

Sommaire

Avant propos	2
Chapitre I Manipulation de micro et nano objets.....	7
1. Contexte du projet.....	8
2. Micro nano robotique.....	10
2.1 Miniaturisation du bras de manipulation : AFM.....	10
2.2 Manipulation en milieu liquide : les pinces optiques.....	12
3. Mécanisme d'auto-assemblage	13
3.1 L'auto-assemblage en biologie.....	14
3.2 Auto-assemblage dirigé, l'exemple de l'origami à ADN.....	15
3.3 L'ADN pour l'auto-assemblage de nanoparticules	18
4. Assemblage dirigé.....	20
4.1 Un outil historique : le peignage d'ADN.....	20
4.2 Assemblage capillaire : comment se forment les tâches de café ?	22
4.3 Contrôle du ménisque en assemblage capillaire : vers la fabrication de lignes	23
4.4 Les micro/nanotechnologie au service de la manipulation d'objets.	25
4.4.1 Texturation des surfaces : vers le contrôle du placement d'objets individuels.....	25
4.4.2 La nanofluidique au service de la manipulation d'ADN.....	29
5. Motivations pour notre travail expérimental.....	34
Chapitre II Micro et Nano Fabrication pour la réalisation de structures micro- et nano-fluidiques	36
1. Introduction générale	37
2. Fabrication de moules de micro-impression.....	38
2.1 Spécifications sur la dimension des structures.....	38
2.2 Procédé de fabrication.....	38
2.3 Revêtement des surfaces	40
3. Procédés de fabrication de nanostructures.....	41
3.1 Lithographie électronique	42
3.1.1 Principe.....	42
3.1.2 Procédé.....	43
3.1.3 Résultats expérimentaux	45
3.1.4 Conclusions sur la lithographie électronique	47
3.2 Lithographie par projection.....	48
3.2.1 Principe.....	48
3.2.2 Procédé.....	49
3.2.3 Résultats expérimentaux	49
3.2.4 Conclusions sur la lithographie par projection.....	50
3.3 Photolithographie par contraste de phase avec le PDMS	50

3.3.1	Principe.....	51
3.3.2	Procédé.....	52
3.3.3	Résultats expérimentaux	52
3.3.4	Comparaison des trois méthodes de nanofabrication	53
4.	Intégration des nanocanaux dans des microsystemes fluidiques	55
4.1	Comparaison des matériaux pour la nanofluidique	56
4.2	Réalisation de nanocanaux intégrés en silicium	57
4.3	Dispositifs en PDMS	59
4.3.1	Moulage/démoulage du PDMS	61
4.3.2	Perçage	61
4.3.3	Collage	62
5.	Manipulations fluidiques	63
5.1	Remplissage et Revêtement des surfaces.....	63
5.2	Actionnement des fluides dans les puces nanofluidiques	63
5.3	Préparation d'ADN	64
6.	Microscopie.....	66
6.1	Spécification du dispositif optique pour le suivi de molécules uniques	66
6.2	Descriptif du montage optique.....	66
6.2.1	Source de lumière.....	67
6.2.2	Filtres.....	68
6.2.3	La caméra EMCCD, et la taille des pixels	68
Partie III Assemblage dirigé de micro et nano objets sur hydrogel structuré		71
1.	Introduction.....	72
2.	Description des hydrogels utilisés	74
2.1	Structure des monomères.....	74
2.2	Polymérisation	74
3.	Fabrication et caractérisation d'hydrogels structurés	76
3.1	Fonctionnalisation de surface pour le greffage physique d'hydrogels ..	76
3.2	Fabrication de gel texturé.....	77
3.3	Caractérisation topographique des gels	79
4.	Assemblage dirigé de nano-objets sur motifs linéaires.....	81
4.1	Assemblage : rôle de la taille des particules	81
4.2	Assemblage : rôle de la nature physique des particules.....	82
4.3	Assemblage : rôle de l'eau emprisonnée dans le gel	85
4.4	Détermination du rendement d'alignement	85
5.	Etude des mécanismes d'assemblage.....	87
6.	Assemblage dirigé sur des motifs complexes	91
7.	Réalisation de structures en multicouches	92
7.1	Transfert des motifs par plasma oxygène	93
7.2	Transfert des motifs sur une autre surface par impression.....	95
7.3	Comparaison des résultats avec le PDMS	96
8.	Applications des hydrogels pour les biotechnologies.....	97
8.1	Validation pour les biopuces	97

8.2 Culture cellulaire avec le copolymère acrylamide-acide acrylique	99
9. Conclusions et perspectives	102
Partie IV Manipulation de molécules d'ADN individuelles dans des réseaux de canalisations nanofluidiques	104
1. Introduction.....	105
1.1 Quelques éléments sur la physico-chimie de l'ADN	105
1.2 Intérêt de l'ADN pour les physiciens.....	106
1.3 Nanofluidique et manipulation d'ADN	108
2. Manipulation de l'ADN par électrophorèse.....	110
2.1 Comportement de l'ADN à l'entrée dans les nanocanaux.....	110
2.2 Mesure de la mobilité de l'ADN- λ dans les nanocanaux	113
2.3 Migration anormale dans le PDMS à forts champs électrique	116
2.4 Élongation d'ADN	117
2.4.1 Influence du confinement dans les nanocanaux en PDMS	117
2.4.2 Influence de la salinité dans les nanocanaux en PDMS	119
2.5 Conclusions : limites et avantages du PDMS pour les expériences de nanofluidique en électrophorèse	121
3 Manipulation d'ADN par flux hydrodynamique	122
3.1 Description du comportement de l'ADN à l'entrée des nanocanaux ..	124
3.2 Élongation de l'ADN avec un champ hydrodynamique	127
3.3 Relaxation d'ADN	131
3.4 Interprétation des résultats	133
3.5 Un exemple d'application	134
3.5.1 Analyse en taille de fragments d'ADN	134
3.5.2 Manipulation d'ADN génomique.....	136
4 Conclusions et perspectives	137
Conclusions et perspectives	138
Annexe A1 : du soft au hard-PDMS	140
Annexe A2 : Protocole de culture cellulaire sur polyacrylamide	141
Annexe A3 : Extraction d'ADN Génomique de cellules animales.....	143
Bibliographie.....	144

Chapitre I

Manipulation de micro et nano objets

1. Contexte du projet

Au cours de cette thèse, nous avons développé de nouveaux outils dédiés à la manipulation spatiale et conformationnelle de nano-objets et de biomolécules. Ce travail est au cœur des préoccupations des activités technologiques modernes, qui cherchent à développer de nouveaux procédés pour la réalisation de nanocomposants aux fonctions variées : électroniques, optiques, thermiques, ou biotechnologiques pour n'en citer que quelques unes. De fait, deux solutions technologiques pour réaliser ces nouveaux composants sont envisageables, l'approche ascendante ou l'approche descendante (Fig. I.1). L'approche descendante vise à miniaturiser des procédés macroscopiques pour réaliser des structures fonctionnelles de petites dimensions. Elle a connu un succès immense, en particulier via les techniques de photolithographie, qui permettent d'imprimer des motifs sur des surfaces de plusieurs centaines de cm^2 avec une précision micrométrique. Ces technologies buttent sur deux inconvénients majeurs : (i) elles ne peuvent pas être réduites à l'infini, sachant que les composants électroniques actuels peuvent contenir des composants élémentaires mesurant de l'ordre de 30-40 nm ; (ii) il est difficile de combiner les procédés standard du « silicium », si performants soient-ils, à des matériaux hétérogènes, qui ouvrent la voie à une diversification des offres technologiques. Une hypothèse actuelle est que l'on atteindra d'ici une dizaine d'années (les délais sont discutés) les limites de ces méthodes de fabrication. Aussi, les scientifiques cherchent-ils à ouvrir de nouvelles voies pour affronter le challenge des nanotechnologies, et proposer une offre diversifiée en nanosystèmes. Les technologies de fabrication ascendantes visent à utiliser les nanostructures issues de la chimie, de la physique, ou de la biologie, qui sont associées à une grande variété de fonctions, pour concevoir les composants du futur. Dans cette stratégie, l'enjeu n'est pas de réaliser les unités fonctionnelles les plus petites possibles, puisqu'elles existent déjà et constituent la boîte à outil du technologue. En revanche, les problèmes d'intégration des nano-objets, c'est-à-dire leur asservissement précis dans un environnement contrôlé par l'homme pour réaliser une opération déterminée, reste un challenge. Il est clair que les approches

ascendantes et descendantes ne doivent pas être vues comme indépendantes, et un objectif pour le futur proche est de réussir leur mariage en utilisant la boîte à outil de la microfabrication conventionnelle et de la compléter avec de nouveaux objets présentant des propriétés originales.

C'est dans cette direction que notre travail de thèse s'est orienté : nous avons exploité les ressources technologiques du LAAS pour réaliser des micro ou nanostructures, qui nous ont permis de développer de nouveaux outils dédiés à la manipulation d'objets. Aussi, dans ce premier chapitre, nous avons choisi de faire une présentation, non exhaustive, des solutions mises en œuvre dans la littérature pour manipuler spatialement des nano-objets ou des biomolécules en milieu liquide. A la suite de cette introduction, nous situerons les enjeux de ces recherches, avant d'aborder notre travail personnel.

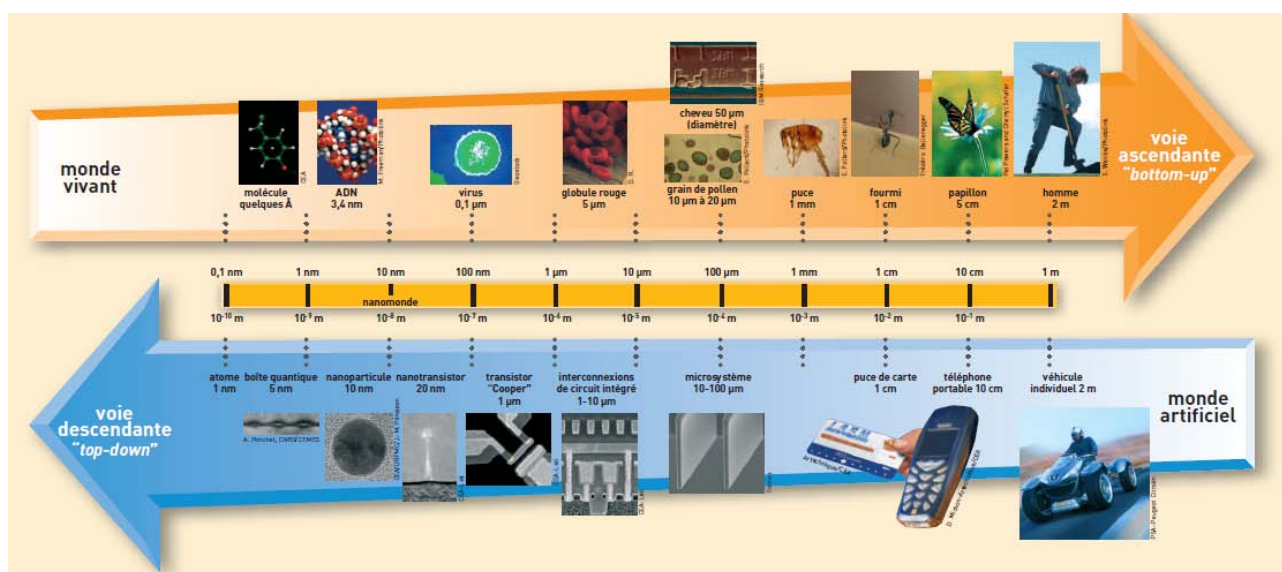


Figure I.1 : Mise en perspective des approches de fabrication ascendante, qui sont le fruit de processus d'assemblage spontané de molécules élémentaires pour former un édifice complexe, et descendante où l'objet macromoscopique est spécifié par l'ingénieur, qui définit les composants élémentaires nécessaires au fonctionnement du circuit.

2. Micro nano robotique

Nous envisageons d'abord quelques approches de manipulation obtenues à partir du déplacement physique d'un effecteur. Ces méthodes sont proches de celles de la robotique, qui a connu un succès considérable à l'échelle macroscopique (pour s'en convaincre, il suffit de réaliser la succession d'opérations complexes réalisées pour l'assemblage d'une voiture). L'idée sous-jacente est de miniaturiser les opérations de déplacement afin de construire des édifices complexes à l'échelle du nanomètre. Cette approche, dite « cathédrale », a connu divers succès, dont nous présentons quelques résultats dans la suite.

2.1 Miniaturisation du bras de manipulation : AFM

Le microscope à force atomique (AFM) est un microscope à sonde locale qui sert avant tout à visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. En mesurant les interactions entre la surface et une pointe de dimension nanométrique montée sur un microlevier dont la déviation est suivie avec l'optique, il est possible de déduire des informations sur les surfaces à l'échelle du dixième de nanomètre (Jalili and Laxminarayana 2004). Dans sa configuration classique, la pointe d'un AFM est reliée à un moteur de déplacement 3 axes nanométrique afin de balayer la surface à représenter, et d'agir sur celle-ci avec une boucle de rétroaction. L'AFM présente l'avantage de pouvoir être utilisé en milieu liquide, et de nombreuses recherches ont été menées pour l'adapter à la manipulation et au positionnement d'objets avec une précision de quelques nanomètres (Junno, Deppert et al. 1995). Dans la Figure I.2, nous présentons un exemple de manipulation de nanoparticules GaAs par AFM, qui permet de réaliser un motif en ligne.

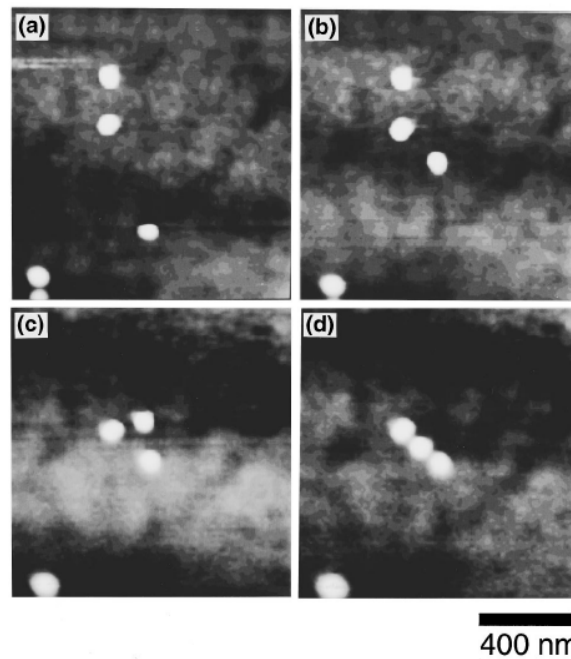


Figure I.2 : Séquences d’images obtenues par AFM montrant l’assemblage de nanoparticules en GaAs de 40 nm selon un motif en ligne. La surface de l’échantillon est elle-même constituée de GaAs, et la pointe de l’AFM est utilisée pour diriger les particules jusqu’à leur position cible. Figure tirée de (Junno, Deppert et al. 1995)

Si cette approche permet de réaliser des expériences de principe tout à fait séduisantes, elle présente deux inconvénients majeurs. C’est d’abord une méthode à bas débit, puisque l’on contrôle *a priori* une seule pointe, qui permet de manipuler une seule particule à la fois. Notons que de nombreuses recherches sont menées pour fabriquer des systèmes à pointes multiples, en particulier pour des applications en biodétection parallélisées (Liu 2008). Dans l’hypothèse où l’on pourrait reproduire la même opération pour construire plusieurs objets en parallèle, cette approche pourrait améliorer le débit de fabrication. Cela dit, cette hypothèse n’a pas encore été démontrée. La manipulation par AFM souffre d’un second problème lié au fait que les forces d’interactions entre les particules, la pointe et la surface doivent être contrôlées finement pour réaliser les opérations de déplacement. Or, cette condition limite les choix en matière de type de particules et de surface sous-jacente. Nous présentons dans la suite une méthode de manipulation sans contact physique entre l’effecteur et la particule, ce qui permet de s’affranchir de ces problèmes d’interaction.

2.2 Manipulation en milieu liquide : les pinces optiques

Le dispositif des pinces optiques est fondé sur l'utilisation d'un faisceau de lumière focalisé, en général un faisceau laser de forte puissance (de l'ordre du Watt) dans le proche infrarouge (1064 nm). Le gradient d'intensité de lumière agit sur des particules diélectriques, confinant les particules au centre du faisceau (Grier 2003). On parle de piège optique. La position du piège peut être déplacée spatialement, en général avec des miroirs galvanométriques, pour réaliser des opérations de déplacement avec une précision de déplacement de 5 nm minimum (Svoboda and Block 1994). Enfin, l'utilisation de dispositif à modulation spatiale de la lumière (Sinclair, Jordan et al. 2004), il est possible de « multiplier » les pièges optiques dans un champ de microscope afin de paralléliser les opérations de manipulation, comme le montre la figure I.3. Cette opération peut être généralisée à des particules en polystyrène et en silice et pour des déplacements en 2D ou 3D.

Selon la réponse diélectrique de la particule, ce dispositif permet de générer des forces supérieures à 100 pN (Ghislain, Switz et al. 1994; Litvinov, Shuman et al. 2002; Rohrbach and Stelzer 2002) avec une résolution minimum de 100 aN (Gittes and Schmidt 1998; Gittes and Schmidt 1998; Pralle, Prummer et al. 1999). De fait, la réponse diélectrique dépend du volume de la particule, et donc les petites particules sont plus difficiles à piéger que les plus grosses.

Pour finir, il est intéressant de noter que l'application « phare » des pinces optiques est avant en biophysique, puisqu'en attachant une molécule d'ADN à la particule piégée, il est possible de réaliser une manipulation spatiale et de simultanément mesurer la force qui lui est imposée.

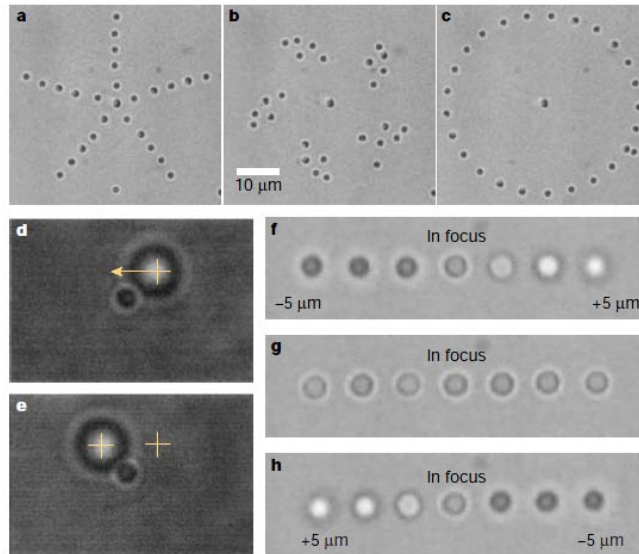


Figure I.3 : Particules de polystyrène et de silice piégées en 2D et 3D avec des pinces optiques parallélisées grâce à un système holographique. Figure tirée de (Grier 2003)

Les pinces optiques constituent un outil précieux en biophysique, mais son potentiel technologique souffre de trois inconvénients : (i) cette technologie doit être mise en œuvre à travers un substrat optique en verre, alors que le matériau roi en technologie est le silicium ; (ii) la réponse optique est faible pour des objets de petite dimension, si bien qu'il n'est pas clair que cette méthode est adaptée aux nano-objets ; et (iii) la manipulation est limitée à un champ de microscope optique, ce qui constitue une petite surface de quelques centaines de μm^2 à comparer aux centaines de cm^2 pour les technologies classiques.

Après la présentation de ces méthodes de manipulation proches de la robotique, nous nous proposons de décrire les méthodes d'assemblage de nano-objets par auto-organisation, qui se produisent spontanément via des procédés d'association moléculaires.

3. Mécanisme d'auto-assemblage

En matière de stratégies de synthèse, la nature offre un panorama exceptionnel de

diversité et de sophistication. L'exemple des cellules est éloquent : l'assemblage de protéines, d'acides nucléiques, et de lipides conduit à la formation de cellules, qui sont des objets macroscopiques compartimentés capables de se répliquer et d'interagir avec leur environnement. La formation d'une cellule est guidée par des phénomènes d'auto-assemblage déterminés par des interactions à l'échelle moléculaire spontanée. La complexité des mécanismes d'auto-assemblage suggère qu'il est possible de développer des stratégies de fabrication d'objets complexes à partir d'événements d'interaction prédit. Nous nous proposons de présenter quelques résultats marquants de cette stratégie de fabrication dans la partie suivante.

3.1 L'auto-assemblage en biologie

L'auto-assemblage moléculaire est le phénomène par lequel des molécules forment par elles-mêmes des structures avec un haut degré d'organisation sans intervention externe. L'auto-assemblage intramoléculaire et intermoléculaire peut être distingué. Le premier mécanisme guide à la formation de conformation spécifique de biomolécules, alors que le second tend à former des assemblages supramoléculaires. Ces assemblages supramoléculaires peuvent être constitués de deux objets, comme dans le cas d'une liaison à forte affinité entre un antigène et un anticorps, mais aussi de multiples objets, qui s'associent dans un édifice structuré à grande échelle (on pense par exemple à une bicouche lipidique).

Les mécanismes d'auto-assemblage sont initiés à partir d'éléments structuraux nanométriques, qui grandissent progressivement pour former des édifices de grande dimension. La structure finale est donc « encodée » dans la forme et les propriétés des molécules initiatrices. L'enjeu de ces sujets de recherche est donc de comprendre les mécanismes d'assemblage afin de prédire et d'orchestrer leur enchainement. Cette approche est ascendante laisse entrevoir la possibilité de créer des nanomatériaux dont

toutes les unités structurales sont contrôlées de l'échelle nanométrique jusqu'à l'échelle mésoscopique.

L'auto-assemblage est *a priori* une stratégie de fabrication adaptée à un grand nombre de molécules, mais c'est avec l'ADN que les recherches ont été les plus fructueuses. L'auto-assemblage avec l'ADN consiste à utiliser la spécificité des interactions entre paire de bases dans la double hélice d'ADN pour fabriquer des édifices moléculaires, que nous proposons de décrire dans le paragraphe suivant.

3.2 Auto-assemblage dirigé, l'exemple de l'origami à ADN

La biologie moléculaire s'est dotée de filières de production d'ADN très fiable. En effet, pour les besoins d'applications aussi centrales que le séquençage, il est nécessaire de disposer d'amorces pour la réaction de PCR, qui sont constitués de segments d'ADN simple brin de 20 pb (paires de bases) environ. L'ADN constitue donc un matériau stable en conditions aqueuses et synthétisable en grande quantité, dont la séquence est connue et les propriétés d'appariement finement comprises. Cette situation unique a permis aux chercheurs d'être très innovants et d'utiliser l'ADN pour de multiples applications biotechnologiques. On peut donc dire que l'ADN a été détourné de sa fonction biologique pour devenir un matériau technologique, en particulier sous la forme d'origami.

Avant d'aller plus loin dans notre description de la structure des origamis à ADN, revenons sur la définition de la flexibilité des polymères. On caractérise la flexibilité d'un polymère par sa longueur de persistance ξ , qui est la longueur au bout de laquelle les corrélations d'orientation le long d'une chaîne sont perdues du fait des fluctuations thermiques. Pour l'ADN simple brin, cette longueur de persistance vaut quelque nm (en conditions dénaturantes, (Tinland, Pluen et al. 1997)). En revanche, l'empilement des paires de bases dans une structure en double hélice se traduit par

une rigidité plus importante de l'ADN double brin par rapport à ses deux brins constitutifs. ξ vaut de l'ordre de 50 nm (soit 150 bp, (Bustamante, Smith et al. 2000)).

Développé par P. Rothemund au « California Institute of Technology » (Douglas, Dietz et al. 2009), l'origami à ADN est fondé sur le repliement d'une longue molécule d'ADN simple brin guidé par plusieurs petits brins complémentaires "discontinus", appelés agrafes (figure I.4, gauche). Cette série d'agrafes se lie par complémentarité de séquence avec des régions ciblées du substrat souple, qui deviennent donc plus rigides puisque sous forme d'ADN double brin. Le repliement de l'ADN est guidé à l'échelle nanométrique pour créer des formes de deux et trois dimensions à l'échelle nanométrique (Fig. I.4, droite).

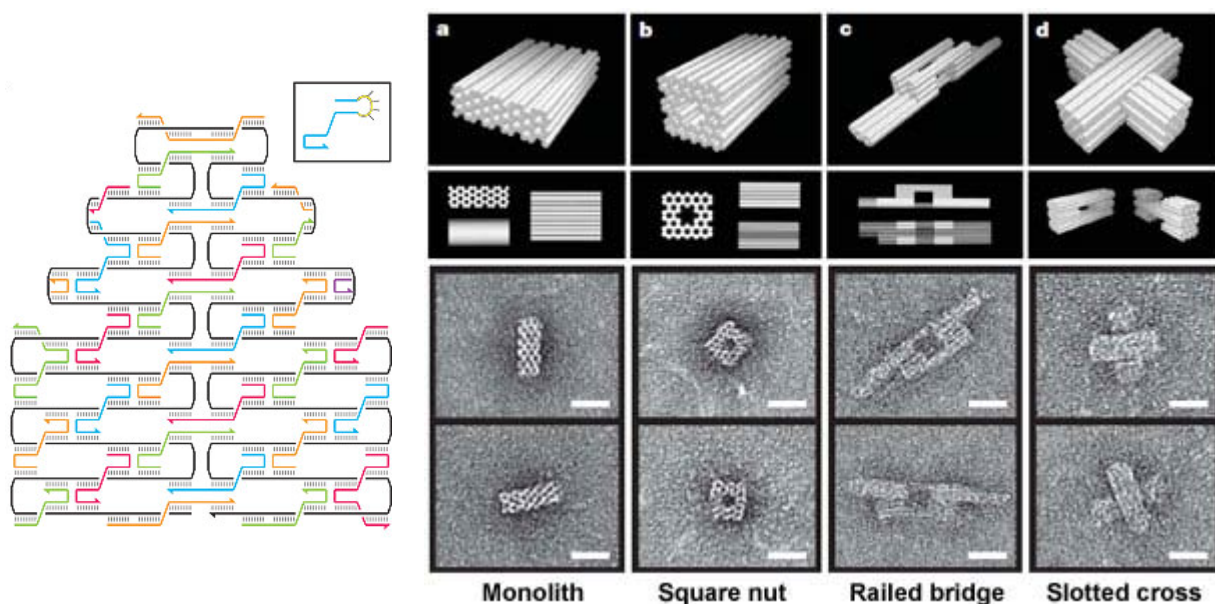


Figure I.4 : La figure de droite présente le principe de repliement d'un ADN substrat (fil noir) avec une série d'agrafes (segments colorés) pour former une structure en forme de rectangle. Ce schéma de construction est généralisé pour générer une série d'objets en 3D, la barre d'échelle représente 20 nm. Figure tirée de (Douglas, Dietz et al. 2009)

Pour comprendre comment un brin d'ADN peut devenir un objet technologique, il faut souligner que les amorces de 20 bp du commerce sont accessibles avec une série de modifications chimiques (groupement thiol ou COOH...), biologiques

(biotine ou digoxigénine), physiques (fluorophores ou fonctions Redox). Ces sites peuvent ainsi être insérés à n'importe quelle position de l'origami, ce qui en fait un nano-objet plurifonctionnel et dont la synthèse est contrôlée à toutes les échelles. Il est important de noter que la synthèse de ces nano-objets est effectuée en volume, et que, contrairement aux approches de fabrication inspirées de la robotique, il n'y a pas de limitation en termes de débit.

Ainsi, ces recherches semblent être promises à un grand avenir pour la synthèse de nouveaux nanomatériaux aux propriétés riches et dont l'architecture est contrôlée à toutes les échelles. Il existe toutefois un verrou pour ces technologies d'auto-assemblage lié au fait qu'il est difficile de réaliser des structures plus grandes que ~100 nm (la taille des plus gros origamis à ADN présentés dans littérature). Autrement dit, il n'est pas évident d'utiliser les structures fabriquées avec de l'ADN dans une architecture fonctionnelle. Pour lever ce verrou, les chercheurs d'IBM (Kershner, Bozano et al. 2009) ont proposé en 2009 d'utiliser les technologies de fabrication conventionnelles pour contrôler l'assemblage d'origami sur des surfaces (Fig. I.5). Grâce à la lithographie électronique, ils ont imprimé des fonctions chimiques sur des surfaces, avec des régions hydrophobes (silanes) et hydrophiles (verre activé), ce qui se traduit par des patrons d'affinité pour les origamis à ADN. C'est un exemple de mariage réussi entre technologies ascendante et descendante, qui ouvre la voie à une intégration précise d'origami à ADN sur des surfaces, et donc à l'utilisation de nouvelles structures pour les nanotechnologies.

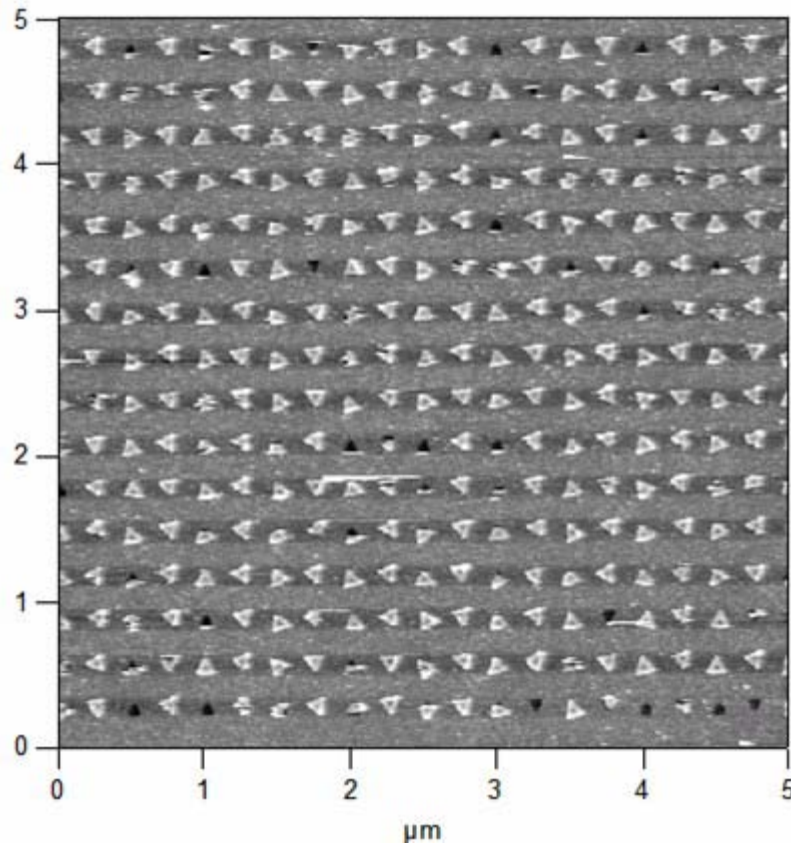


Figure I.5 : Images par microscopie à force atomique d'origami à ADN en forme de triangles assemblées sur une surface imprimée de motifs réguliers. Les motifs sont constitués de silanes aminés (de charge positive), avec une forte affinité pour l'ADN. Figure tirée de (Kershner, Bozano et al. 2009)

3.3 L'ADN pour l'auto-assemblage de nanoparticules

Nous proposons de décrire un autre axe de recherche dans lequel le potentiel de l'ADN pour la nanoconstruction par auto-assemblage est démontré, à savoir l'assemblage de nanoparticules en utilisant l'ADN simple brin comme ciment de construction.

Pour aborder ce sujet, mentionnons d'abord que les procédés de chimie pour la synthèse de nano-objets aux dimensions et aux fonctions calibrées sont toujours plus nombreux. Ils offrent donc une boîte à outils très importante pour la conception de nanosystèmes. Toutefois, comme dans le cas des origamis à ADN, le problème est

d'intégrer ces nano-objets dans ces structures fonctionnelles, soit en les associant dans des structures macroscopiques, soit en les déposant de manière contrôlée sur des surfaces.

L'idée de décorer la surface de nanoparticules avec de courts segments d'ADN simple brin a été proposée par Mirkin et collaborateurs en 1996 (Mirkin, Letsinger et al. 1996). Si les brins sont complémentaires, ils s'associent spontanément pour former une structure en double hélice, ce qui guide l'agrégation des nanoparticules. Il est important de noter que Mirkin a plus récemment démontré la possibilité de réaliser des structures cristallines formées à partir de nanoparticules d'or en choisissant bien les séquences des brins complémentaires (Mirkin, Letsinger et al. 1996). Cette stratégie peut aussi être adaptée à d'autres types de particules, en particulier les nanoparticules d'Aluminium et d'oxyde de cuivre. L'alliage Al/CuO est fortement énergétique, et il a été utilisé historiquement pour souder des rails de train. L'optimisation des propriétés de ces alliages semble devoir passer par les nanoparticules afin d'augmenter les surfaces spécifiques en matériaux et ainsi augmenter le stockage d'énergie. Mes collaborateurs du LAAS ont montré qu'il est possible de décorer la surface des particules d'Aluminium et d'oxyde cuivre avec des traitements chimiques spécifiés dans la Figure I.6, puis de diriger l'assemblage d'un matériau composite Al/CuO dont la densité énergétique est parmi les meilleures recensées dans la littérature (Séverac, F. et al. 2011).

Les limites de cette stratégie d'assemblage de nanoparticules par ADN résident dans l'intégration de ces solides obtenus. En effet, les procédés de synthèse sont volumiques, et il est difficile de positionner un agrégat de nanoparticules dans un système afin de pouvoir l'exciter dans le cadre d'une opération donnée (par exemple la mise à feu d'un matériau énergétique pour le décollage d'une fusée).

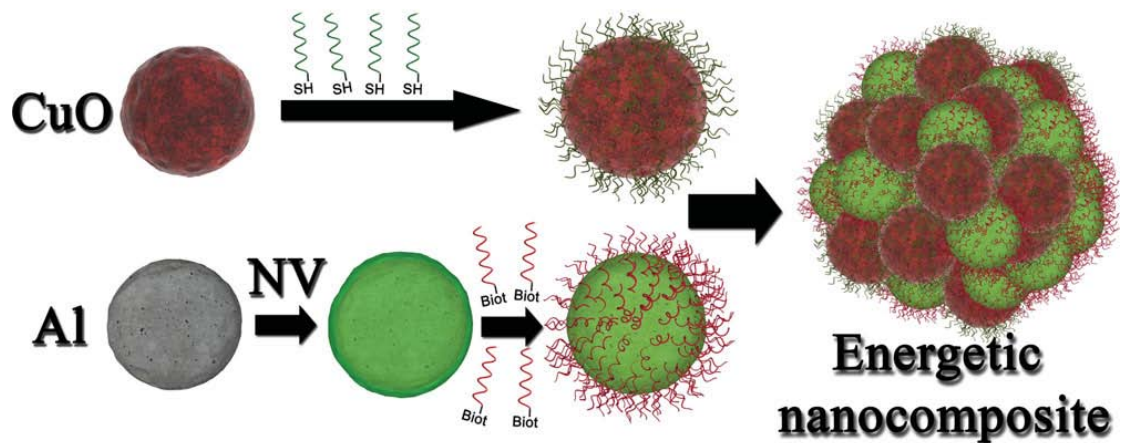


Figure I.6 : Principe de fabrication d'un solide de nanoparticules d'Aluminium et de d'oxyde de cuivre. L'ADN simple brin est greffé via un groupement thiol (SH) pour CuO, et on utilise la neutravidine (NV) pour recouvrir la surface d'aluminium, puis des ADN biotine (biot). Les deux séquences sont complémentaires, ce qui permet d'assembler un matériau composite énergétique. Figure tirée de (Séverac, F. et al. 2011)

4. Assemblage dirigé

La troisième stratégie d'assemblage que nous souhaitons décrire maintenant repose sur l'utilisation de phénomènes physiques permettant d'organiser spatialement des nano-objets, ou de manipuler des biomolécules dans l'espace des conformations. Ce champ disciplinaire est très vaste, et nous fournissons quelques exemples qui illustrent de manière convaincante le potentiel de cette stratégie de recherche technologique.

4.1 Un outil historique : le peignage d'ADN

Le peignage d'ADN (DNA combing en anglais) est un outil de manipulation d'ADN central, car il a inspiré nombre de travaux pour l'assemblage de nano-objets et de biomolécules. Il a été découvert de manière fortuite : à la fin du séchage d'une goutte contenant de l'ADN déposée sur une lame de verre rendue hydrophobe par un

traitement au silane, les molécules d'ADN sont étirées longitudinalement à la surface du verre (Allemand, Bensimon et al. 1997). Ce processus peut être dirigé si l'on contrôle le mouvement d'un ménisque (Fig. I.7) et les molécules d'ADN se retrouvent étirées suivant une direction déterminée. Ce phénomène est dû à l'adsorption des extrémités de l'ADN sur les surfaces hydrophobes à pH acide (optimal à pH=5,5, (Allemand, Bensimon et al. 1997)), puis le ménisque tire l'extrémité libre de l'ADN et accroche de proche en proche la molécule sur la surface. Les forces d'étirement sont importantes dans la mesure où l'ADN adopte sa conformation sur-étirée pendant l'opération (sa longueur est multipliée par un facteur de 1,5 par rapport à la longueur cristallographique). Cet outil s'est révélé particulièrement pertinent pour la biologie moléculaire, car il est adapté à la manipulation d'ADN génomique, et, en le combinant aux outils de marquage avec les anticorps, il est possible de révéler des structures biologiques à l'échelle de la molécule individuelle.

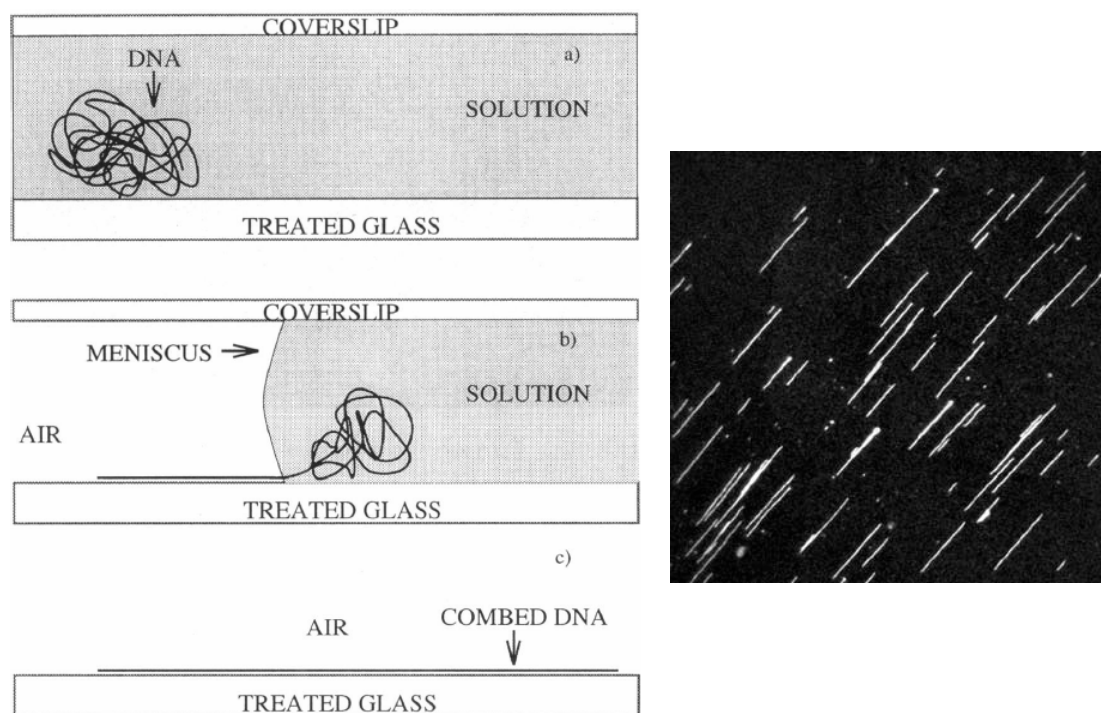


Figure I.7 : Principe de peignage d'ADN (a) ADN incubées à un pH adéquat sur une surface traitée se lie spontanément par un (ou deux) extrémités à la surface. (b) Quand l'interface passe, l'ADN est étiré perpendiculairement au ménisque recule (c) Il est laissé linéarisé et sec après le ménisque. Figure tirée de (Allemand, Bensimon et al. 1997)

Il souffre de deux inconvénients principaux : (i) l'ADN est étiré de manière aléatoire sur la surface, ce qui complique la détection systématique des molécules sur une surface ; (ii) le collage de l'ADN sur la surface est délicat à réaliser de manière reproductible, et la surface peut être contaminée ce qui rend la détection par fluorescence délicate.

4.2 Assemblage capillaire : comment se forment les tâches de café ?

Les ménisques de liquide permettent d'étirer de molécules d'ADN individuelles, mais aussi de manipuler des nano-objets grâce au mécanisme d'assemblage capillaire. Le phénomène est connu de tous : le séchage d'une tâche de café se traduit par la formation d'une auréole noire, associée à l'accumulation des particules de café sur les bords de la goutte (Fig. I.8a). Ce phénomène a été décrit par Deegan et ses collaborateurs (Deegan, Bakajin et al. 1997), sous le terme d'assemblage capillaire. Du fait de la finesse du film de liquide sur les bords de la goutte, l'évaporation y est accrue, ce qui se traduit par un flux hydrodynamique dans la goutte en direction du ménisque. Ce phénomène, qui permet de diriger des nano-objets à des positions privilégiées, a été mis en évidence en utilisant des particules fluorescentes (Fig. I.8b). La taille des motifs ainsi imprimés est de l'ordre de quelques millimètres, mais il a été proposé d'utiliser cet effet pour distribuer de particules à l'échelle de quelques microns (Govor, Reiter et al. 2004)

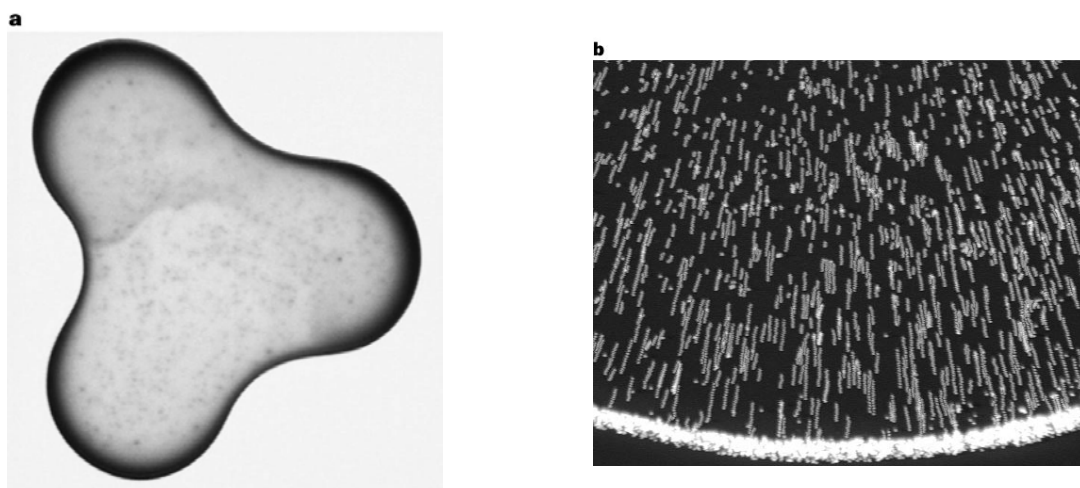


Figure I.8 : Mécanisme d'assemblage capillaire. (A) Photographie d'une tache de café de ~2 cm de diamètre à la fin du séchage de liquide. Les bords sont sombres du fait de l'accumulation de colloïdes sur les bords. (B) Le comportement de nanoparticules fluorescentes suivies par microscopie est représenté. Le mouvement des particules dans le fluide est montré avec de multiples expositions superposées sur l'image. Figure tirée de (Deegan, Bakajin et al. 1997)

La principale limitation de cette technologie provient du faible nombre de structures qu'elle permet de générer : des cercles de diamètre en général millimétrique, dans lesquels on contrôle mal le nombre de particules assemblées. Le succès de ces travaux est avant tout académique, car les flux capillaires spontanés ayant lieu pendant le séchage d'une goutte constituent un beau modèle physique.

4.3 Contrôle du ménisque en assemblage capillaire : vers la fabrication de lignes

De nombreuses innovations ont été proposées pour palier aux limitations de l'assemblage capillaire, afin d'en faire une technologie robuste pour la manipulation spatiale de nano-objets. Une idée intéressante consiste à utiliser les effets d'assemblage capillaire en contrôlant la position du ménisque au cours du temps grâce à un moteur pas à pas. Plus précisément, on déplace le ménisque par saccades avec

des intervalles de temps et d'espace déterminés (Huang, Tao et al. 2006). Le temps entre deux déplacements est ajusté afin de former une ligne de nanoparticules au niveau du ménisque (figure I.9). Ce procédé permet de réaliser des séries de lignes répétées avec un intervalle de dimension de $\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ ou plus. Le type de particules est unique mais on peut répéter l'opération avec plusieurs types de particules successivement.

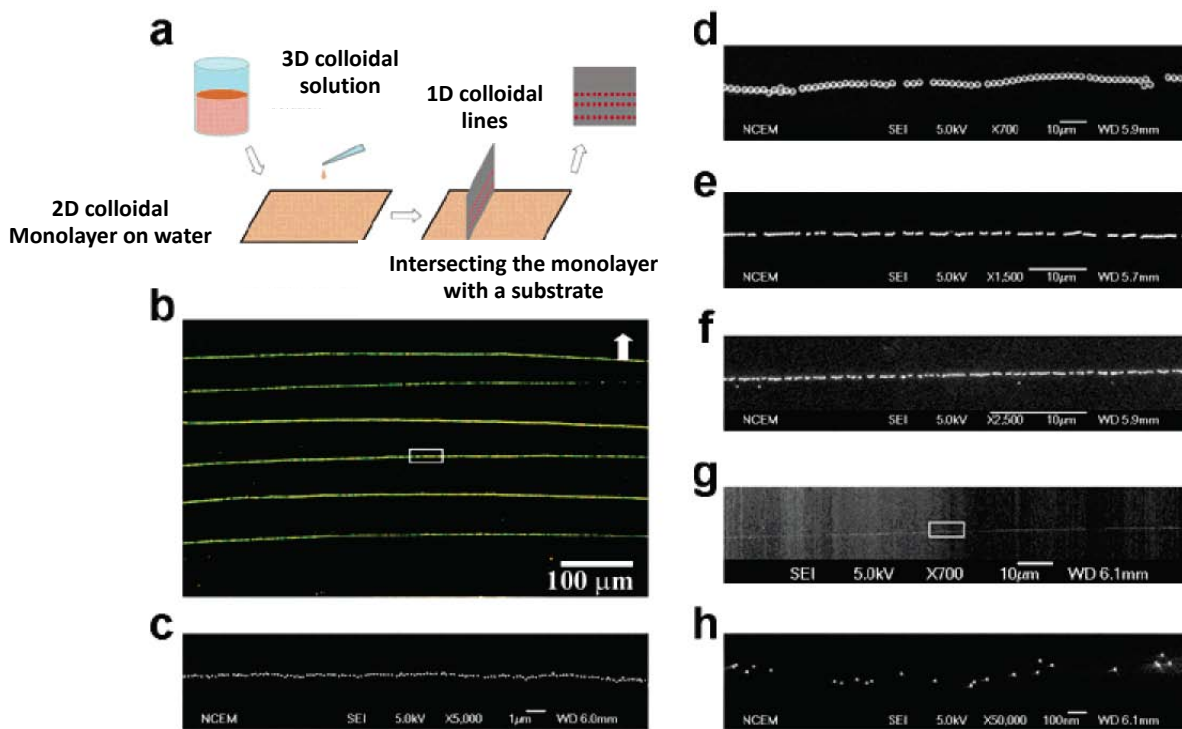


Figure I.9 : Assemblage dirigé de lignes de particules colloïdales. (a) Illustration schématique du procédé. Cette méthode permet de produire des réseaux 1D de particules avec une large gamme de tailles et de matériaux. (b) Photographie de microscopie optique de nanoparticules en Ag (diamètre de 50 nm) assemblées selon des lignes sur un substrat en silicium. (c) Image de microscopie électronique des nanoparticules assemblées dans l'insert blanc de (b). Les images du panneau de droite représentent des clichés de microscopie électronique pour différents types de particules : particules en SiO₂ de (d) 2,3 µm, (e) 450 nm, (f) 160 nm de diamètre, et (g-h) nanoparticules de Pt de 7 nm. Figure tirée de (Huang, Tao et al. 2006)

L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne permet de réaliser que des motifs en ligne, et qu'elle n'est pas adaptée à des réseaux de lignes peu espacés. Ces deux problèmes limitent son potentiel technologique.

4.4 Les micro/nanotechnologie au service de la manipulation d'objets.

4.4.1 Texturation des surfaces : vers le contrôle du placement d'objets individuels

Dans les travaux cités jusqu'à présent, les expériences d'assemblage de nano-objets ou d'ADN sont réalisées sur des substrats « lisses ». Autrement dit, il n'existe pas de position privilégiée le long du front du ménisque pour diriger finement l'assemblage des objets. Les technologies de micro/nanofabrication permettent de texturer les surfaces avec des motifs de différentes géométries et de différentes profondeurs, suggérant ainsi la possibilité de forcer une organisation spatiale plus fine des particules ou des ADN. Cette idée a été mise en œuvre dès 2001 (Yin, Lu et al. 2001), et Yin et ses collaborateurs ont démontré de manière très convaincante la possibilité d'arranger des particules de polystyrène de diamètre variant entre 0,2 et 4 μm à l'intérieur de trous ou de fentes de dimension micrométrique. En réduisant la taille des motifs inscrits dans le substrat grâce à la lithographie électronique (Cui, Bjork et al. 2004), Alivisatos et ses collaborateurs ont montré qu'il était possible d'organiser à grande échelle des nanoparticules de diamètre compris entre 2-50 nm selon des motifs réguliers et à grande échelle (Fig. I.10). Il est intéressant de noter que les surfaces texturées ont été également utilisées pour l'assemblage dirigé de molécules d'ADN selon des motifs réguliers (Cerf, Thibault et al. 2009), ce qui permet d'optimiser la distribution spatiale de molécules.

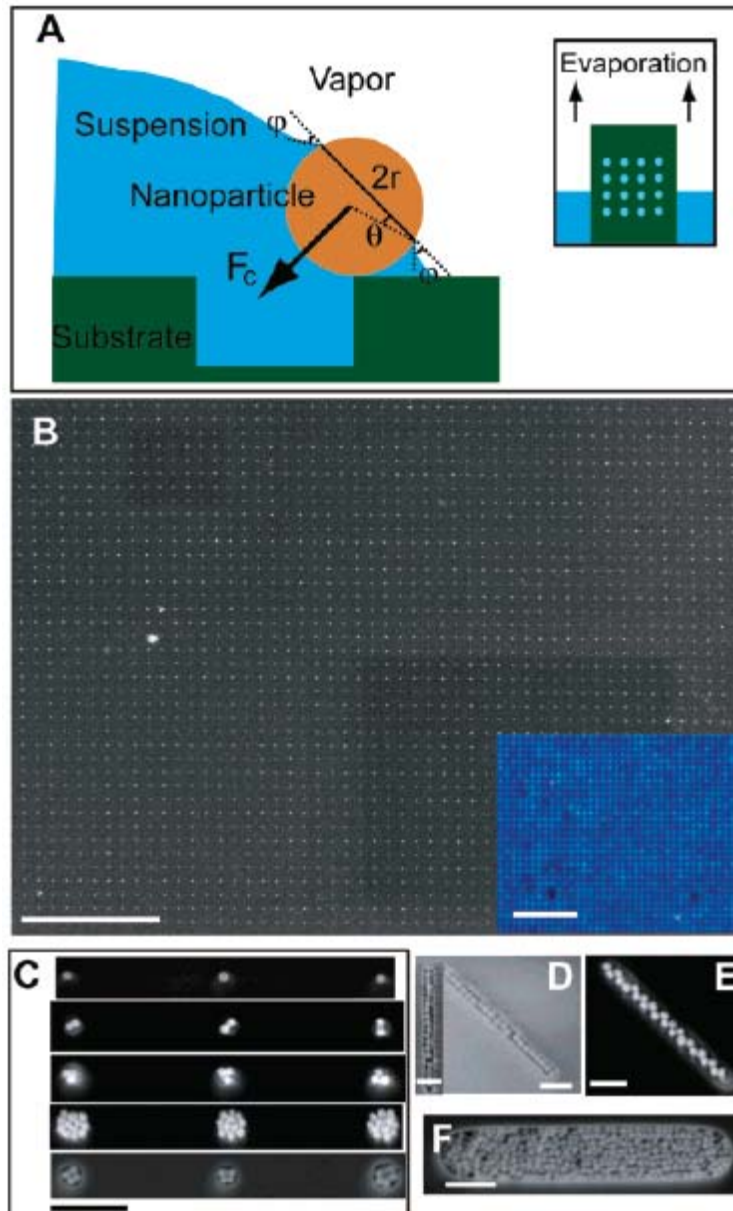


Figure I.10 : Utilisation d'un substrat texturé pour l'assemblage de nanoparticules d'or de 50 nm de diamètre, tiré de (Cui, Bjork et al. 2004). (a) Principe de l'expérience, (b) Résultat de l'assemblage avec des trous réguliers de 60 nm de profondeur et 50 nm de diamètre. (c) La taille des trous varie selon la gamme 50, 100, and 110 nm et le nombre de particules stockées dans les trous est ajusté. (d-e-f) Assemblage dans des motifs en lignes de taille variable. Les barres d'échelle correspondent à 10 μm (A) , 500 nm (C), et 200 nm (D,E, F).

Une contribution décisive dans ce domaine de recherche a été effectuée par les chercheurs d'IBM Zurich (Kraus, Malaquin et al. 2005; Kraus, Malaquin et al. 2007;

Malaquin, Kraus et al. 2007), qui ont cherché à comprendre les mécanismes présidant à l'assemblage de particules sur des surfaces lisses ou texturées. Cette équipe a choisi d'utiliser un substrat en Poly-Diméthyle-Siloxane (PDMS) car son état de surface peut être facilement ajusté : le PDMS est hydrophobe, et il peut être rendu hydrophile avec un traitement rapide au plasma oxygène. Leurs travaux ont été réalisés avec des particules de polystyrène de diamètre $\sim 1\ \mu\text{m}$ et des nanoparticules d'or de 50 nm. Ils décrivent deux différents mécanismes d'assemblage, à savoir l'assemblage capillaire et l'assemblage convectif (figure I.11). L'assemblage convectif est obtenu pour des substrats hydrophiles (l'angle de contact est inférieur à 20°), et l'assemblage est entraîné par le flux convectif induit par l'évaporation au niveau de la ligne de contact. Ce mécanisme conduit, sur des surfaces planes (figure I.11a), à la formation de couches continues 2D de particules, ou à des couches discontinues sur des surfaces texturées (figure I.11c). Pour des angles de contact supérieurs à 20° , les auteurs décrivent le mécanisme d'assemblage capillaire : les forces capillaires induites par le ménisque force le déplacement des objets. Sur un substrat texturé, cette méthode permet de confiner des particules uniques dans des trous (figure I.11d), et aucun dépôt n'est détecté sur une surface lisse (figure I.11b). Dans un développement abouti de cette recherche, les auteurs démontrent l'écriture de forme complexe avec une précision de placement de particules uniques selon des motifs espacés de $\sim 1\ \mu\text{m}$ (Malaquin, Kraus et al. 2007).

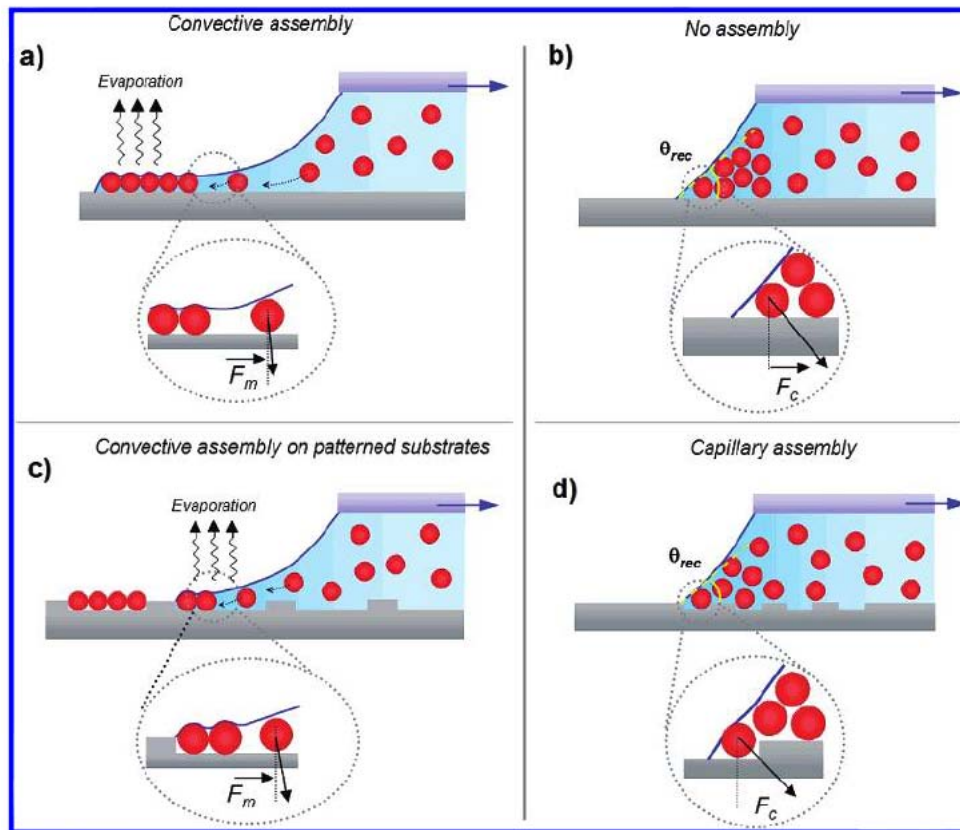


Figure I.11 : Différents mécanismes d'assemblage selon les propriétés de mouillage et de structuration topographique du substrat, tiré de (Malaquin, Kraus et al. 2007).

4.4.2 La nanofluidique au service de la manipulation d'ADN

La microfluidique a connu un succès considérable au cours des 20 dernières années, car les technologies de microfabrication permettent de réaliser un environnement fluide dans lequel toutes les caractéristiques de l'écoulement sont contrôlées (Whitesides 2011). A partir des années 2000 (Napoli, Eijkel et al. 2010), l'idée de fabriquer des structures nanométriques pour manipuler des fluides a été suggérée. Dans des géométries confinées (la dimension des canaux nanofluidique est inférieure à ~ 100 nm), les macromolécules sont confinées, et leur espace conformationnel est contrôlé. Il est donc vite apparu que la nanofluidique était un outil unique pour la manipulation moléculaire, et les études sur l'ADN ont été nombreuses du fait du caractère modèle de ce polymère. Nous proposons de revenir sur les résultats majeurs concernant la manipulation d'ADN par nanofluidique.

Les travaux fondateurs concernant la manipulation de l'ADN en canaux nanofluidique ont été effectués par l'équipe de R. H. Austin (Princeton). Ayant observé le succès considérable du peignage moléculaire, il proposa l'idée de fabriquer des nanostructures pour étirer longitudinalement des molécules d'ADN. Si la dimension d'une canalisation est plus petite que le diamètre d'un polymère à l'équilibre (le rayon de giration d'une chaîne idéale est défini comme $\xi\sqrt{N}$ où ξ est la longueur de persistance et N le nombre de segments de la chaîne), son insertion dans le canal se traduit par un changement conformationnel. Pour un ADN classique de $50 \cdot 10^3$ bp, le rayon de giration vaut $0,7 \mu\text{m}$, et donc les effets de confinement apparaissent en dessous de cette longueur critique. La conformation du polymère est alors guidée par la géométrie des canaux, et dans un nanocanal linéaire l'ADN adopte une configuration étendue selon (P. G. de Gennes, 1979) :

$$\frac{l}{L} = \left[\frac{w\xi}{D^2} \right]^{1/3} \quad (\text{I.1})$$

où L est la longueur de contour de l'ADN, w son diamètre qui vaut ~ 2 nm (CR Calladine, 2004), et D la section du nanocanal. Notez que cette relation est valable

tant que $D > \xi$, et pour des degrés de confinement très important (Odijk 1983), l'étirement suit un comportement différent :

$$\frac{l}{L} = 1 - 0.361 \left[\frac{D}{\xi} \right]^{2/3} \quad (I.2)$$

Ces deux relations démontrent que le degré de confinement, qui est ajusté lors de la phase de fabrication des dispositifs, permet de contrôler le degré d'étirement de l'ADN. Les nanocanaux sont donc un outil de manipulation de molécule individuelle. Ces prédictions ont été testées dans un article d'Austin et collaborateurs, qui ont fabriqué par nano-impression une galerie de nanocanaux de taille variant entre 30x40, 60x80, 80x80, 140x130, 230x150, 300x440, et 440x440 nm², et qui ont mesuré le degré d'élongation de l'ADN dans ces structures (Fig. I.12). Ces auteurs ont montré un accord qualitatif avec les deux modèles et une intersection entre ces deux régimes pour une dimension de nanocanal de ~80 nm (Fig. I.12, droite).

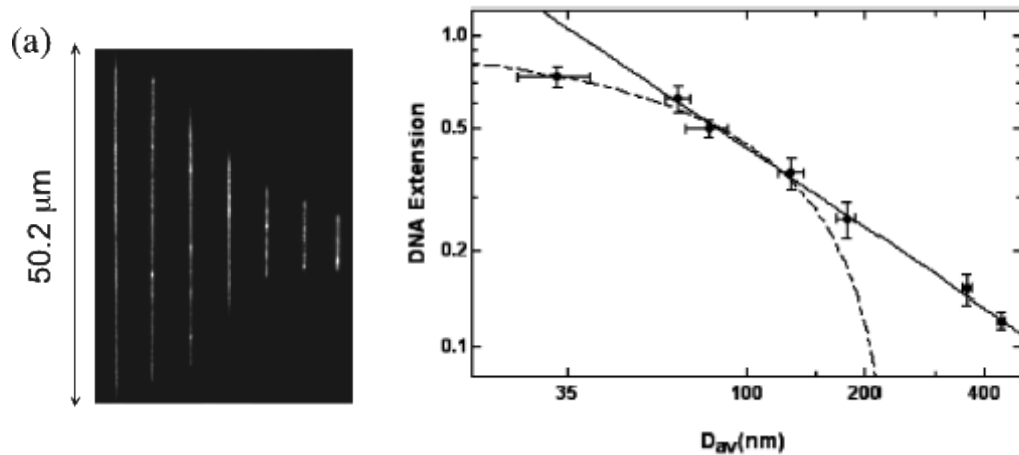


Figure I.12 : L'étirement de molécules d'ADN T2 (164 kbp) dans les canaux de tailles différentes, démontrant que plus le degré de confinement est important, plus l'étirement des molécules est fort. A droite, les données sont analysées de manière quantitative avec le taux d'étirement l/L en fonction de la taille des canaux D . Figure tirée de (Reisner, Morton et al. 2005)

Cette technologie de manipulation d'ADN offre des avantages importants pour la manipulation contrôlée d'une population de molécules : les nanocanaux sont fabriqués de manière collective avec des procédés parallélisés, ce qui ouvre la voie à une observation à haut débit des ADN avec une précision à la molécule individuelle. Il est intéressant de noter que ces recherches innovantes ont été brevetées, et elles ont fait l'objet d'un transfert technologique rapide avec la création de la start-up BioNanoMatrix. Par ailleurs, les expériences réalisées avec des nanocanaux ont conduit à deux contributions plus appliquées : R.H. Austin a démontré l'intérêt de nanocanaux pour la manipulation d'ADN de taille génomique (Tegenfeldt, Prinz et al. 2004), et la possibilité de réaliser de l'analyse de sites de restriction par des nucléases sur molécule unique (Riehn, Lu et al. 2005).

Une faiblesse de cette technologie tient au fait que les forts degrés d'étirement sont obtenus pour des nanocanaux de faible dimension. Or ces structures sont délicates à obtenir. Aussi, plusieurs travaux ont été menés pour améliorer le degré d'étirement pour une géométrie donnée en modulant la force ionique du tampon. En effet, la longueur de persistance de l'ADN augmente lorsque la concentration en sel diminue du fait de l'exaltation de la portée des interactions électrostatiques répulsives entre monomères d'ADN (Baumann, Smith et al. 1997). Riehn et collaborateurs ont ainsi montré que le degré d'élongation pouvait être multiplié par deux dans une canalisation de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ ou $100 \times 100 \text{ nm}^2$ utilisant une solution de TBE 5X ou diluée 100 fois à 0.05X (Fig. I.13a,b). L'augmentation de l'étirement avec la diminution de la force ionique est beaucoup moins marquée dans le cas de nanocanaux à forts confinements (Fig. I.13c).

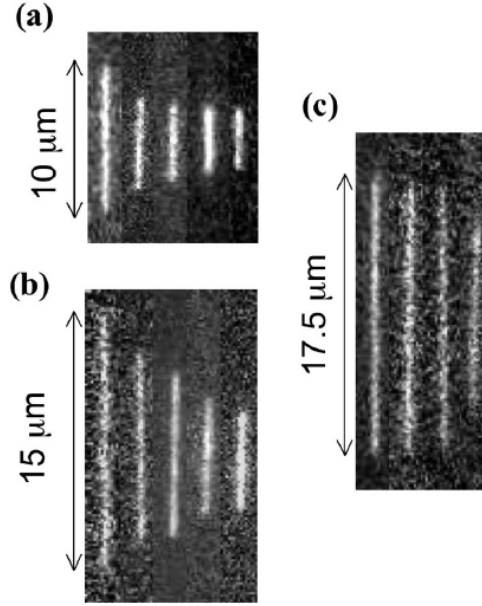


Figure I.13 : Molécule individuelle d'ADN- λ dans différentes concentrations de TBE (de gauche à droite, 0.05x, 0.2x, 0.5x, 2x, 5x TBE) dans des canaux de (a) 200 nm, (b) 100 nm, (c) 50 nm. Figure tirée de (Reisner, Beech et al. 2007)

Par ailleurs, la diminution de la force ionique s'accompagne d'une exaltation de la répulsion électrostatique au niveau des parois : les charges négatives présentes à la surface du verre ou du PDMS attirent par attractions électrostatiques les ions positifs en solutions dans une couche de Debye d'épaisseur λ_D (Fig. I.14) définie selon :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{2\varepsilon_0\varepsilon_R k_B T}{e\rho_0}} \quad (I.3)$$

où ρ la densité volumique de charges, e la charge de l'électron, $k_B T$ l'énergie d'agitation thermique, et ε_R la permittivité diélectrique. La longueur de Debye vaut quelque nanomètres en conditions salines physiologiques (CR Calladine, 2004), mais elle peut atteindre jusqu'à ~ 100 nm en faible concentration saline, ce qui la rend non négligeable lorsque l'on étudie des phénomènes en géométrie nanofluidique. Or, l'ADN est repoussé de la couche de Debye du fait sa charge négative, et il n'est pas surprenant de remarquer que D. Schwartz et ses collègues (Kim, Kim et al. 2011)

soient parvenus à étirer une molécule d'ADN quasiment à sa longueur de contour en utilisant de « grands » nanocanaux de ~ 300 nm de section dans une solution contenant 0.1 mM de sel.

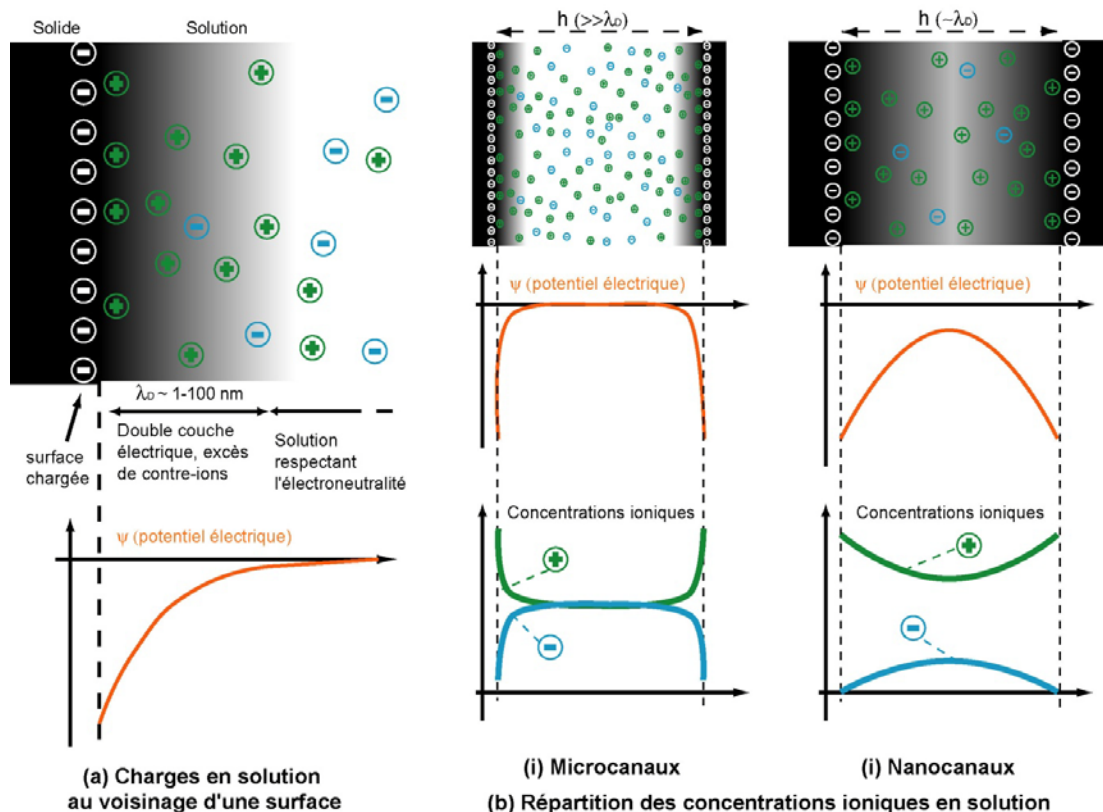


Figure I.14 : Répartition d'ions en solution au voisinage d'une paroi. (a) Double couche électrique et longueur de Debye. (b) Illustration de la spécificité de nanocanaux : répartition du potentiel électrique et des concentrations ioniques dans le cas de microcanaux (i) et de nanocanaux (ii). Pour les nanocanaux, le recouvrement des doubles couches électriques est responsable d'un excès de contre-ions (ici les cations, pour un solide chargé négativement).

Dans ce panorama, un résultat est intéressant à mentionner : l'équipe P. Schwille a montré que l'ADN se place spontanément au voisinage des parois latérales dans des nanofentes de hauteur inférieure à 100 nm, et à basse force ionique (Fig. I.15, (Krishnan, Moench et al. 2007)). Ce phénomène d'assemblage spontané est en outre observé pour des nano-objets de charge négative, qui ont également tendance à s'organiser le long des parois latérales des nanofentes (Krishnan, Moench et al. 2007)

Ce phénomène est intimement associé à l'existence d'une couche de Debye puisqu'il dépend de la force ionique, mais son explication quantitative reste encore un défi.

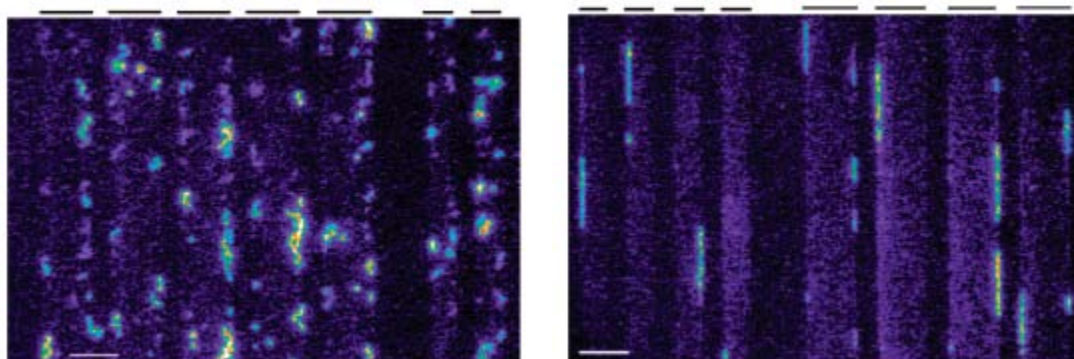


Figure I.15: Les deux clichés de microscopie de fluorescences représentent des molécules d'AND- λ placés dans des fentes de 200 nm (gauche) et 100 nm (droite) de hauteur de 10 μ m de large. A basse force ionique (concentration en sel de 0.35 mM) et en présence d'un fort confinement, les molécules s'accumulent spontanément sur les bords latéraux des nanofentes (Krishnan, Moench et al. 2007).

5. Motivations pour notre travail expérimental

Nous venons donc de dresser un panorama de résultats expérimentaux récents concernant la manipulation de nano-objets et de biomolécules. Cet état de l'art va nous servir à cadrer les travaux que nous avons effectués au cours de notre thèse. Deux axes de recherches ont été poursuivis : (i) le développement de nouveaux matériaux pour assembler des nano-objets selon des motifs complexes, et (ii) la réalisation de dispositifs nanofluidiques pour la manipulation d'ADN.

Sur le volet de la manipulation de nano-objets, la plupart des travaux ont été effectués avec des substrats texturés obtenus avec des résines photosensibles (Yin, Lu et al. 2001), du silicium (Xu, Xia et al. 2007), ou du PDMS (Malaquin, Kraus et al. 2007). Autrement dit, l'impact du matériau texturé sur le mécanisme d'assemblage dirigé des nano-objets n'a pas été complètement élucidé. Nous avons donc décidé d'utiliser un matériau original pour diriger l'assemblage des particules, à savoir un hydrogel, comme le poly-acrylamide ou le poly-éthylène-glycol, et nous avons

développé des procédés particuliers pour sa texturation. En outre, à rebours de l'essentiel des travaux antérieurs qui utilisent des trous pour diriger l'assemblage des particules, nous avons voulu savoir si des motifs en relief pouvaient induire un assemblage dirigé de particules.

Sur le volet nanofluidique, nous avons démarré un sujet original en France, mais avec 5 ans de retard sur les meilleures équipes américaines. Nous avons souhaité être innovants dans notre conception d'un système dédié à la manipulation d'ADN génomique, ce qui n'a été réalisé pour l'instant que dans une seule étude (Tegenfeldt, Prinz et al. 2004). Pourtant, le réel challenge applicatif dans l'utilisation des nanocanaux est de manipuler des chromosomes complets, car ces objets ne sont pas analysables avec les techniques de biologie moléculaire, qui sont adaptées à l'étude de fragments d'ADN inférieurs à ~20 kbp. Notre principale innovation est d'avoir développé des procédés pour la fabrication de systèmes nanofluidiques en PDMS, sachant que le PDMS est le matériau roi en microfluidique, mais qu'il reste peu utilisé en nanofluidique. De plus, nous avons montré que l'utilisation de l'hydrodynamique comme moyen d'actionnement des liquides dans les nanocanaux permet moduler le degré d'étirement de l'ADN en conservant une géométrie donnée de nanocanaux, et nous avons valorisé cette innovation avec un brevet. Au final, nous nous sommes placés dans ce sujet au niveau international, et nous faisons partie des équipes capables d'étirer longitudinalement des chromosomes purifiés à partir de cellules humaines.

Chapitre II

Micro et Nano Fabrication pour la réalisation de structures micro- et nano-fluidiques

1. Introduction générale

Une grande partie de notre travail de thèse a consisté à mettre au point des outils technologiques pour manipuler spatialement des biomolécules ou des nano-objets. Ces développements ont été réalisés au sein de la centrale de fabrication du LAAS, qui bénéficie d'une expertise reconnue depuis 40 ans en fabrication de composants/systèmes intégrés sur silicium. Nous proposons d'aborder ce travail dans ce chapitre. Avant de rentrer dans le corps du manuscrit, il est important de noter que le travail de fabrication de microsystemes fluidiques est fondé sur des procédés de microfabrication (photolithographie, gravure, croissance et dépôt de films, assemblage...) bien établis au LAAS. Notre contribution est donc d'avoir su «mettre en musique» ces méthodes pour obtenir les structures répondant à nos spécifications. Ce travail sera donc décrit brièvement, selon les grandes lignes méthodologiques.

En revanche, la nanofluidique constitue une thématique de recherche nouvelle au LAAS. Elle est fondée sur les techniques de nanofabrication et de nanostructuration, qui ont connu un essor remarquable ces dernières années à la fois grâce aux efforts menés par l'industrie de la microélectronique pour poursuivre la réduction en taille des composants, mais également par la recherche en amont pour la compréhension de la matière aux échelles nanométriques. Au cours de cette thèse, nous avons mis au point pour la première fois des recettes et des protocoles simples et reproductibles pour fabriquer des structures nanométriques, mais nous nous sommes aussi appuyés sur des procédés établis pour d'autres projets. Ce travail nous a demandé un soin tout particulier, et nous décrirons en détails les résultats que nous avons obtenus dans ce cadre.

2. Fabrication de moules de micro-impression

2.1 Spécifications sur la dimension des structures

Nous avons voulu développer une technologie de texturation de gels hydrophiles fondée sur les techniques de micromoulage. Le moule est imprimé dans un substrat de silicium, et il présente des motifs de différentes formes et tailles selon une gamme variant entre 10-100 μm en largeur et 5-30 μm en profondeur (Fig. II.1). Ces motifs ont été imprimés suivant des formes en V, c'est-à-dire des flancs lisses (Fig. II.1a), ou en U selon un creuset plus ou moins régulier (Fig. II.1b).

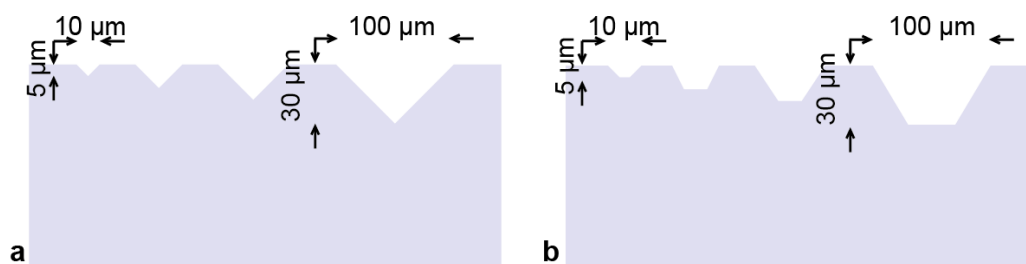


Figure II.1 : Schéma des motifs en forme de V et U, et spécification de leurs dimensions.

2.2 Procédé de fabrication

Le cahier des charges nécessite de recourir à un procédé de fabrication à deux étapes avec une photolithographie optique conventionnelle et une gravure. Le masque de photolithographie a été conçu au sein de la salle blanche du LAAS, et il comporte une banque de motifs géométriques simples sous la forme de lignes droites ou tortueuses, de lignes discontinues, de carrés, et, de manière plus exotique, de lettres ou un motif en «œil» (Fig. II.2).

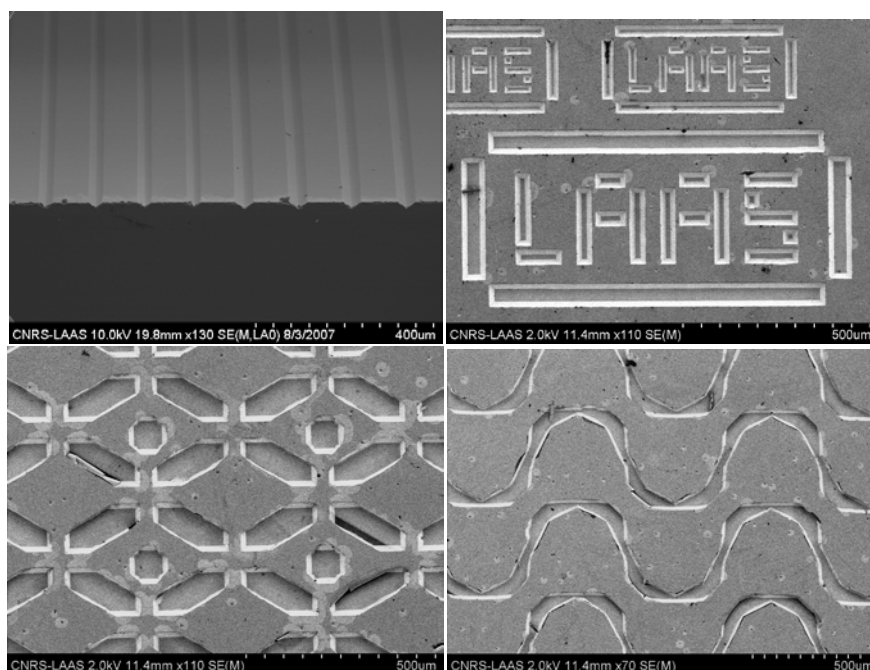


Figure II.2 : Images de moules imprimés dans le silicium pour le procédé de texturation d’hydrogels.

Le procédé commence par une enduction de résine photosensible (AZ1505), puis la couche de résine est insolée à travers le masque (procédé standard spécifié par le fabricant). Certaines régions du substrat sont alors exposées, et d’autres protégées, ce qui permet de transférer les motifs de la résine vers le silicium (Fig. II.3.a-b). Deux stratégies ont ensuite été envisagées pour graver le silicium dans les régions déprotégées.

Nous avons d’une part réalisé une gravure humide avec de la potasse concentrée et à chaud (90°C). La gravure du silicium est alors anisotrope du fait de la sélectivité d’attaque chimique sur certains plans cristallographiques du silicium (la gravure selon le plan $\langle 111 \rangle$ est très lente). En utilisant un substrat de silicium $\langle 100 \rangle$ et en orientant correctement les motifs sur le substrat, nous avons ainsi réalisé les trous en forme de V dont l’angle de base est 54° ((Hajjoul, Mathon et al. 2011), Fig II.3d). Le temps total de traitement du silicium dans le bain de potasse est fixé à 15 minutes.

D’autre part, nous avons effectué une gravure sèche par plasma réactif avec les gaz CF₄ et SF₆ et un bâti de gravure TEPLA 300, qui attaque le silicium de manière

plutôt isotrope, ce qui se traduit par la formation de motifs en forme de U, c'est-à-dire avec des flancs latéraux courbés.

Les structures ainsi obtenues ont été observées par microscopie électronique à balayage (MEB) et par profilométrie mécanique (Fig. II.2), ce qui nous a permis de vérifier que les moules étaient conformes à nos spécifications.

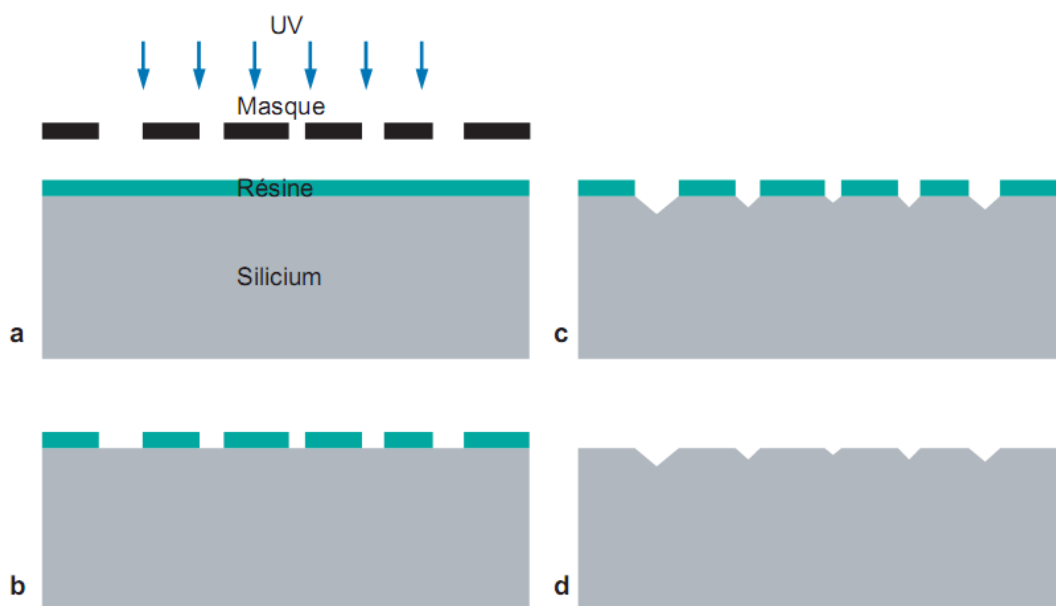


Figure II.3 : La figure présente les étapes de fabrication des moules en forme de V sur silicium. (a) Le procédé commence par une étape de photolithographie sur la résine AZ 1505 (0.5 μm d'épaisseur) pour protéger et ouvrir des régions précises du substrat en silicium (b).

La plaquette est ensuite immergée dans un bain de potasse concentrée, ce qui permet de graver le silicium suivant les plans cristallins du substrat (c). Enfin la résine est éliminée par rinçage à l'acétone (d).

2.3 Revêtement des surfaces

Nous avons ensuite testé plusieurs états de surface pour assurer un moulage reproductible des structures imprimées dans le silicium. Les résultats obtenus avec du silicium oxydé n'ont pas été suffisamment reproductible au moment de l'étape de démoulage des gels qui était souvent difficile à effectuer. Les meilleurs résultats ont été obtenus en évaporant une couche d'or de 100 nm sur le silicium (avec une couche

d'accroche de titane de 20 nm). Les surfaces d'or sont hydrophiles dès lors qu'elles sont fraîchement activées avec un mélange oxydant, comme le piranha (50% H_2O_2 + 50% H_2SO_4), et ce traitement était effectué tous les jours avant les expériences.

3. Procédés de fabrication de nanostructures

Contrairement aux méthodes de microfabrication dont on vient de voir un exemple dans le paragraphe précédent, les technologies de nanofabrication dédiées à la réalisation de motifs de l'ordre de 100 nm ou moins sont souvent lourdes à mettre en œuvre, et peu diffusées dans la communauté scientifique internationale. Il est à noter que selon Georges Whitesides (Whitesides 2011), ces deux problèmes expliquent le faible développement de la nanofluidique au niveau international, comparativement au développement fulgurant qu'a connu la microfluidique au cours de ces quinze dernières années. Dans ce contexte, nous avons envisagé plusieurs solutions méthodologiques, avec, d'une part, des outils bien maîtrisés au LAAS comme la photolithographie par projection et la lithographie électronique (nous avons été les premiers au laboratoire à mettre en musique ces procédés pour des applications de nanofluidique) ; et, d'autre part, une stratégie de nanofabrication inspirée de travaux de l'équipe de G. Whitesides de 1997 (Rogers, Paul et al. 1997), qui présente l'avantage d'être réalisée avec des appareils de photolithographie classique, donc développable dans un grand nombre de laboratoires. Dans cette partie, nous souhaitons évoquer les résultats obtenus avec nos différentes approches, et comparer leurs performances respectives.

Notons que toutes ces techniques permettent d'imprimer une résine avec des motifs nanométriques, qui sert ensuite de masque lors d'une étape de gravure sèche par plasma. Les étapes de gravure ont été essentiellement effectuées avec le bâti STS du LAAS avec le programme RIEAN-O2 et en gravant pendant 18 s pour une profondeur de transfert de ~ 200 nm.

3.1 Lithographie électronique

3.1.1 Principe

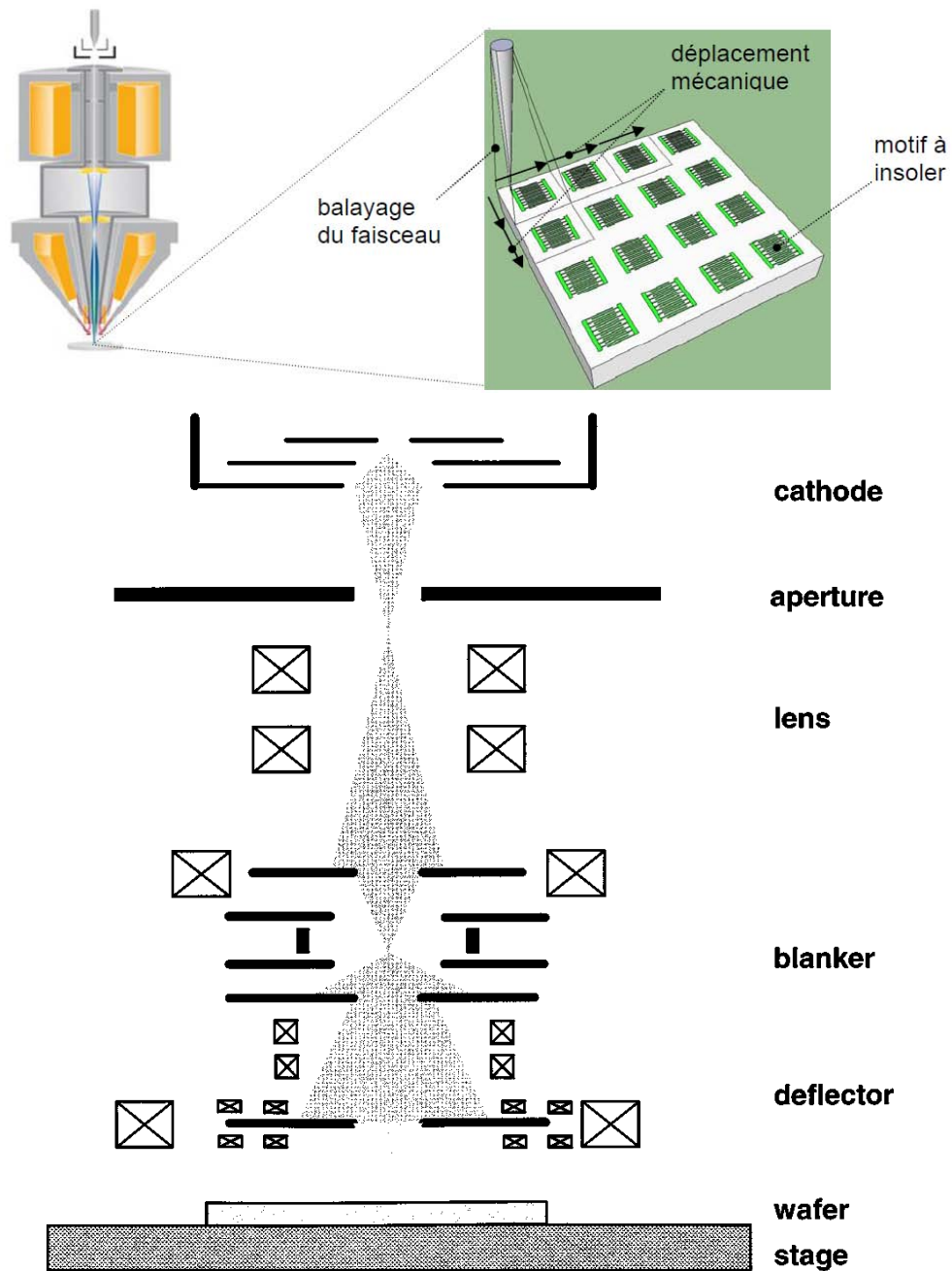


Figure II.4: schéma de principe d'un équipement de lithographie électronique à balayage.
Dessin tiré de (Fontana, Katine et al. 2002)

La lithographie électronique à balayage est la technologie de nanofabrication la plus répandue, car elle atteint des résolutions spatiales extrêmement fines (Fontana, Katine et al. 2002). Cependant, son mode d'écriture (exposition point par point) en fait une technologie très lente, et l'utilisation d'un faisceau d'électrons focalisés requiert un équipement particulièrement lourd et coûteux. Brièvement, un masqueur électronique est composé d'un canon à électrons, de lentilles de condensation (magnétiques), destinées à focaliser, mettre en forme et aligner le faisceau, une plateforme mécanique contrôlée par interférométrie laser, pour déplacer l'échantillon et venir le placer sous le faisceau électronique avec la plus grande précision possible (quelques nanomètres), un modulateur d'intensité du faisceau, et une lentille finale servant à réduire la taille du faisceau et le défléchir le long d'un chemin prédéfini. Enfin, un ordinateur contrôle l'équipement. La figure II.4 schématise les principaux éléments constituant un équipement de lithographie électronique à balayage.

L'exposition vectorielle du faisceau se distingue de l'écriture parallèle des équipements de photolithographie standards. Les champs d'exposition classiques de ces équipements n'excèdent pas le mm^2 , ce qui s'avère relativement petit pour la réalisation de dispositifs micro-nanofluidique (Araki, Aydil et al. 2010). La réalisation de motifs nanométriques sur de grandes surfaces impose donc une technologie de « step-and-repeat », c'est-à-dire l'écriture d'une succession de champs.

3.1.2 Procédé

Le procédé commence par la préparation du substrat en silicium, qui est une étape importante dans la mesure où les impuretés résiduelles interfèrent très fortement avec la réalisation de motifs nanométriques. Nous avons donc effectué un double nettoyage au trichloro-éthylène chaud (5 min à 60°C), suivi d'un rinçage dans un bain d'acétone, d'un rinçage final à l'eau dé-ionisée (EDI), et finalement d'une déshydratation pendant 20 min à 200°C .

Nous avons ensuite enduit sur le substrat une solution de PMMA (30 g/L) en déposant 6 mL de PMMA sur une plaquette de 10 cm, puis en tournant à 3000 tr/min (5000 tr/min²) pendant 30s. L'épaisseur de la couche de PMMA est de 150 nm selon une mesure de profilométrie mécanique.

Afin d'optimiser le taux d'exposition électronique sur la taille des motifs, nous avons testé plusieurs doses dans la gamme 165-390 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$. De même, la taille d'un champ pour l'écriture électronique est connue pour changer la taille des motifs finalement obtenus. Aussi, nous avons exposé des motifs avec des champs de 125x125 μm^2 (ce qui nous permet de réaliser des canaux de 125 μm de longueur), et des champs de 400x400 μm^2 (pour les canaux de longueur 325 et 530 μm). L'espacement entre deux nanocanaux est fixé à 5 μm .

Pour compléter ces tests, différentes largeurs de nanocanaux ont été envisagées : 60, 80, 100 et 120 nm pour les champs de 125 x 125 μm ; puis 100, 120, 140 et 160 nm pour des de 400 x 400 μm . Le schéma II.5 résume les différentes expériences d'insolation qui ont été réalisées.

La dernière étape du procédé consiste à révéler la résine en PMMA, et elle a été effectuée en immergeant le substrat pendant 45 s dans un mélange MBK/Isopropanol (proportion 1/3), suivi d'un rinçage de 45 s dans un bain d'isopropanol pur suivi d'un séchage direct à l'azote.

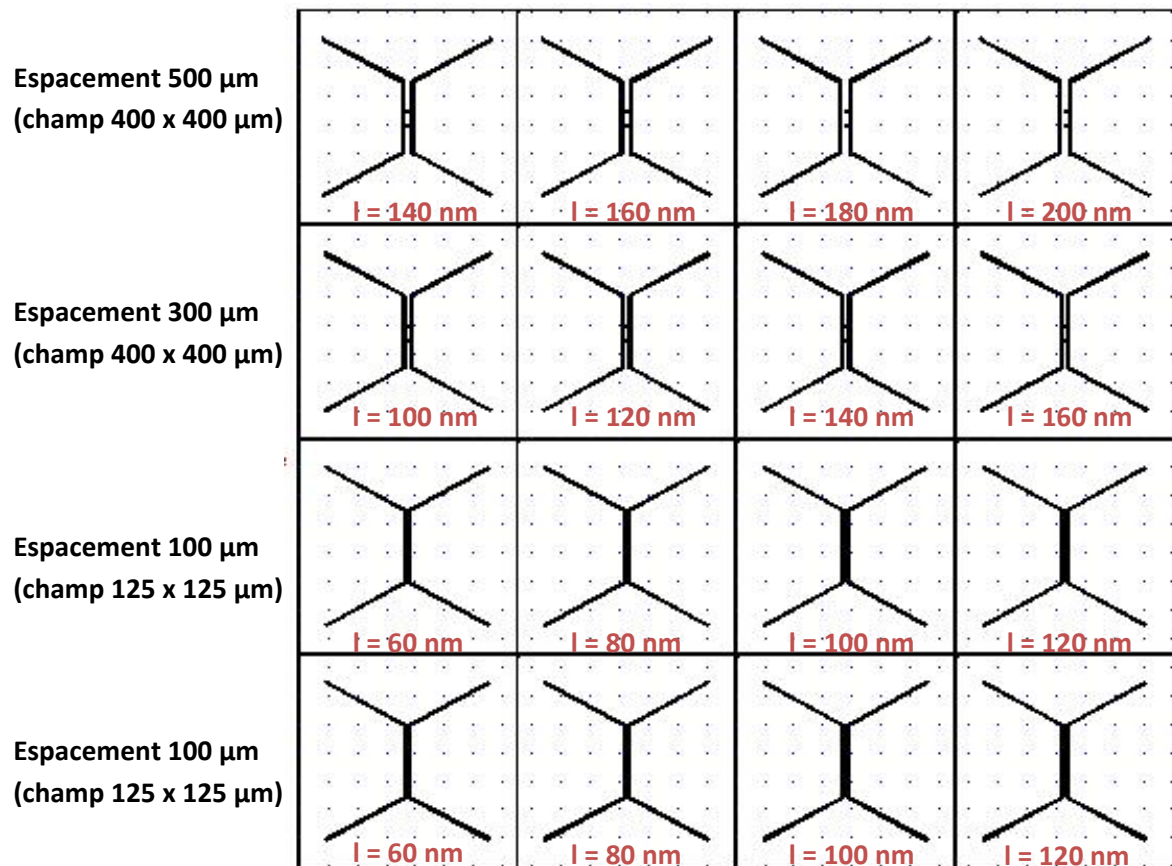


Figure II.5 : Schéma récapitulatif des largeurs et tailles de champ testées pendant la lithographie électronique

3.1.3 Résultats expérimentaux

Influence de la dose d'insolation : Les deux principales conclusions sont que la largeur des motifs augmente avec la dose d'insolation, ce qui est attendu, et que le profil des canaux est moins « dentelé » avec une dose d'insolation plus importante (Figure II.6).

Raccords de champ : Les raccords de champ sur les canaux de 530 μm de longueur ont été testés en insolant avec des champs de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ ainsi qu’avec des champs de $125 \times 125 \mu\text{m}^2$. Dans les deux cas cependant, le résultat n’est pas satisfaisant, et bien que le raccord ait lieu, le rétrécissement engendré s’avère important, ce qui complique les expériences en milieu liquide (Figure II.8).

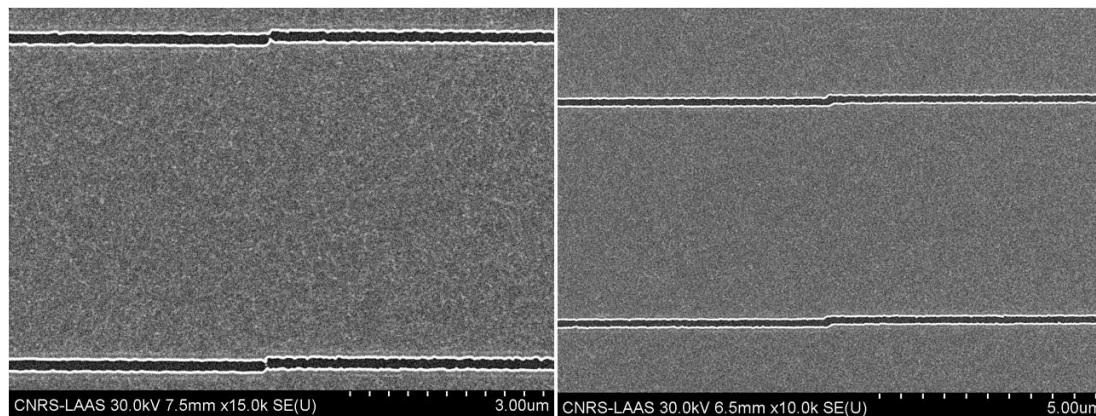


Figure II.8 : Raccords de champ observés au MEB pour deux tailles de champ différentes. (*gauche*) : raccord de champ au grossissement $\times 15000$ pour un champ d’insolation de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$. (*droite*) : raccord de champ au grossissement $\times 10000$ pour un champ d’insolation de $125 \times 125 \mu\text{m}^2$.

3.1.4 Conclusions sur la lithographie électronique

En vue de la réalisation d’une insolation « fonctionnelle », nous visons des motifs de largeur comprise entre 100 et 200 nm. L’optimisation du profil des canaux nécessite de coder des canaux à des dimensions inférieures en les insolant à une dose de $385 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. Enfin, en ce qui concerne le problème des raccords de champ, nous pouvons raisonnablement viser des nanocanaux de 300 μm de longueur.

3.2 Lithographie par projection

3.2.1 Principe

La lithographie optique conventionnelle, qui consiste à plaquer un masque sur un substrat enduit de résine, trouve ses limites à une échelle de taille de l'ordre de $\sim 2\text{ }\mu\text{m}$. Pour parvenir à de meilleures performances, il a été proposé d'utiliser un système optique réducteur pour focaliser un faisceau et diminuer la taille des motifs imprimés sur la résine, c'est la lithographie par projection, dont le principe est illustré dans la Figure II.9. Nous disposons au LAAS d'un aligneur par projection CANON 3000i4 avec un module de réduction 5X. La limite théorique de résolution est donc 1/5 de la résolution du réticule, en l'occurrence 350 nm.

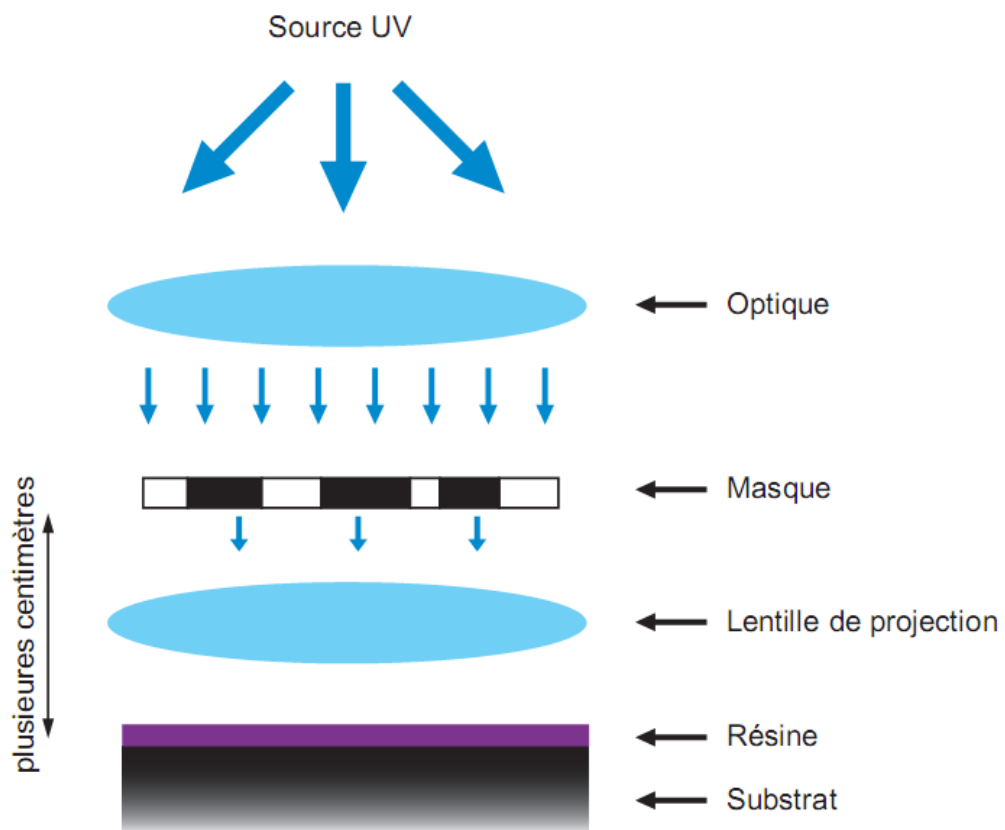


Figure II.9: Schéma de principe d'un aligneur par projection.

La lithographie par projection est une technique d'écriture parallèle, mais les champs d'insolation mesurent de l'ordre de quelques cm^2 . Il faut donc répéter les insolutions pour couvrir une plaquette de silicium de 10 cm de diamètre, ce qui est géré par la machine.

3.2.2 Procédé

Nous avons développé un procédé utilisant la résine PFI (Sumitomo) d'épaisseur 1 μm afin de générer des réseaux linéaires de dimension latérale variant entre 200-800 nm (imprimé avec un grossissement 5X sur le masque, *i.e.* 1-4 μm). Le wafer en silicium est nettoyé avec le mélange sulfo-chromique pendant 5 minutes, puis rincé à l'eau et séché à 200°C pendant 20 minutes. La surface est alors traitée avec un silane (HexaMethylDiSiloxane) pour favoriser l'accroche de la résine. L'enduction de résine a été réalisée en tournant à 3500 tr/min pendant 30 s, et l'épaisseur finale est de 1,05 μm . Un pré-recuit à 90°C pendant 60 s est nécessaire pour obtenir des flancs verticaux dans la résine. La plaque est ensuite insolée sous UV avec une dose optimisée à 2400 mJ/cm^2 , suivi par un post-recuit à 110°C pendant 60 s. La résine est enfin révélée avec une solution spécifique commerciale pendant 40 s.

3.2.3 Résultats expérimentaux

Cette technologie s'est révélée prometteuse pour la fabrication de nanocanaux de plus de 300 nm de section (Figure II.10). Les nombreux tests menés ont montré l'importance des réglages d'alignement sur cette machine, qui doivent être calibrés tous les jours. Au final, ce procédé d'impression rapide nous permet de couvrir la gamme spatiale comprise entre 300 nm et 1 μm .

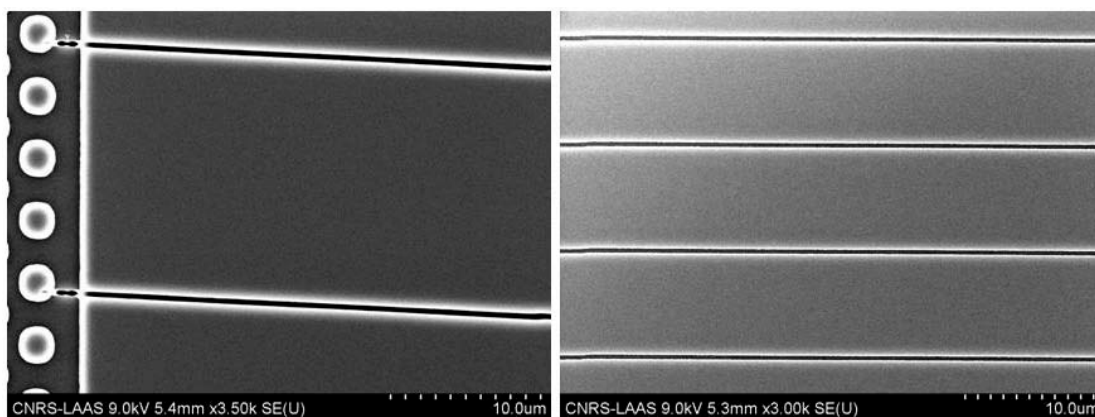


Figure II.10: Réseaux de nanocanaux obtenus par lithographie par projection, et leur raccord avec des structures microfluidiques.

3.2.4 Conclusions sur la lithographie par projection

Cette technique est rapide, le procédé parallèle, et l'appareil est accessible en salle blanche au LAAS. Toutefois elle est adaptée à la réalisation de nanocanaux plus large que 300 nm, ce qui correspond à un régime relativement peu intéressant pour la manipulation d'ADN en nanocanaux (voir chapitre I).

3.3 Photolithographie par contraste de phase avec le PDMS

Contrairement aux deux technologies précédentes, la lithographie par contraste de phase avec le PDMS n'a jamais été mise au point au LAAS, et nous avons effectué ce travail original au cours de cette thèse. Cette technique a été proposée au départ par le groupe de G. W. Whitesides (Rogers, Paul et al. 1997; Xia and Whitesides 1998; Lee, Jeon et al. 2005), qui fournit régulièrement de nouvelles idées pour la nanofabrication. L'idée d'appliquer la photolithographie par contraste de phase pour la réalisation de dispositifs nanofluidiques est nouvelle et a fait l'objet d'une publication (Viero, He et al. 2011).

3.3.1 Principe

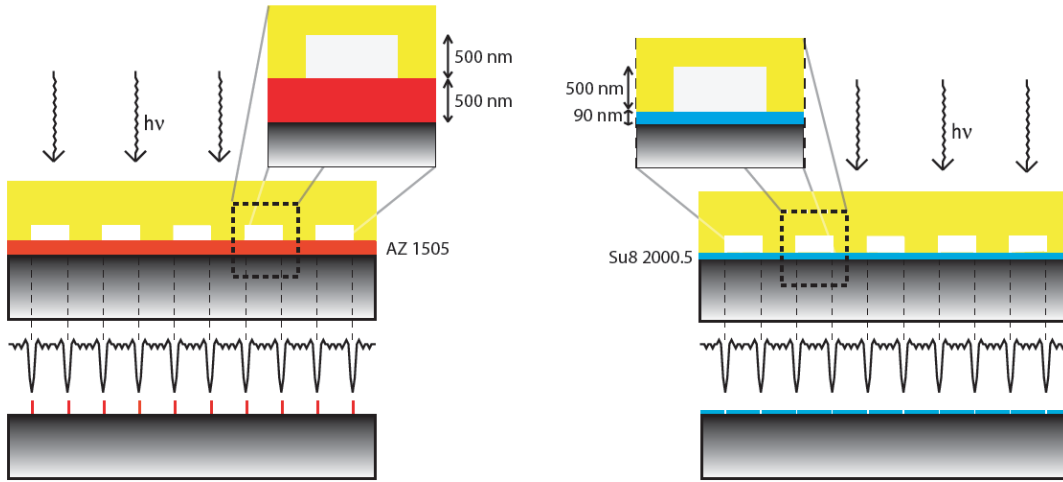


Figure II.11: Ce schéma synthétise le principe de fonctionnement de la lithographie par décalage de phase, en précisant les dimensions du masque en PDMS que nous avons utilisées, ainsi que les épaisseurs de résine.

La lithographie à contraste de phase à base de PDMS repose sur la fabrication d'un masque à contraste de phase, qui est un morceau de PDMS imprimé de micro-canaux de 3-10 μm de large et ~ 500 nm de hauteur. Ce masque est obtenu par photolithographie conventionnelle de résine AZ1505 (500 nm de hauteur en procédé standard), et par micro-moulage de lignes de résine avec du PDMS. Le masque à contraste de phase est ensuite déposé sur une résine photosensible déposée sur un substrat. Lorsqu'un éclairage parallèle est appliqué à travers le masque, les rayons traversant l'air ou le PDMS sont décalés en phase (Figure II.11), ce décalage étant proportionnel à la hauteur de la marche et à la différence d'indice entre l'air et le PDMS. La différence de marche peut introduire des interférences destructives lorsque la condition suivante est réalisée :

$$h = \frac{i \cdot \lambda}{2 \cdot \Delta n}$$

où h est la hauteur des motifs du masque, λ est la longueur d'onde de l'UV d'insolation (~ 405 nm), Δn est la différence d'indice optique entre PDMS et l'air (0.43), $i = 1, 3, 5 \dots 2n+1$. Ainsi, il est possible d'imprimer des motifs de taille

inférieure à la longueur d'onde, au minimum $\lambda/4$, soit ~ 100 nm pour un éclairage à 400 nm. Ce procédé est applicable aux résines positives et négatives, et il ne nécessite que des appareils de photolithographie classique.

3.3.2 Procédé

Le wafer est nettoyé par mélange sulfo-chromique pendant 5 minutes, puis rincé à l'eau et séché à 200°C pendant 20 minutes. La surface est alors traitée avec silane (HMDS) pour favoriser l'accroche de la résine. Et puis une couche de résine AZ 1505 est déposée sur le wafer en tournant à 3800 tr/min (5000 tr/min^2) pendant 30 s. L'épaisseur de la résine est 500 nm selon une mesure de profilométrie mécanique. Un pré cuit à 105°C pendant 30 s est nécessaire après l'enduction. La plaque est ensuite insolée sous UV de 30 mJ/cm^2 et la résine insolée est révélée dans le révélateur spécifique pendant 20 s.

3.3.3 Résultats expérimentaux

Ce procédé s'est avéré pertinent, puisque l'on a obtenu 3 wafers fonctionnels dédiés à la réplique de systèmes nanofluidiques en PDMS avec des motifs de dimensions 200 et 120 nm (Figure II.12 haut). Notons que nous avons pu réaliser des dispositifs encore plus petits avec des dimensions typiques de 80 nm, dont l'utilisation en nanofluidique s'est révélée délicate. Le procédé peut en outre être utilisé pour la réalisation de réseau de nano-plots de géométries diverses (Figure II.12 bas), en réalisant deux expositions consécutives avec le masque à contraste de phase. Ces structures ont été utilisées dans le travail de thèse de Yannick Viero pour des expériences de manipulation d'ADN autour de nanoplots (Viero, Y. et al. 2011).

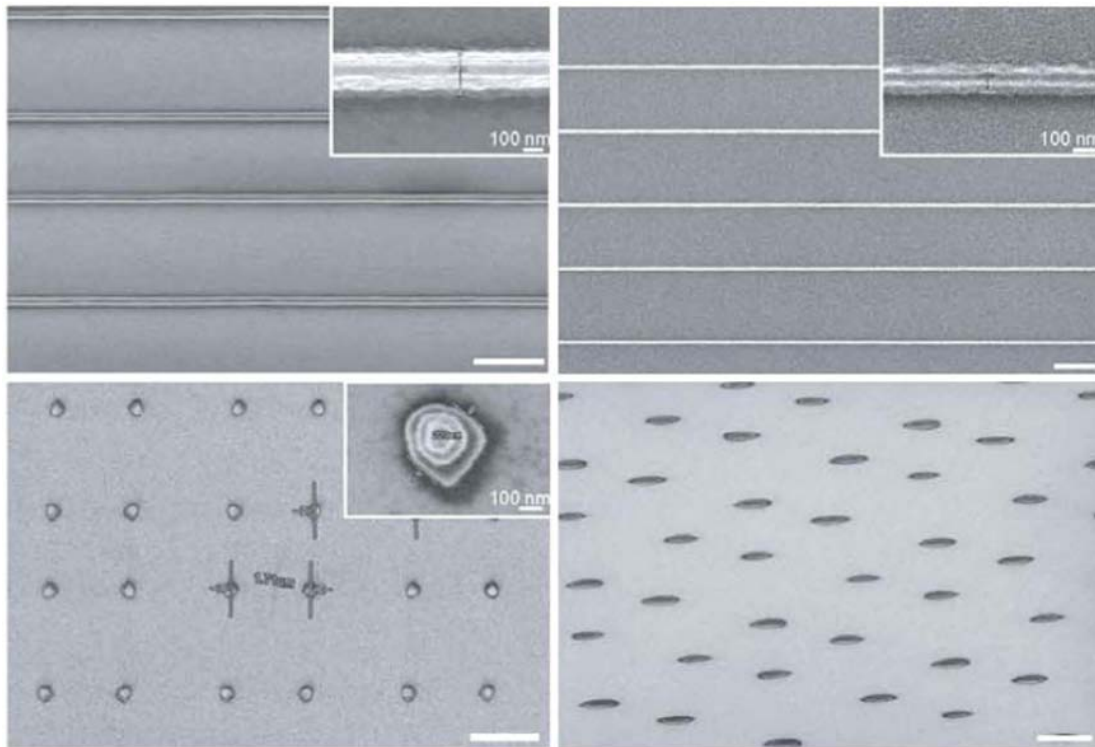


Figure II.12: (haut) Images MEB de motifs linéaires réalisés sur résine AZ-1505 par lithographie à décalage de phase. En ajustant le temps d'insolation (2.2s à gauche, 2.6s à droite), nous avons obtenu des motifs de largeur respective de 200 et 100 nm environ. **(bas)** Le procédé lithographie à contraste de phase peut être répété pour produire des réseaux de points régulièrement distribués sur une surface. La géométrie de ces points est déterminée par l'angle de rotation entre les deux orientations du masque.

3.3.4 Comparaison des trois méthodes de nanofabrication

Nous avons synthétisé les avantages et faiblesses des trois techniques de nanofabrication dans le tableau II.1. La lithographie par projection ne nous a pas été très utile pour les expériences de nanofluidique vu qu'elle permet de fabriquer des canaux plus grands que 300 nm, ce qui trop grand pour la manipulation d'ADN (Fig. I.10). A l'opposé, les meilleurs résultats ont été obtenus par lithographie électronique, mais cette méthode est délicate à mettre en œuvre. La lithographie à contraste de phase a été très pertinente pour l'avancement du projet, car elle nous a permis de réaliser des moules pour répliquer des nanocanaux en PDMS, un procédé peu répandu, mais rapide et très avantageux pour le prototypage. Au bilan, retenons donc que deux

techniques ont été utiles à l'avancement du projet, à savoir la lithographie électronique et la lithographie à contraste de phase.

La réalisation de dispositifs nanofluidiques fonctionnels requiert un procédé d'intégration des nanocanaux dans un réseau fluidique complexe. Ce travail est décrit dans la partie suivante.

Technologies	Largeur nanocanaux	Longueur nanocanaux	Avantages	Difficultés spécifiques	Statut pour le projet
Lithographie électronique	50 – 300 nm	< 300 μm	Grande précision d'écriture	- Mise en œuvre délicate - Ecriture lente - Industrialisable ?	Très pertinente
Lithographie par projection	300 nm – 1 μm	< 2 mm	Haut débit	- Inadaptée aux faibles dimensions - Réglages d'alignement	Pertinente
Lithographie contraste de phase	80 nm – 1 μm	< 5 mm	Haut débit	- Révélation résine critique - Intégration peu précise - Inadapté au 4 pouces	Très pertinente

Tableau II.1 : Le tableau synthétise les résultats expérimentaux obtenus avec les différentes technologies de nanofabrication que nous avons testées.

4. Intégration des nanocanaux dans des microsystèmes fluidiques

Notre objectif est d'insérer les nanocanaux dans un circuit fluidique permettant d'amener de l'ADN ou une autre biomolécule depuis un tube classique de biologie moléculaire vers les nanostructures. Nous avons développé des nanocanaux fluidiques en silicium et en PDMS, ce qui a nécessité de développer deux procédés d'intégration des nanostructures. En particulier les dispositifs en silicium sont formés de canaux creusés dans le substrat (Fig. II.13a), alors que les systèmes en PDMS sont répliqués à partir d'un moule en relief (Fig. II.13b). Nous détaillerons donc d'abord le procédé pour l'intégration de nanocanaux dans le silicium, puis nous développons les résultats concernant les dispositifs en PDMS. Mais avant de rentrer dans les détails du procédé, décrivons les avantages et inconvénients de chaque option technique.

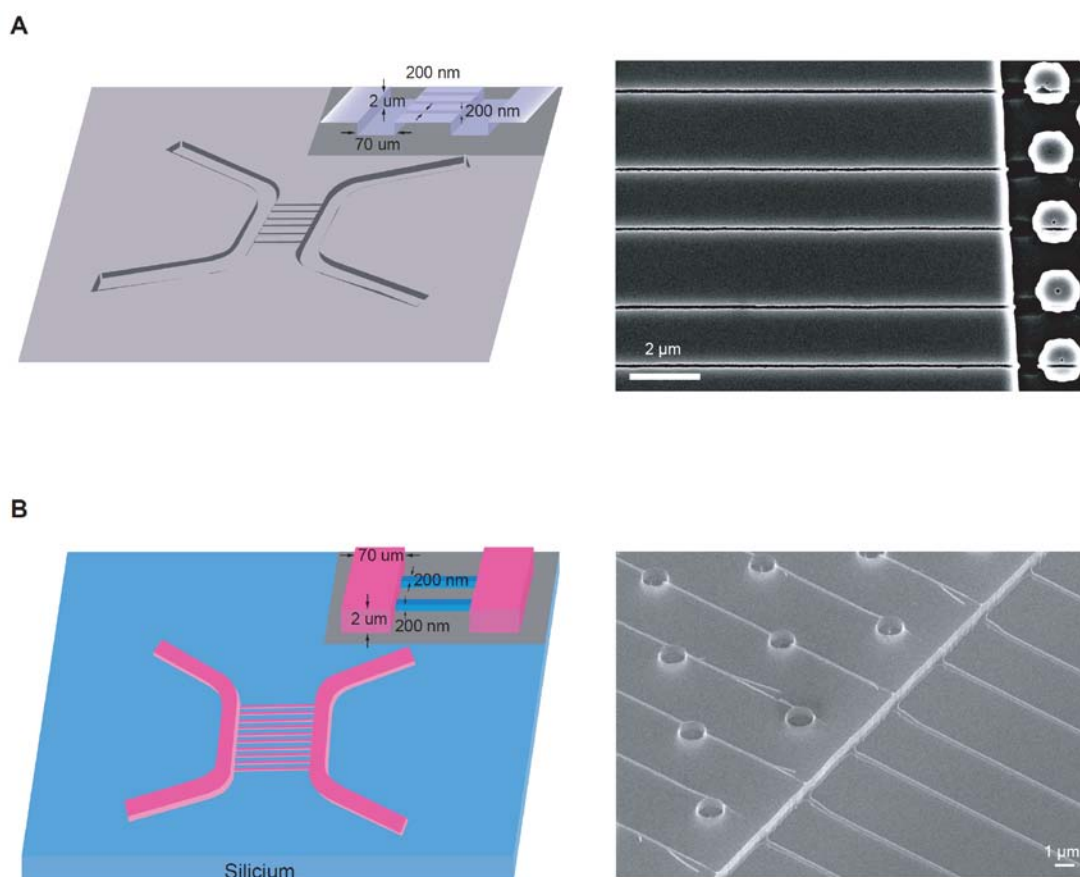


Figure II.13 : Principe et image du dispositif par microscopie électronique pour la réalisation de nanocanaux en silicium (A), et de moule pour la réplcation de nanocanaux en PDMS (B).

4.1 Comparaison des matériaux pour la nanofluidique

Les expériences de nanofluidiques fondées sur les nanocanaux sont essentiellement réalisées avec des dispositifs en verre, car ce matériau biocompatible est isolant et donc adapté aux expériences utilisant un actionnement par champ électrique, et il a une forte rigidité caractérisée par un module d'Young estimé à 150 GPa (Spiering, Bouwstra et al. 1993). Le silicium est utilisé de manière plus rare, même si l'oxydation de sa surface peut être facilement contrôlée, au prix d'une étape technologique supplémentaire. La centrale de fabrication est bien équipée pour la réalisation de dispositifs en silicium, et les appareils pour la gravure du verre sont en revanche moins adaptés. Aussi, notre choix s'est porté sur la fabrication de dispositifs en silicium tout au long du projet.

Il est intéressant de noter que le matériau « roi » en microfluidique est le PDMS. Il présente en effet l'avantage d'être particulièrement bon marché, facile à répliquer, et biocompatible, ce qui en fait un matériel de choix pour du prototypage (Duffy, McDonald et al. 1998). Le PDMS n'est que très rarement utilisé en nanofluidique du fait de sa faible rigidité mécanique (son module d'Young est estimé à 2 MPa à la formulation standard (Rogers et Lee 2009), ce qui se traduit par un effondrement des canaux de petites dimensions. Pour nous affranchir de ce problème, nous avons utilisé un PDMS formulé avec des chaînes plus courtes pour augmenter son degré de polymérisation et ainsi améliorer la tenue mécanique du matériau : le « hard-PDMS », noté h-PDMS. La formulation du soft et du hard-PDMS est présentée en annexe A1. Rappelons que le degré de polymérisation est défini comme le nombre d'unités monomères d'une chaîne polymérique. En augmentant ce degré de polymérisation, on augmente la résistance mécanique du matériau. Ainsi, le module d'Young du h-PDMS est 4 fois plus important que celui du soft PDMS (9 MPa, Rogers et Lee 2009). Ainsi, Schmid et Michel ont démontré la tenue mécanique de structures de 80 nm de diamètre sur 100 nm de hauteur, ce qui semble compatible avec les dispositifs que nous souhaitons réaliser (Schmid and Michel 2000).

D'une certaine manière, le développement d'une filière de nanofluidique en

PDMS a constitué un pari, qui s'est avéré payant puisqu'il nous a permis de prototyper des structures rapidement et ainsi dégrossir les difficultés méthodologiques de notre projet.

4.2 Réalisation de nanocanaux intégrés en silicium



Figure II.14 : Photos au microscope optique de l'alignement entre le niveau « nanocanaux » et le niveau « canaux d'arrivée » sur deux cellules positionnées à des extrémités du wafer. (*gauche*) alignement observé sur la cellule située à l'extrémité haute et gauche du wafer (longueur des nanocanaux égale à 530 μm) au grossissement x20. (*droite*) : alignement observé sur la cellule située à l'extrémité basse et droite du wafer (longueur des nanocanaux égale à 120 μm) au grossissement x50.

Alignement avec le deuxième niveau microfluidique : Nous avons effectué l'insolation d'un deuxième niveau (niveau canaux d'arrivée) en utilisant la résine PFI 1 μm d'épaisseur selon le procédé standard, suivi d'une gravure RIE programme « ouverture polySi » 45 sec sur l'ALCATEL AMS4200 (profondeur de gravure 2 μm).

Les débordements des nanocanaux à l'intérieur des microcanaux ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ, et nous avons observé un décalage maximal en x par rapport à la position centrée « idéale » de 2,18 μm . Ce décalage étant différent selon les cellules (maximal pour les cellules situées à l'extrémité gauche du wafer, minimal pour les cellules à l'extrémité droite), nous pouvons conclure qu'il ne

provient pas de l'insolation électronique, mais d'une légère erreur lors de l'alignement photolithographique. Nous avons prévu une marge de 15 μm , bien supérieure à l'erreur finale (fig. II.14). Aussi, l'alignement entre nanostructures et microstructures peut être fait avec une précision de 5 μm avec une bonne fiabilité.

Perçage Pour percer des trous dans le silicium, on utilise une « sableuse » qui injecte un flux haute pression de micro particules d'aluminium. On perce ainsi aux quatre extrémités des microcanaux. A noter qu'une couche de résine est déposée de façon laminaire sur la plaque du silicium pour protéger les motifs nanométriques.

Capotage des canaux Le silicium peut être collé sur lamelle de verre de microscope par soudure anodique, mais cette méthode requiert des lamelles en pyrex, qui sont chères et difficilement réutilisables. Aussi, nous avons choisi un procédé de soudure réversible, qui consiste à coller les nanocanaux sur une lamelle de verre recouverte d'une couche de PDMS servant d'adhésif.

Pour ce faire, on dépose une couche de h-PDMS par tournette (vitesse=3000 tr/min, accélération=3000 tr/min², temps=30 s) sur une lamelle de verre nettoyée au mélange sulfo-chromique et déshydratée à 200°C pendant 20 minutes. Une fois enduit, le h-PDMS est placé à l'étuve à 90°C pendant 1 heure pour la réticulation. Ensuite on nettoie la puce en silicium avec un mélange sulfo-chromique pendant 2 minutes, et la lamelle du verre recouverte de h-PDMS à l'isopropanol. Enfin, on active la surface de silicium par plasma O₂ (1000 ml/min, 800 W, 2 minutes avec cage faraday), puis on ajoute le h-PDMS (1000 ml/min, 200 W, 30 secondes avec cage faraday). La puce en silicium est déposée sur la couche de h-PDMS, et on chauffe à 100°C pendant 15 minutes pour améliorer la qualité du collage. Cette stratégie résiste à des pressions supérieures à 2 Bar.

Connectique Comme l'épaisseur de la plaque silicium est de 500 μm , on ne peut pas brancher les tubes connectique directement sur la puce. Aussi, on fabrique des plots en PDMS de 5*5*3mm (L*W*H) percés avec kit uni core diamètre de 1.2 mm. On

colle un plot PDMS sur chaque trou avec de la colle photo sensible (Fulcrand, Bancaud et al. 2011). Les plots PDMS sont rincés avec de l'isopropanol et les surfaces sont activées par plasma oxygène avant le collage (Fig. II.15).

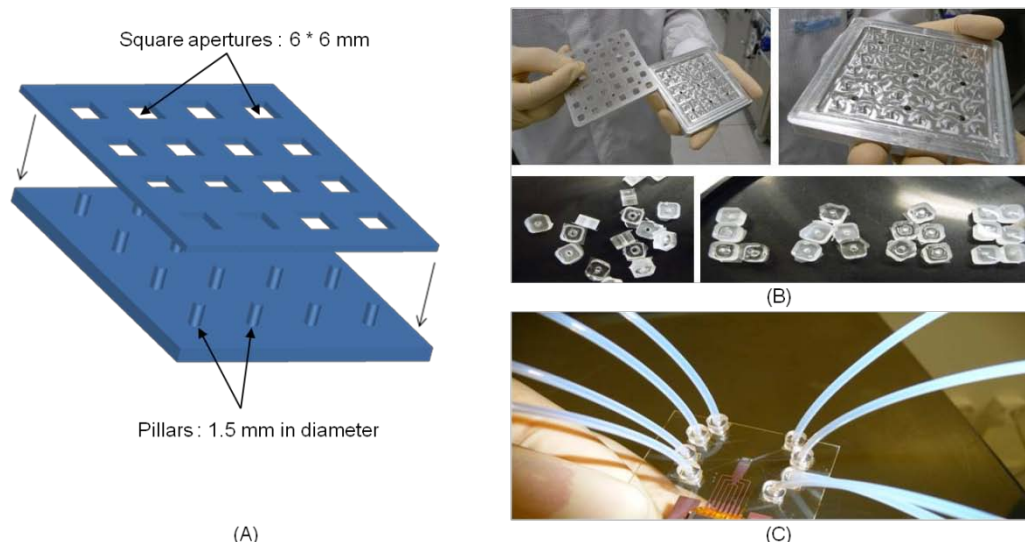


Figure II.15 : Réalisation des adaptateurs pour relier des tubes millimétriques à des puces microfluidiques. (A) Dimensions du moule fabriqué à l'atelier mécanique du LAAS. (B) Photographies des plots en PDMS. (C) Plots reportés sur une puce et connectés à des tubes.

4.3 Dispositifs en PDMS

La fabrication de moules de nanofluidique impose de graver des canaux microfluidiques plus épais que les nanocanaux (Fig. II.13B). Pour parvenir à ce résultat, nous avons choisi la stratégie suivante :

- graver les microcanaux sur une profondeur ciblée variant entre 0.7-2 μm ,
- réaliser le protocole de lithographie par contraste de phase sur un substrat texturé.

Notons d'emblée que ce protocole n'est pas optimal, puisque l'étalement de la résine de photolithographie est plus délicat sur un substrat texturé. De plus, le protocole de lithographie par contraste de phase nécessite un dépôt conforme du masque en PDMS sur la surface, mais les motifs empêchent le contact sur toute la surface. Sur ce deuxième volet, l'utilisation d'un masque en PDMS est avantageuse

car la souplesse de ce matériau (voir discussion plus après) permet de minimiser les effets de marche. Au final, nous avons observé que, pour une marche de 2 μm , les motifs de lithographie par contraste de phase étaient mal résolus au voisinage de la marche (~ 800 nm de large, à comparer à 200 nm loin de la marche, Fig. II.16-gauche), mais ce problème est résolu avec un microcanal de 0.7 μm , pour lequel on ne voit pas d'effet d'interface (Fig. II.16-droite).

Notons que nous aurions pu effectuer ce protocole en réalisant d'abord les nanocanaux sur un substrat lisse et « conventionnel », avant d'imprimer des motifs microfluidiques avec une résine épaisse, comme la SU-8. Ce protocole est *a priori* plus simple, mais nous n'avons pas pris le temps de le mettre en œuvre.

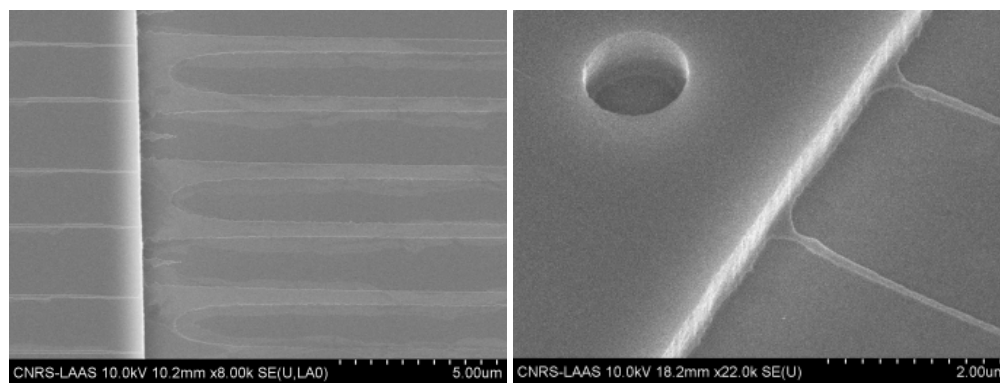


Figure II.16 : Photos au microscope électronique de l'interface entre nanocanaux et microcanaux dans un moule en silicium dédié à la réplique de nanocanaux en PDMS. La marche mesure 2 μm d'épaisseur à gauche, et les motifs nanométriques sont mal résolus, alors qu'avec une marche de 0,7 μm , on observe une bonne définition des nanocanaux (droite).

Décrivons maintenant le procédé que nous avons développé pour la fabrication de systèmes nanofluidiques en PDMS par réplique.

4.3.1 Moulage/démoulage du PDMS

Le moule silicium est rincé avec de l'isopropanol, et séché avec de l'azote avant de faire le moulage. Une couche de h-PDMS (Schmid and Michel 2000) est enduite à la tournette sur le moule (vitesse=800 tr/min, accélération=800 tr/min², temps=30 s), ce qui nous donne une couche de 70 µm d'épaisseur par mesure de profilométrie mécanique. La plaque est chauffée dans une étuve à 75°C pendant 45 minutes afin de réticuler la couche de h-PDMS. Puis, on verse 30 g de PDMS classique (sylgard 184, rapport base : agent réticulant=10:1, et dégazé dans un cloche à vide pendant 30 minutes) sur le h-PDMS pour obtenir une épaisseur de 3-4 mm. Une fois la surface du PDMS bien homogène, on place la bicouche h-PDMS/PDMS dans une étuve à 75°C pendant 3 heures. Grâce à cette bicouche, on combine l'avantage de rigidité accrue du h-PDMS au niveau des nanocanaux, en conservant un matériau globalement peu cassant, qui peut être découpé et percé pour aboutir à une puce fluide fonctionnelle.

Pour faciliter le démoulage des puces en PDMS, nous avons réalisé un traitement de la surface du moule avec un silane OTS (Octadecyltrichlorosilane 1% dans Trichloréthylène pendant 5 min), ce qui rend la surface hydrophobe (angle de contact ~110°). A cet égard, il est intéressant de noter que le PDMS non réticulé mouille les surfaces traitées à l'OTS, ce qui rend possible l'enduction à la tournette. En revanche, le PDMS réticulé n'adhère pas sur ces surfaces.

4.3.2 Perçage

Le perçage des trous dans les puces est dédié à l'injection de liquide dans les microcanaux. Les trous sont percés avec un outil de perçage « kit uni core » de 1,2 mm de diamètre aux quatre extrémités de micro canaux. On les perce du côté h-PDMS (coté motifs) vers PDMS pour s'assurer de la qualité des connections fluidiques. En outre, nous avons constaté qu'il est préférable de réaliser l'opération de perçage 24 h après la fabrication des puces (et leur sortie de l'étuve), car les fissures dans les matériaux sont ainsi minimisées.

4.3.3 Collage

La dernière étape de fabrication de puces en PDMS est le collage. On colle la partie PDMS sur une lamelle de verre de microscope pour capoter les canalisations. Avant le collage, la puce en PDMS est rincée dans un bain à ultrasons rempli d'isopropanol pendant 5 minutes, puis séchée à l'azote. La lamelle du verre est nettoyée au mélange sulfo-chromique pendant 2 minutes, et puis séchée à l'azote. Les surfaces de PDMS et de verre sont activées par plasma O_2 (TEPLA 300) : on commence par la lamelle de verre (1000 ml/min, 800 W, 2 minutes avec la cage de Faraday), et puis on ajoute la puce en PDMS (1000 ml/min, 200 W, 30 secondes avec la cage de Faraday). Le PDMS est posé sur lamelle de verre, et on recuit l'ensemble à $100^\circ C$ pendant 15 minutes pour éviter le décollage à haute pression. On obtient ainsi un dispositif fonctionnel présenté dans la figure II.17.

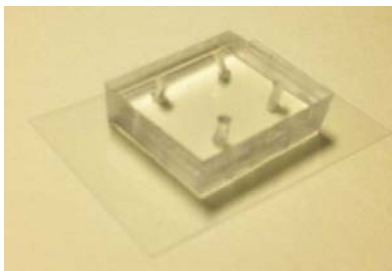


Figure II.17 : Photographie d'un dispositif nanofluidique en PDMS assemblé sur une lamelle de microscope

5. Manipulations fluidiques

5.1 Remplissage et Revêtement des surfaces

Le premier remplissage de nos dispositifs (en PDMS ou en silicium) tire partie des forces capillaires pour guider le liquide dans toutes les canalisations. Pour favoriser ce remplissage, nous effectuons cette étape avec des puces « fraîchement » (moins d'une heure) activées avec un traitement au plasma oxygène. Les surfaces sont donc hydrophiles, ce qui assure un remplissage rapide (~ 10 s) des micro- et nano-canaux. Notons que l'introduction de liquide dans les quatre trous en même temps suffit au remplissage des dispositifs en PDMS, mais, pour une raison que nous ne comprenons pas, il faut mettre du liquide dans les quatre réservoirs un par un avec les dispositifs en silicium.

Toutes les solutions tampons que nous avons utilisées ont été complémentées en Polyvinylpyrrolidone (PVP, MW=40 kg/mol, 2% en poids/volume), qui est un polymère neutre hydrosoluble. Le PVP présente une affinité pour les surfaces de verre ou de PDMS, et il est couramment utilisé pour lutter contre l'adsorption non-spécifique de biomolécules en microfluidique et nanofluidique (Randall, Schultz et al. 2006; Cross, Strychalski et al. 2007), et en tant que revêtement de surface dynamique pour lutter contre l'électro-osmose.

5.2 Actionnement des fluides dans les puces nanofluidiques

Nous avons réalisé notre propre technologie pour relier les microcanaux à des réservoirs macroscopiques (Fig. II.18, gauche). Ceux-ci sont formés de tubes de 1,5 ml, sur lesquels on colle un cylindre en inox de diamètre de 1,2 mm, qui permet de les insérer dans les trous d'entrée de la puce nanofluidique. On insère également un fil platine dans ces tubes, qui est mis en contact avec les solutions afin d'appliquer un champ électrique et de diriger la migration d'ADN par électrophorèse. Enfin, le bouchon du tube est percé et collé avec un tuyau en silicone, ce qui nous permet de le

connecter vers un appareil de la régulation de la pression (Fluigent). Les puces micro/nanofluidiques ainsi montées sont finalement placées sur un microscope optique inversé (Zeiss AxioVision). Ce microscope à épifluorescence est équipé d'un objectif 100x (ouverture numérique = 1.3, Zeiss), d'une source LED (lumencor), et d'une camera EMCCD ANDOR. L'ensemble de ce montage est décrit dans la section 6.

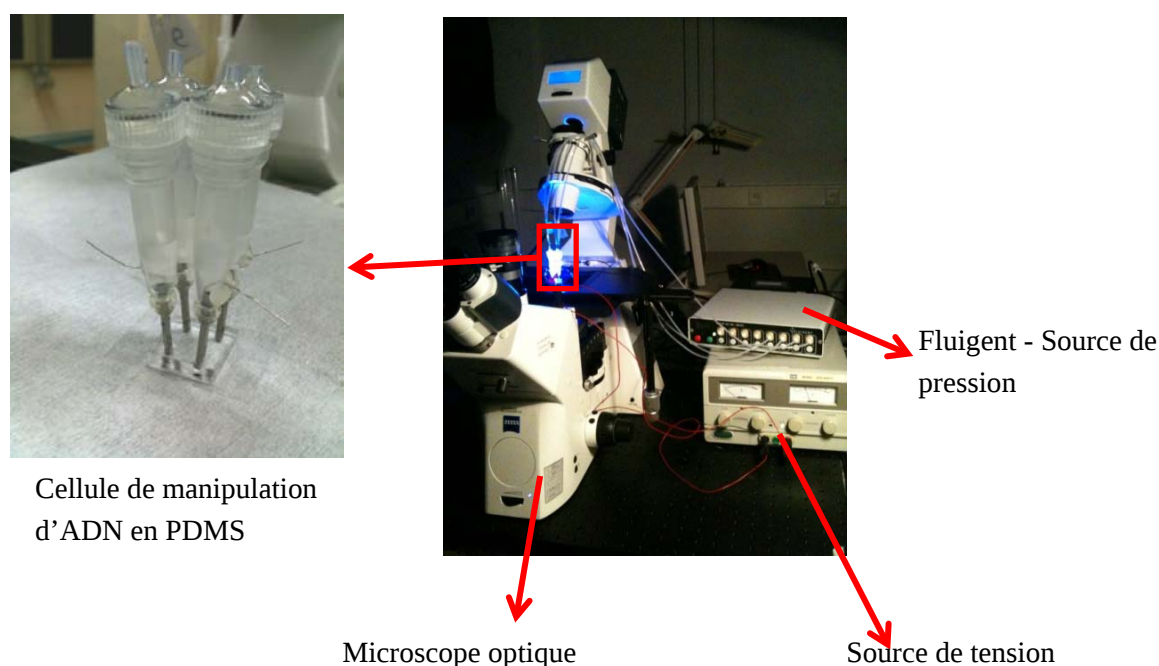


Figure II.18 : Photographie d'un dispositif nanofluidique en PDMS avec ses connectiques et le banc expérimental pour les mesures.

5.3 Préparation d'ADN

Nous avons utilisé deux différents types d'ADN pour ces expériences, soit l'ADN purifié du phage lambda, qui est commercial, mais ne présente pas d'intérêt biologique, soit de l'ADN génomique purifié, que nous avons obtenu en développant des procédés spécifiques au laboratoire.

L'extraction d'ADN génomique est réalisée à partir de cellules d'eucaryotes supérieurs (cellules NRK, « Normal Rat Kidney »). Après décollement des cellules à

la trypsine, et inactivation de cette protéine, on collecte des fractions d'environ 50×10^3 cellules, qui sont encapsulées dans des matrices en agarose (de type « low melt », le choix de cet agarose est assez délicat). Ensuite, les matrices d'agarose permettent de réaliser les étapes de lyse et purification en minimisant les contraintes mécaniques sur les chromosomes, qui, du fait de leur grande longueur de $10\text{-}100 \times 10^6$ bp, sont très fragiles. Les traitements de purification consistent à immerger les blocs d'agarose pendant plusieurs jours dans des solutions contenant du SDS (un surfactant qui casse les liaisons ADN-protéines) et de la protéinase K (une enzyme de restriction protéinique). Juste avant les expériences nanofluidiques, nous faisons fondre les blocs d'agarose à 50°C et diluons les solutions avant d'envoyer la solution dans les canalisations. Notons qu'il est également possible de digérer l'agarose avec l'enzyme β -agarase.

L'ADN est marqué en fluorescence avec un intercalant appelé YOYO-1 (homodimère d'oxazole, Molecular Probes), qui est incorporé à un rapport de 1 fluorophore pour 10 paires de bases. Ce fluorophore est ajouté juste avant les expériences.

6. Microscopie

6.1 Spécification du dispositif optique pour le suivi de molécules uniques

Nous avons mis en place un dispositif de microscopie destiné au suivi de molécules uniques d'ADN dans des nanocanaux. Tentons d'en définir les spécifications avant de rentrer dans les détails du montage proprement dit. Nous souhaitons suivre des molécules individuelles en microscopie de fluorescence, ce qui impose d'utiliser des optiques collectant un grand nombre de photons afin de correctement caractériser la conformation des biomolécules. L'efficacité de la collection, notée E , est proportionnelle au rapport de l'ouverture numérique (notée NA) à la puissance 4, divisée par le grossissement (noté M) à la puissance 2 ($E \approx NA^4 / M^2$, (Frigault, Lacoste et al. 2009)). Il est donc primordial de choisir des objectifs à forte ouverture numérique, et nous avons travaillé avec un objectif à grossissement 100X ($NA=1,4$; $E \sim 4 \cdot 10^{-4}$) et 40X immersion à eau ($NA=1,2$; $E \sim 13 \cdot 10^{-4}$). Les deux grossissements ne conduisent à de mêmes tailles de pixels, mais, à ce stade, précisons juste que nous sommes amenés à travailler avec des ADN de grande taille ($ADN-\lambda$ a une distance bout-à-bout de 22 μm en présence de fluorophore (Reisner, Beech et al. 2007), qui sont correctement résolus avec des pixels de taille inférieure à 500 nm.

Notons pour finir que nous avons été amenés à caractériser la conformation d'ADN en cours de migration dans les nanocanaux avec des vitesses de 20 à 500 $\mu m/s$. Autrement dit, pour éviter d'observer des molécules floues, qui défilent devant le capteur au cours de l'acquisition, il est nécessaire de minimiser le temps d'exposition et donc d'utiliser des objectifs à fort rendement de collection en fluorophores.

6.2 Descriptif du montage optique

Décrivons maintenant les différents éléments de notre dispositif optique, qui est construit autour d'une plateforme Zeiss AxioVision (Fig. II.19).

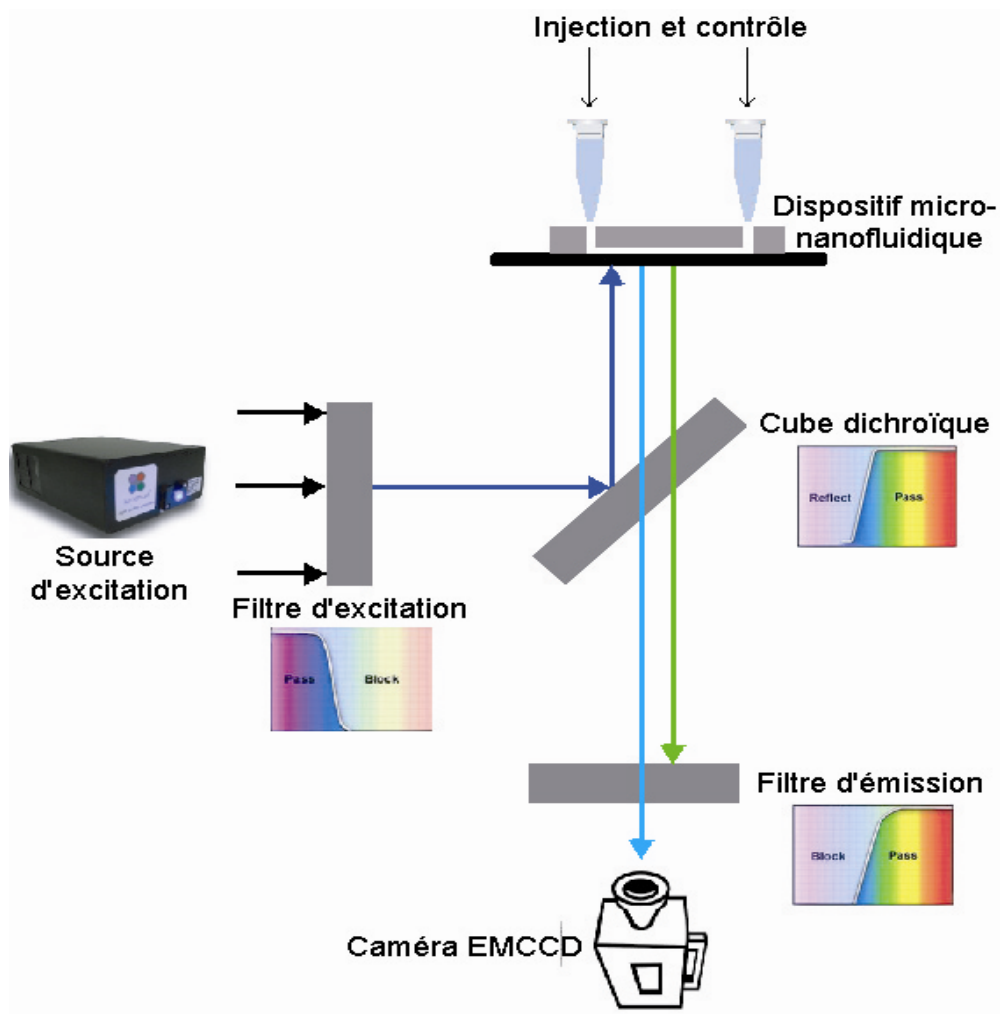


Figure II.19: Schéma récapitulant les principaux éléments d'un microscope à épifluorescence. Il comporte une source lumineuse dont le rayonnement est filtré par le filtre d'excitation puis réfléchi par le cube dichroïque vers l'échantillon. Le rayonnement émis est ensuite filtré par le filtre d'émission, avant d'arriver à un détecteur optique (en l'occurrence une caméra EMCCD).

6.2.1 Source de lumière

Pour la grande majorité de nos expériences, une source utilisant une technologie à diodes laser (modèle SPECTRA 7 light engines®) a été utilisée. Son gros point fort concerne l'asservissement très aisé et très fiable de la puissance émise pour une longueur d'onde donnée, parmi les 7 disponibles. On peut aisément asservir une puissance d'excitation comprise entre 2 et 200 mW pour l'excitation à 480 nm.

6.2.2 Filtres

Le choix des filtres (excitation, émission et cube dichroïque) est primordial pour l'amélioration du rapport signal sur bruit. Ainsi, le fluorophore que nous avons utilisé pour l'observation de molécules d'ADN est YOYO-1. Il a un pic d'excitation à 490 nm, et un pic d'émission à 510 nm. Nous avons choisi un filtre d'excitation dont le pic est à 470 nm (avec une bande passante de 40 nm), et un filtre d'émission dont le pic est à 525 nm (avec une bande passante de 25 nm). Le dichroïque a une valeur de transition de 495nm. Ce cube dichroïque est le modèle 38 HE de Zeiss® et ses caractéristiques sont illustrées sur la figure II.20.

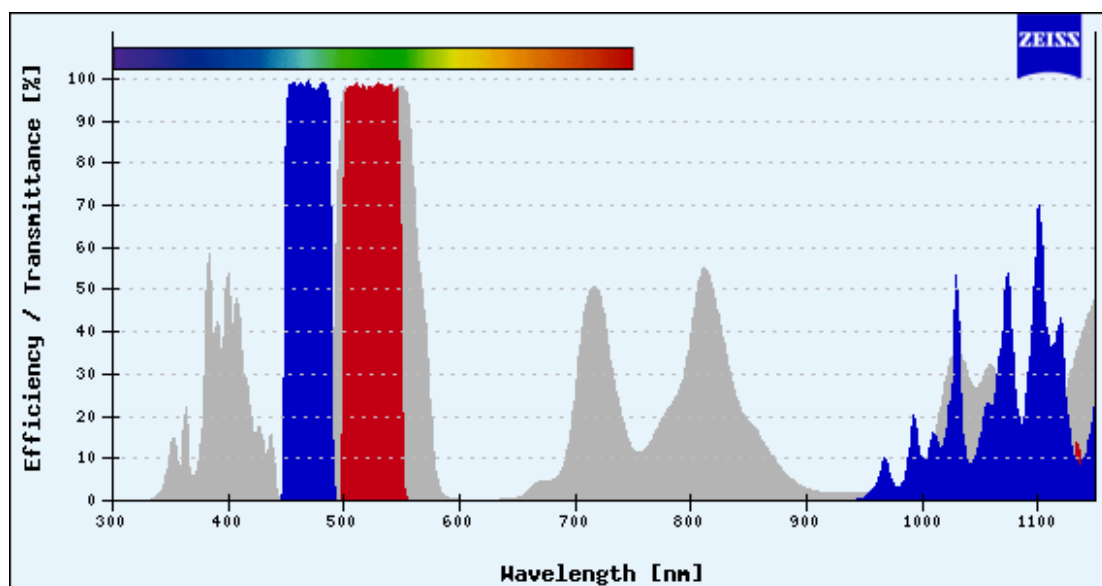


Figure II.20 : Caractéristiques spectrales du cube dichroïque 38 HE de Zeiss® utilisé sur notre banc optique

6.2.3 La caméra EMCCD, et la taille des pixels

Nous avons choisi la technologie EMCCD pour la caméra. Les EMCCD sont actuellement les meilleures solutions pour détecter de faibles flux lumineux, du fait de l'intégration d'un registre de multiplication analogique sur le capteur. Un capteur CCD est composé d'une zone active d'imagerie (photodiode carré) et d'un registre de

lecture. La photodiode est formée d'un capteur de lumière en silicium, qui stocke les électrons dans des puits de potentiel. A la fin de l'acquisition, les photoélectrons accumulés dans les pixels sont transmis de manière séquentielle, ligne par ligne, dans le registre de lecture. Cette dernière étape est lente, et constitue la principale limitation des caméras EMCCD. Notons que l'intégration d'un registre de gain dans les EMCCD permet de multiplier le signal par un gain M sans augmenter le bruit. Nous avons utilisé un modèle Andor « Du 885 » refroidi à une température de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cette caméra a une efficacité quantique, la probabilité de détecter un photon d'une longueur donnée, de 65 % et la taille de pixel est de $8 \times 8\text{ }\mu\text{m}^2$.

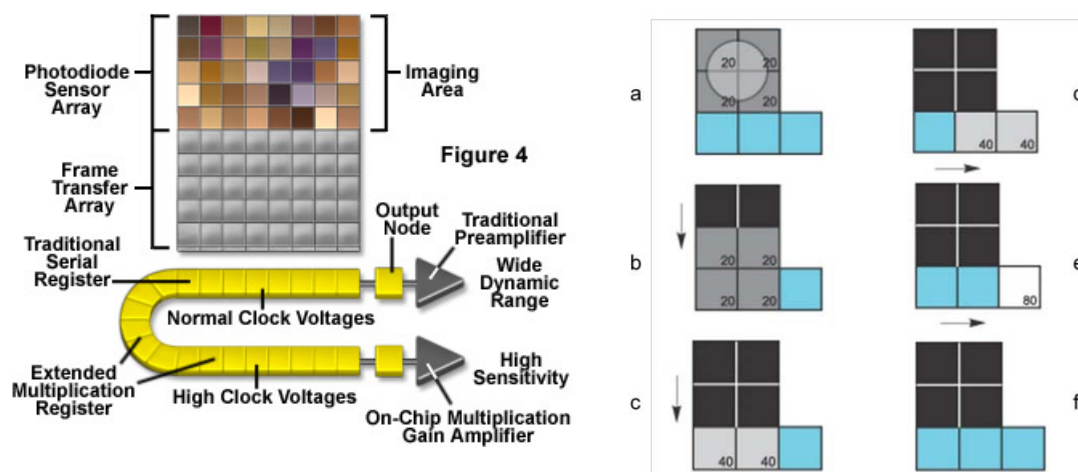


Figure II.21: Principe d'un capteur CCD avec un gain d'amplification (gauche), et principe du binning des pixels pour accélérer la vitesse d'acquisition.

Le "binning" est le processus de fusion de la charge collectée des pixels adjacents dans un CCD au cours de lecture. Ce processus est effectué avant la numérisation et l'amplification du signal dans les circuits par le contrôle des registres à décalage série et parallèle (Fig. II.21). Les deux principaux avantages du "binning" sont un meilleur rapport signal/bruit (SNR) et la capacité d'augmenter la fréquence des trames, mais au détriment de la résolution spatiale.

Le binning est déterminé en fonction d'un compromis avec le grossissement de l'objectif. Avec l'objectif 100X, nous avons comparé la qualité des images

obtenues avec un binning 2x2 et 4x4 (soit une taille effective de pixels de 162x162 nm² et 333x333 nm²) avec un temps d'exposition similaire de 10 ms (Fig. II.21). Le binning 4x4 nous a donné les meilleurs résultats, et nous avons effectué nos expériences dans ces conditions. Notons que pour l'objectif 40X, nous avons utilisé le même binning, et la taille de pixel représentait 550 nm.

Binning	SNR
2x2	12,4
4x4	17,9

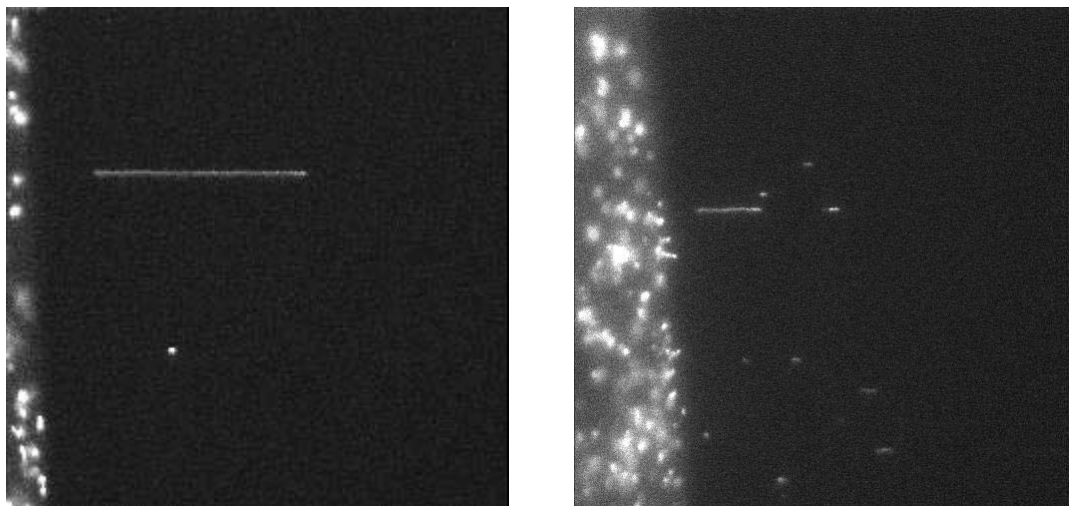


Figure II.22: Comparaison des images de molécules d'ADN individuelles obtenues avec un binning 4x4 (gauche) et un binning 2x2 (droite).

Partie III

Assemblage dirigé de micro et nano objets sur hydrogel structuré

1. Introduction

Une variété de technologies a été mise au point pour fabriquer des particules colloïdales avec des formes, des structures, des dimensions et des propriétés contrôlées qui font d'elles des objets de choix pour le développement de nouvelles générations de nano-systèmes. Un des principaux challenges dans le développement de tels dispositifs reste l'intégration des nano-objets sur de grandes surfaces, via des techniques d'assemblage dites « bottom-up », et notamment celles mettant à profit les phénomènes dits d'auto-assemblage. Ces processus survenant dans des environnements fluides et permettant d'organiser des particules le long de motifs, apparaissent aujourd'hui comme très prometteurs (Grzelczak, Vermant et al. 2010). Aussi, des études pionnières ont développé le principe de dépôt dits « contact-line », qui exploite des flux capillaires en gouttes pour diriger la formation de motifs en cercle et ce à l'échelle millimètre (Deegan, Bakajin et al. 1997) et même du micromètre (Govor, Reiter et al. 2004). Un autre mécanisme d'assemblage basé sur des flux convection, entraînés par l'évaporation du solvant sur ligne de contact de gouttelettes, s'est montré adapté à la formation de couches bidimensionnelles de micro-et nanoparticules à grande échelle (Prevo and Velez 2004). Afin d'obtenir des réseaux linéaires de colloïdes avec des espacements variables sur un moule, il a également été proposé de tremper le substrat dans une solution de colloïdes et de contrôler la vitesse de l'évaporation du solvant en chauffant, ainsi que la vitesse de retrait du substrat de la solution (Huang, Tao et al. 2006). L'utilisation de moules texturés par lithographie électronique ou optique (Yin, Lu et al. 2001; Cui, Bjork et al. 2004), ou des motifs gravé sur silicium (Yin, Lu et al. 2001) ou poly-diméthylsiloxane (PDMS) (Malaquin, Kraus et al. 2007) a permis de considérablement élargir les potentialités de l'assemblage capillaire et convectif. En effet, via ces techniques issues de la microélectronique, des structures complexes peuvent être générées pour le piégeage de particules à des positions contrôlées, et ce sur de grandes surfaces, et avec des résolutions de l'ordre du micron (Kraus, Malaquin et al. 2007). Toutefois, ces technologies nécessitent des équipements onéreux, et des savoir-faire spécifiques et

un contrôle drastique de l'environnement qui entravent leurs distributions dans les laboratoires de recherche.

Dans ce chapitre, nous présentons une technologie simple et polyvalente pour assembler des micro et nano particules selon des motifs de complexité différente à l'échelle du micromètre et sans aucune manipulation externe. Notre méthode emploie des polymères hydrophiles (poly-acrylamide (PAM) et polyéthylène glycol (PEG)), d'utilisation répandue dans les milieux académique et industriel, notamment, en biotechnologie, pour la modification de surface, mettant à profit leur imperméabilité à l'adsorption de protéines (Feldman, Hahner et al. 1999; Kingshott, McArthur et al. 2002). Par ailleurs, les hydrogels de PAM et PEG sont biocompatibles, et déjà répandus pour des applications de biologie moléculaire, une des plus répandues étant leur utilisation, comme matrice de séparation par taille d'ADN et de protéines par électrophorèse (Schmalzing, Piggee et al. 1993; Viovy 2000) ainsi que pour les recherches en biologie cellulaire, car elles constituent un fond de cellules résistantes dans la culture cellulaire (Berg, Yang et al. 2004). Les demandes plus tard a motivée des développements technologiques basés sur photolithographie ou micromoulage (Khademhosseini and Langer 2007; Kobel, Limacher et al. 2009) pour générer des substrats micropuits pour l'ingénierie tissulaire. Nous établirons ici le protocole mis au point pour la structuration des hydrogels PAM /PEG par micromoulage. Nous montrerons ensuite comment ceux-ci permettent l'assemblage dirigé de micro et nanoparticules le long de motifs de différentes complexités. Le mécanisme d'assemblage ayant été investigué par imagerie en temps réel, nous montrerons comment cette organisation se construit et mène vers deux résultats différents, à savoir une organisation des colloïdes aux sommets des structures ou à leur base, suivant que celle-ci est dirigée par les seuls flux créés par l'évaporation du solvant (sur gel sec) ou bien par une combinaison de ceux-ci avec des flux de perméation vers l'intérieur du gel humide. Les conditions optimales d'assemblage en réseaux linéaires de particules de polymère, d'or, ou d'oxyde de cuivre seront ensuite définies, et nous mettrons en avant la polyvalence de notre technologie. Enfin, nous développerons deux stratégies de transfert de réseaux organisés de particules

d'or sur substrat de verre et de silicium, la première étant basée sur la gravure sacrificielle des hydrogels, la seconde sur l'impression par contact direct avec un substrat. Nous montrerons enfin que les particules ainsi transférées conservent leurs propriétés de surface par la mise en place d'une expérience de greffage d'ADN. Nous concluons enfin sur les multiples possibilités offertes par la technique d'auto-organisation sur hydrogel de PAM / PEG, qui font d'elle une candidate de choix pour l'intégration de micro-nanoparticules dans des systèmes fonctionnels.

2. Description des hydrogels utilisés

2.1 Structure des monomères

Nous avons utilisé deux différents types d'hydrogel, formés soit à partir de monomères d'acrylamide, soit de monomère d'éthylène glycol ((Fig. III.1, gauche et droite, respectivement). Ce sont deux composés très communs à la fois dans l'industrie, en particulier agroalimentaire, mais aussi dans le milieu académique, principalement en biochimie de l'ADN ou des protéines puisque l'acrylamide constitue un support classique pour la séparation de biomolécules.

Notons que ces deux monomères ne présentent pas la même réactivité chimique, puisque l'acrylamide dispose d'une double liaison carbone, qui est utilisée pour la polymérisation, alors que l'éthylène glycol est très inerte chimiquement.



Figure III.1 : Formule chimique de l'acrylamide (gauche) et de l'éthylène glycol (droite)

2.2 Polymérisation

Considérons d'abord le cas de l'acrylamide. La réaction de polymérisation est effectuée soit par polymérisation en chaîne radicalaire, soit par additions successives

de monomères sur une extrémité active de la chaîne macromoléculaire. Cette réaction se déroule en trois phases : l’amorçage, la propagation et la terminaison. Ce scénario aboutit à la formation de chaînes de polyacrylamide (pAM) polydisperses, ce degré de polydispersité pouvant être ajusté en jouant sur les conditions réactionnelles, par exemple en contrôlant la concentration en monomères ou la concentration en amorceur réactionnel. La polymérisation aboutit à une solution concentrée en chaînes linéaires, et la formation d’un gel de polymère nécessite d’associer physiquement ces chaînes entre elles. Pour ce faire, nous utilisons le bis-acrylamide, qui est un agent réticulation (Fig. III.2, haut). De plus, deux agents de polymérisation, à savoir le TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) et l’ammonium persulfate (APS), qui servent respectivement de catalyseur et d’initiateur de la réaction, peuvent aussi être utilisés.

Dans le cas du polyéthylène-glycol (pEG), nous avons utilisé un composé commercial pEG-diacrylate (pEG-DA) formé d’un cœur polymérisé comprenant ~11 monomères et de deux extrémités réactives comprenant des double liaisons carbone (Fig. III.2, bas), activées avec le même mélange que pour le poly-acrylamide, à savoir TEMED + APS.

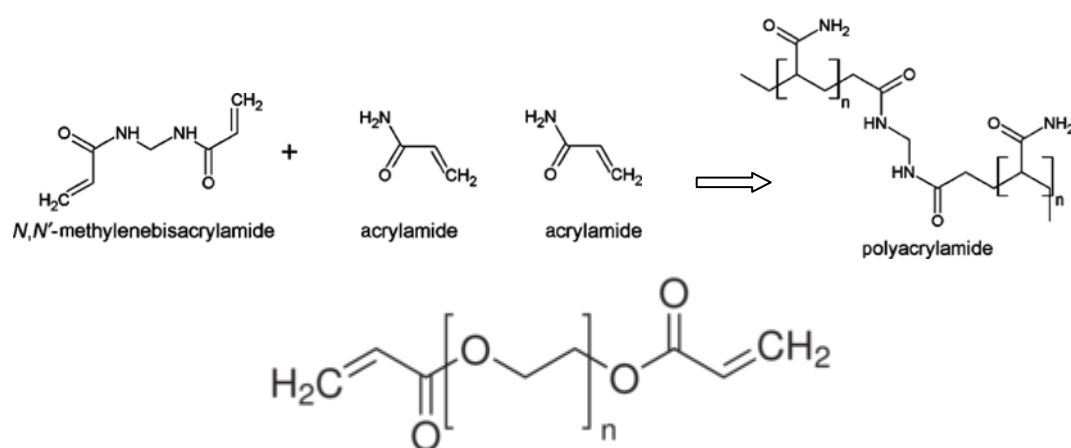


Figure III.2 : Le panneau du haut représente la formation de chaînes de polyacrylamide réticulées, et la structure du bas est l’unité réactionnelle utilisée pour la formation d’hydrogels PEG réticulés.

D’un point de vue pratique, nous avons testé plusieurs concentrations en acrylamide pour la fabrication de gels hydrophiles. Nous avons ainsi utilisé un

mélange commercial de monomères d'acrylamide et de Bis-acrylamide dans un rapport 29:1, de concentration initiale en masse de 40% dans l'eau pour solution mère. Cette dernière a été diluée dans de l'eau pour aboutir à une concentration finale de 2, 4, 10, et 20%. Les gels de concentrations de 4 et 10% se sont révélés être les plus adaptés à notre étude. Pour le pEG, la solution mère de monomère a été utilisée à une concentration de 5% dans l'eau. Les concentrations en TEMED et APS ont été fixées à 0,5 et 0,2%, respectivement.

3. Fabrication et caractérisation d'hydrogels structurés

3.1 Fonctionnalisation de surface pour le greffage physique d'hydrogels

Si nous avons introduit plus tôt le matériau dans lequel transférer nos structures, il reste encore à voir comment greffer celui-ci sur notre surface support en verre, le seul dépôt de ce matériau sur cette dernière n'était pas suffisant pour garantir la stabilité de notre système. Nous avons choisi un traitement dit de silanisation pour permettre ce greffage.

Le silane 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (aussi appelé le γ -méthacryloxypropyltriméthoxysilane, Fig. III.3) réagit via son extrémité méthacrylate avec le polymère d'acrylamide, ou les doubles liaisons C du pEG-DA. Ce silane est neutre, ne s'ionise pas en solution et son extrémité Si-(OCH₃)₃ (triméthoxysilane) est destinée à s'accrocher sur la surface support en verre.

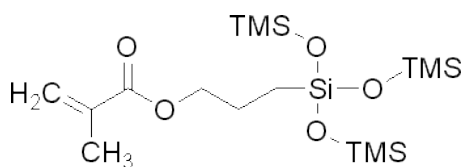


Figure III.3 : Formule chimique du silane 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate

Le protocole de silanisation comprend les étapes suivantes :

Afin d'activer la surface, nous immergeons d'abord les lamelles de verre dans un bain de soude (1 M), puis le substrat est lavé à l'eau désionisée (EDI). On procède enfin à sa neutralisation à l'aide d'acide chlorydrique 0,5 M. On rince ensuite la surface à l'EDI puis à l'éthanol (les traces d'eau persistantes pourraient en effet interagir avec les molécules de silane). On termine enfin par un rinçage au solvant de silanisation, le trichloroéthylène. On procède ensuite à l'étape de silanisation consistant à tremper le substrat dans une solution contenant le silane à une concentration de 1% dans du trichloroéthylène pendant 12 h. On termine enfin par un rinçage du substrat dans un bain contenant le solvant de silanisation puis un bain d'éthanol en enfin dans un bain d'EDI.

3.2 Fabrication de gel texturé

Nous souhaitons à ce stade décrire le procédé pour réaliser des surfaces de gels texturées. Pour ce faire, nous utilisons un procédé de micro-impression avec un moule microfabriqué selon le procédé décrit au chapitre II (paragraphe 2). Les moules sont fabriqués en silicium et ils sont recouverts d'or, matériau très peu réactif et très hydrophile.

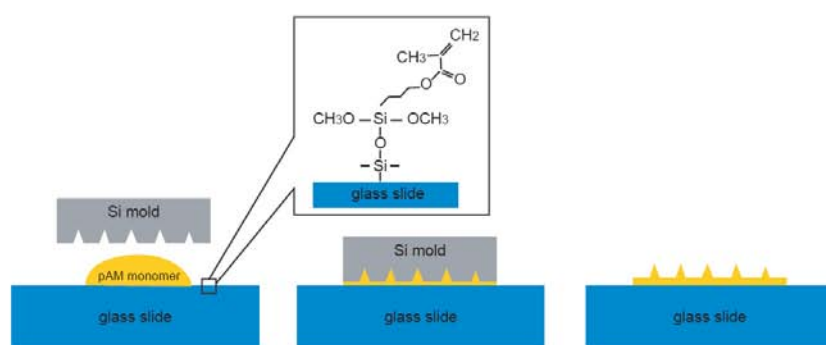


Figure III.4 : Procédé de fabrication de hydrogel texturé : a) la solution monomère+TEMED+APS est déposée sur le substrat silanisé; b) le moule est déposé sur la goutte, et le hydrogel est réticulé dans environ 5 minutes ; c) le moule est enlevé après la réticulation de hydrogel et le gel texturé est fabriqué et greffé sur le substrat.

Le protocole débute par le nettoyage des moules, par une exposition à un plasma d'oxygène (débit de gaz 1000 l/min, 800 W, pendant 3 minutes sans cage de Faraday). 50 μ l de solution d'acrylamide ou de pEG-DA sont déposés sur le substrat silanisé, formant une goutte du fait de l'hydrophobicité du silane sur laquelle on vient immédiatement reporter le moule (Fig. III.4). Le caractère hydrophile du moule assure la bonne couverture de la solution entre les deux surfaces. Ce « sandwich » est ensuite laissé au repos durant 5 minutes à température ambiante, temps nécessaire à la réticulation de la solution d'hydrogel. Après démoulage, on obtient sur le substrat une couche d'hydrogel greffée mise en forme par les motifs du moule. Une photographie du moule de dimension 3x1 cm², ainsi que l'hydrogel texturé obtenu avec notre procédé en utilisant une lamelle de microscope comme support sont présentées en figure III.5. En outre, nous présentons des images de microscopie électronique de la surface des gels après le procédé d'impression. On notera que la surface est de très faible rugosité et l'excellente reproduction des motifs obtenue grâce à notre procédé.

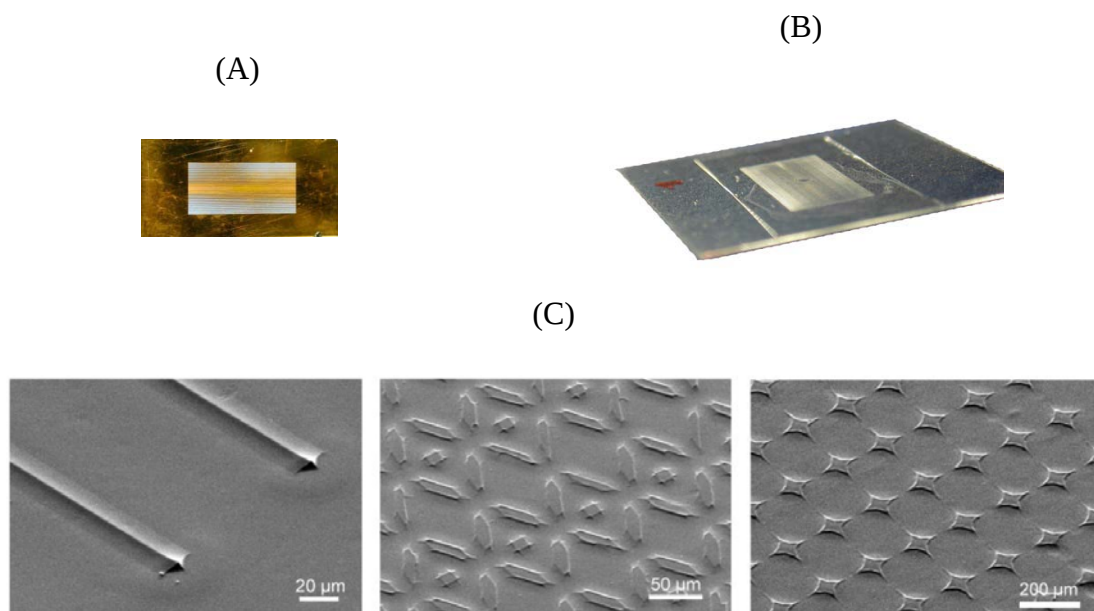


Figure III.5 : (A) Photographie d'un moule (3 cm x 1 cm) de silicium couvert d'une couche d'or avec des motifs en forme de V, et (B) d'un hydrogel de polyacrylamide 10% texturé sur lamelle de verre et mis en forme avec le moule présenté en a). (C) Clichés de microscopie électronique des différents motifs obtenus par micro-impression. Les surfaces des gels ont été recouvertes d'un film d'or de ~5 nm afin d'améliorer la qualité des images.

3.3 Caractérisation topographique des gels

Les caractéristiques topographiques, à savoir la hauteur, la largeur, mais aussi la rugosité des surfaces, conditionnent de manière drastique les effets physiques que nous souhaitons investiguer. Aussi, il est crucial de les mesurer avec la plus grande précision. Ces mesures ont été menées sur les gels de pAMsec de concentration 4 et 10% environ 30 minutes après la réticulation, le temps nécessaire à un séchage complet et donc à l'obtention de structures stables. La figure III.6 est une photographie acquise à l'aide d'un microscope optique (objectif 20X) en lumière blanche de motifs en V. De plus, nous avons mené une étude par microscopie à force atomique (AFM), qui nous a permis d'acquérir les caractéristiques géométriques tridimensionnelles des structures. La figure III.6 présente le résultat de cette investigation. La zone explorée correspond à la zone marquée par un rectangle noir sur la figure III.6. La figure présentée traduit le profil tridimensionnel d'un motif en V d'une largeur à la base de 30 μm et d'une hauteur de 500 nm.

Ayant façonné des motifs en V qui diffèrent de par la longueur de leurs bases et leurs hauteurs dans le moule de silicium, nous avons voulu caractériser l'influence de la concentration en gel de pAM sur la structure des motifs. Les profils $z(x)$ (z définissant la hauteur par rapport au plan de la surface et x une dimension transverse au motif dans le plan de cette dernière) de trois différents types de motifs sont présentés en figure III.7, et ce pour des gels de concentration de 4 et 10% en monomère d'acrylamide. La largeur des motifs varie de 10 à 30 μm pour des hauteurs allant de 500 nm à 2,5 μm dans le cas de gels de concentration 10% en monomère d'acrylamide. Dans un gel de concentration 4% en monomère, la largeur varie de 20 à 35 μm et la hauteur de 0,4 à 1,2 μm . On observe donc un rétrécissement relatif bien plus marqué sur les motifs fabriqués dans le gel à 4%, ce qui peut s'expliquer par le fait que celui-ci a une teneur initiale en eau plus importante. En effet, l'évaporation se traduit par un effondrement vertical des structures, dirigé par l'ancrage covalent à la surface du verre, si bien que les motifs conservent leur largeur mais diminuent considérablement en épaisseur.

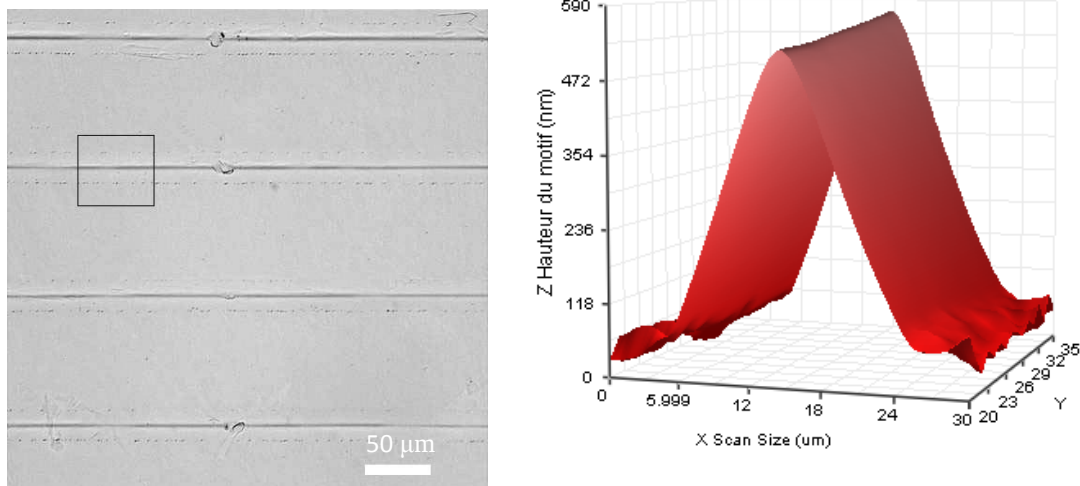


Figure III.6 : Motifs en forme de V imprimés sur polyacrylamide (lumière blanche). Figure 3D d'un motif (AFM)

Notons que cet effondrement vertical des motifs se traduit par une diminution très importante des angles de base des motifs (voir l'insert de la figure III.7, gauche). En effet, le moule, obtenu par gravure humide d'un substrat en silicium(110), est caractérisé par des angles de base de 35°. Après séchage, l'angle des motifs a diminué jusqu'à des valeurs comprises entre 1° et 4° suivant la concentration en acrylamide du gel. De plus, les motifs imprimés avec un moule comprenant des sillons de 60 μm en largeur et 25 μm en hauteur ont une taille finale de 2,5 et 0,9 μm selon que l'on utilise un gel concentré à 10 ou 4%. Autrement dit, le taux d'effondrement vertical, qui vaut $2.5/25 \sim 10\%$ et $0.9/25 \sim 3.6\%$, est en accord avec la concentration en monomère.

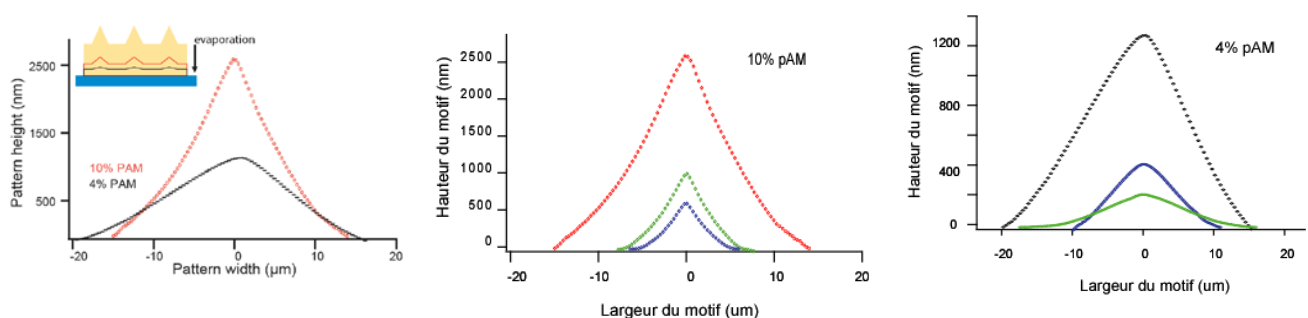


Figure III.7 : Profils $z(x)$ de différents motifs transférés dans des gels de concentration 10% et 4% en monomère d'acrylamide. Le panneau de gauche montre les profils pour une même largeur de motifs de 30 μm avec une concentration en acrylamide différente, et les panneaux du milieu et de droite représentent différents motifs obtenus pour une même concentration d'acrylamide.

4. Assemblage dirigé de nano-objets sur motifs linéaires

Une fois le gel texturé, on procède à l'étude de l'assemblage de particules à sa surface. Pour cela, on dépose et étale un volume de 20 μl d'une solution contenant des billes fluorescentes à la surface de ce dernier. Le système est ensuite laissé à température ambiante durant environ 1 heure, temps nécessaire à l'évaporation du solvant. On observe enfin l'agencement des particules à l'aide d'un microscope. Les différentes étapes de la manipulation sont présentées sous forme de diagramme en figure III.8.

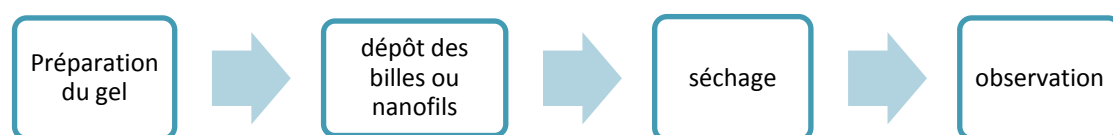
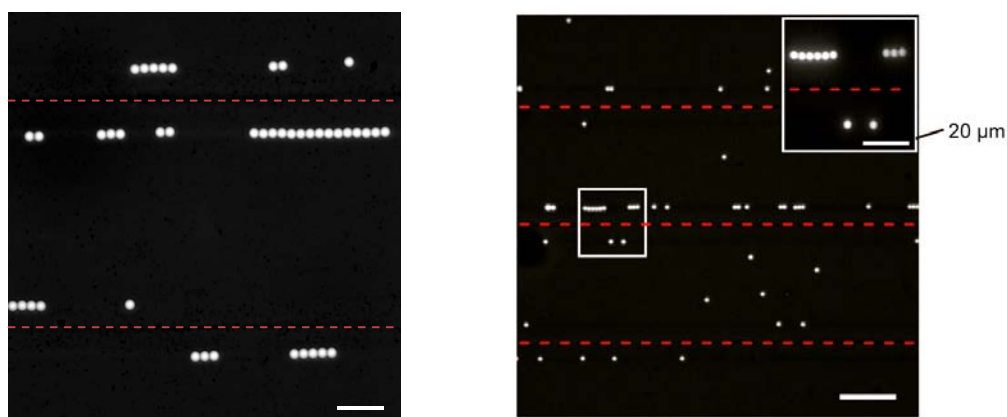


Figure III.8 : Protocole expérimental pour les expériences d'assemblage de nano-objets

4.1 Assemblage : rôle de la taille des particules

Nous avons découvert de manière fortuite un phénomène d'assemblage spontané des particules le long de la base des motifs au cours de la phase d'évaporation de l'eau. Nous avons ensuite vérifié que ce phénomène avait lieu quelque soit la taille des nanoparticules considérées, en utilisant des particules de latex de différentes dimensions.



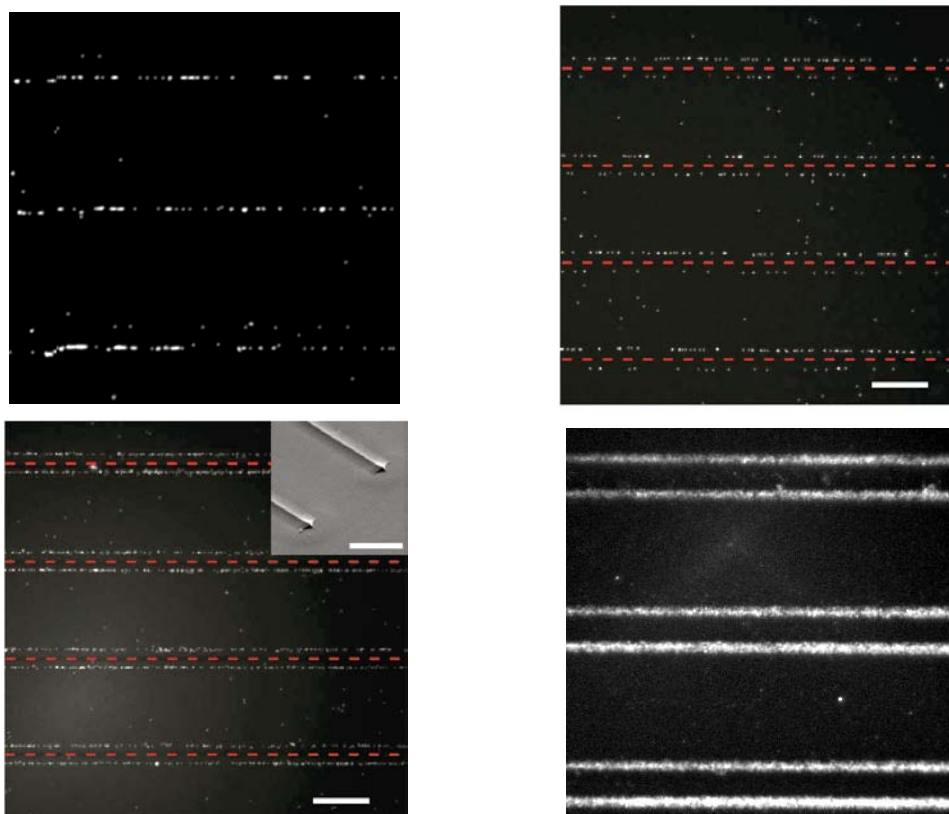


Figure III.9 : Clichés de microscopie optique de fluorescence représentant la distribution des particules à la fin du processus de séchage. Nous avons testé l’organisation pour une gamme de taille de nanoparticules comprenant 10 μm , 4 μm , 1 μm , 0,5 μm , 0,17 μm et 0,1 μm (dans l’ordre depuis le panneau en haut à gauche jusqu’en bas à droite). Les barres d’échelles représentent 20 μm .

Notons que les billes de taille supérieure à 3 μm ont été assemblées avec une organisation en collier de perles comprenant jusqu’à une vingtaine des particules collées les unes aux autres.

4.2 Assemblage : rôle de la nature physique des particules

Après avoir démontré que les billes fluorescentes en polymère s’organisaient spontanément selon des lignes, nous avons souhaité savoir si la nature physique des objets, et en particulier leur densité, changeait le processus d’assemblage. Nous avons donc réalisé des expériences avec des particules d’or dont la densité est 19.3 g/cm^3 , à comparer à 1,05 g/cm^3 pour des billes de latex. Nous avons également complété ces expériences avec des particules magnétiques, c'est-à-dire des matériaux composites formés d’une matrice en polymère dans laquelle sont encapsulées des nanoparticules

de fer, qui présentent une densité de 1,6 et 1,8 g/cm³ (spécifications du fournisseur DynalBiotech (Invitrogen)).

Nous avons observé que les billes d'or de 100 et 250 nm de diamètre, étaient réparties aléatoirement sur la surface du gel, indépendamment de la présence de motifs (Fig. III.10, A). L'alignement de billes magnétiques de 2,8 µm s'est lui aussi révélé peu efficace (Fig. III.10, G), ce qui démontre que le mécanisme d'assemblage ne fonctionne pas dès lors que les billes sont trop denses. Sans décrire le mécanisme d'assemblage à proprement dit (voir ci-après), nous avons rapidement constaté que les particules lourdes sédimentent à la surface du gel en un temps plus court que les 30 minutes nécessaires à l'évaporation de l'eau. Elles restent donc distribuées aléatoirement sur le gel tout au long du processus.

Nous avons poursuivi ce travail en étudiant le comportement de nanoparticules d'or pour lesquelles la diffusion est plus forte que la sédimentation si bien qu'elle reste en suspension pendant toute l'évaporation. Pour préciser la limite de taille R à laquelle les particules flottent ou sédimentent, revenons à la définition du nombre de Péclet, qui compare l'effet des forces de convection (vitesse liée à la gravité U) par rapport aux forces de diffusion (coefficient de diffusion D) :

$$Pe = \frac{UR}{D} = \frac{mgR}{\mu D} = \frac{mgR}{k_B T} = \frac{4\pi R^4 \rho g}{3k_B T} \quad (\text{III.1})$$

Où R est la taille des particules, ρ leur densité, g la constante de gravité, et $k_B T$ l'énergie d'agitation thermique. Si Pe est plus grand que 1, alors les forces de gravité dominent, et les deux effets sont en balance pour $Pe=1$, ce qui correspond à une particule de ~80 nm pour l'or. Dans le cas de particules inférieures à cette limite en taille, nous avons obtenu de bons alignements de nanoparticules (Fig. III.10, B-C-D). Les mêmes résultats ont ensuite été confirmés avec d'autres objets (nanoparticules de 150 nm en cuivre, densité=6,3 g/cm³, $Pe<1$, Fig. III.10, F).

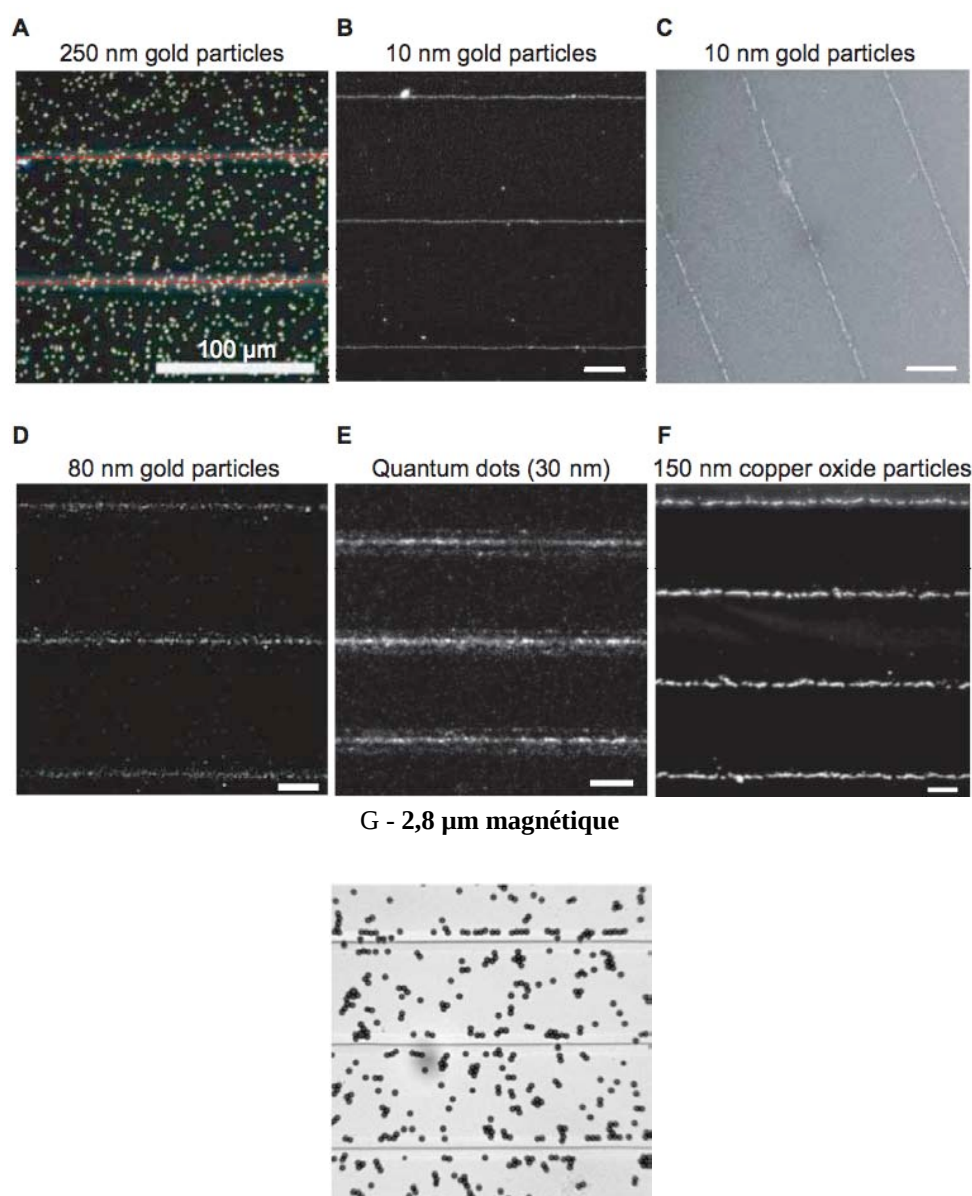


Figure III.10 : Clichés présentant le résultat de notre procédé d'assemblage pour des nanoparticules de différentes dimensions en or (A-B-C ; noter que A-B sont des images de microscopie en fond noir, et l'image C est obtenue par microscopie électronique), ou avec d'autres matériaux (D-E-F-G). Les barres d'échelles représentent 20 μm.

Au final, ce travail démontre la genericité de procédé d'assemblage des nano-objets suivants des motifs linéaires, dès lors que la sédimentation est suffisamment lente et/ou que la densité des objets est suffisamment faible.

4.3 Assemblage : rôle de l'eau emprisonnée dans le gel

Lors de nos expériences, nous avons détecté une source de variabilité en termes d'assemblage des nano-objets, qui étaient localisés soit au niveau du sommet soit à la base des motifs, comme le montre le résultat d'une expérience réalisée avec des billes de polymères de 100 nm sur des gels identiques en composition et en taille de motifs (Fig. III.11). Nous avons finalement réalisé que ce motif d'assemblage était déterminé par le gonflement du gel : lorsqu'on laisse au gel le temps de sécher (« gel sec ») avant de déposer les particules, elles s'assemblent au sommet des motifs. En revanche, sur un gel « humide » encore plein d'eau, l'accumulation de particules est détectée sur les flancs des motifs. La largeur des lignes de particules est beaucoup plus fine avec un gel sec qu'avec un gel humide pour des traceurs de petites dimensions.

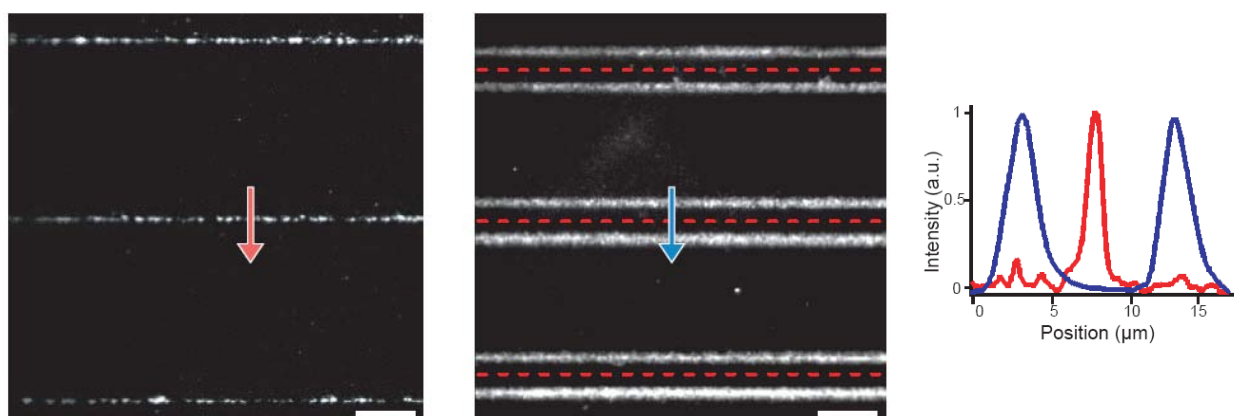


Figure III.11 : Comparaison de l'assemblage de billes de polystyrène fluorescentes de 100 nm sur un gel à 4% selon qu'il est « sec » (gauche) ou qu'il est « humide » (droite). Les barres d'échelles représentent 20 μm . Le panneau de droite montre l'intensité du signal de fluorescence le long des lignes représentées sur les deux images.

4.4 Détermination du rendement d'alignement

Nous avons enfin choisi de quantifier précisément le rendement d'alignement des particules utilisées. Pour ce faire, nous avons choisi de mesurer le nombre de particules placées le long des motifs, par rapport au nombre total de particules dans le

champ d'observation. Comme nous utilisons la microscopie de fluorescence, en corrigeant pour le fond d'image, nous pouvons calculer le nombre de particules par une mesure directe d'intensité de fluorescence. Il s'ensuit que le rendement d'alignement A peut s'écrire sous la forme :

$$A = \frac{R - \frac{S_p}{S_t}}{1 - \frac{S_p}{S_t}} \quad (\text{III.2})$$

Où R est le rapport entre l'intensité de fluorescence concentrée en bas des motifs sur l'intensité totale dans une image. Nous incluons dans la formule III.2 le rapport S_p/S_t entre la surface en bas des motifs et totale de l'image pour s'assurer d'avoir un rendement nul si les particules sont distribuées aléatoirement sur l'image. Ce calcul de rendement nous montre que les nano-objets de petites tailles sont très efficacement assemblés et ce, quelles que soient leurs natures.

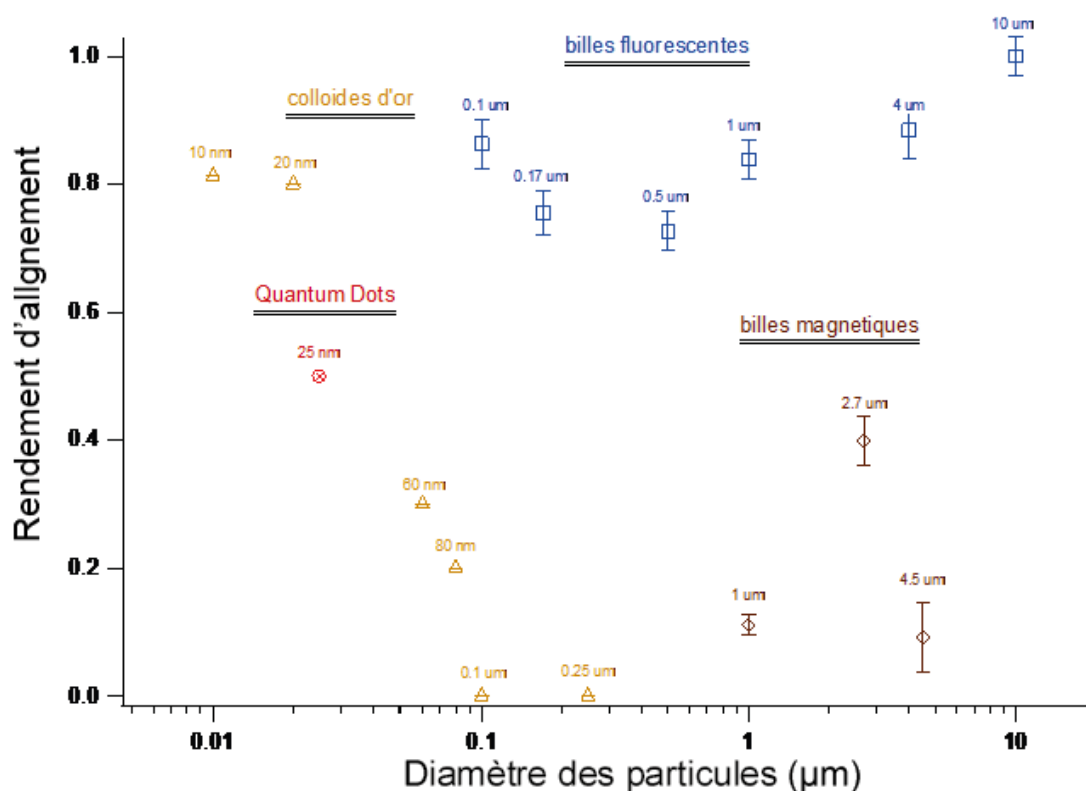


Figure III.12 : Rendement d'alignement pour différentes particules. Bleu : billes fluorescentes de diamètre 0.1, 0.17, 0.5, 1, 4 et 10 μm; Marron: billes magnétiques de diamètre 1, 2.7, 4.5 μm. Rouge : Quantum Dots de 25 nm. Jaune : billes d'or de diamètre 10, 20, 60, 80, 100, et 250 nm.

5. Etude des mécanismes d'assemblage

Nos résultats expérimentaux montrent clairement le rôle de l'hydrodynamique (la sédimentation empêche l'assemblage), et celui de la nature physico-chimique du gel (les motifs d'assemblage diffèrent selon que le gel est « sec » ou « humide »). Nous avons ensuite voulu étudier le mécanisme physique qui guide l'assemblage des particules, et nous avons réalisé des expériences de microscopie optique de fluorescence dans lesquelles nous avons suivi le mouvement de particules. Ces expériences ont été principalement réalisées avec des traceurs de taille micrométrique,

car ils sont très brillants, et adaptés à l'imagerie rapide.

Comme les gels jouent un rôle déterminant dans le mécanisme d'assemblage, nous avons effectué les expériences sur des supports secs et humides, et nous avons constaté que la dynamique des traceurs était différente dans les deux cas.

5.1.1 Assemblage dirigé par perméation

Dans le cas où le gel est gonflé d'eau, nous avons d'abord utilisé des traceurs polymère de 3 microns de diamètre. Nous avons constaté qu'ils sédimentaient à la surface du gel avant la fin du séchage, et qu'ils étaient alignés le long du bas de motifs au bout d'une heure. Pour comprendre cet apparent paradoxe, nous nous sommes concentrés sur les derniers instants pendant lesquels l'eau s'évapore. En microscopie de fluorescence on peut clairement observer que les billes, initialement aléatoirement distribuées, sont ramenées le long des motifs (flèches oranges, Fig. III.13A), puis elles glissent le long des motifs pour finalement former des arrangements en colliers de perles (flèches vertes, Fig. III.13A). Pour mieux comprendre ce mécanisme, nous avons utilisé un éclairage en lumière blanche et nous avons constaté l'existence d'un flux longitudinal le long des motifs (flèches dans la Fig. III.13B), et d'un ménisque qui recule spontanément vers les motifs (ligne pointillée orange, Fig. III.13B). Ce ménisque explique la force de traction, qui ramène les particules vers la base des motifs, et le flux longitudinal la formation de colliers de perles. L'existence de ce mécanisme explique la formation de lignes « larges », car le ménisque ramène les traceurs de petites dimensions jusqu'à la base des motifs avec peu de spécificité spatiale (Fig. III.13C).

Nous avons interprété l'existence de ce ménisque à un flux de perméation à travers le gel hydrophile (Fig. III.13D) : le gel ayant une forte affinité pour l'eau tend à l'aspirer comme une éponge, et cette aspiration de liquide est guidée par les motifs imprimés dans le gel. L'existence de ce flux de perméation a été confortée par l'observation de mouvements de recirculation à l'intérieur du ménisque, décrits par

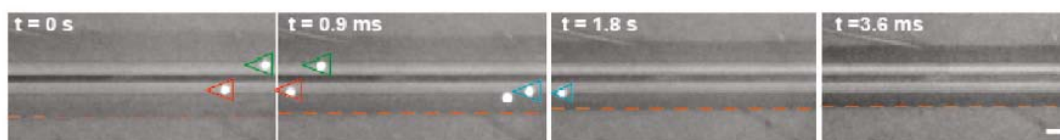
des flèches circulaires dans le schéma III.13D.

A ce stade, il est intéressant de noter que les expériences d'assemblage de nano-objets sont souvent réalisées sur des substrats en PDMS (Malaquin, Kraus et al. 2007). Or, le PDMS est un matériau à travers lequel il existe un flux de perméation (Randall and Doyle 2005). Aussi, l'assemblage par perméation, qui n'a jamais été décrite dans le cas du PDMS, joue très probablement un rôle dans les mécanismes d'organisation de nano-objets. En support de cette hypothèse, nous avons réalisé l'expérience d'assemblage sur un substrat en PDMS avec de micro-particules, et nous avons observé qu'une fraction des objets était effectivement assemblée le long des motifs. Ce dernier résultat suggère donc l'importance des flux de perméation dans les mécanismes d'assemblage, et l'utilisation de gels hydrophiles est un moyen de les exalter.

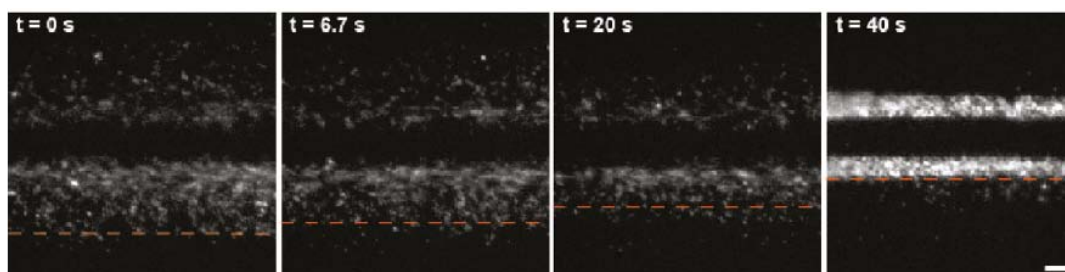
A



B



C



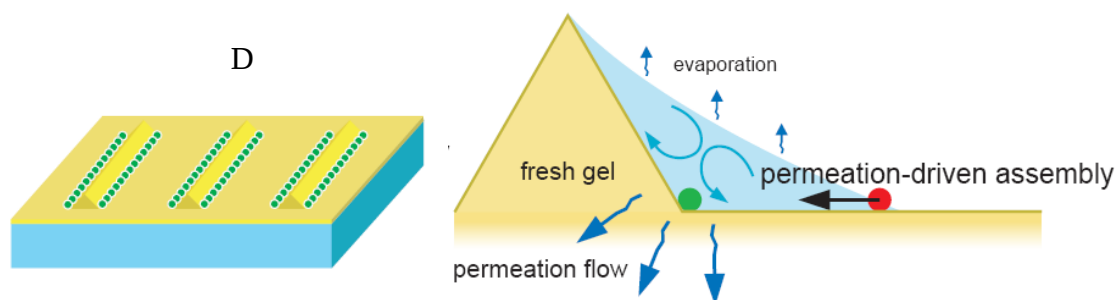


Figure III.13 : Assemblage sur gel humide. (A) Images tirées d'un film montrant le mouvement de particules fluorescentes de $4\ \mu\text{m}$ au cours de l'évaporation de l'eau. La position de ces billes ainsi que leurs directions successives sont figurées à l'aide de flèches colorées (B) Le ménisque de la goutte d'eau, se retirant peu à peu en direction des reliefs, est simultanément observé en lumière blanche par transmission et la ligne en pointillés orange indique sa position. (C) Traceurs de $100\ \text{nm}$ déposés sur un hydrogel frais restant en suspension dans l'eau pendant la rétraction du ménisque (ligne pointillée orange). (D) Description du mécanisme d'assemblage dirigé par la perméation. Les barres d'échelle représentent $20\ \mu\text{m}$, le temps est indiqué en seconde.

5.1.2 Assemblage dirigé par évaporation

Nous avons ensuite étudié le mécanisme d'assemblage sur un gel « sec », et nous avons suivi le comportement de billes de $0,5\ \mu\text{m}$ de diamètre. Au préalable, nous avons vérifié que le gel d'acrylamide, une fois séché, ne regonflait pas grâce à des mesures de profilométrie réalisée à la fin du séchage, et après 30 minutes d'immersion dans un liquide.

L'acrylamide est un support hydrophile, et le liquide contenant les particules recouvre complètement les motifs tout au long de l'évaporation de liquide. Au cours du temps, nous avons constaté l'existence d'un flux longitudinal aux motifs (flèche verte dans Fig. III.14A), et d'un flux orthogonal aux motifs (flèche bleue), qui guide les particules jusqu'au sommet des motifs. La position finement définie de l'arête supérieure des motifs se traduit donc par un assemblage finement localisé.

Nous avons interprété ce mécanisme d'assemblage comme une conséquence de l'évaporation de liquide plus prononcée au voisinage des pointes des motifs liée à la plus grande surface d'échange air-liquide (l'épaisseur de liquide est faible dans cette région, Fig. III.14B). Cette évaporation plus forte se traduit par un flux transverse

qui dirige les particules à la pointe des motifs. Ce mécanisme ressemble beaucoup à l'assemblage capillaire (Malaquin, Kraus et al. 2007), qui explique l'apparition d'une tâche circulaire noire après l'évaporation du liquide contenu dans une goutte de café. L'avantage des hydrogels texturés est qu'ils permettent de diriger la formation de motifs plus complexes que de simples cercles, et qu'il enrichit cette stratégie pour l'organisation spatiale de nano-objets.

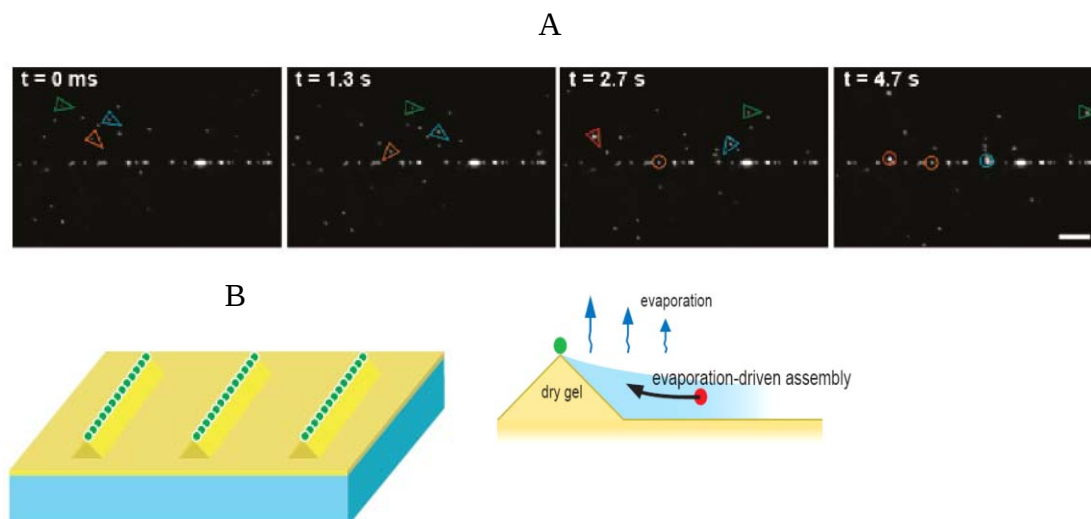


Figure III.14 : Dynamique d'assemblage sur gels secs. (A) Séquence temporelle obtenue par microscopie de fluorescence de particules de 0,5 μm (le temps est indiqué en insert). La barre d'échelle représente 20 μm . (B) Schéma décrivant le mécanisme d'assemblage dirigé par évaporation.

6. Assemblage dirigé sur des motifs complexes

Nous avons ensuite imprimé des motifs plus complexes, comprenant des lignes discontinues, des carrés, des vagues, des hexagones, ou encore des lettres (LAAS). Selon le mécanisme d'assemblage utilisé (gel « sec » ou « humide »), nous pouvons ainsi obtenir une grande variété d'organisation spatiale de particules, qui sont présentées dans la Fig. III.15 (nous présentons en insert les clichés de microscopie électronique des différentes topographies de gel). Ce travail démontre donc la grande versatilité de notre technologie d'assemblage, et donc son potentiel vaste champ d'application.

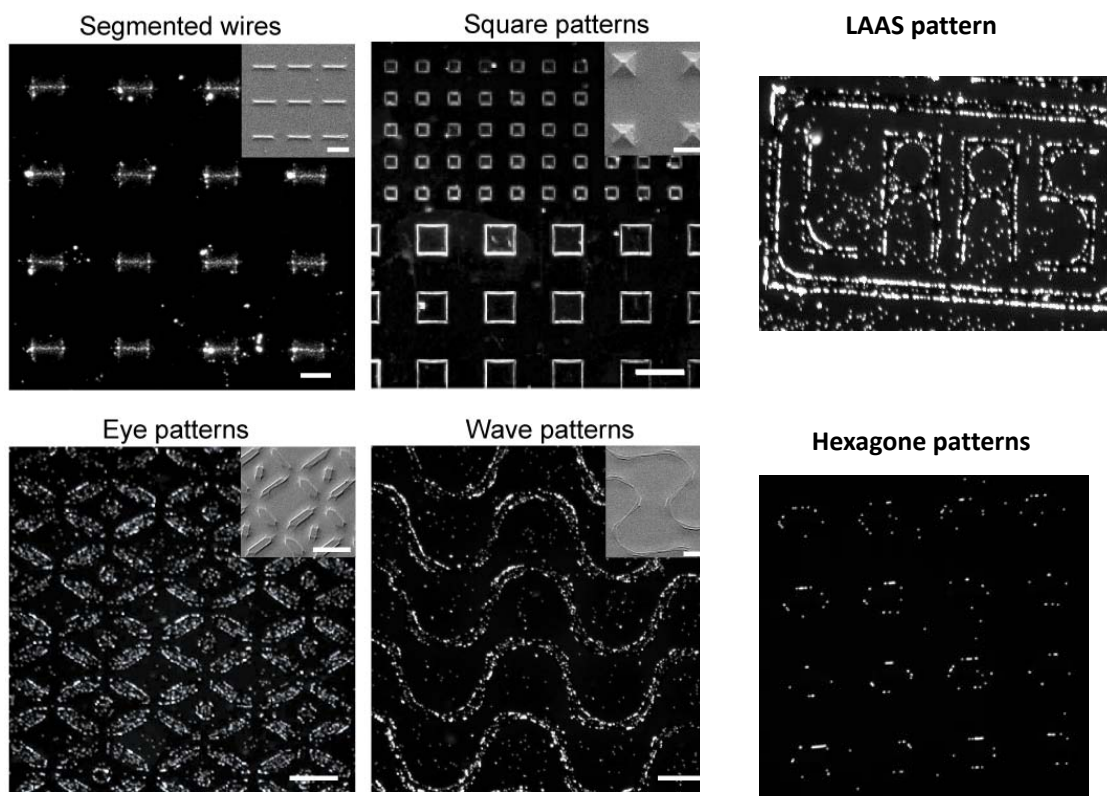


Figure III.15 : Assemblage de particules sur des motifs de différentes complexités. Des billes de latex de 1 μm ont été utilisées pour ces expériences, à l'exception du résultat présenté avec des segments, sur lequel on a effectué un assemblage de nanoparticules d'or de 20 nm. Les barres d'échelle représentent 20 μm .

Notons que nous n'avons pas effectué le travail d'évaluation des plus petits motifs réalisables, en termes de dimensions et d'espacement. A l'heure actuelle, nous pouvons donc seulement conclure que notre technologie est adaptée à des motifs isolés séparés de $\sim 20 \mu\text{m}$ et de dimension caractéristique minimum $\sim 10 \mu\text{m}$. Il suit de ce constat que nous ne parvenons pas à l'écriture de particules uniques, comme cela a pu être démontré avec des substrats en PDMS par l'équipe d'IBM Zürich (Kraus, Malaquin et al. 2007).

7. Réalisation de structures en multicouches

Les nanoparticules sont assemblées sur un gel hydrophile, ce qui ne constitue pas un substrat « conventionnel » pour les micro-nanotechnologies. Aussi, nous avons

souhaité développer des technologies de report pour déplacer les objets de la surface du gel vers des substrats en silicium ou en verre. D'un point de vue méthodologique, ce travail nous permet d'intégrer notre procédé d'assemblage dans une démarche de fabrication de composants complexes, dans lesquels sont superposées un ensemble de couches fonctionnelles. Nous avons exploré deux stratégies pour transférer les nanoparticules, soit en utilisant une gravure sèche, soit par report direct par contact, et nous nous proposons de présenter ces résultats dans cette partie.

7.1 Transfert des motifs par plasma oxygène

La gravure sèche par plasma O_2 attaque sélectivement les composés organiques, car les atomes de carbone sont dégradés en dioxyde de carbone. Aussi, dans le cas d'assemblage avec des nanoparticules métalliques ou d'oxyde métalliques, qui sont stables vis-à-vis du plasma, nous avons tenté de dégrader le gel, et ainsi de reporter les particules sur le substrat solide sous-jacent (verre ou silicium, Fig. III.16). Notons que ce procédé nous a permis d'observer les lignes de nanoparticules d'or par microscopie électronique comme dans la Fig. III.10C.

Le protocole que nous avons développé repose sur les paramètres suivants : Débit de O_2 : 1000 mL/min, Puissance RF : 800 W, durée : 15 minutes. L'attaque est menée sans cage Faraday pour une attaque physique rapide. Il faut toutefois remarquer que ce procédé n'est pas tout à fait inerte pour les nanoparticules, car il est par exemple accompagné d'un fort échauffement (100-150°C), qui peut se traduire par une fusion des nanoparticules, qui perdent alors leur forme sphérique.

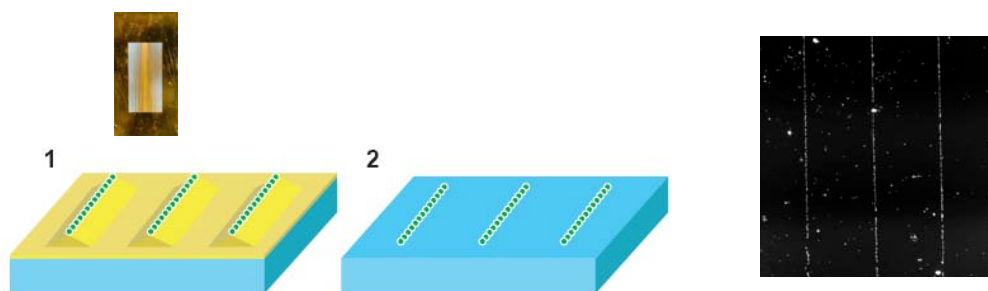


Figure III.16 : Schéma de fabrication des lignes de colloïde d’or de 10 nm de diamètre.

1. Assemblage du premier niveau de colloïde d’or sur gel sec. 2. Après traitement plasma oxygène, le gel est dégradé et les colloïdes sont transférés sur le substrat. Une photo de lignes de colloïde d’or microscopie en champ noir est montrée à droite.

Pour démontrer la pertinence de ce procédé, nous avons effectué un assemblage en réseau de nanoparticules d’or. Le premier niveau de fabrication est réalisé en suivant le protocole précédemment décrit, qui comprend donc la texturation du gel par moulage et l’organisation des billes par évaporation du solvant puis à leur transfert sur la surface support par gravure du gel. A la fin de cette étape, les billes sont organisées en lignes parallèles (Fig. III.16), suivant les crêtes des motifs en V.

Nous réalisons alors un deuxième niveau, qui consiste à fonctionnaliser à nouveau la surface de verre par des silanes, puis à greffer un gel de polyacrylamide de novo, dont les motifs sont orientés à 90° afin d’obtenir des réseaux carrés. On répète ensuite une deuxième fois l’étape de dépôt de billes, et le gel est enfin dégradé par plasma O₂. On obtient ainsi deux niveaux d’organisation de colloïdes suivant des directions orthogonales (Fig. III.17).

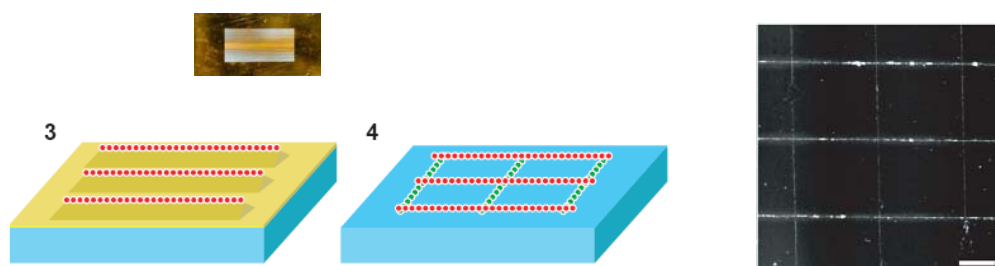


Figure III.17 : Schéma de fabrication des lignes de colloïde d’or de 10 nm de diamètre pour le deuxième niveau. 1. Assemblage du deuxième niveau de colloïde d’or sur gel sec en tournant le moule 90°. 2. Après traitement plasma oxygène, le gel est enlevé et les colloïdes d’or sont

transférés sur le substrat superposé sur le premier niveau. Une photo de réseau de colloïdes d'or en champ noir est montrée à droite. La barre d'échelle représente 20 μm .

7.2 Transfert des motifs sur une autre surface par impression

Le procédé de transfert par plasma n'est pas général dans le sens où il n'est pas adapté à des particules organiques, qui sont elles-aussi dégradées. Nous avons testé un protocole par report direct, c'est-à-dire par contact surface à surface (Balci, Leinberger et al. 2008). Ce protocole fonctionne si on augmente l'énergie d'interaction de surface des nanoparticules lors du procédé. Dans ce contexte, l'utilisation d'un hydrogel semble être une bonne option du fait de leur caractère non adhésif reconnu par exemple en biologie (Peppas, Hilt et al. 2006). Toutefois, nous ne sommes jamais parvenus à transférer les particules du gel de pAM vers une autre surface (éventuellement traitée avec des silanes pour augmenter les énergies d'adhésion). Cet effet est dû aux propriétés physico-chimiques de ce gel, qui est associée à forte énergie d'interaction avec toutes les particules manipulées, car le transfert s'est révélé très facile avec des gels de polyéthylène glycol. Nous avons ainsi pu déposer des particules d'or ou de polymère vers d'autres supports en silicium, verre, ou aluminium (Fig. III.18). Ce résultat démontre donc l'importance de contrôler les propriétés du gel utilisé pour l'assemblage afin de garantir de bonnes propriétés de transfert par contact direct.

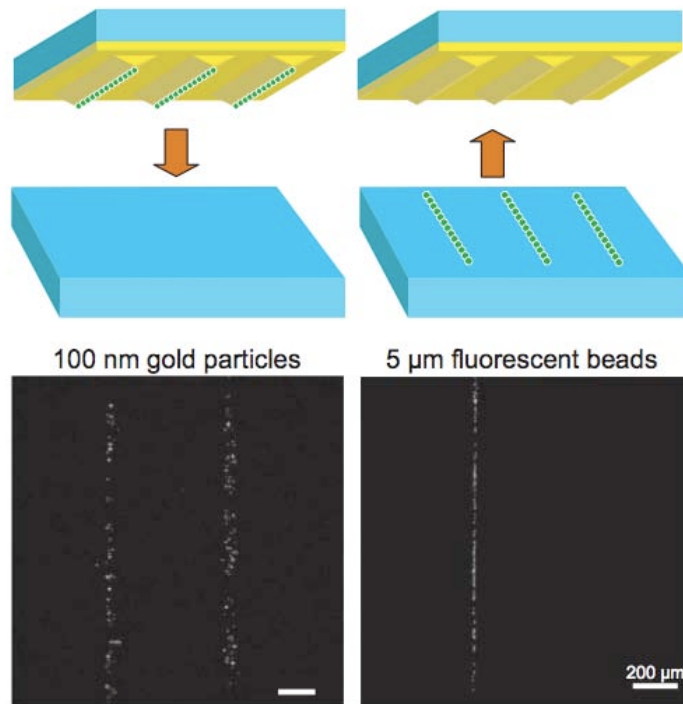


Figure III.18 : Transfert des colloïdes d’or de 100 nm et billes fluorescentes de 5 μm de diamètre par impression vers une autre lamelle de verre.

7.3 Comparaison des résultats avec le PDMS

Le poly-diméthylsiloxane (PDMS) (Malaquin, Kraus et al. 2007) est beaucoup utilisé comme substrat pour l’assemblage dirigé de particules, pour comparer avec nos hydrogels, nous avons fabriqué un substrat en PDMS avec des motifs linéaires reportés d’un même moule pour fabriquer hydrogel texturé. A la fin de séchage, les particules de 100 nm se mettent aléatoirement sur la surface en PDMS (figure III.19). Le PDMS donc n’est pas un bon matériau pour notre méthode.

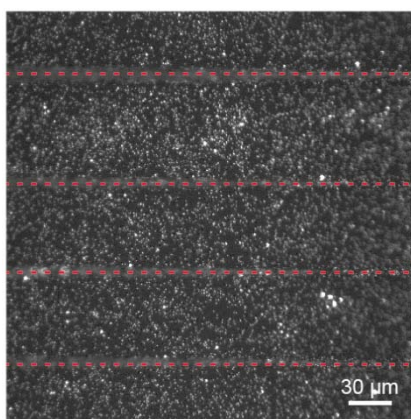


Figure III.19 : Billes fluorescentes de 100 nm de diamètre sur surface PDMS avec des motifs en lignes traitée par plasma oxygène. Les lignes en pointillés sont les sommets des motifs linéaires.

8. Applications des hydrogels pour les biotechnologies

Nous avons finalement voulu tester nos procédés pour des applications en biotechnologies. Nous avons décidé d'explorer deux directions appliquées à la biologie moléculaire et à la biologie cellulaire.

8.1 Validation pour les biopuces

Les biopuces à ADN sont constituées de surfaces recouvertes de fragments d'ADN de séquence déterminée, qui servent de sonde de capture pour détecter la présence d'une cible dans un mélange d'ADN génomique. Ces sondes à ADN sont en général greffées sur des surfaces, et l'accrochage est assuré par différents protocoles opératoires de chimie. L'utilisation d'un substrat d'or est une solution classique car le groupement thiol (-SH) peut être couplé sur des oligonucléotides commerciaux, et forme un complexe stable sur les surfaces d'or (Ghosh, Han et al. 2008). De manière plus générale, le couplage direct de l'ADN sur des surfaces d'or est une des clés à l'origine du succès colossal des techniques de fabrication de structures complexes à base de nanoparticules d'or (Mirkin, Letsinger et al. 1996). Ce domaine de recherche a d'ailleurs récemment ouvert la voie à des procédés de synthèse de solide de nanoparticules à architecture contrôlée (Park, Lytton-Jean et al. 2008).

Dans ce panorama, nous avons souhaité vérifier que les nanoparticules d'or, une fois intégrées dans des structures linéaires étaient fonctionnelles pour le couplage à des molécules d'ADN-SH. Après avoir réalisé des lignes de colloïdes d'or selon des motifs linéaires, et transféré ces motifs par plasma sur un substrat en verre, nous avons déposé une solution contenant des ADN-SH simple brin pendant 2 h (voir la séquence dans la Fig. III.20). Pour révéler le processus de greffage, nous utilisons un deuxième ADN, complémentaire du premier, et présentant un fluorophore à une extrémité (Fig. III.20). Après une nuit d'incubation, et un rinçage au PBS pendant 30 minutes, nous avons détecté un signal de fluorescence sur les lignes de nanoparticules. Nous avons obtenu un résultat négatif, lorsque l'ADN sonde ne porte pas de fonction -SH, et qu'il ne peut pas s'accrocher à la surface. Notons que le fait de pouvoir greffer de l'ADN sur les nanoparticules d'or rend la surface fonctionnelle pour la biodétection mais aussi pour la technologie : on peut envisager de greffer via l'ADN d'autres nanoparticules sur les réseaux de lignes assemblés grâce aux gels texturés. Cette perspective ouvre donc des pistes pour l'intégration de nano-objets hétérogènes en composition selon des architectures complexes, ce domaine restant pour l'heure très peu développé dans la littérature.

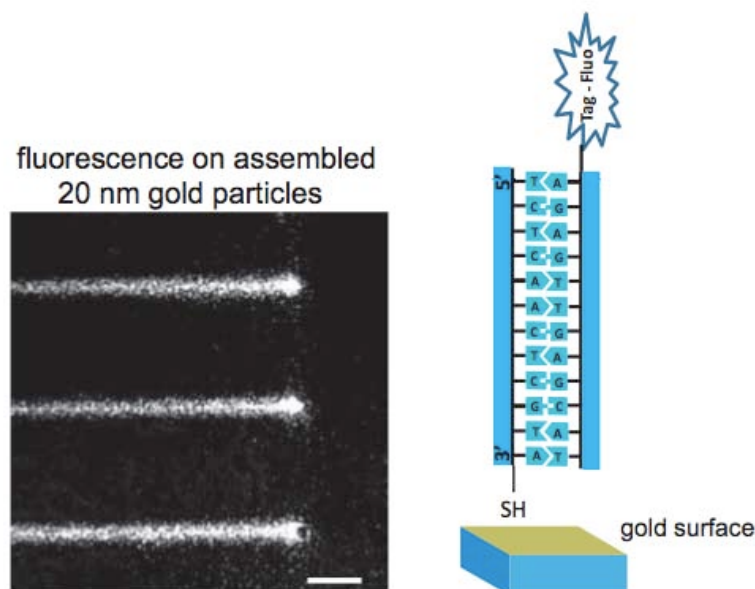


Figure III.20 : Stratégie pour le greffage d’ADN sur des nanoparticules d’or organisées en ligne par notre procédé. L’image de droite est obtenue par microscopie optique de fluorescence, et la barre d’échelle représente 20 μm .

8.2 Culture cellulaire avec le copolymère acrylamide-acide acrylique

Les substrats souples sont beaucoup utilisés en culture cellulaire, en particulier depuis qu’une équipe a montré que des cellules souches pouvaient être différenciées en os ou en muscle selon la rigidité du substrat (Engler, Sen et al. 2006). Différents protocoles, notamment fondés sur les gels de polyacrylamide, ont été envisagés pour réaliser ces substrats souples. Nous avons donc souhaité savoir si nos protocoles de fabrication de gels texturés étaient compatibles avec la culture cellulaire.

Les gels de polyacrylamide ne constituent pas un substrat, sur lequel les cellules adhèrent (Pelham and Wang 1997). Aussi, il est nécessaire de le modifier chimiquement pour lui associer des fonctions d’adhésion. Une stratégie classique consiste à réaliser un copolymère acrylamide-acide acrylique, car l’acide acrylique contient un groupement $-\text{COOH}$, sur lequel on peut greffer des protéines grâce à un protocole chimique décrit dans la Figure III.21. La protéine d’adhésion que nous avons utilisée est le collagène.

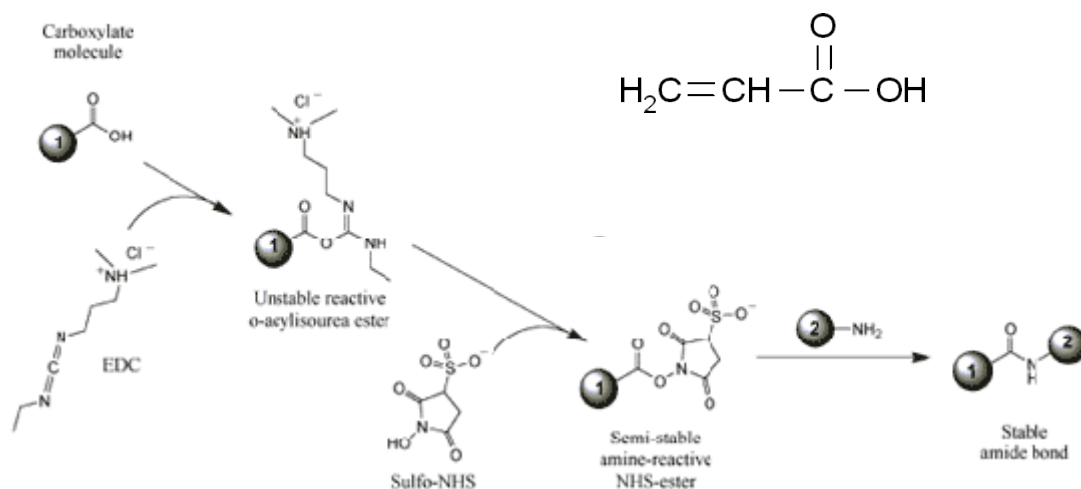


Figure III.21 : Nous avons réalisé un copolymère d’acrylamide et d’acide acrylique (structure chimique en haut à droite). Les groupements COOH sont ensuite activés en utilisant un protocole à base de carbodiimide et N-hydroxysuccinimide, ce qui permet de greffer des protéines de manière spécifique, selon le schéma représenté dans la figure.

Le verrou dans ce protocole est d’identifier des conditions compatibles avec la formation d’un gel avec notre procédé de micro-impression, et avec la culture cellulaire. En conservant un gel à 10% en concentration d’acrylamide (mélange commercial décrit au début de ce chapitre), nous avons testé une gamme de concentration en acide acrylique, et en TEMED+APS pour activer la réaction, comme décrit dans le tableau III.2.

Monomère 10%	Acide Acrylique	TEMED	APS
500	1	1.5	5
500	5	3	10
500	10	6	20
500	12	9	30
500	25	12	40

Tableau III.2 : Synthèse des différentes concentrations en acide acrylique pour réaliser un gel à base de copolymère acrylamide-acide acrylique (volume en µl). 4% d’acide acrylique est ajouté

Après activation des COOH avec le mélange carbodiimide (EDC, 3 wt%) / N-hydroxysuccinimide (NHS, 1 wt%), nous avons testé l'utilité des gels pour la culture cellulaire avec des lignées CHO. Les gels à 10 % en acide acrylique (ligne grisée dans le tableau III.2) se sont révélés être ceux qui permettaient de réaliser une culture sur substrat souple (à plus faible concentration, les cellules n'ont pas poussé sur les gels). La Figure III.22 présente le résultat d'une expérience, dans laquelle nous avons effectué une culture sur trois substrats différents : plastique (gauche), verre (milieu) (il y a une partie de l'image, indiquée par une flèche rouge, qui marque le bord du gel), et gel (droite). Nous avons obtenu des tissus denses sur verre et plastique, avec des morphologies cellulaires classiques. Sur le gel, nous avons observé trois formes différentes : il y a la forme normale (flèche verre), en rond (flèche rouge), et des cellules qui s'étirent longitudinalement (flèche bleue). Cette hétérogénéité est certainement liée à des inhomogénéités de rigidité de la surface. Ce travail mériterait donc d'être approfondi, mais nous avons obtenu la preuve de principe pour la culture cellulaire sur gels hydrophiles fabriqués avec nos propres procédés.

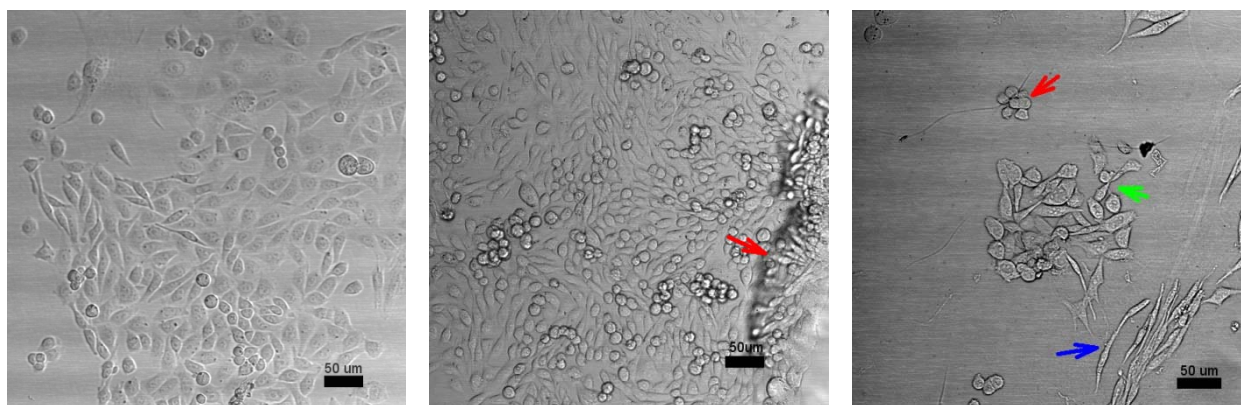


Figure III.22 : Clichés de microscopie de transmission de cellules CHO cultivées dans un boîte de Pétri contenant le substrat en verre sur lequel est fabriqué le gel. Cette configuration nous permet de comparer la culture sur le plastique (gauche), le verre (au milieu), et le gel hydrophile (à droite).

9. Conclusions et perspectives

Une technologie simple et polyvalente pour la fabrication d'hydrogels texturés par micromoulage a été présentée. Après une caractérisation structurale des motifs obtenus, nous avons exploré l'utilisation des gels texturés pour plusieurs domaines d'applications en technologie et en biologie.

Nous avons d'abord montré que les hydrogels texturés étaient pertinents pour l'assemblage de micro et nano particules de taille variant sur 3 décades, sur de grandes surfaces, et le long des différents motifs (linéaires ou complexes). Notre procédure est simple et versatile, mais elle est limitée à des particules solubles dans l'eau, et dans le but d'étendre son champ d'application, il serait utile d'explorer l'assemblage dirigé sur texturé gels hydrophobes qui sont gonflés dans un solvant volatil. Par ailleurs, notre technologie n'atteint pas une précision suffisante pour organiser des nanoparticules individuelles (Kraus, Malaquin et al. 2007), mais son potentiel applicatif n'est pas inutile pour autant : on peut imaginer utiliser les lignes de nano-objets comme structures de base pour l'édification d'architectures complexes dont l'ADN serait le ciment de construction. On obtiendrait ainsi de nouveaux matériaux à base de nanoparticules, ce qui est un enjeu des nanotechnologies.

D'un point de vue plus physico-chimique, le mécanisme d'assemblage a été décrit, montrant en particulier un nouveau processus d'assemblage par perméation. Nous avons en outre montré que la composition chimique du gel était primordiale pour le transfert de particules vers d'autres substrats, ce qui ouvre un champ de recherche pour l'optimisation de la structure physique des gels pour des applications technologiques. Dans la même direction, nous avons montré qu'il est possible de modifier la structure physique des gels pour augmenter leur potentiel applicatif, en particulier vers la biologie cellulaire. Au final, ce travail à la frontière entre la technologie, la physique et la biologie nous a permis d'utiliser un matériau très utile en biologie moléculaire, mais très exotique en technologie, pour accomplir des

opérations technologies et biologiques. C'est un exemple d'utilisation de nouveaux matériaux polymères pour les technologies, un domaine de recherche très actif au niveau international.



Partie IV

Manipulation de molécules d'ADN individuelles dans des réseaux de canalisations nanofluidiques

1. Introduction

1.1 Quelques éléments sur la physico-chimie de l'ADN

L'élucidation de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 fut une étape fondamentale dans notre compréhension de l'hérédité génétique (Fig. IV.1). Chaque brin de la double hélice est un polymère organique linéaire constitué des quatre lettres du code génétique. Ces quatre lettres sont des nucléotides, qui comprennent trois sous-unités : une base azotée, un sucre (le désoxyribose) et un groupement phosphate. La base azotée est reliée au désoxyribose au niveau du premier carbone (Fig. IV.1, droite). Il existe quatre bases azotées dans l'ADN, les purines (adénine et guanine), et les pyrimidines (cytosine et thymine). Le groupement phosphate, chargé négativement en solution, est relié au carbone 5' du désoxyribose par une liaison phosphodiester. Une seconde liaison phosphodiester le relie au carbone 3' du nucléotide voisin. Les interactions entre bases sont hautement spécifiques, ce qui fait qu'en général on trouvera une adénine en face d'une thymine, et une guanine en face d'une cytosine.

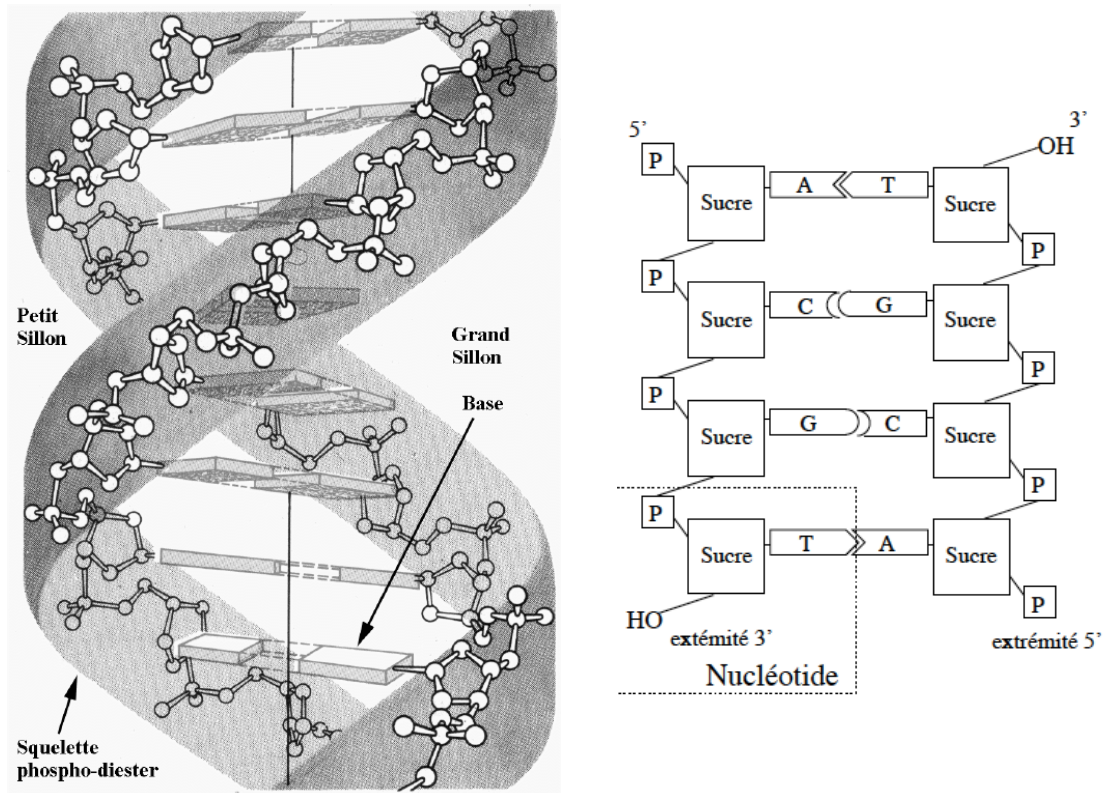


Figure IV.1 : (Gauche) Structure en double hélice de l'ADN-B. Les bases sont représentées par des rectangles plans, le squelette phosphodiester par un ruban qui parcourt le bord de la double hélice. La structure est légèrement asymétrique et on observe deux sillons à la surface de l'ADN : le grand et le petit sillon. (Droite) Structure déployée des bases d'un ADN.

1.2 Intérêt de l'ADN pour les physiciens

Dans la représentation détaillée jusqu'ici, l'ADN est décrit sous sa forme canonique en hélice droite, qui est appelé ADN-B, car cette structure est favorisée dans les conditions salines physiologiques (Wolffe, 1998). Cela dit, l'ADN peut adopter d'autres conformations (pour en citer quelques unes A, Z, P...) dont la pertinence biologique est encore discutée aujourd'hui.

L'ADN-B est chargé négativement avec deux charges négatives par paires de bases. Sachant que l'espace entre deux paires de bases (pb) consécutives est de 0,34 nm, la densité linéique de charge est de ~ 6 e-/nm. De plus, sachant que le génome d'un organisme eucaryote contient $\sim 10 \times 10^9$ pb, on en déduit qu'un chromosome humain mesure plusieurs cm de longueur. Enfin, il est à noter que la double hélice

d'ADN-B fait un tour toutes les dix bases, et elle est stabilisée par des interactions attractives entre bases se faisant face le long des deux brins. L'empilement entre bases dans l'hélice se traduit une forte rigidité de l'ADN par rapport à l'ADN simple brin. Cette rigidité est en général mesurée par la longueur de persistance (l_p), qui est la longueur au bout de laquelle les corrélations d'orientation sont perdues dans une chaîne de polymère sous l'effet de l'agitation thermique. l_p vaut 50 nm en conditions salines physiologiques pour de l'ADN double brin, et sa valeur est environ 20 fois plus faible pour de l'ADN simple brin. Il faut noter que la longueur de persistance varie avec la concentration saline : la diminution de la concentration en sel exalte la répulsion électrostatique, et tend donc à augmenter la longueur de persistance (Mannion, Reccius et al. 2006).

Une fois précisé ces ordres de grandeur, nous pouvons nous interroger sur l'intérêt de l'ADN par rapport aux polymères synthétiques pour les expériences de physique. L'ADN est en fait le seul polymère dont la synthèse peut être contrôlée, grâce aux mécanismes de réplication du vivant, à la base près jusqu'à des longueurs de plusieurs milliards d'unité. A l'opposé, la synthèse d'un polymère se traduit dans presque tous les cas par des distributions en taille large, qui compliquent l'interprétation des données expérimentales. En plus, l'utilisation de l'ADN permet de bénéficier de toutes les techniques de biologie moléculaire pour la synthèse d'ADN, sa modification chimique précise, son marquage avec un très bon rapport signal/bruit, de sorte que ce polymère peut être observé à l'échelle de la molécule individuelle sans difficulté.

1.3 Nanofluidique et manipulation d'ADN

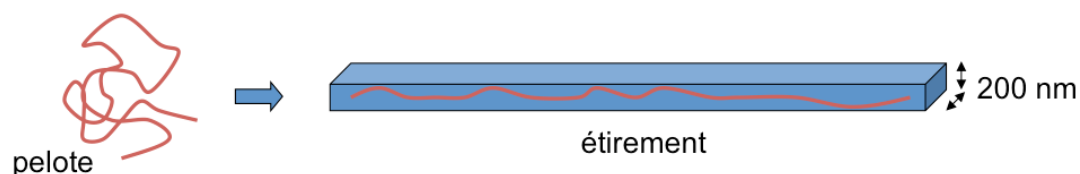


Figure IV.2 : Les molécules d'ADN sont repliées en forme de pelote en solution libre, et le confinement induit par les nanocanaux permet de les étirer longitudinalement de manière contrôlée et réversible.

La nanofluidique vise à étudier les liquides aux petites échelles. Dans les géométries confinées de nanocanaux, l'étude du comportement des polymères a été l'objet d'une attention particulière visant à comprendre comment le confinement induit par les murs change la conformation et la dynamique de chaînes polymériques (Fig. IV.2). Dans ce contexte et motivé par l'ambition d'une manipulation d'ADN optimisée, nous avons fabriqué une « famille » de nanocanaux de dimension variable (entre 100 et 500 nm de largeur), et en utilisant différents matériaux (le silicium ou le PDMS). Une série de clichés de microscopie électronique représentant l'ensemble des nanosystèmes fluidiques que nous avons manipulés est présentée en Fig. IV.3. Cette famille de nanocanaux comporte des structures qui ont déjà été utilisées dans la littérature (Tegenfeldt, Cao et al. 2004), et nous n'explorons donc pas une « nouvelle » physique du confinement dans ce chapitre. En réalité, la nouveauté de nos travaux réside dans la comparaison des actuations des fluides par hydrodynamique et électrophorèse sur le comportement de molécules d'ADN individuelles confinées dans les nanocanaux, mais aussi dans la comparaison du PDMS par rapport au silicium en tant que matériau pour la nanofluidique. Nous proposons donc de découper ce chapitre en deux parties, l'une consacrée à l'actionnement électrophorétique des ADN, et l'autre à l'actionnement hydrodynamique. Nous avons obtenu l'essentiel de nos résultats avec des dispositifs de dimension transverse 200x200 nm², et nous présentons au fil du texte une comparaison avec des géométries de structures différentes.

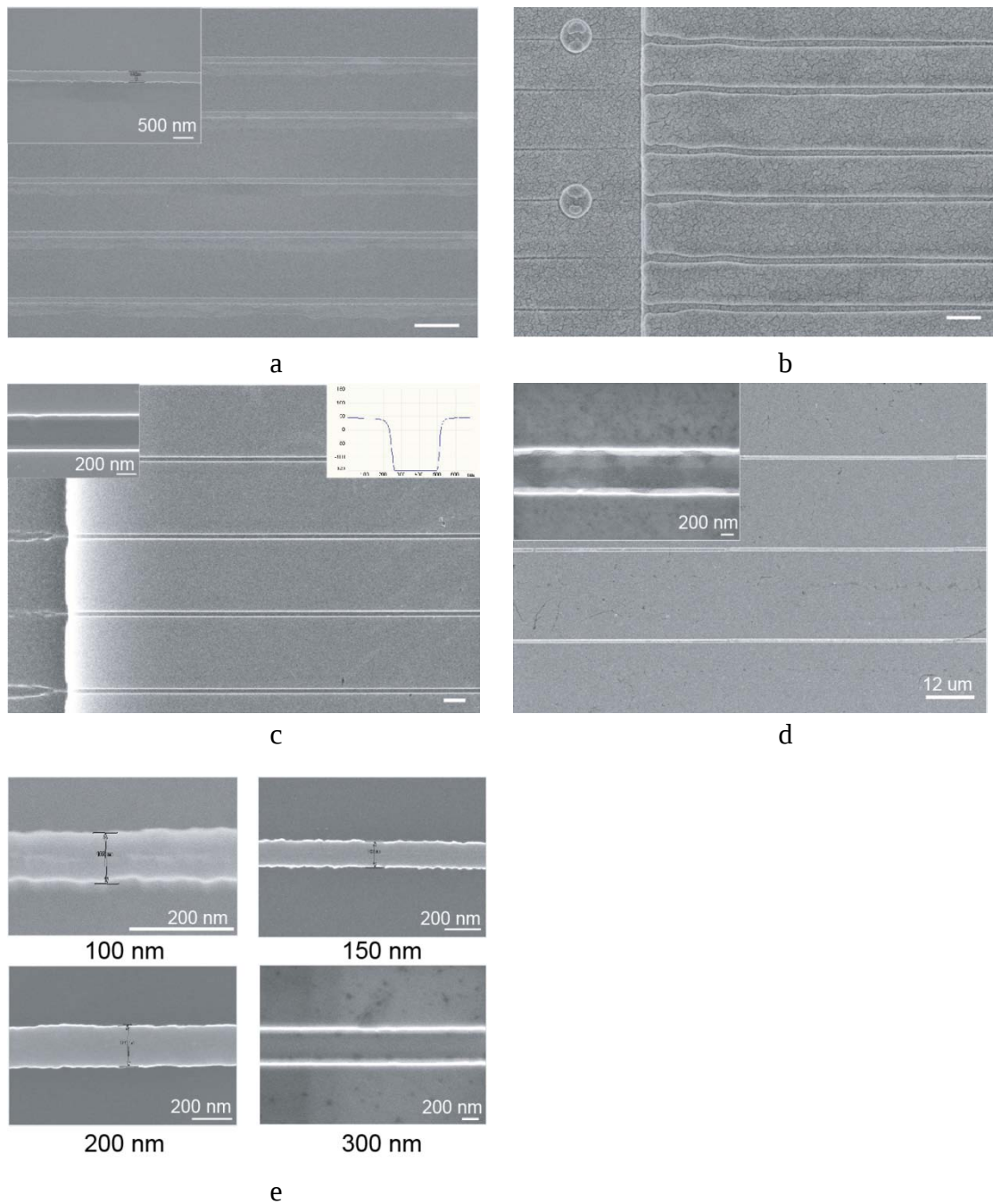


Figure IV. 3 : Structures des nanocanaux fluidiques imagées par microscopie électronique. Le panneau du haut représente le moule en silicium (a) pour fabriquer les dispositifs en PDMS (b) dont la dimension est $200 \times 200 \text{ nm}^2$. Les panneaux inférieurs montrent les dispositifs en silicium dont la dimension de nanocanaux est $300 \times 250 \text{ nm}^2$ (c), $500 \times 250 \text{ nm}^2$ (d). Des nanocanaux individuels en silicium de 100, 150, 200, et 300 nm sont imagés avec un fort grossissement (e).

2. Manipulation de l'ADN par électrophorèse

Dans cette partie, nous présentons les résultats de nos expériences menées avec des dispositifs en PDMS comprenant des nanocanaux de 200 nm de section carrée. Par convention, nous faisons circuler l'ADN de la gauche vers la droite (Fig. IV.4). L'ADN est toujours introduit dans le tube 1, et les trois autres tubes contiennent du tampon (voir chapitre II pour les conditions expérimentales). Nous appliquons un champ électrique stationnaire dans le temps avec un potentiel positif appliqué aux tubes 3 et 4, et les tubes 1 et 2 connectés à la masse (les molécules d'ADN sont chargées négativement, et elles migrent de la gauche vers la droite). Dans ce chapitre, nous décrivons d'abord la conformation de l'ADN lorsqu'il rentre dans les nanocanaux, puis nous caractérisons sa migration et sa conformation à l'équilibre.

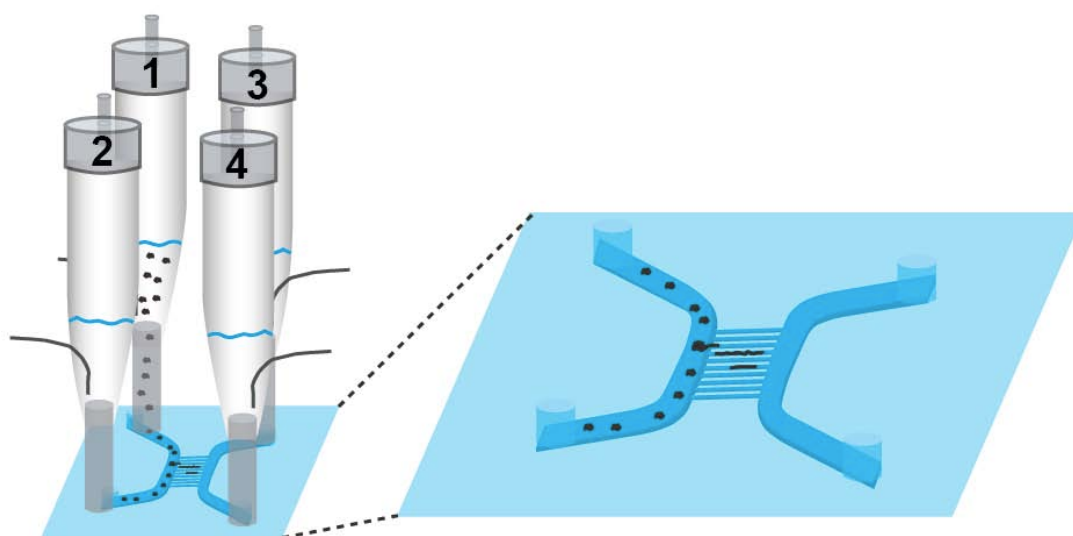
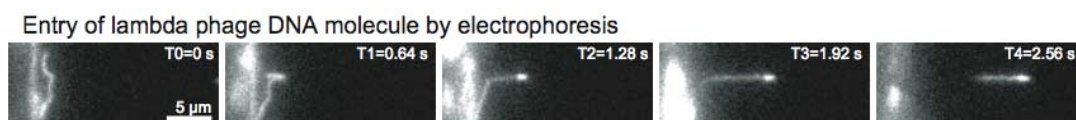


Figure IV.4 : Schéma du système micro nano fluide : les molécules d'ADN sont introduites dans le micro canal d'arrivée, et les autres canaux sont remplis avec du tampon. Les quatre tubes sont intégrés avec un fil de platine pour connecter avec une source de tension.

2.1 Comportement de l'ADN à l'entrée dans les nanocanaux

Pour réussir une manipulation d'ADN dans des nanocanaux, il est nécessaire de contrôler précisément la conformation des molécules, qui doit être étirée

linéairement de manière homogène. Deux défauts « classiques » interviennent et compliquent l'analyse structurale des molécules : la formation d'épingles à cheveux, qui sont caractérisées par un coude d'ADN (Fig. IV.5, (Cao, Tegenfeldt et al. 2002)), ou l'apparition de nœuds à l'intérieur de la chaîne. Ces dernières structures sont assez rares, et nous ne les avons pas étudiées. Les épingles à cheveux sont en revanche très fréquentes : en analysant avec la résolution d'un microscope optique la conformation d'une cinquantaine de molécules, nous avons observé que 83% (n=40) des ADN étaient repliés. Ce phénomène est lié au fait que l'entrée de l'ADN dans les nanocanaux se produit dès lors qu'un fragment de la molécule s'immisce dans les nanostructures. Le rapport de forme entre micro et nanocanaux induit un fort accroissement du champ électrique dans les nanostructures (par conservation du flux), ce qui génère une force électrique importante qui tire toute la molécule dans le nanocanal, qu'elle soit repliée ou linéaire (Fig. IV.5). Cette conformation en épingle à cheveu est pénalisée entropiquement, mais la relaxation se déroule en des temps de plusieurs dizaines de secondes ((Cao, Tegenfeldt et al. 2002), on montre dans la Fig. IV.5 que l'épingle reste repliée pendant au moins deux secondes). Aussi, pour éviter ce problème, R. Austin et ses collaborateurs ont imaginé des structures à gradient entropique, permettant de contrôler la conformation de la molécule avant son entrée dans les nanocanaux (Fig. IV.5, bas, (Cao, Tegenfeldt et al. 2002)). Cette géométrie permet également d'éviter l'accumulation d'ADN à l'entrée des nanocanaux.



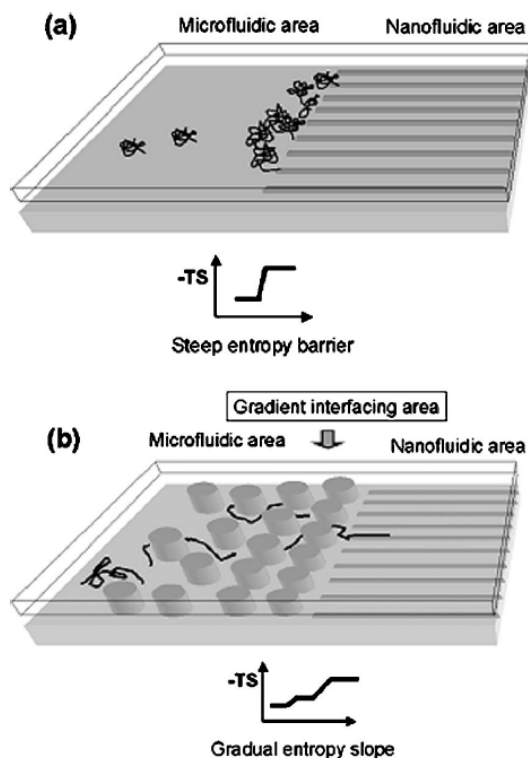


Figure IV.5 : (Haut) La séquence temporelle montre la formation d'une conformation en épingle à cheveu à l'entrée du nanocanal de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ en PDMS. (Bas) R. Austin et ses collaborateurs ont proposé de réaliser une structure d'interface à base de plots entre le micro et le nanocanal pour favoriser la formation d'ADN étiré sans épingles à cheveux. Figure tirée de (Cao, Tegenfeldt et al. 2002).

Il est à noter que les molécules en cours d'immiscion dans les nanocanaux sont tirées par l'extrémité amont confinée qui subit des forces électriques, alors que la partie aval dans le microcanal est relaxée et résiste entropiquement à l'entrée dans les canaux. Il s'ensuit que la tension le long de l'ADN est inhomogène, et que l'extension bout à bout de la molécule est maximale au moment où la molécule est intégralement introduite dans le nanocanal (Fig. IV.6). Elle relaxe ensuite pour atteindre un niveau d'étirement stable. Le temps caractéristique de cette relaxation est étudié dans la partie 3.3, et, à ce stade, retenons que nous avons caractérisé les propriétés conformationnelles de l'ADN et sa migration dans cet état d'équilibre.

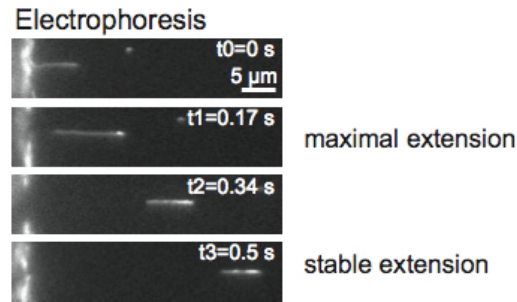


Figure IV.6 : La séquence temporelle représente une molécule d'ADN- λ qui entre dans un nanocanal par électrophorèse. Son extension maximale est mesurée une fois qu'elle est intégralement insérée, puis sa longueur relaxe jusqu'à un état d'équilibre.

2.2 Mesure de la mobilité de l'ADN- λ dans les nanocanaux

Nous avons cherché à caractériser la mobilité de l'ADN dans nos dispositifs micro-nanofluidiques en PDMS. Nous avons d'abord mesuré la vitesse du centre de masse d'au moins 5 molécules d'ADN- λ à 4 tensions différentes dans les microcanaux de 2 μm de hauteur. La mobilité vaut $2\text{-}3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ pour différentes concentrations salines obtenues en faisant varier la dilution du tampon TBE (Figure IV.7), et cette valeur est en accord avec les estimations fournies dans des articles utilisant des systèmes microfluidiques de dimension comparable (Randall, Schultz et al. 2006; Ou, Cho et al. 2009). Dans les nanocanaux carré de 200 nm de section, la migration de l'ADN a également été caractérisée, et la mobilité nous a semblé 10 fois plus faible quelle que soit la concentration saline ou le pH (Tableau IV.1). Ce résultat est inattendu car la mobilité est identique dans les micro- et les nano-canaux lorsque l'on utilise du verre (Mannion, Reccius et al. 2006), sauf si l'on confine les molécules d'ADN des structures inférieures à 20 nm. Cela dit, la lente migration de l'ADN dans les nanocanaux en PDMS a été déjà détectée dans une autre étude, dans laquelle les auteurs ont mesuré une mobilité de $\sim 0,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ (Campbell, Wilkinson et al. 2004). En outre, nous avons vérifié que cette mobilité lente était spécifique au PDMS en utilisant des nanocanaux en silicium de $200 \times 200 \text{ nm}^2$: nous avons mesuré une mobilité de $1.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ (données en rose dans la Figure IV.7), une valeur nettement plus grande que pour le PDMS.

D'un point de vue théorique, ce résultat est surprenant car les équations électro-hydrodynamiques décrivant la migration de l'ADN en solution indiquent que le déplacement de liquide en électrophorèse est limité à la couche de Debye autour de l'ADN (hypothèse « free draining » en anglais). Comme la longueur de Debye pour une solution de TBE 1X est de quelques nanomètres, soit beaucoup moins que la dimension des nanocanaux, on s'attend à ce que la migration soit indépendante de la conformation du polymère (Doyle, Ladoux et al. 2000). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les flux électro-osmotiques sont renforcés dans les nanocanaux, et conduisent à une vitesse de migration effective réduite par rapport à la mobilité libre de l'ADN de $4.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ en TBE (Stellwagen et al. 1997). Cette hypothèse semble toutefois peu vraisemblable car on s'attend à une diminution du flux électro-osmotique dans les nanocanaux si la longueur de Debye n'est pas négligeable en comparaison de demi-largeur de nanocanaux, de sorte que le flux électro-osmotique n'atteint pas un profil plat, et les vitesses maximales sont abaissées.

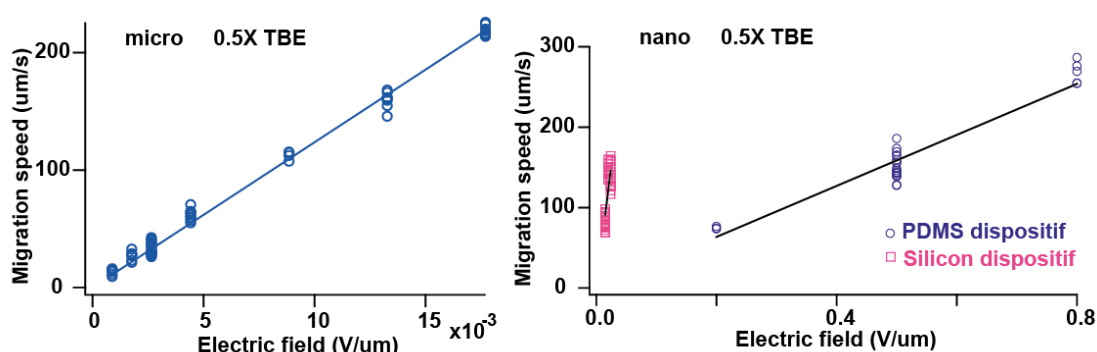


Figure IV.7 : Les mobilités des λ -ADN dans les microcanaux de 2 μm de profondeur (gauche) et dans les nanocanaux de 200 nm (droite). Les données en bleu et rose sont une comparaison des résultats obtenus avec des dispositifs en PDMS et en silicium, respectivement.

De manière plus générale, dans la mesure où le ralentissement de la migration de l'ADN semble être spécifique au PDMS, nous avons cherché un mécanisme lié à ce matériau. Nous avons donc envisagé l'hypothèse d'une rugosité des parois latérales des nanocanaux plus forte pour le PDMS qui conduirait à des flux électro-osmotiques accrus. Cela dit, des simulations récentes ont démontré la tendance inverse (Qiao 2007) : la rugosité tend à écranter le couplage entre mouvement hydrodynamique et le

potentiel de surface. Notons toutefois que cette prédiction est a priori dépendante de la force ionique (la longueur de Debye peut être plus ou moins importante que les infractuosités dans le PDMS), et cet effet n'est pas décrit dans le travail de Qiao et collaborateurs (Qiao 2007).

Condition	Micro ($\times 10^{-4}$ $\text{cm}^2 \cdot \text{V/s}$)	Nano ($\times 10^{-4}$ $\text{cm}^2 \cdot \text{V/s}$)
TBE 0.05x	2.5	0.13
TBE 0.1x	2.8	0.09
TBE 0.5x	3.2	0.17
TBE 1x	2.4	0.14
TBE 2x	2.1	0.21
super saturé en liquide, puis TBE 0.5x	2.8	0.12
rinçage avec EDTA, puis 0.5x TBE	5.1	0.03
PDMS / phosphate pH=5.3	2.3	0.22
PDMS / phosphate pH=7.2	2.2	0.24
PDMS / phosphate pH=8.6	2.5	0.13
Silicium TBE 0.5x	2.1	1.09

Tableau IV.1 : Valeur de la mobilité de molécules d'ADN mesurée dans les micro- et les nano-canaux de dispositifs en PDMS (casées grisées) ou en silicium (cases blanches). Nous avons testé différentes conditions expérimentales associées à des forces ioniques variables (concentration en TBE différentes) ou des pH variables (tampon phosphate à différents pH) pour expliquer la différence de mobilité observée entre les micro- et les nanostructures.

Nous avons également envisagé que le polymère utilisé pour le revêtement des surfaces (le PVP) modifie les propriétés de migration de l'ADN dans les nanocanaux, mais ce résultat n'est pas cohérent avec la plus grande mobilité de l'ADN dans les nanocanaux en silicium. Une autre différence entre le PDMS et le silicium est liée à l'existence de flux de perméation dirigé vers l'intérieur du PDMS (Randall, Schultz et al. 2006), qui pourrait altérer le comportement de l'ADN. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré la mobilité de l'ADN après avoir saturé nos dispositifs avec du liquide en utilisant l'approche de (Randall, Schultz et al. 2006), qui consiste à immerger les cellules de PDMS dans du liquide à 60°C pendant quelques heures. Nous n'avons pas détecté de variation de mobilité avec ce traitement, ce qui invalide

cette hypothèse.

Enfin, le PDMS est connu pour contenir des résidus tels que de chaînes non réticulées ou des ions de platine. Ces composés peuvent significativement dégrader les conditions de l'imagerie (Jo, Dhingra et al. 2007), et ils peuvent être éliminés en trempant le PDMS dans de l'EDTA pendant 24h. Ce protocole a été réalisé, et nous avons détecté une mobilité d'ADN deux fois plus grande dans les microcanaux, et 10 fois plus lente dans les nanocanaux, ce qui démontre que le PDMS est responsable du comportement anormal de l'ADN dans les canalisations nanométriques. Malheureusement, ce résultat ne nous donne pas de raisons microscopiques pour la faible mobilité dans les nanocanaux.

En conclusion, malgré toutes nos recherches, nous n'avons pas d'explication quantitative expliquant la mobilité ralentie de l'ADN dans les nanocanaux. Nous pouvons clairement conclure que cet effet est lié au PDMS, et qu'il est modulé suivant le traitement appliqué à ce matériau. Une hypothèse à avancer est l'existence d'interactions non spécifique et de faible affinité entre le PDMS et l'ADN (indépendante de la force ionique ou du pH), qui pourraient ralentir la molécule et lui conférer un mouvement fluide. Ce modèle nous a malheureusement semblé difficile à tester expérimentalement.

2.3 Migration anormale dans le PDMS à forts champs électriques

Pour compléter notre caractérisation de la réponse électrophorétique de l'ADN dans le PDMS, nous souhaitons mentionner un résultat non expliqué que nous avons observé : à fort champ électrique ($1 \text{ V}/\mu\text{m}$), les molécules d'ADN tendent à former des agrégats, qui migrent vers la cathode (électrode négative), c'est-à-dire à l'inverse de molécules d'ADN individuelles (Fig. IV.8), alors que les molécules individuelles se comportent de manière conventionnelle, c'est-à-dire qu'elles migrent vers l'anode.

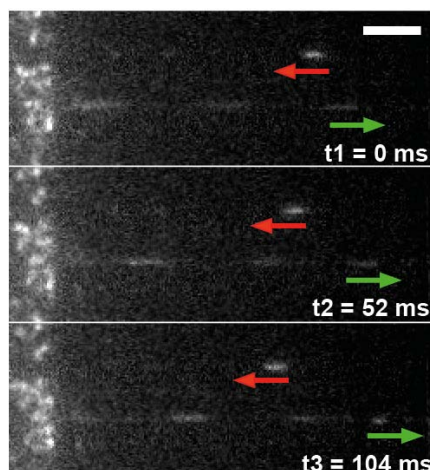


Figure IV.8 : Molécule d'ADN migrent à direction opposée à fort champ électrique (1 V/ μm). Barre d'échelle se présente 5 μm

2.4 Élongation d'ADN

2.4.1 Influence du confinement dans les nanocanaux en PDMS

Les résultats obtenus par les collaborateurs de R. Austin ont montré que le degré d'étirement de l'ADN est modulé par le degré de confinement imposé à la molécule (Reisner, Morton et al. 2005). Dans une canalisation mesurant 200x200 nm² de section, nous avons mesuré une extension moyenne des molécules d'ADN- λ de 6.2 μm . Sachant que leur longueur de contour est estimée à ~ 22 μm (Reisner, Beech et al. 2007), nous en déduisons que le degré d'étirement est de 6.2/22 $\sim$ 28 % (Tableau IV.2), ce qui est en accord avec les résultats d'Austin, qui ont mesuré un taux d'élongation de 25% dans des dispositifs en verre de dimension comparable (Reisner, Morton et al. 2005). Nous avons utilisé nos dispositifs en PDMS de 120x120 nm² de section, et encore mesuré l'élongation de molécules. La longueur moyenne vaut 6.6 μm , soit un taux d'élongation de 30%. Ce résultat n'est pas cohérent avec la littérature puisqu'on s'attend à un taux d'élongation multiplié par ~ 2 selon le travail d'Austin et collaborateurs (Tableau IV.2).

Après la réponse difficilement interprétable concernant la migration

électrophorétique de l'ADN dans les nanocanaux en PDMS, nous observons que la conformation d'équilibre de l'ADN dans les nanocanaux n'est pas en accord avec les résultats publiés dans la littérature. Il faut toutefois noter que nous avons mesuré la dimension des nanocanaux sur les puces en PDMS, soit avant l'étape d'assemblage du PDMS sur verre, et l'étape de remplissage des nanocanaux avec du liquide. Or, l'assemblage est effectué par activation des surfaces au plasma, ce procédé étant associé à un échauffement important et donc potentiellement dommageable pour les surfaces, et le remplissage de liquide est associé à des forces capillaires susceptibles de déformer les canalisations (van Honschoten, Escalante et al. 2007).

Quoiqu'il en soit, ce résultat nous a conduits à effectuer l'essentiel de nos expériences avec des nanocanaux de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ dans la mesure où les réponses mesurées sont plus « habituelles », et la manipulation expérimentale de ces cellules est plus facile : l'évaporation du liquide à travers les nanocanaux de 120 nm nous a semblé plus rapide, or les cellules deviennent inutilisables après évaporation. Aussi, toute mauvaise manipulation avec les cellules de 120 nm entraînait la perte du dispositif.

Dimension des nanocanaux	Élongation de l'ADN
$200 \times 200 \text{ nm}^2$	$6.2 \pm 0.27 \text{ } \mu\text{m}$
$120 \times 120 \text{ nm}^2$	$6.6 \pm 0.07 \text{ } \mu\text{m}$

Tableau IV.2 : Élongations de l'ADN dans les nanocanaux de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ et $120 \times 120 \text{ nm}^2$ (TBE 0.5X)

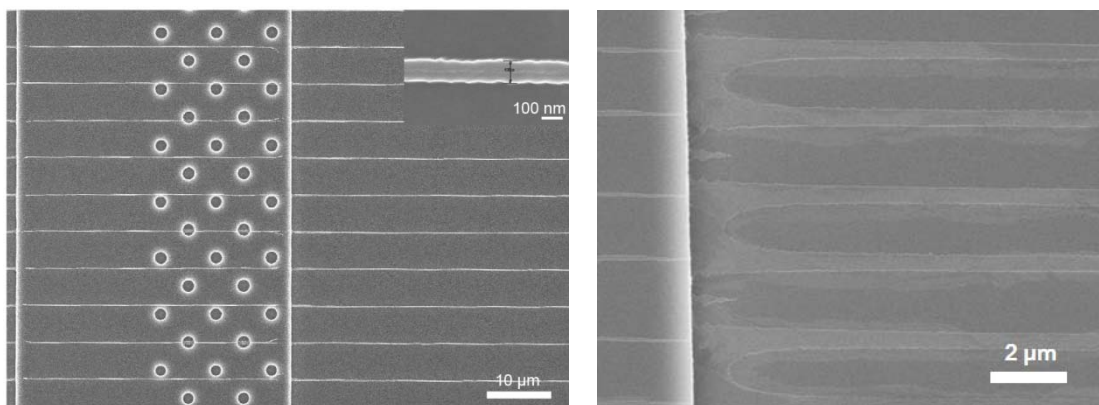


Figure IV.9 : Photo MEB de moule en Silicium avec les nanocanaux de $120 \times 120 \text{ nm}^2$ (gauche) et $200 \times 200 \text{ nm}^2$ (droite)

2.4.2 Influence de la salinité dans les nanocanaux en PDMS

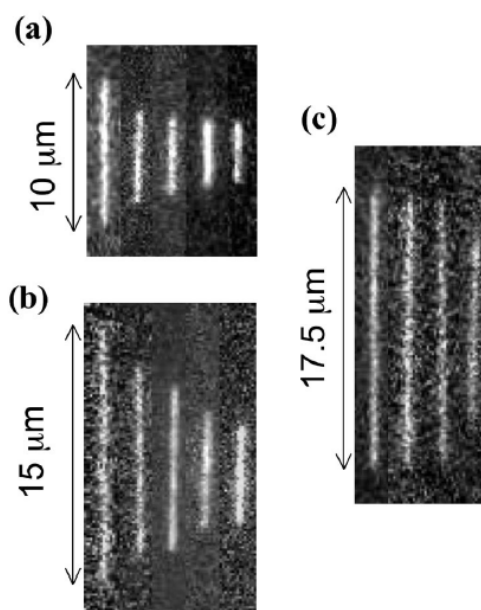


Figure IV.10 : Molécule individuel de λ -ADN dans différentes concentrations TBE (de gauche à droite, 0.05 x, 0.2 x, 0.5 x, 2 x, 5 x TBE) dans des canaux de (a) 200 nm, (b) 100 nm, (c) 50 nm. Figure tirée de (Reisner, Beech et al. 2007)

Selon des résultats de Reisner et collaborateurs présentés dans la figure IV.10 (Reisner, Beech et al. 2007), il est possible de moduler l'étirement de l'ADN en jouant sur la concentration saline de la solution tampon tout en conservant une

géométrie de nanocanaux identique. En effet, la longueur de persistance de l'ADN augmente lorsque la concentration en sel diminue puisque la portée des interactions électrostatiques répulsives entre monomères d'ADN est exaltée à basse force ionique (Baumann, Smith et al. 1997). En particulier, dans des nanocanaux de 200 nm de section carrée, il est possible d'augmenter l'étirement par un facteur 2 en diminuant la concentration en sel par 100 (Fig. IV.10 (a)). Comme cet effet nous a semblé intéressant, nous avons voulu le reproduire dans des nanocanaux en PDMS : nous avons utilisé différentes concentrations en tampon TBE (0.05X, 0.1X, 0.5X, 1X, 2X), et nous avons mesuré l'élongation de l'ADN- λ . Le même niveau d'étirement stable de $\sim 6 \mu\text{m}$ a été mesuré quelque soit les conditions salines (Tableau IV.3).

En conclusion, il n'est pas possible de moduler le degré d'élongation de l'ADN avec un dispositif en PDMS, ce qui indique que la composition du liquide dans les nanocanaux n'est pas bien contrôlée. Les échanges liés au flux de perméation à travers le PDMS se traduisent probablement par l'introduction de composés non désirés dans la solution, en particulier les ions platine qui sont des agents de réticulation du PDMS. Il s'ensuit que la force ionique est mal contrôlée dans les systèmes nanofluidiques en PDMS. Notons que ce problème *a priori* général pour les systèmes fluidiques en PDMS est amplifié en géométrie confinée puisque le volume de liquide emprisonné dans les nanocanaux est tellement faible qu'il est rapidement altéré par le milieu environnant.

TBE	Longueur d'étirement (μm)
0.05x	5.1+/-0.06
0.1x	4.8+/-0.03
0.5x	5.7+/-0.04
1x	5.3+/-0.12
2x	5.5+/-0.04

Tableau IV.3 : Longueur de molécules d'ADN placées dans des nanocanaux en PDMS de section carré de 200 nm selon la concentration en tampon TBE.

2.5 Conclusions : limites et avantages du PDMS pour les expériences de nanofluidique en électrophorèse

Le PDMS offre des avantages intéressants en microfluidique liés à sa biocompatibilité, son caractère peu onéreux, et sa transparence (240nm-1100nm) associée à une faible auto fluorescence. A partir d'un moule pérenne, il est possible de répliquer des puces fluidiques à de nombreuses reprises, ce qui est très avantageux pour le prototypage. En microfluidique, l'inconvénient majeur du PDMS tient à sa forte déformabilité, qui est caractérisée par un module d'Young $E \sim 10^4$ fois plus faible que celui du verre, ce qui empêche d'appliquer de fortes pressions. De fait, ce problème est limité pour des systèmes nanofluidiques si l'on utilise le h-PDMS ($E \sim 10$ MPa) et avec de géométrie à section carré ($h \sim 200$ nm), car la déformation typique d'un canal est déterminée par (Gervais, El-Ali et al. 2006):

$$\frac{\Delta h}{h} \approx \frac{\Delta P}{E} \quad (\text{IV.1})$$

où ΔP la différence de pression entre le canal et l'extérieur. Nous en déduisons que le taux de déformation à 500 mBar est de 5 %. Au final, le prototypage rapide nous a été particulièrement utile pour la thèse, car nous avons pu tester de nombreuses conditions expérimentales et gagner de l'expérience, qui s'est avérée utile pour comparer la réponse du PDMS avec celle d'autres matériaux (voir la suite pour plus de discussion).

Malgré ses avantages, notre étude sur les propriétés de l'ADN dans des nanocanaux en PDMS a mis à jour de nombreuses limites de ce matériau. Dès lors que nous avons voulu analyser un effet physique simple lié, par exemple, à la force ionique, nous avons obtenu des résultats incohérents avec les données publiées dans la littérature. Ces incohérences nous empêchent, pour l'instant, d'utiliser ce polymère pour des études quantitatives de nanofluidique.

3 Manipulation d'ADN par flux hydrodynamique

Après avoir utilisé l'électrophorèse pour la manipulation d'ADN dans les nanocanaux, nous souhaitons présenter nos développements concernant l'actionnement des liquides par flux hydrodynamique. Dans le cas de l'électrophorèse (tant que la longueur de Debye est petite par rapport au rayon des nanocanaux), tous les segments de la molécule, quel que soit leur position à travers le canal, sont soumis à la même force électrique si bien que le champ de force appliqué à l'ADN est homogène (Fig. IV.11). En revanche, dans le cas de l'hydrodynamique, le profil du champ de vitesse est parabolique avec une vitesse maximum au centre du canal et nulle au niveau des parois (le nombre de Reynolds est très petit par rapport à 1). Autrement dit, la molécule est soumise à des forces de cisaillement, qui, lorsqu'elles sont appliquées à des molécules placées dans un écoulement de cisaillement entre des plaques de verre parallèles espacées de 50 μm , altèrent à la fois la statique et la dynamique des molécules d'ADN (Smith, Babcock et al. 1999).

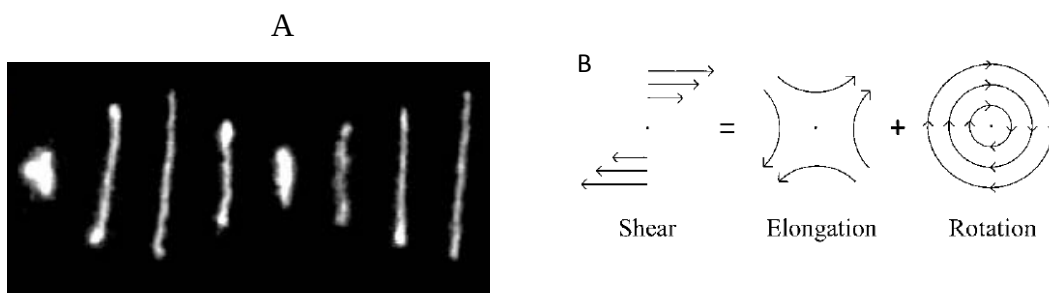


Figure IV.11 : Les profils des champs de force appliqués aux molécules dans le cas hydrodynamique et électrophorétique.

Plus précisément, la force d'un flux de cisaillement est représentée par un nombre sans dimension appelé nombre de Weissenberg (Wi), défini comme le rapport du taux de cisaillement ($\partial v_x / \partial z$) par le temps de relaxation du polymère. Leur étude démontre qu'un flux de cisaillement entraîne une extension de l'ADN (clichés consécutifs d'une molécule d'ADN au cours du temps dans Fig. IV.12A), et une dynamique lente avec des cycles d'extension/relaxation répétés (signature temporelle de la longueur au

cours du temps dans la Fig. IV.12A). Il est toutefois intéressant de noter que l'élongation par un écoulement de cisaillement est beaucoup moins importante qu'avec un flux élongationnel (Fig. IV.12A, panneau du bas). Cet effet est lié à la présence d'une composante rotationnelle dans le flux (Fig. IV.12B), qui déstabilise l'étirement de la molécule, entraînant un phénomène de « tumbling » (Fig. IV.12B). En effet, lorsque la molécule s'étire, elle s'aligne le long du flux, et la force de poussée exercée sur la molécule diminue, ce qui favorise la relaxation de la molécule (Fig. IV.12B). Le mouvement brownien peut ensuite perturber cette dynamique, provoquant à nouveau une extension, le tout produisant des instabilités que l'on exprime par ce terme de « tumbling ».

A ce stade, notons que nous nous attendons à une dynamique différente dans des nanocanaux par rapport à la réponse en « volume ». En effet, la composante rotationnelle, responsable de la dynamique de tumbling est écrantée par les nanocanaux. Aussi, il est intéressant au niveau fondamental de comprendre comment répond une molécule d'ADN dans une telle géométrie. C'est ce que nous nous proposons de faire dans les paragraphes suivants, en prenant pour référence la réponse de l'ADN en présence d'un champ électrique.



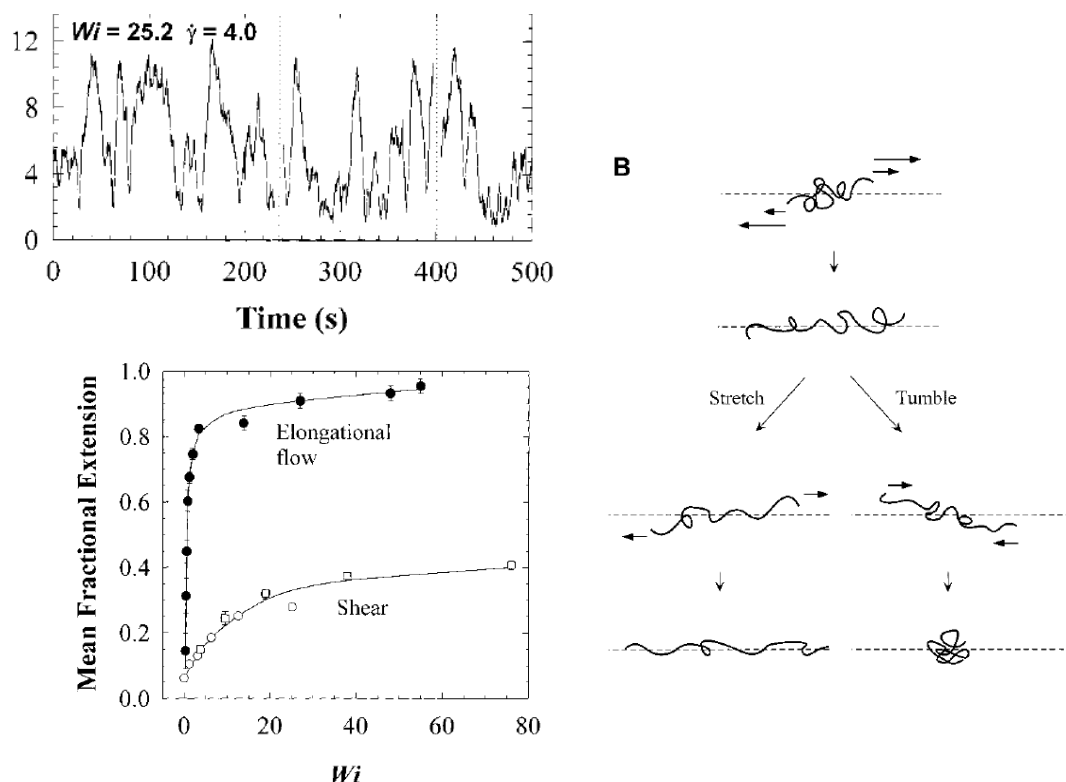


Figure IV.12 : (A) Réponse d'une molécule d'ADN- λ en présence d'un écoulement de cisaillement. Le panneau du haut montre des clichés de microscopie de fluorescence au cours du temps (intervalle 5 s). Le panneau du milieu montre la longueur de la molécule au cours du temps, avec des pics caractéristiques de la dynamique de tumbling. Le panneau du bas présente la comparaison de la réponse de l'ADN sous l'effet d'un flux de cisaillement vs. Elongationnel. (B) Un écoulement de cisaillement est décomposé en une composante d'élongation et de rotation (en haut), et l'étirement de la molécule par le cisaillement s'accompagne de rotation (tumble), qui tendent à relaxer l'élongation vers une conformation globulaire. Ces données sont tirées de (Smith, Babcock et al. 1999).

3.1 Description du comportement de l'ADN à l'entrée des nanocanaux

La conformation de l'ADN dans les nanocanaux est déterminée par sa dynamique d'entrée, qui peut favoriser des structures en épingle à cheveux (voir Fig. IV.5). Nous avons donc souhaité comparer l'effet d'un actionnement par force électrique ou hydrodynamique au moment de l'insertion de l'ADN dans les nanocanaux. Dans les deux cas, les molécules entrent de manière plus fréquente avec une conformation repliée, mais nous avons constaté qu'en présence d'un flux hydrodynamique, les molécules d'ADN relaxent en moins d'1 seconde vers une conformation étendue sans

repliement (figure IV.13). Nous en concluons donc que l'utilisation de l'hydrodynamique permet de mieux contrôler la conformation des molécules dans les nanocanaux.

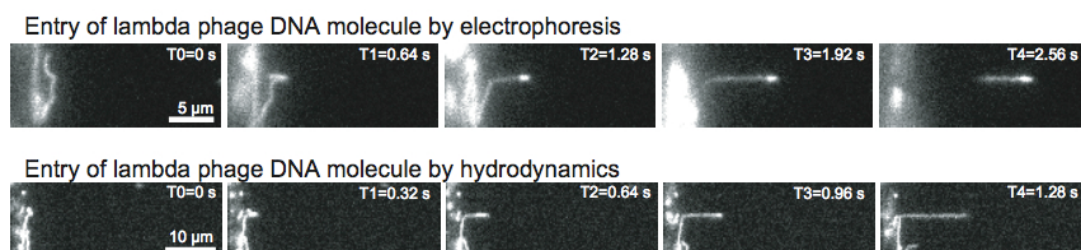
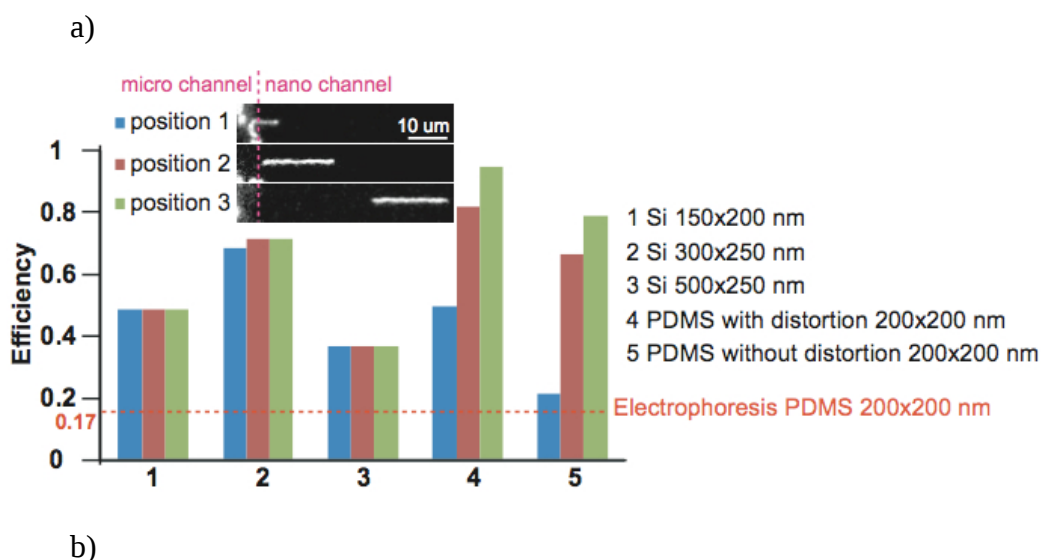


Figure IV.13 : Entrée de la dynamique d'entrée de molécules d'ADN- λ dans un nanocanal. La molécule conserve sa conformation repliée sous un champ électrique (haut), alors qu'elle se déplie en flux hydrodynamique (bas). Le dispositif est constitué de nanocanaux en PDMS de 200 nm de section carré.

Nous avons ensuite voulu caractériser plus précisément cette propriété de l'actionnement hydrodynamique en mesurant le nombre de molécules complètement étirées (sans repliements) avec des nanocanaux de différentes géométries et imprimés dans différents matériaux (le silicium et le PDMS). Nous avons distingué 3 positions différentes le long du canal (insert dans la figure IV.14a) afin de tenir compte de la relaxation de la molécule au cours de sa progression dans le nanocanal. La position 1 correspond à une molécule partiellement insérée dans le nanocanal, la position 2 à la molécule complètement insérée, et la position 3 correspond à la conformation après une migration de 20 μm . Dans le cas électrophorétique, 17% des molécules ne présentent pas de repliement, et cette proportion reste constante dans les trois positions (ligne pointillée dans Fig. IV.14a). Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant le PDMS et des nanocanaux de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ avec une proportion de molécules sans repliement supérieure à 80% (colonnes 4 et 5), qui peut atteindre jusqu'à 95% en optimisant la géométrie des canaux (voir plus bas pour les détails). Les résultats avec le silicium sont légèrement moins bons, mais nous constatons qu'ils sont optimaux pour des canaux de $300 \times 250 \text{ nm}$, pour lesquels on atteint 70% de

molécules étendues. Cette dimension est voisine des nanocanaux en PDMS, ce qui suggère que cette géométrie est adaptée à l'extension rapide des molécules. De manière surprenante, nous n'observons pas de diminution du nombre de molécules en conformation en épingle à cheveux lors de leur migration dans les nanocanaux contrairement au cas du PDMS. Ce résultat surprenant démontre que le PDMS présente des propriétés spécifiques pour la nanofluidique actionnée par hydrodynamique, comme dans le cas de l'électrophorèse. Nous n'avons pas trouvé d'explication pour ce résultat, mais l'existence de flux de perméation à travers les parois des nanocanaux peut changer significativement les profils de vitesse et donc la réponse des molécules.



	Method	Dispositifs	pos 1	pos 2	pos 3
1	Hydrodynamic	Si 150x200nmx100um	0.49	0.49	0.49
2		Si 300x250nmx100um	0.69	0.72	0.72
3		Si 500x250nmx500um	0.37	0.37	0.37
4		PDMS with distortion 200x200nmx100um	0.5	0.82	0.95
5		PDMS without distortion 200x200nmx500um	0.66	0.89	0.89
6	Electrophoresis	PDMS with distortion 200x200nmx100um	0.17	0.17	0.17

Figure IV.14 : Quantification de l'élongation de l'ADN dans des différents dispositifs Le trait pointé rouge est le joint de micro canal et les nanocanaux.

Revenons maintenant à la discussion concernant le taux maximal de molécules étendues avec les dispositifs en PDMS. L'observation par microscopie électronique

des nanocanaux en PDMS démontre que nous avons réalisé un moule comportant des canaux droits et sans défauts, et un autre avec une distorsion caractérisée par un rétrécissement brutal des canaux (Fig. IV.15). La constriction induit une variation du profil de vitesse, et donc une contrainte sur la molécule (de type élongationnel). Cette contrainte semble donc se traduire par une accélération de la relaxation de la molécule vers une conformation longitudinale.

De manière plus générale, nous reviendrons sur l'interprétation microscopique du phénomène de relaxation vers une conformation étendue facilitée avec l'hydrodynamique dans la section 3.4. Retenons à ce stade que l'utilisation de l'hydrodynamique permet de mieux contrôler la conformation de l'ADN, et l'utilisation du PDMS présente encore des propriétés particulières, qui, si elles sont mal comprises, le rendent très favorable pour la manipulation hydrodynamique.

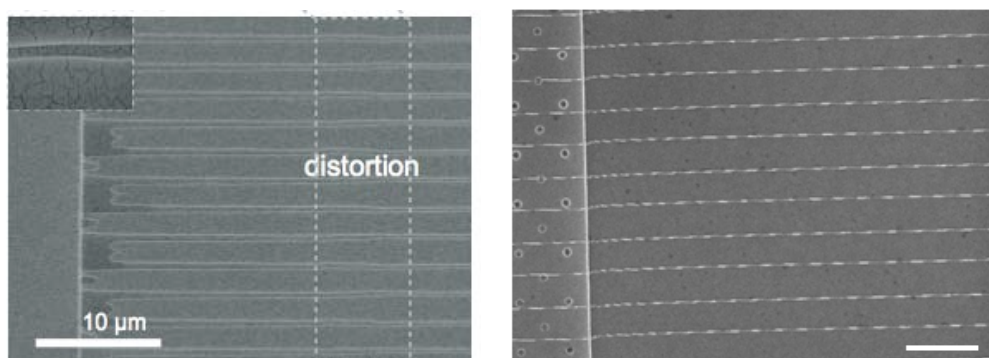


Figure IV.15 : Photo MEB de moule en Silicium avec distortion (gauche) et sans distortion (droite). Barre d'échelle se présente 10 μm .

3.2 Élongation de l'ADN avec un champ hydrodynamique

Comparons désormais la conformation à l'équilibre de l'ADN dans les nanocanaux en utilisant un actionnement hydrodynamique ou électrophorétique. Dans la section 2.4.2 nous avons étudié l'élongation de l'ADN- λ dans des nanocanaux en PDMS de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ par électrophorèse, et montré que l'élongation valait $6 \mu\text{m}$ en moyenne quelque soit la force ionique. Nous avons suivi le comportement de molécules d'ADN individuelles dans les mêmes nanocanaux et en utilisant un tampon

TBE dilué 0.5X. A la fin de la phase de relaxation, nous avons observé que les molécules d'ADN sont plus étirées en utilisant l'hydrodynamique avec une longueur à l'équilibre de $\sim 12 \mu\text{m}$ pour une vitesse de migration de $100 \mu\text{m/s}$ (Fig. IV.16).

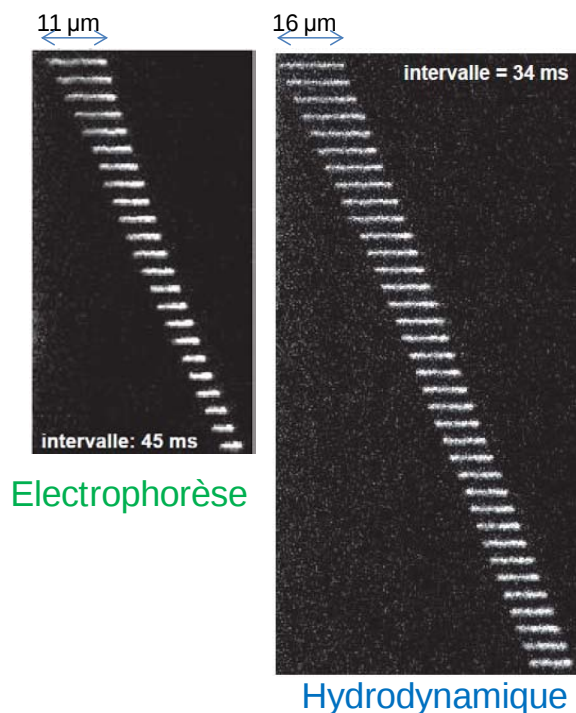


Figure IV.16 : Evolution temporelle de la conformation d'une molécule d'ADN- λ dans les nanocanaux lorsqu'elle soumise à un actionnement électrophorétique (gauche) ou hydrodynamique (droite). On note que la longueur à l'équilibre est plus importante avec de l'hydrodynamique.

Nous avons ensuite voulu mesurer le couplage entre vitesse du fluide et la longueur des molécules à l'équilibre. Pour cette expérience, il est *a priori* idéal de mesurer la vitesse du fluide dans le nanocanal avec des nanoparticules fluorescentes, mais ces expériences n'ont pas été concluantes en raison du collage de ces objets sur les parois. Aussi, nous avons considéré que la vitesse de migration des molécules d'ADN constituait un bon « marqueur » de la vitesse du fluide. Avec cette simplification, nous avons constaté que plus la molécule migre vite, plus elle est étirée (Figure IV.17, gauche). A champ nul, nous avons mesuré une longueur de $\sim 5 \mu\text{m}$ pour une molécule d'ADN- λ dans un nanocanal de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ en PDMS, et l'extension atteint 8, 12, et $15 \mu\text{m}$ pour des vitesses de migration de 40, 120, et 190

$\mu\text{m/s}$, respectivement. Nous avons réalisé cette expérience à plusieurs forces ioniques et nous n'avons pas observé de différence significative pour l'extension de l'ADN en fonction de sa vitesse (couleurs des données dans Fig. IV.17, gauche). Cet effet est relativement logique vu nos résultats en électrophorèse, qui ont montré un étirement indépendant de la force ionique dans le PDMS. Les histogrammes de longueur démontrent clairement l'augmentation de l'étirement sous l'effet de l'actionnement hydrodynamique (Fig. IV.17, droite).

Au final, il faut noter que cet effet est particulièrement intéressant, car il nous permet de moduler le degré d'étirement de l'ADN en jouant sur les paramètres de l'actionnement fluïdique. A partir d'un nanocanal de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ et une vitesse de migration de $150 \mu\text{m/s}$, nous pouvons atteindre des niveaux d'élongation nécessitant normalement des canalisations de 100 nm de section carré. Cet atout nous a conduits à déposer un brevet au cours de l'année 2011.

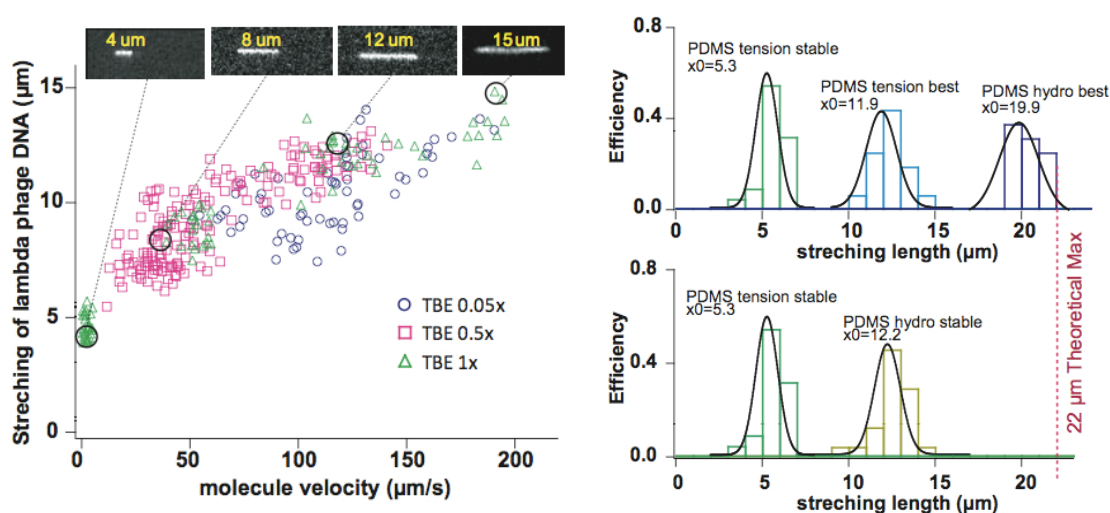
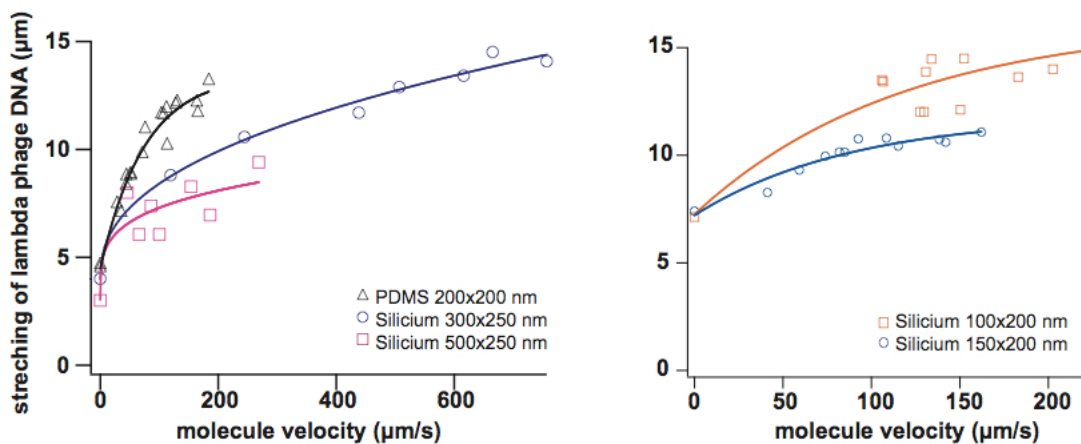


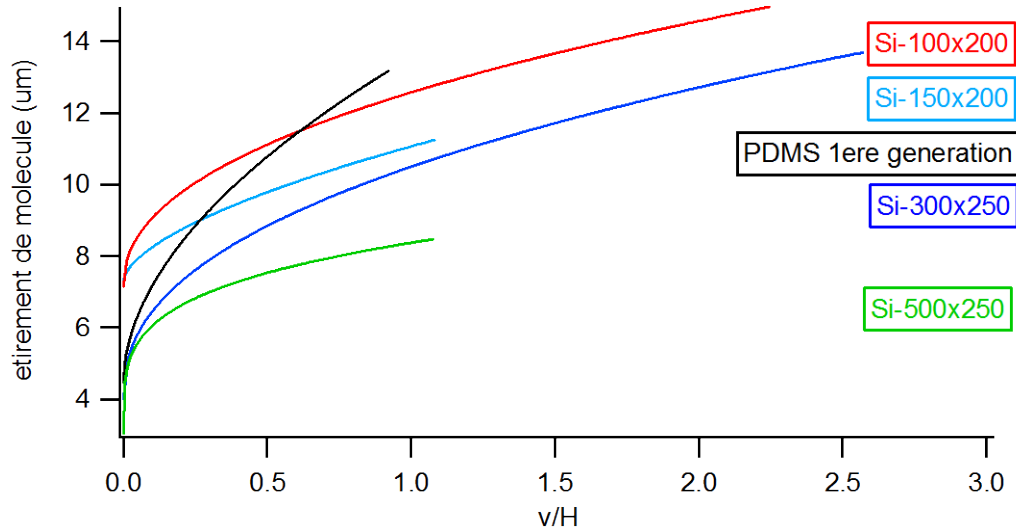
Figure IV.17 : (Gauche) Longueur de molécules d'ADN- λ en fonction de leur vitesse de migration dans les nanocanaux de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ en PDMS à trois différentes forces ioniques. Les inserts sont des clichés de microscopie de fluorescence représentant la conformation des molécules. **(Droite)** La figure de droite montre des histogrammes sur 20 molécules au minimum représentant l'étirement de molécules d'ADN soumises à des forces électriques à une vitesse de $150 \mu\text{m/s}$. Notons que l'élongation maximale obtenue à l'entrée dans les nanocanaux atteint pratiquement la longueur de contour des molécules avec l'hydrodynamique.

Enfin, nous avons voulu connaître l'influence de la taille des nanocanaux et du

matériau structuré pour le phénomène d'étirement hydrodynamique. Nous avons donc étudié la relation élongation – vitesse dans des différents dispositifs : canaux en silicium de $500 \times 250 \text{ nm}^2$, $300 \times 250 \text{ nm}^2$, $150 \times 200 \text{ nm}^2$ et $100 \times 200 \text{ nm}^2$ (figure IV.18). Il semble que la géométrie de canaux proche de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ conduise à des résultats très prometteurs dans la mesure où nous atteignons des niveaux d'étirement supérieur à 50% de la longueur de contour de la molécule ($22 \text{ }\mu\text{m}$) pour des vitesses de migration de $\sim 150 \text{ }\mu\text{m/s}$. Ce résultat est d'ailleurs observé pour le silicium et pour le PDMS (courbes noire et orange dans la figure IV.18a). Nous observons de plus un effet de géométrie : l'élongation en fonction de la vitesse dépend des dimensions des nanocanaux. Cet effet est attendu dans la mesure où la grandeur pertinente pour décrire l'étirement est le taux de cisaillement, qui vaut approximativement v/h où v est la vitesse de la molécule et h la hauteur du canal. Cette normalisation des données permet d'aboutir à des courbes de réponses plus cohérentes (figure IV.18b).



a)

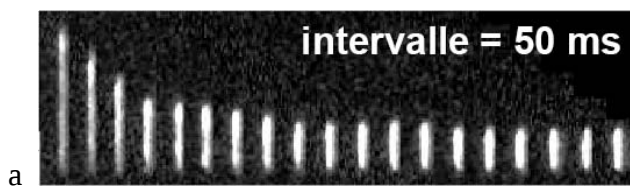


b)

Figure IV.18 : Relation élongation-vitesse (a) et élongation-v/h (b) pour l'ADN- λ dans des dispositifs de géométrie différente.

3.3 Relaxation d'ADN

Après avoir analysé l'élongation de l'ADN en régime permanent, nous avons étudié la relaxation des molécules dans les canaux de différentes dimensions et de différents matériaux par électrophorèse et par flux hydrodynamique. La figure IV.19a montre deux séries d'images avec la relaxation d'un ADN- λ dans un nanocanal de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ en PDMS par électrophorèse. La longueur initiale est $13 \text{ }\mu\text{m}$, et la molécule relaxe à sa conformation d'équilibre en $\sim 200 \text{ ms}$. Dans la même canalisation mais par flux hydrodynamique, la relaxation à partir d'une longueur initiale de $16 \text{ }\mu\text{m}$ prend environ 300 ms .



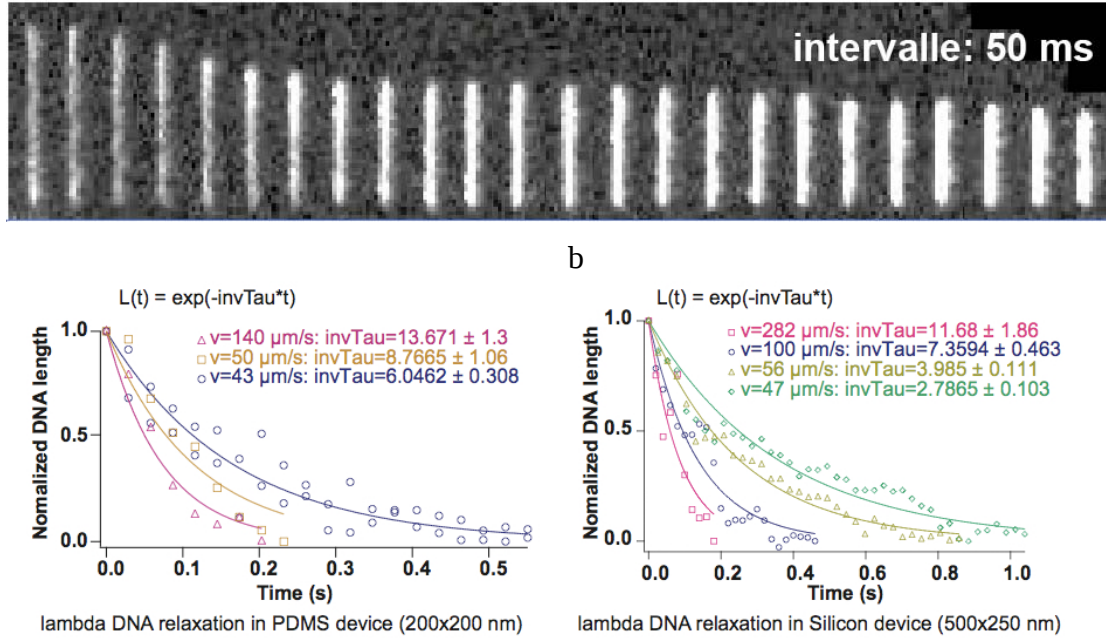


Figure IV.19 : (a) Les données présentées dans la figure IV.15 ont été alignées pour montrer les cinétiques de relaxation d'un ADN- λ à l'intérieur du nanocanal. La réponse à un champ électrophorétique est présentée en haut, celle à un champ hydrodynamique en bas. Les deux images sont à la même échelle. (b) Les données de relaxation en longueur ont été normalisées pour comparer les cinétiques à plusieurs vitesses de migration dans des nanocanaux en PDMS (200x200 nm² à gauche) et en silicium (500x250 nm² à droite).

Nous avons ensuite voulu savoir si le temps de relaxation dépend de la vitesse de migration de la molécule dans les nanocanaux. Avec un actionnement hydrodynamique, nous avons observé une accélération des cinétiques de relaxation avec la vitesse de progression des molécules dans les nanocanaux (Fig. IV.19b). Ce résultat est observé avec toutes les géométries et indépendamment du matériau utilisé, comme le montre les données obtenues en PDMS 200x200 nm² et en silicium 500x250 nm². Cette même étude a été conduite en utilisant l'électrophorèse pour actionner le déplacement des molécules d'ADN et avec des nanocanaux en PDMS de 200x200 nm². Ces résultats ont également montré une variation du temps de relaxation en fonction de la vitesse de migration des molécules (Fig. IV.20), et des temps de relaxation environ 2 fois plus rapide en électrophorèse qu'en hydrodynamique. Il est intéressant de noter que ce ralentissement des dynamiques de

relaxation en présence d'un écoulement de cisaillement a été détecté par Chu et ses collègues pour des manipulations d'ADN en volume (Fig. IV.12).

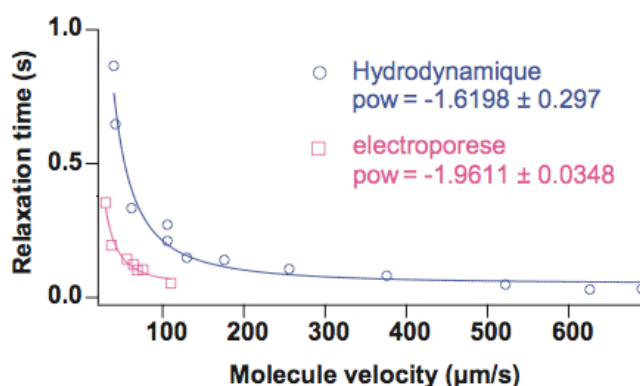


Figure IV.20 : Temps de relaxation des molécules d'ADN- λ en fonction de la vitesse de migration dans des nanocanaux par électrophorèse (rose) et par flux hydrodynamique (bleu)

3.4 Interprétation des résultats

Dans ce chapitre, nous avons étudié la réponse d'un ADN- λ lorsqu'il est placé dans un dispositif nanofluidique en silicium ou en PDMS, et nous avons comparé l'effet d'un actionnement électrophorétique ou hydrodynamique. Nous avons mis en évidence deux effets intéressants justifiant l'utilisation de l'hydrodynamique pour la manipulation des ADN. D'une part, les molécules d'ADN adoptent plus une configuration plus étendue, sans coude, au moment de leur insertion dans les nanocanaux. D'autre part, nous avons proposé un moyen de contrôler le degré d'élongation des molécules en modulant la pression en entrée des canaux tout en conservant une géométrie donnée de nanocanaux.

Interprétons d'abord l'élongation de l'ADN sous l'effet d'un champ hydrodynamique. La présence de cisaillement dans l'écoulement induit des contraintes le long de la molécule. En effet un monomère situé au centre du canal se déplace plus vite qu'un autre au voisinage de la paroi. Si le monomère au milieu est

situé en amont du canal par rapport à celui au bord, ce phénomène se traduit par une contrainte élongationnelle. Mais la configuration opposée, qui est associée à une contrainte de compression, a également lieu le long de la chaîne. Autrement dit, une chaîne de polymère est soumise à des contraintes de compression/extension le long de son contour. Si la réponse élastique de l'ADN est identique (ressort linéaire), alors on ne s'attend pas à un étirement de la molécule. Notre résultat indique donc qu'il est plus facile d'étirer l'ADN que de le comprimer. Nous proposons que cette réponse anharmonique soit liée au confinement : la compression est défavorisée car elle se traduit par un gonflement latéral de la chaîne, que la contrainte stérique interdit.

Concernant la linéarisation favorisée de l'ADN, il est intéressant de noter que le temps de relaxation de l'ADN est augmenté en présence de l'écoulement hydrodynamique. Or, la déformation d'un ADN en présence d'un écoulement de cisaillement est caractérisée par le nombre de Weisenberg, qui dépend linéairement du temps de relaxation de la molécule : plus la molécule relaxe lentement, plus le nombre de Weisenberg augmente, et plus la molécule est déformée. Autrement dit, nous pouvons suggérer que l'écoulement de Poiseuille augmente la déformabilité de la molécule pour une vitesse d'immiscions dans les nanocanaux donnée.

3.5 Un exemple d'application

A partir de ce travail, nous avons conduit deux expériences complémentaires pour démontrer l'intérêt de nos développements technologiques.

3.5.1 Analyse en taille de fragments d'ADN

Nous avons souhaité démontrer que les nanocanaux pouvaient être utiles à l'analyse en taille de fragments d'ADN, comme l'a montré R. Austin et ses collaborateurs dans des structures de 120 nm (Riehn, Lu et al. 2005). Pour ce faire, nous avons utilisé une enzyme de restriction de l'ADN (BmtI) coupant l'ADN- λ une

seule fois, ce qui produit des fragments de 14 kb et 35 kb. En complétant avec l'ADN- λ , nous avons ainsi obtenu un mélange avec trois ADN de taille 14, 35, et 49 kb. Nous avons introduit ce mélange dans notre dispositif nanofluidique en PDMS de $200 \times 200 \text{ nm}^2$, et effectué une manipulation en hydrodynamique à une vitesse de migration de $150 \text{ }\mu\text{m/s}$. Nous avons réalisé une acquisition de 5 minutes, ce qui nous a permis de visualiser environ 350 molécules. Puis, nous avons réalisé un histogramme des longueurs des molécules étirées dans les nanocanaux (Figure IV.21). Nous avons détecté trois pics, qui ont été analysés avec des gaussiennes, afin de déduire une longueur moyenne et une dispersion caractéristique. Nous avons enfin montré la dépendance linéaire entre la taille des fragments et leur taille en paire de bases, ce qui établit que notre technologie permet d'étirer de manière homogène des fragments d'ADN dans la gamme 10-50 kb.

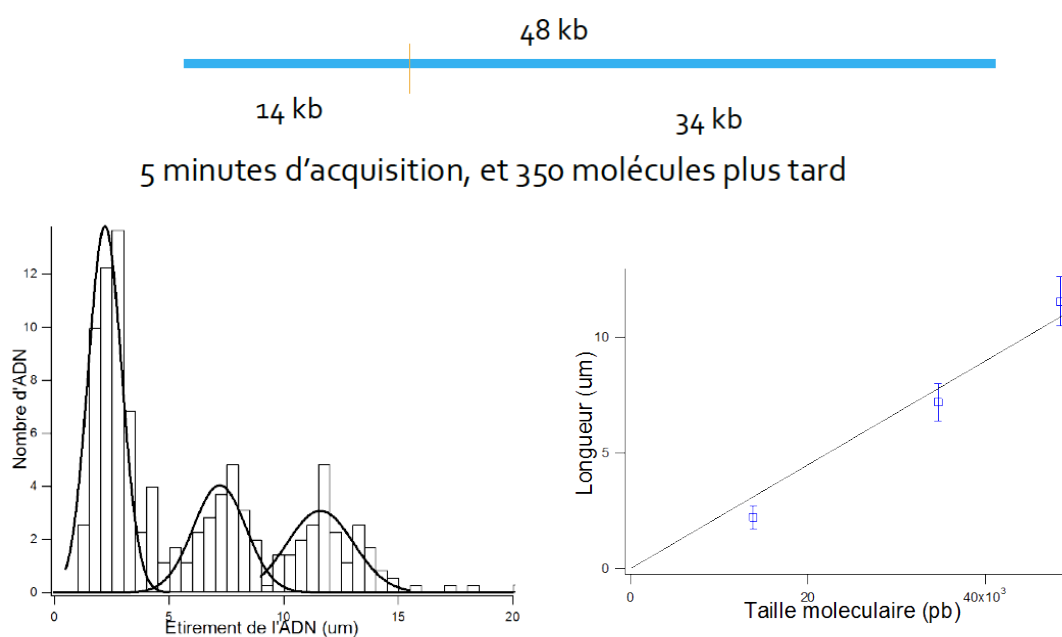


Figure IV.21 : Détection de λ -ADN (48 kb) et λ -ADN coupé avec l'enzyme BmtI en deux sections (14 kb et 34 kb) dans des nanocanaux par flux hydrodynamique.

3.5.2 Manipulation d'ADN génomique

Nous souhaitons démontrer que notre technologie est adaptée à la manipulation d'ADN génomique, et à l'étude de signaux inscrits sur ces ADN par voie optique. Pour ce faire, nous avons développé des protocoles pour la purification d'ADN génomique, et nous avons inséré ces ADN dans les nanocanalisation (Fig. IV.22). Ce test s'est révélé concluant, et l'utilisation de l'hydrodynamique nous a permis d'atteindre un niveau d'étirement beaucoup plus fort que l'électrophorèse (Fig. IV.17).

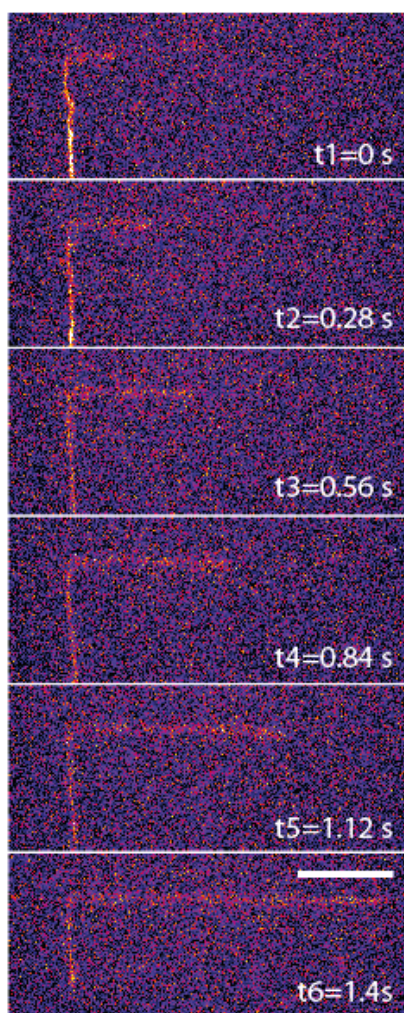


Figure IV.22 : Une molécule d'ADN génomique (NRK) qui entre dans un nanocanal par flux hydrodynamique. Barre d'échelle se présente 20 μm

4 Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons utilisé nos développements de nanotechnologies pour la manipulation de molécules d'ADN individuelles. Nous avons travaillé selon deux directions originales. Nous avons d'une part testé de manière quantitative le potentiel du PDMS pour la nanofluidique. Nous avons montré que ce matériau est très adapté au prototypage rapide, et son utilisation nous a permis d'avancer vite dans nos projets de recherche concernant la manipulation d'ADN. Toutefois, la description des mécanismes physiques associés à la migration et à l'étirement de l'ADN dans les nanocanaux s'est révélée très décevante, voire même inexplicable. Autrement dit, il nous semble tout à fait inutile d'utiliser le PDMS pour des études de physique en nanofluidique, mais c'est un matériau très pertinent pour son potentiel applicatif associé à son fort intérêt pour le prototypage.

Nous avons également réalisé une étude originale sur la manipulation de l'ADN par hydrodynamique. Nous avons présenté un panorama assez complet de la réponse de cette molécule en fonction de la géométrie des canaux et du matériau structural. Cette stratégie de manipulation nous a permis de déposer un brevet, et de mettre les premiers jalons vers une utilisation des systèmes fluidiques pour la manipulation de l'ADN chromosomique, et donc d'aborder des questions de biologie moderne. Ce volet constituera la suite de mon travail de thèse.

Conclusions et perspectives

Nous avons présenté nos travaux issus de deux axes de recherche consacrés à la manipulation spatiale de micro- et nano-objets sur des gels hydrophiles texturés, et l'étirement longitudinal de l'ADN dans des canaux nanofluidiques.

Tout d'abord, le domaine de l'assemblage spatial de nano-objets sur des substrats texturés est très actif, et il est aujourd'hui possible de placer des nanoparticules individuelles dans des motifs espacés de quelques microns. Ces succès ont été obtenus en utilisant de la silice ou du PDMS comme matériau structurant, et nous avons exploré le potentiel d'un nouveau support, les hydrogels. Nous avons démontré que les flux hydrodynamiques ayant lieu à la surface des hydrogels permettent de guider des particules selon des organisations déterminées, et nous avons identifié deux mécanismes responsables de cette organisation spatiale : l'assemblage par capillarité, qui est un phénomène bien connu, et l'assemblage par perméation, qui est décrit pour la première fois dans cette thèse. Ces mécanismes permettent de diriger l'assemblage de tous types de particules, et selon des motifs de diversité très variables. Nous n'atteignons pas une précision de placement à l'échelle de la particule unique, mais nous n'avons pas non plus imprimé sur le gel des motifs adaptés au positionnement de particules individuelles, comme cela est fait avec le PDMS. Autrement dit, une perspective très pertinente pour le sujet est réaliser des moules avec des nanostructures dédiées à la capture d'une seule nanoparticule. C'est un travail technologique exigeant que nous n'avons pas envisagé au cours de la thèse, mais qui mérite d'être exploré dans le futur. Dans une autre direction, si l'on ne cherche pas à atteindre une précision de placement de particules individuelles, il serait intéressant de développer des composants fondés sur des nanoparticules organisées en lignes. Ce travail ne nécessite pas de contrôle à l'échelle de la particule individuelle, et permet par exemple d'envisager la fabrication de jauges de contraintes (une couche mince de nanoparticule voit sa réponse électrique fortement varier sous l'effet d'une torsion du substrat). En outre, il serait très pertinent de pouvoir assembler des réseaux complexes

de nanoparticules de différentes natures chimiques (par exemple conductrice et semi-conductrice) afin de réaliser des structures électroniques avec des propriétés originales. Ce deuxième objectif semble plus abordable, mais il nécessite d'optimiser précisément les procédés d'assemblage et de report des particules dans le but d'obtenir des lignes « denses » en nanoparticules.

Dans le deuxième volet du travail, nous avons débuté un projet de recherche avec un retard de 5 ans sur les meilleures équipes internationales en nanofluidique. Ce retard est en grande partie comblé à ce jour, comme le démontrent nos développements originaux sur l'utilisation de l'hydrodynamique pour étirer plus efficacement l'ADN. Le premier défi qui s'ouvre à nous est de mieux comprendre le mécanisme physique responsable de l'élongation de l'ADN dans des nanocanaux avec des flux hydrodynamiques. Pour aborder ce problème, nous avons entamé une collaboration avec l'équipe de Jean-Marc Victor (LPTMC, Paris) pour étudier par dynamique moléculaire la réponse d'un ADN dans un nanocanal. D'autre part, nous menons des expériences modèles où l'on mesure précisément les paramètres hydrodynamiques du flux et la réponse de l'ADN. Ces expériences sont menées par H. Ranchon un étudiant du laboratoire avec des systèmes fluidiques « en fente », qui nous permettent de caractériser précisément les écoulements et de mieux sonder la conformation de l'ADN en fonction du niveau de confinement. Le second défi, qui reste d'une grande actualité dans le domaine de la nanofluidique, est de démontrer l'intérêt de cette technologie pour la biologie. Nos dispositifs permettent en effet de manipuler l'ADN génomique, et nous sommes entrain de travailler sur le marquage de séquences nouvellement répliquées par les cellules. Nous espérons ainsi pouvoir diagnostiquer des anomalies du programme de réplication cellulaire, ce qui présente un intérêt pour des applications en cancérologie.

Annexe A1 : du soft au hard-PDMS

Nous présentons dans cette annexe les formulations des soft et h-PDMS, élastomères aux modules d'Young respectifs de 2 et 9 MPa environ.

A1.1. Formulation du soft PDMS

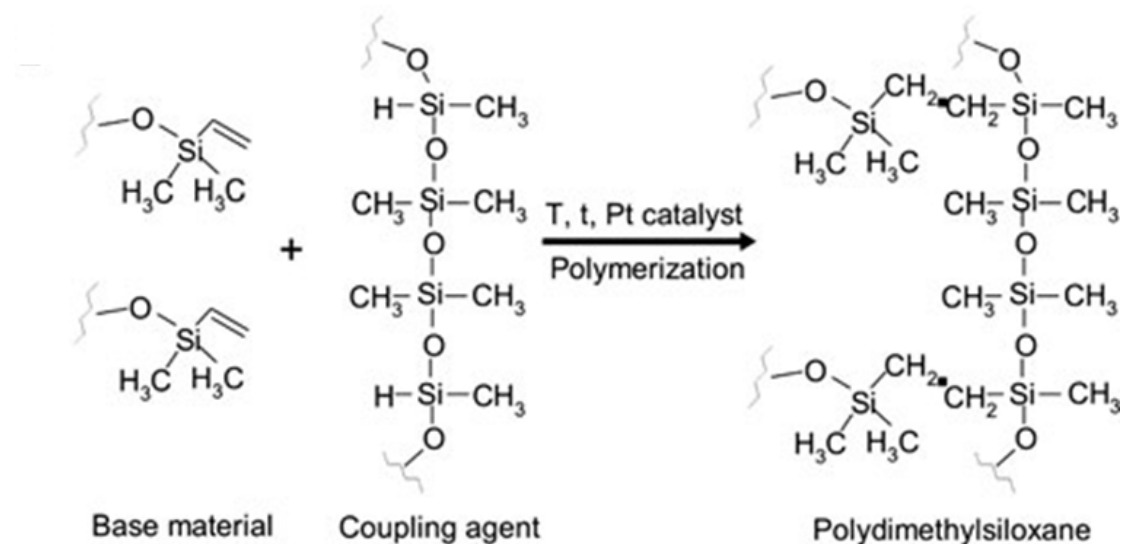


Figure A1.1 : schéma de la réaction de réticulation du PDMS. Schéma tiré de Cai et Neyer 2010

A1.2. Formulation du h-PDMS

VDT 731 (7-8%)..... (vinylmethylsiloxane dimethylsiloxane cop.)	13.6g
VQM 135..... (vinyl Q-resine dispersion)	2g
Modulateur..... (tetramethyl-tetravinyl cyclotetrasiloxane)	100μL
SIP6831.1..... (Platinum cyclovinyldimethylsiloxane complex in xylene 2.1~2.4%Pt)	20μL
HMS 301..... (Methyhydrosiloxane dimethylsiloxane cop.)	4g

Figure A1.2 : préparation de 20 g de h-PDMS : les quatre premiers composés sont ajoutés les uns après les autres, formant une base aux chaînes plus courtes que celles du soft-PDMS. Après avoir placé le mélange sous vide pendant 10 minutes environ, l'agent réticulent est ajouté. Après avoir homogénéisé le mélange à température ambiante, une dernière étape de dégazage sous vide est nécessaire avant d'obtenir un polymère 4 fois plus rigide que le soft-PDMS.

Annexe A2 : Protocole de culture cellulaire sur polyacrylamide

Préparation avant culture cellulaire

Stérilisation des milieux

Tout ce qui ne doit contenir aucune cellule doit être stérilisé (Dans notre cas, il y a le monomère de polyacrylamide, EDC, NHS, Collagène à stériliser). Pour cela, il faut filtrer, en condition de stérilité (c'est-à-dire sous une flamme ou sous un psm), en utilisant un filtre à pas de 0,2µm. Avec un filtre à 0,2µm, seuls les virus seront conservés.

Stérilité des surfaces

La zone propre doit être la plus propre possible, par décontamination régulière utilisant un nettoyant-décontaminant de surface. Par précaution, il faut également nettoyer et décontaminer toute surface entrant dans la zone propre: les flacons, les bouteilles, les gants, les mains, et aussi les lamelles silanisée et lamelles nues que nous allons utiliser dans la manipulation.

Pour faire un film de gel sur le verre, on prend une lamelle silanisée et une nue qui sont stériles dans l'éthanol, et on les laisse à coté pour le séchage. Quand les lamelles sont sèches, on met 60 µl de solution de polyacrylamide, et couvert tout de suite la lamelle nue juste la dessus avant la réticulation de polyacrylamide, et attendre une demi-heure.

Rinçage - une fois que le gel est fait, on le rince avec du PBS (2 fois de 500µl)

Activation de surface – en mettant 60µl de mélange d'EDC et NHS sur toute la surface du gel nous permet d'activer des groupements carboxyles afin d'accrocher la protéine. Cette étape est faite dans un environnement humide, et réactiver pendant 10 minutes.

Rinçage – le deuxième rinçage (2 fois de 500µl)

Accrochage de la protéine - par la suite, on peut accrocher la protéine, donc on met 60 µl de collagène sur le gel, et attendre 15 minutes.

Préparation de la suspension des cellules

Il nous faut : le milieu de culture qui contient : EDTA (l'acide éthylène-diamine-tétraacétique), milieux de Base (F-12 Mélange Nutritif Ham) et la Solutions de Tamponnées au Phosphate (PBS), la trypsine, et la PBS.

En suivant ces étapes suivantes :

Inspirer la suspension préparée avant

Rincer avec PBS

Trypsine

Mettre dans l'incubateur pendant 5 minutes

Mettre le milieu de culture

Dépôt des cellules - A la fin, on peut mettre les cellules sur le gel : 5ml de milieu de culture et 100µl de suspension de cellule, et conserver dans l'incubateur. On peut les observer dans deux jours.

Annexe A3 : Extraction d'ADN Génomique de cellules animales

Avant de commencer la manip de culture cellulaire penser à :

- Préchauffer la trypsine, le milieu de culture et le PBS à 37°C
- Allumer le Bain marie à 70°C pour l'extraction d'ADN

1) Culture cellulaire :

- Elimine le milieu de culture des boîtes de pétri
- Lavage des cellules avec du PBS : pour éliminer les protéines présentes dans le milieu qui pourraient inhiber l'action de la trypsine
- Décollement des cellules : ajout de 800µL de trypsine 0,25%-EDTA sur les cellules, incubation **2min à 37°C**
- Observation au microscope inverse que toutes les cellules soient décollées du support.
- Inactivation de la trypsine : ajout de milieu de culture complet (avec SVF) qui contient des inhibiteurs de la trypsine
- Comptage des cellules sur cellules de Mallassez avec du bleu trypan (colore en bleu les cellules mortes)
- Centrifugation des cellules (1300rpm, 3min), élimine le surnageant, reprend le culot dans 200µL de PBS.

Rq : le comptage des cellules se fait sur 25 carrés de la cellule de Mallassez :

Nbre de cellules/mL = nbre cellules comptées * 4 * Fd * 1000

2) Extraction d'ADN

Extraction avec le kit Qiagen : DNeasy Tissue Handbook (Cat NO 69 504)

- Lyse des cellules : Protéinase K + Buffer, incubation **70°C 10min**
- Précipite l'ADN : ajout d'éthanol 100% - Vortex
- Passe le mix sur colonne de silice, centrifuge
- Lavage 1, centri
- Lavage 2 , centri + séchage
- Elution de 100 à 200µL de tampon d'élution

Rq : On peut repasser une deuxième fois l'éluat sur la colonne pour être sûr de récupérer tout l'ADN

- Dosage de l'ADN au spectrophotomètre à 260nm.

Rq : $A_{260}/A_{280} = 1.8/2$: Extraction ok

$A_{260}/A_{280} < 1.8$: Contamination par des protéines

$A_{260}/A_{280} > 2$: Contamination d'ARN

Bibliographie

Chapitre I

Allemand, J. F., D. Bensimon, et al. (1997). "pH-dependent specific binding and combing of DNA." Biophysical Journal **73**(4): 2064-2070.

Baumann, C. G., S. B. Smith, et al. (1997). "Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(12): 6185-6190.

Bustamante, C., S. B. Smith, et al. (2000). "Single-molecule studies of DNA mechanics." Current Opinion in Structural Biology **10**(3): 279-285.

Cerf, A., C. Thibault, et al. (2009). "Ordered arrays of single DNA molecules by a combination of capillary assembly, molecular combing and soft-lithography." Microelectronic Engineering **86**(4-6): 1419-1423.

Cui, Y., M. T. Bjork, et al. (2004). "Integration of colloidal nanocrystals into lithographically patterned devices." Nano Letters **4**(6): 1093-1098.

Deegan, R. D., O. Bakajin, et al. (1997). "Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops." Nature **389**(6653): 827-829.

Douglas, S. M., H. Dietz, et al. (2009). "Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes." Nature **459**(7245): 414-418.

Ghislain, L. P., N. A. Switz, et al. (1994). "MEASUREMENT OF SMALL FORCES USING AN OPTICAL TRAP." Review of Scientific Instruments **65**(9): 2762-2768.

Gittes, F. and C. F. Schmidt (1998). "Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers." Optics Letters **23**(1): 7-9.

Gittes, F. and C. F. Schmidt (1998). "Signals and noise in micromechanical measurements." Methods in Cell Biology, Vol 55 **55**: 129-156.

Govor, L. V., G. Reiter, et al. (2004). "Self-assembled nanoparticle deposits formed at the contact line of evaporating micrometer-size droplets." Physical Review E **69**(6).

Grier, D. G. (2003). "A revolution in optical manipulation." Nature **424**(6950): 810-816.

Huang, J. X., A. R. Tao, et al. (2006). "A general method for assembling single colloidal particle lines." Nano Letters **6**(3): 524-529.

Jalili, N. and K. Laxminarayana (2004). "A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences." Mechatronics **14**(8): 907-945.

Junno, T., K. Deppert, et al. (1995). "CONTROLLED MANIPULATION OF NANOPARTICLES WITH AN ATOMIC-FORCE MICROSCOPE." Applied Physics Letters **66**(26): 3627-3629.

Kershner, R. J., L. D. Bozano, et al. (2009). "Placement and orientation of individual DNA shapes on lithographically patterned surfaces." Nature Nanotechnology **4**(9): 557-561.

Kim, Y., K. S. Kim, et al. (2011). "Nanochannel confinement: DNA stretch approaching full contour length." Lab on a Chip **11**(10): 1721-1729.

Kraus, T., L. Malaquin, et al. (2005). "Closing the gap between self-assembly and microsystems using self-assembly, transfer, and integration of particles." Advanced Materials **17**(20): 2438-+.

Kraus, T., L. Malaquin, et al. (2007). "Nanoparticle printing with single-particle resolution." Nature Nanotechnology **2**(9): 570-576.

Krishnan, M., I. Moench, et al. (2007). "Spontaneous stretching of DNA in a two-dimensional nanoslit." Nano Letters **7**(5): 1270-1275.

Litvinov, R. I., H. Shuman, et al. (2002). "Binding strength and activation state of single fibrinogen-integrin pairs on living cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(11): 7426-7431.

Liu, C. (2008). "Parallel scanning probe arrays: their applications." Materials Today **11**: 22-29.

Malaquin, L., T. Kraus, et al. (2007). "Controlled particle placement through convective and capillary assembly." Langmuir **23**(23): 11513-11521.

Mirkin, C. A., R. L. Letsinger, et al. (1996). "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials." Nature **382**(6592): 607-609.

Napoli, M., J. C. T. Eijkel, et al. (2010). "Nanofluidic technology for biomolecule applications: a critical review." Lab on a Chip **10**(8): 957-985.

Odijk, T. (1983). "ON THE STATISTICS AND DYNAMICS OF CONFINED OR ENTANGLED STIFF POLYMERS." Macromolecules **16**(8): 1340-1344.

Pralle, A., M. Prummer, et al. (1999). "Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light." Microscopy Research and Technique **44**(5): 378-386.

Reisner, W., J. P. Beech, et al. (2007). "Nanoconfinement-enhanced conformational response of single DNA molecules to changes in ionic environment." Physical Review Letters **99**(5).

Reisner, W., K. J. Morton, et al. (2005). "Statics and dynamics of single DNA molecules confined in nanochannels." Physical Review Letters **94**(19).

Riehn, R., M. C. Lu, et al. (2005). "Restriction mapping in nanofluidic devices." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(29): 10012-10016.

Rohrbach, A. and E. H. K. Stelzer (2002). "Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations." Applied Optics **41**(13): 2494-2507.

Sinclair, G., P. Jordan, et al. (2004). "Assembly of 3-dimensional structures using programmable holographic optical tweezers." Optics Express **12**(22): 5475-5480.

Svoboda, K. and S. M. Block (1994). "OPTICAL TRAPPING OF METALLIC RAYLEIGH PARTICLES." Optics Letters **19**(13): 930-932.

Tegenfeldt, J. O., C. Prinz, et al. (2004). "The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(30): 10979-10983.

Tinland, B., A. Pluen, et al. (1997). "Persistence length of single-stranded DNA." Macromolecules **30**(19): 5763-5765.

Whitesides, G. M. (2011). "What Comes Next?" Lab on a Chip **11**(2): 191-193.

Xu, J., J. Xia, et al. (2007). "Evaporation-induced self-assembly of nanoparticles from a sphere-on-flat geometry." Angewandte Chemie-International Edition **46**(11): 1860-1863.

Yin, Y. D., Y. Lu, et al. (2001). "Template-assisted self-assembly: A practical route to complex aggregates of monodispersed colloids with well-defined sizes, shapes, and structures." Journal of the American Chemical Society **123**(36): 8718-8729.

Séverac, F., Alphonse, P., Estève, A., Bancaud, A. and Rossi, C. (2011). "High-Energy Al/CuO Nanocomposites Obtained by DNA-Directed Assembly." Advanced Functional Materials.

P. G. de Gennes (1979). "Scaling Concepts in Polymer Physics." Cornell University Press, Ithaca, NY,

CR Calladine. (2004). "Understanding DNA: the molecule & how it works."

Chapitre II

Araki, N., E. S. Aydil, et al. (2010). "Collision of a long DNA molecule with an isolated nanowire." Electrophoresis **31**(22): 3675-3680.

Cross, J. D., E. A. Strychalski, et al. (2007). "Size-dependent DNA mobility in nanochannels." Journal of

Applied Physics **102**(2).

Duffy, D. C., J. C. McDonald, et al. (1998). "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)." Analytical Chemistry **70**(23): 4974-4984.

Fontana, R. E., J. Katine, et al. (2002). "E-beam writing: A next-generation lithography approach for thin-film head critical features." Ieee Transactions on Magnetics **38**(1): 95-100.

Frigault, M. M., J. Lacoste, et al. (2009). "Live-cell microscopy - tips and tools." Journal of Cell Science **122**(6): 753-767.

Fulcrand, R., A. Bancaud, et al. (2011). "On chip magnetic actuator for batch-mode dynamic manipulation of magnetic particles in compact lab-on-chip." Sensors and Actuators B: Chemical.

Hajjoul, H., J. Mathon, et al. (2011). "Optimized micromirrors for three-dimensional single-particle tracking in living cells." Applied Physics Letters **98**(24).

Lee, T. W., S. Jeon, et al. (2005). "Soft-contact optical lithography using transparent elastomeric stamps: application to nanopatterned organic light-emitting devices." Advanced Functional Materials **15**(9): 1435-1439.

Randall, G. C., K. M. Schultz, et al. (2006). "Methods to electrophoretically stretch DNA: microcontractions, gels, and hybrid gel-microcontraction devices." Lab on a Chip **6**(4): 516-525.

Reisner, W., J. P. Beech, et al. (2007). "Nanoconfinement-enhanced conformational response of single DNA molecules to changes in ionic environment." Physical Review Letters **99**(5).

Rogers, J. A., K. E. Paul, et al. (1997). "Using an elastomeric phase mask for sub-100 nm photolithography in the optical near field." Applied Physics Letters **70**(20): 2658-2660.

Schmid, H. and B. Michel (2000). "Siloxane polymers for high-resolution, high-accuracy soft lithography." Macromolecules **33**(8): 3042-3049.

Spiering, V. L., S. Bouwstra, et al. (1993). "ON-CHIP DECOUPLING ZONE FOR PACKAGE-STRESS REDUCTION." Sensors and Actuators a-Physical **39**(2): 149-156.

Viero, Y., Q. He, et al. (2011). "Efficient prototyping of large-scale pdms and silicon nanofluidic devices using pdms-based phase-shift lithography." Microfluidics and Nanofluidics: 1-9.

Whitesides, G. M. (2011). "What Comes Next?" Lab on a Chip **11**(2): 191-193.

Xia, Y. N. and G. M. Whitesides (1998). "Soft lithography." Annual Review of Materials Science **28**: 153-184.

Rogers, J. A, et H. H. Lee. (2009). "Unconventional nanopatterning techniques and applications." John Wiley & Sons.

Chapitre III

Balci, S., D. M. Leinberger, et al. (2008). "Printing and aligning mesoscale patterns of Tobacco mosaic virus on surfaces." Advanced Materials **20**(11): 2195-+.

Berg, M. C., S. Y. Yang, et al. (2004). "Controlling mammalian cell interactions on patterned polyelectrolyte multilayer surfaces
10.1021/la0355489." Langmuir **20**(4): 1362-1368.

Cui, Y., M. T. Bjork, et al. (2004). "Integration of colloidal nanocrystals into lithographically patterned devices
10.1021/nl049488i." Nano Letters **4**(6): 1093-1098.

Deegan, R. D., O. Bakajin, et al. (1997). "Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops
10.1038/39827." Nature **389**(6653): 827-829.

Engler, A. J., S. Sen, et al. (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." Cell **126**(4): 677-689.

Feldman, K., G. Hahner, et al. (1999). "Probing resistance to protein adsorption of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers by scanning force microscopy
10.1021/ja991049b." Journal of the American Chemical Society **121**(43): 10134-10141.

Ghosh, P., G. Han, et al. (2008). "Gold nanoparticles in delivery applications." Advanced Drug Delivery Reviews **60**(11): 1307-1315.

Govor, L. V., G. Reiter, et al. (2004). "Self-assembled nanoparticle deposits formed at the contact line of evaporating micrometer-size droplets
061609 10.1103/PhysRevE.69.061609." Physical Review E **69**(6).

Grzelczak, M., J. Vermant, et al. (2010). "Directed Self-Assembly of Nanoparticles
10.1021/nn100869j." Acs Nano **4**(7): 3591-3605.

Huang, J. X., A. R. Tao, et al. (2006). "A general method for assembling single colloidal particle lines
10.1021/nl060235u." Nano Letters **6**(3): 524-529.

Khademhosseini, A. and R. Langer (2007). "Microengineered hydrogels for tissue engineering
10.1016/j.biomaterials.2007.07.021." Biomaterials **28**(34): 5087-5092.

Kingshott, P., S. McArthur, et al. (2002). "Ultrasensitive probing of the protein resistance of PEG

surfaces by secondary ion mass spectrometry
Pii s0142-9612(02)00228-4 10.1016/s0142-9612(02)00228-4." Biomaterials **23**(24): 4775-4785.

Kobel, S., M. Limacher, et al. (2009). "Micropatterning of Hydrogels by Soft Embossing
10.1021/la9002115." Langmuir **25**(15): 8774-8779.

Kraus, T., L. Malaquin, et al. (2007). "Nanoparticle printing with single-particle resolution." Nature Nanotechnology **2**(9): 570-576.

Kraus, T., L. Malaquin, et al. (2007). "Nanoparticle printing with single-particle resolution
10.1038/nnano.2007.262." Nature Nanotechnology **2**(9): 570-576.

Malaquin, L., T. Kraus, et al. (2007). "Controlled particle placement through convective and
capillary assembly
10.1021/la700852c." Langmuir **23**(23): 11513-11521.

Mirkin, C. A., R. L. Letsinger, et al. (1996). "A DNA-based method for rationally assembling
nanoparticles into macroscopic materials." Nature **382**(6592): 607-609.

Park, S. Y., A. K. R. Lytton-Jean, et al. (2008). "DNA-programmable nanoparticle crystallization."
Nature **451**(7178): 553-556.

Pelham, R. J. and Y. L. Wang (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by
substrate flexibility." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America **94**(25): 13661-13665.

Peppas, N. A., J. Z. Hilt, et al. (2006). "Hydrogels in biology and medicine: From molecular
principles to bionanotechnology." Advanced Materials **18**(11): 1345-1360.

Prevo, B. G. and O. D. Velev (2004). "Controlled, rapid deposition of structured coatings from
micro- and nanoparticle suspensions
10.1021/la035295j." Langmuir **20**(6): 2099-2107.

Randall, G. C. and P. S. Doyle (2005). "Permeation-driven flow in poly(dimethylsiloxane)
microfluidic devices." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America **102**(31): 10813-10818.

Schmalzing, D., C. A. Piggee, et al. (1993). "CHARACTERIZATION AND PERFORMANCE OF A
NEUTRAL HYDROPHILIC COATING FOR THE CAPILLARY ELECTROPHORETIC SEPARATION OF
BIOPOLYMERS." Journal of Chromatography A **652**(1): 149-159.

Viovy, J. L. (2000). "Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms."
Reviews of Modern Physics **72**(3): 813-872.

Yin, Y. D., Y. Lu, et al. (2001). "Template-assisted self-assembly: A practical route to complex aggregates of monodispersed colloids with well-defined sizes, shapes, and structures 10.1021/ja011048v." Journal of the American Chemical Society **123**(36): 8718-8729.

Chapitre IV

Baumann, C. G., S. B. Smith, et al. (1997). "Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(12): 6185-6190.

Campbell, L. C., M. J. Wilkinson, et al. (2004). "Electrophoretic manipulation of single DNA molecules in nanofabricated capillaries." Lab on a Chip **4**(3): 225-229.

Cao, H., J. O. Tegenfeldt, et al. (2002). "Gradient nanostructures for interfacing microfluidics and nanofluidics." Applied Physics Letters **81**(16): 3058-3060.

Doyle, P. S., B. Ladoux, et al. (2000). "Dynamics of a tethered polymer in shear flow." Physical Review Letters **84**(20): 4769-4772.

Gervais, T., J. El-Ali, et al. (2006). "Flow-induced deformation of shallow microfluidic channels." Lab on a Chip **6**(4): 500-507.

Jo, K., D. M. Dhingra, et al. (2007). "A single-molecule barcoding system using nanoslits for DNA analysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(8): 2673-2678.

Mannion, J. T., C. H. Reccius, et al. (2006). "Conformational analysis of single DNA molecules undergoing entropically induced motion in nanochannels." Biophysical Journal **90**(12): 4538-4545.

Ou, J., J. Cho, et al. (2009). "DNA electrophoresis in a sparse ordered post array." Physical Review E **79**(6).

Qiao, R. (2007). "Effects of molecular level surface roughness on electroosmotic flow." Microfluidics and Nanofluidics **3**(1): 33-38.

Randall, G. C., K. M. Schultz, et al. (2006). "Methods to electrophoretically stretch DNA: microcontractions, gels, and hybrid gel-microcontraction devices." Lab on a Chip **6**(4): 516-525.

Reisner, W., J. P. Beech, et al. (2007). "Nanoconfinement-enhanced conformational response of single DNA molecules to changes in ionic environment." Physical Review Letters **99**(5).

Reisner, W., K. J. Morton, et al. (2005). "Statics and dynamics of single DNA molecules confined in nanochannels." Physical Review Letters **94**(19).

Riehn, R., M. C. Lu, et al. (2005). "Restriction mapping in nanofluidic devices." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(29): 10012-10016.

Smith, D. E., H. P. Babcock, et al. (1999). "Single-polymer dynamics in steady shear flow." Science **283**(5408): 1724-1727.

Tegenfeldt, J. O., H. Cao, et al. (2004). "Stretching DNA in nanochannels." Biophysical Journal **86**(1): 596A-596A.

van Honschoten, J. W., M. Escalante, et al. (2007). "Elastocapillary filling of deformable nanochannels." Journal of Applied Physics **101**(9).

Directed Assembly of Nanoparticles along Predictable Large-Scale Patterns Using Micromolded Hydrogels

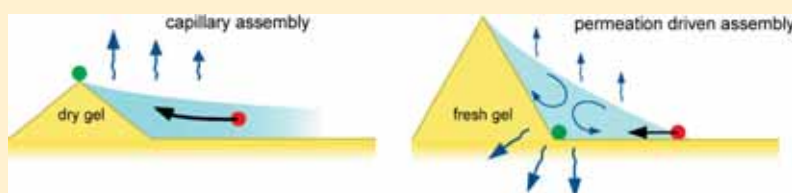
Qihao He,^{†,‡} Fabrice Sév  rac,^{†,‡} Houssam Hajjoul,^{†,‡} Yannick Viero,^{†,‡} and Aurélien Bancaud^{*,†,‡}

[†]CNRS, LAAS, 7 Avenue du Colonel Roche, F-31077 Toulouse, Cedex 4, France

[‡]Universit   de Toulouse, UPS, INSA, INP, ISAE, UT1, UTM, LAAS, F-31077 Toulouse, Cedex 4, France

S Supporting Information

ABSTRACT:



We present a new technology to organize microparticles and nanoparticles along micropatterns of variable complexity over centimeter-squared surfaces. This technology relies on the fabrication of textured hydrogels, which serve as templates for directed assembly after the deposition of a droplet of colloids on their surfaces. We show that directed assembly occurs spontaneously during water evaporation, and we demonstrate the efficiency of this mechanism for a variety of organic and inorganic nano-objects. The dynamics of this process is also uncovered by light microscopy, showing that the patterns imprinted on the gel determine fluid flow during water evaporation and allow for directed movements toward predictable positions. We finally propose different methods to transfer assembled particles from hydrogels to glass, silicon, or metallic surfaces, and we show that the assembled and transferred particles retain their surface properties for bioassays. Beyond the originality of this spontaneous assembly mechanism, it constitutes an attractive technology for nano-object large-scale integration, which does not require costly environmental control equipment.

1. INTRODUCTION

A variety of technologies have been devised to fabricate colloidal particles with controlled shapes, structures, dimensions, and very attractive functional properties for the development of new generations of nanosystems. One of the main challenges in the development of such devices remains the integration of nano-objects over large surfaces, and bottom-up assembly techniques, which take advantage of self-assembly processes occurring in fluidic environments to organize particles along desired patterns, have been vaunted as promising technologies.¹ Pioneering studies developed the principle of contact-line deposition, which exploits capillary flow in liquid drops to direct the formation of ringlike patterns on the millimeter scale² or on the micrometer scale.³ Another assembly mechanism based on convective flow, which is driven by solvent evaporation at the contact line of liquid droplets, has been shown to be suitable for the formation of large-scale microparticle and nanoparticle 2D layers.⁴ To obtain linear colloidal arrays with variable spacing on a template, it was also proposed to dip the substrate in a solution of colloids and to control the pace of solvent evaporation with a heater, as well as the pull-out speed when raising the substrate.⁵ The use of templates textured by electron or optical lithography^{6,7} or engraved with motifs in silicon⁶ or poly(dimethylsiloxane) (PDMS)⁸ has greatly improved the potential of capillary and convective assembly because complex structures could be generated by trapping

particles at defined positions over large surfaces. Printing single particles at $\sim 1\ \mu\text{m}$ resolution has now been demonstrated.⁹ These technologies, however, remain inaccessible to most research laboratories because they require operator-driven motors and/or environmental control systems to monitor contact-line progression and solvent evaporation, respectively. Moreover, they have been mostly validated with gold nanoparticles as model nano-objects, and it remains to be demonstrated whether they are sufficiently generic to be applied to additional nanomaterials.

In this report, we present a simple and versatile technology to assemble microparticles and nanoparticles along micrometer-scale patterns of different complexity with no need for external manipulation. Our method is based on synthetic hydrophilic polymers polyacrylamide (PAM) and poly(ethylene glycol) (PEG). PAM and PEG are extensively used for surface modification in biotechnology because of their repulsion of protein adsorption.^{10,11} Moreover, PAM and PEG hydrogels are highly biocompatible for molecular biology applications, where they are among the best separation matrices for DNA and protein electrophoresis,^{12,13} as well as for research in cell biology because they constitute a cell-resistant background in cell culture.¹⁴ The

Received: January 8, 2011

Revised: April 28, 2011

Published: May 11, 2011

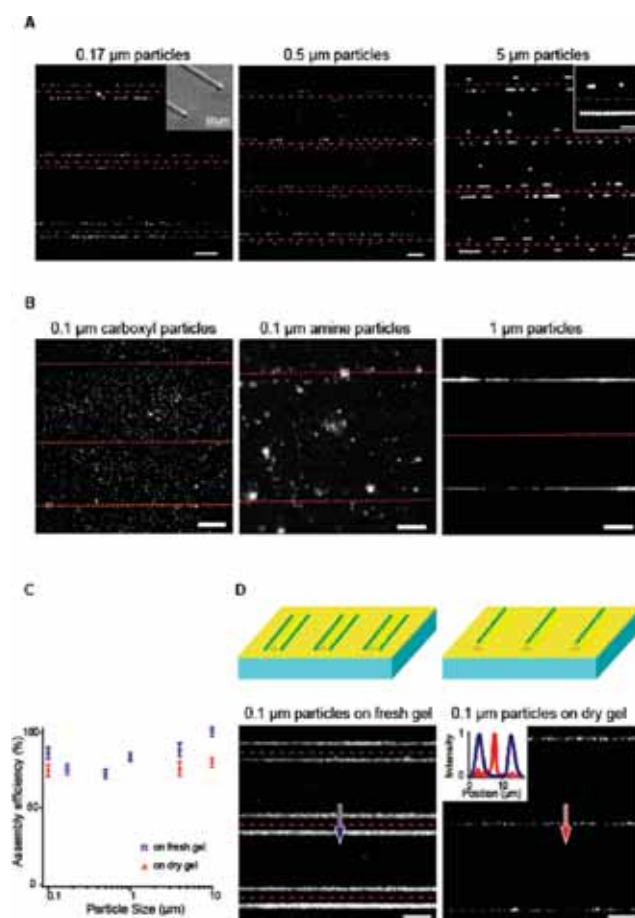


Figure 2. Assembly of polymer microparticles and nanoparticles in linear arrays. (A) Colloids of variable sizes deposited on fresh gels spontaneously accumulate at the bottom of the reliefs during water evaporation, as inferred from fluorescence micrographs. Red dashed lines correspond to the apex of V-shaped patterns. (B) The same experiment carried out on PDMS substrates shows random distributions of nanoparticles independent of their surface charge (see Supporting Information Figure S1 for surface potential characterization) and linear repartitions for microparticles. (C) Assembly efficiencies, which are determined by measuring the number of particles organized in arrays vs the total number of particles in the field of view, are plotted vs tracer dimensions. Each data point is the average of at least three independent experiments. (D) Particles (100 nm each) accumulate at the bottom or at the apex of the reliefs for fresh or dry gels, respectively (left and right fluorescence micrographs, respectively). Blue and red plots of the intensity along the direction perpendicular to the patterns are depicted in the inset. Note that we did not detect reswelling of the gel on the timescale of directed assembly experiments (not shown). Scale bars = 20 μm.

(Figure 2A), for 4 and 10% PAM/PEG hydrogels, and for micropatterns spanning 10 to 60 μm (data not shown). Bearing in mind that PDMS micropatterned surfaces have been used to organize viruses spatially,¹⁷ we then wished to determine whether hydrophobic or hydrophilic PDMS substrates could be used to assemble microparticles and nanoparticles. Hydrogels appeared to be more efficient than PDMS at directing the assembly of 100 nm tracers, whereas both types of substrates allowed us to produce linear arrays of microparticles (Figure 2B).

The assembly efficiency was then quantitatively evaluated by image analysis based on ratiometric measurements of the number

of particles assembled on the motifs versus the total number of particles in the field of view. (See the Experimental Section for the exact formulation.) Assembly efficiencies were typically larger than 80% for polymeric tracers with size ranging from 100 nm to 10 μm (Figure 2C), and optimal results were obtained with 5–10 μm particles, which were nearly systematically trapped along the linear patterns (right panel in Figure 2A) in pearl necklaces composed of up to 20 particles (inset in right panel of Figure 2A). Interestingly, a broad spatial distribution, which was characterized by a full width at half-maximum of 2.1 μm in the direction perpendicular to the arrays (inset in Figure 2D), was detected for 100 nm nanoparticles, and we wished to improve this performance by optimizing the hydrogel preparation.

Instead of using freshly prepared hydrogels, directed assembly experiments were conducted on dry templates that were obtained after ~1 h of evaporation at room temperature. A markedly different spatial distribution that consisted of one linear array of 100 nm tracers located at the upper edge of the motifs was detected (Figure 2D). These arrays were characterized by a 2-fold-narrower breadth of 1.1 μm in the direction transverse to the patterns (red curve in the inset of Figure 2C). Notably, the accumulation of particles at the upper edge of the motifs was a surprising result because this position does not correspond to a minimum in the gravitational energy. However, this phenomenon was observed only for small tracers that undergo negligible gravitational forces in comparison to Brownian forces during assembly, and microparticles of diameter larger than 1 μm were expectedly organized at the bottom of the reliefs even on dry gels (data not shown).

To conclude that linear arrays of particles spanning 100 nm to 10 μm could efficiently be arranged in linear arrays using V-shaped micropatterned PAM/PEG hydrogels, we set out to investigate the dynamics of this process by real-time fluorescence microscopy.

2.3. Assembly Dynamics. The dynamics of 100 nm tracers deposited on dry hydrogels, which remained collapsed in the course of water evaporation (data not shown), was first investigated. Two dominant flows, which were parallel and perpendicular to the patterns, were detected. Large-scale fluid equilibration in the presence of oriented micropatterns accounted for the existence of longitudinal flows (green arrowhead in Figure 3A). The flow directed toward the apex of the motifs (red, blue, and orange arrowheads in Figure 3A) was responsible for the formation of linear arrays of nanoparticles, given that tracers stalled their motion once they reached the pattern apex. Interestingly, this dynamics is reminiscent of the assembly mechanism described by Deegan et al.² for the formation of ring patterns after coffee droplet evaporation. The increased rate of evaporation close to the apex of the motifs (vertical arrows in Figure 3E, left panel), which is due to the thinning of the water layer at the solid/liquid contact line, is compensated for by a flow that conveys the nanoparticles to the tip of the reliefs (black arrow in Figure 3E, left panel), thus suggesting that the physical phenomenon responsible for directed assembly is evaporation in the case of dry gels.

The motion of 1 μm tracers deposited on fresh gels was subsequently recorded. As in the case of dry gels, longitudinal flows attributed to large-scale fluid equilibration were observed (arrowheads in Figure 3B). In addition, water evaporation on fresh gels was associated with the formation of a meniscus, which receded toward the motifs (orange dashed lines in Figure 3B). This receding efficiently dragged tracers to the lower edge of the patterns (orange arrowheads in Figure 3C) and was thus

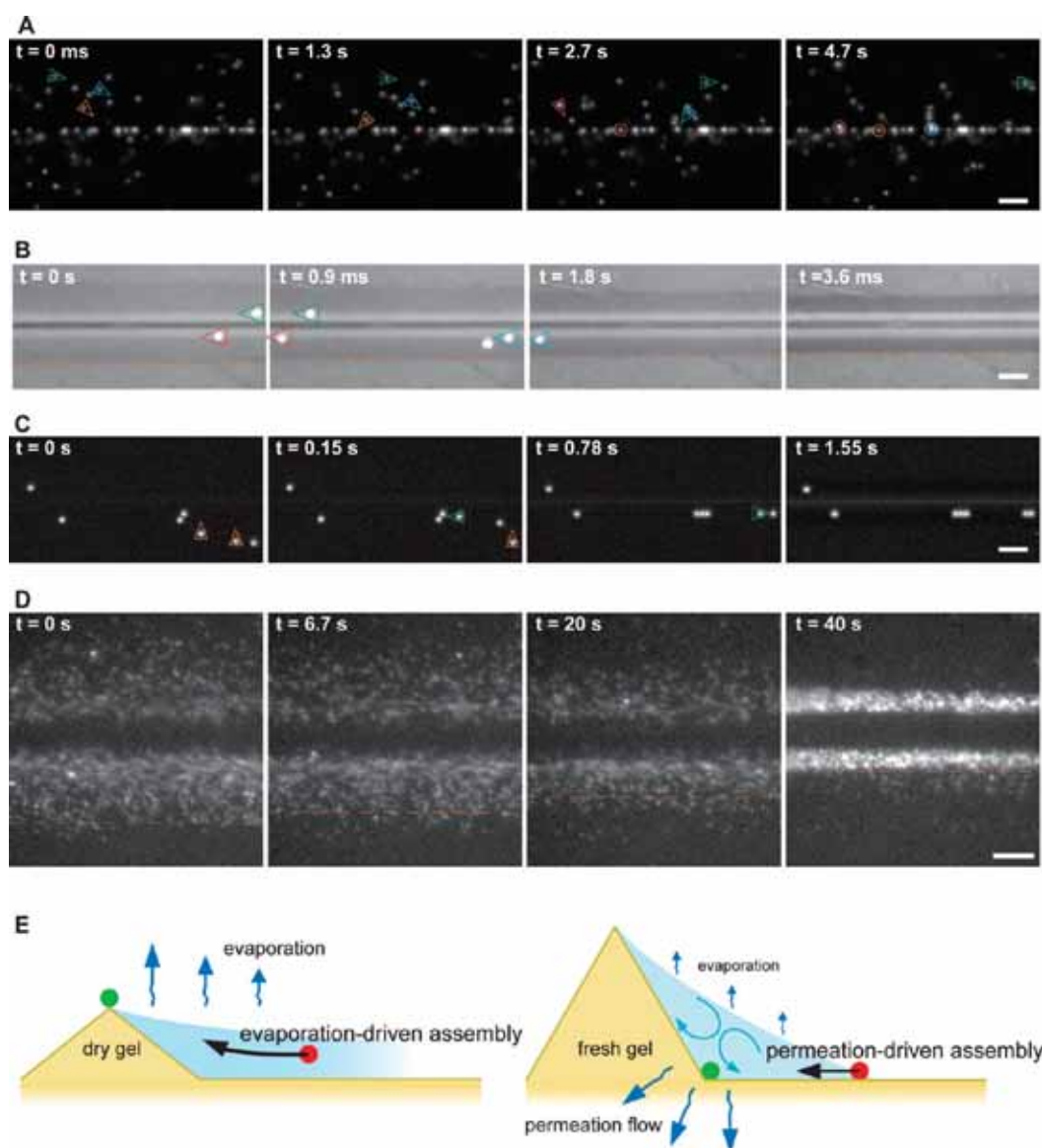


Figure 3. Real-time observation of the assembly process. (A) Time lapse imaging of 100 nm tracers deposited on dry gels, showing that directed assembly occurs owing to the presence of transverse flows that convey the particles toward the motif apex, where they remain trapped in linear arrays (red, orange, and blue triangles highlight particles and their direction of motion). (B) Selected images of a time-lapse recording of fluorescent $1\ \mu\text{m}$ particles in the course of water evaporation. Beads and their motion are represented by colored arrowheads that depict their successive positions in the sequence and their direction. The receding of water, which is directed toward the reliefs, is simultaneously observed by white-light transmission (orange dashed lines indicate the meniscus contact line). (C) Assembly dynamics of $5\ \mu\text{m}$ tracers, which are conveyed perpendicularly and then longitudinally with respect to the motif axis (orange and green arrowheads, respectively). (D) Tracers (100 nm each) deposited on a fresh hydrogel remain in suspension in the receding water meniscus. (The contact line is depicted by orange dashed lines.) (E) Right and left panels schematize evaporation-driven and permeation-driven assembly mechanisms observed on dry and fresh gels, respectively. Particles (red circles) are directed to determined positions, which are marked by green circles, by capillary flow, or receding forces (black arrows). Note that water evaporation also occurs in the case of fresh hydrogels, but this phenomenon appears to be negligible in comparison to permeation inside the gel. Scale bars = $20\ \mu\text{m}$.

responsible for the assembly of two linear arrays per hydrogel pattern. Pearl necklaces of particles (inset in Figure 2A) were eventually formed owing to longitudinal flows that conveyed the tracers along the lower edge of the motifs until they collided with static ones (green arrowheads in Figure 3C). Interestingly, the assembly on textured PDMS substrates was characterized by a similar dynamics that was driven by the receding of particles to the bottom of the patterns (data not shown). The assembly

dynamics of smaller 100 nm tracers was subsequently monitored, showing that these particles continued to flow in the liquid as evaporation proceeded and that they were conveyed to the bottom of the patterns by the receding meniscus (Figure 3D). We therefore conclude that the receding meniscus exerts the dragging force for directed assembly on fresh hydrogels. We envision that the receding of water toward the patterns of hydrogels is related to permeation flows oriented inward the gel, which are

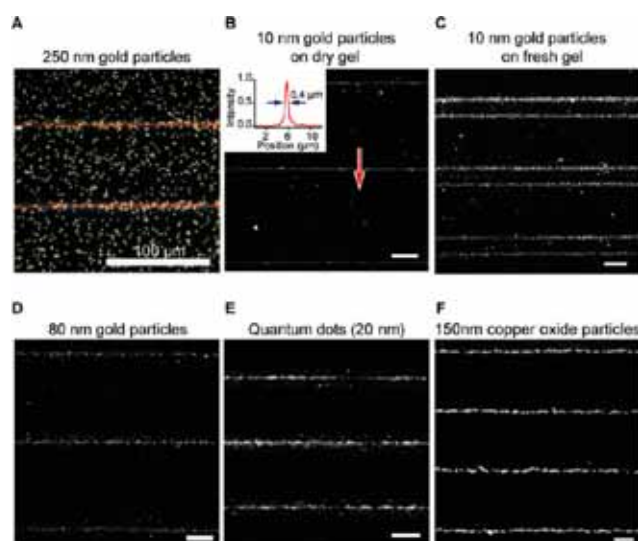


Figure 4. Fabrication of linear arrays of metallic nanoparticles. (A) When deposited on fresh or dry V-shaped hydrogels, 250 nm gold nanoparticles cannot be organized in linear arrays, as inferred from their random distribution observed by dark-field microscopy. (B, C) After hydrogel degradation (see the Experimental Section and Supporting Information Figure S2 for surface characterization by energy-dispersive X-ray analysis), dark-field micrographs show that 10 nm gold colloids accumulate at the apex or the bottom of V-shaped reliefs for dry or fresh hydrogels, respectively. (See the electron micrograph of these linear arrays in Supporting Information Figure S1.) Our technology is also applicable to (D) 80 nm gold nanoparticles, (E) ~ 20 nm quantum dots, and (F) ~ 150 nm copper oxide, as inferred from dark field or fluorescence micrographs. (See Supporting Information Figure S1 for the copper oxide nanoparticle size characterization.) Note that 80 nm gold tracers were not assembled in linear arrays using PDMS textured substrates (not shown). Scale bar = $20\ \mu\text{m}$, unless otherwise mentioned.

likely due to the strong affinity of hydrogels for water (blue arrows in Figure 3E, right panel). The existence of this permeation flow is strongly supported by the observation of rotational flows in the course of water evaporation (circular blue arrows in Figure 3E and Supporting Information Video 1). We therefore propose to coin this assembly mechanism “permeation-driven assembly”. Permeation flows also occur in PDMS,¹⁸ likely accounting for the similar assembly dynamics observed with this material.

Permeation-driven assembly is reminiscent of capillary assembly as described in ref 8, yet with the notable difference that our pathway is spontaneous and does not require operator-driven moving menisci. Interestingly, permeation flows have been disregarded in capillary assembly,⁸ although they should act cumulatively with capillary forces to convey particles to the grooves imprinted in PDMS substrates.

We then decided to move one step ahead and apply this technology to organize metallic nanoparticles in linear arrays.

2.4. Linear Arrays of Metallic Particles. Nanoscale materials, as defined by their common length scales of between 1 and 100 nm, are known to exhibit significantly different physical, chemical, electrical, and optical properties compared to their properties on the macroscale, which motivated considerable research effort over the past 10 years because of their potential broad spectrum of applications, including sensing, catalysis, nanoelectronics, and energy. Gold nanoparticles, which can be

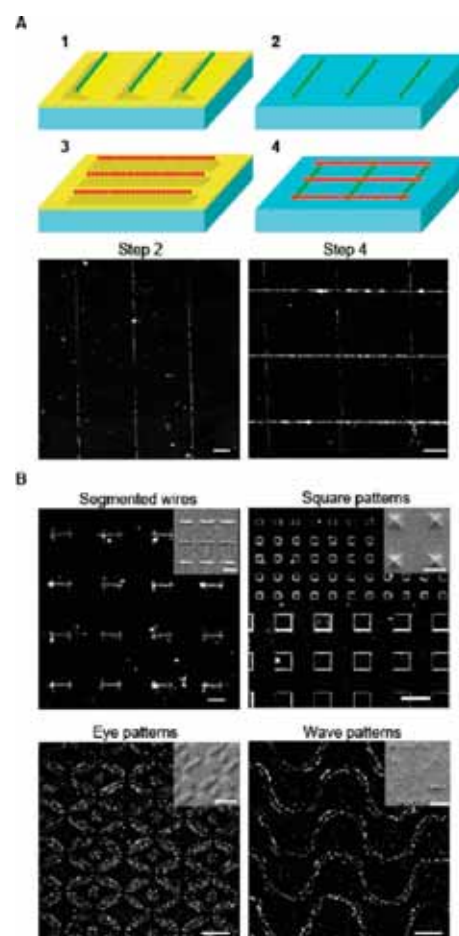


Figure 5. Generation of complex arrays of particles. (A) The upper panels depict the iterative process for grid pattern fabrication, and the corresponding dark-field micrographs in the lower panel represent the arrangement of 10 nm particles during two steps of the process. (B) Microparticles and nanoparticles can also be organized along segmented wires, 2D square arrays, eye motifs, or tortuous lines using hydrogels textured with segmented V-reliefs, pyramids, eye-shaped patterns, or wave patterns (upper-left, upper-right, lower-left, and lower right panels, respectively). Insets show electron micrographs of hydrogel patterns. Note that hydrogels were degraded by oxygen plasma for the observation of 20 nm gold particles by dark-field microscopy. Scale bars = $20\ \mu\text{m}$.

synthesized with exquisite control over their sizes, have been extensively manipulated in particular for their optical properties¹⁹ and used as model objects for directed assembly.⁹ The potential of textured hydrogels for metallic nano-object integration was therefore validated by depositing gold colloids with diameters spanning 10 to 250 nm.

After water evaporation, 250 nm gold nanoparticles were randomly distributed either on fresh or dry hydrogels (Figure 4A), suggesting that hydrodynamic forces were negligible in comparison to gravitation as a result of the much greater density of gold. This interpretation is somewhat supported by the poor assembly of $3\ \mu\text{m}$ magnetic polymer particles (Supporting Information Figure S1), which are only ~ 15 times denser than those in a polymer (density of 1.7 vs 1.05, respectively, according to manufacturer specifications). Next, 20 and 10 nm gold tracers, which stably float in water because Brownian random forces are dominant

on this length scale (sedimentation and Brownian forces balance for 50 nm gold particles, as inferred from their Péclet number²⁰), were deposited on dry or fresh gels, and despite their high densities, they were organized in one or two linear arrays per relief, respectively (Figure 4B,C and Supporting Information Figure S1). Interestingly, the lateral breadth of the linear arrays was submicrometric at $\sim 0.4 \mu\text{m}$, as inferred from dark-field micrograph image analysis (inset in Figure 4B). These performances outperform inkjet printing, which typically allows us to generate $10 \mu\text{m}$ patterns,²¹ and they are comparable to recent assembly methods based on moving contact lines.⁵

Finally, experiments were carried out with gold tracers of 80 nm, with this size corresponding to the range for which Brownian and gravitation forces balance, and single linear arrays were detected on dry gels with broader lateral widths than with 10 nm beads (Figure 4D). The versatility of the technology was further validated by directing the assembly of 30 nm quantum dots (Figure 4E) as well as ~ 150 nm copper oxide nanoparticles (Figure 4F). Overall, we demonstrate that linear arrays of virtually any metallic colloids smaller than ~ 100 nm can be generated very reliably with our technology, and we set out to investigate whether complex patterns could also be generated.

2.5. Generation of Complex Patterns. We first examined the possibility of fabricating grid patterns of gold nanoparticles by the iterative assembly of linear arrays. After a standard assembly protocol (Figure 5A), 20 nm gold particles were transferred to the silicon substrate by hydrogel selective etching using oxygen plasma (Experimental Section), and a V-shaped hydrogel was formed de novo (step 3 in Figure 5A) to organize a second layer of gold particles perpendicular to the first one. Interestingly, beyond the demonstration of the repeatability of our technology, this procedure could be applied to nanoparticles of different compositions in order to increase the degree of complexity of the resulting architectures further.

Hydrogels textured with 2D arrays of segmented V reliefs were subsequently produced and dried to serve as templates for the directed assembly of 10 nm gold nanoparticles. These tracers were expectedly organized at the apex of the patterns, thus forming regular arrays of finite wires (left panel in Figure 5B). We next fabricated hydrogel arrays composed of pyramids or circular shapes surrounded by four smooth boundaries and attempted to assemble $1 \mu\text{m}$ polymer particles at the lower edge of these patterns. The resulting 2D square patterns or “eye” motifs (middle and right panels of Figure 5B, respectively) demonstrate the diversity in structural output of our technology.

2.6. Transfer and Application to Bioassays. One drawback of our technology comes from the fact that assembled particles lie on hydrogels, which do not constitute relevant templates for microsystems applications. We therefore set out to establish protocols to transfer printed particles from the gel to conventional substrates. As described in the previous paragraph, gold nanoparticles can be transferred to the gel substrate by selectively etching it with oxygen plasma. (See Supporting Information Figure 2 for surface characterization after plasma treatment by energy-dispersive X-ray analysis.) Contact printing,^{22–24} which consists of transferring the particles to the desired template by conformal contact and is readily adapted to pick-and-place technologies, is an alternative solution that seems well suited to hydrogels given their well-characterized antifouling properties. Surprisingly, however, beads assembled on PAM hydrogels remained firmly bound to this surface, whereas organic or inorganic particles organized on PEG templates could readily be transferred by direct manual

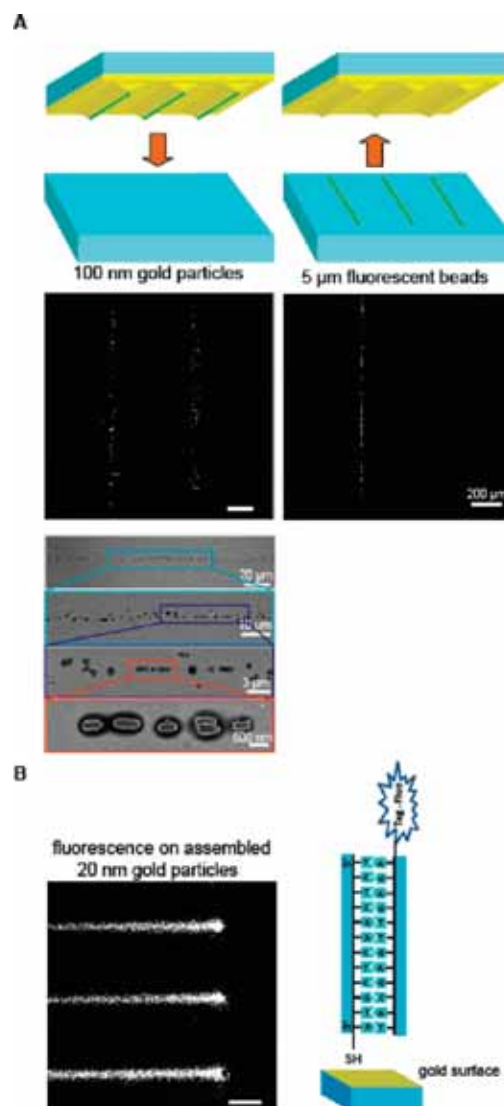


Figure 6. Transfer of particles and characterization of their surface properties for bioassays. (A) The upper panels show the process used to transfer particles from hydrogel surfaces to glass or silicon substrates, and the lower panels are dark-field and fluorescence micrographs of linear arrays of 20 nm gold and $5 \mu\text{m}$ polymer particles (left and right images, respectively). These linear arrays were also observed by electron microscopy at different magnifications (lower panel). (B) Arrays of 10 nm particles transferred on silicon by plasma etching are incubated with tailored DNAs, as schematized in the inset, and the fluorescence micrograph indicates that DNAs were successfully coupled to the beads. Scale bars = $20 \mu\text{m}$, unless otherwise mentioned.

contact to glass, silicon, and aluminum substrates at room temperature (Figure 6A,B). Interestingly, this simple, generic transfer procedure is an advantage of our technology because it avoids complex surface modifications with silane or polymers and thermal heating.^{9,22}

Gold nanoparticles are unique objects for biotechnology because of their excellent stability under aqueous conditions and their straightforward surface modification via thiol moieties.²⁵ These properties have been extensively exploited to coat their surfaces with single-/double-stranded DNA²⁶ or proteins,²⁷ and we wished to test whether these particles remained functional,

once assembled and transferred. Linear arrays of gold nanoparticles were thus soaked in a solution containing DNA molecules modified with one thiol group and one fluorophore (Figure 6B). After thorough rinsing, a specific fluorescence signal was detected on particles transferred by plasma (Figure 6B) and by direct contact (data not shown). The absence of a signal for fluorescent DNAs with no thiol moieties showed that DNA coupling was not mediated by nonspecific interactions (data not shown) and proved that integrated gold nanoparticles were still functional for bioassays.

3. CONCLUSIONS

A simple, versatile technology for the fabrication of textured hydrogels by micromolding has been presented. The resulting templates have been shown to be relevant to the assembly of microparticles and nanoparticles over large surfaces and along patterns of different complexities. The assembly mechanism has been uncovered, showing a novel permeation-driven mechanism. We finally showed that assembled particles could be transferred and integrated into alternative templates while retaining their properties for bioassays. Interestingly, the spontaneous nature of this assembly mechanism, which does not necessitate control over temperature and humidity conditions, makes it an ideal tool for nano-object integration in research laboratories. Moreover, our approach does not involve the use of complex surfactant mixtures,⁹ which are required in contact-line assembly to monitor solid–liquid interfacial properties and which may interfere with the surface properties of nanoparticles, in particular, those of bioassays given that most surfactants are deleterious to proteins. Notably, one constraint of directed assembly on textured hydrogels arises from the fact that it is limited to nanoparticles that are soluble in water, and in order to extend the applicability of our technology, it would be useful to explore the potential of directed assembly on textured hydrophobic gels (organogels) that are swelled in volatile solvent.

Despite its simplicity and versatility, our approach does not achieve single-particle resolution. Rather, it is adapted to the large-scale production of structural patterns of a few micrometers separated by $\sim 10\ \mu\text{m}$. This limitation should not dramatically limit its applicability because the integration of nano-objects on the micrometer scale is largely sufficient to assess their potential as functional compounds in new nanosystems.²⁸ Moreover, we posit that our assembly technology can be used in combination with conventional micromachining in order to devise millimeter-scale interconnexions that can be linked to nanoparticles arrays. In another direction, it would be interesting to combine our assembly process with DNA-based nanofabrication, which consists of using DNA strand interactions to direct the nanoscale assembly of nano-objects.²⁹ Because we demonstrated that linear arrays of particles can be coated with DNA, these structures could in turn be used as a structural layer to form homogeneous or heterogeneous nanoparticle assemblies. Finally, the degree of complexity of the technology could be increased with polymer chemistry, which enables us to generate multifunctional templates bearing structural, chemical, or photoreactive patterns.³⁰ Heterogeneous patterns could then be obtained by combining hydrodynamically directed assembly with spatially controlled binding reactions using copolymers composed of acrylamide and acrylic acid, which contain carboxyl groups that can be activated for coupling to proteins.³¹ These future developments in terms of nanoparticle manipulation and hydrogel chemistry

will allow us to provide a complete toolbox for nano-object integration that is easily accessible to academic laboratories.

4. EXPERIMENTAL SECTION

Unless stated, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

4.1. Silicon Mold Fabrication. Silicon molds were obtained by potassium chloride wet etching, as described in ref 32. They were subsequently covered with 100 nm of gold to obtain hydrophilic and antifouling surfaces that were frequently cleaned by oxygen plasma (800 W, 5 min on a TEPLA 300).

4.2. Substrate Surface Silanization. Glass slides, silicon wafers, or metallic surfaces were modified over 12 h with 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate diluted to 1% in trichloroethylene. After being thoroughly rinsed, functionalized templates were dried at 200 °C for 30 min and stored at room temperature in a dry environment.

4.3. Hydrogel Fabrication and Etching. For PAM hydrogels, 50 μL of 10 or 4% acrylamide/bis-acrylamide solution (29:1) was complemented with 0.5% *N,N,N,N*-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) and 0.2% ammonium persulfate (APS) dissolved in water and deposited on silanized surfaces. PEG hydrogels were obtained using 5% homobifunctional PEG molecules (PEG-diacrylate, $M_w = 700$) dissolved in water complemented with 0.5% *N,N,N,N*-tetramethyl-ethylenediamine and 0.2% ammonium persulfate. After polymerized hydrogels were extensively rinsed in water to remove excess monomers, TEMED, and APS, dry textured hydrogels were eventually etched by oxygen plasma for 15 min at 800 W using a TEPLA 300.

4.4. Microparticles and Nanoparticles. Microparticles and nanoparticles were diluted 100- to 10 000-fold in water before each experiment, and 20 μL of this solution was deposited on textured hydrogels. CuO nanoparticles were dispersed in water complemented with 0.05% Tween-20 and sonicated for 5 min at 500 W. In some cases, their sizes and their surface potential were monitored by dynamic light scattering (ZetaSizer, Malvern).

4.5. Optical and Electron Microscopy. Fluorescence and dark-field microscopy experiments were carried out with a Zeiss Axio-Observer, which was equipped with an Andor EM-CCD camera and one 20 $\times$ dark-field or 100 $\times$ (NA = 1.3) objective. Electron microscopy was performed with a Hitachi S4800 at 3 keV and 2 μA .

4.6. Image Analysis. After background intensity subtraction, the total number of particles in the field of view and the number of particles assembled on the patterns can be determined by measuring the total intensity and the intensity on the patterns, respectively. The resulting ratio of these quantities, R , is expected to be lower than 1 but strictly greater than zero even in the case of randomly distributed particles, although this situation corresponds to an unsuccessful assembly. To compensate for this artifact, the assembly efficiency A takes into account the pattern of the total surface ratio (S_t/S_p):

$$A = \frac{R - \frac{S_p}{S_t}}{1 - \frac{S_p}{S_t}} \quad (1)$$

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. SEM of 10 nm gold nanoparticle linear arrays transferred to silicon, 2.7 μm magnetic beads assembled on fresh gel, and the CuO particle size distribution. The surface potential of different nanoparticles. Energy dispersive X-ray analysis after oxygen plasma etching. Video 1: rotational motion of 1 μm particles during water evaporation. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: abancaud@laas.fr.

■ ACKNOWLEDGMENT

Q. H. thanks the ANR for funding (program JC08_341867), and F.S. and Y.V. thank the DGA for funding. We thank P. Joseph and T. Leichley for critically reading the manuscript.

■ REFERENCES

- (1) Grzelczak, M.; Vermant, J.; Furst, E. M.; Liz-Marzàn, L. M. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3591–3605.
- (2) Deegan, R. D.; Bakajin, O.; Dupont, T. F.; Huber, G.; Nagel, S. R.; Witten, T. A. *Nature* **1997**, *389*, 6653–6655.
- (3) Govor, L. V.; Reiter, G.; Parisi, J.; H., B. G. *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2004**, *69*, 061609.
- (4) Prevo, B. G.; Velez, O. D. *Langmuir* **2004**, *20*, 2099–2107.
- (5) Huang, J.; Tao, A. R.; Connor, S.; He, R.; Yang, P. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 524–529.
- (6) Yin, Y.; Lu, Y.; Gates, B.; Xia, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8718–8729.
- (7) Cui, Y.; Björk, M. T.; Liddle, A.; Sönnichsen, C.; Boussert, B.; Alivisatos, A. P. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1093–1098.
- (8) Malaquin, L.; Kraus, T.; Schmid, H.; Delamarche, E.; Wolf, H. *Langmuir* **2007**, *23*, 11513–11521.
- (9) Kraus, T.; Malaquin, L.; Schmid, H.; Riess, W.; Spencer, N. D.; Wolf, H. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 570–576.
- (10) Feldman, K.; Hähner, G.; Spencer, N. D.; Harder, P.; Grunze, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10134–10141.
- (11) Kingshott, P.; McArthur, S.; Thiessen, H.; Castner, D. G.; Griesser, H. J. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4775–4785.
- (12) Viovy, J.-L. *Rev. Mod. Phys.* **2000**, *72*, 813–872.
- (13) Schmalzing, D.; Piggee, C. A.; Poret, F.; Carrilho, E.; Karger, B. L. *J. Chromatogr. A* **1993**, *652*, 149–159.
- (14) Berg, M. C.; Yang, S. Y.; Hammond, P. T.; Rubner, M. F. *Langmuir* **2004**, *20*, 1362–1368.
- (15) Kobel, S.; Limacher, M.; Gobaa, S.; Laroche, T.; Lutolf, M. P. *Langmuir* **2009**, *25*, 8774–8779.
- (16) Khademhosseini, A.; Langer, R. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5087–5092.
- (17) Balci, S.; Leinberger, D. M.; Knez, M.; Bittner, A. M.; Boes, F.; Kadri, A.; Wege, C.; Jeske, H.; Kern, K. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2195–2200.
- (18) Randall, G. C.; Doyle, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 10813–10818.
- (19) Jennings, T.; Strouse, G. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *620*, 34–47.
- (20) Happel, J.; Brenner, H. *Low Reynolds Number Hydrodynamics: with special applications to particulate media (Mechanics of Fluids and Transport Processes)*; Springer: New York, 1983.
- (21) Smith, P. J.; Shin, D.-Y.; Stringer, J. E.; Derby, B. *J. Mater. Sci.* **2006**, *41*, 4153–4158.
- (22) Kraus, T.; Malaquin, L.; Delamarche, E.; Schmid, H.; Spencer, N. D.; Wolf, H. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2438–2442.
- (23) Horn, A.; Hilt, S.; Fery, A.; Böker, A. *Small* **2010**, *6*, 2122–2125.
- (24) Hyun, D. C.; Moon, G. D.; Cho, E. C.; Jeong, U. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 2155–2162.
- (25) Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1307–1315.
- (26) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature* **1996**, *382*, 607–609.
- (27) Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Daniel, W. L.; Massich, M. D.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3280–3294.
- (28) Pech, D.; Brunet, M.; Durou, H.; Huang, P.; Mochalin, V.; Gogotsi, Y.; Taberna, P.-L.; Simon, P. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 651–654.
- (29) Tanaka, K.; Shionoya, S. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2732–2742.
- (30) Taeymans, D.; Wood, J.; Ashby, P.; Blank, I.; Studer, A.; Stadler, R. H.; Eijck, P.; Lalljie, S.; Lingnert, H.; Lindblom, M.; Matissek, R.; Mäler, D.; Tallmadge, D.; O'Brien, J.; Thompson, S.; Silvani, D.; Whitmore, T. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 323–347.
- (31) Martensson, K.; Mosbach, K. *Biotechnol. Bioeng.* **1972**, *14*, 715–724.
- (32) Hajjoul, H.; Kocanova, S.; Lassadi, I.; Bystricky, K.; Bancaud, A. *Lab Chip* **2009**, *9*, 3054–3058.

Efficient prototyping of large-scale pdms and silicon nanofluidic devices using pdms-based phase-shift lithography

Y. Viero · Q. He · L. Mazenq · H. Ranchon ·
J. Y. Fourniols · A. Bancaud

Received: 28 April 2011 / Accepted: 7 July 2011 / Published online: 13 October 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract In this study, we explore the potential of polydimethylsiloxane (PDMS)-based phase-shift lithography (PPSL) for the fabrication of nanofluidic devices. We establish that this technology, which was already shown to allow for the generation of 100 nm linear or punctual features over squared centimeter surfaces with conventional photolithography systems, is readily adequate to produce some of the most popular nanofluidic systems, namely nanochannels and nanoposts arrays. We also demonstrate that PPSL technology enables to generate PDMS and silicon nanofluidic systems. This technological achievement allows us to perform single DNA molecule manipulation experiments in PDMS and silicon nanochannels, and we observe an unexpectedly slow migration of DNA in PDMS devices, which is independent on salt or pH conditions. Our data in fact hint to the existence of an anomalous response of DNA in PDMS nanofluidic devices, which is likely associated to transient nonspecific interactions of DNA with PDMS walls. Overall, our work

demonstrates the efficiency and the performances of PPSL for prototyping nanofluidic systems.

1 Introduction

In the last decade, a large number of functionalities have been miniaturized in microfluidic systems to perform complex chemical or biochemical procedures with enormous benefits in cost, reduced sample volumes, and improved performances (Sanders and Manz 2000; Reyes et al. 2002). The ambition to downscale microfluidic operations in nanoscale devices has led to the emergence of nanofluidics, which consists in performing analytical operations with systems composed of structures of ~ 100 nm or less (Mawatari et al. 2010; Piruska et al. 2010). Nanofluidic systems offer a unique potential in analytical sciences because separation operations can be performed in matrices tailored at the nanoscale, enabling to achieve some of the most impressive separation efficiencies (Kaji et al. 2004). Moreover, the confined geometry of nanofluidic systems allows monitoring the environment of single molecules, and the conformation of single DNA molecules was successfully manipulated inside nanochannels (Reisner et al. 2005; Tegenfeldt et al. 2004).

The rapid breakthrough of microfluidics largely relied on the huge fabrication toolbox that was invented for microsystems processing, but the development of nanofluidics has been hampered by the difficulty of fabricating nanostructures due to the cost and the poor accessibility of nanofabrication equipments (Whitesides 2011). For example, electron beam lithography (EBL) is the most commonly used nanofabrication technology (Fontana et al. 2002), as it achieves exquisite spatial resolutions, but it is a slow process because nanopatterns are imprinted by point-by-point serial

Y. Viero and Q. He contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10404-011-0888-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Y. Viero · Q. He · L. Mazenq · H. Ranchon ·
J. Y. Fourniols · A. Bancaud (✉)
LAAS, CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche,
31077 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: abancaud@laas.fr

Y. Viero · Q. He · L. Mazenq · H. Ranchon ·
J. Y. Fourniols · A. Bancaud
UPS, INSA, INP, ISAE, UT1, UTM, LAAS,
Université de Toulouse, 31077 Toulouse Cedex 4, France

exposures. Moreover, the typical write field for an e-beam of 1 mm^2 is relatively small for a separation device (Dorfman 2010), and larger write-fields are possible using a step-and-repeat method, albeit the possibility of stitching errors. Nanoimprint lithography (NIL), which has been developed in the middle of the 90 s and has been shown to be adapted to fabricate 25 nm features (Chou et al. 1995), is one popular alternative to EBL. Although clearly relevant to mass production, NIL is not ideal for prototyping given the need to fabricate a mold by e-beam patterning. Consequently, there is a clear need for alternative methods for prototyping nanofluidic systems, as exemplified by the recent report on nanopost arrays fabrication based on conventional photolithography (Ou et al. 2011).

In this article, we demonstrate that PDMS-based phase-shift lithography (PPSL) is a useful technology for a broad range of applications in nanofluidics phase-shift lithography, which was initially pioneered by (Rogers et al. 1997), relies on a PDMS phase mask that is obtained by conventional photolithography. By exposing a photoresist through this mask, 100 nm linear or punctual features have been generated, and optimal performances with 50 nm patterns were achieved using hard-PDMS [h-PDMS, a formulated PDMS with a fivefold increased Young modulus (Schmid and Michel 2000)]. This technology was already applied to generate optical polarizers (Rogers et al. 1997), nanowells to accommodate individual NaCl crystals (Odom et al. 2002), or high-frequency surface acoustic wave transducers (Hesjedal and Seidel 2003). The relevance of PPSL for nanofluidic devices fabrication yet remains to be demonstrated, and we provide different solutions for the integration of $\sim 100 \text{ nm}$ PPSL features in functional nanofluidic systems made out of silicon or PDMS. Single DNA manipulation experiments are subsequently conducted in our nanochannels and nanoposts arrays with exquisite signal to noise ratio at the single molecule level. The electrophoretic response of DNA in PDMS versus silicon nanochannels is specifically investigated, showing an unexpectedly slow mobility in PDMS likely associated to nonspecific interaction between PDMS and DNA. Overall, we posit that PPSL offers a great technological solution for nanofluidics, and it is particularly relevant to overcome the technological bottleneck, which has slowed down innovation rate in nanofluidics.

2 Phase-shift photolithography: general principles

2.1 Principle

PPSL aims to fabricate nanometric patterns with conventional photolithography. It relies on a transparent PDMS phase mask, which is composed of periodically distributed

surface air gaps (Fig. 1a). As light passes through this mask, its intensity is modulated in the near field due to the phase shifting at the PDMS/air regions (Rogers et al. 1998). This phase shift can be modulated by adjusting the thickness of the patterns imprinted on the mask according to:

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} h \times (n_{\text{PDMS}} - n_{\text{air}}) \quad (1)$$

with λ , h , and n the wavelength, the channel height, and the optical index, respectively. The intensity in the near field is reduced to zero as the phase shift is equal to an odd multiple of π . Thus, given the difference in optical index between PDMS and air of 0.33, and the peak absorption wavelength of a photoresist of $\sim 350 \text{ nm}$, the light intensity at the edges of the gaps is reduced to zero for $h \sim 500 \text{ nm}$. The light cancellation spans over a width on the order of one quarter of the wavelength of the light used for exposure, so that we expect to produce $\sim 90 \text{ nm}$ features with this technology.

2.2 Application to positive and negative tone photoresists

The master for the binary phase mask was fabricated by conventional photolithography of AZ1505 photoresist (AZ-Electronic Materials), and it consisted of periodic $4 \mu\text{m}$ linear patterns repeated every $8 \mu\text{m}$ (Fig. 1a). Note that we coated silicon wafers with an Hexamethyldisiloxane (HMDS) layer by vapor priming to promote adhesion of AZ1505. Unreticulated PDMS (Sylgard 184, Corning) was poured on these structures, and cured at 75°C during 3 h. The PDMS template was then peeled off, and manually brought into conformal contact with a silicon wafer coated with AZ1505 (prebake 30 s at 95°C , red layer in Fig. 1a). The photoresist with the phase shift mask was exposed with 75 mJ/cm^2 (h-line) using a conventional SUSS Microtech[®] Ma6 mask aligner, and subsequently developed during 20 s with AZ developer. Linear patterns of $\sim 200 \text{ nm}$ were obtained with this protocol (Fig. 1b, left panel), and smaller motifs of $\sim 100 \text{ nm}$ could be generated by reducing the prebake time to 20 s (Fig. 1b, right panel). Indeed a shorter (or colder) prebake is responsible for a higher concentration in residual solvent in the photoresist. As a result, the development rate increases, leading to a reduction in size of the patterns. Notably, these structures were imprinted over large surfaces of several cm^2 , so that one key benefit of PPSL stems from its capacity to generate very long features characterized by a length-to-width ratio of $\sim 10^4$ ($5 \text{ mm}/200 \text{ nm}$).

PPSL was also shown to allow for the fabrication of 2D arrays of nanoposts by means of two successive exposures along different directions (Rogers et al. 1997). Each exposure indeed imprints one array of parallel lines on the

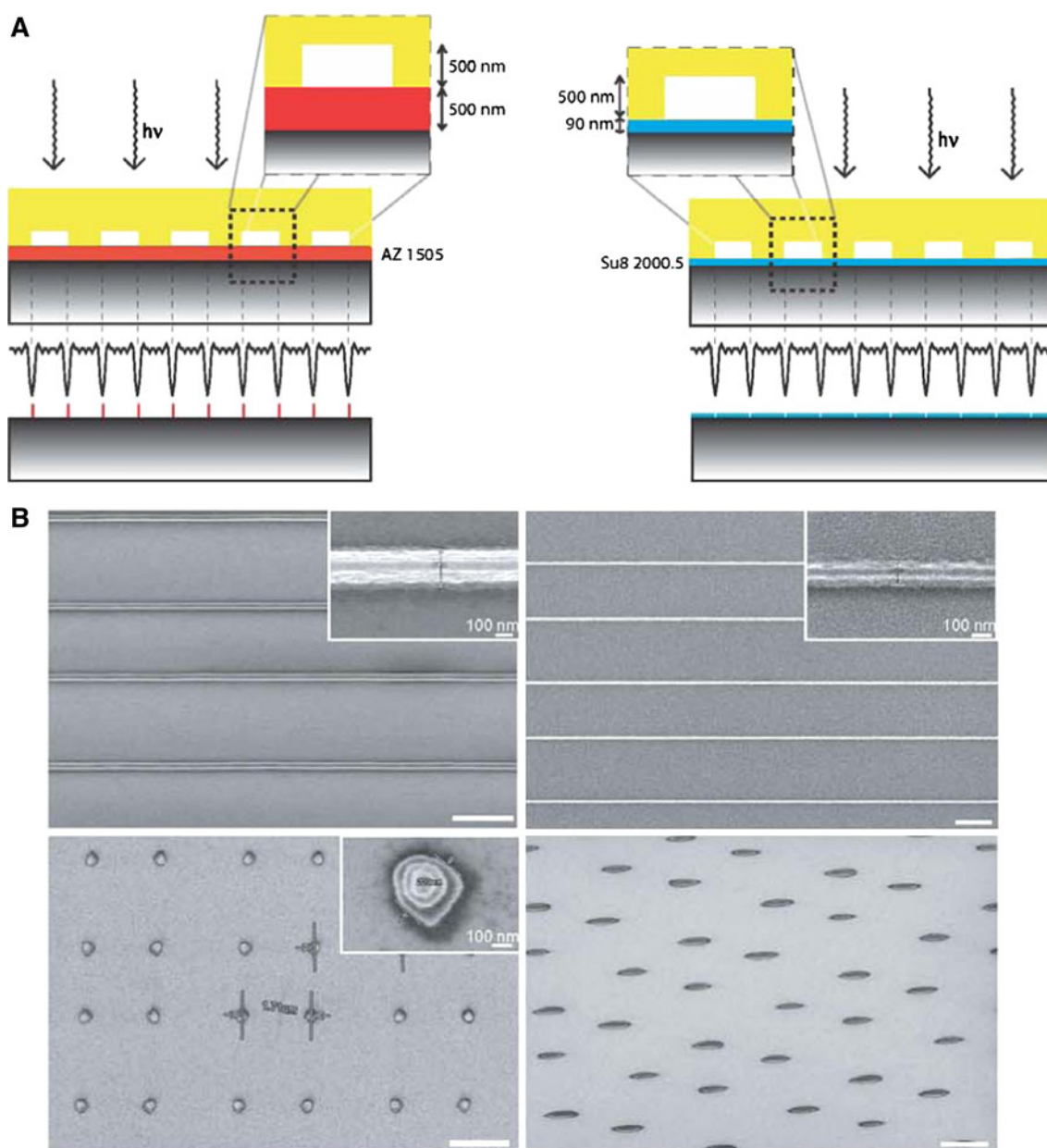


Fig. 1 Principle and results of PDMS-based phase-shift lithography. **a** This figure sketches the principle of PPSL, highlighting the dimensions of the PDMS phase mask as well as the photoresist thickness. **b** The upper panels show scanning electron micrographs of 200 and 100 nm PPSL AZ 1505 linear features on silicon wafers. The

lower panels represent scanning electron micrographs of 200 nm punctual patterns of AZ1505 with cylindrical and ovoid geometries, which are obtained by two consecutive exposures with two different angular shifts (90° and 30°, respectively). Scale bars = 2 μm, unless mentioned

photoresist, and the intersections between these lines define punctual unexposed features. Interestingly, by choosing the angular shift between the exposures and the dose of illumination from 30–50 mJ/cm² with the Ma6 mask aligner, the size and the geometry of the posts could be tuned down to sizes of 120 nm (Fig. 1b). Note that the exact dose of illumination had to be calibrated every month to obtain optimal results. In addition to being low-cost and high-

throughput, the features produced with this technology were highly reproducible, as demonstrated by the standard deviation in size of less than 3% for 270 nm nanoposts, as inferred from structural inspection of individual nanoposts by electron microscopy (Supplementary Fig. S1).

We finally developed a protocol for PPSL of the negative tone photoresist SU8-2000.5 (Microchem Corp), which was spin coated at 4,000 rpm during 30 s with a

closed bowl to reach a minimal thickness of 90 nm (blue layer in Fig. 1a). After a prebake of 60 s at 95°C, the photoresist was exposed to 40 mJ/cm² (i-line) with an EVG® 620 mask aligner, post-baked during 30 s at 95°C, and eventually developed during 1 min in propylene glycol methyl ether acetate (PGMEA). This protocol allowed us to obtain 250 nm linear patterns, which could not be further reduced most likely because the post-baking step favors diffusion of reticulation agents, and thus broadens the resulting patterns, as described in (Odom et al. 2002).

Overall our results are similar to those published by Whitesides and colleagues, and we set out to devise fully integrated nanofluidic systems with PPSL.

3 Integration of PPSL features in nanofluidic devices

Nanofluidic devices are composed of macroscopic inlets/outlets, of microscopic fluidic connections that enable to convey molecules, and of functional nanoscale features. Their fabrication is thus based on multi-scale hierarchical processes that we describe in the following.

3.1 Transfer and connection of PPSL features

Let us first consider the simple case of nanopost arrays. PPSL patterns were transferred in silicon using standard Reactive Ion Etching (RIE) with an STS or an Alcatel system with CF₄, SF₆ and O₂ pressures at 1.3×10^{-3} mBar or 7.2×10^{-2} mBar and RF powers set to 450 W or 2,800 W, respectively. Etch rates were 9 nm/s and 22 nm/s for the STS and the Alcatel, respectively, as inferred from mechanical profilometry using a TENCOR profiler. Access holes were finally drilled through silicon by sand blasting using a 50 µm film of Laminar 5038 to protect micro and nanopatterns (Fig. 2a).

3.2 Fabrication of silicon nanochannels

Transferred PPSL nanochannels were connected to microfluidic channels, which were generated by conventional photolithography. Note that micro- and nanochannels were systematically connected because the arrays of nanochannels covered areas of several cm², and the typical distance between microchannels was much lower of ~500 µm (cartoon in Fig. 2b). The microchannels were etched by RIE over depths of ~2 µm (see inset of Fig. 2b for dimensions), and access holes were eventually drilled through silicon by sand blasting.

Note that for silicon devices dedicated to DNA electrophoretic manipulation, a thermal oxide layer of ~100 nm was eventually grown on silicon for electrical insulation (Jeong et al. 2001). This additional oxide layer is

expected to reduce the width of nanochannels by 100 nm while their depth should remain unchanged (Jeong et al. 2001).

3.3 Fabrication of a silicon master for PDMS molding

The generation of a master for PDMS molding required the development of a specific two-step process, starting with the etching of microchannels by RIE followed by the fabrication of nanochannels by PPSL (Fig. 2c). PPSL was thus performed on a textured substrate, which was not optimal for photoresist spin-coating, and for PDMS phase mask conformal contact. We indeed obtained poorly resolved PPSL features at the interface between micro- and nanostructures for 2 µm thick microchannels (Supplementary Fig. S2), and this artifact was significantly improved using 700 nm thick microchannels (Fig. 2c). Note that the width of microchannels was carefully adjusted to 30 µm in order to prevent the collapse of PDMS chip after molding (Zhou et al. 2005).

The resulting mold was immersed in trichloroethylene supplemented with 1% octadecyl-trichlorosilane during 5 min to obtain anti-fouling surfaces. Unreticulated h-PDMS was then spin coated on the mold at 1,000 rpm during 30 s to produce a 40 µm layer that was cured at 75°C during 45 min. Thirty grams of conventional PDMS prepolymer was subsequently poured on the wafer, and the baking was prolonged during 2 h at 75°C. The resulting double-layer PDMS replica, which is coined h-PDMS chip, thereafter, was peeled off, and holes were punched at the end of the each microchannels using a Harris uni-core punch kit. Note that the apparition of crackles on the PDMS surface was minimized by punching 24 h after peeling. The quality of nanochannels replication was eventually assayed by electron microscopy (Fig. 2d).

3.4 Sealing nanofluidic structures

After thorough cleaning of glass coverslips and h-PDMS chips with 95% saturated chromium trioxide mixture and isopropanol, respectively, glass and h-PDMS surfaces were activated using oxygen plasma during 2 min at 800 W, and 30 s at 200 W, respectively, before being placed in conformal contact. The bonding strength was enhanced by curing the resulting chip at 100°C during 20 min (Tang et al. 2006).

In the case of silicon devices, the standard sealing technique is anodic bonding, which involves large electric fields in combination with strong pressures. These conditions however turned out to be deleterious for nanoposts stability (not shown). Bonding was thus performed by spin-coating a 6 µm layer of h-PDMS on glass coverslips (4,000 rpm), which was cured at 75°C for 2 h, and then activated using the same protocol as for h-PDMS chip bonding. We checked by optical microscopy that

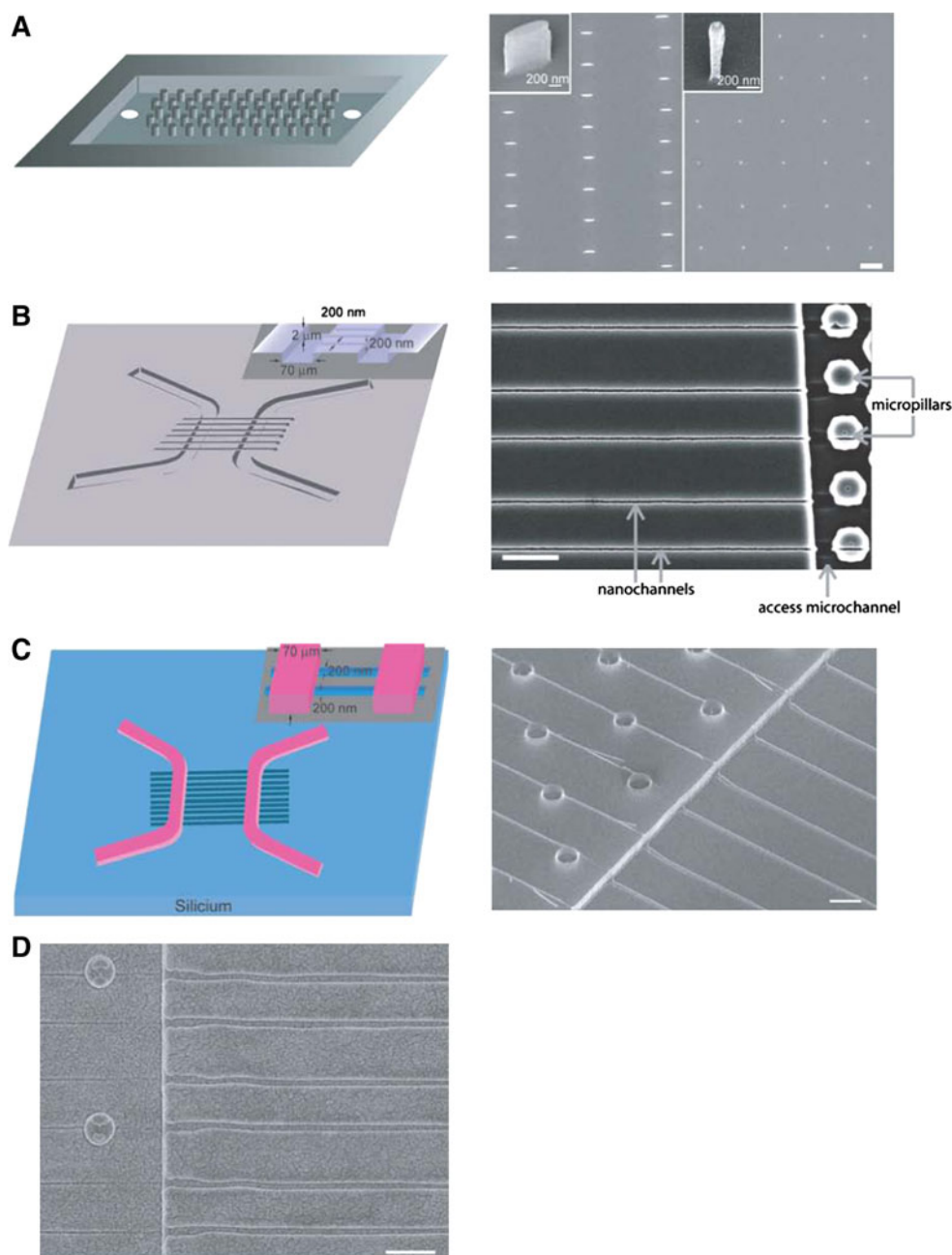


Fig. 2 Integration of PPSL features in functional nanofluidic systems. **a** Nanopost arrays of different geometries are observed by electron microscopy (*right panel*), and an artistic view of the device is represented in the *left panel*. Insets show tilted zooms of single elliptical (*left*) and cylindrical (*right*) nanopost. The height of these nanoposts is 800 nm. **b** The *left panel* depicts the integration strategy of silicon nanochannels, and the dimension of the resulting systems. The *right panel* is a scanning electron micrograph of the functional system. The width and the height of these nanochannels are 200 and 300 nm, respectively. **c** The mold for the fabrication of h-PDMS

nanochannels is schematized in the *left panel*, and imaged by scanning electron microscopy in the *right panel*. The width as well as the height of these nanochannels is 200 nm. **d** SEM of h-PDMS nanochannel chip, highlighting the sharp interface between microchannels (on the *left*) and nanochannels (on the *right*). Note that a 5-nm gold layer was deposited on PDMS to improve imaging conditions. *Scale bars* = 2 μ m. Note that micropillars were engraved in microchannels to facilitate the uptake of DNA molecules in nanochannels by unraveling their natural coiled conformation [cylindrical patterns in the micrographs of (**b**), (**c**), and (**d**)]

nanopillars remained intact after this process (not shown). Interestingly, because the PDMS layer is dissolved in 95% saturated chromium trioxide mixture at room temperature

during a few hours, silicon nanofluidic chips could be repeatedly cleaned and re-assembled for each new experiment.

4 Application to single DNA molecule manipulation

4.1 Methods

We wished to conduct single DNA molecule manipulation experiments with our nanofluidic devices. λ -DNA molecules fluorescently labeled with YOYO-1 (Molecular Probes) were prepared after careful titration of both species by absorbance spectroscopy at 260 and 488 nm. Two buffers, namely Tris–Borate–EDTA (TBE) [Tris–HCl 80 mM, Borate 80 mM, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 5 mM] or 100 mM phosphate buffers, were used at various dilutions and they were supplemented with 5% Dithiothreitol and 2.5% Poly-vinylpyrrolidone (PVP, MW 40 kDa) to reduce photo-induced damages, and to suppress nonspecific interactions and electro-osmotic flows, respectively. Note that the addition of higher concentration of PVP increases the buffer viscosity to a degree that prevents the complete filling of nanochannels, thus impeding the electric field to pass across the device.

Imaging was performed with a Zeiss epifluorescence microscope equipped with the 38HE filter set (Zeiss), and with a Lumencor Light Engine emitting at 475 nm with a 28 nm bandwidth and a power of 20 mW to reduce photobleaching (AAkerman and Tuite 1996). An ANDOR iXon-885 camera was used to observe single DNAs using a binning of 4×4 , and a pixel size of 0.33 μm . Exposure times varied from 10 to 30 ms depending on the requirements of the experiment. DNA manipulation was performed with pressure or electrophoretic actuation using a Fluigent® pressure manager in the range 5–1,000 mBar, or a GW INSTEK® power supply (1–100 V) connected to platinum electrodes directly immersed in the fluidic reservoirs, respectively.

4.2 Single molecule observations

We first checked that PPSL nanopost arrays were adapted to study the dynamics of DNA-nanopost interaction. The physics of the collision of λ -DNA with obstacles has been extensively worked out at the micron-scale, and more recently with smaller posts of ~ 500 nm (Kaji et al. 2004; Ou et al. 2011). Yet the subject remains sparsely studied for smaller sized cylindrical or elliptical obstacles. Using 200 nm cylindrical posts, we could investigate DNA unhooking dynamics at the single molecule level with exquisite temporal and spatial resolutions, as demonstrated by the time lapse of one individual collision event, and the time evolution of the molecule center of mass (Fig. 3a). In addition large numbers of molecules could be simultaneously observed with no detectable problems of clogging (inset in Fig. 3a), thus showing that our technology is compatible with systematic investigations of DNA-nanoposts interactions (Y.V. & A.B. in preparation).

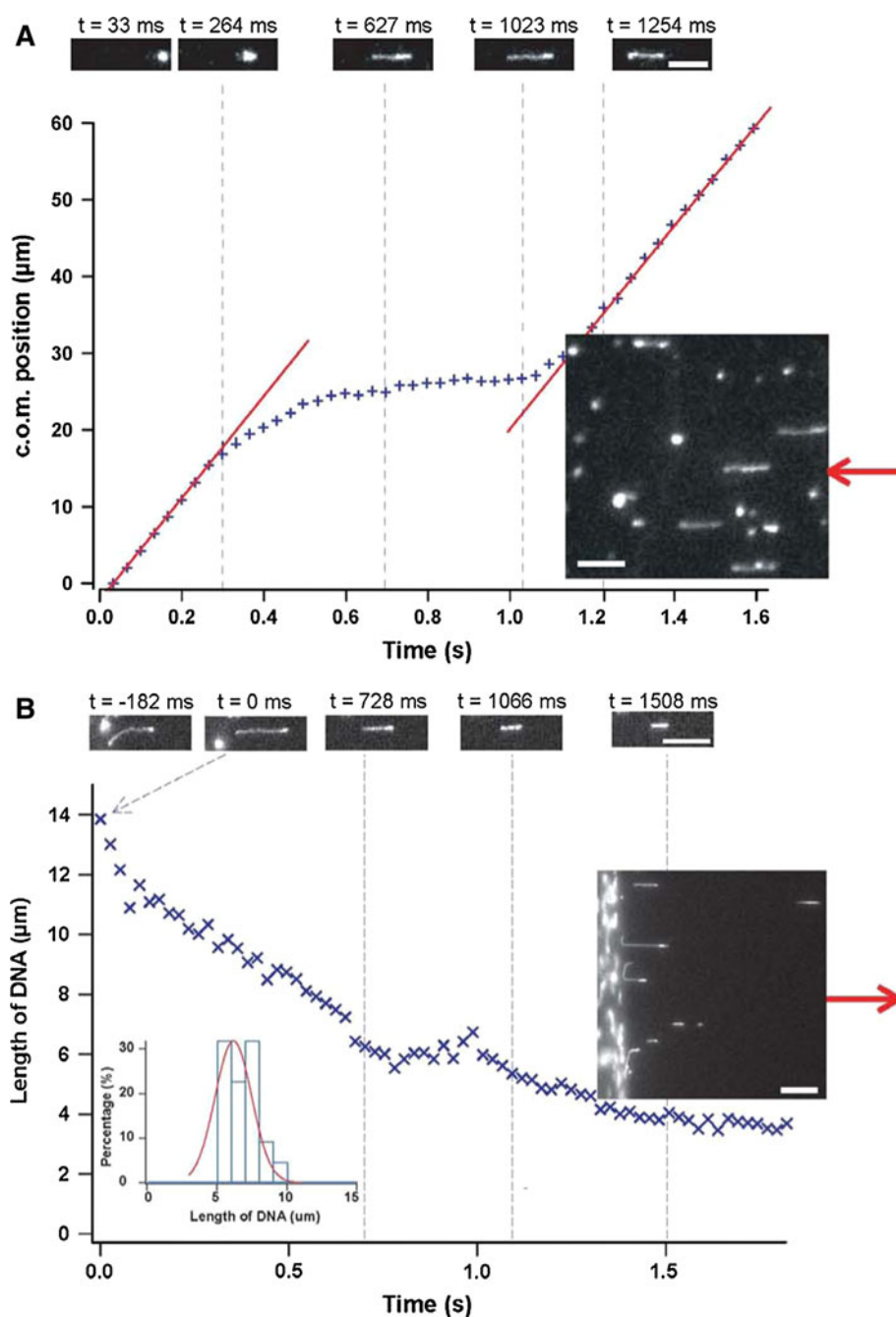
The functionality of h-PDMS and silicon nanochannels was subsequently assessed by performing experiments with λ -DNA, which could be manipulated in 200 nm square nanochannels with lengths spanning 100–5 mm (Fig. 3b). The confinement inside nanochannels expectedly induced an entropic spreading of the molecules to a length of ~ 4 μm (plateau in Fig. 3b and histogram in inset), representing a degree of stretching of 28% given that fluorescently labeled λ -DNA measures ~ 22 μm (Perkins et al. 1995). This value is consistent with experimental results obtained with glass nanochannels (Reisner et al. 2005). Interestingly, we could perform DNA nanomanipulation experiments during several hours with our h-PDMS chips by continuously applying 10 mBar in both microchannels. Moreover, high quality imaging and parallel manipulations of DNA could be performed with h-PDMS nanochannels, as shown by the time lapse sequence of one uptake event, and by the fluorescence micrograph displaying several molecules entering multiple nanochannels, respectively (Fig. 3b). Consequently, our technology for nanochannel and nanopost arrays fabrication is particularly adapted for nanofluidic prototyping.

4.3 Characterization of DNA electrophoresis in h-PDMS chips

PDMS is the workhorse material in microfluidics due its facile and rapid fabrication by replication molding (Becker and Gärtner 2007). However PDMS has been sparsely used in nanofluidics because its Young's modulus is too low to prevent nanostructures from collapsing (Zhou et al. 2005), although in some cases PDMS collapse was cleverly directed to generate nanostructures of tunable dimensions (Huh et al. 2007; Park et al. 2009). Using our technology for 200×200 nm PDMS nanochannels fabrication (Fig. 2d), we set out to evaluate the performances of this material for the electrophoretic manipulation of DNA.

The mobility of λ -DNA, which was assessed by measuring the velocity of the center of mass of at least five molecules under at least four different tensions, was $2\text{--}3 \times 10^{-4}$ cm^2/Vs in 2 μm thick access microchannels for different dilutions of TBE (Fig. 4a, b). This value was in excellent agreement with previous estimates obtained in microfluidic systems [see e.g. (Ou et al. 2009); (Randall and Doyle 2006)]. The migration of DNA was also characterized in nanochannels, showing a tenfold slowed down mobility that was independent of salt concentration and pH (Fig. 4b). Moreover, the comparison of the mobility of DNA fragments of different sizes, which spontaneously form due to light-induced DNA fragmentation (note the sizes of the DNA fragments in Fig. 3b), did not indicate any appreciable difference (data not shown). Interestingly, this slow migration of DNA in PDMS nanochannels was

Fig. 3 Single DNA molecule manipulation in PPSL nanofluidic systems. **a** The plot represents the temporal evolution of the center of mass of a λ -DNA molecule moving at a speed of $24 \mu\text{m/s}$ and colliding with a 140 nm nanopost. The upper fluorescence micrographs show the molecule conformation in the course of the collision. The picture in the inset is the camera full-frame, showing multiple DNA collisions and the absence of clogging. **b** The plot shows the length of a λ -DNA over time, as the molecule enters inside a nanochannel with selected snapshots of the relaxation in the upper panel. The full-frame of the camera in the inset shows the exquisite signal to noise ratio, which is characterized by a signal to noise ratio of 15 ± 3 (signal divided by standard deviation of the background noise) for inter-frame intervals of 30 ms . The histogram in the inset represents the steady-state λ -DNA size distribution in nanochannels ($0.5 \times \text{TBE}$, $n = 30$). Scale bars = $10 \mu\text{m}$. Red arrows indicate the direction of DNA migration



already detected in another study that reported a mobility of $\sim 0.6 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ (Campbell et al. 2004). This result is somewhat surprising because DNA is generally treated as a free draining polymer moving in an electric field at a rate that solely depends on its effective charge density, and not on its conformation (Viovy 2000). One may therefore hypothesize that electro-osmotic flows are enhanced in nanochannels, leading to a reduced effective migration speed in comparison to the free mobility of DNA of $4.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ in TBE (Stellwagen et al. 1997). However, electro-osmotic flows should rather be reduced

in nanochannels because the Debye length is not necessary negligible in comparison to nanochannels half width, so that the electro-osmotic flow does not reach a flat profile and the maximum fluid velocity is lowered. It may also be tempting to suggest that the roughness of PDMS nanochannels sidewalls enhances electro-osmotic flows, but recent simulations rather demonstrated the opposite trend (Qiao 2006). Altogether, explanations that rely on changes in electrophoresis or electro-osmosis thus appear to be inconsistent, and the measurement of a rapid DNA mobility of $1.9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ (Mannion et al. 2006) and

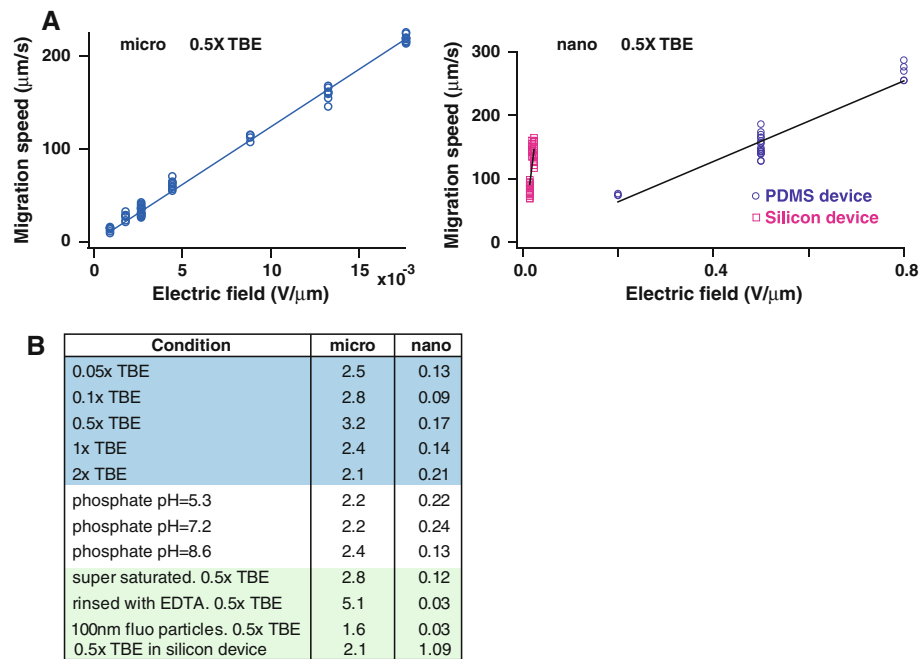


Fig. 4 DNA electrophoresis in h-PDMS nanochannels. **a** The graphs represents the migration speed of λ -DNA for different electric fields inside $70 \times 2 \mu\text{m}$ microchannels (left panel), and $200 \times 200 \text{ nm}$ nanochannels etched in PDMS or in silicon (blue and red datasets, respectively, in the right panel). Note that we systematically assessed the micro- versus nanofluidic response in the same chip. Also, the

actuating field is stronger in nanochannels because the insertion of molecules in nanochannels has to be triggered by higher electric fields. **b** The array summarizes the mobility of λ -DNA (units = $10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$) inside micro- and nanochannels in different buffer conditions. Note that our estimates of the mobility were stable over periods of at least 2 h

$1.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ (Fig. 4a) in $100 \times 100 \text{ nm}$ glass nanochannels or in our own silicon $200 \times 200 \text{ nm}$ nanochannels, respectively, further strengthens this argument. Notably, the mobility in our devices is somewhat smaller than that in glass nanochannels, most likely because our sealing layer is composed of h-PDMS.

One possible explanation may be that the DNA is becoming entangled in the PVP, which is the surface coating polymer. PVP should indeed be present in higher concentration in nanochannels due to their increased surface-to-volume ratio, yet this scenario is unlikely because the molecular weight of the PVP is relatively low, and it is inconsistent with the higher mobility in silicon nanochannels. We then investigated whether the altered DNA migration in nanochannels was induced by the existence of permeation flows inward PDMS (Randall and Doyle 2006). But the mobility remained unchanged after super saturating our devices in humid conditions. PDMS is also known to contain residues such as unreticulated chains or platinum ions that degrade imaging conditions (Jo et al. 2007), and which can be eliminated by soaking PDMS in EDTA during 24 h. Notably, this protocol was performed by immersing nanofluidic chips in EDTA after the final bonding step, because, in our hands, the EDTA treatment was incompatible with the covalent sealing of the devices. To our surprise, DNA mobility was twofold enhanced in microchannels and

tenfold slowed down in nanochannels, thus showing that PDMS plays a central role in this unexpectedly slow mobility. We therefore speculated that the anomalous mobility of DNA was associated to the existence of transient nonspecific interactions between PDMS and DNA. Interestingly we assayed the electrophoretic response of 100 nm carboxyl-nanoparticles, i.e. a nanoobject with a different surface chemistry, in untreated PDMS and with $0.5 \times \text{TBE}$. These objects were characterized by a mobility of $1.6 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ and $0.03 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ in microchannels and nanochannels, respectively. Thus the migration of these nanoobjects is sharply slowed down in nanochannels, generalizing the idea that the migration of nanoobjects in h-PDMS nanochannels exhibits anomalous behaviors. Consequently, our data suggest h-PDMS offers an attractive solution for rapid nanofluidic prototyping, but this material may also introduce uncontrolled bias for quantitative physical studies.

5 Conclusions

In this work we demonstrate that PPSL allows to generate some of the most popular structures of nanofluidics, namely nanochannels and nanoposts arrays. Moreover, PPSL can be specifically adapted to fabricate silicon and PDMS nanofluidic systems. Beyond this technological achievement,

we show that high quality single DNA molecule imaging can be performed with our PPSL systems. Finally, we perform a series of experiments to analyze the anomalous electrophoretic response of DNA in PDMS nanochannels, which is characterized by a tenfold slowed down mobility. This study leads us to conclude that PDMS is particularly relevant for nanofluidic prototyping, but this material may introduce uncontrolled biases for physical studies. Because PPSL solely requires conventional photolithography equipments, we envision that PPSL can be an efficient solution to speed up the discovery rate in nanofluidics.

Acknowledgments Y. Viero, H. Ranchon thank DGA and for PhD fellowship funding, and we thank TEAM research facility for support in fabrication. This work and the fellowship of Q.He. were supported by the ANR program JC08_341867.

References

- AAkerman B, Tuite E (1996) Single- and double-strand photocleavage of DNA by YO, YOYO and TOTO. *Nucleic acids research* 24:1080
- Becker H, Gärtner C (2007) Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem* 390:89–111
- Campbell LC, Wilkinson MJ, Manz A, Camilleri P, Humphreys CJ (2004) Electrophoretic manipulation of single DNA molecules in nanofabricated capillaries. Electronic supplementary information (ESI) available: Four videoclips showing the movement of DNA molecules in nanocapillaries. *Lab Chip* 4:225. <http://www.rsc.org/suppdata/lc/b3/b312592k/>
- Chou SY, Krauss PR, Renstrom PJ (1995) Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers. *Appl Phys Lett* 67:3114
- Dorfman K (2010) DNA electrophoresis in microfabricated devices. *Rev Mod Phys* 82:2903–2947
- Fontana RE, Katine J, Rooks M, Viswanathan R, Lille J, MacDonald S, Kratschmer E, Tsang C, Nguyen S, Robertson N et al (2002) E-beam writing: a next-generation lithography approach for thin-film head critical features. *Magnetics, IEEE Transactions on* 38:95–100
- Hesjedal T, Seidel W (2003) Near-field elastomeric mask photolithography fabrication of high-frequency surface acoustic wave transducers. *Nanotechnology* 14:91
- Huh D, Mills KL, Zhu X, Burns MA, Thouless MD, Takayama S (2007) Tuneable elastomeric nanochannels for nanofluidic manipulation. *Nat Mater* 6:424–428
- Jeong Y, Kim S, Chun K, Chang J, Chung DS (2001) Methodology for miniaturized CE and insulation on a silicon substrate. *Lab Chip* 1:143
- Jo K, Dhirga DM, Odijk T, De Pablo JJ, Graham MD, Runnheim R, Forrest D, Schwartz DC (2007) A single-molecule barcoding system using nanoslits for DNA analysis. *Proceed Nat Acad Sci* 104:2673
- Kaji N, Tezuka Y, Takamura Y, Ueda M, Nishimoto T, Nakanishi H, Horiike Y, Baba Y (2004) Separation of long DNA molecules by quartz nanopillar chips under a direct current electric field. *Anal Chem* 76:15–22
- Mannion JT, Reccius CH, Cross JD, Craighead HG (2006) Conformational analysis of single DNA molecules undergoing entropically induced motion in nanochannels. *Biophys J* 90:4538–4545
- Mawatari K, Tsukahara T, Sugii Y, Kitamori T (2010) Extended-nanofluidic systems for analytical and chemical technologies. *Nanoscale* 2:1588
- Odom TW, Thalladi VR, Love JC, Whitesides GM (2002) Generation of 30–50 nm Structures Using Easily Fabricated, Composite PDMS Masks. *J Am Chem Soc* 124:12112–12113
- Ou J, Cho J, Olson D, Dorfman K (2009). DNA electrophoresis in a sparse ordered post array. *Phys Rev E* 79. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.79.061904>
- Ou J, Joswiak MN, Carpenter SJ, Dorfman KD (2011) Plasma thinned nanopost arrays for DNA electrophoresis. *J Vac Sci Technol A* 29:011025
- Park S, Huh YS, Craighead HG, Erickson D (2009) A method for nanofluidic device prototyping using elastomeric collapse. *Proceed Nat Acad Sci* 106:15549
- Perkins T, Smith D, Larson R, Chu S (1995) Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow. *Science* 268:83–87
- Piruska A, Gong M, Sweedler JV, Bohn PW (2010) Nanofluidics in chemical analysis. *Chem Soc Rev* 39:1060
- Qiao R (2006) Effects of molecular level surface roughness on electroosmotic flow. *Microfluid Nanofluid* 3:33–38
- Randall GC, Doyle PS (2006) Collision of a DNA Polymer with a Small Obstacle. *Macromolecules* 39:7734–7745
- Reisner W, Morton K, Riehn R, Wang Y, Yu Z, Rosen M, Sturm J, Chou S, Frey E, Austin R (2005) Statics and dynamics of single dna molecules confined in nanochannels. *Phys Rev Lett* 94. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.94.196101>
- Reyes DR, Iossifidis D, Auroux P-A, Manz A (2002) Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. *Anal Chem* 74:2623–2636
- Rogers JA, Paul KE, Jackman RJ, Whitesides GM (1997) Using an elastomeric phase mask for sub-100 nm photolithography in the optical near field. *Applied Physics Letters* 70:2658
- Rogers JA, Paul KE, Jackman RJ, et Whitesides GM (1998) Generating 90 nanometer features using near-field contact-mode photolithography with an elastomeric phase mask. *J Vacuum Sci Tech B: Microelectronics and Nanometer Structures* 16:59
- Sanders GHW, Manz A (2000) Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis. *Trends Anal Chem* 19:364–378
- Schmid and Michel (2000) Siloxane polymers for high-resolution, high-accuracy soft lithography. *Macromolecules* 33:3042–3049
- Stellwagen NC, Gelfi C, Righetti PG (1997) The free solution mobility of DNA. *Biopolymers* 42:687–703
- Tang KC, Liao E, Ong WL, Wong JDS, Agarwal A, Nagarajan R, Yobas L (2006) Evaluation of bonding between oxygen plasma treated polydimethyl siloxane and passivated silicon. *J micro-mech microeng* 16:155–161
- Tegenfeldt JO, Prinz C, Huang RL, Austin RH, Chou SY, Cox EC, Sturm JC, Cao H (2004) Micro- and nanofluidics for DNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 378:1678–1692
- Viovy JL (2000) Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: physical mechanisms. *Rev Modern Phys* 72:813
- Whitesides GM (2011) What Comes Next? *Lab Chip* 11:191
- Zhou W, Huang Y, Menard E, Aluru NR, Rogers JA, Alleyne AG (2005) Mechanism for stamp collapse in soft lithography. *Appl Phys Lett* 87:251925

Hydrodynamic Manipulation of DNA in Nanopost Arrays: Unhooking Dynamics and Size Separation

Yannick Viero, Qihao He, and Aurélien Bancaud*

Micro- or nanofabricated obstacle arrays are widely used as model matrices to perform fast DNA separations by electrophoresis. In this report, a gallery of obstacles of radii spanning from 40 to 250 nm are used to investigate the dynamics of hydrodynamic-field-driven DNA–nanopost collisions at the single-molecule level. The data shows that DNA disengagement dynamics are reasonably well described by conventional electrophoretic models in the limit of a large spacing between obstacles and for moderate migration velocities. It is also demonstrated that the use of hydrodynamic flow fields to convey DNA molecules is associated with changes in the configurational space of hooking events, and to altered relaxation dynamics between consecutive collisions. This study defines experimental conditions for the efficient separation of DNA fragments of tens of base pairs, and provides a complete framework by which to understand the behavior of DNA in the course of hydrodynamic-driven migrations through nanopost arrays.

1. Introduction

Electrophoresis is a central tool in bioanalytical chemistry for the separation of DNA, proteins, or hormones by size or charge. Size separation requires that two target analytes migrate at different speeds for a given electric field. This condition is not fulfilled for DNA in free solution because electric forces and hydrodynamic drags linearly depend on the length of the molecule.^[1] Size separation is thus generally achieved using separation matrices composed of hydrophilic gels or polymer solutions, which can be considered as heterogeneous networks of obstacles through which small DNA molecules migrate faster than larger ones. The most common matrix in which to perform DNA electrophoresis consists of

a slab gel, but high performance separations are performed with capillaries $\approx 100\ \mu\text{m}$ in diameter and tens of centimeters in length due to their excellent heat dissipation and reduction of convection.^[2] In addition, arrays of capillaries increase DNA analysis throughput by a factor of at least ten in comparison to conventional slab-gels,^[3] and this technology enabled completion of the human genome sequencing project at the turn of 2000 in far less time than initially expected.

Polymeric separation matrices are intrinsically disordered systems, and Volkmuth and Austin developed the idea of separating DNA through ‘artificial pores’ in 1992.^[4] These ideal matrices are composed of microfabricated 2D arrays of cylindrical posts, and they turned out to be particularly relevant for the separation of long DNA strands of $\approx 100 \times 10^3$ base pairs (kbp),^[5] which are otherwise analyzed by pulsed-field gel electrophoresis over excessively long periods spanning several hours to days. Research in artificial separation matrices have mostly been conducted with micrometer-scale obstacles,^[6–10] and the field attracted renewed interest with the emergence of nanotechnologies, which pave the way to the fabrication of nanopost arrays tailored from the molecular level to the macroscale.^[11,12] The promises of nanotechnologies were confirmed experimentally, as some of the most impressive separation data were produced with ≈ 250 and ≈ 200 nm-radius obstacles.^[13,14]

Y. Viero, Q. He, Dr. A. Bancaud
CNRS, LAAS
7 Avenue du Colonel Roche
F-31077 Toulouse Cedex 4, France
E-mail: abancaud@laas.fr

Y. Viero, Q. He, Dr. A. Bancaud
Université de Toulouse
UPS, INSA, INP, ISAE, UT1, UTM, LAAS
F-31077 Toulouse, Cedex 4, France

DOI: 10.1002/smll.201101345

So far, separation experiments in micro- or nanopost arrays have mostly been carried out using electrophoretic actuation, although hydrodynamics provides an alternative solution to convey DNA molecules through arrays of pillars,^[15,16] and the processes of DNA trapping and unhooking were shown to be similar with electrophoresis and hydrodynamics.^[16] Interestingly hydrodynamic forces enabled circumvention of an intrinsic problem of electrophoresis, which arises from the presence of surface charges on nanoposts that induce electro-osmotic flows. Electro-osmotic flows, which induce spatially heterogeneous flows in the Debye layer, can be efficiently reduced by the covalent grafting of hydrophilic polymer brushes on the surface of nanoposts, but the spatial extension of these polymers of ≈ 10 nm or more^[17] may introduce a bias in the physics of unhooking from the nanoposts.

Here, the first comprehensive single-molecule study of pressure-driven DNA–nanopost disengagement dynamics is performed using DNA molecules of two different sizes, 49 and 35 kbp, and nanoposts of sizes spanning 40–250 nm in radius. First, DNA unhooking dynamics are compared using electric versus hydrodynamic actuation, showing that the characteristic timescale of unhooking is nearly four times longer in the case of hydrodynamics. This result is in contradiction with the generally admitted assumption that hydrodynamic and electrokinetic forces are equivalent in the context of DNA–obstacle interactions.^[18] Interestingly though, the agreement of this data with standard disengagement models is much better for pressure-driven migrations, pointing to the relevance of using hydrodynamic actuation to study the physics of DNA–nanopost collisions. Moreover, it is demonstrated that the dispersion of the conformations adopted by DNA during collisions is strongly reduced with hydrodynamics in comparison to electrophoresis. This result is accounted for by the observation of slowed DNA relaxation dynamics with hydrodynamics, which suggests that the presence of shear in the flow field enhances the deformability of DNA. A subsequent assay of DNA unhooking dynamics for different obstacle sizes, hydrodynamic flows, and DNA lengths is performed in order to define the optimal conditions for size-separation experiments. This study finally allows separation of a mixture of 14 and 35 kbp DNA in 100 s using a continuous flow. Altogether, our work provides a complete framework by which to understand the behavior of DNA in the course of hydrodynamic-driven migrations through nanopost arrays.

2. Single-Molecule Study of DNA-Unhooking Dynamics

2.1. Model Development

The dynamics of DNA–obstacle interaction have been thoroughly studied at the microscale in order to unravel the sieving mechanisms that lead to size separation in gel electrophoresis (see e.g., references [22–24]). For small obstacles, the hydrodynamic number that characterizes DNA–obstacle interaction is the Péclet number (Pe). According to the formulation of Randall and Doyle,^[21] its expression is:

$$Pe = \frac{U \times l_p}{D} \quad (1)$$

with U , l_p , and D the velocity, persistence length, and diffusion coefficient of DNA, respectively. For $Pe > 1$, the collision of a coiled DNA with a small obstacle is expected to induce its stretching into a hairpin hooked configuration. In order to evaluate Pe , we determined the diffusion coefficients to be 0.5 and 0.4 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for 35 and 49 kbp DNA molecules, respectively, by recording their spontaneous motion inside our fluidic systems (SI, Figure S2). Notably, previous bulk measurements of the diffusion coefficient of 0.47 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for 49 kbp DNA are in excellent agreement with our estimates,^[25] given that the moderate confinement associated with the height of 0.8 μm of the channels is expected to slow down the diffusion coefficient by $\approx 10\%$.^[26] The velocity of DNA spans 20–100 $\mu\text{m s}^{-1}$ with electrophoretic or hydrodynamic actuation and the most conservative value was used here for a DNA persistence length of 50 nm,^[27] bearing in mind that low salt conditions tend to increase l_p ,^[28] but the effect of YOYO on DNA persistence length continues to be debated (see e.g., [29–31]). Consequently, Pe spans 2–12 for λ -DNA.

Collision events have already been classified into 5 different conformations. In addition to roll-off collisions that do not lead to an unraveling of the molecule around the post, the hooking of DNA around obstacles has been described with 4 states termed W, X, J, and U conformations.^[21] J and U collisions are the most frequent at low Pe values,^[21] and they follow the same DNA-folding principle, which is characterized by symmetric or asymmetric hooks, respectively (see sketches in the Experimental Section). X, which involves a partial extension of the molecule,^[21] and even more so W conformations tend to be rare in this experiment (see more below), and their dynamics will therefore not be analyzed here.

DNA progression through obstacle arrays has been modeled by repetitive cycles of i) collision with the post and extension into a hairpin hooked (J/U) configuration; ii) rope-over-pulley disengagement; and iii) a period of translation before the next collision.^[24,32] The disengagement is driven by the differential force exerted on the two DNA arms, and by assuming a series of simplifications^[21] it is possible to calculate the unhooking time as a function of the disequilibrium of the molecule conformation (Equation (2)):

$$t_{\text{unh}}(x_1(0)) = -\frac{\tau_c}{2} \ln \left(1 - \frac{2x_1(0)}{L} \right) \quad (2)$$

with $x_1(0)$ the maximum size of the shorter arm, L the maximum extension length of the molecule, and $\tau_c = L/U$ is the characteristic time scale of disengagement in the case of electric-driven DNA–post interactions.^[21] Our data on hydrodynamic-driven DNA unhooking were analyzed using Equation (2) with the only adjustable parameter, τ_c . The length of the molecule and the maximum size of the shorter arm were measured for every molecule by manual tracking in ImageJ software.

To conclude, the conventional rope-over-pulley model was used to elucidate DNA–post disengagement kinetics driven by hydrodynamics. It is noteworthy that this model was constructed to describe electrophoretic collisions (that

is, for homogeneous force fields across the channel), whereas these experiments are conducted in the presence of parabolic flow fields (Experimental Section). The velocity profile, which is null at the channel walls and maximum at the center of channel, induces elongational and/or compressive stresses to the molecule, leading to a specific dynamics described in the following sections.

2.2. Electric- versus Hydrodynamic-Driven DNA Unhooking Dynamics

First, DNA unhooking dynamics were compared using hydrodynamic and electric flow fields. Note that the experimental conditions were nearly identical, except that the obstacles were 250 and 300 nm in radius for hydrodynamics and electrophoresis, respectively. This difference is explained by the requirement of adding an insulating layer on silicon for electrophoretic actuation (see methods). 35 kbp DNA molecules were manipulated in nanopost arrays at two different migration speeds of 20 and 40 $\mu\text{m s}^{-1}$, which correspond to $Pe \approx 2$ and 4, respectively. The conformations of hooked DNA were examined. At $Pe = 2$, the occurrence of X collisions was relatively frequent in electrophoresis ($\approx 60\%$, $n = 45$; as already detected in [21]) whereas this conformation was rare with hydrodynamics ($\approx 5\%$, $n = 40$), and U/J collisions were predominantly detected ($\approx 95\%$, $n = 50$). This trend was further accentuated at $Pe = 4$ because the percentage of X collisions increased in electrophoresis ($>90\%$, $n = 50$), while U/J events remained preponderant for hydrodynamics ($\approx 90\%$, $n = 50$). In fact, the threshold to observe significant proportions of X collisions was shifted towards larger Pe with hydrodynamics, scoring $\approx 80\%$ of X events at $Pe \approx 10$ ($n = 45$). It was thus concluded that an advantage of flow-driven DNA–nanopost collisions lies in the simple configurational space, with one predominant type of collision for a broad range of Pe spanning ≈ 2 –8. As discussed below, this feature is bound to the anomalous dynamics of DNA in this system.

Next, the focus was on DNA unhooking dynamics, and disengagement times were measured for different initial DNA conformations described by the length $x_1(0)$ of the shorter arm (see the schematic in the Experimental Section). The characteristic timescale of disengagement, τ_c , was extracted for hydrodynamics and electrophoresis, and for migration speeds of 20 and 40 $\mu\text{m s}^{-1}$ (Figure 1A). This study showed longer disengagement times with hydrodynamic actuation (compare the blue and red datasets in Figure 1A). At $Pe = 2$, the theoretical value of $\tau_c = 0.61$ s was consistent with our hydrodynamic data of 0.69 s, whereas unhooking kinetics were accelerated 2.9-fold in the case of electrophoresis (that is, $\tau_c = 0.18$ and 0.52 s for experimental measurements and theoretical predictions, respectively). Similar trends were detected at $Pe = 4$ with 1.3- and 0.4-fold differences between the theoretical disengagement times and experimental data for hydrodynamics or electrophoresis, respectively (Figure 1A, right panel). These results are somewhat surprising because the predictions of τ_c should fit the output of electrophoresis experiments,^[21] and they are in contradiction with the assumption that electric and hydrodynamic

forces generate equivalent effects on DNA during collisions with posts.^[18] Notably, this equivalence between electric and hydrodynamic forces was demonstrated for homogeneous flow fields, an assumption that is not validated with Poiseuille flows (see Experimental Section). Previous work by Panwar and Kumar^[33] pointed out that polymer behavior in flows with inhomogeneous velocity gradients can differ from that in flows with homogeneous ones. Our experimental data strongly comfort these Brownian simulations, with a hydrodynamic unhooking time nearly 4 times longer than that determined for electrophoresis at the same Péclet value.

From here, the difference in unhooking dynamics were elucidated by monitoring disengagement events at the single-molecule level. For this, the temporal evolution of the center of mass of individual molecules during collisions was recorded. Hydrodynamics-driven collisions were characterized by a standard profile (Figure 1B), following i) a linear increase of the center of mass over time until the DNA impacts the obstacle; ii) a plateau associated with the DNA hooking around the obstacle; iii) the final unhooking and the increase of the curve. The pre- and post-impact slopes were always equal (dashed lines in Figure 1B). In the case of electrophoresis, an unusual dynamic was detected because the speed of the molecule increased 1.8 ± 0.3 -fold right after the collision (dashed lines and histogram in Figure 1C), as has been described for DNA collisions with columns of magnetic particles.^[32] It was initially suggested that this anomalous response arose from the difference in drag between an extended-versus-coiled conformation of DNA,^[32] but this interpretation was ruled out by model experiments with microposts.^[21] This acceleration may instead be related to the alteration of electric fields around the obstacle due to, e.g., electro-osmotic flows. Interestingly, this interpretation provides a hint to the interpretation of the faster electrophoretic disengagements, because enhanced electric fields should increase pulling forces during disengagement, and thus accelerate rope-around-pulley unhookings. In turn, these results show that unhooking models, which were constructed to describe electrophoretic collisions with microscale obstacles,^[24] provide a better description of hydrodynamic-driven disengagement kinetics with nanoscale obstacles.

The physics of hydrodynamic-driven DNA migration through a nanopost array were then studied. At first, the focus was on the intrinsic dynamics of DNA, which constitutes a critical component of disengagement kinetics.^[24]

2.3. Relaxation of DNA with Hydrodynamic and Electric Actuation

Our nanoposts arrays are semidiluted, so DNA chains, which are extended after collisions, can completely recoil in the interstices of the array, and these relaxations were monitored at the single-molecule level for different Pe values. In the case of electrophoresis, the same relaxation time of 0.33 ± 0.05 s was measured at $Pe = 2.5$ and 4.5 for 35 kbp molecules, and the same trend was observed for 49 kbp molecules with a relaxation time of 0.53 ± 0.10 s at $Pe = 2.7$

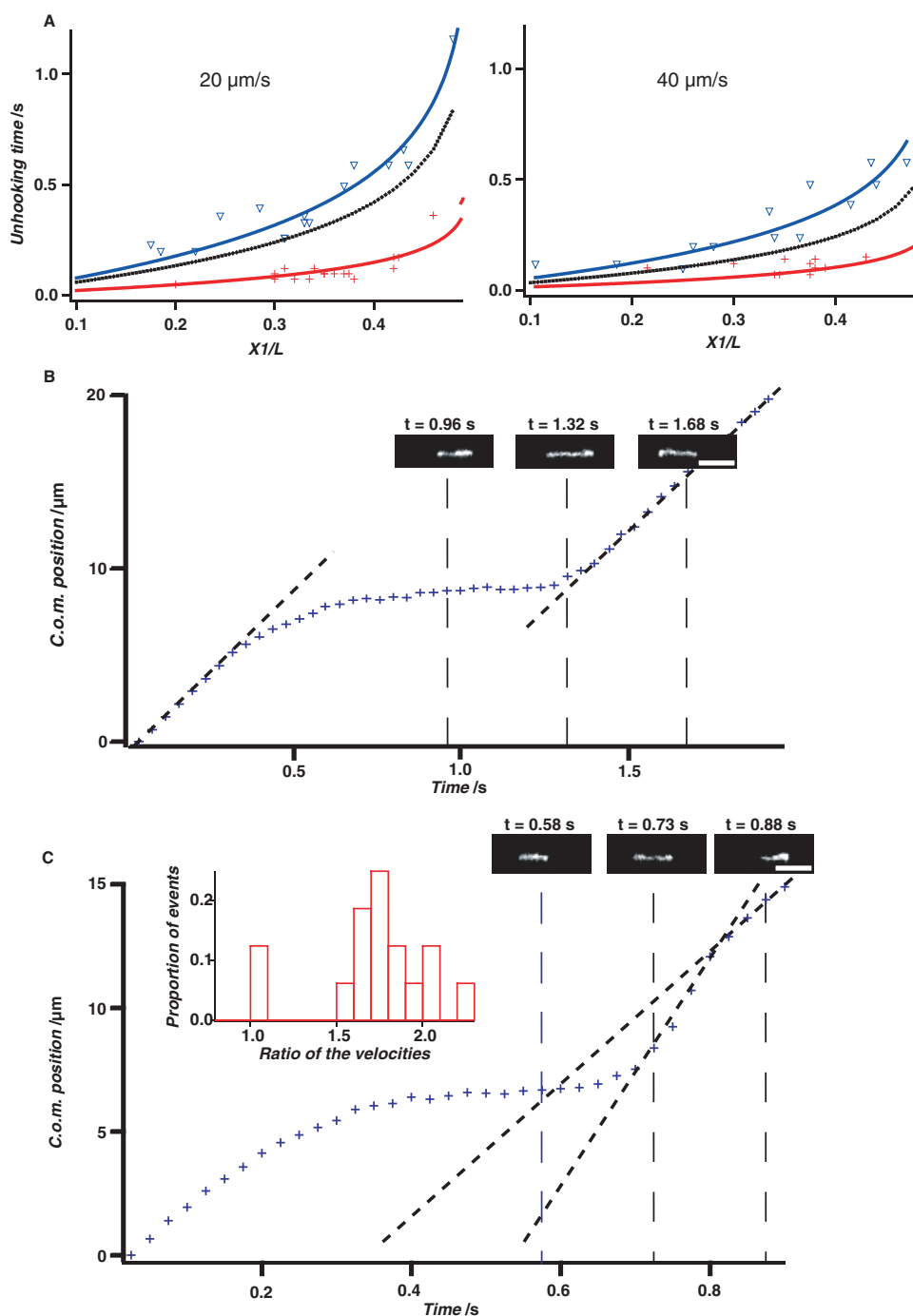


Figure 1. Hydrodynamic- and electric-driven unhooking dynamics of 35 kbp DNA. A) The unhooking time of different J collisions is plotted as a function of the initial DNA conformation, which is characterized by the short arm length $x_1(0)$ (see Figure 6E). The experiments are carried out at migration speed of 20 and $40 \mu\text{m s}^{-1}$ (left and right plots, respectively), and the red and blue datasets correspond to the dynamics recorded with electric and hydrodynamic actuation, respectively. The black curves in both graphs represent the predictions of the model proposed by Randall and Doyle,^[21] which was shown to accurately reproduce electrophoretic collisions at the microscale. Note that the black curves were extracted based on the length of DNA during hydrodynamic-driven collisions ($L = 12.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$), which is slightly more extended than with electric actuation ($L = 10.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$). B) The plot shows the temporal evolution of the center of mass of one 35 kbp molecule during the collision with a 240 nm nanopost using hydrodynamic actuation. The DNA velocity is the same before and after the collision, as depicted by the two dashed lines. The upper insets show fluorescence micrographs of the DNA in the time course of the collision. C) Same as in (B) but using electrophoretic actuation. The velocity of the center of mass is two-fold accelerated right after the release (compare the two dashed lines). This acceleration was reproducibly observed, as demonstrated by the histogram of the ratio of the velocity after and before collision (20 events). Scale bars = $10 \mu\text{m}$.

and 5.5 (dashed lines in **Figure 2A**). The relaxation timescale was systematically slowed down with hydrodynamic flow fields (blue datasets and time series in **Figure 2A**), and the

maximum departure between hydrodynamics versus electrophoresis, associated with a 4-fold deceleration of recoiling times, was reached at low Pe of ≈ 2 . Furthermore, a clear

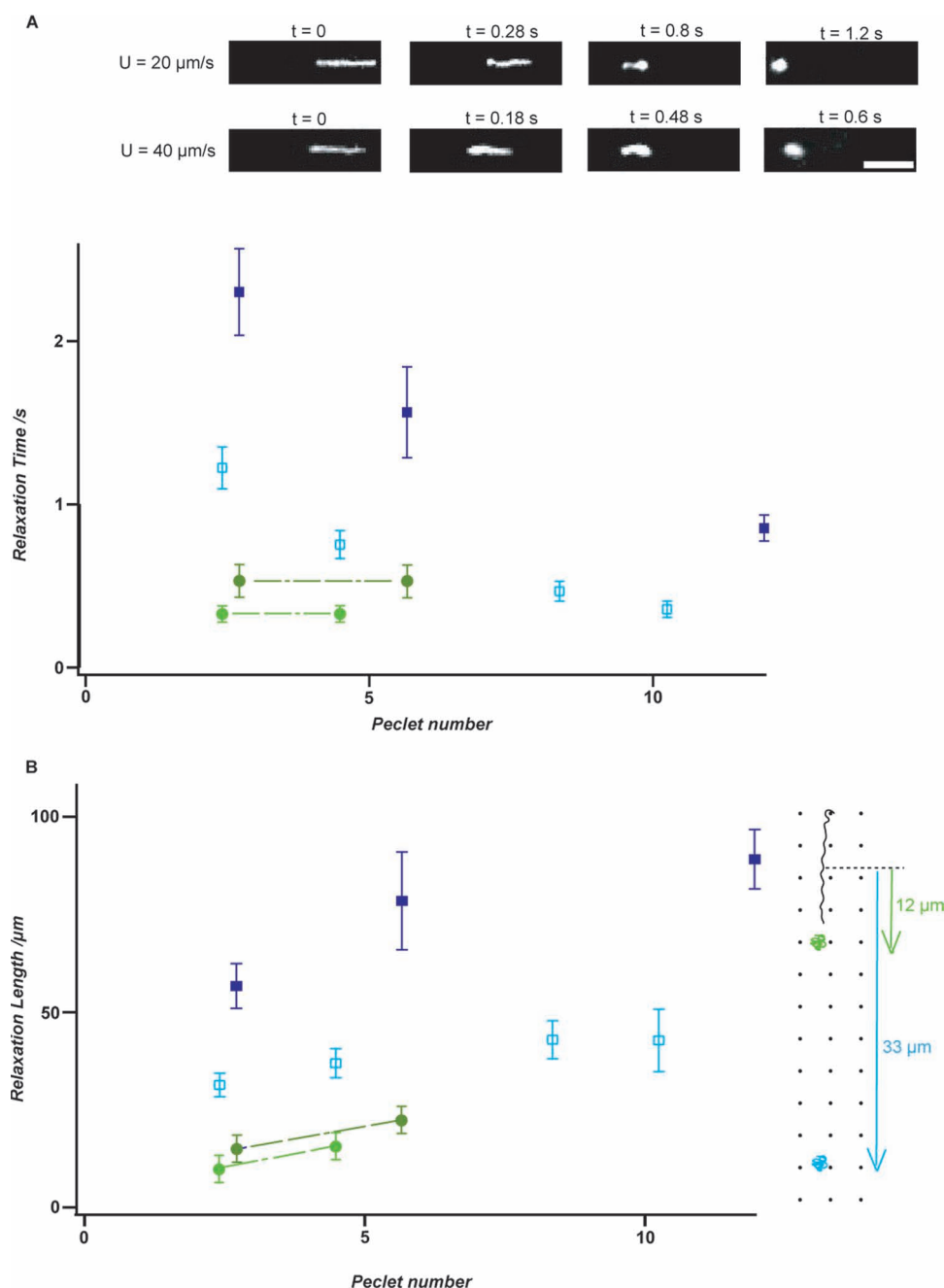


Figure 2. DNA relaxation after collision. A) The upper insets show fluorescence micrographs over the course of relaxation at two different migration speeds. The plot shows the relaxation times for 35 and 49 kbp molecules (light and dark colors, respectively) as a function of Pe . The relaxation time is much longer with hydrodynamic flows than with electrophoresis (blue versus green datasets, respectively). B) The relaxation time was converted into a relaxation length, as depicted in the schematics on the right, which shows the distance travelled by a 35 kbp DNA at $20 \mu\text{m s}^{-1}$ in a realistic array before complete recoiling under hydrodynamic or electric actuation (blue and green globules, respectively). The relaxation length is plotted as a function of Pe for 49 and 35 kbp fragments with the same color codes as in (A).

dependence of the relaxation time with Pe was noted, which is reminiscent of the shear-dependent dynamics of DNA in shear flows.^[34–36] The parabolic flow in 800 nm-high channels is indeed associated with shear rates spanning $\approx 50\text{--}250 \text{ s}^{-1}$, given DNA migration speeds of $20\text{--}100 \mu\text{m s}^{-1}$. In this range, tethered DNA chains have been shown to exhibit slow temporal fluctuations,^[37] which arise from cyclic dynamics that occur due to the coupling between the chain velocity in the flow direction to fluctuations in the shear-gradient direction.

Although the molecule is not attached to the surface in our case, the shear in the flow field may induce cyclic movements within the chain that slow down its relaxation. This anomalous dynamic has an unexpected consequence regarding the conformation of DNA during collisions: indeed, the threshold flow to deform a tethered DNA is determined by the ratio of its diameter to its relaxation time.^[38] Thus, slowed down relaxations should favor the rapid deployment of stretched DNA arms during collisions, and reduce the

occurrence of X collisions, as observed experimentally for $Pe < 8$.

Because the motion of DNA between two consecutive collisions was already shown to be a critical step for the modeling of electrophoretic separations,^[20] and the next hooking probability is higher for coils than for extended chains due to their larger breadth,^[39] it is important to evaluate the length travelled by the DNA before it adopts a coiled conformation de novo. The relaxation length was defined as the distance travelled by the center of mass of the molecule after unhooking—that is, the sum of half the length of the DNA, plus the product of the DNA relaxation time and its velocity (schematics in Figure 2B). According to this definition, the migration distance increases with Pe in the case of electrophoresis (dashed lines in Figure 2B). The slowed relaxations for hydrodynamics lead to increased relaxation lengths (blue datasets in Figure 2B). It is considered that these long relaxation lengths lead to a reduction in the number of collisions during the migration through nanopost arrays, and potentially degrade their performances for size separation,^[20] although this hypothesis remains to be tested experimentally.

Altogether this study shows that the existence of shear in Poiseuille flows alters DNA relaxation dynamics, and changes the conformational space of hooking events as well as the behavior of DNA between consecutive collisions. Next, the physics of the collisions using obstacles and DNA strands of variable sizes were investigated.

2.4. Unhooking Dynamics versus Obstacle Size

J collisions were studied with nanoposts of 40, 70, 135, and 240 nm in radius. The migration speed of 35 kbp DNA was set to $40 \mu\text{m s}^{-1}$ ($Pe = 4$), and we measured disengagement times of 0.35 ± 0.01 , 0.45 ± 0.01 , 0.44 ± 0.02 , 0.48 ± 0.02 s for obstacles of 40, 70, 135, and 240 nm, respectively (Figure 3A). Unhooking dynamics thus appeared to be slower for large obstacles. It is possible that this effect stems from the long range couplings of hydrodynamic flow fields (that is, the flow is perturbed over a length roughly proportional to the diameter of the post). To test this hypothesis, 2D COMSOL simulations were run with realistic obstacle sizes and spatial distributions (Figure 3B). The flow velocity in the interstices of the array was set to $\approx 40 \mu\text{m s}^{-1}$, and its value between consecutive posts of 240 and 40 nm was 17 and $27 \mu\text{m s}^{-1}$, respectively. Bearing in mind that elongated 35 kbp DNA strands measure $\approx 12 \mu\text{m}$, these molecules explore the interobstacle space in the J conformation, and they undergo lower drag forces with larger posts. More precisely, following the simplified model of Popelka et al.,^[24] it can be assumed that the disengagement time is proportional to the drag force exerted on the two arms, and it was deduced that the disengagement time should be increased $27/17 \approx 1.6$ -fold for 240 versus 40 nm obstacles, in keeping with the experimental onset in unhooking time of $0.48/0.35 \approx 1.4$.

Consequently, our study suggests that hydrodynamic-driven DNA posts interactions should be studied with small obstacles, or equivalently with a large spacing between obstacles in order to avoid the complications associated to the

coupling of hydrodynamic flow fields between consecutive obstacles.

2.5. Unhooking Dynamics versus DNA Size

The unhooking dynamics for different DNA sizes were then investigated. J collisions with 35 and 49 kbp molecules were analyzed at migration velocities of 20, 40, and $100 \mu\text{m s}^{-1}$ using nanopost arrays of 70 nm. The elongation of DNA during J collisions was studied first, showing that the extension of molecules expectedly increased with the flow (blue datasets in the insets of Figure 4A,B). Interestingly though, the elongation was always greater than the predictions of Mohan and Doyle,^[40] and of Holleran and Larson^[41] (dotted curves in the insets of Figure 4A,B). We attribute this enhanced stretching to i) the greater deformability of DNA using hydrodynamic actuation (see above), and ii) the moderate entropic stretching associated with the confinement induced by the 800 nm-thick channels.^[42] Interestingly, the lower extension of DNA in the context of electrophoresis (green dataset in the inset of Figure 4A) supports our interpretation of a higher deformability of DNA induced by hydrodynamic flow fields.

The disengagement kinetics were then studied. These appeared to be faster for increasing migration paces (Figure 4A,B). This result is anticipated because disengagements are driven by the hydrodynamic forces exerted on the long and short arms.^[21,24] Furthermore, the predictions for the disengagement time, τ_c (Equation (2)), were in good agreement with our experimental data at low Pe values (Figure 4C). Interestingly though, a consistent departure of $\approx 50\%$ between the model and our results was detected at higher Pe values. This difference may be due to the existence of an additional drag force produced by the excess of bending constraints associated with the sharp curvature of the DNA around the nanopost, as proposed in reference [43]. To test this suggestion, the disengagement dynamics of 35 kbp DNA fragments were studied with smaller nanoposts of 40 nm and at the same flow rate of $100 \mu\text{m s}^{-1}$. Because the same unhooking time of 0.18 s was measured, this hypothesis was ruled out. We thus suggest that the shear stress exerted on the molecule at high Pe values cannot be disregarded in modelling the physics of unhooking, and we suggest that this effect should be investigated with quantitative models in the future.

To conclude, this work suggests that, for hydrodynamic-driven unhooking dynamics, DNA should be manipulated in sparse nanopost arrays at $Pe < \approx 8$, a regime in which the physics of disengagement is reasonably well described by standard electrophoresis models. Finally, moving one step ahead, size-separation experiments were performed to test the potential of these matrices for bioanalysis.

3. DNA Size Separation: Proof of Principle

Starting from a device composed of 70 nm nanopillars, two lateral holes were drilled on each side of the separation channel (Figure 5A) in order to inject a DNA mix at a defined position. The DNA migration speed was

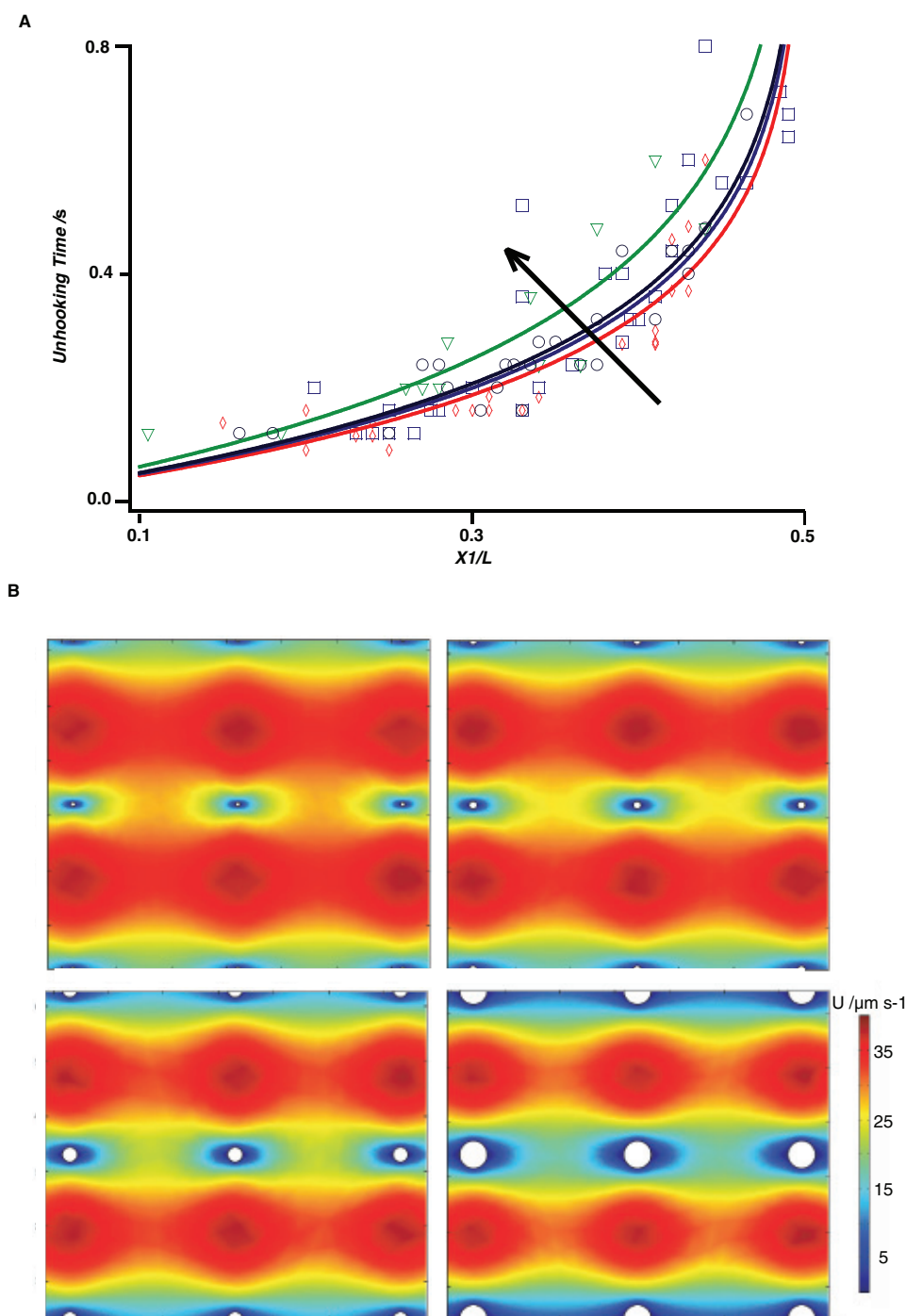


Figure 3. Unhooking dynamics for different obstacle sizes. A) The unhooking time of different J collisions is plotted as a function of the initial DNA conformation, as inferred from the short arm length $x_1(0)$, and for different obstacle size of 40, 70, 135, and 240 nm (red, black, blue, and green datasets, respectively), and their corresponding single parameter fits using Equation (2). The migration speed was set to $40 \mu\text{m s}^{-1}$ by assigning the appropriate pressure according to the hydrodynamic resistance of the channels (not shown). B) The flow-field magnitude was simulated in COMSOL using 2D laminar flow models. The maximum flow speed in the interstices of the arrays was set to $\approx 40 \mu\text{m s}^{-1}$, and it was observed that the minimum velocity between two consecutive obstacles along the x-axis decreases as the size of the post increases (compare the lower right and the upper left panels).

thus set to $50 \mu\text{m s}^{-1}$ (that is, $Pe = 5$ and $D_{\text{eff}} \approx 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for 35 kbp DNA). In this regime, DNA collisions mostly consist of J conformations and the physics of DNA collisions can be modeled with conventional electrophoresis

models (see above). After a time lag of 50 s, a first peak was detected, followed by a second one 2-fold brighter at 110 s (Figure 4B). Interestingly, the difference in intensity between the two peaks is consistent with the fact that the DNA sample

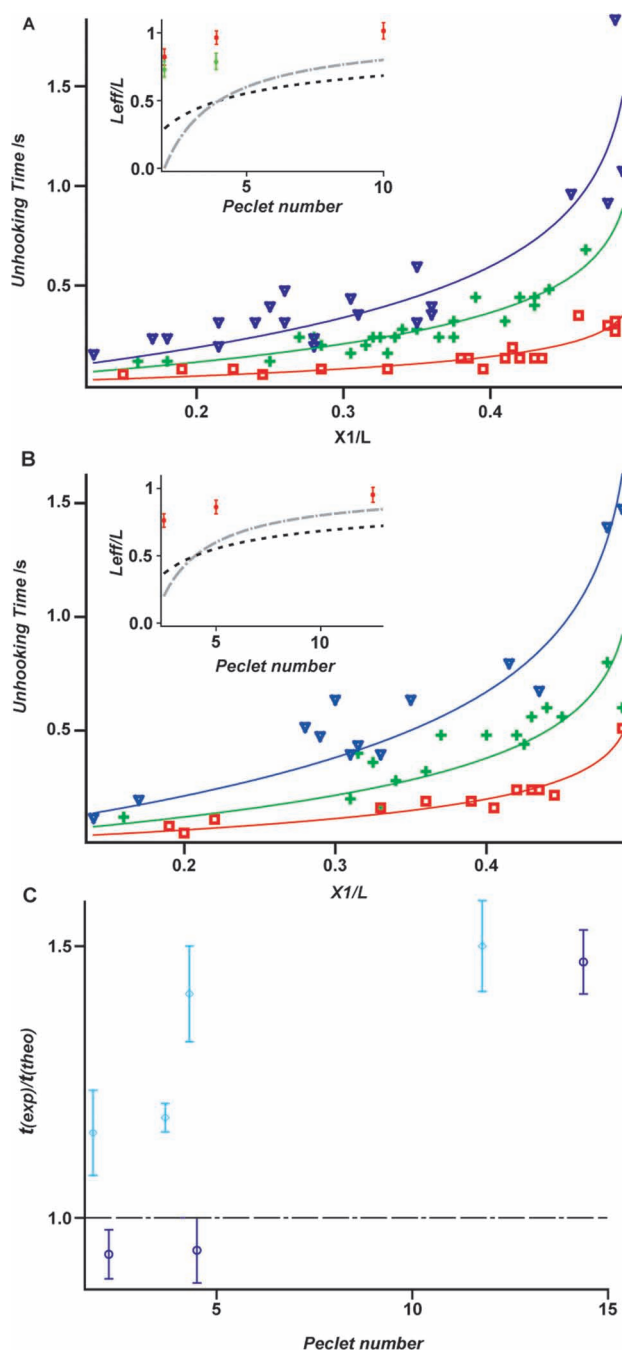


Figure 4. Unhooking dynamics for different DNA size. A) The unhooking time of 35 kbp DNA fragments undergoing J collisions is plotted as a function of the initial short arm length $x_1(0)$, and for three different DNA migration speeds of 20, 40, and 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ (blue, green, and red datasets, respectively), while setting the size of nanopillars to 70 nm. B) The same experiment is shown using 49 kbp molecules. C) Unhooking dynamics were analyzed quantitatively using Equation (2) (solid curves in (A) and (B)), yielding characteristic unhooking times τ_c . These characteristic times were then normalized to the theoretical values of the model of Randall and Doyle,^[25] and plotted as a function of Pe for 35 and 49 kbp chains (blue and orange datasets, respectively). This data shows a departure from the model at $Pe \approx 10$.

contains the same number of 14 and 35 kbp molecules, and that their intensity is exactly doubled with a staining ratio of 1 fluorophore per 10 bp. This experiment thus demonstrates

that our technology enables the performance of size separations in less than 2 min. Moreover, the separation resolution, as defined by the ratio of the distance between consecutive peaks to the mean width of the peaks, was estimated to be ≈ 2.3 . This outperforms conventional slab-gel electrophoresis, which requires at least 1 h to separate such long species (data not shown). They are comparable to the electrophoresis separation results reported in the literature,^[13,14] though these authors showed separation efficiencies over much broader ranges of molecular weights. We wish to underline that this separation efficiency could be easily improved by reducing the width of the injection band, which is solely determined by dimensions of the access holes (Figure 5A), from $\approx 200 \mu\text{m}$ in the current device (data not shown) to $50 \mu\text{m}$ using conventional photolithography.

4. Conclusion

In this report, a detailed study of hydrodynamic-driven DNA–nanopillar collisions is provided at the single-molecule level. Our investigations of the DNA conformational space during hooking events first show that DNA nearly systematically folds in a J/U state using hydrodynamic actuation at low Pe , whereas a broader dispersion is observed with electrophoresis. We suggest that this effect is induced by the slowed relaxations of DNA in the presence of Poiseuille flows, which enhances the deformability of the molecule and favors the formation of two stretched arms during collisions. We then assay the disengagement dynamics of hydrodynamic collisions, and show that standard electrophoretic models provide a good description of unhooking events at low Pe and for small-sized obstacles (typically $<100 \text{ nm}$) given a spacing of $3 \mu\text{m}$. Interestingly, electrophoretic disengagement dynamics appear to be accelerated four-fold in comparison to those detected with hydrodynamics, and they depart from the predictions of conventional electrophoretic models. We suggest that this unexpected behavior results from the presence of uncontrolled electro-osmotic flows. Electro-osmotic flows could be reduced by covalently grafting neutral polymers at the surface of nanoposts, but the coating protocols may be challenging to establish in fluidic channels. Altogether, our results point to the fact that the use of hydrodynamic actuation is a relevant strategy to monitor the process of DNA–obstacle disengagement at the nanometer level.

It has been recently shown that dispersion during electrophoretic separation through an array of obstacles was due to the combination of dispersions associated with the variance of the duration of a collision, and the variance in the distance between collisions.^[44] We show a simplified configuration space during collisions, which should lead to a reduced variation of holdup times. However, hydrodynamic motion introduces an additive contribution to the dispersion, which arises from the coupling of parabolic shear flows with transverse molecular diffusion.^[45,46] This “Taylor” dispersion, which has been shown to introduce adverse effects in bioassays,^[47] is characterized by this effective diffusion coefficient:

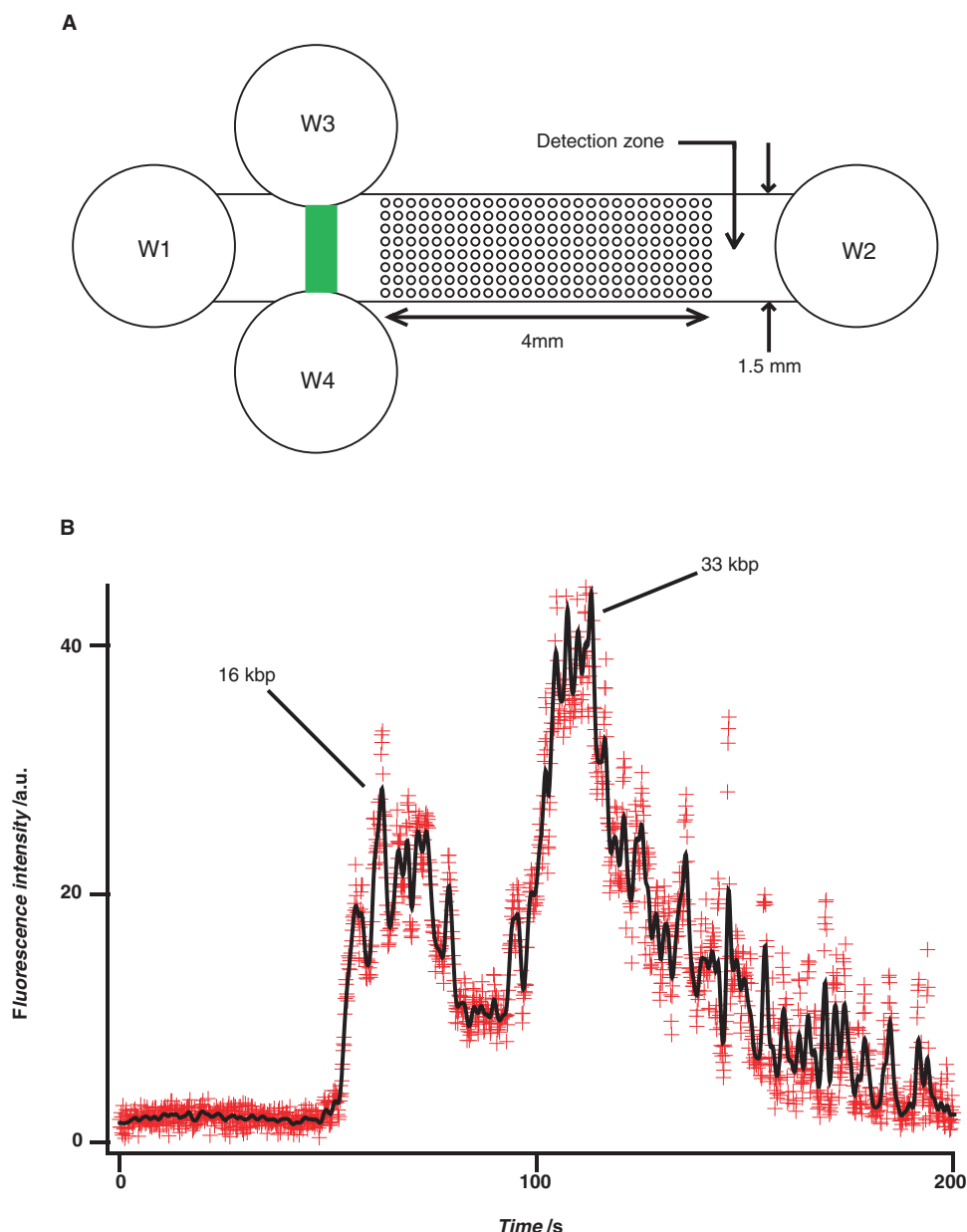


Figure 5. DNA Separation. A) A separation device was fabricated according to the specifications described in the sketch, and the separation matrix consisted of an array of 140 nm nano-posts. B) A mix containing 16 and 33 kbp DNA chains was introduced in the plug (green area in (A)), and the intensity was recorded over time in the detection zone.

$$D_{\text{eff}} = D \left(1 + \frac{h^2 U^2}{192 D^2} \right) \quad (3)$$

with $h = 400$ nm the channels' half-height. Given that the molecular diffusion of ≈ 30 kbp DNA should be $\approx 0.5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, we deduce that the second term becomes dominant for $U > 20 \mu\text{m s}^{-1}$. Shear-enhanced diffusion can be reduced either by reducing the channel's height or by increasing the diffusion coefficient of the molecule (that is, with long DNA molecules). The former possibility is also accompanied by enhanced shear stresses, which complicate DNA–nanopost disengagement dynamics, as shown in Figure 4C. Consequently, we believe that our technology is relevant for the separation of long

DNA molecules, even if this Taylor dispersion calculation must be partially false due to the presence of obstacles during the motion of DNA molecules. This assumption will therefore have to be demonstrated by additional separation experiments and complemented by modeling that will enable the definition of the optimal working conditions of our separation matrices.

In another direction, the matrices for DNA separation have always been composed of cylindrical obstacles, and Jo and Dorfman recently asked whether this shape was optimal for size separation.^[48] Because our technology enables the production of ovoidal posts,^[19] we will be particularly interested to study DNA unhooking dynamics for different geometries in the future.

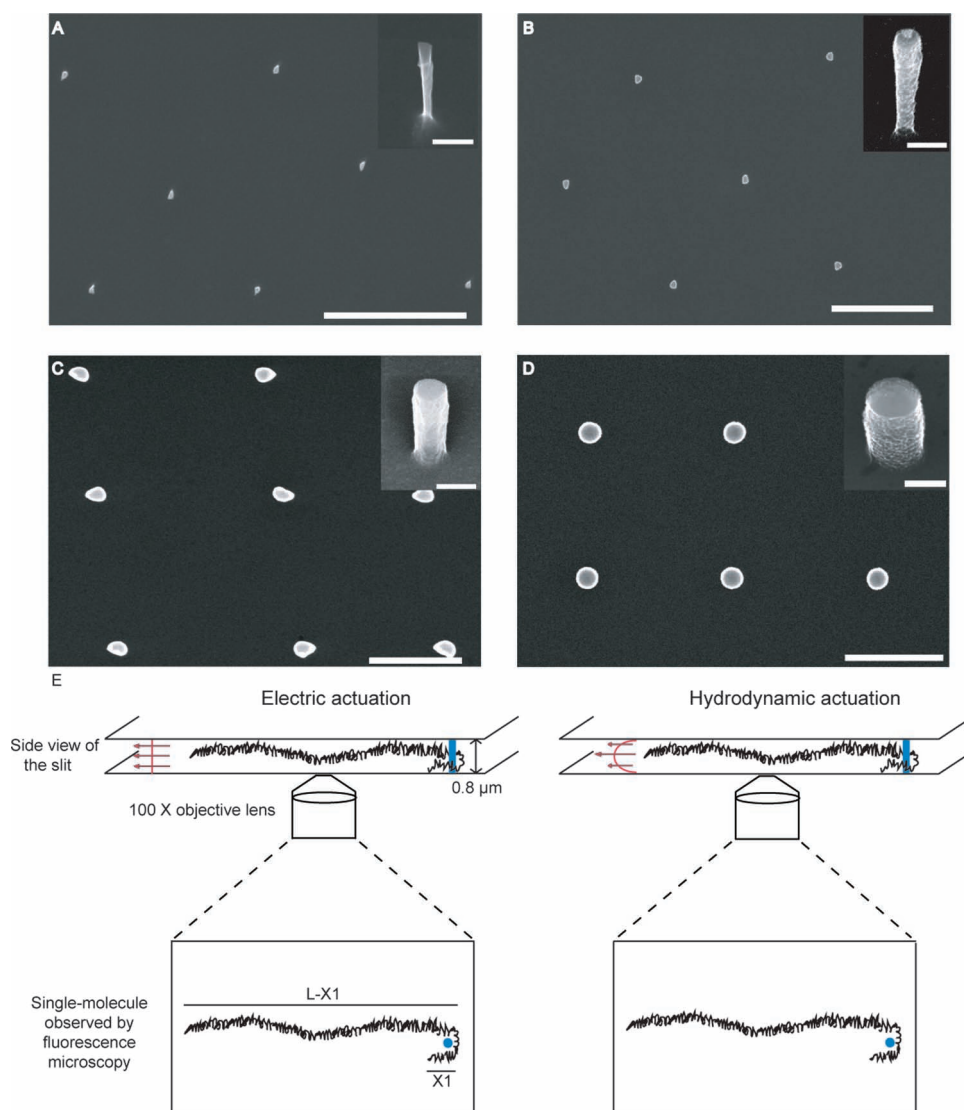


Figure 6. Fabrication of nanopost arrays for hydrodynamic manipulation of DNA. A–D) The four panels represent scanning electron microscopy (SEM) images of the different nanopost arrays (scale bars = 2 μm), and the insets are tilted views of individual posts (scale bars = 200 nm). E) Schematic representations of the J conformation during a collision driven by electrophoresis or hydrodynamics (left and right panels, respectively). The constant electric field across the channel induces an homogeneous force vertically, whereas the parabolic Poiseuille flow is associated to a greater drag force for the portions of the chain located in the middle of the channel in comparison to those close to the sidewalls. The length of the shorter arm is denoted x_1 throughout the manuscript.

5. Experimental Section

Nanofabrication: A gallery of silicon nanopillars of radii spanning 40–250 nm and 800 ± 100 nm in height was fabricated (Figure 6). Polydimethylsiloxane (PDMS)-based phase-shift photolithography, as described in reference [19] or projection lithography were used to obtain 70 and 140 nm, or 250 nm nanoposts, respectively (Figure 6B–D). Our collection of pillars was completed with an array of 40 nm nanoposts (Figure 6A), which was obtained by thermally growing a 120 nm silicon dioxide layer on 70 nm nanoposts, followed by oxide removal using fluorhydric acid wet etching (SI, Figure S1). Note that the comparison of electric- versus hydrodynamic-driven DNA–nanopost interactions required the growth of a 100 nm insulating layer of silicon dioxide on the 250 nm nanoposts, so that nanoposts for electrophoretic experiments measured 300 nm in radius. The distance between

nanoposts was set to $\approx 3 \mu\text{m}$, so that the density of obstacles, as defined by the diameter-to-spacing length ratio, spans 0.03 to 0.17. This regime corresponds to a dilute-to-semidilute array,^[20] in which the spacing between posts is sufficiently low to allow DNA molecules to recoil between consecutive collisions.

In order to obtain functional devices, two access holes, which served as fluidic inlet and outlet, were drilled by sand blasting. The channels were eventually sealed using a thin layer of hard-PDMS spin-coated on glass coverslips (see reference [19] for details of the protocol), which was activated by oxygen plasma in order to bring silicon and PDMS surfaces into conformal contact for bonding. Note that this bonding technology did not require high pressures or temperatures, and thus did not induce the collapse of nanopillars. Overall, a complete toolbox to monitor DNA–post interactions at the nanoscale is devised.

Single-Molecule Imaging: Single-molecule experiments were conducted with λ -DNA molecules (48.5 kbp), and a fragment of 34.7 kbp obtained by cleavage of λ -DNA with the restriction enzyme BmtI (note that the digestion generates a by-product of 13.8 kbp that was used for size-separation experiments). DNA was fluorescently labeled with YOYO-1 (Molecular Probes) at a staining ratio of 1 fluorophore per 5 bp after careful titration of DNA and YOYO-1 by absorbance spectroscopy at 260 and 488 nm, respectively. The buffer was 0.1X TBE (Tris-HCl 8 mM, borate 8 mM, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5 mM), and it was supplemented with 5% dithiothreitol to reduce photo-induced damages, and with 2% polyvinylpyrrolidone (PVP, 360 kDa) to suppress nonspecific interactions and electro-osmotic flows. Note that this relatively high concentration of polymer in comparison to reference experiments (e.g., reference [21]) could affect the viscoelasticity of the flow inside this microchannel, and it was assumed that the relatively low molecular weight of PVP should not have a major effect besides coating the microchannel walls. Imaging was performed with a Zeiss epifluorescence microscope equipped with the 38HE filter set (Zeiss), and with a Lumencor Light Engine emitting at 475 nm with a 28 nm bandwidth and a power of 20 mW. An ANDOR iXon-885 camera was used to observe single DNAs using a binning of 4×4 , and a pixel size of 0.33 μm . Exposure times varied from 20 to 40 ms depending on the requirements of the experiment (see SI, Video 1 to assess the quality of videos). DNA manipulation was performed using electrophoresis or pressure actuation that was monitored by a Fluigent pressure manager in the range 0–1000 mBar. Migration speeds were controlled with an accuracy of 15% from one experiment to the other.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

We are grateful to K. Dorfman for critical reading and constructive comments on the manuscript. Y.V. thanks the Defence Procurement Agency (DGA) for PhD fellowship funding, and we thank the TEAM research facility for support in fabrication. This work and the fellowship of Q.H. were supported by the ANR program JC08_341867.

- [1] B. M. Olivera, P. Baine, N. Davidson, *Biopolymers* **1964**, *2*, 245–257.
- [2] L. Mitnik, L. Salomé, J. L. Viovy, C. Heller, *J. Chromatog. A* **1995**, *710*, 309–321.
- [3] A. T. Woolley, R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11348.
- [4] W. D. Volkmuth, R. H. Austin, *Nature* **1992**, *358*, 600–602.
- [5] O. Bakajin, T. A. J. Duke, J. Tegenfeldt, C.-F. Chou, S. S. Chan, R. H. Austin, E. C. Cox, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6053–6056.
- [6] W. D. Volkmuth, T. Duke, R. H. Austin, E. C. Cox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6887.
- [7] W. D. Volkmuth, T. Duke, M. C. Wu, R. Austin, A. Szabo, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *72*, 2117–2120.
- [8] T. Duke, G. Monnelly, R. H. Austin, E. C. Cox, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 17–22.
- [9] P. S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud, J. L. Viovy, *Science* **2002**, *295*, 2237.
- [10] R. Ogawa, H. Ogawa, A. Oki, S. Hashioka, Y. Horiike, *Thin Solid Films* **2007**, *515*, 5167–5171.
- [11] H. Cao, J. O. Tegenfeldt, R. H. Austin, S. Y. Chou, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 3058.
- [12] Y. C. Chan, Y.-K. Lee, Y. Zohar, *J. Micromech. Microeng.* **2006**, *16*, 699–707.
- [13] N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, Y. Baba, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 15–22.
- [14] J. Ou, M. N. Joswiak, S. J. Carpenter, K. D. Dorfman, *J. Vac. Sci. Technol. A* **2011**, *29*, 011025.
- [15] M. Kenward, G. W. Slater, *Eur. Phys. J. E* **2006**, *20*, 125–141.
- [16] N. P. Teclemariam, V. A. Beck, E. S. G. Shaqfeh, S. J. Muller, *Macromolecules* **2007**, *40*, 3848–3859.
- [17] M. Murat, G. S. Grest, *Macromolecules* **1989**, *22*, 4054–4059.
- [18] D. Long, J. L. Viovy, A. Ajdari, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 3858–3861.
- [19] Y. Viero, Q. H. He, A. Bancaud, *Microfluidics Nanofluidics* **2011**, DOI: 10.1007/s10404-011-0888-0.
- [20] K. Dorfman, *Rev. Mod. Phys.* **2010**, *82*, 2903–2947.
- [21] G. C. Randall, P. S. Doyle, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7734–7745.
- [22] G. I. Nixon, G. W. Slater, *Phys. Rev. E* **1994**, *50*, 5033–5039.
- [23] E. M. Seveck, D. R. M. Williams, *Phys. Rev. E* **1994**, *50*, 3357–3360.
- [24] S. Popelka, Z. Kabatek, J. L. Viovy, B. Gas, *J. Chromatog. A* **1999**, *838*, 45–53.
- [25] D. E. Smith, T. T. Perkins, S. Chu, *Macromolecules* **1996**, *29*, 1372–1373.
- [26] F. Brochard, P. G. de Gennes, *J. Chem. Phys.* **1977**, *67*, 52–56.
- [27] J. L. Viovy, *Rev. Modern Phys.* **2000**, *72*, 813.
- [28] G. S. Manning, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3607–3616.
- [29] O. B. Bakajin, T. A. J. Duke, C. F. Chou, S. S. Chan, R. H. Austin, E. C. Cox, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 2737–2740.
- [30] C. U. Murade, V. Subramaniam, C. Otto, M. L. Bennink, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 835–843.
- [31] K. Günther, M. Mertig, R. Seidel, *Nucleic Acid Res.* **2010**, *38*, 6526–6532.
- [32] N. Minc, J.-L. Viovy, K. Dorfman, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 198105.
- [33] A. S. Panwar, S. Kumar, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 925.
- [34] D. E. Smith, H. P. Babcock, S. Chu, *Science* **1999**, *283*, 1724.
- [35] P. S. Doyle, E. S. G. Shaqfeh, A. P. Gast, *J. Fluid Mech.* **1997**, *334*, 251–291.
- [36] P. LeDuc, C. Haber, G. Bao, D. Wirtz, *Nature* **1999**, *399*, 564–566.
- [37] P. S. Doyle, B. Ladoux, J. L. Viovy, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 4769–4772.
- [38] F. Brochard-Wyart, *Europhys. Lett.* **1995**, *30*, 387.
- [39] N. Minc, P. Bokov, K. B. Zeldovich, C. Fütterer, J. L. Viovy, K. D. Dorfman, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 362–375.
- [40] A. Mohan, P. S. Doyle, *Macromolecules* **2007**, *40*, 8794–8806.
- [41] S. P. Holleran, R. G. Larson, *Macromolecules* **2008**, *41*, 5042–5054.
- [42] W. Reisner, K. Morton, R. Riehn, Y. Wang, Z. Yu, M. Rosen, J. Sturm, S. Chou, E. Frey, R. Austin, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 196101.
- [43] S. Burlatsky, J. Deutch, *Science* **1993**, *260*, 1782–1784.
- [44] D. W. Olson, J. Ou, M. Tian, K. D. Dorfman, *Electrophoresis* **2011**, *32*, 573–580.
- [45] G. Taylor, *Proc. Royal Soc. London A. Math. Phys. Sci.* **1953**, *219*, 186–203.
- [46] A. Ajdari, N. Bontoux, H. A. Stone, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 387–392.
- [47] A. Bancaud, G. Wagner, K. D. Dorfman, J.-L. Viovy, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 833–839.
- [48] J. Cho, S. Kumar, K. D. Dorfman, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 860–867.

Received: July 5, 2011

Revised: August 10, 2011

Published online: October 21, 2011