



Développement de systèmes fluidiques dédiés à la manipulation d'ADN dans réseaux de nanoplots : étude à l'échelle de la molécule unique et application à la séparation

Yannick Viero

► To cite this version:

Yannick Viero. Développement de systèmes fluidiques dédiés à la manipulation d'ADN dans réseaux de nanoplots : étude à l'échelle de la molécule unique et application à la séparation. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. INSA de Toulouse, 2011. Français. NNT : . tel-00660356

HAL Id: tel-00660356

<https://theses.hal.science/tel-00660356>

Submitted on 16 Jan 2012

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'INSA de Toulouse
Discipline ou spécialité : *Micro-Nanosystèmes*

Présentée et soutenue par Yannick VIERO
Le 13 décembre 2011

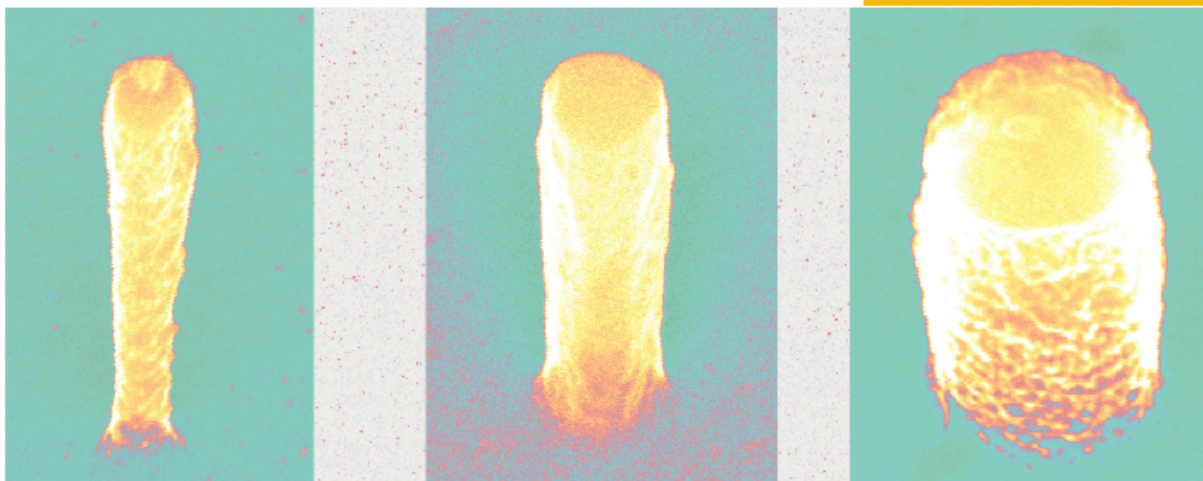
Titre :

Développement de systèmes fluidiques dédiés à la manipulation d'ADN dans réseaux de nanoplots : étude à l'échelle de la molécule unique et application à la séparation

JURY

Pr. Pascal Mailley, rapporteur
Pr. Bernard Tinland, rapporteur
Pr. Bertrand Raquet, examinateur
Dr. Rose-Marie Capella, examinatrice

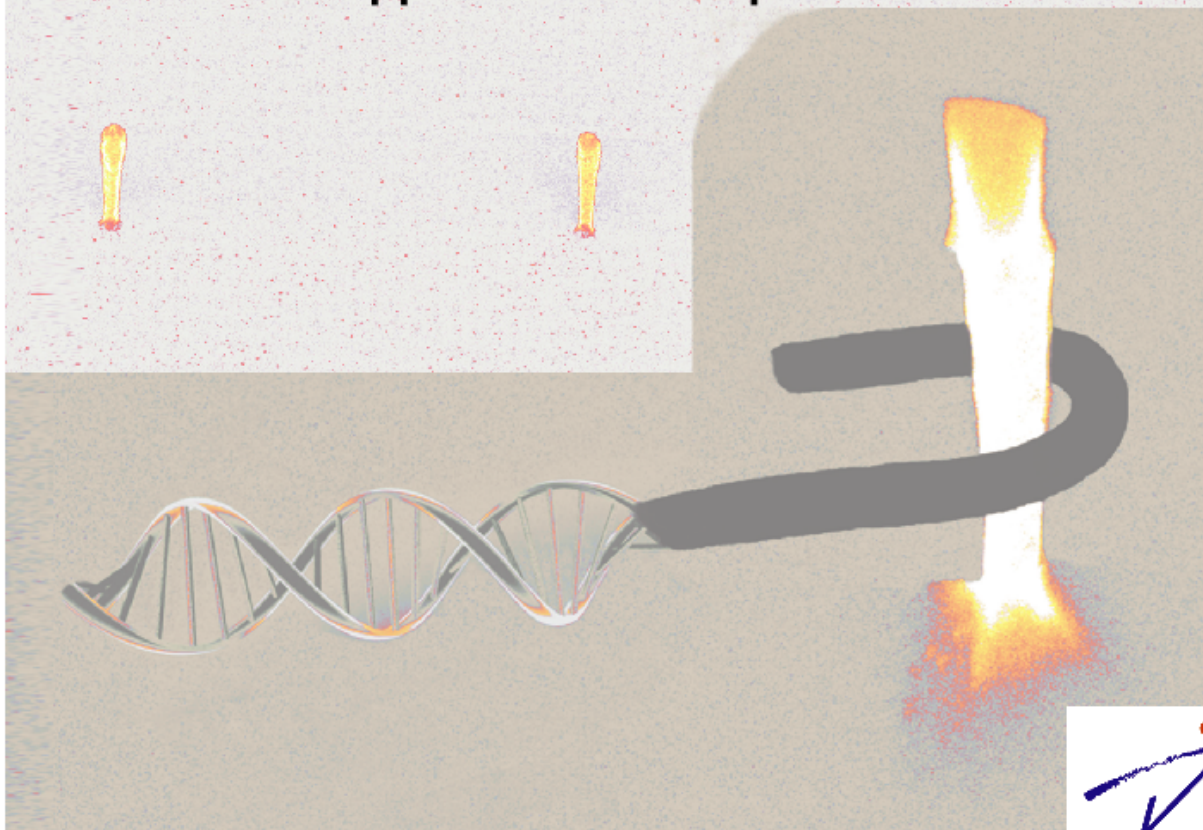
Ecole doctorale : GEET
Unité de recherche : LAAS/CNRS
Directeur(s) de Thèse : Pr. Jean-Yves Fourniols et Dr. Aurélien Bancaud
Rapporteurs :



Développement de systèmes fluidiques dédiés à la manipulation d'ADN dans des réseaux de nanoplots:



**étude à l'échelle de la molécule unique
et application à la séparation**



Directeurs de thèse: M. Jean-Yves Fourniols
M. Aurélien Bancaud



Remerciements

Près de quatre années se sont écoulées depuis mon arrivée au LAAS en février 2008. Quatre années qui m'ont permis de m'immiscer dans le monde de la recherche scientifique, quatre années des plus enrichissantes, quatre années qui ont débuté par un stage de fin d'étude et qui se concluent par ce manuscrit... le parcours suivi n'a pourtant pas été linéaire, et c'est avec un petit pincement au cœur que je vois à présent une page importante de ma vie se tourner vers d'autres aventures.

J'ai effectué mon travail de thèse au sein du groupe Nano-Ingénierie et Intégration des Systèmes, dirigé par Jean-Yves Fourniols, que je tiens à remercier pour son accueil. C'est également l'ensemble du groupe que je tiens à remercier, pour les échanges informels qui m'ont été utiles tout au long de ma thèse.

Mes travaux de thèse ont été dirigés par Aurélien Bancaud, qui m'a accueilli avec enthousiasme et gentillesse. Ses grandes qualités humaines, associées à un sens scientifique aiguisé, en ont fait un directeur de thèse dont rêve tout doctorant, je m'en rends particulièrement compte avec le recul. Ses orientations m'ont permis de développer un travail original, sa constante disponibilité et ses remarques toujours pertinentes ont permis de considérablement gagner en efficacité. Surtout, c'est pour tout ce qu'il m'a appris, notamment en termes de micro-nanofluidique, de manipulation de molécules d'ADN, domaines pour lesquels j'arrivais sans aucun bagage, que je tiens à le remercier chaleureusement. Je le quitte avec regret en lui souhaitant bon vent pour la suite de sa carrière qui sera je n'en doute pas des plus brillante.

Je souhaite remercier Houssam Hajjoul, Julien Mathon, Hubert Ranchon et Joris Lacroix, doctorants également encadrés par Aurélien, pour leur aide précieuse et leur gentillesse. Mais j'ai toutefois une pensée particulière pour Qihao He, car nous avons travaillé en étroite collaboration pendant plus de deux ans (et même jusqu'à la fin). Qi a toujours été disponible, facile à vivre, extrêmement compétent, et je pense que je n'aurais pas pu aller aussi loin sans sa collaboration. Merci à toi Qi, j'espère que ta soutenance va bien se passer et que la suite sera heureuse.

J'ai une pensée particulière pour les membres du groupe microfluidique (Pierre Joseph, Alla Allouch, Maud-Alix Mader, Ana Trapaidze....) pour les échanges que nous avons eu notamment lors des réunions microfluidique hebdomadaires, toujours dans la bonne humeur. Plus généralement, et en oubliant certainement un grand nombre d'entre eux (je m'en excuse

par avance), je remercie dans le désordre Thierry Leichley, Henri Camon, Thierry Camps, Jean-François Le Neal, Pierre Yameogo, Sebastiano Brida, Rémy Fulcrand, Ali Boukabache, Sofian Soulimane, Georges Landa, Mehdi Djafari Rouhani..., toutes les personnes qui ont partagé avec moi conseils et connaissances scientifiques au cours de ma thèse.

J'en profite pour saluer amicalement Robert Darmana, qui m'a aidé à prendre une décision capitale : « si tu as de quoi soutenir, soutiens ! ».

Outre l'aspect scientifique, j'ai également partagé de grands moments avec la bande des « copains » du LAAS. Je vais essayer de ne pas en oublier : Vincent Picot, qui devait en plus me supporter dans le bureau, bravo pour ton courage, Sébastien Cargou, Stéphane Pinon, Maéva Collet, Lamine Ourak bogosse, Teddy Borr (même s'il aurait pu raconter ses blagues en se faisant moins prier), Hubert Ranchon, Ioan Burciu, Julien Juyon, Jonathan Boucher, Thomas Epert, Sven Salomon, Lucie Nguyen, Jérôme Lubin, François Blard, Arnaud Cazale, Pierre-Henri Merrer. Combien de repas, de pauses café partagés, combien de blagues racontées (notamment les mercredi et vendredi n'est-il pas) ? Combien de débats passionnés (merci Ioan pour avoir constamment pris le parti adverse sans lequel tout débat est impossible), essentiellement politiques ? Les conclusions étaient toujours les mêmes, mais c'était toujours excellent. Merci messieurs dames, je vous fais des gros bisous et vous souhaite le meilleur pour la suite, vous êtes chouettes !

Je ne voudrais pas oublier la bande des « copains » à l'extérieur du labo, les soirées (plus ou moins nombreuses selon les périodes), les week-ends de vadrouille, la complicité, tout ce que les amis peuvent apporter, et qui est pour moi indispensable. Merci aux collocs successifs : Yvan, Ramou, Ilias, Jojo, Titi (jusqu'au bout ça c'est courageux !), pour la vie de famille. Merci à Chemeu, Aymenn, Julie, Feyrouz, Adil, Ptite pillule, Pedro, Cléo, Ninou, Adrien, Juh, Pouletch, Charly, Chocho, Chacha, Avril, Leila, Skafestif, Vinçou, Nathan, Mélo, Lili, Dub, Audrey, Pauline, Pathé, Willow, Allison, Hassan, Ronan, Marie, Elisa, ...punaise j'arrête là mais ceux que j'ai oubliés vont me tuer, désolé ! Vous avez grandement participé à faire de moi ce que je suis, je ne sais pas si c'est bien, mais moi ça me va !

Bien évidemment, ma famille a énormément compté, pour leur soutien et l'envie d'apprendre qu'ils m'ont aidé à développer tout au long de ma vie. Mes parents bien sûr, mais également mes grands parents et mon tonton, tous fiers de voir le petit arriver au bout de ses études : « on va enfin te voir un peu plus ! ». Je vous aime fort. Enfin, c'est toi Virginie qui m'a supporté au quotidien, surtout sur la fin quand les nerfs étaient « un peu » à fleur de peau. Tu as su me donner de l'énergie et me rassurer pour arriver au terme de cette aventure. A nous

d'ouvrir une nouvelle page, en espérant qu'elle soit aussi heureuse que celle qui s'achève : où c'est qu'on signe ?

« D'une façon générale cet ouvrage est dédié à toutes les personnes avec qui mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants ».

Table des matières

Avant propos	1
--------------------	---

Chapitre 1: Historique sur les techniques de séparation de molécules d'ADN

1.1 L'ADN, du séquençage au polyélectrolyte modèle	4
1.2 Séparation par électrophorèse sur gel.....	7
1.2.1 Les origines de l'électrophorèse	7
1.2.2 L'électrophorèse sur gel devient la stratégie standard pour la séparation.....	10
1.2.3 La reptation, modèle pour l'électrophorèse sur gel	13
1.3 Développement de nouvelles stratégies	16
1.3.1 Electrophorèse par champ pulsé	16
1.3.2 Electrophorèse capillaire	18
1.3.3. Séparation hydrodynamique en solution libre	20
1.3.4 L'émergence des laboratoires sur puce	22
1.4. Séparation dans des réseaux d'obstacles microfabriqués.....	22
1.4.1. Electrophorèse à champ continu dans de réseaux microfabriqués	22
1.4.2. Electrophorèse à champ pulsé dans des réseaux microfabriqués	24
1.4.3. Séparation par diffusion.....	24
1.4.4. Séparation entropique	26
1.5. Un nouvel enjeu : la diminution en taille des obstacles	27

Chapitre 2: Fabrication de réseaux d'obstacles nanométriques

2.1. Fabrication de structures à l'échelle nanométrique.....	31
2.1.1. Présentation des technologies standards de nanofabrication.....	31
2.1.2. Choisir un matériau adapté.....	35
2.2. Une technologie alternative : La Lithographie par Décalage de Phase.....	37
2.2.1. Présentation de la technologie	37
2.2.2. Fabrication de motifs nanométriques par lithographie par décalage de phase	39

2.2.3. Photolithographie par projection : élargissement de la gamme de structures générées vers les grandes dimensions	43
2.2.4. Utilisation de l'oxydation thermique pour la réduction de la taille des obstacles.....	44
2.3. Intégration des nanostructures dans des dispositifs micro-nanofluidiques	46
2.3.1. Transfert des motifs dans le substrat silicium	46
2.3.2. Perçage des trous d'accès et isolation électrique.....	48
2.3.3. Capotage des dispositifs	49
2.3.4. Connectique fluidique	50

Chapitre 3: Microscopie de fluorescence

3.1. Bref historique.....	53
3.2. Rappels sur la physique de la fluorescence.....	54
3.3. Quelques techniques de microscopie à fluorescence	55
3.3.1. Epifluorescence	55
3.3.2. TIRF	56
3.3.3. Microscopie confocale.....	57
3.3.4. FCS	58
3.3.5. FRET	60
3.3.6. FRAP	61
3.3.7. Microscopie super résolutive.....	62
3.4. Description du dispositif de microscopie adapté au suivi de molécules individuelles	64
3.4.1. Source de lumière	66
3.4.2. Filtres.....	66
3.4.3. Ouverture numérique et grossissement.....	67
3.4.4. La caméra EMCCD, dédiée à une imagerie à bas niveau de lumière	67
3.4.5. Binning	68
3.4.6. Taille du pixel.....	68
3.5. Marquage de l'ADN- λ optimisé pour réduire le rapport signal sur bruit.....	69
3.6. Conclusion sur les résultats d'imagerie obtenus	70

Chapitre 4: Étude des collisions entre des molécules d'ADN et des obstacles cylindriques

4.1. Quelques notions de base	73
4.1.1. Définition du nombre de Péclet	73
4.1.2. Classification des événements de collision ADN-obstacles	77
4.1.3. Description des collisions en fonction de la géométrie du réseau	80
4.1.4. Déplacement par hydrodynamique ou électrophorèse	83
4.2. Etude expérimentale des événements d'interaction ADN / nano-obstacle	84
4.2.1. Déformation de l'ADN dans un écoulement de cisaillement	86
4.2.2. Interaction ADN/obstacle avec une force hydrodynamique / électrophorétique	87
4.2.3. Dynamiques de désengagement en fonction de la taille des obstacles	95
4.2.4. Dynamiques de désengagement en fonction de la taille de l'ADN	98
4.3. Séparation en taille de molécules d'ADN : preuve de concept	101
4.3.1. Séparation hydrodynamique de fragments de 14 et 35 kpb	101
4.3.2. Estimation de la diffusion dans nos dispositifs	103

Chapitre 5: Étude des collisions entre des molécules d'ADN et des obstacles asymétriques

5.1. Eléments théoriques relatifs aux obstacles asymétriques	108
5.2. Effets de l'asymétrie sur les écoulements	109
5.3. Réalisation et caractérisation de plots asymétriques	111
5.4. Présentation des résultats expérimentaux	114
5.4.1 Résultats moyennés sur un ensemble de molécules	114
5.4.2 Etude à l'échelle de la molécule individuelle	116
5.5. Conclusion	119

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives	120
---	-----

Annexes

Annexe A1 : du soft au hard-PDMS	123
A1.1. Formulation du soft PDMS.....	123
A1.2. Formulation du soft PDMS.....	123
Annexe 2: Tenues mécaniques du soft et du hard-PDMS.....	125
A2.1. Etude de stabilité de motifs réalisés en soft et hard-PDMS	125
A2.2. Etude de la déformation du PDMS soumis à une contrainte	126
Article <i>Microfluidics and Nanofluidics</i> :	132
Article <i>SMALL</i> :	141

Références

Références	188
------------------	-----

Avant propos

Dans ce mémoire, nous présentons les résultats de trois années de recherche menées au sein du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes. L'orientation microsystème du laboratoire m'a permis de me confronter avec les technologies de la microélectronique, sur un sujet de recherche largement pluridisciplinaire combinant micro/nanofabrication, micro/nanofluidique, techniques d'imagerie de molécules individuelles, analyse d'images et biophysique. Etre situé à l'interface de ces grands domaines m'a permis de m'immerger dans des communautés très différentes, mais dont les connexions, marquées notamment par l'émergence des laboratoires sur puce, sont désormais affirmées comme l'une des voies vers l'innovation et le développement de nouveaux outils pour la biologie.

En effet, au cours de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, deux technologies majeures ont émergé et profondément modifié notre perception de la science et de la technologie. La première est reliée au champ de la technologie des semi-conducteurs, poussé aujourd'hui par la perspective de nouveaux systèmes rassemblés derrière l'étiquette « nanoélectronique ». La seconde est reliée au développement de la biologie moléculaire. Son point de départ est souvent placé en 1953, date de la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick, et depuis elle tente d'atteindre une compréhension profonde de la vie par l'utilisation de biotechnologies spécifiques. Depuis la fin des années 1990, l'idée d'une convergence possible entre ces deux champs technologiques s'est diffusée dans la communauté scientifique mondiale, avec l'émergence de ce que l'on désigne parfois sous le terme de « nanobiotechnologies ». Un des exemples majeurs de cette convergence s'est révélé avec la course au séquençage, marquée par le lancement du projet *Human Genome* en 1990, accompli en 2003 avec la publication du premier séquençage complet d'un génome humain.

Elément clé du séquençage, la séparation en taille de molécules d'ADN est un des exemples pour lesquels les laboratoires sur puce peuvent être une source d'innovation, l'ambition étant de faciliter l'accès aux séquençages et d'apporter des diagnostics sur des maladies encore largement incomprises comme le cancer.

Nous présentons dans le chapitre 1 une introduction générale sur les techniques de séparation de molécules d'ADN. Elle est le plus souvent réalisée par électrophorèse sur gel, mais une multitude de techniques alternatives ont émergé avec plus ou moins de succès en termes de vitesse et pouvoir de séparation. Apparue il y a 20 ans, l'idée d'utiliser des microsystèmes sur

silicium pour séparer des molécules d'ADN a connu un engouement important, renforcé par des résultats très convaincants obtenus avec des matrices d'obstacles nanométriques.

Dans ce contexte, nous présentons dans le chapitre 2 notre approche originale pour la réalisation de dispositifs de séparation d'ADN à base de matrices de nanoplots. Nous avons utilisé la centrale technologique disponible au sein du laboratoire pour développer une technologie de nanofabrication alternative rapide et robuste, destinée à la réalisation de dispositifs dédiés à l'étude de molécules d'ADN individuelles et présentée dans le chapitre 2.

Nous abordons ensuite dans le chapitre 3 le banc optique que nous avons développé et optimisé pour le suivi de molécules uniques. La séparation dans des réseaux d'obstacle repose sur les interactions ADN-obstacle dépendantes en taille, aboutissant à une séparation effective des molécules. L'enjeu étant d'étudier en détail ces collisions, nous avons développé un banc optique optimisé pour le suivi de molécules individuelles, afin d'atteindre des performances de microscopie pertinentes et adaptées à une étude approfondie des interactions ADN-obstacle.

Grâce au développement de réseaux d'obstacles nanofabriqués et d'un banc optique performant, nous présentons dans le chapitre 4 la première étude des dynamiques de collision ADN-obstacle sous l'effet d'un champ hydrodynamique, afin de comprendre les mécanismes de migration d'une molécule d'ADN, aboutissant à une séparation. Cette étude a été poussée jusqu'au stade de la preuve de concept, avec la validation d'une séparation effective de molécules d'ADN dans nos dispositifs avec une résolution très satisfaisante.

Enfin, dans le chapitre 5, nous présentons la première étude expérimentale des dynamiques de collision entre des molécules d'ADN individuelles et des obstacles asymétriques dans l'optique de déterminer une géométrie optimale pour la réalisation de dispositifs de séparation performants pouvant éventuellement, à terme, être intégrés dans les nouvelles technologies de séquençage ultra-résolutifs.

Au bilan, cette thèse présente un travail original sur les matrices d'obstacles nanofabriqués pour la séparation d'ADN utilisant l'hydrodynamique, exemple concret de nanobiotechnologies pour la biologie moléculaire dans un contexte scientifique marqué par des enjeux cruciaux liés au séquençage.

Chapitre 1

Historique sur les techniques de séparation de molécules d'ADN



1.1 L'ADN, du séquençage au polyélectrolyte modèle

L'ADN, abréviation d'Acide DésoxyriboNucléique, est une chaîne polymérique constituée d'acides nucléiques. Cette molécule est avant tout le support de l'information génétique des êtres vivants. Sa forme caractéristique est en double hélice dite « B », et elle est constituée de deux brins, qui sont des répétitions de nucléotides formés d'un sucre, le désoxyribose, d'un groupement phosphate et de l'une des quatre bases azotées élémentaires (adénine, cytosine, guanine, thymine). Les deux brins sont reliés par des liaisons faibles de type ponts hydrogènes entre nucléotides complémentaires (cytosine-guanine ou adénine-thymine). L'appariement de deux nucléotides constitue la structure unitaire de l'ADN, appelé paire de base (pb). L'espacement entre deux bases consécutives est d'environ 0,34 nm. Du fait de la présence de groupements phosphate sur le squelette de l'ADN, cette molécule est chargée négativement en solution aqueuse. Le caractère polymérique de l'ADN ainsi que ses charges en font un polyélectrolyte de type polyanion.

Outre le fait qu'elle renferme le matériel génétique, la molécule d'ADN a été, et reste encore, massivement étudiée en tant que polymère modèle par les physiciens. Elle peut en effet être produite avec une monodispersité à la paire de base près, et selon une gamme de taille très large, pouvant aller de quelques paires de base à plusieurs millions de paires de base (Mpb), comme dans le cas de chromosomes humains. Il est en outre possible, avec les techniques actuelles d'ingénierie génétique, de produire en masse des molécules dont l'enchaînement de nucléotides est contrôlé tout au long de la chaîne, ce qui a par exemple permis tout récemment de créer des êtres vivants entièrement synthétiques (Gibson et al. 2010).

La structure en double hélice apporte à l'ADN des caractéristiques mécaniques particulières : l'empilement des paires de base se traduit par une rigidité plus importante de l'ADN par rapport à ses deux brins constitutifs. De manière plus quantitative, on caractérise la flexibilité d'un polymère par sa longueur de persistance (l_p), qui est la longueur au bout de laquelle les corrélations d'orientations le long d'une chaîne sont perdues du fait des fluctuations thermiques, et qui caractérise sa rigidité. Celle-ci est classiquement de quelques nm pour les polymères synthétiques ou l'ADN simple brin. La longueur de persistance de l'ADN double brin vaut environ 50 nm, soit 150 pb, ce qui en fait un polymère semi-flexible (la longueur de persistance est nettement plus longue que la distance entre monomères, et inférieure à la longueur de contour de la molécule (David H. Boal 2002)).

La conformation d'une chaîne d'ADN en solution peut être décrite avec un modèle discret fondé sur un assemblage de N_k segments d'orientation aléatoire et de longueur l_k (longueur de Kuhn, égale au double de l_p). L'ADN adopte une conformation en pelote dont le rayon de giration (R_g) peut être exprimé en fonction du nombre de segments par

$$R_g = \frac{N_k^\nu l_k}{\sqrt{6}} \quad (1.1)$$

avec ν le coefficient de Flory, qui a une valeur proche de 3/5 dans le cas d'une chaîne gonflée (viovy 2000).

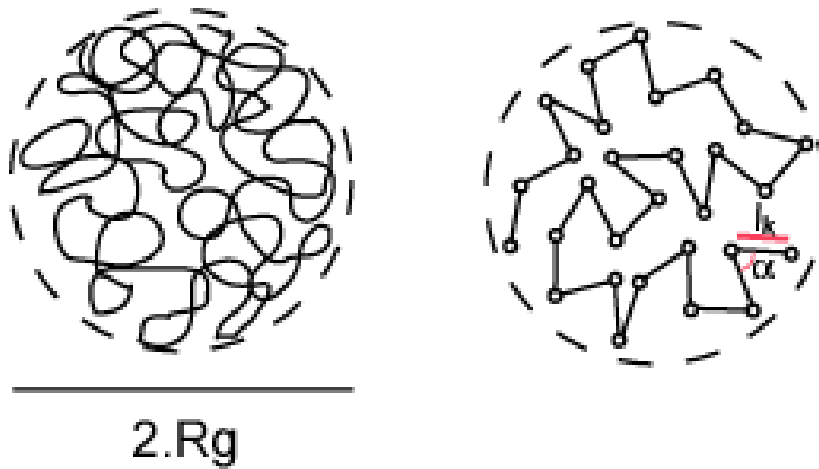


Figure 1.1: Schématisation simplifiée d'une molécule d'ADN en conformation libre. On peut la représenter sous la forme d'une pelote de rayon de giration R_g , ou comme une suite de segments rigides de longueur l_k dont les orientations sont décorrélées

Les technologies d'étude de l'ADN issues de la biologie moléculaire connaissent aujourd'hui un essor remarquable. A titre d'exemple, le génotypage, c'est-à-dire le séquençage du génome d'un individu, est devenu incontournable pour la recherche fondamentale en cancérologie, les tests de paternité ou la détection de maladies (H. Hammond et al. 1994) ; (Lyssenko et al. 2008). Le séquençage de l'ADN a été inventé à la fin des années 70 par deux équipes indépendantes, celle de W. Gilbert et celle de Sanger, les deux équipes publiant leurs résultats en 1977 (Maxam et Gilbert 1977 ; Sanger, Nicklen, et Coulson 1977), et obtenant le prix Nobel de chimie en 1980. C'est l'approche de Sanger (approche par synthèse enzymatique) qui va s'avérer la plus performante et devenir la technique standard de séquençage. Dans cette approche, l'ADN est digéré en de nombreux fragments hétérogènes. Une amorce d'oligonucléotides est ajoutée aux fragments. Le point d'encrage de l'amorce sera le point de départ de la synthèse du fragment complémentaire. L'enzyme ADN polymérase est ensuite

ajoutée, avec des nucléotides « normaux », les désoxynucléotides, ou dNTP (d-ATP, d-CTP, d-GTP et d-TTP) et une faible concentration en nucléotides analogues, les didésoxy nucléotides, ou ddNTPs. Ces derniers sont identiques aux nucléotides normaux, ne différant qu'en deux points. Les groupes hydroxyles (OH) des riboses sont remplacés par des atomes d'hydrogène (H), empêchant l'ajout de nouveaux nucléotides au brin d'ADN par la polymérase. Ainsi, lorsqu'une ddNTP est insérée à un brin d'ADN en cours de synthèse, celle-ci est stoppée. L'autre point clé repose sur le fait que ces ddNTPs ont un marqueur fluorescent attaché (un même marqueur est associé à une famille de ddNTP).

Le produit de la réaction est donc un mélange de molécules d'ADN partiellement synthétisées dont la longueur varie en fonction du point d'intégration du ddNTP. Ces fragments sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel (ou plus récemment par électrophorèse capillaire), un laser va exciter l'ensemble des fragments et les signaux recueillis, qui diffèrent en fonction de la base associée, sont traités par un ordinateur qui va pouvoir remonter à la séquence initiale du brin que l'on cherchait à séquencer. Cette méthode transforme ainsi une information chimique (séquence de nucléotides) en information physique (code couleur) accessible par une lecture laser directe.

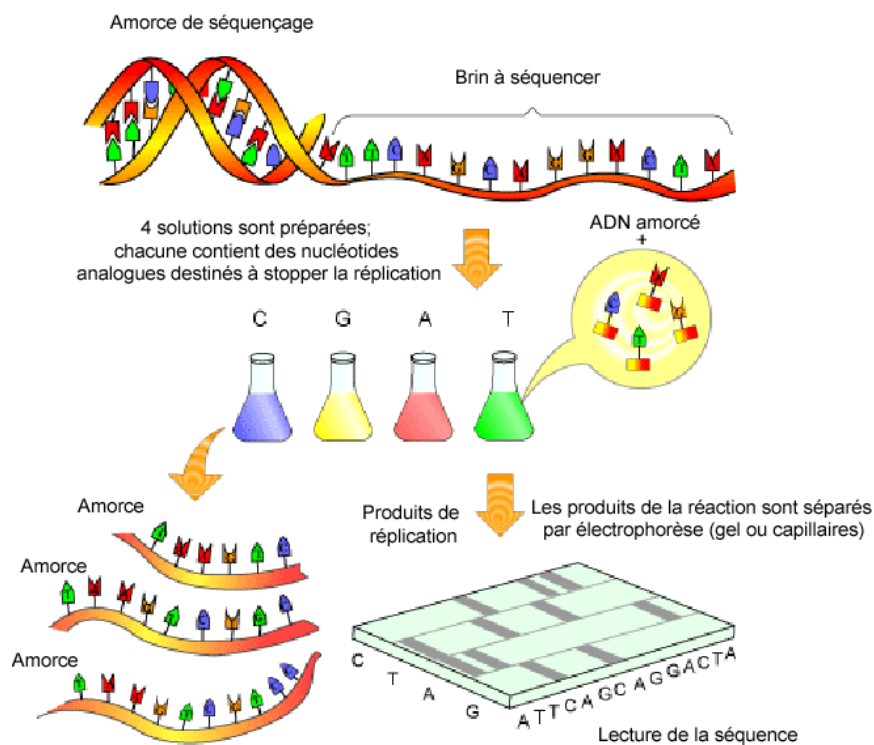


Figure 1.2: Schéma de principe de la méthode de séquençage de Sanger et Nicklen. Un ADN simple brin est amplifié en présence de nucléotides analogues (ddNTPs) qui sont utilisés à la fois pour arrêter la réaction et marqué les fragments d'ADN produits. Ces fragments sont ensuite séparés par taille. Finalement, un ordinateur va lire le signal provenant d'une excitation laser des fragments contenus dans le gel, pour déterminer la séquence du brin d'ADN.

Avant de passer à la section suivante, notons que la course au développement de technologie pour le séquençage n'est pas terminée, comme l'illustre le lancement de la technologie HeliScope développée par l'entreprise Helicos Biosensing de Stephen Quake (<http://www.helicosbio.com>). Cette méthode inventée au début des années 2000 (Braslavsky, Hebert, Kartalov, et Quake 2003a) est présentée comme la première plateforme de séquençage de molécules individuelles à partir d'imagerie molécule unique et de microfluidique (« True Single Molecule Sequencing », tSMS). Cette technologie a notamment permis de séquencer le génome du bactériophage M13, composé de 6407 bases (Harris et al. 2008) et la capacité de séquençage de la firme Helicos Biosensing, annoncée à environ 109 bases par jour, en fait une des technologies actuelles de pointe. Cependant, le coût d'un séquençage par la technologie HeliScope semble trop élevé pour prétendre devenir une technologie de séquençage de masse, et dès lors il est nécessaire de continuer à chercher à optimiser la séparation de molécules d'ADN (notamment) tant en termes de résolution que de vitesse.

La séparation de molécules d'ADN constitue donc une étape primordiale pour le séquençage, et une précision fine est nécessaire pour reconstituer une séquence de nucléotides à la base près. Cette séparation est très majoritairement effectuée grâce à l'électrophorèse, c'est-à-dire en faisant migrer des molécules d'ADN à travers un gel ou une solution de polymères sous action d'un champ électrique. Avant de décrire de manière plus spécifique les mécanismes de migration et de séparation des ADN dans les gels, nous nous proposons de revenir sur le principe et l'histoire de l'électrophorèse.

1.2 Séparation par électrophorèse sur gel

1.2.1 Les origines de l'électrophorèse

La première expérience d'électrophorèse rapportée date de 1807. Réalisée par Ferdinand Friedrich Von Reuss, titulaire d'une chaire à l'université de Moscou depuis 1803, elle met en évidence la migration de particules d'argile sous l'application d'un champ produit par des piles constituées d'un empilement de couples de disques zinc-cuivre, découvertes seulement 7 ans plus tôt par Volta. Dans la publication qui s'ensuit, Reuss décrit deux phénomènes électrocinétiques encore non connus, et qui sont encore certainement aujourd'hui les deux

phénomènes électrocinétiques les plus étudiés : l'électrophorèse et l'électro-osmose. L'électrophorèse est le déplacement relatif d'une particule électriquement chargée (solide, liquide, ou gazeuse) par rapport à un fluide sous l'influence d'un champ électrique. L'électro-osmose est le déplacement d'un liquide lorsqu'il est placé dans une canalisation dont les parois sont chargées.

Lorsqu'une particule de charge électrique Q est placée dans un champ E , elle est soumise à une force

$$F_e = Q.E \quad (1.2)$$

La viscosité du milieu contenant la particule, notée η , induit une force de frottements f , opposée à la force électrique, qui dépend du rayon r de la particule et de sa vitesse de migration v selon la relation

$$f = 6\pi. \eta.r.v \quad (1.3)$$

L'équilibre est atteint lorsque la vitesse de la particule v est constante, et on peut alors exprimer la vitesse en fonction du champ appliqué par la relation

$$v = \frac{Q}{6\pi\eta r} E = \mu E \quad (1.4)$$

On désigne μ comme étant la mobilité électrophorétique de la particule, caractéristique intrinsèque qui permet la séparation d'espèces de mobilité différentes sous l'application d'un champ électrique.

Un siècle plus tard, Hardy (Hardy et Whetham 1899 ; Hardy 1905) découvre que de nombreuses espèces biologiques comme des enzymes ou des protéines possèdent des propriétés électrophorétiques, et qu'il est donc possible de prévoir leur migration en fonction du champ électrique appliqué. Cela amène la communauté des biochimistes à se pencher de près sur ce phénomène (Michaelis 1909). En 1923, Kendall et Crittenden séparent des isotopes d'ions chlorure par l'application d'un champ électrique au sein d'un tube de verre de moins de 4 cm de diamètre contenant une solution ionique et une courte section de gel d'agar (Kendall et Crittenden 1923). Ils rapportent la première expérience de séparation électrophorétique par frontières mouvantes (en anglais *Moving Boundary Electrophoresis*, MBE, cf. figure 1.3).

Ce n'est cependant qu'en 1937 que l'on situe généralement la naissance de la séparation par électrophorèse. Tiselius, reprenant le principe d'électrophorèse à frontières mouvantes montre qu'il est possible de séparer spatialement des protéines contenues dans une solution électrolytique (Tiselius 1937). En 1950, une nouvelle méthode de séparation électrophorétique apparaît, l'électrophorèse de zone (*Zone Electrophoresis*, ZE (Haglund et

Tiselius 1950), fig. 1.3). Cette dernière présente l'énorme potentiel de discriminer complètement les espèces contenues dans la solution. Sa mise en œuvre nécessite de contrer les effets gravitationnels potentiellement responsables de la sédimentation des espèces dans le fond de la chambre de séparation. La ZE utilise un milieu de support. L'étude et l'optimisation de ce support deviendra dès lors un des enjeux majeurs de la séparation.

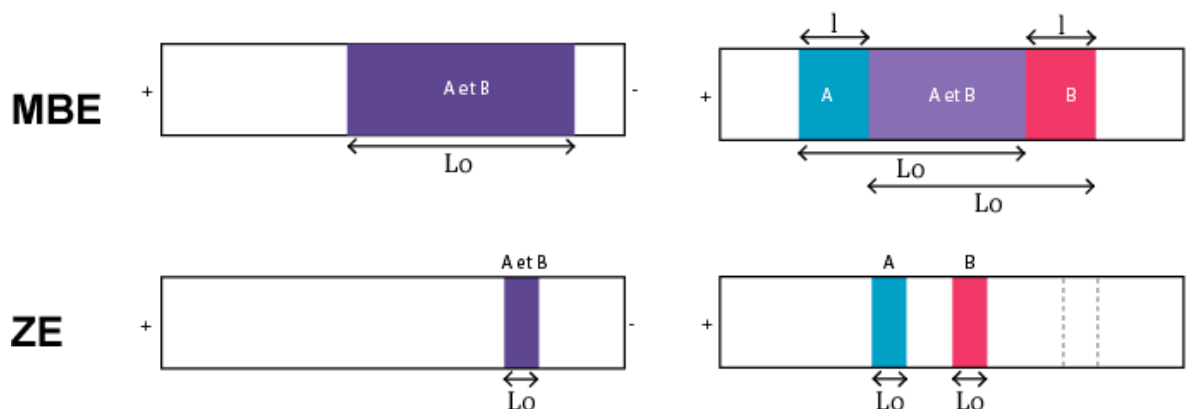


Figure 1.3 : L'utilisation d'un milieu comme support de séparation permet la discrimination complète d'espèces chimiques, apportant une amélioration considérable à la technique d'électrophorèse à frontière mouvantes (MBE) qui existait auparavant.

Les premiers milieux utilisés pour l'électrophorèse sont en phase liquide, mais une limitation importante à la technique vient des phénomènes de convection, qui conduisent à une vitesse de transport des espèces supérieure à l'électrophorèse en elle-même, et réduisent drastiquement le pouvoir de séparation de la technique. En 1939, Klobusitzky et König réussissent à isoler spatialement des espèces contenues dans du venin de serpent en appliquant un champ électrique dans du papier saturé en solution électrolytique (Klobusitzky et König 1939). Cette idée a participé à l'invention quelques années plus tard de la première véritable chromatographie sur papier (Consden, Gordon et Martin 1944). Par la suite, les nombreux développements apportés à cette technique ont permis de séparer de nombreuses espèces biologiques telles que des mononucléotides (Davidson et Smellie 1952), des coenzymes nucléotidiques (D. Siliprandi, Siliprandi et Lis 1954), des di et tri-nucléotides (Markham et Smith 1952), des acides aminés (Evered 1959), mais également des peptides grâce à la première séparation en 2D couplant électrophorèse et chromatographie sur papier (Ingram 1958) pour ne citer qu'elles. L'utilisation du papier comme milieu de séparation présente cependant des inconvénients majeurs, comme la difficulté de déposer l'échantillon à séparer dans une zone suffisamment étroite pour permettre une complète discrimination, mais également par la forte capacité d'adsorption du papier, pouvant perturber fortement les

analyses qui suivent la séparation (Smithies 1955). Ainsi, lorsque Grabbar et Williams effectuent la première séparation sur gel en 1953, la science de la séparation connaît un tournant majeur (Grabbar et Williams 1953).

1.2.2 L'électrophorèse sur gel devient la stratégie standard pour la séparation

Un gel de polymère est un réseau de chaînes polymériques branchées réunies par des liaisons covalentes (comme par exemple pour le polyacrylamide), ou par agrégation physique (comme pour l'agarose). Ce réseau de chaînes enchevêtrées engendre des pores de tailles variables, dépendant de nombreux paramètres comme notamment la concentration en polymère. Les gels polymériques peuvent être utilisés comme matrices de séparation, mais il en existe bien d'autres, que nous allons décrire succinctement.

En 1955, Smithies réalise la première séparation par électrophorèse sur gel d'amidon (en l'occurrence de l'amidon de pomme de terre), et provoque un large engouement de la communauté avec la mise en évidence de l'existence d'un polymorphisme chez une famille de protéines humaines, les haptoglobines (Smithies et Walker 1955). L'électrophorèse sur gel comparée au papier permet une amélioration considérable du pouvoir de séparation. Ainsi, alors que l'on était capable de discriminer que 7 protéines dans le sérum humain, l'électrophorèse sur gel d'amidon permet d'en discriminer plus de 20.

Un autre facteur déterminant fut la mise en évidence du phénomène de tamisage (« sieving »). Les blocks d'amidon utilisés pour la séparation sont alors très concentrés (~15%) et les molécules migrant dans le gel subissent des frictions en raison de la faible taille des pores du gel. Mal compris par Smithies et Walker, ce phénomène est détaillé quelques années plus tard par Porath (Porath et Flodin 1959). En outre, aux concentrations utilisées pour la séparation, les gels d'amidon s'avèrent relativement opaques aux longueurs d'ondes d'émission, ce qui perturbe grandement les analyses. Rapidement abandonnés, ces gels ont toutefois permis de développer les concepts fondamentaux de la séparation électrophorétique sur gel (mécanisme de *sieving*, réduction maximale de la taille de l'échantillon à séparer afin de minimiser le temps nécessaire à la séparation et donc la diffusion).

La recherche de nouveaux supports de séparation accompagne l'essor de cette science et amène la mise au point de deux principaux types de gels dont l'importance est telle qu'on les

retrouve encore aujourd'hui massivement tant dans la recherche académique que dans l'industrie.

Les premiers sont les gels d'agarose. Obtenus par purification d'agar-agar, un polymère contenu dans la paroi cellulaire de certaines espèces d'algues rouges, ils sont formés de liaisons non covalentes sous la forme de structures enroulées qui maintiennent le polymère dans un état de gel. Les gels d'agarose forment des pores dont le diamètre varie typiquement de 200 à 500 nm en fonction de la concentration en agarose dilué (Norton et al. 1986), ce qui les rend tout à fait pertinent pour la séparation de fragments d'ADN de taille supérieure à ~500 pb. Ils ont par conséquent été massivement utilisés pour l'analyse de la digestion par des enzymes de restriction d'ADN clonés (Battey et Clayton 1978 ; Gilroy et Thomas Jr. 1983), la préparation de vecteurs et de fragments pour clonage (Goldberg 1980), la séparation de grands fragments d'ADN (Flint 1977 ; Steck 1994 ; Jones et Chi 1997) ou d'ARN (Lehrach et al. 1977 ; Krieg et Melton 1984) ou la cartographie S1, méthode de caractérisation des modifications posttranscriptionnelles dans l'ARN (A. J. Berk et Sharp 1977 ; Schon et al. 1983).

Les gels d'agarose sont encore aujourd'hui massivement utilisés dans la recherche clinique et l'industrie. Mujico et al. ont ainsi développé une plateforme de PCR en temps réel (Q-PCR) utilisant un gel d'agarose pour améliorer la sensibilité de détection du gluten dans les aliments, dans le but de prévenir les risques pour les patients atteints d'intolérance au gluten, ou d'allergies au blé (Mujico et al. 2011). La recherche industrielle continue elle aussi d'utiliser les gels d'agarose. Citons notamment la publication de Abou-Shamad, où le séquençage de différentes variétés de microalgues a permis de définir un candidat plausible pour la fabrication massive de bio-carburant (Abou-Shanab et al. 2011).

A la même époque se développe l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, qui résulte de la polymérisation de monomères d'acrylamide en chaînes linéaires, liées à un dérivé bi-fonctionnel de l'acrylamide, le N,N'-méthylène-bis-acrylamide. La concentration en acrylamide ainsi que le ratio acrylamide/bis-acrylamide déterminent la taille des pores du gel. L'ajustement de ces paramètres offre au polyacrylamide une gamme optimale de séparation qui varie de quelques pb à 1 kpb environ. Cette large gamme d'utilisation a fait de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide une technique particulièrement adaptée à la purification ou la synthèse d'oligonucléotides (Garbers 1979 ; Mülsch et Gerzer 1991) ; (Kaplan 1998), à l'isolement ou l'analyse de fragments d'ADN de taille inférieure à 1kpb (Harley et White 1972 ; Jeppesen 1980 ; Ranade et al. 2009) et à la résolution de petits

fragments d'ARN (Gould 1966 ; McPhie, Hounsell, et Gratzer 1966 ; Lanyon et Williamson 1968). Cela explique son essor rapide (Hjertén 1963 ; Davis 1964). En 1970, Ulrich K. Laemmli utilise le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) qui, en décorant la surface des protéines, permet de masquer les variations de charges des protéines en fonction de leur contenu peptidique pour obtenir une charge proportionnelle à la taille de la molécule. Il est ensuite capable de séparer les protéines par Electrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide (PAGE) : l'article qu'il publie dans *Nature* (Laemmli 1970) rapporte la découverte de protéines jusqu'alors inconnues dans le bactériophage T4. Avec près de 170 000 citations rapportées, c'est l'un des articles les plus cités de l'histoire.

Aujourd'hui, les gels d'agarose et de polyacrylamide sont les supports standards pour la séparation de molécules d'ADN par électrophorèse. Ils sont disponibles dans le commerce et à bas prix, ce qui explique qu'ils restent aujourd'hui le standard tant pour la recherche que pour l'industrie. Parallèlement à l'essor de ces deux types de gel, on peut également citer, toujours à la fin des années 50, le développement d'un autre support pour la séparation électrophorétique, l'acétate de cellulose. Il permet dans un premier temps de séparer les différents phénotypes de l'hémoglobine (Kohn 1957) ; (D. C. Smith et Murchison 1959). Il connaît un essor rapide, s'avère extrêmement plus rapide que l'électrophorèse sur gel d'amidon et nécessite des quantités inférieures d'échantillon à analyser (Goodwin, Schneider, et Fry 1995). Au cours des années 60, l'acétate de cellulose est principalement utilisé pour l'analyse des protéines contenues dans le sang (Toda, Fujita, et Ohashi 1982) mais également de protéines plus grosses comme l'insuline (Hales et Randle 1963). Des applications moins conventionnelles, relevant de la science médico-légale ou la caractérisation de microorganismes pathogènes (Mebrahtu et al. 1992) sont également rapportées. Ce support présente cependant des inconvénients majeurs comparativement aux gels d'agarose ou de polyacrylamide. Ces derniers, nettement moins chers, ont connu de nombreuses modifications et améliorations qui ont permis d'élargir leur champ d'application possible. Cela n'a pas été le cas de l'électrophorèse sur acétate de cellulose, qui est restée une technique rapide mais peu reproductible et faiblement résolutive (Destro-Bisol et Santini 1995), ce qui explique son quasi abandon (Bartlett 1963 ; Harada, Sawyer, et Dahlberg 1975 ; J. B. Lee et al. 2004 ; Pielesz et Binias 2010).

Malgré leur popularité, les techniques d'électrophorèse sur gel précédemment décrites présentent l'inconvénient majeur de voir leur efficacité de séparation considérablement réduites pour des fragments d'ADN supérieurs à ~40 kpb, en raison de leur taille de pores (J. L. Viovy 2000a). Cela pose des problèmes importants lorsqu'on cherche à discriminer des

ADN génomiques par exemple, dont les tailles peuvent être de plusieurs Mpb. Les scientifiques ont donc cherché à contourner ce problème, et les améliorations apportées sont venues d'une meilleure compréhension des lois régissant le déplacement d'un polyélectrolyte dans un gel. Nous allons à présent brièvement les développer.

1.2.3 La reptation, modèle pour l'électrophorèse sur gel

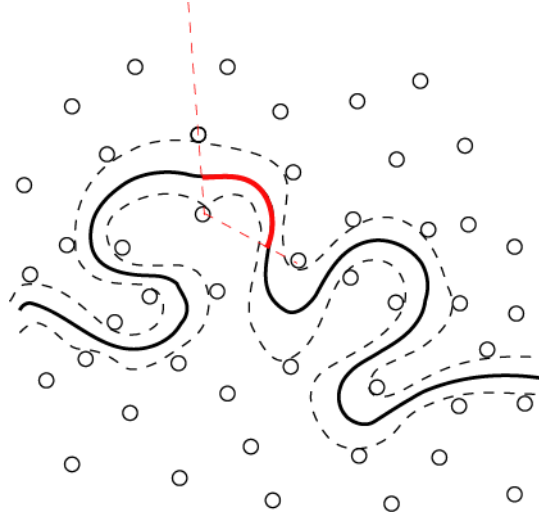


Figure 1.4: schéma illustrant le mécanisme de reptation d'une molécule d'ADN à travers un gel. Les fibres du gel confinent la molécule à l'intérieur d'un tube de diamètre a . La molécule peut être assimilée à une succession de bulbes (en rouge), contenant chacun $(a/l_k)^2$ segments de kuhn.

Le squelette de l'ADN étant chargé négativement en solution ionique, l'application d'un champ électrique va induire une force électrostatique, entraînant le déplacement de la molécule. Le confinement induit par le tube écrante les interactions à longue portée entre les segments de la chaîne, qui sont ainsi considérés indépendants. Les N segments de Kuhn de la chaîne sont assimilés à des ressorts soumis à des frictions aux points de jonction (« *bead-spring model* »), possédant un coefficient de friction ξ_k et une charge q_k . La friction totale subie par la chaîne est alors $N_k \xi_k$ et sa charge totale $N_k q_k$. La force électrique totale appliquée à la chaîne peut alors s'écrire sous la forme $Fe = Q.E = N_k q_k.E$. La friction visqueuse s'exprime sous la forme

$$fv = \xi v = N_k \xi_k v \quad (1.5)$$

v étant la vitesse de la molécule. L'équilibre entre les forces électrique et visqueuse permet alors d'exprimer la vitesse de la molécule

$$v = \frac{N_k q_k E}{N_k \xi_k} = \frac{q_k E}{\xi_k} \quad (1.6)$$

La mobilité de la molécule, $\mu_0 = v/E$, prend donc la forme

$$\mu_0 = q_k/\xi_k \quad (1.7)$$

On en déduit qu'en solution libre la mobilité d'une molécule d'ADN est indépendante de N_k , et donc de sa taille : l'électrophorèse en solution libre ne permet pas la séparation en taille de molécules d'ADN (tout du moins pour des molécules excédant quelques dizaines de pb (J. L. Viovy 2000a)).

Cependant, un grand nombre de techniques ont été proposées pour s'affranchir de cette limitation, la principale étant l'électrophorèse d'ADN sur gel. Nous allons à présent présenter le modèle décrivant le déplacement de molécules à travers un gel sous l'action d'un champ électrique, le modèle de reptation biaisée (Slater et Noolandi 1985).

La reptation classique décrit le déplacement d'une chaîne de polymère dont le rayon de giration est plus important que le diamètre des pores du gel dans lequel elle se déplace. Dans ce modèle, la chaîne est considérée comme « piégée » dans un tube (Edwards 1967) empêchant le déplacement latéral de la molécule. Ce tube est orienté selon l'axe du champ appliqué à l'intérieur du gel, dont les dimensions dépendent de l'environnement de la chaîne (enchevêtrements avec les autres molécules, structure du gel). La similarité de ce comportement avec le modèle développé par de Gennes en 1971 pour rendre compte de la diffusion d'une chaîne dans une solution polymérique, comparable au déplacement d'un serpent (de Gennes 1971), explique le terme de reptation utilisé par les physiciens des polymères.

Le modèle de reptation d'une chaîne d'ADN dans un gel a été développé indépendamment par deux équipes en 1982, celle de Lumpkin et Zimm (Lumpkin et Zimm 1982) et celle de Lerman et Frisch (Lerman et Frisch 1982). Il est admis que le gel est rigide et a une taille de pores a homogène (l'inexactitude de cette hypothèse est l'une des sources d'erreur de ce modèle). La section de chaîne contenue dans un pore est appelée bulbe (« *blob* »), Dans ce modèle, une molécule d'ADN de longueur de contour $L=N_k.l_k$ est assimilée à une succession de bulbes (« *blobs* ») de diamètre égal à la taille des pores du gel, a . Etant admis que la chaîne est flexible à l'échelle d'un pore, les bulbes peuvent donc être considérés Gaussiens. Chaque bulbe contient alors $(a/l_k)^2$ segments de Kuhn. Le nombre de bulbes dans la chaîne est donc égale au nombre de segments de Kuhn de cette chaîne, divisé par le nombre de segments de Kuhn présents dans un bulbe, soit $N=N_k.(l_k/a)^2$. L'énergie nécessaire au déplacement de ces bulbes à travers le gel est minime s'ils se déplacent à travers une séquence de pores par marche aléatoire (« *random-walk*») définissant le tube.

En présence d'un champ, que nous supposons orienté selon l'axe x , chaque blob va subir une force dépendant de son orientation vis-à-vis du champ. Afin que la chaîne reste dans le tube, le champ appliqué ne doit pas dépasser une valeur critique :

$$\frac{q_k E a^3}{2k_B T l_k^2} < 1 \quad (1.8)$$

En désignant par h_x la projection de la chaîne sur l'axe des x (la projection sur l'axe des x de sa distance bout à bout), on peut écrire alors la force électrique agissant sur la chaîne comme

$$F_e = \frac{Q E h_x}{l_k} = \frac{q_k N_k E h_x}{l_k}, \text{ opposée à une force visqueuse } F_v = -\xi L v_{tube} \text{ où } v_{tube} \text{ est la vitesse}$$

de la molécule à l'intérieur du tube formé par les pores. En utilisant les équations (1.5) et

(1.7), on peut exprimer la vitesse v_{tube} sous la forme $\frac{\mu_0 E h_x}{L}$. Comme la vitesse de la molécule

selon l'axe x est reliée à sa vitesse dans le tube par la relation

$$v_x = v_{tube} \frac{h_x}{L} \quad (1.9)$$

On a alors

$$v_x = \mu_0 E \left(\frac{h_x}{L} \right)^2 \quad (1.10)$$

et finalement

$$\mu_x = \mu_0 \left(\frac{h_x}{L} \right)^2 \quad (1.11)$$

Deux cas de figures se présentent :

(i) le champ appliqué est suffisamment faible ($\frac{q_k E a^3}{2k_B T l_k^2} \ll 1$), alors la chaîne est très

faiblement étirée et suit une statistique gaussienne, ce qui implique $\langle h_x^2 \rangle \approx L$. La mobilité électrophorétique peut ainsi s'exprimer sous la forme $\mu_x \approx \mu_0/L$: dans ce cas, on constate bien que la mobilité dépend de la taille, ce qui va permettre la séparation en taille de molécules d'ADN dans le gel.

(ii) si le champ est plus fort, tout en satisfaisant toujours la condition (1.8), on peut considérer que la chaîne est presque complètement étirée ($\langle h_x \rangle \approx L$). La mobilité électrophorétique ne dépend plus de la taille de la chaîne et la séparation en taille devient impossible. On parle alors de reptation biaisée avec orientation : le « choix » de la trajectoire de la tête de la chaîne ne suit plus une statistique brownienne, mais est biaisé par le champ

électrique. Ce biais explique également que les gels ne puissent séparer les très grandes molécules d'ADN. En effet, pour un même champ, une grande molécule sera moins étirée qu'une petite. La transition entre dépendance et indépendance en taille a lieu pour une taille de chaîne (J. L. Viovy 2000a)

$$N^* = \frac{5}{6} \frac{k_B T}{\eta b^2 \mu_0 E} \quad (1.11)$$

L'un des paramètres déterminant de ce déplacement concerne le choix du pore d'entrée effectué par la tête de la chaîne. Sans force extérieure, ce choix est totalement aléatoire. Cependant, sous l'application d'un champ, la direction prise par la tête n'est plus aléatoire (elle est dite biaisée). Ce modèle, bien que partiel et ayant subi d'autres raffinements, permet de rendre qualitativement les observations expérimentales. En effet, il est expérimentalement acquis que la mobilité de petits fragments d'ADN dans un gel est indépendante du champ appliqué (si celui-ci est assez faible), mais pour des grandes chaînes, cette mobilité ne dépend plus que du champ, et pas de la longueur. Ce résultat est primordial car il met en relief l'un des principaux inconvénients de la séparation électrophorétique sur gel : elle s'avère très difficile voire impossible pour des chaînes dont la taille excède ~40 kpb, ce qui est rédhibitoire pour de nombreuses applications dans les domaines médico-légaux, de tests de paternité, ou d'analyse de maladies génétiques (H. Hammond et al. 1994 ; Lyssenko et al. 2008).

1.3 Développement de nouvelles stratégies

1.3.1 Electrophorèse par champ pulsé

Pour parvenir à séparer des molécules de grandes tailles, les chercheurs ont proposé une stratégie fondée sur des champs pulsés dès 1984 (Schwartz et Cantor 1984) ; (Carle et Olson 1984). Dans cette approche, l'orientation du champ électrique est changée suivant différentes direction et de manière périodique (Goering 2010). Comme les plus petites molécules se réorientent plus vite que les plus grandes, la réorientation périodique du champ va entraîner une séparation spatiale des molécules selon leur taille. Comme pour les autres stratégies d'électrophorèse sur gel, la concentration du gel, son épaisseur, mais également la durée et l'intensité des pulses modifient la résolution de la séparation. Cette technique ayant permis de

séparer des molécules 100 fois plus grandes qu'en électrophorèse standard sur gel, elle connaît un essor rapide, et plusieurs variantes ont été étudiées. Citons les trois principales (Fig. 1.5) :

(i) Les dispositifs d'électrophorèse à champ homogène et à contours fixes (*Clamped Homogeneous Electric Field*, ou CHEF), sont les plus couramment utilisés. Ils comportent 24 électrodes, ce qui permet de créer à l'intérieur du gel un gradient de champ très homogène (G. Chu, Vollrath, et Davis 1986 ; Orbach et al. 1988). En contrôlant les électrodes par ordinateur, Clark et al. ont montré que la gamme d'orientation et d'intensité des champs appliqués pouvait être quasi infinie (Clark et al. 1988). Cependant, la réorientation des molécules se fait le plus souvent avec un angle de 120° , car elle produit une migration équidistante sur la droite et la gauche du gel.

(ii) L'électrophorèse sur gel par inversion de champ (*Field Inversion Gel Electrophoresis*, FIGE) est certainement l'approche la plus simple, puisqu'elle ne requiert que deux électrodes (Carle, Frank, et Olson 1986)(Turmel et al. 1990). Le champ appliqué s'inverse périodiquement au cours du temps, et une réorientation à 180° est alors induite. Elle s'avère plus rapide que la CHEF, mais moins discriminante (Gardiner 1991) et s'avère peu adaptée pour la séparation de fragments dépassant les 600 kpb.

(iii) Les dispositifs à rotation du gel modifient périodiquement l'orientation du gel selon deux directions et non plus celle du champ, qui est homogène et constant. Cependant, si l'on se place dans le référentiel des molécules d'ADN, cela équivaut à changer l'orientation du champ.

Malgré les gains considérables apportés à la gamme de séparation, le processus de PFGE est lent, et requiert plusieurs heures voire plusieurs jours pour séparer des longues molécules.

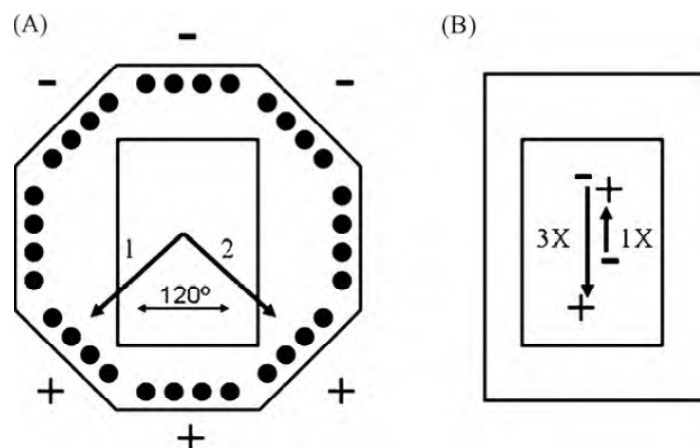


Figure 1.5 : schémas de principe de dispositifs d'électrophorèse à champ pulsé utilisant la technologie CHEF (A) et FIGE (B). Schémas issus de Gardiner et al. (2010).

1.3.2 Electrophorèse capillaire

Au cours de la même décennie, une stratégie de séparation s'est également développée, devenant le standard pour la séparation de courts fragments d'ADN et par conséquent pour le génotypage, il s'agit de l'électrophorèse capillaire (*Capillary Electrophoresis*, ou CE). Elle est décrite pour la première fois en 1981 (Jorgenson et Lukacs 1981). Elle est réalisée dans des tubes en silice fondue dans la majeure partie des cas, dont le diamètre interne varie de 50 à 100 μm sur des longueurs de 10 à 50 cm typiquement (J. L. Viovy 2000a). Dans cette géométrie, le rapport surface-volume est considérablement accru par rapport aux dispositifs classiques. La dissipation par effet Joule de la chaleur y est nettement améliorée, et il devient possible d'appliquer des champs nettement plus grands, typiquement 200-300V/cm, à comparer avec la limite de 50 V/cm pour l'électrophorèse sur gel standard. Cela permet de limiter les effets de diffusion au cours de la séparation, et améliore ainsi le pouvoir de séparation.

Cependant, travailler avec des diamètres internes inférieurs à 100 μm (passer d'un environnement macroscopique à un environnement microscopique) n'est pas sans contrainte, notamment pour le milieu de séparation utilisé. En effet, même si des solutions ont été trouvées pour remplir les capillaires avec des blocs de gels, encrassement, cassure, et formation de bulles peuvent détériorer les conditions de séparation et entraîner de grandes variations de reproductibilité, voire la perte du contact électrique, ce qui nuit de manière critique aux performances des dispositifs fondés sur l'utilisation de capillaires. Ces difficultés, ainsi que l'existence de travaux anciens relatifs à l'utilisation de solutions de polymères en tant que matrice de séparation (Bode 1977), ont conduit de nombreux groupes à repenser le milieu de séparation, en utilisant non plus des blocs de gels de polymère, mais des solutions de polymères plus ou moins diluées. Les solutions de polymère diluées ont été utilisées pour la première fois par Barron et al. en 1993 (Barron, Soane, et Blanch 1993) et les mécanismes de séparation ont été décrits plus tard par Hubert (Hubert, Slater, et Viovy 1996) sur la base de modèles de collisions avec des polymères neutres, qui augmentent la friction. Des vitesses de séparation très rapides pour des tailles n'excédant pas 20 kpb ont été atteintes avec cette technique, mais la résolution est médiocre, en raison notamment d'une gamme de mobilités relativement réduite (J. L. Viovy 2000a). Cependant, des performances remarquables ont été atteintes notamment par Kim et Morris en 1994 et 1995, ou par Hammond en 1997, en combinant électrophorèse capillaire et champs pulsés dans des solutions diluées de polymères linéaires (Kim et Morris 1994 ; Kim et Morris 1995 ; Hammond et al. 1997).

Les solutions de polymères enchevêtrés sont aujourd'hui devenues les supports standards pour la séparation par électrophorèse capillaire. Les enchevêtrements des polymères créent un maillage qui se comporte comme les pores d'un gel (de Gennes 1979) ; Fig. 1.6). Les modèles de séparation sont assez complexes, car ils dépendent de la concentration en polymère que l'on utilise. Cependant, cela n'a pas empêché de nombreuses équipes de prouver la puissance de cette stratégie de séparation (Dovich 1997 ; Goetzinger et al. 1998). La combinaison de l'électrophorèse capillaire dans des solutions enchevêtrées à l'utilisation de champs pulsés a aussi montré des performances remarquables : Heller et al. réussissent en 2001 à séparer des molécules allant jusqu'à 166 kpb en moins de 10 minutes (Heller, Magnusdottir, et Viovy 2001).

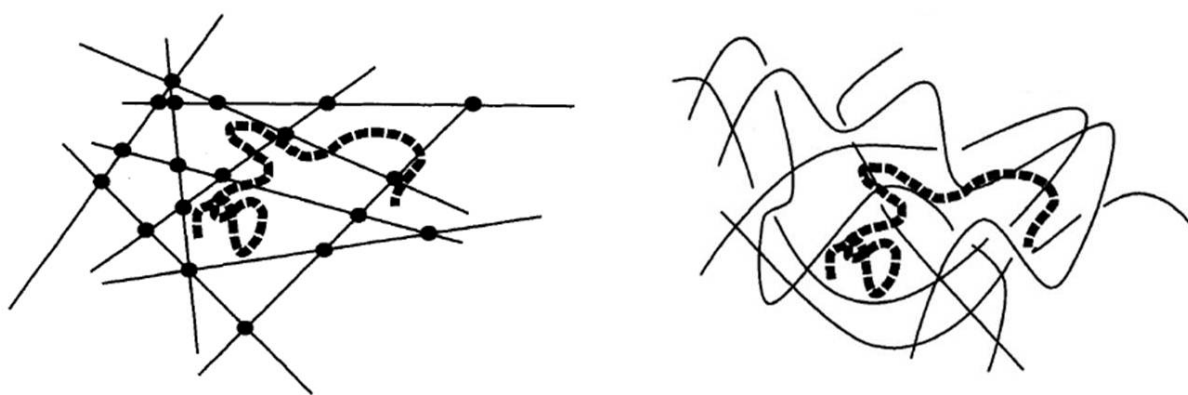


Figure 1.6: les dynamiques de migration d'une molécule d'AND dans un gel (**gauche**) ou dans une solution de polymères enchevêtrés (**droite**) suivent un régime de reptation. Les points d'enchevêtrements jouent le rôle des jonctions covalentes du gel.

Les dispositifs d'électrophorèse capillaire offrent des atouts considérables en termes d'automatisation et de parallélisation qui en ont fait les standards commerciaux actuels. Dès 1988 est rapportée la première électrophorèse capillaire automatisée, avec détection UV sur colonne, injection automatique et détection par ordinateur pour une analyse systématique (Kasper et al. 1988). Cette technologie a ouvert la voie aux premiers équipements industriels de séquençage. Notons que le développement des outils de séquençage a motivé des efforts considérables par de nombreuses équipes à travers le monde dans une véritable course. A titre d'exemple, la stratégie de renouvellement automatisé de la matrice de séparation à l'intérieur des capillaires a été proposée en 1993 (Guttman 1994 ; Ruiz-Martinez et al. 1993) et elle a permis de conserver au cours du temps le pouvoir de séparation du dispositif. Afin de réduire drastiquement le temps de séquençage, il est apparu nécessaire de multiplexer la séparation par l'utilisation de réseaux de capillaires, ce qui a été démontré dès 1992 (Mathies et Huang

1992), ouvrant la voie à de nouveaux enjeux tels que l'accroissement de la sensibilité de détection (Swerdlow et al. 1990). Ainsi, le projet « human genome » a pu être mené à bien avec la publication de son achèvement partiel en 2001 et complet en 2004 (International Human Genome Sequencing Consortium 2004) après plus de 10 années d'efforts et près de 2.7 milliards de dollars dépensés. A titre de comparaison, huit ans plus tard, un génome humain a été séquençé en 5 mois pour un coût d'environ 1.5 million de dollars. Cette révolution du séquençage a été permise par la mise au point de technologies de séquençage dites de « nouvelle-génération » (les « *Next-Generation Sequencing* », ou NGS (Voelkerding, Dames, et Durtschi 2009). Une première plateforme NGS est commercialisée en 2005 par la compagnie 454 Life Sciences. Depuis, les NGS ont considérablement accéléré de nombreux domaines de la recherche génomique, en rendant possibles des expériences techniquement impossibles auparavant. Citons notamment le séquençage de milliers de génomes humains, qui ouvre la voie à une caractérisation et un catalogage des variations génétiques entre les êtres humains sans précédent. Citons également l'identification de polymorphismes et de mutations de gènes impliqués dans certains cancers, avec une finesse encore inédite. Ou enfin son impact capital dans l'étude de la diversité microbienne d'échantillons environnementaux ou cliniques. Pour une analyse plus complète et détaillée, nous invitons les lecteurs à se référer à la revue « Next-Generation Sequencing : From Basic Research to Diagnostics » précédemment citée.

L'accomplissement de l'ambitieux projet de séquençage du génome humain n'a pas ralenti les travaux dans le domaine de la séparation d'ADN, le but étant de réduire encore la durée et le coût d'un séquençage complet, ce qui est devenu un enjeu sociétal fort (santé mais aussi police criminelle notamment). L'Institut National de Recherche des États-Unis sur le Génome Humain (en anglais NHGRI) a réuni des fonds pour une série de projets dont le but est d'abaisser le coût d'un séquençage à 1000 \$ voire moins (Karger et Guttman 2009), ce qui reste le principal ennemi du séquençage aujourd'hui.

1.3.3. Séparation hydrodynamique en solution libre

Dans ce contexte, en 2008, Wang et al. ont rapporté les premières expériences de séparation de molécules d'ADN en solution libre sans application d'un champ électrique (*Free Solution Hydrodynamic Separation*, FSHS). Ils montrent que la manipulation hydrodynamique de molécules d'ADN dans un « nano-capillaire » (500 nm de rayon) de plusieurs dizaines de cm

de longueur permettait de séparer avec une très bonne résolution (X. Wang et al. 2008; Fig. 1.7). L'affranchissement du champ électrique leur permet de séparer dans une même expérience des petits oligonucléotides et des longues molécules d'ADN.

Par la suite, l'équipe du professeur Liu a montré que cette technique était capable de séparer des protéines (X. Wang, Cheng, et al. 2009), des molécules d'ADN de 75 pb à plus de 100 kpb en une seule expérience (X. Wang, Veerappan, et al. 2009) et que la combinaison de la FSHS avec la microscopie confocale permettait de séparer des échantillons contenant 240 yoctomoles ($240 \cdot 10^{-24}$ mol, soit environ 150 molécules ; K. J. Liu et al. 2011). Même si le temps nécessaire à la séparation est relativement important (environ 1h), le coût de fabrication est minime et le seuil de détection atteint est extrêmement bas tout en conservant une résolution de séparation remarquable. En parallélisant massivement ces capillaires, il semble que ces travaux soient très prometteurs, constituant une option supplémentaire pour la réduction des coûts de séquençage.

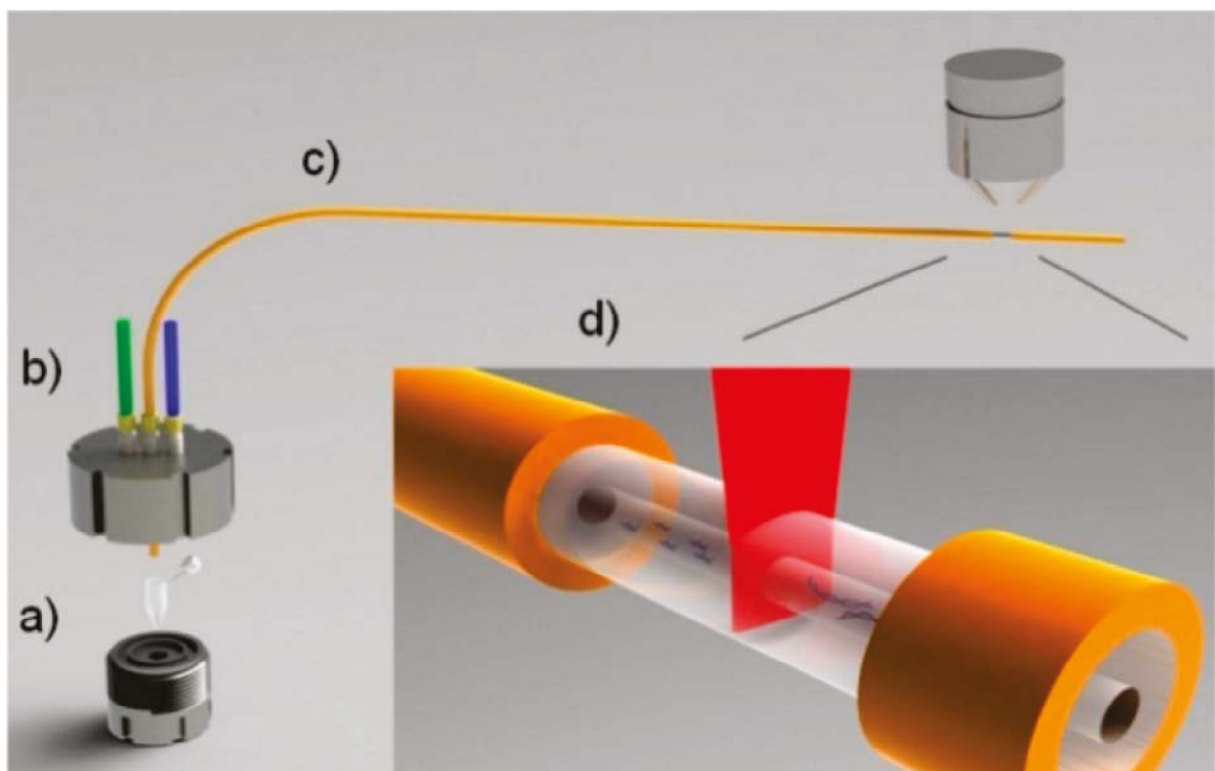


Figure 1.7 : représentation du système de séparation par FSHS utilisé par Wang et al. Il comprend une zone d'injection **(a)**, des ports permettant le contrôle en pression **(b)**, le capillaire de séparation **(c)** et la région d'analyse confocale **(d)**. Tiré de (K. J. Liu et al. 2011).

1.3.4 L'émergence des laboratoires sur puce

Toujours dans ce contexte de course à la réduction des coûts de séquençage, les scientifiques se sont penchés sur la réalisation de dispositifs intégrés sur puce, en tirant partie des avancées spectaculaires des technologies sur silicium. Manz et al. proposent en 1990 la notion de « Systèmes miniaturisés d'analyse chimique totale, abrégée par la suite en Micro Total Analysis Systems, ou MicroTAS (Manz, Graber, et Widmer 1990). Les MicroTAS regroupent sur une même puce l'ensemble d'une chaîne d'analyse d'un échantillon jusqu'au résultat final. Il implique donc la réalisation de fonctions diverses comme le tri, la concentration, le mélange d'espèce chimiques ou biologiques, des fonctions d'actionnement (valves, pompes,...) mais également des capteurs pour l'électronique de lecture associée. C'est encore Manz, qui en 1992 publie la première réalisation d'un laboratoire sur puce permettant de séparer des molécules d'ADN par électrophorèse capillaire (Manz et al. 1992).

En 1992, Volkmuth et Austin publient un article capital (Volkmuth et Austin 1992). Ils proposent l'idée de reproduire artificiellement les matrices de pores des gels pour la séparation électrophorétique en utilisant les techniques de la microélectronique, en particulier la photolithographie et la gravure du silicium. Ils réalisent un dispositif contenant un réseau de microplots avec des dimensions et une périodicité calibrées sur l'ensemble du dispositif. Cette matrice d'obstacles parfaitement régulière laisse espérer des performances supérieures aux gels qui sont intrinsèquement désordonnés.

Nous nous proposons de revenir maintenant sur les avancées qui ont été effectuées grâce aux technologies « silicium » appliquées à l'électrophorèse de l'ADN.

1.4. Séparation dans des réseaux d'obstacles microfabriqués

1.4.1. Electrophorèse à champ continu dans de réseaux microfabriqués

L'article de Volkmuth et Austin de 1992 montre pour la première fois le processus d'interaction de molécules d'ADN, dirigées par actionnement d'un courant continu, avec des obstacles à l'arrêt (Fig. 1.8). En outre, les auteurs indiquent que le temps de traversée du réseau dépend de la taille des molécules, ouvrant la voie à un nouveau mécanisme de séparation. Par la suite, ces collisions ADN-obstacles ont été massivement étudiées

(Volkmuth, Duke et al. 1994 ; Volkmuth et al. 1995 ;Kevin Dorfman 2006), dans le but de déterminer des conditions optimales de séparation. Le mouvement de l'ADN peut être décrit comme celui d'une corde enroulée autour d'une poulie (« *rope-over-pulley* »), se désengageant sous l'effet des forces électrocinétiques. Nous décrirons ce modèle de façon détaillée dans la section 3.1.2.

Il faut attendre la fin des années 1990 pour que les premiers dispositifs de séparation utilisant cette méthode soient mis au point (Volkmuth, Duke et al. 1994). En 2002, Doyle et al. publient pour la première fois une expérience de séparation par collisions dans un réseau d'obstacles. Après avoir injecté une solution contenant des billes magnétiques dans un microcanal en PDMS, l'application d'un champ perpendiculaire à ce canal crée un réseau quasi hexagonal de colonnes de billes, d'un diamètre d'environ $1\mu\text{m}$, espacées d'environ $4\mu\text{m}$. Ce dispositif leur a permis de séparer des molécules d'ADN λ et T4 en moins de 3 minutes (P.S. Doyle, Bibette, Bancaud, et Viovy 2002). De la même façon, Minc et al. montrent en 2005 la séparation de ces ADN en 150 secondes (Minc et al. 2005).

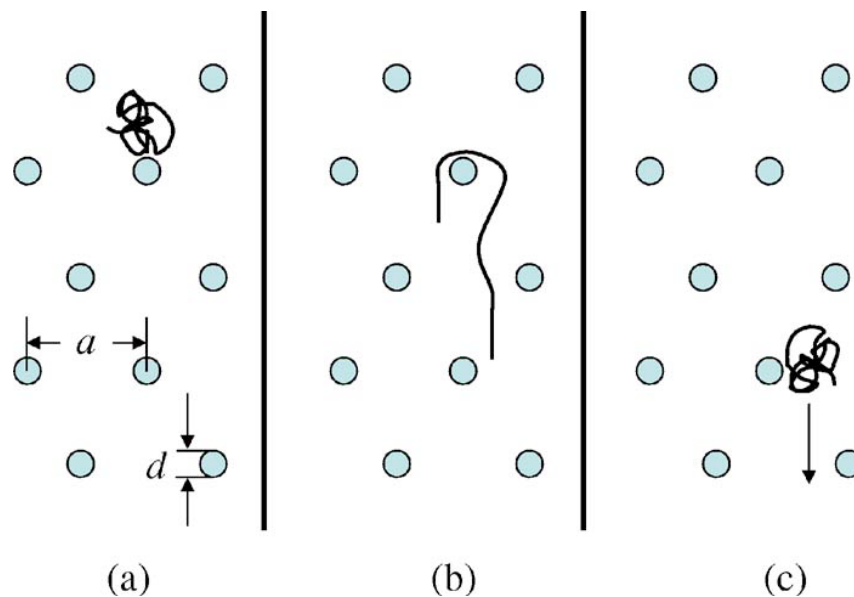


Figure 1.8: schéma descriptif du déplacement d'une molécule d'ADN soumise à un champ continu dans un réseau d'obstacles microfabriqués de paramètre de maille a et de diamètre d . La molécule a une probabilité d'entrer en collision avec un obstacle, ce qui va entraîner sa déformation et un temps de résidence dépendant de la taille de la molécule. Dessin tiré de (K. Dorfman 2006).

1.4.2. Electrophorèse à champ pulsé dans des réseaux microfabriqués

En 1996, Duke et al. ont l'idée d'utiliser le principe de la PFGE, précédemment évoquée dans la section 1.3.1., non plus dans un gel, mais dans un réseau d'obstacles microfabriqués (T.A.J. Duke et al. 1996 ; Fig. 1.9). Ils estiment l'efficacité de la séparation plus efficace que sur gel, de par la régularité du réseau, mais également par la possibilité d'utiliser des champs beaucoup plus forts dans le réseau que dans un gel. En 2001, Bakajin et al. montrent la séparation d'ADN λ et T4 (respectivement 49 et 169 kpb) en 10 secondes, soit certainement la meilleure performance de séparation obtenue à ce jour (Olgica Bakajin, Duke, Tegenfeldt, Chou, Chan, Austin, et Cox 2001a). De plus, le choix des intensités et durées des pulses, tout comme de la géométrie du réseau d'obstacle, peuvent permettre d'appliquer cette technique à une large gamme de molécules, inatteignable sur gel.

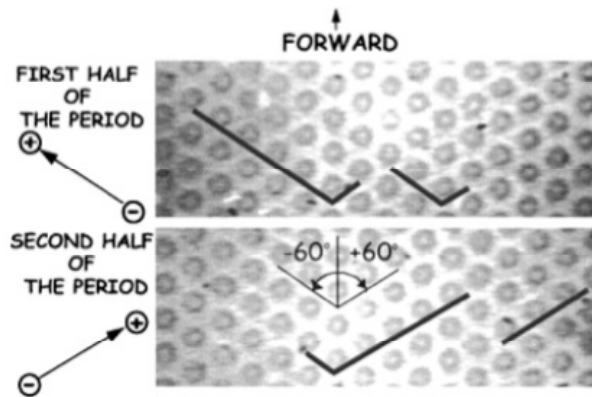


Figure 1.9 : réseau d'obstacles microfabriqués utilisé pour la séparation de molécules d'ADN par Electrophorèse à champ pulsé. Les performances de séparation rapportées sont à ce jour les plus impressionnantes. Image tirée de (Olgica Bakajin, Duke, Tegenfeldt, Chou, Chan, Austin, et Cox 2001a).

1.4.3. Séparation par diffusion

Le théorème de fluctuation-dissipation prédit une dépendance du coefficient de diffusion d'une chaîne polymérique en fonction de sa taille R_g , selon l'équation

$$D = \frac{K_B T}{\xi_c} \approx \frac{K_B T}{\eta R_g}$$

où ξ_c et η représentent respectivement le coefficient de friction de la chaîne considérée et la viscosité du milieu. Cette équation fait apparaître clairement que plus une chaîne est longue, plus elle diffuse lentement dans le milieu. C'est cette idée fondamentale qui est à la base des

travaux de Duke et Austin (TAJ Duke et Austin 1998). Ils décident de réaliser des réseaux d'obstacles perpendiculaires, de dimensions et périodicité micrométriques, orientés selon un axe différent du champ électrique appliqué (avec en l'occurrence un décalage de 45°), et donc de la force agissant sur les molécules d'ADN (Fig. 1.10). Les molécules d'ADN vont suivre le réseau selon un axe diagonal à ce dernier. Cependant, comme elles diffusent au cours de leur migration, elles vont avoir une possibilité de basculer sur une autre diagonale, probabilité d'autant plus grande que leur coefficient de diffusion est fort (et donc plus la molécule est petite). Ainsi, au bout d'un temps de parcours suffisamment grand, le réseau opère une séparation spatiale des molécules selon leur taille, comme illustré sur la figure (1.10).

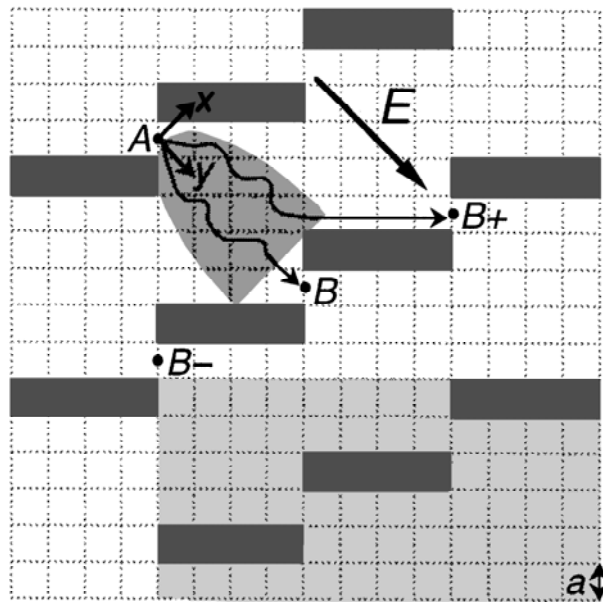


Figure 1.10 : schéma de la séparation par diffusion dans un réseau d'obstacles présentant une asymétrie vis-à-vis du champ électrique., tiré de Duke et Austin (1998). Les molécules de haut poids moléculaire diffusant peu parcourent le trajet AB, alors que des molécules avec un fort coefficient de diffusion, donc courtes effectuent le trajet AB+.

Les performances de ces dispositifs sont dépendantes de la géométrie du réseau, mais également des conditions de manipulation des molécules. En 1999, Chou et Austin montrent que des molécules d'ADN λ coupées avec l'enzyme XhoI (soit des fragments de 15 et 33.5 kbp), suivent des trajectoires différentes dans le réseau, définissant les conditions optimales de séparation de leur dispositif (C. F. Chou et al. 1999). En 2002, Cabodi et al. prouvent la séparation effective de molécule d'ADN T2 et T7 (R_g respectivement égal à 1.1 et 2.3 μm) en moins de 10 minutes (Cabodi, Turner, et Craighead 2002), validant les performances prometteuses des dispositifs de tri par diffusion (*Brownian ratchets*, ou cliquets browniens). Cependant, pour optimiser la séparation, la vitesse des molécules à travers le réseau doit être

relativement faible (1.4 $\mu\text{m/s}$ pour Chou et al.), et ce d'autant plus que les molécules à séparer sont grandes (afin d'éviter au maximum des modifications de conformation, lors des collisions avec les obstacles, qui vont diminuer le rôle joué par la diffusion et donc la résolution de séparation).

1.4.4. Séparation entropique

En 1999, Han et Craighead ont montré que des différences entropiques dans un microsystème fluide pouvaient conduire à une séparation en taille de molécules d'ADN (Han, Turner, et Craighead 1999). Ils se sont inspirés des travaux d'Arvanitidou et Hoagland qui ont montré en 1991 l'existence d'un régime de piégeage entropique dans les gels, qui devient important lorsque la taille des pores de la matrice de gel est comparable au rayon de giration des molécules traversant le gel (Arvanitidou et Hoagland 1991). Han et Craighead ont fabriqué des pièges artificiels dans un microcanal, alternances de zones fines, c'est-à-dire de hauteur inférieure au rayon de giration de la molécule, et de zones plus épaisses, c'est-à-dire de hauteur supérieure au rayon de giration. Ainsi, sous l'application d'un champ électrique, les molécules vont alternativement passer de zones entropiquement favorables (les zones épaisses), et défavorables (les zones fines), entraînant des changements de conformation. Ainsi, lorsqu'un nombre suffisant de monomères entre dans une zone fine, sous l'action conjuguée de la diffusion thermique et de l'application d'un champ électrique, la molécule va pouvoir sortir de sa « trappe entropique », jusqu'à en gagner une prochaine. Comme le temps moyen de piégeage d'une molécule dépend de sa surface en contact avec la barrière entropique, les plus longues molécules vont avoir un temps moyen de piégeage plus court, et vont donc pouvoir se mouvoir dans le réseau de pièges entropiques avec une mobilité supérieure aux molécules les plus courtes, effectuant ainsi une séparation en taille. Han et Craighead ont ainsi démontré en 2000 la séparation de longues molécules (5-160 kpb) en 15 minutes (Han et Craighead 2000).

Les zones à entropie variable ont plus tard été utilisées d'une autre façon par Turner et al. en 2002 pour la séparation d'ADN (S. Turner, Cabodi, et Craighead 2002). Leur technique est basée sur le « repliement entropique ». Tant qu'une molécule ne reçoit pas suffisamment d'énergie pour entrer dans une zone entropiquement défavorable, c'est-à-dire une zone où ses possibilités de conformation sont réduites, elle restera dans la zone entropiquement favorable. Si l'énergie apportée est suffisante pour franchir la barrière entropique, elle va pénétrer dans

la zone entropiquement défavorable. Si on coupe la force appliquée (en l'occurrence un champ électrique), deux cas de figure se présentent : soit la molécule est entièrement entrée dans la zone de faible entropie, auquel cas la molécule va rester dans cette zone, soit elle n'est que partiellement rentrée, et dans ce cas elle va minimiser son énergie interne en se repliant dans la zone de plus forte entropie (fig. 1.11). Turner et al. ont appliqué ce principe en appliquant des séries de pulses électriques dans un microcanal au milieu duquel se trouve une zone à forte densité de nanoplots, donc à entropie plus faible. Au moment du pulse, les molécules vont entrer par reptation entre les nanoplots. En s'arrangeant pour arrêter les pulses avant que les plus longues molécules n'aient complètement pénétrées dans le réseau, ils vont entraîner le repliement de ces dernières dans la zone entropiquement favorable (et uniquement ces dernières), et induire une séparation spatiale des molécules en fonction de leur taille.

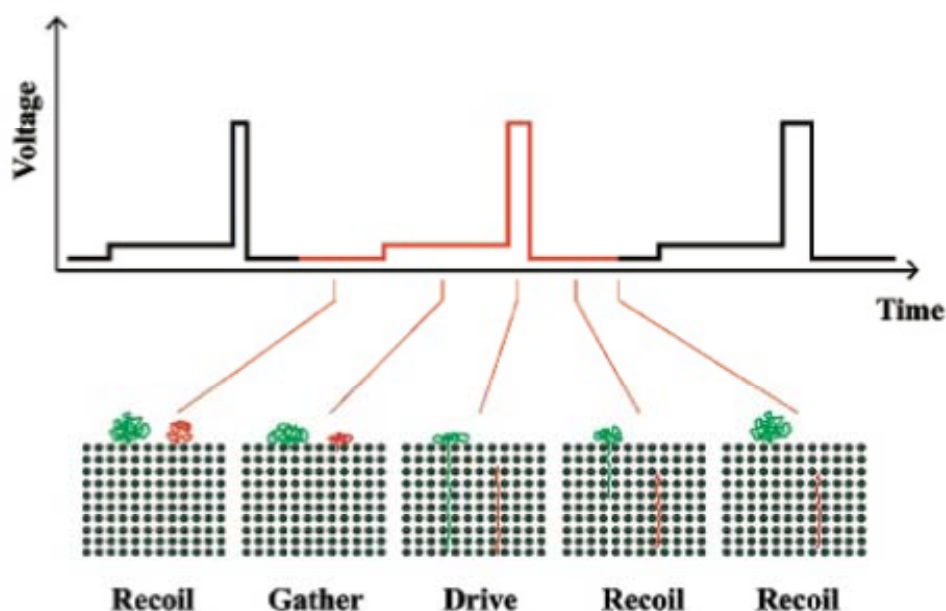


Figure 1.11 : schéma d'une séparation par repliement entropique, tiré de Turner et al. (2002). Sous l'action d'un pulse, la molécule la plus petite (en rouge) entre entièrement dans la zone de faible entropie, alors qu'une partie de la molécule la plus grosse (en vert) reste dans la zone de forte entropie. A la fin du pulse, la molécule rouge reste dans le réseau dense de nanoplots, alors que la verte se replie hors de cette zone. Une séparation spatiale en taille est ainsi réalisée.

1.5. Un nouvel enjeu : la diminution en taille des obstacles

Les interactions ADN-obstacle ont été massivement étudiées dans des réseaux d'obstacles micrométriques (cf. section 4.1.3.). Cependant, il est apparu qu'en diminuant la taille des

obstacles, on pouvait réduire considérablement la probabilité d'interactions glissantes « *roll-off collisions* ». Ces interactions n'entraînent pas le déroulement de la chaîne d'ADN et ne rentrent pas dans le cadre du mécanisme de *rope-over-pulley*. Elles ne dépendent pas de la taille des molécules : les limiter au maximum devient alors un enjeu majeur, une diminution de la dispersion étant attendue lors de la séparation.

En 2004, Kaji et al. réalisent une expérience de séparation dans un réseau dense de piliers de quartz de 500 nm de diamètre espacés de 100 nm, réalisés par lithographie électronique (Kaji, Tezuka, Takamura, Ueda, Nishimoto, Nakanishi, Horiike, et Baba 2004a). Ces dispositifs leur permettent de séparer des ADN λ et T4 en moins de 2 minutes. Quelques années plus tard, Ogawa et al. reproduisirent la même expérience, en réussissant à séparer des ADN de 10 et 38 kpb en 20 secondes (R. Ogawa, Ogawa, Oki, Hashioka, et Horiike 2007a). Ces travaux, aux performances remarquables, présentent toutefois l'inconvénient majeur de nécessiter pour leur réalisation l'utilisation de techniques de nanoélectronique, basées sur la lithographie électronique. Ces équipements, peu disponibles dans la communauté des biophysiciens, sont lourds, très coûteux, et leur écriture sérielle implique un temps de fabrication très long. La lourdeur de ces équipements se traduit par des dispositifs, certes remarquables pour un travail de laboratoire, mais trop coûteux pour entrer en phase industrielle et rentrer en compétition avec les techniques en capillaire. C'est pourquoi il nous a semblé important de réfléchir sur des solutions alternatives à la lithographie électronique pour la réalisation d'obstacles nanométriques. Notons que suivant ces motivations, Araki et Dorfman ont publié en 2010 une étude de collisions entre des molécules d'ADN et des nanofils de ZnO (Araki, Aydil, et Dorfman 2010) ; Fig. 1.12). La technologie de fabrication permet de créer des obstacles nanométriques et à fort rapport d'aspect (une centaine de nanomètres de diamètre, pour une hauteur de 1.5 μm) à moindre coût, et ces dispositifs constituent des outils modèles pour l'étude des interactions entre une molécule d'ADN et un obstacle assimilé à un point. Cependant, une séparation effective en taille n'a pas été possible, de par l'irrégularité des réseaux ainsi formés et l'instabilité des nanofils de ZnO (fig. 1.12).

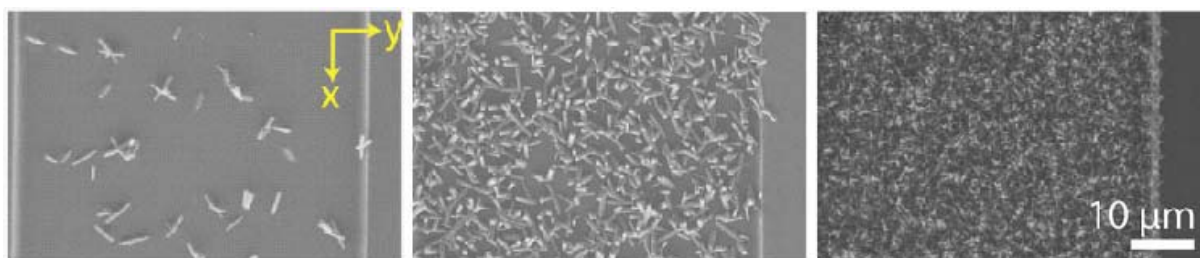


Figure 1.12 : Réseaux de nanofils de ZnO instables et hétérogènes utilisés par Araki et al. (2010) pour l'étude des collisions de molécules d'ADN avec ces nanofils.

Presque toutes les technologies de séquençage industrielles actuellement disponibles nécessitent une séparation ultra-résolutive et ultra-rapide de molécules d'ADN, pour des tailles variant de quelques pb à plusieurs Mpb (idéalement des chromosomes entiers). Il semble aujourd'hui clair que pour espérer atteindre une maturité industrielle quant à la séparation de molécules d'ADN dans des réseaux microfabriqués, il faut dans un premier temps améliorer notre compréhension des dynamiques de migration de ces molécules, encore aujourd'hui très largement évanescentes (D. W. Olson, Ou, Tian, et Dorfman 2011a). C'est pourquoi nous avons voulu nous pencher sur les mécanismes de migration de molécules d'ADN dans des réseaux d'obstacles nanométriques soumises à un flux hydrodynamique, totalement inconnus jusqu'à présent.

Nous présentons tout d'abord une technologie alternative de nanofabrication que nous avons développée pour générer des réseaux d'obstacles aux dimensions et formes ajustables, qui nous ont permis dans un second temps d'étudier en détail ces mécanismes de migration.

Chapitre 2

Fabrication de réseaux d'obstacles nanométriques



2.1. Fabrication de structures à l'échelle nanométrique

2.1.1. Présentation des technologies standards de nanofabrication

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'étude de collisions entre des molécules d'ADN et des obstacles est un enjeu visant à améliorer les dispositifs de séparation. Il va de soi que les développements technologiques reposent sur la fabrication de ces structures. La grande majorité des dispositifs de séparation en taille de molécules d'ADN dans des réseaux d'obstacles microfabriqués ne requièrent, pour leur fabrication, que des équipements de microélectronique. Ces équipements sont aujourd'hui massivement répandus dans les laboratoires, et leur fabrication, massivement parallélisée, reste relativement bon marché. Cependant, les contraintes sont différentes lorsqu'on souhaite réaliser des structures à l'échelle nanométrique. Les technologies disponibles sont souvent lourdes, peu diffusées, notamment dans la communauté des biophysiciens, et le coût est souvent élevé. Il est à noter que selon Georges Whitesides, la raison majeure du faible développement de la nanofluidique, comparativement au développement fulgurant qu'a connu la microfluidique au cours de ces quinze dernières années, provient de ces difficultés d'accès aux technologies de nanofabrication (George M. Whitesides 2011a). A l'heure actuelle, les deux principales technologies utilisées pour la fabrication de structures à ces échelles sont la lithographie électronique et le Nano-Imprint.

La lithographie électronique à balayage (en anglais e-beam Lithography) est la technologie de nanofabrication la plus répandue, car elle atteint des résolutions spatiales extrêmement fines (Fontana 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 blanker pour moduler le 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 2.1 schématise les principaux éléments constituant un équipement de lithographie électronique à balayage.

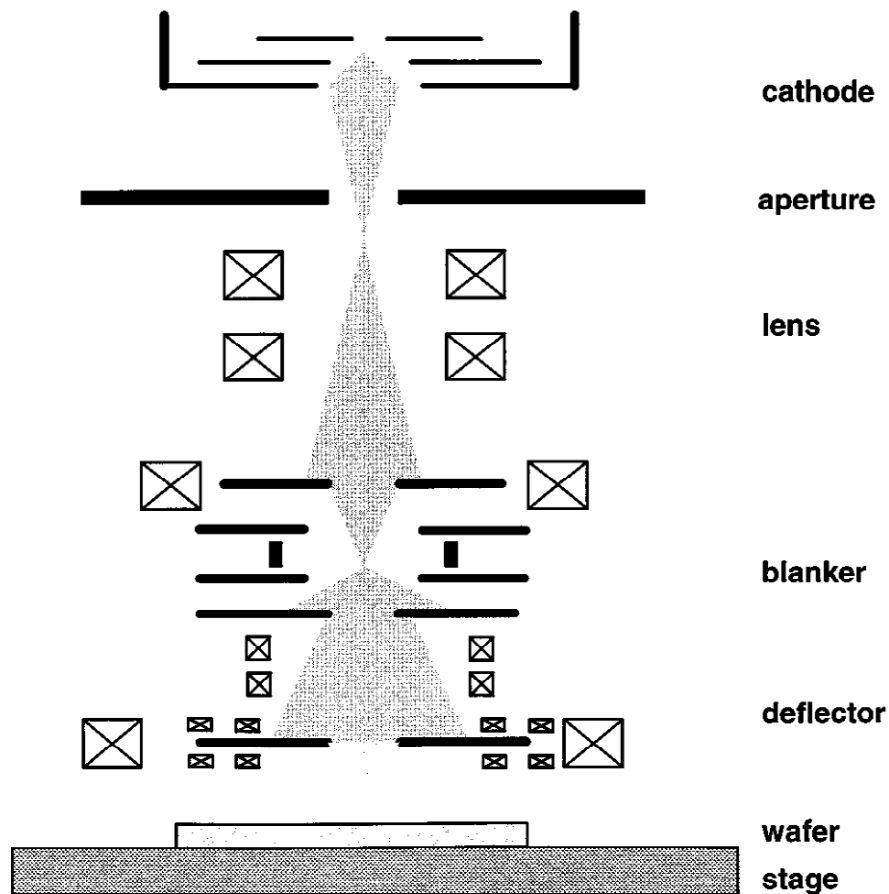


Figure 2.1: schéma de principe d'un équipement de lithographie électronique à balayage. Dessin tiré de Fontana et al. 2002 E-Beam writing: a next-generation lithography approach.

L'exposition vectorielle du faisceau se distingue de l'écriture parallèle des équipements de photolithographie standards et en fait une technologie lente. 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 de séparation (Jia Ou, Joswiak, Carpenter, et Dorfman 2011a). La réalisation de motifs nanométriques plus importants avec de tels équipements impose une technologie de « *step-and-repeat* », c'est-à-dire une succession de champs les uns à la suite des autres. La figure 2.2 montre ainsi les erreurs qui peuvent se produire au niveau de ces zones de raccord de champ.

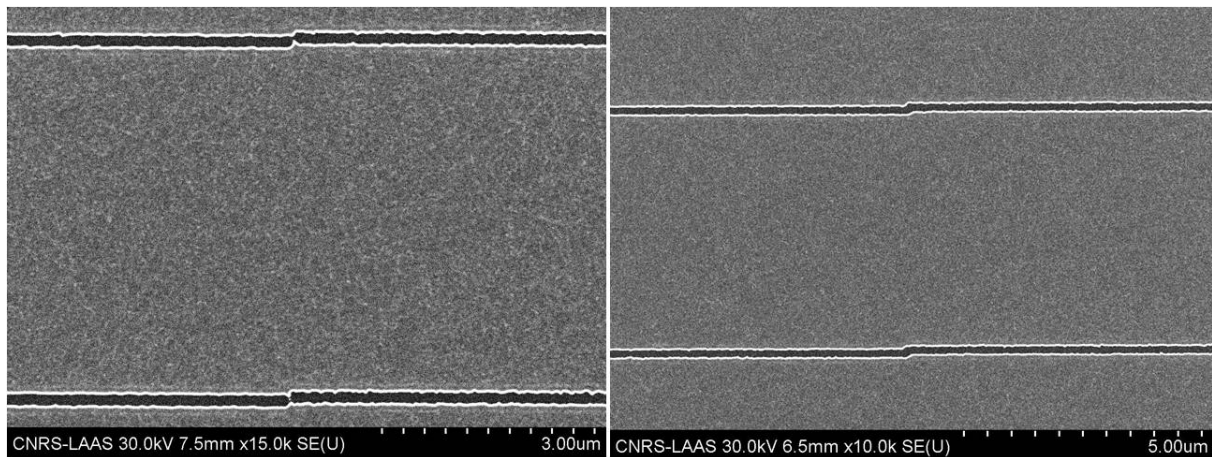


Figure 2.2 : Images au Microscope Electronique à Balayage (MEB) de nanocanaux réalisés par lithographie électronique à balayage au sein de la centrale technologique du LAAS (équipement RAITH 150). Ces structures sont des exemples de nanostructures réalisées en vue de la manipulation de molécules d'ADN, en l'occurrence l'extension entropique due au confinement à l'intérieur de nanocanaux de 140x140 nm. Ces images sont centrées sur une zone de raccord de champ, pour des champs de 400x400 (**gauche**) et 160x160 μm (**droite**). Ces raccords, aléatoires, sont à éviter pour la réalisation de dispositifs fonctionnels, et imposent donc de limiter les raccords de champ (donc la taille des structures réalisées).

Au milieu des années 90, une technologie alternative est apparue, développée par l'équipe du professeur Stephen Chou (Stephen Y. Chou, Krauss, et Renstrom 1995): la Lithographie par Nano-Impression, en anglais *Nano-Imprint Lithography* (NIL). La Nano-Impression est une technologie qui a connu une diffusion relativement importante, car il a été prouvé qu'elle pouvait générer des motifs avec une résolution inférieure à 25 nm. Elle est particulièrement adaptée à la production de masse, de par son mode de production parallélisé. Si l'utilisation d'un moule permet de générer rapidement et à moindre coût des motifs à des échelles très largement inférieures aux limites de la photolithographie standard, sa fabrication la rend assez inadaptée pour faire du prototypage. Le moule requiert en effet l'utilisation d'une technologie ultra-résolutive, le plus souvent la lithographie électronique, ce qui alourdit considérablement la génération rapide de dispositifs.

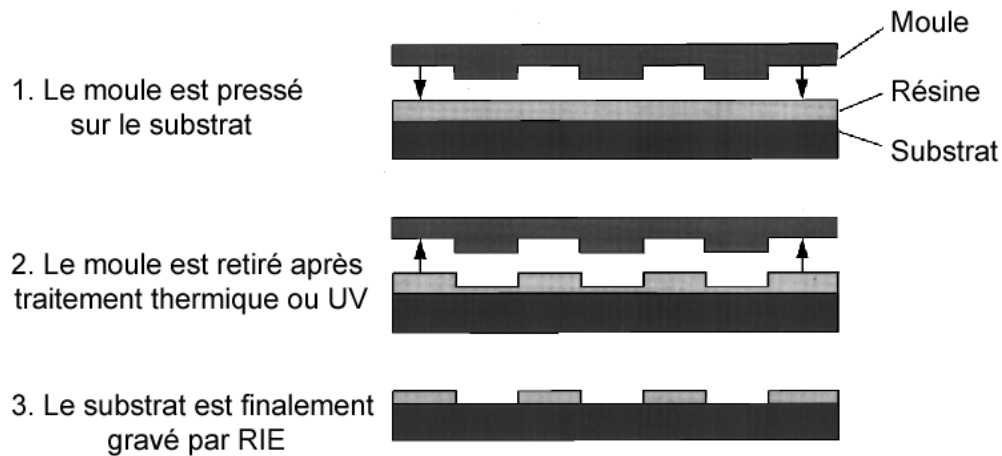


Figure 2.3 : schéma de principe du NIL. Figure tirée de (S.Y. Chou, Krauss, et Renstrom 1996).

Il existe ainsi un fort besoin concernant le développement de technologies alternatives pour la réalisation de dispositifs nanofluidiques, comme l'indiquent de récentes publications utilisant la photolithographie standard pour réaliser des obstacles dont les dimensions sont bien en-deçà des limites théoriques. Ainsi, Ou et Dorfman ont étudié l'influence de la taille des obstacles sur les performances de séparation d'un réseau d'obstacles, avec des diamètres minimum de 360 nm (Jia Ou et al. 2011 ; fig. 2.4). Leur technologie de fabrication peut être désignée sous le terme « *Plasma thinned photolithography* ». En amincissant les motifs générés par photolithographie standard avant gravure du substrat, la limite de résolution est considérablement réduite, mais reste cependant limitée. De plus, la gravure des obstacles engendre des structures crantées (phénomène de « *scalloping* »), avec une stabilité mécanique satisfaisante pour des rapports diamètre sur hauteur d'obstacles inférieurs à 6, ce qui rend cette technique peut adaptée à la réduction en taille que nous cherchons à réaliser.

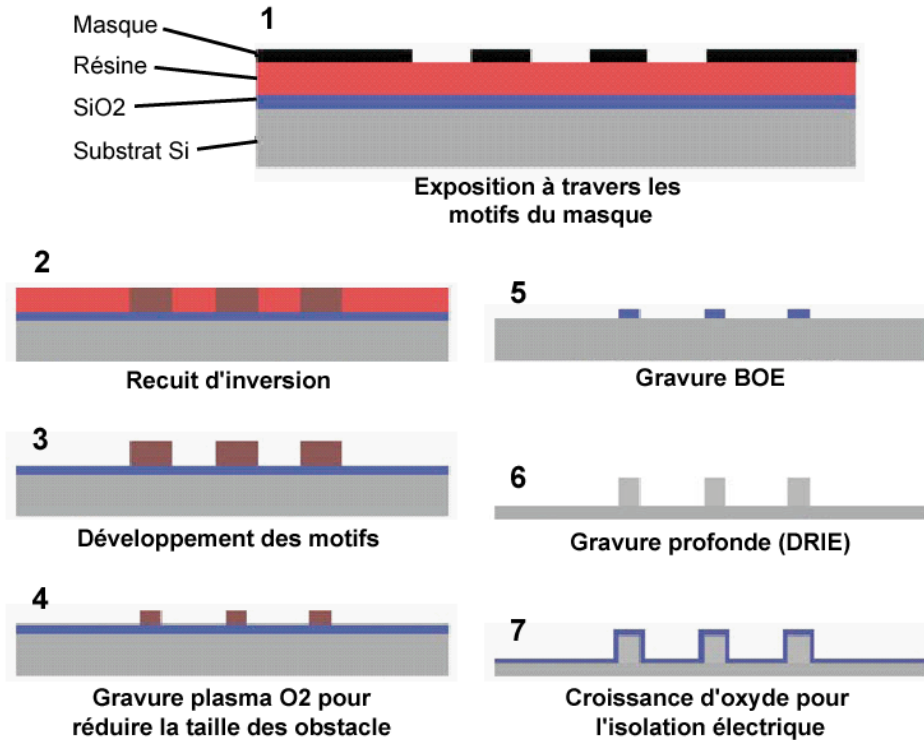


Figure 2.4: Procédé de nanofabrication par photolithographie puis amincissement plasma. Une résine photosensible réversible est exposée à travers un masque (1). La résine subit ensuite un recuit d'inversion (2) et un développement (3). Une étape contrôlée de plasma O₂ permet de réduire la taille des motifs préalablement à la gravure du substrat (4). La couche de SiO₂ est ensuite gravée (5) avec un Buffer Oxide Etchant (BOE), libérant le substrat Si pour une gravure DRIE (6). Enfin, on fait croître une couche de SiO₂ pour isoler électriquement le dispositif (7). Figure tirée de Ou et al. 2011.

2.1.2. Choisir un matériau adapté

Nous avons vu dans la section 1 que les études de dynamique d'interaction ADN-obstacles ont été réalisées avec une grande variété de matériaux : silicium (Volkmut et al. 1994 ; Y.C. Chan, Lee, et Zohar 2006 ; Jia Ou et al. 2009), verre (R. Ogawa et al. 2007), mais également polymères comme le PolyDiMethylSiloxane (PDMS, G. Randall et Doyle 2004 ; Randall et Doyle 2006), dont nous détaillerons la formulation dans l'annexe A1, ou encore billes magnétiques organisées en colonnes (Doyle et al. 2002) ou même nanofils (Araki, Aydil, et Dorfman 2010), avec des performances et des contraintes différentes. Notons que des dispositifs microfluidiques ont également été rapportés sur PolyMéthAcrylate de Méthyle (PMMA, Chhina et al. 2011) et même sur papier (Martinez et al. 2008), illustrant la recherche de développement de dispositifs à bas coûts.

Les billes magnétiques offrent l'énorme avantage de s'affranchir des techniques de microélectronique, et donc de fabriquer rapidement et à faible coût des réseaux d'obstacles. De plus, il est possible de jouer sur leur taille et l'espacement des colonnes pour ajuster les paramètres du réseau. La gamme de taille des colonnes est de 2 à 5 μm , dans un réseau dont la périodicité varie de 5 à 30 μm .

Les premiers dispositifs microfluidiques ont été réalisés en silicium ou en verre, en utilisant les technologies de plus en plus répandues de la microélectronique (photolithographie, gravures sèches et/ou humides, ...). Cependant, au cours du temps, des nécessités de réduction des coûts ont entraîné les laboratoires académiques et industriels à se pencher sur l'utilisation de nouveaux matériaux pour la microfluidique, les polymères, qui présentent l'avantage d'être particulièrement bon marché. L'essor de ces matériaux a été fulgurant, notamment pour l'un d'entre eux, le Poly(DiMéthylSiloxane), PDMS. En effet, outre son prix, cet élastomère permet de répliquer avec une très grande fiabilité des motifs aux échelles micro et nanométriques ce qui en fait un matériel de choix pour du prototypage (Duffy et al. 1998). Il est également transparent pour des longueurs d'onde supérieures à 280 nm, donc compatible avec la plupart des outils de détection (absorbance et fluorescence notamment), et biocompatible. Tous ces arguments ont fait du PDMS un matériau privilégié tant pour du prototypage que pour du développement : 90% des réalisations microfluidiques sont ainsi développées sur PDMS (H. Becker et Gärtner 2000). Cependant, le PDMS présente un certain nombre d'inconvénients majeurs. Sa relative instabilité mécanique le rend incompatible avec la fabrication de réseaux d'obstacles à fort rapport d'aspect. Cette limitation devient critique lorsqu'on diminue la taille des obstacles tout en conservant une hauteur de canal suffisante pour manipuler facilement les solutions et ne pas induire un confinement trop important pour les biomolécules manipulées. Son module d'Young est ainsi estimé à 2 MPa à la formulation standard de 1 :10 (Rogers et Lee 2009), ce qui explique sa relative instabilité. Cette limitation est particulièrement critique pour la réalisation de nos dispositifs de séparation. En effet, nous cherchons à fabriquer des obstacles de diamètre inférieur à 100 nm. Comme nous avons choisi une hauteur de canal de 800 nm environ, nous devons compenser l'instabilité générée par le rapport d'aspect défavorable des obstacles par un choix de matériau relativement rigide, ce qui n'est pas le cas du soft PDMS. Nous nous sommes également intéressés à un PDMS à chaînes plus longues, formulé 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). Une étude comparative des stabilités mécaniques et des déformations du soft et du hard-PDMS est présentée dans l'annexe A2. Malgré une tenue mécanique supérieure au soft PDMS, le h-PDMS reste trop déformable pour assurer la stabilité de nos réseaux d'obstacles. Ainsi, Schmidt et Michel ont démontré la tenue mécanique de structures de 80 nm de diamètre sur 100 nm de hauteur ayant par conséquent un rapport d'aspect nettement inférieur aux structures que nous cherchons à réaliser (Schmid et Michel 2000).

Cela nous a conduits à revenir à des matériaux dits « durs », à savoir le silicium ou le verre. Le silicium et le verre offrent une tenue mécanique bien supérieure aux autres matériaux, et ils sont compatibles avec les techniques de micro-nanoélectronique. De plus, leurs états de surface sont chimiquement modifiables et facilement contrôlés. Toutefois, ces matériaux présentent l'inconvénient du temps/coût de fabrication supérieur.

Ces contraintes nous imposent de réaliser nos dispositifs en utilisant les matériaux de micro-nanofabrication classiques dits « durs », à savoir verre ou silicium (le module d'Young du silicium est estimé à 150 GPa, V. L. Spiering, Bouwstra, et Spiering 1993), soit près de 20 000 fois plus que le h-PDMS. Notre choix s'est tout naturellement porté vers le silicium préférentiellement au verre, car les technologies de nanofabrication, tant en photolithographie qu'en gravure sont incomparablement plus matures au sein de la centrale technologique du LAAS.

2.2. Une technologie alternative : La Lithographie par Décalage de Phase

2.2.1. Présentation de la technologie

En 1997, John Rogers, membre de l'équipe de Georges Whitesides, réalise des motifs inférieurs à 100 nm par Lithographie par Décalage de phase (*Phase-Shift Lithography*) en n'utilisant que des procédés de fabrication issus de la photolithographie (Rogers et al. 1997). Le principe de la lithographie par décalage de phase est résumé sur la figure 2.5. Le point de

départ repose sur la fabrication d'un masque en PDMS, issu d'un moule réalisé par photolithographie standard. En photolithographie classique, un masque induit des contrastes de transmission lumineuse. Certaines zones sont optiquement transparentes et transmettent de l'énergie lumineuse à une résine photosensible, alors que d'autres zones (le plus souvent en chrome) sont complètement opaques. Dans le cas de la lithographie par décalage de phase, le masque induit un contraste d'indice, qui va être responsable de la génération d'interférences lumineuses.

Le masque en PDMS présente un réseau de microcanaux de profondeur contrôlée. Après avoir déposé ce masque sur une résine photosensible, on l'insole à l'aide d'un équipement de photolithographie standard dans le proche UV. A ces longueurs d'onde, le PDMS est transparent (Kumar et Whitesides 1993). La présence de microcanaux se traduit par des marches de variation d'indice optique, l'indice optique de l'air étant différent de celui du PDMS (respectivement 1 et 1.33 environ). L'intensité du faisceau d'insolation est modulée par interférences lors de son passage aux interfaces air/PDMS par décalage de phase, suivant la relation

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} h \times (n_{PDMS} - n_{air}) \quad (2.1)$$

avec h la hauteur du repli d'air (donc la profondeur des canaux sur le masque en PDMS), λ la longueur d'onde d'insolation et n l'indice optique du milieu traversé, PDMS ou air. Lorsque ce décalage de phase est égal à π [2π], les interférences sont destructives et sur de fines franges au niveau des interfaces air/PDMS (sur les bords des microcanaux) l'intensité du faisceau incident s'annule (Rogers 1998). La résine photosensible déposée sur le substrat est donc dans ce cas insolée sur toute sa surface, exceptée sur les franges d'interférences. Après développement et transfert, en fonction de la polarité de la résine, on obtient alors des canaux (dans le cas d'une résine négative) ou des lignes (dans le cas d'une résine positive).

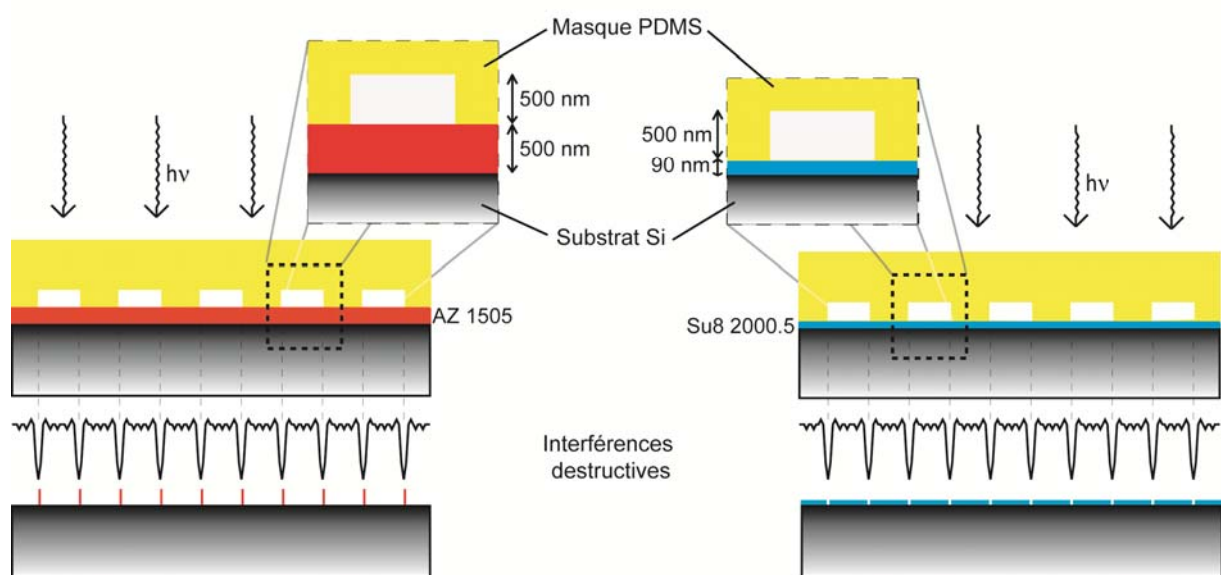


Figure 2.5 : Ce schéma synthétise le principe de fonctionnement de la lithographie par décalage de phase, en précisant les dimensions du masque en PDMS que nous avons utilisées, ainsi que les épaisseurs de résine.

Etant donné que la différence d'indice entre le PDMS et l'air est de 0.33, que le pic d'absorption de la résine se situe aux alentours de 350 nm, les interférences seront destructives si les marches du PDMS avoisinent 500 nm (équation 2.1). Comme ces interférences se produisent sur une largeur équivalente à environ un quart de la longueur d'onde d'insolation (Rogers et al. 1998), nous pouvons en déduire que cette technologie peut nous permettre de générer des motifs d'environ 90 nm de largeur.

Le développement de cette technologie est tout à fait pertinent pour la réalisation de nos structures par les performances attendues d'une part, mais surtout par le fait qu'elle repose sur la photolithographie et ne requiert en conséquence que des équipements de microfabrication standards (type aligneur de photolithographie), massivement présents dans les centrales de fabrication et permettant la fabrication de dispositifs à des coûts nettement moindres que des équipements de nanofabrication du type lithographie électronique.

2.2.2. Fabrication de motifs nanométriques par lithographie par décalage de phase

La première étape consiste à fabriquer un moule destiné à générer le masque en PDMS. Ce moule a été fabriqué par photolithographie conventionnelle en utilisant la résine positive AZ-1505 (AZ-Electronic Materials). Les motifs générés, un réseau de lignes de 4 μm de largeur

reproduites tous les 8 μm , ont une hauteur de 505 nm environ. Il est important de noter qu'une couche d'HexaMethylDiSiloxane (HMDS) a été déposée en phase vapeur sur le substrat avant l'enduction de la résine pour améliorer son adhésion. Après exposition et développement de la résine, ce promoteur d'adhérence maintient le substrat dans un état de surface hydrophobe. Du PDMS (Sylgard-184) non réticulé est ensuite déposé sur les structures du moule, l'ensemble est ensuite placé dans un étuve à 75°C pendant environ 3 heures. La couche de PDMS, après réticulation, est démoulée aisément en raison de l'hydrophobie du substrat de silicium, et nous pouvons alors préparer l'insolation par décalage de phase.

Nous avons développé le procédé de lithographie par décalage de phase pour des polarités de résine positive (avec la résine AZ-1505) et négative (résine Su8-2000.5). Commençons par la polarité positive.

Après avoir nettoyé le substrat silicium (wafer 4'') dans un mélange sulfochromique, l'avoir rincé puis déshydraté, nous avons enduit la résine AZ-1505 sur une tournette à 3800 tr/min, 5000tr/min² pendant 30 s, pour déposer environ 505 nm de résine sur le substrat. Après une étape de pré-recuit à 95°C pendant 30 s, nous avons placé le masque en PDMS en contact conformationnel avec la résine. La résine avec son masque a ensuite été insolée avec un aligneur conventionnel Ma-6 de SUSS Microtech® pendant 2.2 s correspondant à une dose d'environ 75 mJ/cm². Après développement (20 s dans du AZ developer), nous avons obtenu des motifs linéaires d'environ 200 nm de largeur, sur plus de 5 mm de longueur, correspondant à un rapport de forme de plus de 25000, très difficile à obtenir à ces échelles avec des techniques conventionnelles de lithographie électronique. Ce réseau de motifs linéaires est en outre obtenu sur de larges surfaces de plusieurs cm². Notons qu'il est également possible de diminuer la largeur des motifs obtenus par lithographie à décalage de phase en réduisant le pré-recuit de 30 à 20 secondes. En effet, un pré-recuit plus court (ou à température moins élevée) réduit l'évaporation des solvants de la résine, et leur concentration lors de l'insolation est donc plus importante. Cela a pour conséquence d'augmenter le taux de développement et donc de réduire la taille des motifs. Il nous a ainsi été possible de réaliser des motifs linéaires d'environ 100 nm de large (fig. 2.6).

Outre la génération de motifs linéaires, Rogers et al. ont également démontré la fabrication de motifs ponctuels par double exposition par décalage de phase (Rogers et al. 1997). En effet, comme le montre la figure 2.7, chaque insolation génère un réseau de lignes parallèles entre elles. En réalisant une deuxième insolation consécutive en décalant angulairement le masque de PDMS, l'intersection entre les deux réseaux va définir des motifs ponctuels (fig. 2.7). Le point fort de cette technologie est qu'en ajustant le décalage angulaire (entre 30 et 90°) ainsi

que la dose d'insolation (entre 30 et 50 mJ/cm²), il est possible d'ajuster la forme (ellipsoïdal ou circulaire) ainsi que la taille (de 120 à 300 nm environ). La dose d'illumination doit être calibrée sur l'aligneur chaque mois, mais entre chaque insolation, la reproductibilité de la technologie dépassait 97% pour des motifs circulaires de 270 nm de diamètre (mesures MEB). Nous avons ainsi développé une technologie capable de produire à haut débit et à bas coût des motifs ponctuels dont la forme et la taille peuvent facilement être adaptées, avec une reproductibilité tout à fait satisfaisante.

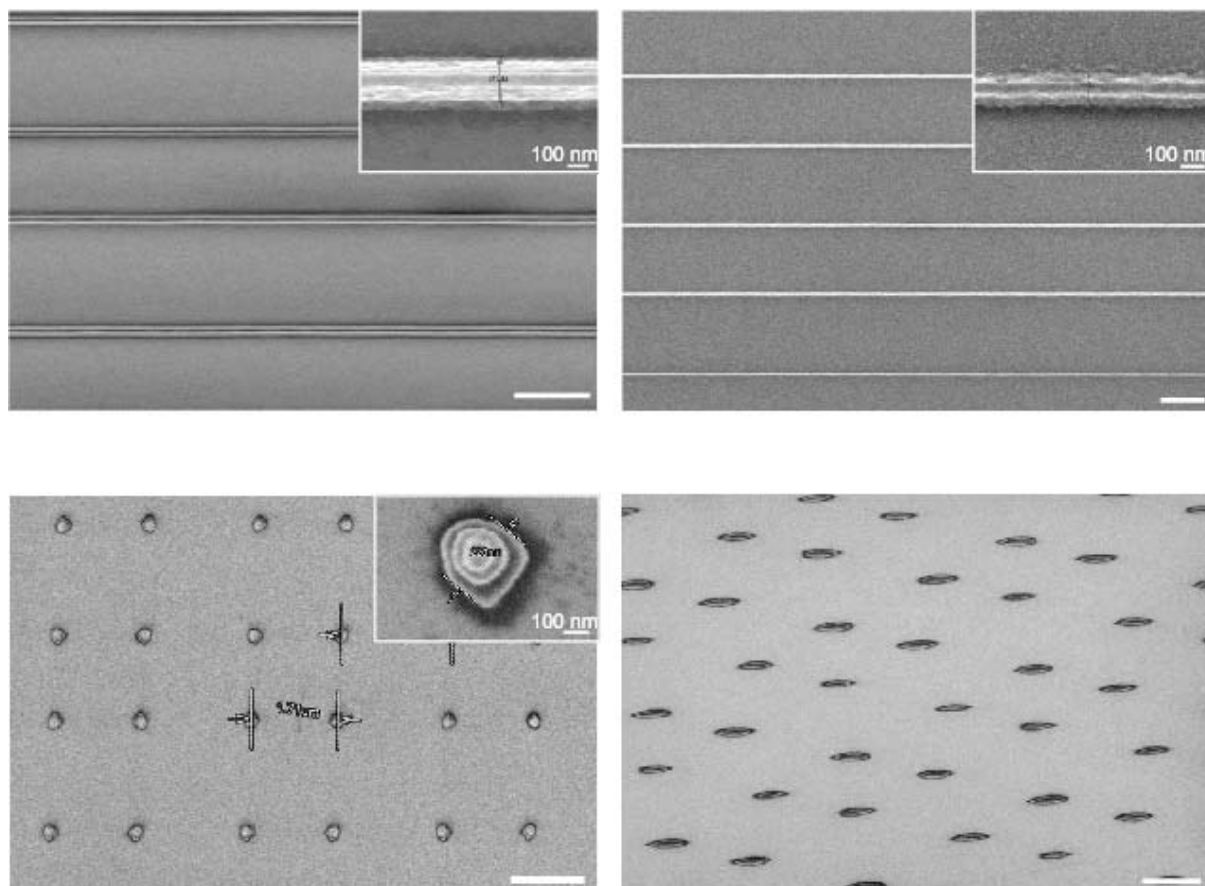


Figure 2.6 : **(haut)** images MEB de motifs linéaires réalisés sur résine AZ-1505 par lithographie à décalage de phase. En ajustant le temps de pré-recuit (30 s à gauche, 20 s à droite), nous avons obtenu des motifs de largeur respective de 200 et 100 nm environ. **(bas)** Une double exposition avec un décalage angulaire permet de générer des motifs ponctuels de taille et de forme variable.

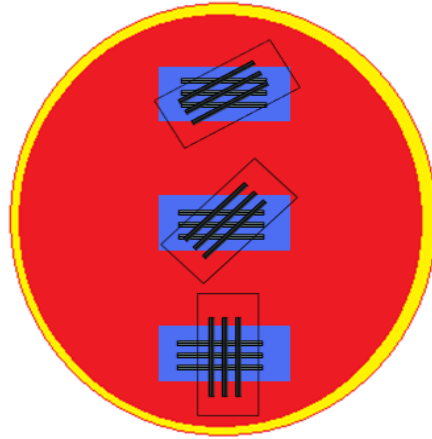


Figure 2.7: une double insolation par décalage de phase avec un décalage angulaire du masque en PDMS entre les deux insolutions permet de générer des motifs ponctuels dont la taille et la forme peuvent être aisément adaptées.

Enfin, nous avons développé la technologie de lithographie par décalage de phase sur résine négative, en utilisant la résine Su8-2000.5. Après avoir soigneusement nettoyé le substrat (voir le protocole décrit pour la résine AZ-1505), l'enduction de la Su8-2000.5 a été réalisée à 4000tr/min, 3000tr/min², pendant 30 s, en fermant le capot d'enduction. Fermer ce capot permet en effet de considérablement limiter l'évaporation des solvants contenus dans la résine au cours de l'enduction, et permet de diminuer l'épaisseur de la résine en fin d'enduction ; Ainsi, par ce procédé, nous avons déposé une fine couche d'environ 90 nm de résine à la surface du substrat. Cette épaisseur peut sembler très (trop) fine, mais elle a été mesurée de façon reproductible à l'aide d'un profilomètre TENCOR. Après un pré-recuit d'une minute à 95°C, la résine a été insolée avec une dose de 40 mJ/cm² (soit un temps d'insolation de 1.2 secondes en utilisant un aligneur EVG®-620). L'insolation est suivie d'un post-recuit de 30 s à 95°C et la résine est finalement développée 40 s dans du Propylène Glycol Methyl Ether Acetate (PGMEA). Le développement de cette technologie sur résine négative nous a permis d'obtenir des motifs linéaires d'environ 250 nm de largeur. Contrairement aux résines positives, un pré-recuit plus court ne permet pas de diminuer la largeur des motifs. Au contraire, l'augmentation du taux de développement a tendance à les élargir.

Les résultats de notre développement technologique sont du même ordre que ceux présentés par Rogers et Whitesides. Les structures générées par lithographie à contraste de phase ont été principalement utilisées en tant que polariseurs optiques (Rogers et al. 1997), nanopuits pour la préparation de réseaux uniformes de cristaux de NaCl (Odom et al. 2002), ou transducteurs SAW (Surface Acoustic Wave) hautes-fréquences (Hesjedal et Seidel 2003). A notre connaissance, ces structures n'ont jamais été utilisées dans des dispositifs fluidiques, malgré leur pertinence aussi bien en termes de reproductibilité, d'échelles, ou des matériaux utilisés.

Dans la suite, nous présentons l'intégration des structures que nous avons fabriquées par lithographie à décalage de phase dans des dispositifs nanofluidiques, à savoir des réseaux de nanocanaux destinés à étudier le confinement de molécules d'ADN, ou des réseaux de nanoplots destinés à étudier les collisions entre ADN-obstacle, et leur utilisation comme dispositifs de séparation. Le confinement de molécules d'ADN dans des nanocanaux étant en dehors de la problématique du présent manuscrit, nous renvoyons le lecteur à la lecture de l'article « *Efficient Prototyping of Large-Scale PDMS and Silicon Nanofluidic Devices Using PDMS-Based Phase Shift Lithography* » que nous avons publié dans la revue *Micrfluidics and Nanofluidics* (DOI 10.1007/s10404-011-0888-0). Nous nous focaliserons sur l'intégration des nanopoints dans des réseaux d'obstacles fonctionnels.

2.2.3. Photolithographie par projection : élargissement de la gamme de structures générées vers les grandes dimensions

La lithographie par décalage de phase nous a permis d'obtenir des motifs ponctuels sur une gamme de taille allant de 120 nm à 300 nm environ. Afin d'élargir la gamme de structures disponibles pour l'étude des collisions ADN-obstacle, nous avons généré des structures de 500 et 1000 nm de diamètre en utilisant l'aligneur par projection CANON 3000i4, disponible depuis peu au sein de la centrale technologique du LAAS/CNRS. Le principe de la photolithographie par projection est illustré sur la figure 2.8.

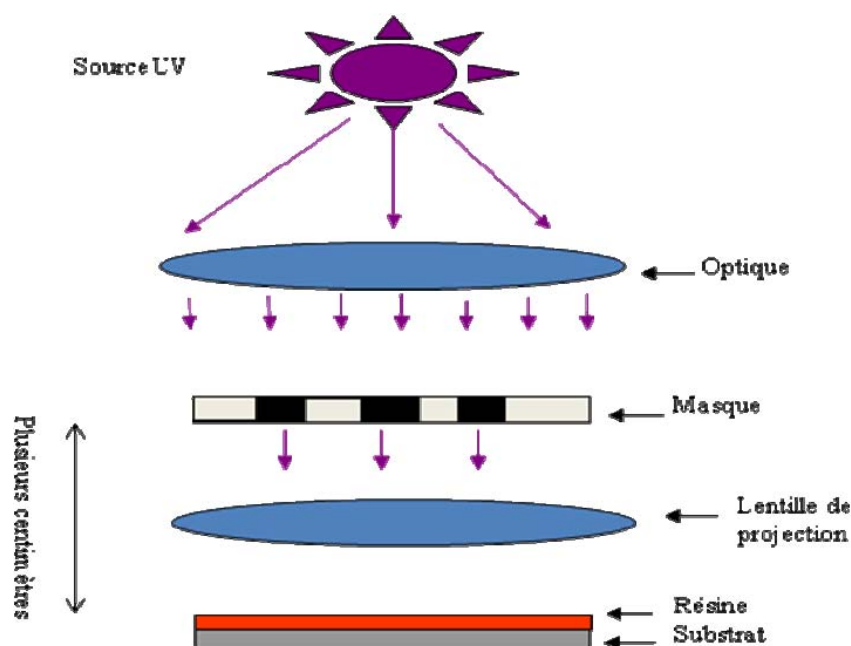


Figure 2.8: schéma de principe d'un aligneur par projection.

Comme pour la photolithographie standard, la photolithographie par projection consiste à exposer une résine photosensible selon des zones définies par un réticule (un masque). Cependant, dans le cas de la photolithographie par projection, les rayons UV traversent un système optique réducteur, dont le coefficient de réduction dépend de l'équipement (le CANON 3000i4 utilise un système de réduction x5). La limite théorique de résolution est donc 1/5 de la résolution du réticule, en l'occurrence 0.35 nm. Nous avons développé un procédé de fabrication utilisant la résine PFI d'épaisseur 1 μm , pour générer des réseaux de motifs circulaires de 500 nm de diamètre.

2.2.4. Utilisation de l'oxydation thermique pour la réduction de la taille des obstacles

Comme nous l'avons vu précédemment, les plus petits piliers stabilisés que nous ayons obtenus par lithographie à décalage de phase ont un diamètre de 140 nm. Toujours dans l'optique d'élargir la gamme de piliers disponibles pour l'étude des interactions ADN-obstacle, ainsi que dans l'optique de se rapprocher de dimensions pertinentes à l'échelle de la molécule (pour rappel, la longueur de persistance de l'ADN- λ est d'environ 50 nm). Nous avons donc décidé d'amincir les plus petits piliers disponibles (à savoir les piliers de 140 nm de diamètre) en faisant croître un oxyde thermique de 120 nm d'épaisseur à la surface du dispositif. Comme l'illustre la figure 2.9-A, cette croissance thermique d'oxyde de silicium (SiO_2) consomme environ 50% de silicium pour sa croissance (théoriquement 54%). Une fois la croissance terminée, en éliminant la couche de SiO_2 formée par gravure à l'acide fluorhydrique, on a bien aminci les piliers. Nous avons fait croître une couche de 120 nm de SiO_2 à la surface d'un dispositif contenant un réseau de piliers de 140 nm de rayon. Nous avons ainsi obtenu après gravure de l'oxyde un réseau de piliers de 80 nm de diamètre (fig. 2.9-B).

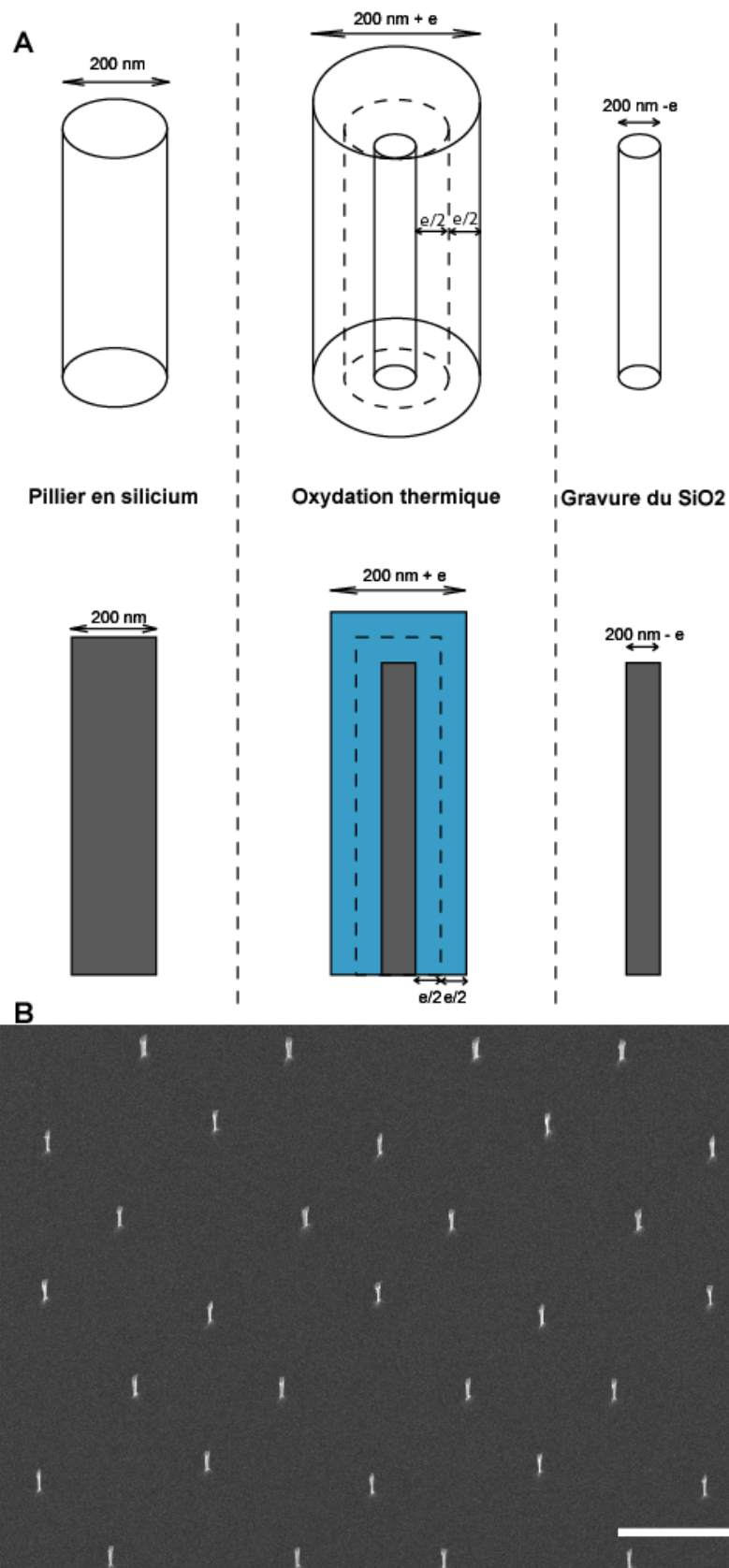


Figure 2.9 : **(A)** procédé d'amincissement d'un pilier de silicium par oxydation thermique puis gravure HF. **(B)** réseau de nanoplots de 80 nm de diamètre obtenus à partir de plots de 140 nm de diamètre amincis par ce procédé. La barre d'échelle correspond à une longueur de 3 μ m.

2.3. Intégration des nanostructures dans des dispositifs micro-nanofluidiques

2.3.1. Transfert des motifs dans le substrat silicium

Les motifs ponctuels générés par lithographie à décalage de phase et par photolithographie par projection ont été transférés dans le substrat silicium par gravure sèche, dite RIE (de l'anglais « *Reactive Ion Etching* »). La gravure RIE est une technique de gravure utilisant un plasma chimiquement réactif pour retirer un ou plusieurs matériaux d'un substrat. Les étapes de la gravure sont les suivantes :

- (i) Génération dans le plasma des espèces qui vont attaquer la couche à graver ;
- (ii) Transfert de ces espèces réactives depuis le plasma jusqu'à la surface de la couche à attaquer ;
- (iii) Adsorption des espèces à la surface ;
- (iv) Réaction entre ces espèces attaquantes et les espèces réactives de la surface. Les espèces produites par la réaction doivent être volatiles pour pouvoir quitter la surface du matériau;
- (v) Désorption puis diffusion dans l'environnement gazeux des produits de la réaction.

La gravure d'un substrat tel que le silicium peut s'opérer par d'autres techniques, comme par exemple la gravure humide qui attaque le substrat sélectivement selon ses plans cristallins. Cependant, les rapport d'aspect défavorables de nos dispositifs nous imposent l'utilisation d'une gravure RIE (dite « sèche » comparativement à la gravure humide). En effet, nous souhaitons réaliser des piliers en silicium, dont la taille minimale avoisine les 100 nm de diamètre. Ces piliers sont contenus dans un canal destiné à faire circuler les molécules d'ADN. Il est clair que plus le rapport hauteur sur diamètre sera petit, plus les plots seront stables. Cela représente une contrainte de fabrication cruciale, car l'intégrité des piliers est primordiale. Il est en outre important de graver les plots sur une profondeur suffisante pour que la manipulation de fluide à cette échelle ne soit pas trop problématique, mais surtout pour ne pas induire un confinement trop important afin de ne pas perturber les dynamiques de collision. Il est donc apparu pertinent de graver ces piliers sur une profondeur de 0.8 μm : en effet, un rapport hauteur sur diamètre de 10 nous semblait raisonnable pour assurer la stabilité des piliers, et nous permettait d'espérer étudier des interactions avec des obstacles dont le

diamètre pouvait descendre jusqu'à 80 nm, dimension tout à fait pertinente pour notre étude. La technologie de gravure utilisée devait par conséquent être très anisotrope, ce qui n'est pas le cas des techniques de gravures humides.

Nous avons utilisé un équipement de gravure ALCATEL® AMS-4200, sous une pression de 7.10^{-2} mBar, une puissance RF de 2800 W, une puissance de biais de 60 W. Les gaz utilisés pour la gravure du silicium sont le perfluorocyclobutane (C_4F_8) et l'hexafluorure de soufre (SF_6). Ces paramètres nous ont permis de mettre au point une gravure très anisotrope qui nous a permis de fabriquer des réseaux d'obstacles nanométriques stables pour une large gamme de tailles.

En vue de l'étude des dynamiques de collision ADN-obstacle, nous avons obtenu des réseaux de plots en silicium de rayon 70 et 135 nm à partir de la lithographie à décalage de phase, et 250 nm de rayon pour les piliers obtenus à partir de la photolithographie par projection (fig. 2.10).

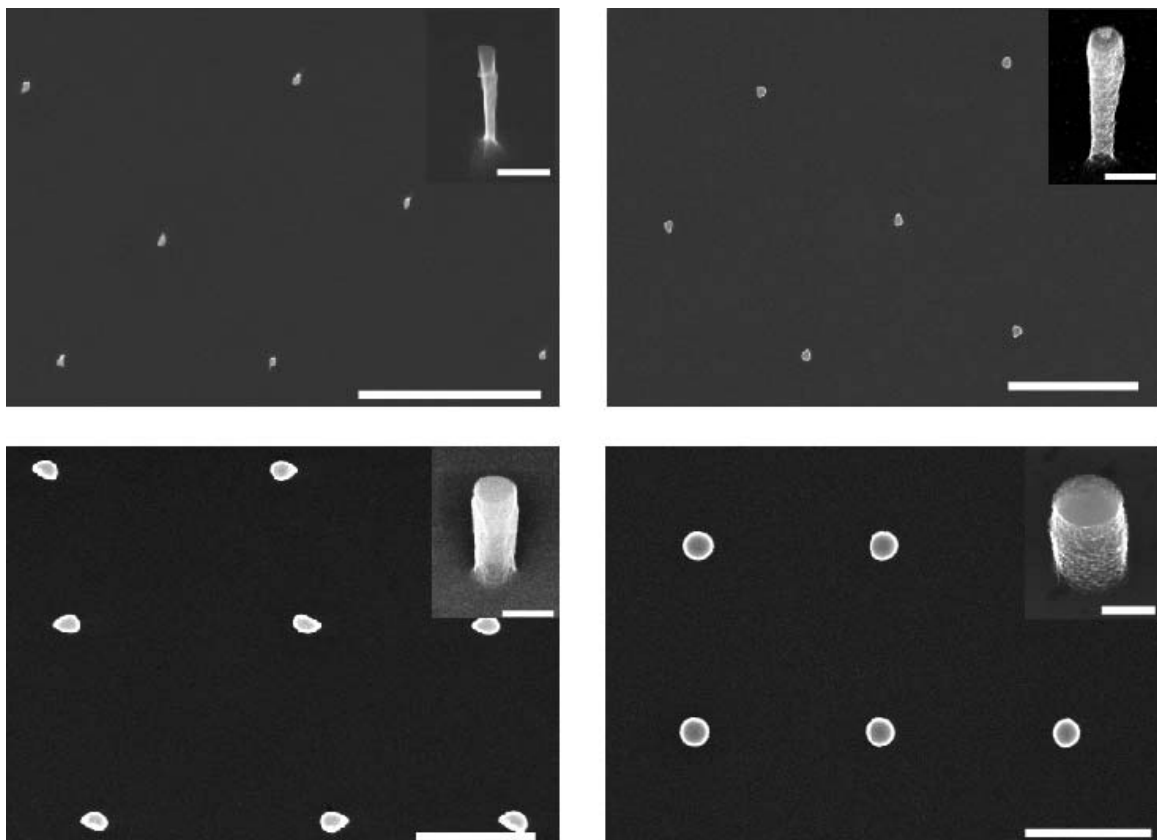


Figure 2.10 : images MEB des différents réseaux de nanopiliers que nous avons fabriqués. Nous avons généré une gamme de piliers de rayons 40 (**haut-gauche**), 70 (**haut-droite**), 135 (**bas-gauche**) et 250 nm (**bas-droite**), de hauteur 800 nm. Les barres d'échelles codent pour 2 μ m. Les inserts sont des images MEB zoomées et tiltées de plots individuels. Les barres d'échelles codent pour 200 nm.

2.3.2. Perçage des trous d'accès et isolation électrique

Afin d'amener la solution contenant les molécules d'ADN dans le microcanal, il est nécessaire de percer des trous d'accès à ses extrémités, comme l'illustre la figure 2.11.

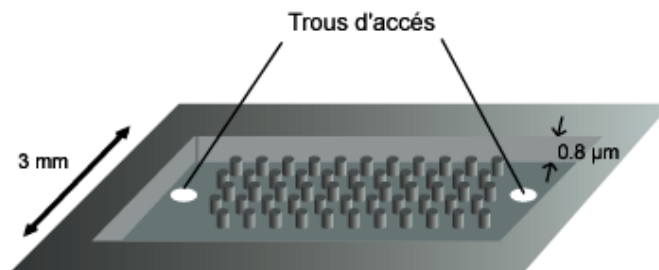


Figure 2.11 : vue d'artiste de nos dispositifs, avec un rappel des dimensions

Le perçage a été réalisé par « sand-blasting », que l'on peut traduire par « abrasion par sablage », avec la microsableuse MB-1002 de COMCOinc®. Un matériau abrasif (en l'occurrence des particules d'allumine) est propulsé par air comprimé à travers une buse sur la surface à percer. Le perçage est manuel et quasi instantané (moins d'une seconde pour traverser un substrat en silicium de 700 μm d'épaisseur). Le diamètre des trous dépend du type d'abrasif, de la puissance de l'air comprimé, du diamètre de la buse, mais également du temps de perçage. Nous avons réalisé des trous d'environ 0.5 mm de diamètre. Afin de limiter au maximum l'endommagement des piliers à ce stade de la fabrication, il est important de protéger la surface avec un film LAMINAR de 50 μm d'épaisseur qui est laminé sur le substrat avant perçage.

Notons au passage que dans le cas où nous réalisons des dispositifs destinés à une manipulation de molécules d'ADN par champ électrique, il était indispensable à ce stade d'isoler électriquement la surface du dispositif, le silicium étant un très bon conducteur électrique. Nous avons dans ce cas fait croître thermiquement une couche de 100 nm de SiO_2 , avec pour conséquence une légère augmentation du diamètre des piliers. Comme nous le verrons dans la section 3, seuls les plots de 250 nm de rayon ont été utilisés pour des manipulations électrophorétiques. Leur rayon est donc passé de 250 à 300 nm. Notons enfin qu'il est primordial que cette étape d'isolation électrique soit réalisée après le perçage des trous, afin qu'ils soient eux aussi isolés et que le champ électrique, lorsqu'on l'appliquera au dispositif, soit confiné dans le microcanal et ne s'échappe pas dans le volume du substrat.

Pour rendre les dispositifs fonctionnels, il convient de les capoter pour former une canalisation fluide permettant de manipuler des fluides. C'est ce capotage que nous allons à présent décrire.

2.3.3. Capotage des dispositifs

a) Rappels de base concernant le scellement de dispositifs en PDMS

Le PDMS comporte des groupements $\text{-O-Si(CH}_3\text{)}_2\text{-}$, ce qui en fait un matériau naturellement hydrophobe, donc difficile à faire adhérer naturellement à une surface, ainsi qu'à remplir d'une solution aqueuse dans le cas de la réalisation de dispositifs microfluidiques. L'exposition d'une surface de PDMS à un plasma oxygène entraîne la formation de groupements silanols (Si-OH) au détriment des groupements méthyles (Si-CH_3) (McDonald et al. 2000) ; (Ng et al. 2002). L'introduction de ces groupements silanols rend la surface du PDMS hydrophile et réactive à une large gamme de groupements silanes tels que Si-NH_2 , Si-COOH , Si-SH .

L'exposition de la surface à sceller (PDMS, verre, silicium, ...) induit elle aussi la présence de radicaux libres -OH . La mise en contact conforme de ces deux surfaces va ainsi générer des liaisons covalentes Si-O-Si , responsables d'un scellement irréversible. Un dispositif microfluidique scellé de la sorte est capable de supporter des pressions de l'ordre de 3 bars (McDonald et al. 2000).

Il est important de noter qu'il est également possible de sceller des dispositifs en PDMS de façon réversible. Sa flexibilité lui permet de se conformer à une surface relativement plane, en créant des liaisons de Van der Waals avec cette dernière. Cette méthode est extrêmement rapide, ne nécessite qu'un nettoyage rigoureux des deux surfaces à traiter, et à lieu à température ambiante. Il est possible après utilisation de retirer le PDMS de la surface sans l'endommager. Cependant, cette technique de scellement ne permet pas de supporter des pressions excédant 350 mBar, ce qui s'avère particulièrement inadapté à des écoulements dans des canalisations nanométriques.

Enfin, signalons qu'il est possible de sceller une canalisation en PDMS sur du PDMS, auquel cas les 4 murs de la canalisation seront en PDMS, mais également sur du silicium ou du verre (3 murs en PDMS). De la même façon, il est possible de sceller une canalisation en verre ou silicium sur du PDMS, auquel cas seul un mur de la canalisation sera en PDMS.

b) Application au scellement de nos dispositifs

Les rapports de forme de nos dispositifs sont particulièrement défavorables (~ 3 mm de largeur pour $0.8 \mu\text{m}$ de profondeur). La technique standard de scellement de dispositifs en silicium est

la soudure anodique (« *anodic bonding* », Albaugh 1991), qui combine température élevée pour favoriser la migration des ions jusqu'aux surfaces à sceller, tension importante (de l'ordre de 300 V), et pression mécanique entre les deux surfaces pour assurer un contact conforme. Cependant, nous avons constaté que la faible profondeur de notre canalisation entraînait un scellement indésirable du fond du canal avec la paroi supérieure, rendant inutilisable la canalisation et donc le dispositif. De plus, cette technique de scellement impliquait une utilisation unique du dispositif car l'équipement dont nous disposions (AML AWB04) ne permet de sceller que des plaques de 4 pouces de diamètre, et non des dispositifs individuels de quelques cm². Il nous a donc semblé pertinent de nous intéresser à une stratégie de scellement sur polymère, en l'occurrence sur du PDMS formulé pour multiplier par 5 son module d'Young, le h-PDMS (Schmid et Michel 2000). Du h-PDMS a été déposé par *spin-coating* (400 rpm, 300 rpm², 30 secondes) sur une lamelle de verre préalablement nettoyée par un mélange sulfochromique et déshydratée 20 minutes à 200 °C. L'ensemble a été placé dans une étuve à 75 °C pendant au moins deux heures afin d'assurer une réticulation complète du h-PDMS. L'épaisseur finale de la lamelle est finalement de $170 \pm 6 \mu\text{m}$, ce qui nous permettra par la suite de ne pas entraver la détection optique.

Après avoir nettoyé avec le plus grand soin nos deux surfaces à sceller, à savoir le microcanal en silicium par un mélange sulfochromique, et le h-PDMS à l'isopropanol, la surface de silicium a été activée par un plasma oxygène d'une puissance de 800 W sur une durée de 2 minutes, et celle de h-PDMS par un plasma de 200 W pendant 30 secondes. Après les avoir mises en contact, nous avons renforcé la force du scellement en recuisant le dispositif ainsi formé dans une étuve à 100°C pendant au moins 20 minutes (Tang et al. 2006).

2.3.4. Connectique fluidique

Au vu des dimensions et des quantités de fluides transitant dans des dispositifs tels que les laboratoires-sur-puces, les systèmes d'entrée/sortie restent un domaine délicat à traiter. Plusieurs solutions ont été proposées suivant la technologie employée (Yuen 2008 ; Gaertner et al. 2003).

La mise au point d'une connectique microfluidique générique et fiable se révèle être un challenge certain. Pour cela, l'utilisation de matériaux facilement usinables, présentant une bonne étanchéité et ayant des qualités de biocompatibilité sont des critères qui ont été pris en considération. En accord avec nos besoins et des qualités requises pour sa mise en œuvre,

nous avons fait le choix du PDMS pour assurer les fonctions de communications fluidiques entre les dispositifs et le système de remplissage en liquide utilisé. La mise au point d'une connectique fluidique utilisant ce matériau a nécessité la fabrication d'un moule spécifique en aluminium. Ce dernier est constitué de deux parties mobiles, comme illustré sur la figure 3.42(a) : une partie inférieure constituée de "chevrons" de 1.5mm de diamètre pour une hauteur de 4mm, et une partie supérieure présentant des ouvertures de 6mm de côté.

Pour ce qui est de la connectique électrique, nous avons choisi d'intégrer directement des fils de platine à travers nos tubes, de façon à ce qu'ils soient en contact avec les solutions. La figure 2.12 illustre ces connectiques.

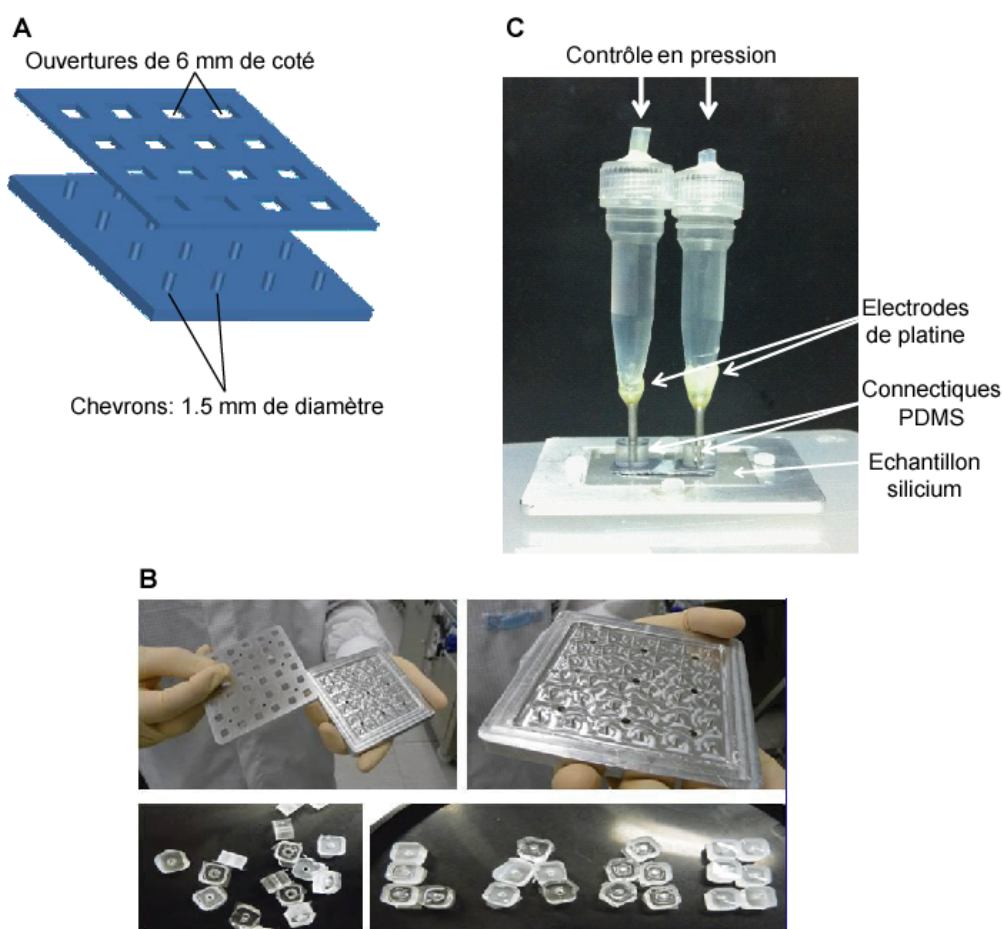


Figure 2.12 : **(A)** Vue d'artiste du moule réalisé pour la fabrication de nos connectiques en PDMS. **(B)** Photos représentant le moule ainsi que les plots en PDMS utilisés pour réaliser la connexion entre les tubes contenant les solutions et les trous d'accès de nos dispositifs. **(C)** Schéma illustrant notre dispositif intégré sur la plateforme de manipulation fluidique et/ou électrique.

Nous présentons, dans le prochain chapitre, le développement du banc optique qui nous a permis d'étudier les mécanismes d'interaction ADN-obstacle à l'échelle de la molécule unique avec une résolution tout à fait pertinente.

Chapitre 3

Microscopie de fluorescence



3.1. Bref historique

Le terme de fluorescence a été défini pour la première fois par George Gabriel Stokes en 1843, avec la description de la luminescence du fluorure de calcium. La loi de Stokes, qu'il formula en 1853, rend compte du fait que lors de la fluorescence, la longueur d'onde émise par l'espèce fluorescente est toujours plus grande que celle de l'émission. Il fallut cependant attendre 1910 pour voir apparaître le premier prototype de microscope à fluorescence, réalisé par H. Lehmann. Avec cet appareil, les scientifiques ont d'abord étudié et observé les espèces naturellement fluorescentes comme la cornée, la chlorophylle, des collagènes, etc. De nombreuses avancées majeures permirent par la suite de populariser la microscopie de fluorescence. La première survint en 1947, lorsque Siegfried Strugger utilisa l'acridine orange, un colorant cellulaire, pour différencier les cellules mortes et vivantes. En 1950, Coons et Kaplan utilisèrent un marqueur fluorescent (la fluorescéine isocyanate) pour marquer des anticorps (Coons et Kaplan 1950). Grâce à la spécificité antigène-anticorps, la sélectivité de l'observation s'en trouvait considérablement accrue, et permit des avancées considérables en biologie cellulaire. Citons également Brumberg qui, en 1959, utilisa un miroir interférentiel pour séparer le faisceau d'excitation du faisceau fluorescent, augmentant considérablement le rapport signal sur bruit de ses observations.

Dans les années 60, Osamu Shimomura étudia la méduse *Aequorea victoria*, isolant une protéine qu'il nomma GFP pour « *Green Fluorescent Protein* ». 30 ans plus tard, en 1994, Martin Chalfie réalisa des protéines de fusion fluorescentes (Chalfie et al. 1994). Grâce aux techniques modernes de biologie moléculaire, cette protéine est aujourd'hui exprimée dans une grande variété d'organismes allant des plantes aux cellules de mammifères, être humain compris, en passant par des organismes tels que bactéries ou levures. Puis Heim et al. introduisirent des mutations dans le gène de la GFP permettant d'élargir le spectre de couleurs disponibles (Heim, Prasher, et Tsien 1994) : en plus du vert il était désormais possible de produire des marqueurs fluorescent dans le bleu, le cyan, le jaune, et même dans l'infrarouge. Il fournit ainsi une gamme de protéines fluorescentes avec des longueurs d'onde séparables, capables de marquer spécifiquement des cellules ou des tissus. L'importance de ces travaux est telle qu'un prix Nobel a été décerné collectivement à Shimomura, Chalfie et Tsien en 2008 pour « la découverte et le développement de la protéine verte, la GFP ». Aujourd'hui, ce sont plus d'une centaine de fluorophores qui sont disponibles sur le marché, pouvant se lier avec des anticorps, des protéines, de l'ADN..., offrant la possibilité d'observer directement

plusieurs partenaires impliqués dans un processus biologique hors ou à l'intérieur d'une cellule, et en temps réel. Dans un premier temps, rappelons quelques concepts de base sur la fluorescence.

3.2. Rappels sur la physique de la fluorescence

Une molécule fluorescente a la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation), pour la restituer ensuite sous forme de lumière de fluorescence. Lorsque cette molécule est excitée par un photon incident dont l'énergie correspond à une transition électronique, elle va se trouver dans un état énergétique dit excité et noté S_1 , de niveau énergétique supérieur à son état fondamental S_0 . La durée de vie de cet état excité est très brève, de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-10} secondes. Au cours de cette période, la molécule va perdre une partie de son énergie, le plus souvent sous forme d'énergie vibrationnelle, et va se retrouver alors dans un niveau énergétique S_1' . Puis elle va retrouver son état fondamental S_0 en émettant un photon : c'est le phénomène de fluorescence (fig. 3.1).

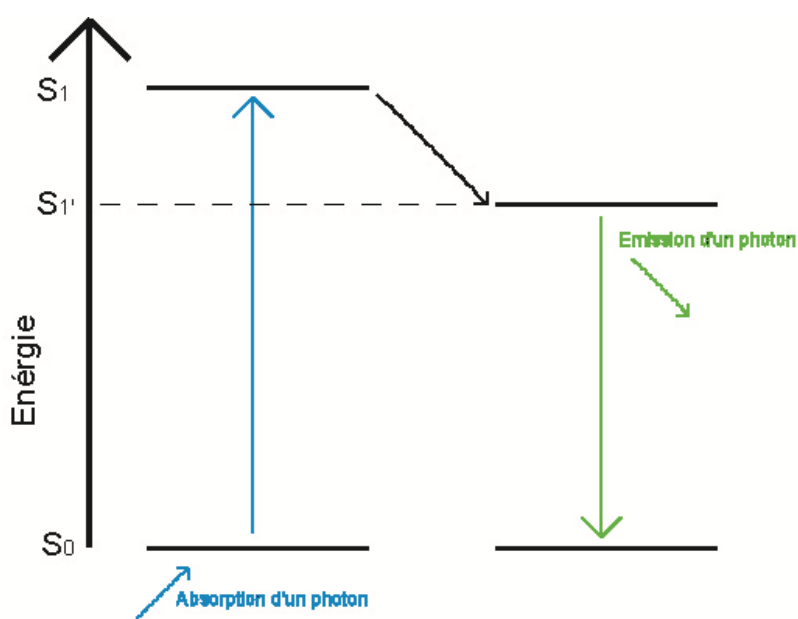


Figure 3.1 : l'absorption d'un photon entraîne le basculement d'une molécule fluorescente vers un état énergiquement plus grand (flèche bleue). Sa relaxation vers son état fondamental S_0 va se traduire par l'émission d'un photon d'énergie inférieure au photon absorbé, que l'on détecte sélectivement avec des filtres optiques.

La perte d'énergie caractérisée par le passage du niveau S_1 au niveau S_1' implique que les photons émis par fluorescence vont avoir une énergie inférieure à celle des photons

incidents (et donc une longueur d'onde plus grande). On désigne ce phénomène comme « décalage de Stokes ». Notons toutefois que l'énergie des photons émis peut être égale à celle des photons incidents, on parle alors de fluorescence de résonance.

Dans la réalité, il existe une gamme de longueur d'onde d'excitation et d'émission : on parle alors de spectre d'absorption ou d'émission, caractéristiques de la molécule fluorescente. Ces molécules fluorescentes, comme nous l'avons vu dans le bref historique, sont à la base de la microscopie de fluorescence, que nous allons à présent décrire.

3.3. Quelques techniques de microscopie à fluorescence

Dans ce paragraphe, nous décrivons brièvement les principales techniques de microscopie à fluorescence et leurs applications à l'étude physique de l'ADN.

3.3.1. Epifluorescence

Le terme de microscopie de fluorescence regroupe plusieurs types de microscopes dont nous allons brièvement décrire les principales caractéristiques. Le microscope optique classique est adapté à l'imagerie en fluorescence grâce à un élément clé, le cube dichroïque.

Ce cube permet d'observer sélectivement la lumière de fluorescence en s'affranchissant de la lumière d'excitation (fig. 3.2-b). Si la source de lumière n'est pas monochromatique, il convient au préalable de sélectionner une partie de son spectre par un filtre dit d'excitation (fig. 3.2-a). Cette lumière est ensuite réfléchiée par le cube dichroïque vers l'échantillon à observer. Le cube va ainsi séparer les trajets optiques des signaux d'excitation et de fluorescence. La longueur d'onde de séparation, notée λ_0 , est une caractéristique du cube : les longueurs d'onde inférieures à λ_0 sont réfléchies, tandis que les longueurs d'onde supérieures à λ_0 sont transmises. Enfin un filtre est placé entre l'échantillon et le capteur optique pour collecter spécifiquement la longueur d'onde de fluorescence : c'est le filtre d'émission (fig. 3.2-c). Notons que les caractéristiques spectrales des filtres d'excitation et d'émission sont opposées : les basses longueurs d'onde sont coupées à l'excitation tandis que seules les hautes longueurs d'onde sont conservées à l'émission, la longueur d'onde de coupure du cube dichroïque λ_0 étant située entre ces deux barrières spectrales.

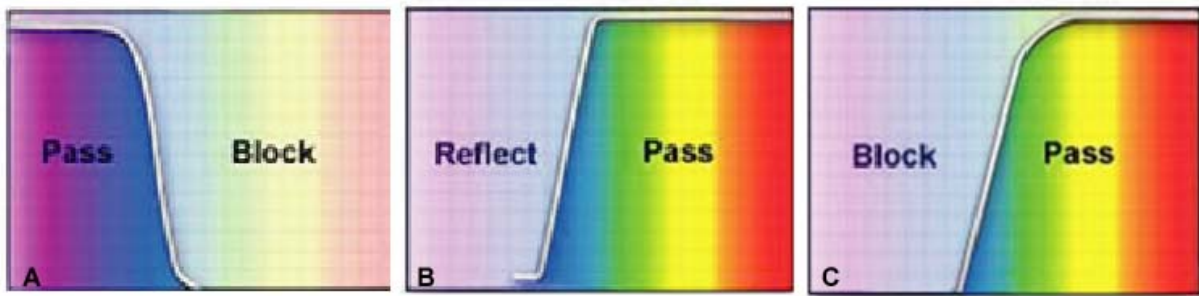


Figure 3.2: Caractéristiques spectrales du filtre d'excitation (A), du cube dichroïque (B) et du filtre d'émission (C), éléments clés d'un microscope à épifluorescence.

3.3.2. TIRF

Il existe également des cas particuliers d'utilisation de microscopes à fluorescence optiques. Ainsi, une illumination par réflexion totale interne permet de n'éclairer un échantillon que sur une très faible profondeur, à l'interface entre le support en verre et le milieu contenant l'échantillon (fig. 3.3). On parle alors de Microscope de Florescence par Réflexion Totale Interne (« *Total Internal Reflexion Fluorescence microscopy* », communément désignée sous l'acronyme TIRF). Si les conditions d'illumination satisfont les conditions de réflexion totale, une onde évanescente, dont l'intensité décroît exponentiellement par rapport à la distance avec la surface, va exciter l'échantillon sur une profondeur comprise entre 100 et 200 nm (Gingell, Heavens, et Mellor 1987). Même si cette décroissance, ainsi que la possibilité d'interactions entre l'échantillon et la surface, peuvent rendre les résultats difficiles à interpréter (Schütz et Hinterdorfer 2002), ce mode d'excitation particulier permet ainsi d'exciter de manière très sélective les fluorophores à l'interface support/échantillon, de façon à s'affranchir au maximum de la fluorescence parasite autour de la zone à observer. Le TIRF est notamment très utilisé pour l'étude des membranes cellulaires et peut également être utilisé pour l'imagerie de molécules individuelles. Ainsi en 2007, Soni et Meller ont utilisé la microscopie TIRF pour détecter les translocations de molécules d'ADN traversant des nanopores de moins de 2 nm de largeur (Soni et Meller 2007).

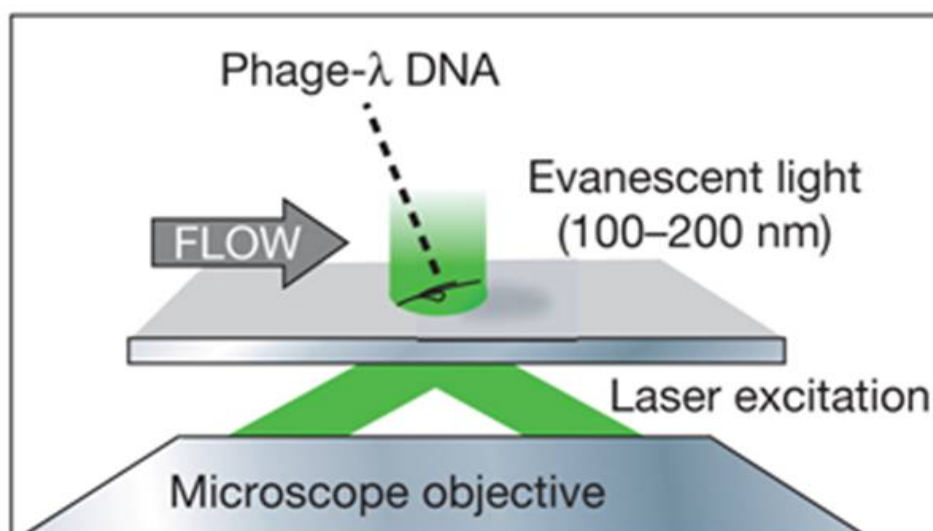


Figure 3.3: application du TIRF à l'observation d'une molécule d'ADN individuelle. Une onde évanescente excite sélectivement des marqueurs fluorescents situés au voisinage de l'interface verre/solvant, limitant ainsi la fluorescence parasite autour de la zone d'observation. Tiré de Hamdan et al. 2009.

3.3.3. Microscopie confocale

L'imagerie par épifluorescence est souvent délicate du fait du signal parasite provenant des fluorophores situés au-dessus et en-dessous du plan focal d'observation. C'est pour palier à ce problème que le microscope confocal a été inventé. Dans ce montage, on fait l'image d'un point source sur l'échantillon et on collecte la lumière de fluorescence à travers un trou placé devant le détecteur. Ce trou de 50 à 100 μm de diamètre est placé dans le plan focal image, rejetant ainsi la lumière provenant des zones non focalisées (Pawley 1995). Cet arrangement définit un volume d'excitation de l'ordre du femtolitre, avec un diamètre d'environ 0.5 μm définie par la diffraction optique sur une hauteur d'environ 2 μm définie par les aberrations sphériques (Nie et Zare 1997 ; Fig. 3.4). Dans la plus grande partie des cas, la source de lumière utilisée est un laser, et on parle alors de Microscope Confocal à Balayage Laser (MCBL). Le laser balaye l'échantillon point par point dans un plan focal, puis on déplace l'objectif pour acquérir une série d'images confocales de l'échantillon qui permettent d'accéder à une représentation 3D de l'objet. Cependant, même si le temps nécessaire pour réaliser l'acquisition d'un point optique est bref, le temps total de balayage nécessaire pour l'obtention de l'image tridimensionnelle est long (supérieur à la seconde), faisant du MCBL une technique de microscopie peu adaptée au suivi dynamique de particules uniques. Dès 1993, Rigler et al. démontrent toutefois qu'il est possible d'appliquer la microscopie

confocale à l'observation en temps réel de molécules uniques (Rigler et al. 1993). En 1996, Edman et Rigler étudient les dynamiques d'hybridation de brins d'ADN avec leur brin complémentaire avec un microscope confocal choisi notamment pour sa capacité à déterminer avec une extrême précision le nombre de molécules fluorescentes présentes dans le volume d'excitation (Edman, Mets, et Rigler 1996). Shuming Nie et al. ont également utilisé la microscopie confocale pour sonder les fluctuations structurales de molécules d'ADN- λ en solution libre (Nie, Chiu, et Zare 1995).

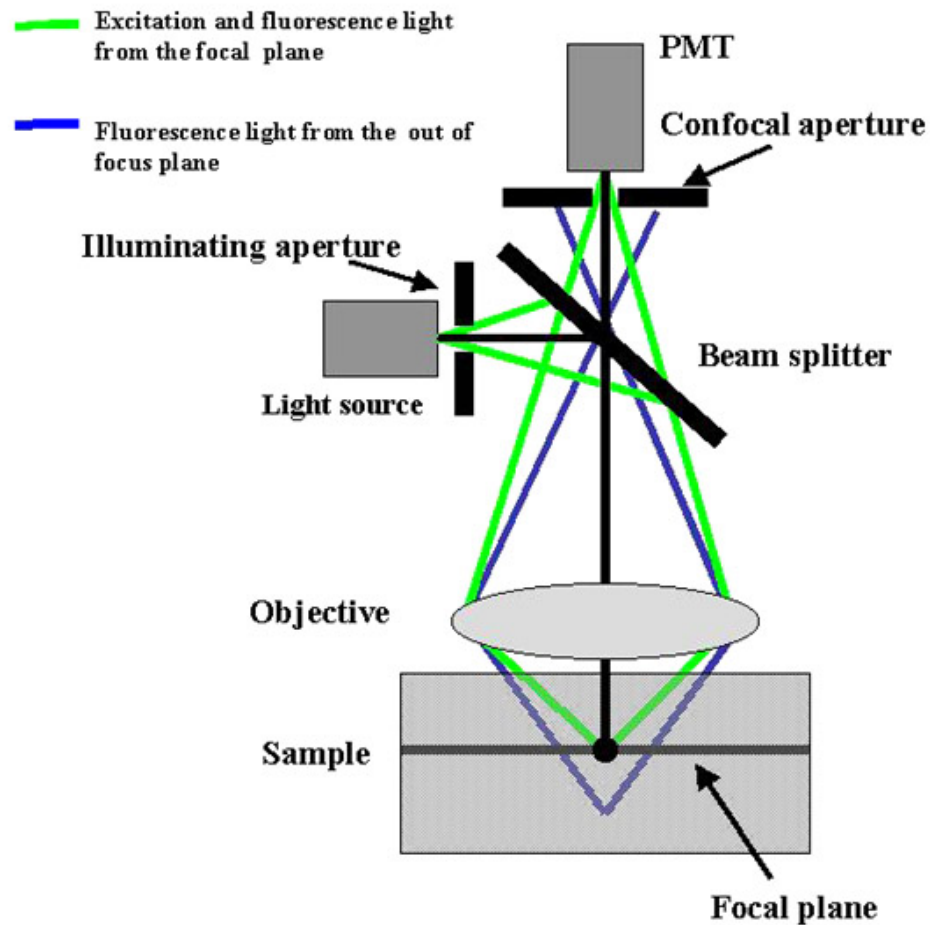


Figure 3.4: principe de la microscopie confocale. Tiré de http://www.lci.kent.edu/Lavrentovich/FCPMweb_site/fcm.html

3.3.4. FCS

Un module particulier peut être ajouté sur les microscopes confocaux pour augmenter leurs fonctionnalités, le module de Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (« *Fluorescence Correlation Microscopy* », ou FCS). Dans ce cas, ce n'est pas l'intensité de signal de fluorescence qui est mesurée, mais les fluctuations d'intensité associées aux mouvements des

particules fluorescentes. Ainsi tous les paramètres physiques pouvant participer aux fluctuations du signal de fluorescence, tels que la concentration locale, le coefficient de diffusion ou les réactions intra et intermoléculaires de biomolécules marquées par un fluorophore sont accessibles par cette technique. A l'heure actuelle, les systèmes de microscopie de corrélation de fluorescence sont presque toujours couplés à un système confocal, permettant de réduire la source lumineuse à un point (fig. 3.5). Le volume observé est ainsi considérablement réduit, mettant en jeu un nombre restreint de molécules, ce qui permet d'améliorer sensiblement la résolution spatiale (axiale et latérale). Cette technique permet en outre l'observation de molécules marquées dans leur environnement, notamment à l'intérieur de cellules sans les dégrader, ce qui a ouvert la voie à une microscopie *in vivo* à haute résolution. La FCS a également permis à Wennmalm et al. d'étudier les fluctuations conformationnelles d'une molécule d'ADN attachée à une surface (Wennmalm, Edman, et Rigler 1997). Ils démontrent que la FCS peut être une technique de microscopie adaptée à l'étude de transitions moléculaires de biomolécules uniques. Citons enfin l'utilisation de la FCS par Tatarkova et al. pour analyser la diffusion de molécules d'ADN double brin, montrant des performances supérieures aux autres techniques d'imagerie pour l'observation de molécules arrondies (Tatarkova et Berk 2005). Cependant, la FCS exige l'observation simultanée d'un faible nombre de particules, et ne peut donc pas réaliser des analyses à haut débit d'une grande population.

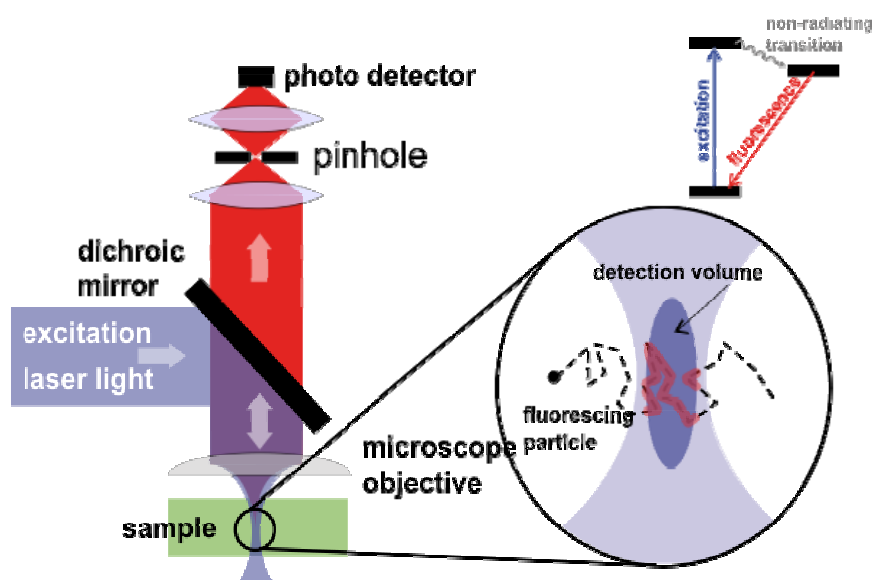


Figure 3.5: principe de la FCS. Les fluctuations d'un signal de fluorescence confocal sont détectées. L'analyse de l'autocorrélation du signal permet ensuite de déterminer le temps caractéristique de ces fluctuations et éventuellement de remonter à des données physiques telles que le coefficient de diffusion d'une molécule.

Tirée du cours de Jan Krieger, « *Absorption and Fluorescence Spectroscopy, Fluorescence Correlation Spectroscopy* ».

3.3.5. FRET

Outre la possibilité d'utiliser différents types de microscopes, il est également possible de jouer sur le marquage pour obtenir une utilisation différente de la fluorescence. Ainsi, l'observation du transfert d'énergie non radiatif entre un fluorophore dit « donneur » et un autre dit « accepteur » peut permettre d'étudier les interactions entre deux molécules à travers la mesure de leur distance (fig. 3.6). Cette distance r doit nécessairement être faible, l'intensité du transfert subissant une décroissance en $1/r^6$ (Selvin 2000). Le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur vont donc devoir se chevaucher, et leur distance doit être inférieure à 10 nm. Cette technique de microscopie est appelée Transfert d'Energie par Résonance de type Förster, en anglais « *Förster Resonance Energy Transfert* », ou FRET. C'est un outil essentiellement utilisé pour la détection, la quantification d'interactions moléculaires. Cette technique peut caractériser des interactions moléculaires indétectables par épifluorescence, mais demande souvent des temps d'acquisition longs. Elle a cependant été très utilisée pour l'observation de molécules uniques. Ainsi, le FRET a permis d'identifier les états conformationnels de molécules uniques diffusant en solution (Deniz et al. 1999), mais également pour observer la dynamique conformationnelle d'enzymes individuelles (Lu 1998) ou encore les interactions entre une protéine et un ADN simple brin (Ha et al. 1996). Notons en outre que cette technique de microscopie a été utilisée avec succès pour séquencer des molécules d'ADN uniques (Braslavsky et al. 2003) et est à la base d'une des technologies de séquençage de nouvelle génération actuellement disponible sur le marché, la technologie HeliScope, que nous avons décrit dans la section 1.

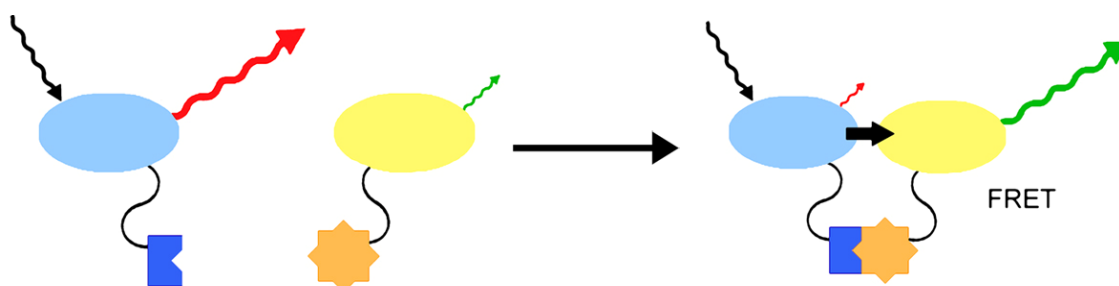
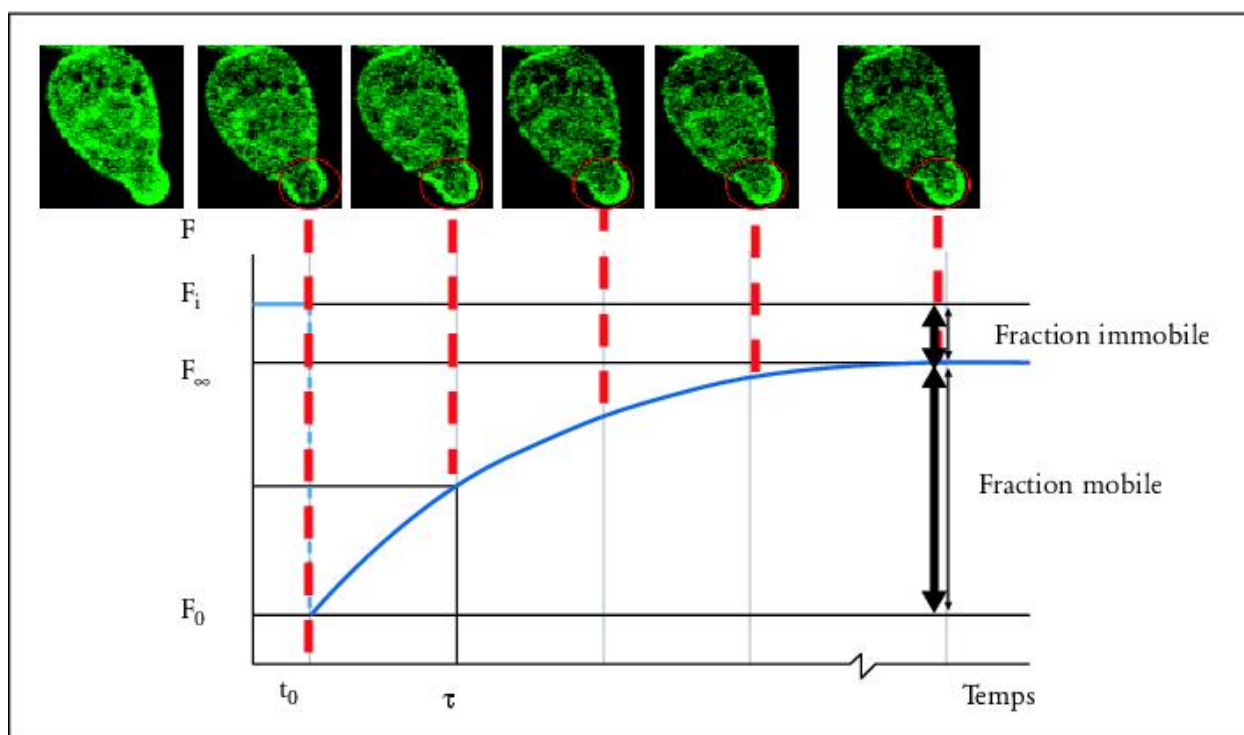


Figure 3.6: principe du FRET : le transfert non-radiatif d'énergie entre deux fluorophores est observé, ce qui peut permettre de remonter à la distance entre les deux molécules et donc d'étudier leurs interactions. Tiré de

<http://www.zmb.uzh.ch/resources/protocols/FRET.html>

3.3.6. FRAP

Citons également la redistribution de Fluorescence après Photoblanchiment (en anglais « *Fluorescence Recovery After Photobleaching* », ou FRAP). Dans ce cas, une zone de l'échantillon est éclairée, jusqu'à extinction complète de sa fluorescence. La redistribution des espèces fluorescentes et photoblanchies va pouvoir notamment permettre d'étudier les dynamiques de diffusion des molécules concernées (fig. 3.7). Le FRAP est l'outil majeur pour l'étude des propriétés cinétiques et diffusives de protéines à l'intérieur de cellules vivantes (M. Weiss 2004) mais a également été utilisé avec succès pour l'étude de molécules d'ADN. Ainsi, Tinland et al. ont mesuré par FRAP le coefficient de diffusion de molécules d'ADN simple brin, dans le but de déterminer avec précision leur longueur de persistance en fonction de la force ionique (Tinland et al. 1997). Cependant, cette technique est souvent peu résolutive, et peut induire une élévation locale de la température, tout comme un *cross-linking* entre molécules pouvant affecter leur coefficient de diffusion (Rayan et al. 2010).



3.3.7. Microscopie super résolutive

En microscopie optique conventionnelle, la limite de résolution est définie par le critère d'Abbe. Un objet lumineux va être observé non comme un point, mais comme une tache provenant de la diffraction. Abbe a montré que deux objets sont indiscernables si la distance qui les sépare est inférieure à $\lambda/2NA$, avec λ la longueur d'onde et NA l'ouverture numérique de l'objectif. Pour nos travaux, le marqueur fluorescent utilisé est le YOYO-1, dont le pic d'émission est à 509 nm. L'objectif que nous avons utilisé est un objectif à grossissement 100X, dont l'ouverture numérique est de 1.3. Le critère d'Abbe nous donne donc alors une résolution de 195 nm environ, ce qui est largement insuffisant pour un suivi de la dynamique de molécules d'ADN. Cependant, ce critère peut être dépassé grâce aux techniques d'imagerie de particules individuelles. En effet, la tâche de diffraction sous laquelle se présente un objet peut être assimilée à une gaussienne, dont le centre peut être déterminé avec une très grande précision, inférieure à la taille du pixel de la caméra qui réalise le suivi de la particule. Cependant, pour atteindre ces performances, il est nécessaire d'augmenter le rapport signal-sur-bruit en jouant sur plusieurs paramètres visant l'amélioration de la qualité du signal ou la diminution du bruit.

Récemment sont apparues de nouvelles techniques d'imagerie super-résolutives, permettant d'atteindre des résolutions spatiales en imagerie de quelques nanomètres, bien inférieures à la limite de résolution optique. Introduites en 2006, la Microscopie par Localisation de PhotoActivation (*PhotoActivation Localization Microscopy*, PALM, Betzig et al. 2006; S. T. Hess, Girirajan, et Mason 2006) et la Microscopie par Reconstruction Optique Stochastique (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*, STORM, Rust, Bates, et Zhuang 2006) sont parmi les techniques d'imagerie super-résolutives les plus populaires. Afin de diminuer la probabilité d'émission de deux ou plusieurs fluorophores situés à une distance inférieure au pouvoir de séparation d'un microscope (et donc indiscernables), il a été proposé d'utiliser une excitation séquentielle et stochastique des fluorophores. En répétant ce processus jusqu'à ce que la majorité des molécules aient été localisées, il est alors possible de reconstruire une image super-résolutive de l'échantillon (fig. 3.8). Ce processus requiert la génération de 1000 à 10000 images, ce qui prend quelques minutes. Puis, ces images sont analysées et l'image finale reconstruite. Ces deux étapes sont cruciales (Henriques et Mhlanga 2009) et peuvent nécessiter plusieurs heures, en fonction de la puissance de l'équipement à disposition de l'utilisateur. Il est donc impossible à l'heure actuelle de générer une image super-résolue d'un échantillon en temps réel. Cependant, des algorithmes ont récemment été développés pour

permettre le suivi de particules uniques par PALM et STORM (Jaqaman et al. 2008 ; Sergé et al. 2008) en réduisant les problèmes de clignotement, séparation d'une particule en plusieurs et seuil de détection qu'un tel suivi engendre (Kalaidzidis 2007). Des efforts sont actuellement menés pour optimiser les étapes d'analyse et de reconstruction, dans le but de tendre vers des imageries en temps réel.

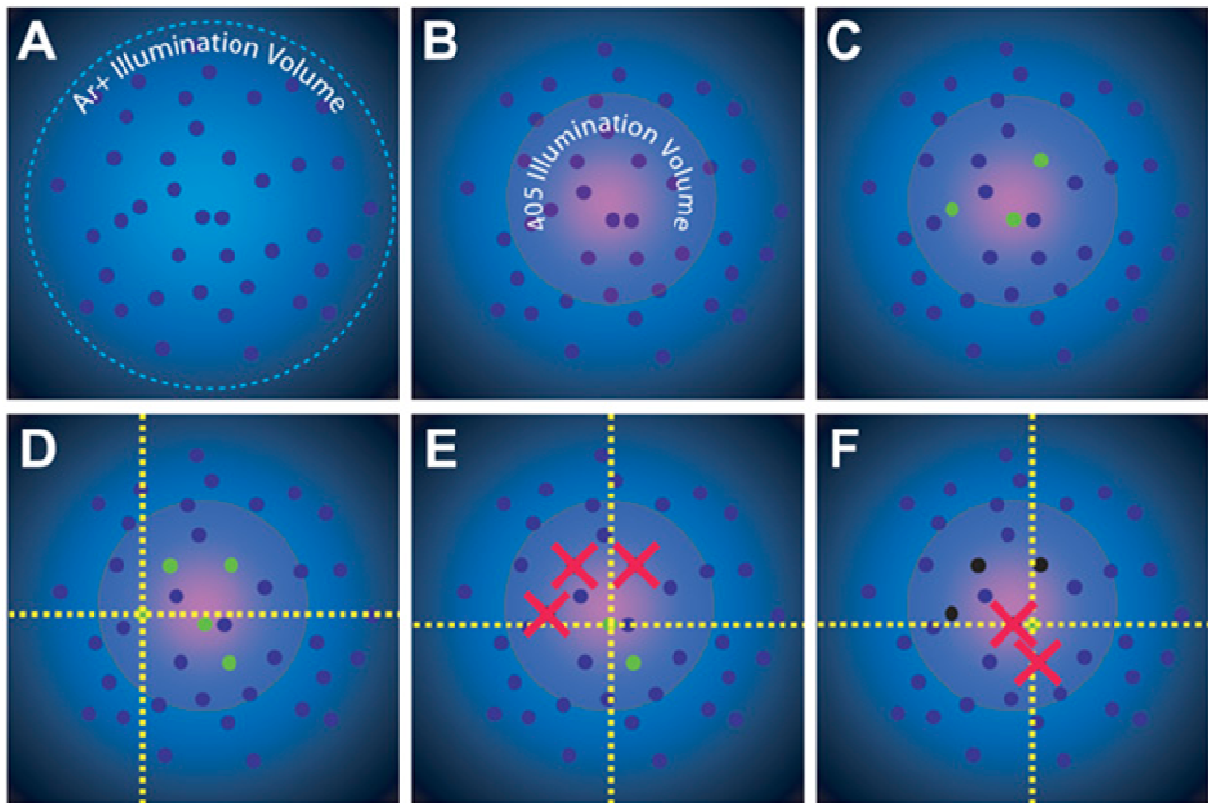


Figure 3.8: principe du PALM. Une zone contenant des molécules fluorescentes est illuminée par deux longueurs d'onde, une pour le **readout** (A), l'autre pour l'activation des molécules (B). Dans la région d'activation, des molécules inactives (en noir) sont activées (C) puis localisées (D). Au bout d'un certain temps, ces molécules photoblanchissent (croix rouges, E) et deviennent inactives (points noirs, F). D'autres molécules sont ensuite activées, localisées et photoblanchies jusqu'à ce que leur nombre soit suffisant pour reconstruire une image super-résolue. Tiré de Hess 2006

Ces techniques super-résolutives ont récemment été appliquées à l'imagerie de molécules d'ADN (Persson et al. 2011). Pour ce faire, l'équipe de Jonas Tegenfeldt a utilisé une autre variante de microscopie résolutive, la microscopie par Emission de Déplétion Stimulée (*STimulated Emission Depletion microscopy*, STED). Comme l'illustre la figure 3.9, la combinaison d'une excitation laser et d'une tâche de désexcitation en forme de donut permet de réduire considérablement la tâche de fluorescence effective et donc la résolution d'imagerie. Ainsi, les résultats publiés indiquent une amélioration de la résolution d'un

facteur 3 à 4 par rapport à la microscopie confocale traditionnelle, sans augmenter le photoblanchiment des marqueurs fluorescents.

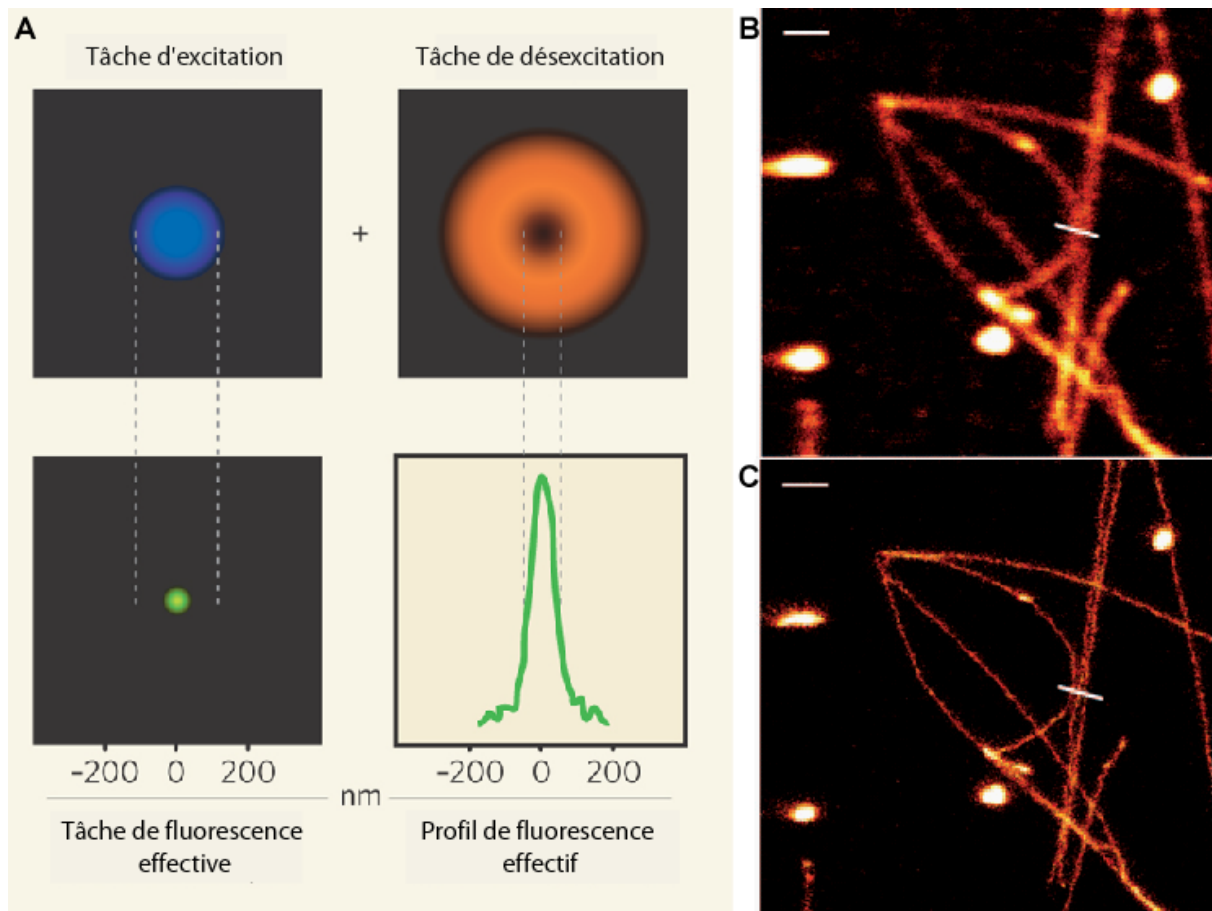


Figure 3.9: (A) Principe de fonctionnement du STED. (B) Image d'une molécule d'ADN-λ marquée au YOYO-1, réalisée par microscopie confocale. (C) Même molécule imagée par STED : l'amélioration de la résolution est d'un facteur 4. Les barres d'échelles valent 1 μm. Image tirée de (Persson et al. 2011).

La liste des techniques de fluorescence que nous présentons est loin d'être exhaustive, et ne se veut qu'un bref aperçu des principales techniques existantes, dont le choix sera déterminé par ce que l'on souhaite mesurer, mais également par un ratio résolution souhaitée / vitesse d'acquisition exigée / difficultés de mise en œuvre.

3.4. Description du dispositif de microscopie adapté au suivi de molécules individuelles

Nous avons mis en place un dispositif de microscopie destiné au suivi de molécules uniques d'ADN dans un réseau d'obstacles. Le suivi d'une population de molécules individuelles

telles que l'ADN- λ implique un espace d'observation relativement grand, afin de visualiser simultanément la plus grande population possible. La vitesse typique des molécules dans ce type de dispositif varie de 20 à 100 $\mu\text{m.s}^{-1}$, ne nécessitant pas des vitesses d'acquisition trop importantes (une molécule ADN- λ se déplaçant à une vitesse de 100 $\mu\text{m/s}$ va avoir un temps de résidence minimal avec un obstacle d'environ 100 ms, K. Dorfman 2010), un temps d'exposition de 20 ms semble donc suffisant pour suivre les dynamiques de collision avec une bonne résolution). D'autre part, une molécule d'ADN- λ a une distance bout-à-bout d'environ 21 μm , ce qui est assez grand pour être observé avec précision par un objectif à grossissement 100X. Ce cahier des charges nous a poussés à réaliser notre étude par épifluorescence. Nous allons à présent décrire le montage réalisé, ainsi que les paramètres que nous avons ajustés pour optimiser l'observation, en suivant le trajet de la lumière sur la figure 3.10.

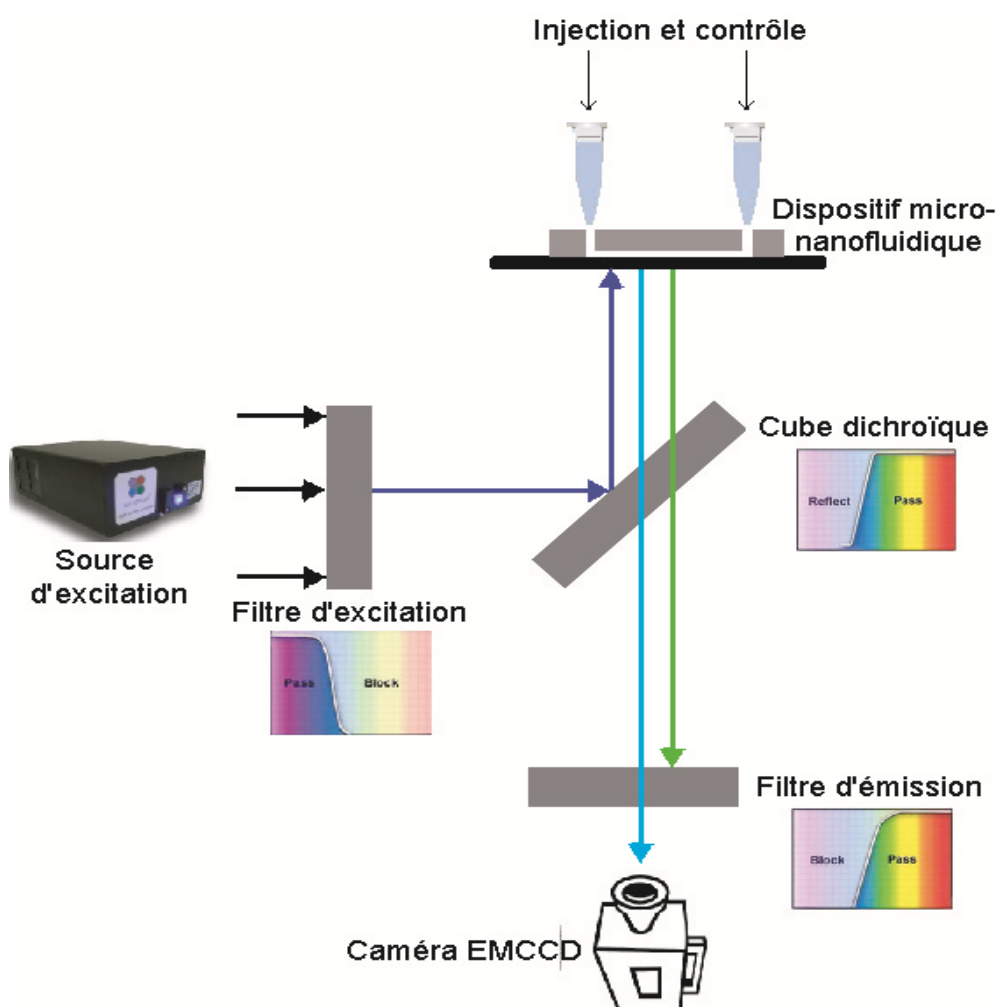


Figure 3.10: schéma récapitulatif des principaux éléments d'un microscope à épifluorescence. Il comporte une source lumineuse dont le rayonnement est filtré par le filtre d'excitation puis réfléchi par le cube dichroïque vers l'échantillon. Le rayonnement émis est ensuite filtré par le filtre d'émission, avant d'arriver à un détecteur optique (en l'occurrence une caméra EMCCD).

3.4.1. 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. Ainsi, en choisissant la longueur d'onde adaptée à l'excitation du YOYO (en l'occurrence 490 nm), on peut aisément asservir une puissance d'excitation comprise entre 2 et 200 mW, ce qui est comparable aux sources laser.

3.4.2. Filtres

Le choix des filtres (excitation, émission et cube dichroïque) est primordial pour l'amélioration du rapport signal sur bruit. Ainsi, le YOYO-1, fluorophore que nous avons utilisé pour l'observation de molécules d'ADN, a un pic théorique 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. Ces caractéristiques sont illustrées sur la figure 3.11.

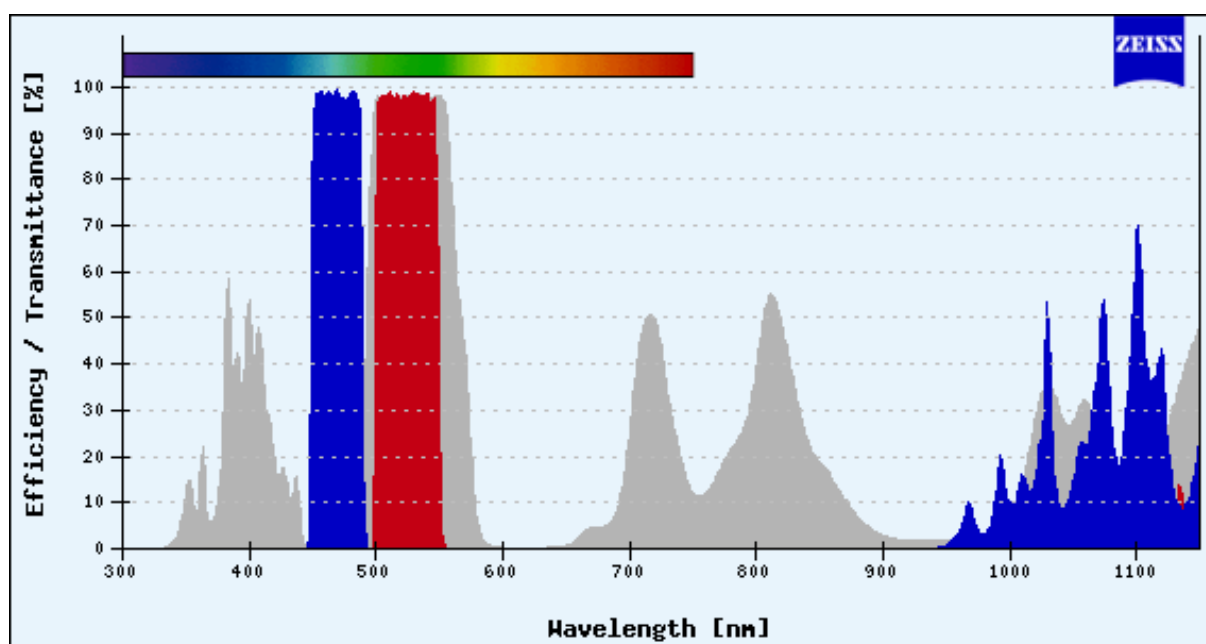


Figure 3.11 : caractéristiques spectrales du cube dichroïque 38 HE de Zeiss[®] utilisé sur notre banc optique

3.4.3. Ouverture numérique et grossissement

Pour un objectif, 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 ($E \propto NA^4/M^2$, (Frigault et al. 2009)). Il est donc primordial de choisir des objectifs à forte ouverture numérique du fait de cette dépendance en puissance 4. Nous avons choisi un objectif à grossissement 100X (nécessaire pour la visualisation de molécules d'ADN avec une résolution acceptable), avec une ouverture numérique de 1.3.

3.4.4. La caméra EMCCD, dédiée à une imagerie à bas niveau de lumière

Notre caméra utilise la technologie *Electron Multiplying Charge Coupled Device* (EMCCD). Elle est composée d'une zone active d'imagerie (des photodiodes) et d'un registre de lecture. La technologie CCD utilise l'effet photoélectrique pour convertir les photons arrivant sur une matrice de pixels en paires électron-trou dans un substrat en semi-conducteur (en l'occurrence en silicium), puis maintient les électrons dans des puits de potentiel. Le nombre d'électrons est proportionnel au nombre de photons reçus par les diodes. A la fin de l'exposition, ces charges sont transmises ligne par ligne dans le registre de lecture de la caméra puis transformées en tension, qui sera proportionnelle au nombre d'électrons. En sortie de la caméra, ce signal sera alors filtré, avant d'être amplifié et numérisé. L'intégration d'un registre de gain dans les caméras EMCCD permet de multiplier le signal par un gain M sans augmenter le bruit.

Les caméras EMCCD sont certainement à l'heure actuelle les caméras offrant la meilleure sensibilité pour des vitesses d'acquisition relativement rapides (de l'ordre d'une dizaine de ms), c'est pourquoi elles sont particulièrement adaptées au suivi de molécules individuelles telles que l'ADN. Le modèle que nous avons utilisé est le modèle ANDOR « Du 885 » refroidie à -70°C . Son efficacité quantique, c'est-à-dire sa probabilité de détection d'un photon d'une longueur d'onde donnée est de 65%, et la taille de ses pixels est de $8 \times 8 \mu\text{m}^2$. Ce choix de caméra s'est avéré tout à fait pertinent pour les observations que nous avons mené, puisque le contraste des films obtenus est très satisfaisant (cf. section 3.6).

3.4.5. Binning

Le binning est une technique d'acquisition numérique consistant à fusionner les charges de plusieurs pixels adjacents dans une matrice de CCD en cours d'acquisition. Effectué avant amplification et numérisation du signal, il permet d'augmenter le rapport signal sur bruit et offre la possibilité d'augmenter la vitesse d'acquisition. Cependant, ce gain se fait au détriment de la résolution et l'utilisation du binning permet de diminuer la taille de l'image en mémoire.

Le binning maximum proposé par la caméra est un binning 4x4, pour lequel une zone de 16 pixels adjacents est fusionnée, ce qui permet d'augmenter la vitesse de rafraichissement du CCD d'un facteur 4. Comme la fusion permet d'ajouter le signal de chaque pixel, sans ajout de bruit, le rapport signal sur bruit est multiplié par 16, mais la résolution de l'image est divisée par 4.

Dans le cas du suivi de molécules fluorescentes, le binning s'avère crucial car pour un même niveau de signal, on peut diminuer la durée d'exposition, donc augmenter la vitesse d'acquisition et limiter le photoblanchiment.

3.4.6. Taille du pixel

Déterminée expérimentalement, elle dépend notamment du grossissement utilisé, de la caméra, ou encore du binning utilisé. Nous avons trouvé, avec le grossissement 100X, la caméra (...) et un binning 4x4, une taille effective de pixel de 333x333 nm.

Notons que nous avons également joué sur les paramètres du logiciel fourni par le fabricant de la caméra (logiciel ANDOR IQ), afin d'augmenter encore la vitesse d'acquisition. A chaque fois, un compromis entre temps d'exposition et gain a du être mené pour se placer dans les conditions les plus optimales.

3.5. Marquage de l'ADN- λ optimisé pour réduire le rapport signal sur bruit

La qualité d'un signal peut être caractérisée par son rapport signal-sur-bruit (Signal to Noise Ratio, SNR, fig. 3.12), dont l'optimisation est primordiale pour améliorer la qualité de la détection. Il peut être calculé selon la formule

$$SNR = \frac{I_m - I_b}{\sqrt{N}} \quad (3.1)$$

avec I_m l'intensité maximale du signal, I_b l'amplitude du bruit, et N l'écart quadratique du bruit. Le principe de calcul du SNR est illustré sur la figure 3.12.

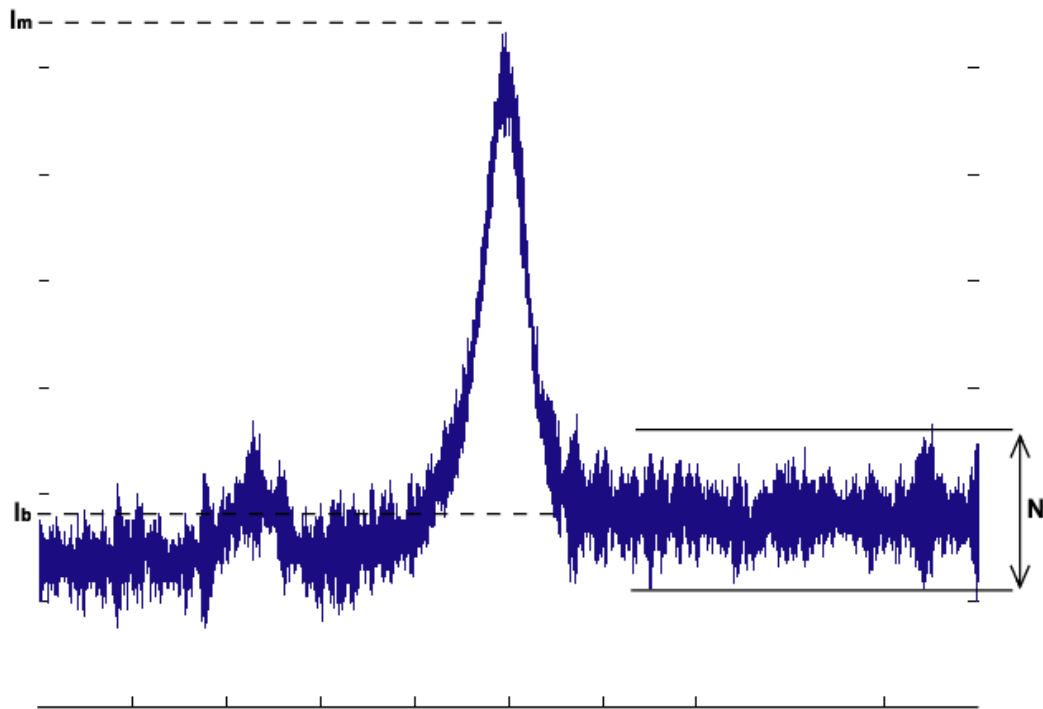


Figure 3.12: représentation d'un signal de fluorescence, caractérisé par une intensité maximale de signal I_m , une intensité de bruit I_b et un écart quadratique N .

Le bruit du signal a plusieurs origines mais l'une des principales provient de l'autofluorescence. Celle-ci peut être engendrée par des impuretés dans le solvant, sur la lamelle porte-objet ou sur les composants optiques du microscope (S. Weiss 1999). Mais l'une des sources majeures d'autofluorescence peut également provenir d'un excès de fluorophores lors du marquage de l'ADN, qui vont alors être présents dans la solution et responsables d'un signal de fluorescence du solvant. On voit bien ici la nécessité d'un compromis entre une quantité suffisante de fluorophores pour augmenter le signal de la

biomolécule que l'on souhaite observer, mais sans excès pour ne pas générer de l'autofluorescence dans le solvant. Même si cette concentration en fluorophore (que l'on calcule dans le cas du marquage d'ADN par un nombre de fluorophore par paire de base) est largement décrite dans la littérature, il est important de la déterminer expérimentalement, afin de trouver précisément un optimum. Celui-ci a été mesuré à 1 fluorophore pour 5 paires de base pour nos expériences. Ainsi, lors de la préparation de nos solutions d'ADN, nous avons effectué des pré-dilutions d'ADN- λ et de YOYO-1 dont nous avons mesuré les concentrations respectives à l'aide d'un équipement de spectroscopie d'absorbance NANODROP respectivement à 260 et 488 nm (concentrations des pré-dilutions respectivement aux alentours de 20 et 4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Une fois ces concentrations connues, nous avons pu ajuster notre solution finale en maîtrisant les concentrations moléculaires (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour l'ADN et 0.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour le YOYO) et par conséquent le rapport ADN-fluorophore.

Une des limitations principales d'amélioration de la sensibilité concerne le photoblanchiment des marqueurs fluorescents. Caractérisés par leur rendement de fluorescence, à savoir le nombre de photons émis par nombre de photons absorbés, ces marqueurs, dans un milieu oxygéné, émettent en moyenne 10^6 photons avant de photoblanchir (Saxton 2009). Comme il est communément admis que l'émission de 100 photons est suffisante pour avoir un rapport signal sur bruit acceptable (de 10/1), environ 10^4 points expérimentaux peuvent donc être obtenus avant photoblanchiment du fluorophore (Ha 2001). Cependant, pour limiter au maximum ce photoblanchiment, responsable d'une réduction drastique du signal de fluorescence, et donc du rapport signal sur bruit, il est classique d'ajouter dans le milieu un agent réducteur afin de limiter au maximum l'oxydation du fluorophore. Dans notre cas, nous avons ajouté 4% en masse de Dithiothreitol (DTT), qui nous a permis d'améliorer la photostabilité de nos fluorophores, et donc d'augmenter le rapport signal sur bruit de nos observations.

3.6. Conclusion sur les résultats d'imagerie obtenus

Les optimisations que nous venons de décrire nous ont permis de réaliser le suivi de molécules d'ADN- λ à travers des réseaux d'obstacles, pour des molécules se déplaçant à des vitesses comprises entre 20 et 100 $\mu\text{m/s}$, avec des temps d'exposition variant de 20 à 40 ms. La figure 3.13 est un exemple d'acquisition pour des vitesses de molécules de 40 $\mu\text{m/s}$ avec un temps d'exposition de 30 ms. Nous avons tracé, à l'aide du logiciel image J, le profil

d'intensité de fluorescence autour d'une molécule d'ADN : l'intensité maximale est ici de 255, l'amplitude du bruit de 20, et la variance de 4, pour un rapport signal-sur-bruit correspondant de près de 60, ce qui est très satisfaisant, nous laissant de la marge pour imager des molécules se déplaçant plus rapidement et nous a permis de mener des analyses de dynamiques à l'échelle de la molécule individuelle, que nous allons à présent présenter.

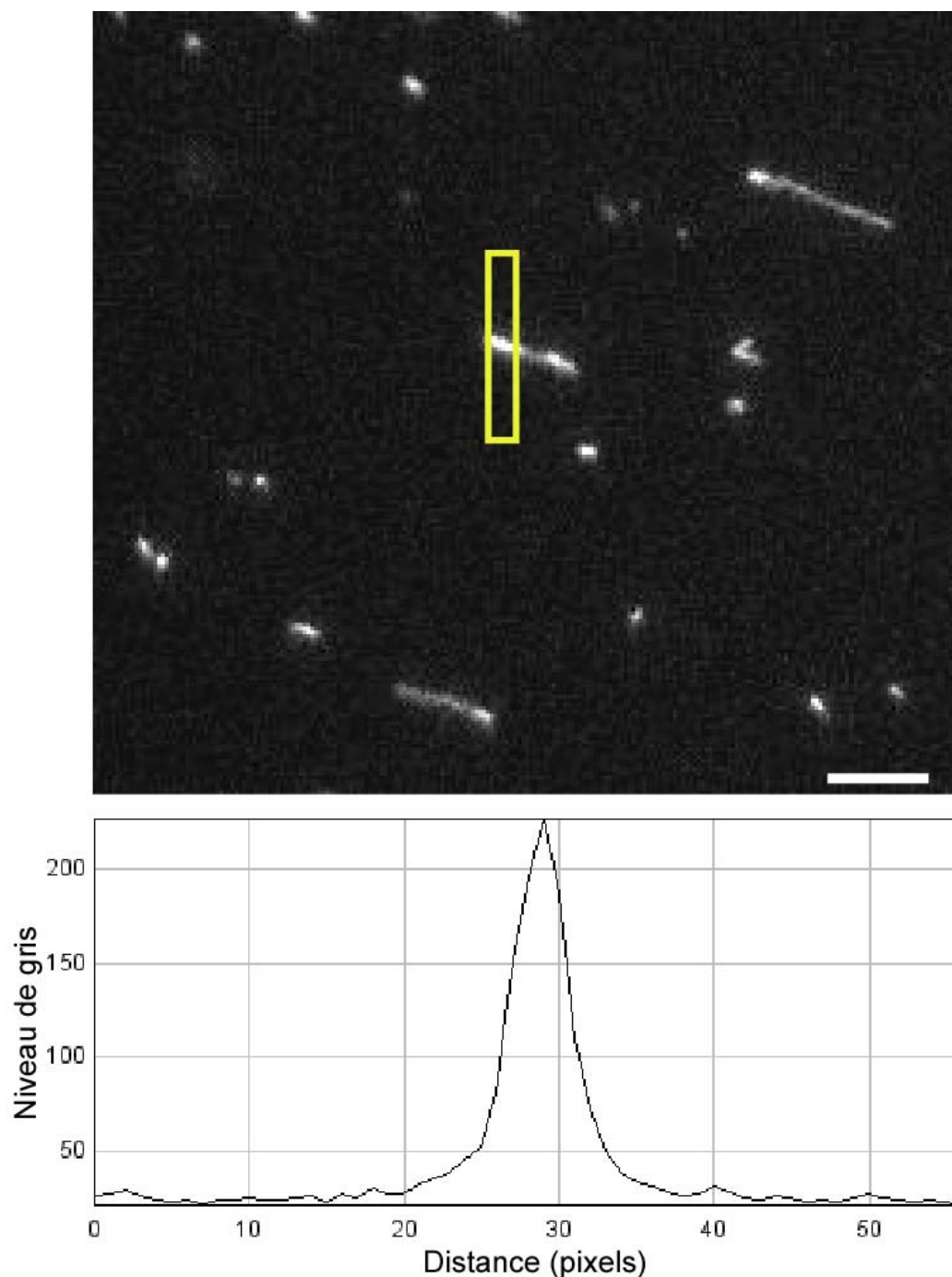


Figure 3.13: **(haut)** image réalisée par notre montage à épifluorescence de molécules d'ADN- λ se déplaçant dans un réseau d'obstacles à une vitesse de 40 $\mu\text{m/s}$ avec un temps d'exposition de 30 ms. La barre d'échelle correspond à 10 μm . **(bas)** Profil d'intensité de fluorescence autour d'une molécule (cadre jaune), nous permettant de déduire un rapport signal-sur-bruit de 59 tout à fait satisfaisant.

Chapitre 4

Étude des collisions entre des molécules d'ADN et des obstacles cylindriques



4.1. Quelques notions de base

4.1.1. Définition du nombre de Péclet

a) Définition du Péclet classique

Le nombre de Péclet est un nombre sans dimension utilisé pour caractériser des phénomènes de transport dans un flux hydrodynamique. Il mesure l'effet de la convection par rapport à la diffusion. Il mesure en fait le temps de diffusion d'une particule de diamètre a se déplaçant à une vitesse U , a^2/D , relativement à son temps de convection a/U . Le nombre de Péclet s'écrit donc

$$Pe = \frac{Ua}{D} \quad (4.1)$$

Cette définition est établie dans le cas d'une particule à conformation stable. On comprend aisément que cette définition n'a aucune raison d'être appliquée à l'ADN, dont le diamètre vaut $2Rg$, étant donné que ses dimensions (sa conformation) peuvent changer au cours de la collision. Il est cependant nécessaire de le caractériser dans le cas de manipulation de molécule d'ADN dans un réseau d'obstacle. Pour cela, nous allons étudier un peu plus en détail la physique d'une chaîne de polymères soumise à un flux hydrodynamique.

b) Définition du Péclet « collision »

En physique des polymères, il existe un modèle simple d'élasticité appelé modèle de la chaîne librement jointe, que nous allons à présent définir. Dans ce modèle, une molécule d'ADN est assimilée à une succession de N segments de Kuhn indépendants, de longueur l_k (cf. section 1) dont les orientations sont complètement décorrélées (Flory et Volkenstein 1969). Dès lors, si l'on applique une force F à l'extrémité de la molécule, alors l'énergie du segment i peut s'écrire $E_i = Fl_k \cos(\theta_i)$, avec θ_i l'angle formé par le segment i et la direction de la force. On peut alors écrire l'énergie totale de la chaîne comme étant

$$E = Fl_k \sum_{i=1}^N \cos(\theta_i) \quad (4.2)$$

En exprimant la fonction de partition puis l'énergie libre F , on peut en déduire l'expression de l'extension relative de la molécule sous la forme

$$\frac{l_k}{L} = -\frac{\delta F}{F} = \coth\left(\frac{Fl_k}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{Fl_k} \quad (4.3)$$

avec L la longueur de contour de la molécule.

A faible force ($Fl_k \ll k_B T$), cette expression peut s'écrire

$$\frac{l}{L} \approx -\frac{Fl_k}{3k_B T} \quad (4.4)$$

Lorsque la force appliquée à la molécule est une force de poussée hydrodynamique, alors son intensité s'exprime en fonction de la vitesse U de la molécule et de son coefficient de friction ξ sous la forme

$$F = \xi U \quad (4.5)$$

En insérant cette expression de la force dans l'équation 4.4, on aboutit à la relation

$$\frac{l}{L} \approx -\frac{\xi U l_k}{3k_B T} \quad (4.6)$$

Le théorème de fluctuation-dissipation permet de relier le coefficient de friction de la molécule à son coefficient de diffusion

$$\frac{\xi}{k_B T} = \frac{1}{D} \quad (4.7)$$

Les équations 4.3 et 4.4 permettent d'exprimer l'extension relative de la molécule sous la forme

$$\frac{l}{L} \approx \frac{U l_k}{3D} = \frac{2}{3} \frac{U l_p}{D} \quad (4.8)$$

Le rapport $U l_p/D$ est un nombre sans dimension qui caractérise la déformation d'une chaîne polymérique. Il existe une analogie évidente avec le nombre de Péclet classique que nous avons défini précédemment. Nous pouvons le définir comme étant le nombre de Péclet de collision, mais par soucis de commodité, nous l'assimilerons au nombre de Péclet classique et le définirons par le terme Pe dans la suite du manuscrit. Il est important de noter que c'est cette définition qui est choisie dans la plupart des publications traitant de la déformation de molécules d'ADN dans un réseau d'obstacles. Ainsi, en se servant de l'équivalence électrohydrodynamique, Randall et Doyle ont défini le nombre de Péclet dans le cas d'un actionnement électrophorétique sous la forme

$$Pe = \frac{\mu_0 E l_p}{D} \quad (4.9)$$

μ_0 étant la mobilité libre de la molécule, et E le champ appliqué à l'intérieur du réseau (G. C. Randall et Doyle 2006).

Ajoutons que pour qu'une collision entraîne un dépliement de la molécule, il faut que les effets convectifs dépassent les effets diffusifs, et que donc Pe soit supérieur à 1 (dans le cas contraire, on assistera à des collisions en roll-off, comme nous le verrons dans la section 4.1.2. Cependant, cette valeur est un ordre de grandeur, et ne peut être prise comme référence absolue. Ce choix reste arbitraire, de nombreuses définitions existent en effet pour le nombre de Péclet. Ainsi Teclemariam choisit le diamètre des obstacles comme dimension caractéristique (Teclemariam et al. 2007) et définit le nombre de Péclet sous la forme $Pe = Ud/D$.

Nous avons utilisé le nombre de Péclet pour caractériser le régime de déformation des molécules d'ADN, il est donc primordial d'être capable de le calculer, et donc d'avoir accès à la longueur de persistance de la molécule, ainsi qu'à son coefficient de diffusion.

La longueur de persistance, tout comme le coefficient de diffusion, sont des grandeurs intrinsèques de l'ADN que nous nous proposons d'estimer. La longueur de persistance d'une molécule d'ADN est de l'ordre de 50 nm, soit 150 pb, mais cette valeur dépend de la concentration saline de la solution (une diminution de cette concentration tend à augmenter la longueur de persistance, (Baumann et al. 1997). De plus, les effets du marqueur fluorescent (en l'occurrence YOYO-1) restent débattus (OB Bakajin, Duke, et al. 1998) ; (Murade et al. 2009) ; (Günther, Mertig, et Seidel 2010), nous avons donc décidé d'utiliser une valeur conservative pour ce paramètre, à savoir 50 nm (J. L. Viovy 2000a).

Nous avons ensuite déterminé expérimentalement le coefficient de diffusion des molécules d'ADN- λ à l'intérieur de nos réseaux d'obstacles. Pour ce faire, nous avons suivi plusieurs dizaines de molécules en l'absence de tout flux pendant une minute, avec une cadence d'acquisition de 110 ms. Puis, nous avons calculé l'évolution temporelle du déplacement quadratique moyen (MSD) en 2 dimensions, et moyenné sur l'ensemble des molécules suivies (fig. 4.1). Précisons que le déplacement quadratique moyen d'une particule est proportionnel au temps, suivant la loi

$$MSD = 2dDt \quad (4.10)$$

avec d la dimension d'espace, et D le coefficient de diffusion.

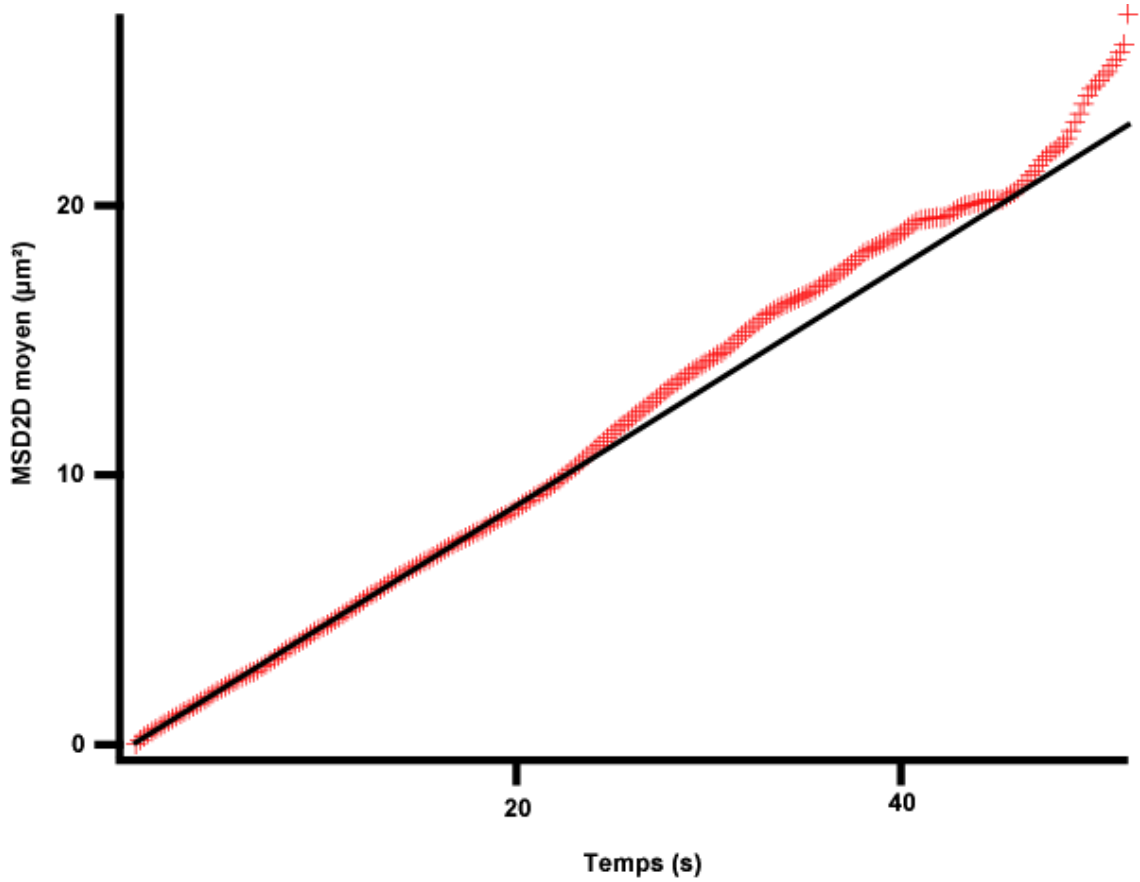


Figure 4.1 : Déplacement quadratique moyen en fonction du temps en 2 dimensions pour des molécules d'ADN- λ à l'intérieur de nos dispositifs (moyenne sur 12 molécules). La pente, proportionnelle au temps de diffusion, est calculée aux temps courts.

Le coefficient de diffusion déduit de ces mesures est de $0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour l'ADN- λ (49 kpb). Il est intéressant de noter que des mesures précédentes (D. E. Smith, Perkins, et Chu 1996) donnaient un coefficient de diffusion de $0.47 \mu\text{m}^2/\text{s}$, ce qui est légèrement supérieur mais en excellent accord avec nos mesures. En effet, nous attendons que le faible confinement induit par la géométrie de notre dispositif (hauteur de canal de $0,8 \mu\text{m}$) tende à diminuer le coefficient de diffusion d'environ 10% (Brochard et de Gennes 1977).

Dès lors, le seul paramètre permettant d'ajuster le nombre de Péclet est la vitesse des molécules, U pour un actionnement hydrodynamique et μE pour une actuation électrophorétique. Cette vitesse est mesurée par suivi de molécules individuelles et mesure de leur déplacement en fonction du temps pour chaque expérience. Notons que le nombre de Péclet peut être calculé pour nos expériences selon :

$$Pe \approx \frac{U(\mu\text{m/s})}{10} \quad (4.11)$$

4.1.2. Classification des événements de collision ADN-obstacles

Lorsqu'une molécule d'ADN, et plus généralement une chaîne polymérique, se déplace à travers un réseau d'obstacles guidée par un champ électrophorétique ou hydrodynamique, elle a une probabilité de rencontrer un de ces obstacles, et la collision se traduit par une modification de sa course. Des simulations (Saville et Sevick 1999) et des observations expérimentales (G. Randall et Doyle 2004) ont montré l'existence de deux types de collisions. Le premier, désigné par le terme de collisions glissantes (en anglais « *roll-off collisions* »), désigne une collision engendrant peu de changement conformationnel de la molécule. Ce mode d'interaction traduit le fait que la molécule subit un phénomène d'advection le long de l'obstacle sans se déformer (en « roulant »), traduisant la prédominance de la diffusion sur la convection. Du fait de l'expression du nombre de Péclet précédemment défini, c'est ce mode de collision qui a lieu pour un nombre de Péclet inférieur à 1. Cependant, le phénomène de glissement ne dépend pas uniquement du nombre de Péclet, mais également de la taille de la molécule, de celle de l'obstacle ainsi que du paramètre d'impact b (fig. 4.2), défini comme la distance entre le centre de masse de la molécule et le centre de l'obstacle. Randall et Doyle ont en particulier observé des collisions suivies de glissement lorsque le paramètre d'impact était plus grand que la somme des rayons de l'obstacle et de giration de la molécule (G. C. Randall et Doyle 2006), condition que l'on peut donc écrire

$$b > R_g + R_{obs} \quad (4.12)$$

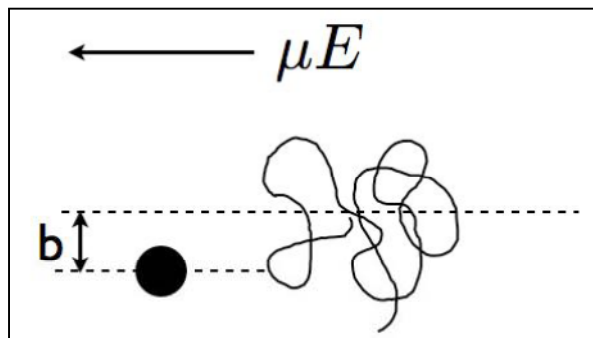


Figure 4.2: Représentation schématique du paramètre d'impact b , tiré de (Araki, Aydil, et Dorfman 2010).

Ces collisions glissantes ont une durée caractéristique indépendante de la taille de la molécule (Saville et Sevick 1999) et n'ont donc pas d'impact sur la dépendance en taille de la mobilité globale des molécules à travers un réseau d'obstacles. Diminuer au maximum la proportion de collisions glissantes dans un dispositif de séparation est donc primordial pour améliorer la

résolution de ces dispositifs. Une des voies envisagées consiste en la réduction de la taille des obstacles (K. Dorfman 2010), afin qu'elle soit très inférieure à la taille de la molécule.

Le deuxième type de collision se traduit par la déformation de l'ADN, qui adopte une configuration dite en « épingle à cheveu ». Il est généralement admis que ces collisions ont lieu que lorsque le coefficient de Péclet est supérieur à 1. Ces collisions sont divisées en quatre catégories dont les noms s'inspirent de la forme prise par la molécule au cours de la collision : collisions en U, J, X ou W (fig. 4.3).

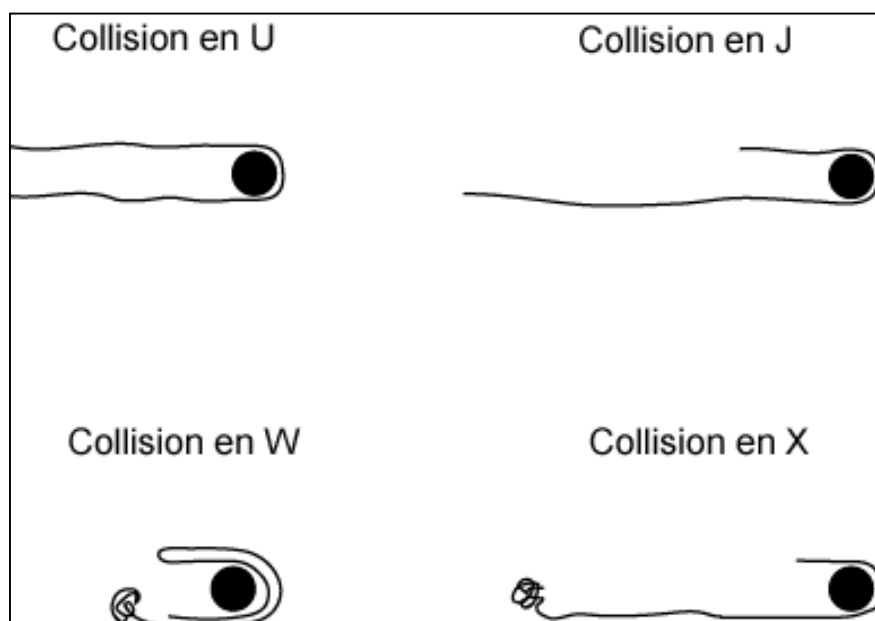


Figure 4.3: Lorsque la convection domine les phénomènes de diffusion (pour $Pe > 1$), la collision d'une molécule d'ADN avec un obstacle entraîne sa déformation en 4 conformations différentes décrites dans cette figure.

Les temps caractéristiques de désengagement de l'ADN ont été étudiés pour toutes ces conformations (à l'exception des collisions en W) et nous nous proposons d'en rappeler les résultats essentiels. Lors d'une collision en U ou J, la molécule d'ADN présente une extension à peu près constante, proche de sa longueur de contour (G. C. Randall et Doyle 2006). Ces collisions suivent une dynamique de corde autour d'une poulie (« *rope-over-pulley* ») que nous allons à présent détailler. Ce sont des collisions modèles, de par l'extension de la molécule considérée comme constante, ce qui explique qu'elles aient été les plus étudiées. La distinction entre U et J se fait par le déséquilibre entre les deux bras au cours de la collision : une collision en U est caractérisée par des bras symétriques (de taille très proche, idéalement identique), ce qui n'est pas le cas d'une collision en J, où on peut clairement identifier un bras plus long que l'autre (fig. 4.4). Randall et Doyle fixent arbitrairement la limite U/J au rapport $x_1/L = 0.45$ (voir la définition de x_1 dans la figure 4.4).

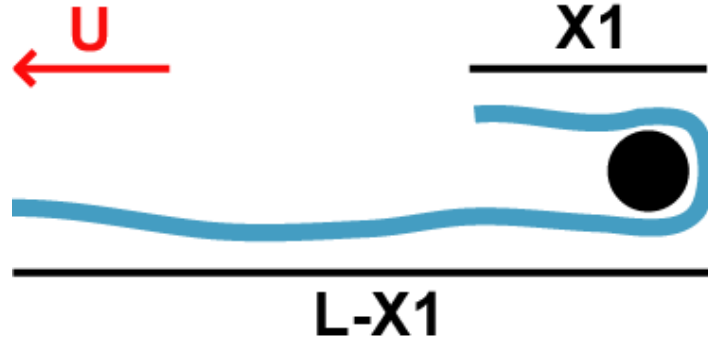


Figure 4.4: schématisation d'une collision « rope-over-pulley ». La chaîne est considérée totalement étirée au cours d'une collision sous l'action d'un flux d'intensité U . La longueur $x_1(t)$ se réfère à la longueur du plus petit bras au cours du temps. $x_1(0)$ correspond à la longueur du bras le plus court en début de désengagement.

La collision en épingle à cheveu suit trois phases :

(i) la molécule est « accrochée » (*hooked*) à l'obstacle et deux bras (de longueur de contour respective l_1 et l_2) s'étirent de chaque côté de l'obstacle dans la direction du flux. La molécule se déroule, les deux bras se déplient jusqu'à leur complète extension : la molécule reste suspendue dans une conformation dite « en U », la tension aux extrémités de chaque bras maintenant la chaîne dans un état étiré. Pour des raisons de simplicité, nous considérerons que la molécule à ce stade est complètement étirée, c'est-à-dire que $L = l_1 + l_2$. Randall et Doyle ont montré que ce temps de désenroulement suivait une loi en $L/\mu_0 E$.

(ii) la molécule commence à se désengager. Il y a équilibre entre la force électrique agissant sur le bras le plus long et la force électrique agissant sur le bras le plus court, plus la force totale de poussée visqueuse :

$$\frac{q_k}{l_1} l_1 E + \xi_c v = \frac{q_k}{l_k} l_2 E \quad (4.13)$$

v étant la vitesse de déplacement de la molécule, équivalente au changement de longueur du bras le plus long par unité de temps dl_2/dt .

On aboutit alors à l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dl_2}{dt} = \frac{q_k E}{\xi_c l_k} (l_2 - l_1) \quad (4.14)$$

La solution de cette équation différentielle s'écrit sous la forme

$$l_2(t) = \frac{L}{2} + \left(l_2(0) - \frac{L}{2} \right) \exp\left(\frac{2q_k E}{\xi_c l_k} t \right) \quad (4.15)$$

A l'instant où la molécule se désengage de l'obstacle, elle est encore complètement étirée. La durée du désengagement est donc le temps au bout duquel le bras le plus long atteint la

longueur de contour de la molécule L , ce qui permet d'exprimer le temps de désengagement sous la forme

$$t_{unh} = \frac{\xi_c l_k}{2q_k E} \ln \left(\frac{1}{(2l_2(0)/L) - 1} \right) \quad (4.16)$$

Comme nous l'avons vu précédemment, le coefficient de friction dans un modèle de diffusion de Rouse peut s'exprimer comme $\xi_c = N_k \xi_k$, on peut donc réécrire le temps de désengagement

$$t_{unh} = \frac{N_k l_k \xi_k}{2q_k E} \ln \left(\frac{1}{(2l_2(0)/L) - 1} \right) \quad (4.17)$$

En utilisant l'expression de la mobilité libre donnée dans la section 1.2, on obtient finalement

$$t_{unh} \approx \frac{\tau_c}{2} \ln \left(\frac{1}{(2l_2(0)/L) - 1} \right), \text{ avec } \tau_c \approx \frac{L}{\mu_0 E} \quad (4.18)$$

Comme $L = l_1 + l_2$, on peut réécrire l'équation 4.17 en fonction de $l_1(0)$ sous la forme

$$t_{unh} \approx \frac{\tau_c}{2} \ln \left(\frac{1}{1 - (2l_1(0)/L)} \right) = -\frac{\tau_c}{2} \ln \left(1 - \frac{2l_1(0)}{L} \right) \quad (4.19)$$

Au cours d'une collision en X, le bras le plus long n'est pas complètement étiré au moment où le plus petit commence à se dégager de l'obstacle. Masubushi et al ont montré que la durée caractéristique de désengagement pouvait s'exprimer sous la forme (Masubuchi et al. 1995)

$$t_{unh[x]} = \left[\sqrt{2} \exp \left(\frac{\pi}{4} \right) - 1 \right] \frac{x_1(0)}{\mu_0 E} \quad (4.20)$$

Enfin, une molécule peut subir une collision en W, caractérisée par une conformation enchevêtrée au moment de l'impact (fig. 4.3). Cependant, ce sont des collisions métastables (K. Dorfman 2010) qui se transforment le plus souvent en collisions en U, J ou X. De plus, il a été montré que ces collisions étaient rares (G. C. Randall et Doyle 2006), leur impact dans le processus de séparation pouvant ainsi être négligé.

4.1.3. Description des collisions en fonction de la géométrie du réseau

Nous allons à présent discuter des dynamiques de molécules d'ADN lorsqu'elles se déplacent à travers un réseau d'obstacles car la géométrie et la densité du réseau déterminent le comportement des molécules. Dans la plupart des publications traitant de ce sujet (simulations ou expérimentations), les réseaux utilisés sont périodiques (très souvent carrés ou hexagonaux). Le diamètre des obstacles est noté $d = 2.R_{obs}$ et la distance entre les centres des

obstacles a pour valeur a . Dès lors, l'espacement inter-obstacles a pour valeur $a-d$. Cette valeur est exacte pour des réseaux carrés, mais peut être utilisée comme bonne approximation pour des réseaux hexagonaux (K. Dorfman 2010).

Lorsque la taille des obstacles est très supérieure au rayon de giration des molécules, les collisions ne se traduisent pas par l'enroulement de l'ADN autour de l'obstacle (schéma en haut à droite dans la figure 4.5). Dans le cas des réseaux d'obstacles larges et denses, les molécules vont migrer en reptation à travers le réseau, suivant les mécanismes décrits pour la migration d'ADN à travers un gel. Cette géométrie est donc inadaptée pour la séparation de longues molécules d'ADN (cf. section 1.2.3.).

Lorsqu'à l'inverse, le rayon des obstacles est comparable (ou inférieur) au rayon de giration des molécules, on s'attend à rencontrer des collisions décrites par le mécanisme d'enroulement d'une corde autour d'une poulie. Ce modèle est particulièrement valable pour des réseaux d'obstacles dilués (schéma en haut à gauche dans la figure 4.5 ; situation (a-d) $\gg R_g$), dans lesquels les événements de collision sont isolés. Le terme « dilué » implique que le temps de relaxation de la molécule est très inférieur au temps nécessaire pour traverser une ligne du réseau. Les premières modélisations de migration à travers un réseau d'obstacles étaient fondées sur des collisions uniques (Sevick et Williams 1994), ce qui simplifie considérablement le problème sans permettre d'évaluer la façon dont les molécules sont séparées par le réseau. Aussi, il n'est pas étonnant de constater l'écart entre le modèle de Nixon et Slater, prédisant une augmentation catastrophique de la dispersion pour des grandes molécules (Nixon et Slater 1994) et qui rend par conséquent ces réseaux dilués inappropriés à leur séparation, avec les expériences (Doyle et al. 2002 ; N. Minc et al. 2004) tout comme les modélisations sur réseaux dilués (Patel et Shaqfeh 2003). Les expériences de séparation se sont avérées plus résolues et plus rapides que prévues par les modèles, même si la diminution drastique du nombre d'obstacles dans le réseau, et la diminution du nombre de collisions subies par une molécule associée, entraîne une perte importante du pouvoir de séparation.

Le dernier cas est celui d'obstacles petits et peu espacés (panneau en bas à gauche de la figure 4.5), qui s'avère être une description raisonnable du déplacement de longues molécules à travers un gel d'agarose (Deutsch et Madden 1989 ; Popelka et al. 1999). Le comportement est alors décrit par le modèle de « géométration » : l'espace entre les obstacles est insuffisant pour que la molécule récupère sa configuration en pelote entre deux collisions, et la partie avant de la molécule interagit avec l'obstacle suivant lorsque l'extrémité arrière quitte l'obstacle. La pelote grossit au cours du temps, et lorsqu'elle est assez grosse, elle se déforme en épingle à cheveu autour de l'obstacle, et ce processus se répète au cours du temps. Les

simulations (Deutsch et Madden 1989)(Shaffer et Olvera de La Cruz 1989) indiquent que la mobilité de molécules en régime de géométration n'est pas dépendante de leur taille, ce qui est en accord avec les résultats observés dans un gel d'agarose.

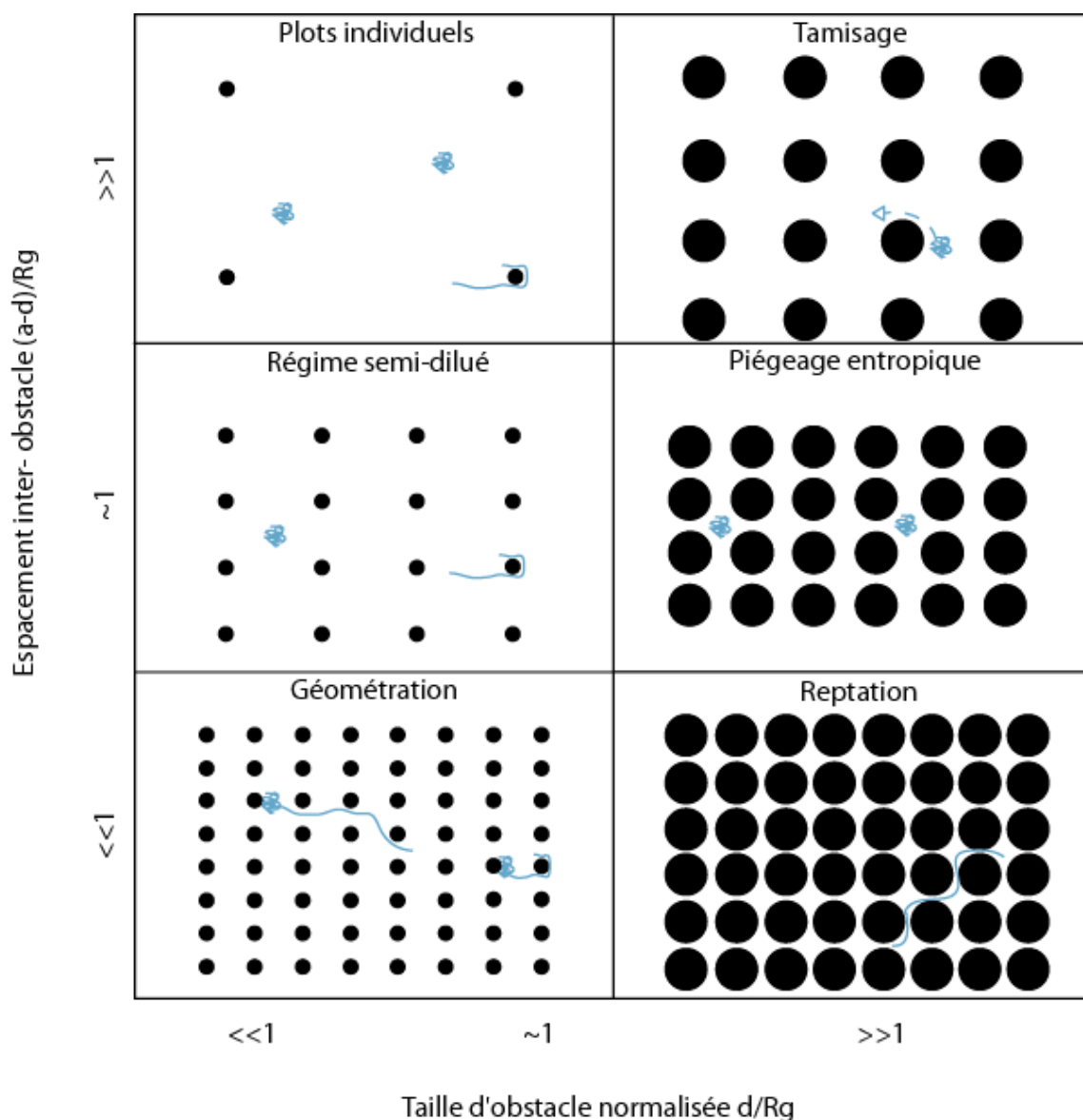


Figure 4.5: différents régimes de déplacement d'une molécule d'ADN à travers un réseau d'obstacles, en fonction de sa géométrie (obstacles petits ou grands, respectivement sur les parties gauche et droite, de densités variables).

Dans la plupart des expériences rapportées (Volkmut et Austin 1992 ; G. Randall et Doyle 2004), le réseau d'obstacles utilisé est trop dense pour que l'on puisse appliquer le modèle dilué, mais l'espacement entre les obstacles est suffisant pour que les molécules puissent reprendre complètement leur conformation libre, nécessitant le développement d'un modèle alternatif à la géométration. Introduit par Minc et al, le modèle de *Continuous-Time Random-Walk* (CTRW) propose une extension du modèle de géométration prenant en compte la

possibilité pour les molécules de se relaxer complètement entre deux collisions successives (Nicolas Minc, Viovy, et Dorfman 2005). Dans le modèle de CTRW, chaque collision est assimilée à une collision avec un obstacle isolé. Il aboutit à exprimer la mobilité effective des molécules à travers le réseau, avec une dépendance linéaire en taille (la mobilité décroissant avec la taille des molécules).

Cependant, outre les dynamiques de collision en elles-mêmes, il convient également de prendre en compte les probabilités de collision (pour chaque type de collision), mais également les dynamiques de relaxations des molécules entre deux collisions successives pour décrire complètement le déplacement de molécules d'ADN à travers un réseau semi-dilué. Le développement d'un modèle complet est encore largement en exploration (Ou et al. 2009 ; Olson et al. 2011).

4.1.4. Déplacement par hydrodynamique ou électrophorèse

Les expériences de séparation d'ADN dans des réseaux d'obstacles micro/nanofabriqués ont été quasi exclusivement menées par électrophorèse (K. Dorfman 2010). Cependant, outre l'application d'un champ électrique, il est également possible d'engendrer le déplacement des molécules à travers le réseau par l'application d'un flux hydrodynamique. A notre connaissance, les seules études qui ont été menées sont une analyse théorique (Kenward et Slater 2006b) et expérimentale (Tecomariam et al. 2007) des dynamiques de collision entre des molécules d'ADN soumises à un flux hydrodynamique et un obstacle micrométrique fixe. Elles concluent à une équivalence des dynamiques de piégeage et de désengagement des molécules d'ADN entre actuation électrique et hydrodynamique. Cette hypothèse, anticipée par Long et al. (Long, Viovy, et Ajdari 1996), a été reprise ensuite dans la plupart des études (G. C. Randall et Doyle 2006). Cependant, l'étude expérimentale de Teclemariam ne présente aucune donnée concernant ces dynamiques à l'échelle de la molécule individuelle, en raison du rapport signal sur bruit médiocre de leur système d'imagerie. L'étude des collisions ADN-obstacle sous flux hydrodynamique reste donc un champ d'investigation ouvert, que nous avons abordé.

L'utilisation d'un flux hydrodynamique présente des atouts intéressants. En effet, il permet de s'affranchir d'un problème majeur et récurrent de l'électrophorèse, l'existence de flux électro-osmotiques liés à la présence de charges à la surface des nanoplots. Ces flux électro-osmotiques induisent des flux spatialement hétérogènes dans la couche de Debye, donc à

proximité des obstacles, faussant par là les analyses théoriques des dynamiques de désengagement. Ces flux électro-osmotiques peuvent être efficacement réduits par le greffage covalent de « brosses » polymériques hydrophiles à la surface des nanoplots (et plus généralement à la surface du dispositif). Cependant, la taille de ces brosses, de 10 nm voire plus (Murat 1989), devient non négligeable lorsque l'on réduit la taille des obstacles et peuvent donc introduire un biais dans l'analyse de la physique de désengagement de la molécule autour d'un nanoplot. De plus, la nécessité d'ajouter une couche isolante à la surface d'un dispositif en silicium (typiquement une croissance d'oxyde de silicium, cf. section 2.2.4) ajoute une étape au processus de fabrication et complexifie la réalisation d'obstacles à l'échelle nanométrique.

4.2. Etude expérimentale des événements d'interaction ADN / nano-obstacle

Comme nous l'avons déjà évoqué, la quasi-totalité des expériences de manipulation de molécules d'ADN à travers un réseau d'obstacles a été effectuée par électrophorèse. On peut montrer (Probstein 1994) que la vitesse électrophorétique d'une particule peut être décrite par l'équation de Helmholtz-Smoluchowski :

$$U(x, y, z) = \frac{\varepsilon \zeta_{EO} E_x}{\mu} \quad (4.21)$$

où ε représente la permittivité de la solution, μ sa viscosité, ζ_{EO} le potentiel zêta électrophorétique de la particule et E_x l'intensité du champ électrique dans la direction de l'écoulement. Comme la vitesse n'est aucunement fonction de la position radiale de la particule, le profil de vitesse associé est homogène (profil de vitesse plat, fig. 4.6).

L'hydrodynamique dans nos dispositifs est à bas nombre de Reynolds. En effet, la dimension caractéristique est $h = 0.8 \mu\text{m}$, la vitesse de l'écoulement varie de 20 à 100 $\mu\text{m/s}$, ce qui donne (en considérant que la viscosité de la solution est celle de l'eau),

$$1.8 \cdot 10^{-5} < \text{Re} < 9 \cdot 10^{-5}$$

Le profil de l'écoulement associé est donc de type Poiseuille et la configuration de nos dispositifs, que l'on peut assimiler à deux plaques espacées d'une distance $h = 0.8 \mu\text{m}$ (la largeur des canaux est plus de 100 fois supérieure à leur hauteur), nous donne un profil de vitesse

$$U(x, y, z) = U(z) = U_{\max} \left(1 - \frac{4z^2}{h^2} \right) \quad (4.22)$$

où la vitesse maximale est donnée par l'équation

$$U_{\max} = \frac{h^2}{8\eta} \frac{d\rho}{dx} \quad (4.23)$$

dépendant de la viscosité dynamique η et du gradient de pression selon l'axe x de l'écoulement.

L'équation 4.22 montre que le profil de vitesse associé à un flux hydrodynamique va dépendre de la position en z de la particule (ou de la molécule dans notre cas), avec un profil de vitesse parabolique (écoulement de cisaillement), contrairement aux flux électrophorétiques, homogènes sur toute la largeur de la canalisation (fig. 4.6). Ces écoulements hydrodynamiques n'ayant que très peu été utilisés pour la manipulation de molécules d'ADN à travers un réseau d'obstacles, nous avons souhaité évaluer les différences de dynamiques entre les deux modes d'actionnement.

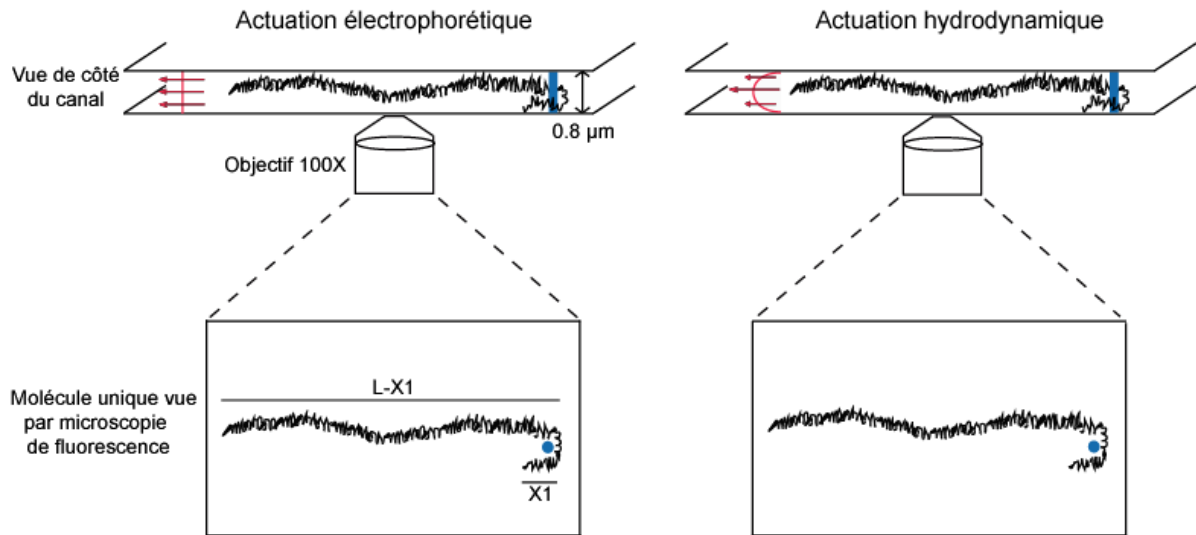


Figure 4.6: représentation schématique d'une collision en J au cours d'une collision induite par un flux électrophorétique (**gauche**) et hydrodynamique (**droite**). Le profil du flux électrophorétique, constant sur toute la hauteur du canal, induit des forces verticalement homogènes, alors que le flux parabolique de Poiseuille est associé à une force de poussée supérieure pour les portions de la chaîne situées au centre du canal comparativement aux portions situées sur les bords du canal. La longueur maximale d'extension du bras le plus court est notée x_1 tout au long du manuscrit.

4.2.1. Déformation de l'ADN dans un écoulement de cisaillement

L'étude de la statistique et de la dynamique de molécules d'ADN uniques dans ce type d'écoulement remonte aux premiers travaux d'imagerie de molécules individuelles menés par Perkins et al. dès 1994 dans un écoulement purement élongationnel (T. T. Perkins et al. 1994), puis en 1999 dans un écoulement de cisaillement (D. E. Smith, Babcock, et Chu 1999b). Ils ont ainsi observé les dynamiques conformationnelles de molécules d'ADN placées dans un écoulement de cisaillement entre des plaques de verre parallèles espacées de 50 μm . Un flux de cisaillement peut être représenté comme la somme d'une composante purement élongationnelle caractérisée par un taux de contrainte (fig. 4.7-A)

$$\dot{\varepsilon} = \left[\left(\frac{\partial v_y}{\partial x} \right) + \left(\frac{\partial v_x}{\partial y} \right) \right] / 2 \quad (4.24)$$

et d'une composante rotationnelle caractérisée par une vorticité

$$\omega = \left[\left(\frac{\partial v_y}{\partial x} \right) - \left(\frac{\partial v_x}{\partial y} \right) \right] / 2 \quad (4.25)$$

Dans le cas d'un flux de cisaillement simple, l'intensité des composantes élongationnelle et rotationnelle est égale. La force d'un flux de cisaillement est représentée par un nombre sans dimension appelé nombre de Weissenberg (Wi), et défini comme le rapport du taux de cisaillement par le temps de relaxation. En jouant sur le taux de cisaillement et sur le temps de relaxation des molécules (en modifiant la viscosité du solvant), ils ont ainsi caractérisé la déformation de l'ADN en fonction du cisaillement. Une des conclusions de leur étude est qu'un flux de cisaillement entraîne une extension de l'ADN, mais beaucoup moins importante qu'un flux élongationnel, du fait de la présence d'une composante rotationnelle qui déstabilise l'étirement de la molécule, entraînant un phénomène de «tumbling» (fig. 4.7-B). En effet, lorsque la molécule s'étire, elle s'aligne le long du flux, la force de poussée exercée sur la molécule va diminuer, favorisant la relaxation de la molécule. Cependant, le mouvement brownien peut perturber cette dynamique, provoquant à nouveau une extension, le tout produisant des instabilités que l'on exprime par ce terme de « tumbling ».

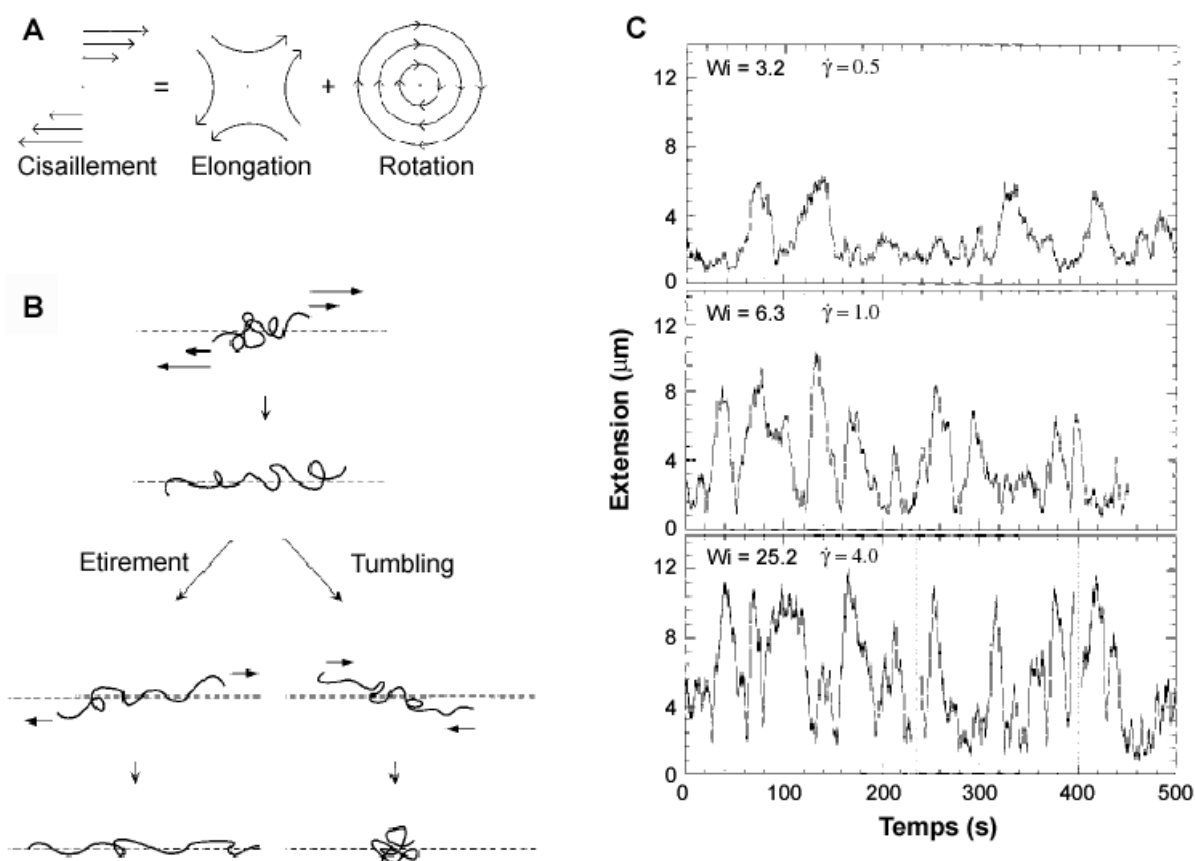


Figure 4.7: représentation schématique d'un flux de cisaillement (A) et de son influence sur les dynamiques conformationnelles de molécules d'ADN. Un flux de cisaillement peut entraîner des instabilités conformationnelles décrites comme phénomène de tumbling (B). Même à bas Weissenberg, de larges fluctuations conformationnelles sont observées. Ces fluctuations sont d'autant plus rapides et importantes que Wi augmente (C). L'extension augmente avec Wi , car le gradient de vitesse, et donc les forces hydrodynamiques agissant sur la molécule, augmente. Tiré de Smith et al. 1999.

Au final, ces travaux démontrent que l'existence d'une composante de cisaillement dans un écoulement modifie les propriétés de dynamique et de statistique d'une molécule d'ADN. Ces propriétés altérées vont changer le comportement de l'ADN lorsqu'il entre en interaction avec un nano-obstacle, comme nous nous proposons de le voir à présent.

4.2.2. Interaction ADN/obstacle avec une force hydrodynamique / électrophorétique

Nous avons dans un premier temps décidé de mesurer le rôle du champ de force sur les dynamiques de collision de molécules d'ADN dans un réseau d'obstacles. Pour cela, nous avons réalisé des manipulations par électrophorèse et hydrodynamique avec les mêmes

conditions expérimentales (géométrie du dispositif, nombre de Péclet). Il faut noter cependant que les obstacles étaient légèrement plus grand (300 nm de rayon au lieu de 250) dans le cas de manipulations électrophorétiques, en raison de la nécessité d'ajouter une couche d'isolation électrique (croissance thermique de SiO₂).

a) Espace des conformations

	Hydrodynamique		Electrophorèse	
Pe	Collisions U/J	Collisions X	Collisions U/J	Collisions X
2	95%	5%	40%	60%
4	90%	10%	10%	90%
10	20%	80%	5%	95%

Figure 4.8 : probabilités d'occurrence des collisions U/J et X à 3 Péclet différents, pour des manipulations hydrodynamiques et électrophorétiques.

Nous avons calculé les probabilités d'occurrence des différentes catégories de collisions précédemment présentées. Nous avons négligé les collisions en W, car nous ne les avons presque jamais observées, probablement en raison de leur caractère transitoire. Nous avons comparé ces probabilités pour trois débits différents (donc à trois Péclet différents), à savoir 20, 40 et 100 $\mu\text{m/s}$ (donc des nombres de Péclet d'environ 2, 4 et 10), pour des manipulations hydrodynamiques et électrophorétiques. L'échantillonnage est effectué sur plus de 40 événements de collisions pour chaque mesure rapportée dans la figure 4.8.

Le calcul de ces probabilités montre une dispersion conformationnelle réduite dans le cas de manipulations hydrodynamiques. En effet, les molécules soumises à un flux hydrodynamique ne vont subir que très rarement des collisions en X à bas Péclet (jusqu'à 4). Les collisions en X vont par contre être majoritaires si les molécules sont soumises à un champ électrique, y compris à Péclet 2 (60% d'occurrence). Le seuil à partir duquel les collisions en X deviennent largement prédominantes est décalé en fonction du champ de force appliqué aux molécules, passant de Péclet 4 dans le cas électrophorétique, à Péclet ~ 10 dans le cas hydrodynamique.

Ainsi, pour l'étude des dynamiques de collisions de molécules d'ADN dans un réseau d'obstacles, il est assez légitime de ne considérer que les collisions en U/J pour des molécules soumises à un flux hydrodynamique (à bas et moyen Péclet), alors que cette hypothèse est

fausse pour un flux électrophorétique. Nous en concluons que le premier avantage quant à l'utilisation d'un flux hydrodynamique dans des dispositifs de séparation de molécules d'ADN repose sur une plus grande homogénéité conformationnelle, avec un seul type de collisions prédominant sur une large gamme de Péclet allant d'au moins 2 à 8, limitant par là la dispersion entre événements et donc améliorant probablement la résolution de séparation des dispositifs.

b) Dynamiques de désengagement

Dans un deuxième temps, nous nous sommes concentrés sur les dynamiques de désengagement en mesurant les temps de désengagement pour les conformations U/J. Ces mesures nous ont permis de déterminer le temps caractéristique de désengagement τ_c pour des débits de 20 et 40 $\mu\text{m/s}$ (Péclet 2 et 4 respectivement). Cette étude montre que le temps de désengagement est 4 fois plus long lorsque la molécule est soumise à un flux hydrodynamique par rapport à une actuation électrophorétique (fig. 4.9).

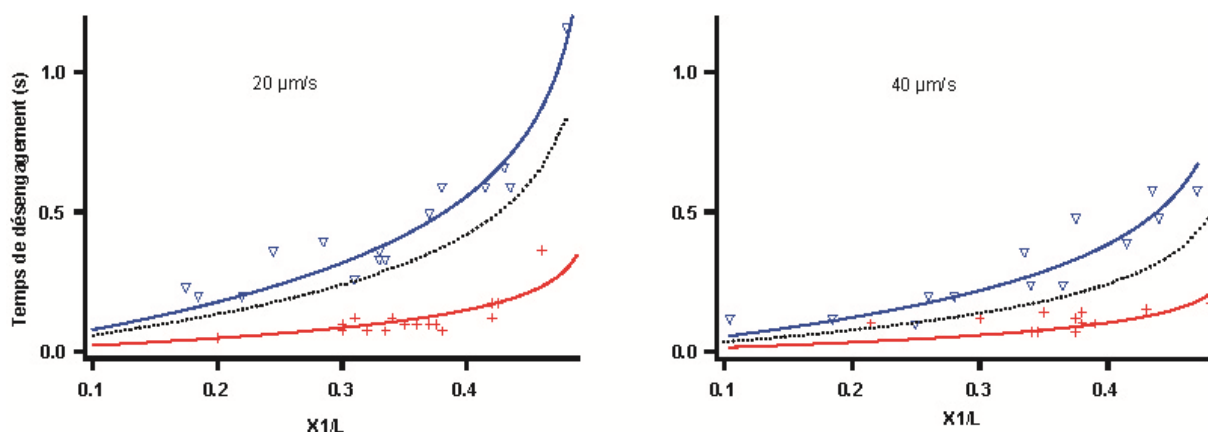


Figure 4.9: Les temps de désengagement de différentes collisions en U/J sont tracés en fonction de la conformation initiale de l'ADN, caractérisée par la longueur du plus petit bras. Les expériences ont été réalisées pour deux vitesses de migration différentes (20 $\mu\text{m/s}$ pour le graphe de gauche, 40 $\mu\text{m/s}$ pour le graphe de droite, ce qui correspond à des nombres de Péclet respectivement égaux à 2 et 4). Sur les deux graphes, les courbes bleues et rouges correspondent aux dynamiques enregistrées pour des actuations hydrodynamiques et électrophorétiques respectivement. Les courbes en noir représentent les prédictions attendues par le modèle de Randall et Doyle, qui a été validé pour des collisions électrophorétiques de molécules d'ADN avec des obstacles à l'échelle micrométrique.

A $Pe = 2$, le temps caractéristique dans le cas hydrodynamique est proche de la valeur théorique du modèle de Randall et Doyle (0.69 et 0.61 s respectivement en utilisant l'équation 4.19). A l'inverse, les dynamiques de désengagement sont près de trois fois plus rapides que

la théorie lorsque la molécule est soumise à un flux électrophorétique (0.18 contre 0.52 s). Les mêmes tendances sont observées à $Pe = 4$, avec un temps caractéristique de désengagement multiplié par des facteurs 1.3 et 0.4 pour des actuations hydrodynamique et électrophorétique, par rapport à la valeur théorique attendue.

Ces résultats sont pour le moins surprenants, puisque nos résultats expérimentaux avec un flux hydrodynamique sont assez proches du modèle de Randall et Doyle, validé par des manipulations sous champ électrique, alors qu'on détecte un écart sous application d'un champ électrophorétique. En plus, nos données sont en contradiction avec l'hypothèse d'équivalence entre forces électrique et hydrodynamique (Long, Viovy, et Ajdari 1996), à la base des équations de Randall et Doyle. Il faut cependant souligner que cette hypothèse a été démontrée pour des flux homogènes, ce qui ne peut être appliqué à des flux de Poiseuille (fig. 4.6).

Pour tenter de comprendre l'origine de ces différences en terme de dynamiques de désengagement, nous avons décidé d'analyser les collisions ADN-obstacle à l'échelle de la molécule individuelle, comme le montrent les figures 4.10 et 4.11. Nous avons enregistré l'évolution temporelle du centre de masse (c.d.m.) de plusieurs molécules au cours d'une collision avec un obstacle. Les collisions hydrodynamiques se caractérisent par une évolution temporelle en trois étapes :

- (i) une vitesse de progression constante avant impact
- (ii) un plateau associé à l'engagement de la molécule autour de l'obstacle
- (iii) le désengagement de la molécule et son retour à une vitesse constante

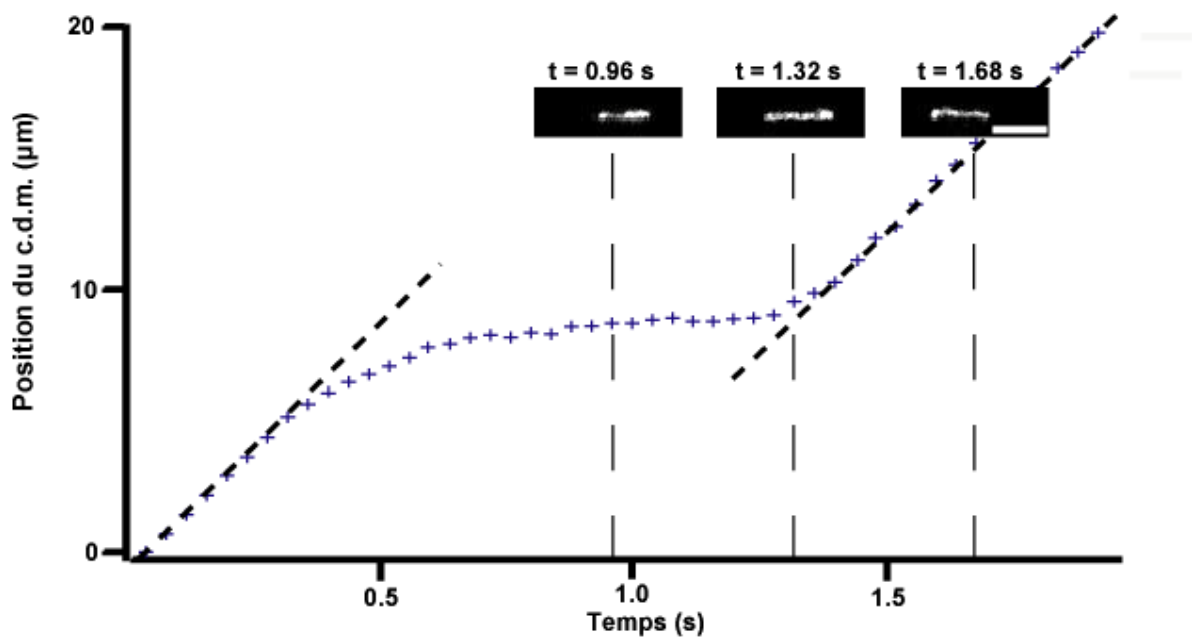


Figure 4.10: graphe montrant l'évolution au cours du temps du centre de masse (c.d.m.) d'une molécule d'ADN soumise à un flux hydrodynamique au cours d'une collision avec un obstacle de 135 nm de rayon. Ses vitesses avant et après collision sont identiques, comme le montrent les deux pentes tracées en pointillés. Les inserts sont des images par fluorescence montrant l'évolution de la conformation de cette molécule au fil de la collision. La barre d'échelle représente 10 μm .

Dans chacune des collisions que nous avons exploitées, les vitesses pré et post-impact étaient égales (fig. 4.9 et 4.10). Les profils d'évolution du centre de masse dans le cas de collisions électrophorétiques se sont avérés moins standards, avec une accélération observée juste après la collision. La vitesse de la molécule est en moyenne multipliée par 1.8 ± 0.3 (cf. histogramme sur la figure 4.11), comme Minc et al. l'avaient observé pour des collisions entre molécules d'ADN et particules magnétiques (N. Minc et al. 2005). Dans cet article, il est suggéré que cette accélération provient de la différence de poussée entre une molécule d'ADN étirée ou en pelote. Cette hypothèse a cependant été infirmée par les expériences modèles de Randall et Doyle menées avec des obstacles micrométriques (G. C. Randall et Doyle 2006). Nous suggérons que cette accélération peut être reliée à la modification du champ électrique autour des obstacles provenant notamment de la présence de flux électro-osmotiques. Il est intéressant de noter que cette hypothèse permettrait également d'interpréter les dynamiques de désengagement électrophorétiques plus rapides que nous observons. En effet, un champ électrique amplifié augmente les forces de traction pendant le désengagement, donnant lieu à des dynamiques de désengagement accélérées. Ces résultats montrent que les modèles de désengagement qui ont été établis pour décrire les collisions électrophorétiques avec des

obstacles micrométriques, offrent une meilleure description des cinétiques de désengagement hydrodynamiques avec des obstacles nanométriques.

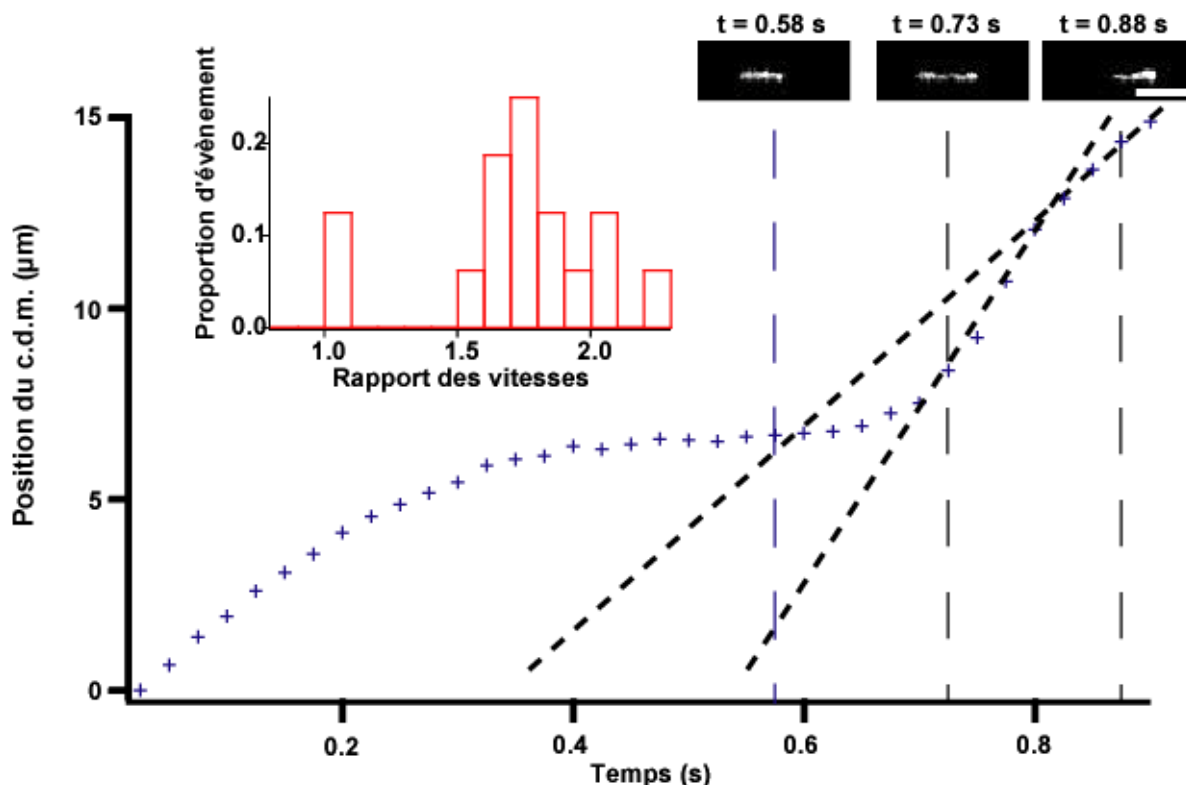


Figure 4.11: Même courbe que présentée sur la figure (4.10), dans le cas cette fois d'une actuation électrophorétique. La vitesse de la molécule est deux fois plus rapide juste après sa sortie de l'obstacle, avant de retrouver sa vitesse libre. Cette accélération a été observée de façon reproductible, comme le montre le diagramme en insert, présentant le rapport des vitesses avant et en fin de collision (20 événements considérés). La barre d'échelle représente 10 μm.

Nous avons ensuite décidé d'aller plus loin et d'étudier la physique de migration de molécules d'ADN à travers un réseau d'obstacles nanométriques, en nous focalisant d'abord sur les dynamiques intrinsèques de l'ADN, qui constituent une composante critique des cinétiques de désengagement (Popelka, Kabatek, Viovy, et Gas 1999b).

c) Relaxation des molécules d'ADN soumises à des actuations électrique et hydrodynamique

Les réseaux d'obstacles que nous avons fabriqués sont dans un régime semi-dilué (espacement de 3 μm donnant $3.5 < (a-d)/R_g < 4$), et en conséquence les chaînes d'ADN, étirées en sortie de collision, peuvent reprendre leur conformation libre en pelote entre les obstacles. Leur déplacement à travers le réseau d'obstacle suit alors le modèle de *Continuous-Time Random-Walk* (CTRW), décrit précédemment. Nous avons étudié le mécanisme de

relaxation à l'échelle de la molécule individuelle, pour des chaînes de 35 et 49 kpb et ce pour différents Pe .

Dans le cas de l'électrophorèse, un même temps de relaxation de 0.33 ± 0.05 s a été mesuré à $Pe = 2.5$ et 4.5 pour des chaînes de 35 kpb, et le même comportement est observé pour des chaînes de 49 kpb, avec un temps de relaxation de 0.53 ± 0.10 s à $Pe = 2.7$ et 5.5 (fig. 4.12).

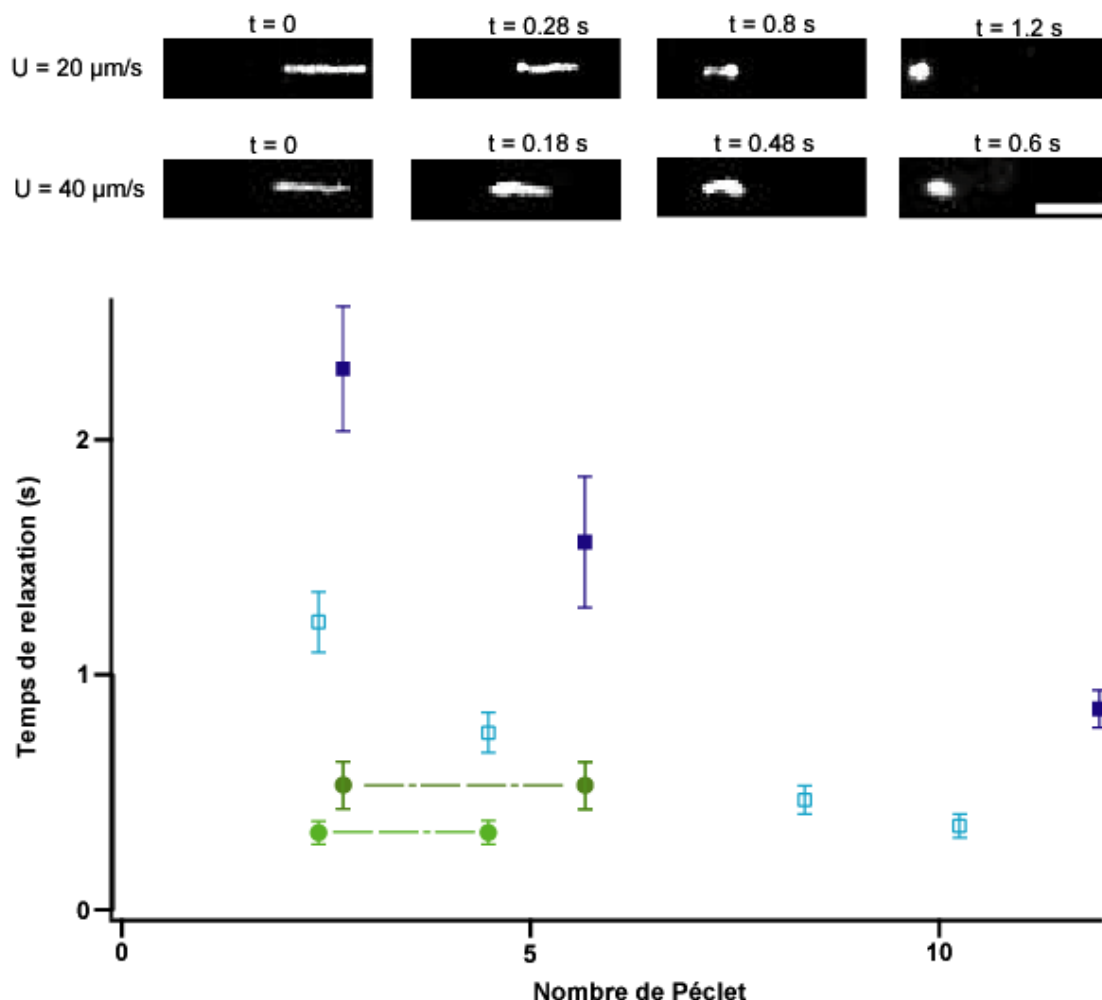


Figure 4.12: les inserts de la partie haute sont des images par fluorescence de la relaxation d'une molécule d'ADN au cours du temps pour deux vitesses de migration. Le graphe donne les temps de relaxation de molécules de 35 et 49 kpb (nuances claires et foncées respectivement) en fonction de Pe . Ce temps de relaxation est plus long lorsque les molécules sont soumises à un flux hydrodynamique qu'à un flux électrophorétique (données en bleu et vert respectivement).

Le temps de relaxation est systématiquement plus long pour des flux hydrodynamiques. Le plus gros écart entre les régimes hydrodynamique et électrophorétique a été obtenu à bas Péclet ($Pe = 2$), avec un temps de relaxation 4 fois plus long. De plus, nous avons observé une nette dépendance du temps de relaxation avec le nombre de Péclet, que l'on peut associer au fait que dans des flux de cisaillement, les dynamiques des molécules d'ADN dépendent du

taux de cisaillement (D. E. Smith, Babcock, et Chu 1999 ; Doyle, Shaqfeh, et Gast 1997 ; LeDuc et al. 1999). Les écoulements Poiseuille (à profil parabolique) sont caractérisés par des taux de cisaillement qui varient de 50 à 250 s^{-1} environ, sachant que nos canaux mesurent 800 nm de hauteur et les vitesses de déplacement sont comprises entre 20 et 100 $\mu m.s^{-1}$. Dans cette gamme de cisaillement, Doyle et Ladoux ont montré que les chaînes d'ADN subissaient des fluctuations temporelles lentes, provenant de dynamiques cycliques provoquées par le couplage entre la vitesse de la chaîne dans la direction du flux et les fluctuations dans la direction du gradient de cisaillement (P.S. Doyle, Ladoux, et Viovy 2000). Bien que dans notre cas la molécule ne soit pas attachée par une de ses extrémités, nous supposons que le cisaillement du flux hydrodynamique induit des fluctuations cycliques à l'intérieur de la chaîne qui ralentissent sa relaxation. Ces dynamiques particulières ont une conséquence inattendue sur la conformation de la molécule pendant sa collision. En effet, Brochard a montré que le seuil de flux pour déformer une chaîne d'ADN était déterminé par le rapport du diamètre de la molécule sur son temps de relaxation (Brochard-Wyart 1995). Dès lors, des temps de relaxation ralentis vont favoriser le déploiement rapide des bras de la molécule étirée au cours d'une collision, réduisant ainsi la probabilité de former des collisions en X, comme nous le constatons à Péclet inférieur à 8.

Comme nous l'avons vu précédemment, le déplacement des molécules d'ADN entre deux collisions consécutives est une étape critique pour la compréhension et la modélisation des séparations électrophorétiques (K. Dorfman 2010). De plus, la probabilité de collision est supérieure pour une chaîne enroulée que pour une chaîne étirée en raison de sa largeur plus importante. Il est donc crucial d'évaluer la longueur parcourue par une molécule d'ADN avant qu'elle n'adopte à nouveau une conformation en pelote. Nous avons défini la longueur de relaxation comme étant la distance parcourue par le centre de masse d'une molécule après désengagement de l'obstacle, c'est-à-dire la demi-longueur de la molécule étirée à laquelle il convient d'ajouter le produit du temps de relaxation de la molécule par sa vitesse (fig. 4.13). En utilisant cette définition, nous avons constaté que la distance de relaxation augmentait avec Pe dans le cas d'une actuation électrophorétique (fig. 4.13). Les temps de relaxation plus longs dans le cas d'une actuation hydrodynamique conduisent à des longueurs de relaxation plus importantes.

Nous prévoyons que des longueurs de relaxation supérieures entraînent une réduction du nombre de collisions moyen subi par une molécule au cours de sa traversée d'un réseau

d'obstacles et donc potentiellement une dégradation des performances de séparation du réseau (K. Dorfman 2010), bien que cette hypothèse reste à confirmer expérimentalement.

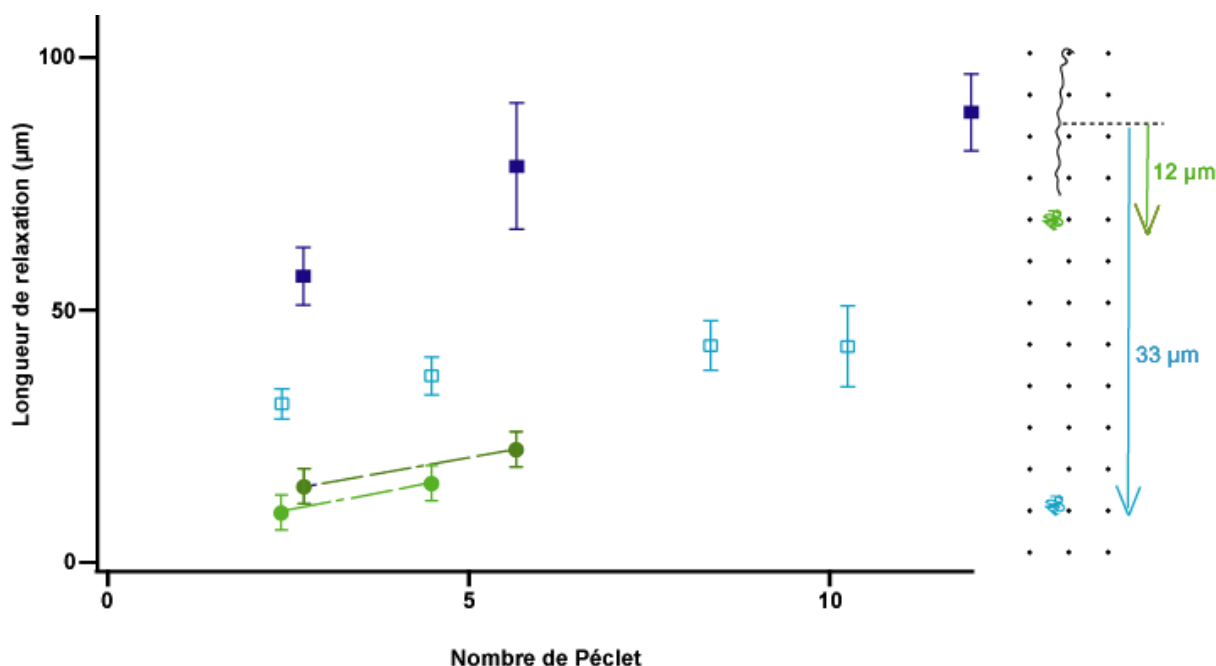


Figure 4.13: Les temps de relaxation de la figure 3.12 ont été convertis en longueur, comme représenté sur le schéma de droite représentant la distance parcourue par une molécule de 35 kpb soumise à un flux hydrodynamique (bleu) ou électrophorétique (vert) avant de reprendre sa conformation libre en pelote. Les longueurs de relaxation sont tracées en fonction de Pe pour des molécules de 35 et 49 kpb en utilisant le même code de couleur que sur la figure 4.12. Cette étude montre que l'existence d'un cisaillement dans les flux de Poiseuille modifie les dynamiques de relaxation des molécules d'ADN, modifiant à la fois l'espace configurationnel des molécules pendant leurs collisions et leur comportement entre deux collisions consécutives. Nous nous sommes ensuite penchés sur la physique des collisions en elles-mêmes, en utilisant des molécules et des obstacles de différentes tailles.

4.2.3. Dynamiques de désengagement en fonction de la taille des obstacles

Nous nous sommes ensuite concentrés sur l'étude des cinétiques de désengagement à proprement parler, aucune étude n'ayant été effectuée sous flux hydrodynamique. Nous avons étudié des collisions en U/J de chaînes de 35 kpb avec des obstacles de rayon 40, 70, 135 et 240 nm. La vitesse des molécules a été fixée à $40 \mu m.s^{-1}$, soit $Pe = 4$. Nous avons mesuré des durées de désengagement de 0.35 ± 0.01 , 0.45 ± 0.01 , 0.44 ± 0.02 et 0.48 ± 0.02 respectivement (fig. 4.14). Les dynamiques de désengagement semblent ainsi être plus lentes pour des obstacles plus larges. Nous suggérons que ce phénomène provient du couplage

longue distance des flux hydrodynamiques, autrement dit le fait que ces flux sont perturbés par les obstacles, sur une distance proportionnelle à leur taille.

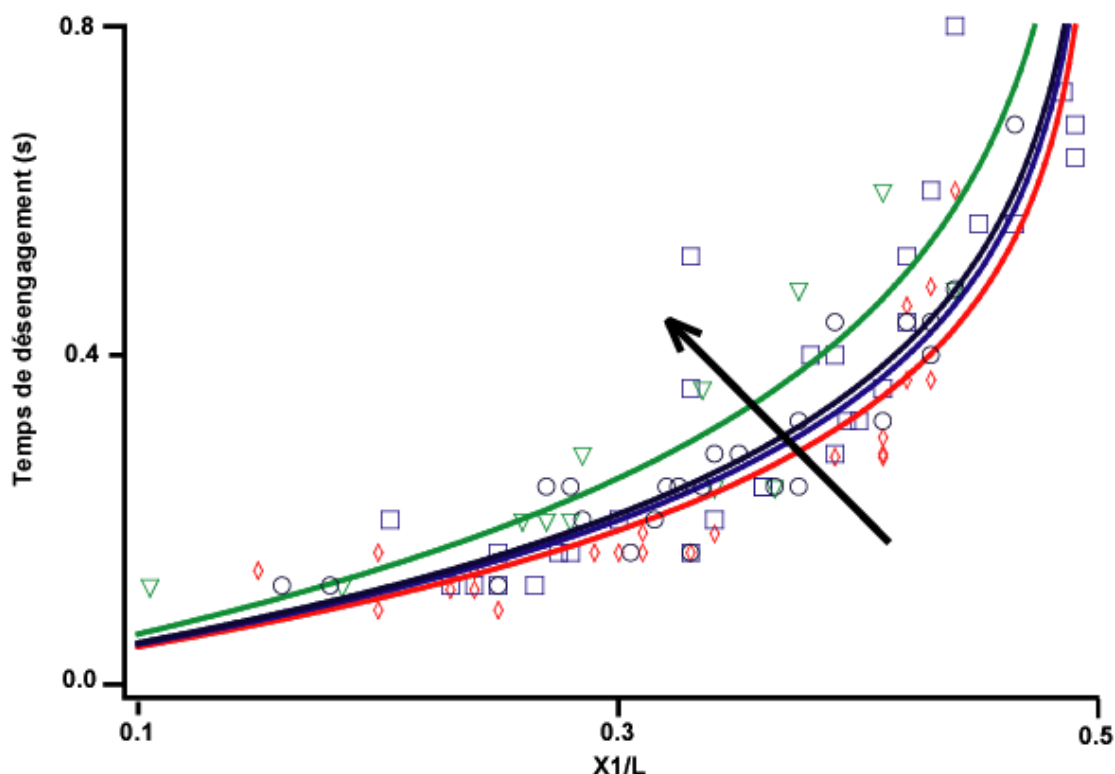


Figure 4.14: Le temps de désengagement pour différentes collisions en U/J est tracé en fonction de la conformation initiale de la molécule (c'est-à-dire la longueur maximale de son bras le plus court), et pour des obstacles de 40, 70, 135 et 240 nm de rayon (rouge, noir, bleu et vert respectivement). Nous avons également fait apparaître les courbes de tendance en utilisant l'équation 4.19. La vitesse de migration a été fixée à $40\mu\text{m/s}$ en assignant une pression appropriée à la résistance hydrodynamique des canaux.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des simulations 2D à l'aide du logiciel COMSOL, en utilisant des géométries d'obstacles réalistes (taille et distribution spatiale, fig. 4.15). Le flux dans les interstices a été fixé à $40\mu\text{m.s}^{-1}$ et sa valeur entre deux obstacles consécutifs, obtenue par modélisation COMSOL, a été de 17 et $27\mu\text{m.s}^{-1}$ pour des obstacles de 240 et 40 nm de rayon respectivement. En gardant à l'esprit le fait que des chaînes de 35 kpb ont une longueur d'extension d'environ $12\mu\text{m}$, elles explorent de ce fait l'espace inter-obstacle lorsqu'elles adoptent une conformation en U/J, et ainsi subissent des forces de poussée d'autant plus faibles que les obstacles sont larges. Plus précisément, si l'on suit le modèle simplifié de Popelka, nous pouvons dire que le temps de désengagement est proportionnel à la force de poussée appliquée sur les deux bras de la molécule (Popelka, Kabatek, Viovy, et Gas 1999b) et nous pouvons donc en déduire que ce temps de

désengagement doit être supérieur d'un facteur $27/17 \approx 1.6$ lorsque le rayon des obstacles passe de 240 à 40 nm, ce qui est en accord avec nos mesures expérimentales donnant un rapport de temps de désengagement égal à $0.48/0.35 \approx 1.4$.

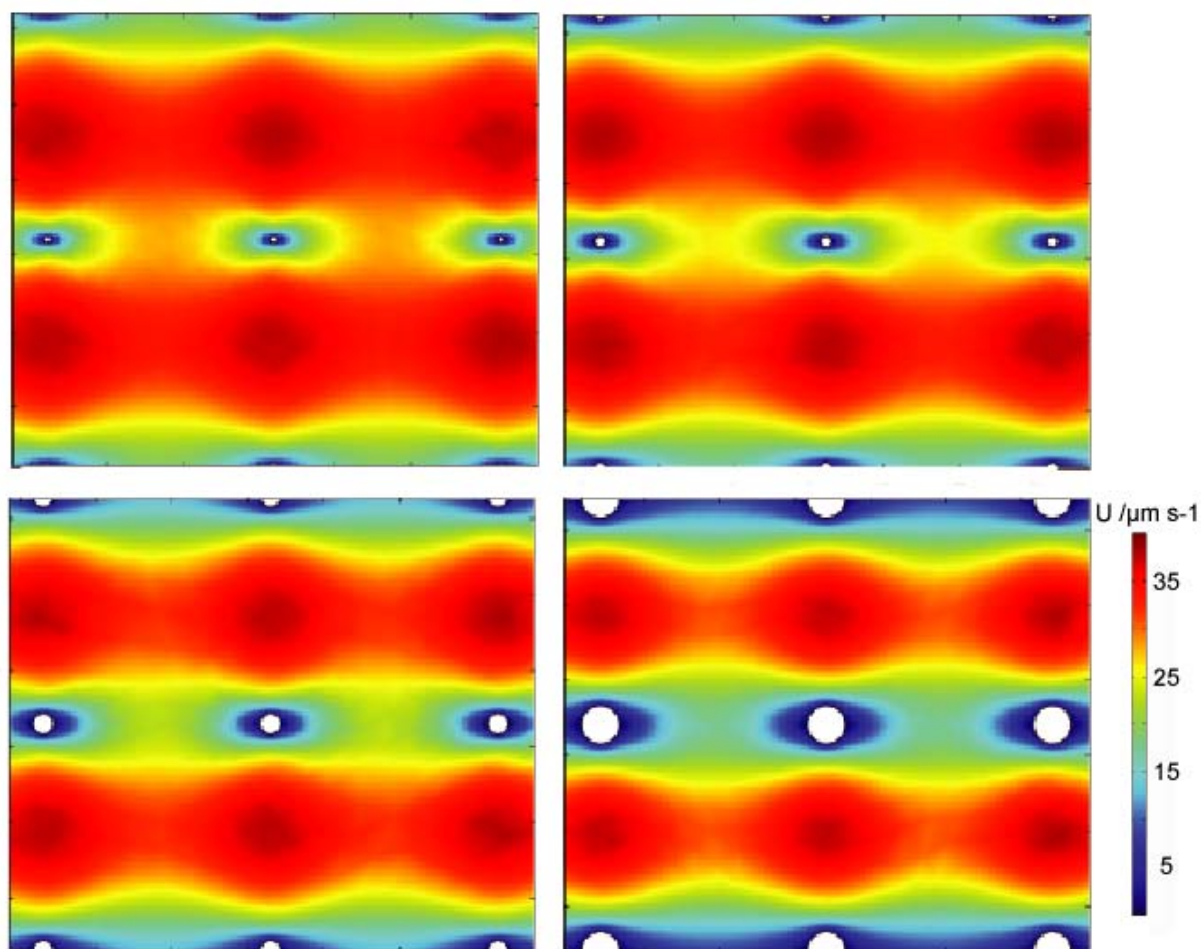


Figure 4.15: l'intensité du flux hydrodynamique a été simulée sous COMSOL en utilisant les modèles de flux laminaires en deux dimensions. La vitesse maximale, dans les interstices, a été fixée à $40 \mu\text{m/s}$, et nous observons alors que la vitesse maximale entre deux obstacles consécutifs sur l'axe des x décroît lorsque la taille des obstacles augmente (comparer en particulier la simulation en haut à gauche, effectuée avec des obstacles de 40 nm, et celle en bas à droite, effectuée avec des obstacles de 240 nm).

En conséquence, notre étude suggère que les interactions ADN-obstacle en flux hydrodynamique doivent être menées avec des petits obstacles, ou de façon équivalente avec des espacements importants entre les obstacles, de façon à éviter les complications liées au couplage des flux hydrodynamiques avec des obstacles consécutifs.

4.2.4. Dynamiques de désengagement en fonction de la taille de l'ADN

Nous avons ensuite étudié les dynamiques de désengagement pour différentes tailles de molécules. Nous avons étudié des collisions U/J pour des chaînes de 35 et 49 kpb, avec des vitesses de 20, 40 et 100 $\mu\text{m.s}^{-1}$, en utilisant des réseaux d'obstacles de 70 nm de rayon. Nous avons étudié dans un premier temps l'extension maximale des molécules en cours de collision, nous permettant de conclure que cette dernière est supérieure lorsque le flux est plus important (fig. 4.16). Nous avons en outre constaté que l'élongation des molécules était systématiquement supérieure aux prédictions de Mohan et Doyle (Mohan et Doyle 2007), comme à celles de Holleran et Larson (Holleran et Larson 2008). Nous attribuons cette augmentation de l'élongation à :

(i) la plus grande déformabilité des molécules lorsqu'elles sont soumises à un flux hydrodynamique. Nous avons déjà évoqué, dans le paragraphe relatif à la relaxation des molécules d'ADN, l'existence de seuils régissant la conformation de chaînes polymériques (attachées par une extrémité à la surface du canal) soumises à un flux de cisaillement (type flux de Poiseuille). Ainsi pour une vitesse de flux inférieure à un seuil V_{c1} , la molécule restera dans sa conformation libre en pelote, alors que pour des flux plus rapides, elle adoptera une conformation dite « en trompette » voire en « tige et fleur » au-delà d'un seuil V_{c2} . Nous avons également vu dans cette section que l'application d'un flux de cisaillement entraînait une augmentation du temps de relaxation de la molécule d'un facteur 4 (à vitesses égales). Comme les seuils définis par Brochard sont inversement proportionnels au temps de relaxation de la molécule, nous voyons bien qu'à vitesse égale, un flux électrique (homogène) va entraîner moins de déformation qu'un flux hydrodynamique (profil parabolique).

(ii) l'étirement entropique modéré associé au confinement induit par les canaux de 800 nm de hauteur. De même, la plus faible extension de l'ADN soumis à un flux électrophorétique renforce notre interprétation d'une plus grande déformabilité associée aux flux hydrodynamiques.

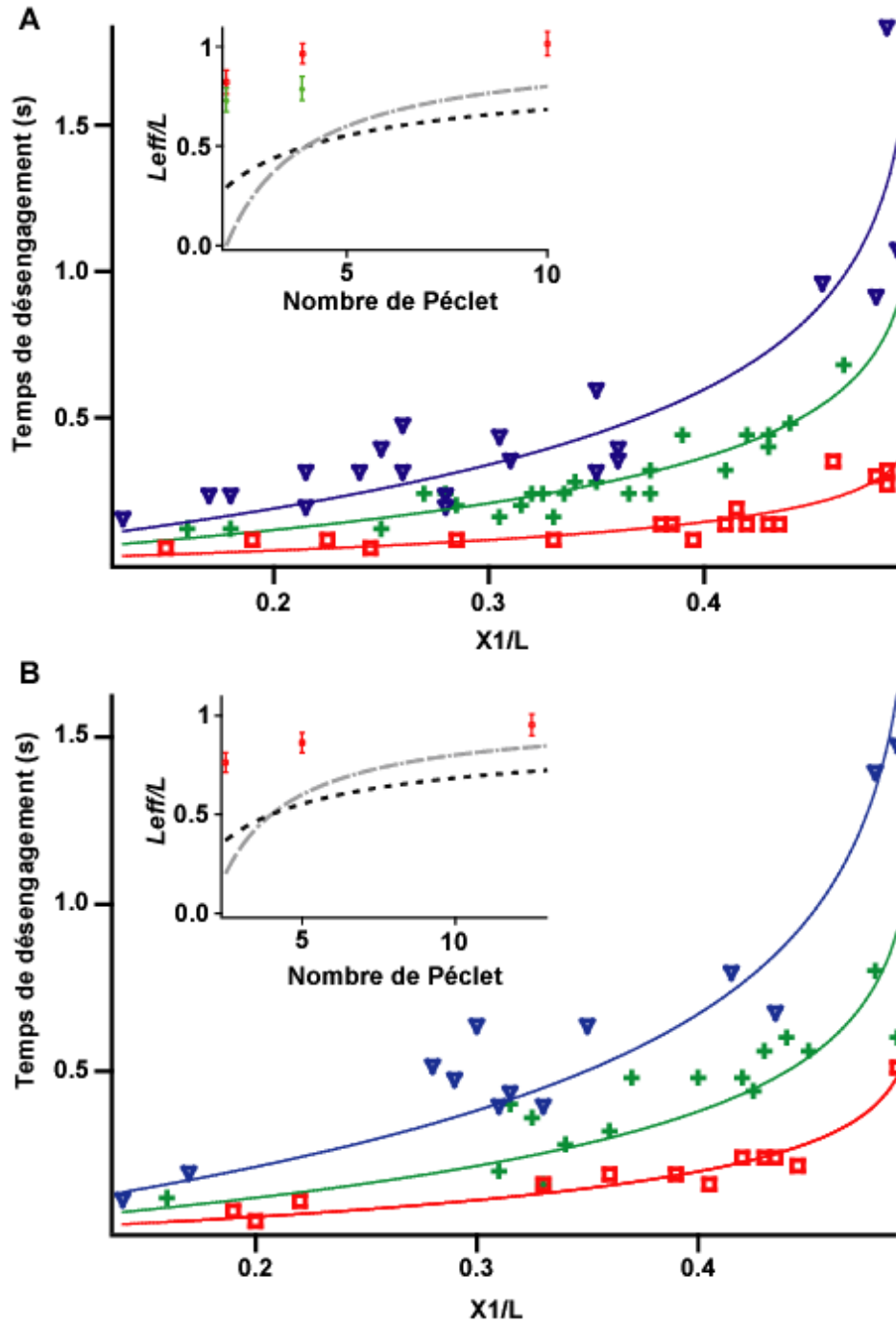


Figure 4.16: Le temps de désengagement de fragments d'ADN de 35 kbp subissant une collision en U/J est tracé en fonction de la configuration initiale de la molécule, et ce pour trois différentes vitesses de migration de 20, 40 et 100 $\mu\text{m/s}$ (données en bleu, vert et rouge respectivement). La taille des obstacles est identique, d'une valeur de 70 nm. Une analyse quantitative des dynamiques de désengagement a été effectuée en utilisant l'équation 4.19, aboutissant à un temps caractéristique de désengagement expérimental. Ces données sont tracées pour des fragments de 35 kbp (A) et 49 kbp (B).

Les inserts indiquent les valeurs d'extension relative maximale des molécules pendant une collision en fonction de Pe et sont comparées aux prédictions de Mohan et Doyle (courbes grises) et de Dorfman (courbes bleues). Nous pouvons constater que ces prédictions sont très peu satisfaisantes à bas Pe .

Nous avons ensuite étudié les cinétiques de désengagement, qui se sont avérées plus rapides pour des plus grandes vitesses de migrations (fig. 4.16). Ce résultat avait été anticipé, le désengagement étant conduit par les forces hydrodynamiques exercées sur les deux bras de la molécule (Popelka et al. 1999 ; G. C. Randall et Doyle 2006). De plus, les prédictions quant au temps de désengagement τ_c (équation 4.18) sont en accord avec nos résultats expérimentaux à bas Pe .

Il est intéressant de noter qu'un écart d'environ 50% entre le modèle et nos résultats est observé à haut Pe (fig. 4.17). Cet écart peut être lié à l'existence d'une force de friction additionnelle générée par un excès de contraintes de courbure lié à la courbure de l'ADN autour des nanoplots, comme l'ont suggéré Burlatsky et Deutch (Burlatsky et Deutch 1993). Pour vérifier cette hypothèse, les dynamiques de désengagement de chaînes de 35 kpb ont également été étudiées pour des obstacles plus petit (rayon 40 nm), donc générant des courbures plus importantes, en conservant un flux de $100 \mu\text{m.s}^{-1}$. Comme nous avons mesuré le même temps de désengagement qu'avec les plots de 70 nm de rayon (0.18 s), nous avons abandonné cette hypothèse. Nous suggérons de façon alternative que la contrainte de cisaillement exercée sur la molécule à haut Pe doit être prise en compte dans le modèle de désengagement.

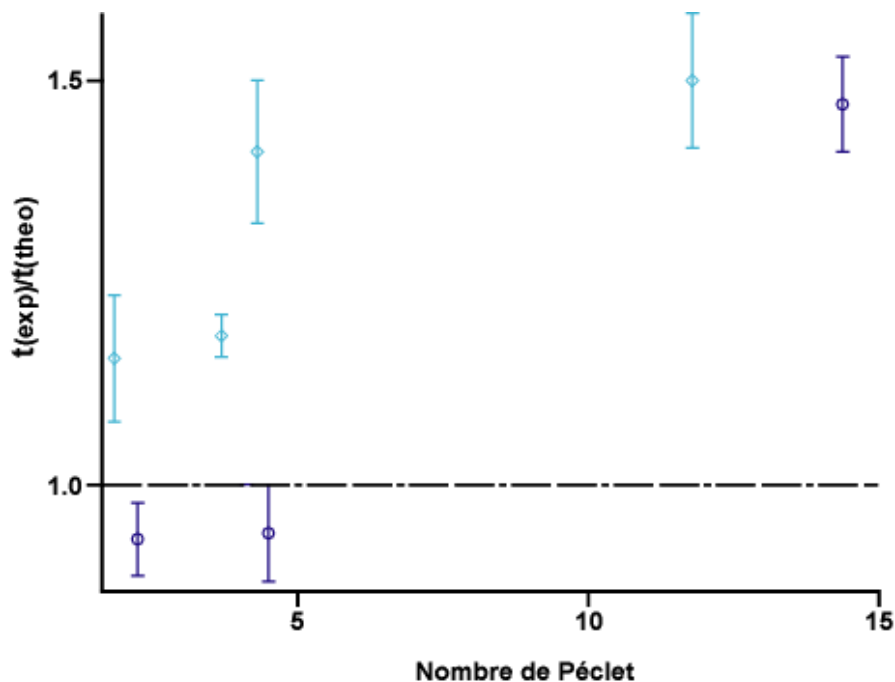


Figure 4.17: Les temps caractéristiques de désengagements obtenus par l'analyse quantitative présentée sur la figure 4.16 ont été normalisés par leur valeur théorique issue du modèle de Randall et Doyle, puis tracés en fonction de Pe pour des chaînes de 35 et 49 kpb (respectivement en bleu clair et bleu foncé). Ces données montrent un écart important avec le modèle à $Pe \sim 4$ et 10 respectivement.

Pour conclure sur les dynamiques de désengagement de molécules d'ADN soumises à un flux hydrodynamique, nos travaux suggèrent que les molécules d'ADN doivent être manipulées dans des réseaux d'obstacles peu denses à $Pe < 8$ environ, un régime pour lequel les dynamiques de désengagement sont relativement bien décrites par les modèles électrophorétiques standards. Rappelons en outre que ce régime permet de réduire l'espace des configurations accessibles aux molécules, réduisant à priori la dispersion de nos dispositifs de séparation. Nous avons finalement décidé de prolonger notre étude par la réalisation d'expériences de séparation d'ADN par taille pour tester le potentiel de séparation de nos dispositifs pour des analyses biochimiques.

4.3. Séparation en taille de molécules d'ADN : preuve de concept

4.3.1. Séparation hydrodynamique de fragments de 14 et 35 kpb

Nous avons utilisé un dispositif composé de nanopiliers de 70 nm de rayon, sur lequel nous avons creusé deux trous latéraux sur chaque côté du canal de séparation (fig. 4.18), afin de les utiliser pour injecter une solution d'ADN à une position bien établie. La vitesse de migration a été fixée à $50 \mu\text{m.s}^{-1}$ (soit $Pe = 5$ pour des molécules de 35 kpb). Un mélange de deux espèces d'ADN de taille 14 et 35 kbp (obtenu par restriction de l'ADN- λ avec l'enzyme BmtI) a été injecté dans notre dispositif.

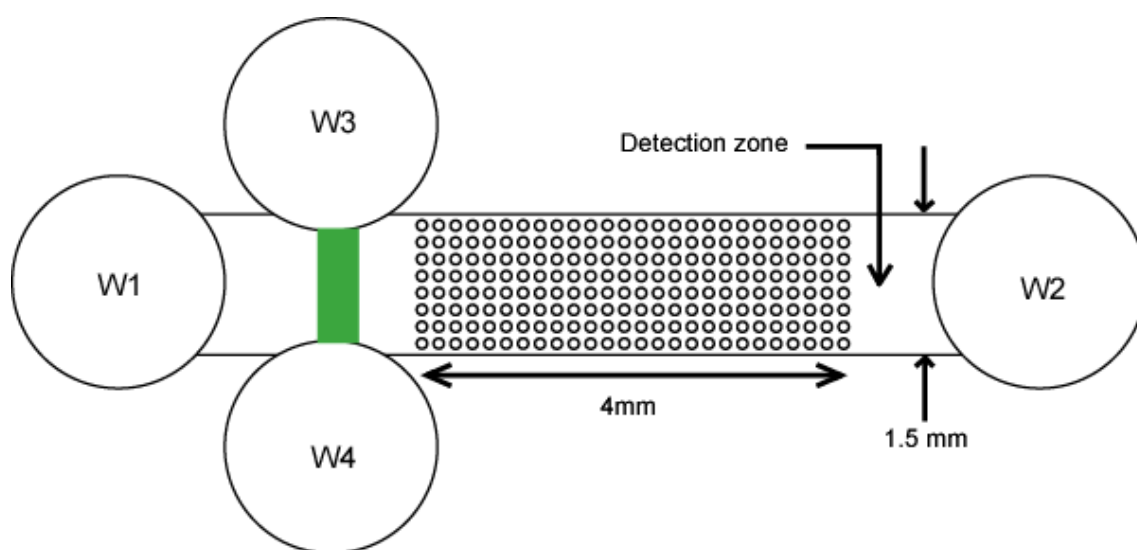


Figure 4.18 : schéma d'un dispositif de séparation utilisé pour séparer des molécules de 14 et 35 kpb. La matrice de séparation est constituée de plots de 70 nm de rayon

En positionnant notre détecteur à une distance d'environ 4 mm de la zone d'injection, nous avons détecté un premier pic au bout de 50 s, suivi par un deuxième deux fois plus brillant 60 secondes plus tard (temps finale de 110 s, fig. 4.19). Il est intéressant de noter que cet écart d'intensité entre les pics est consistant avec le fait que notre solution d'ADN contient des molécules de 14 et 35 kpb à la même concentration, et que leur intensité de fluorescence est doublée lorsqu'on les marque avec le même rapport d'un fluorophore pour 10 paires de base.

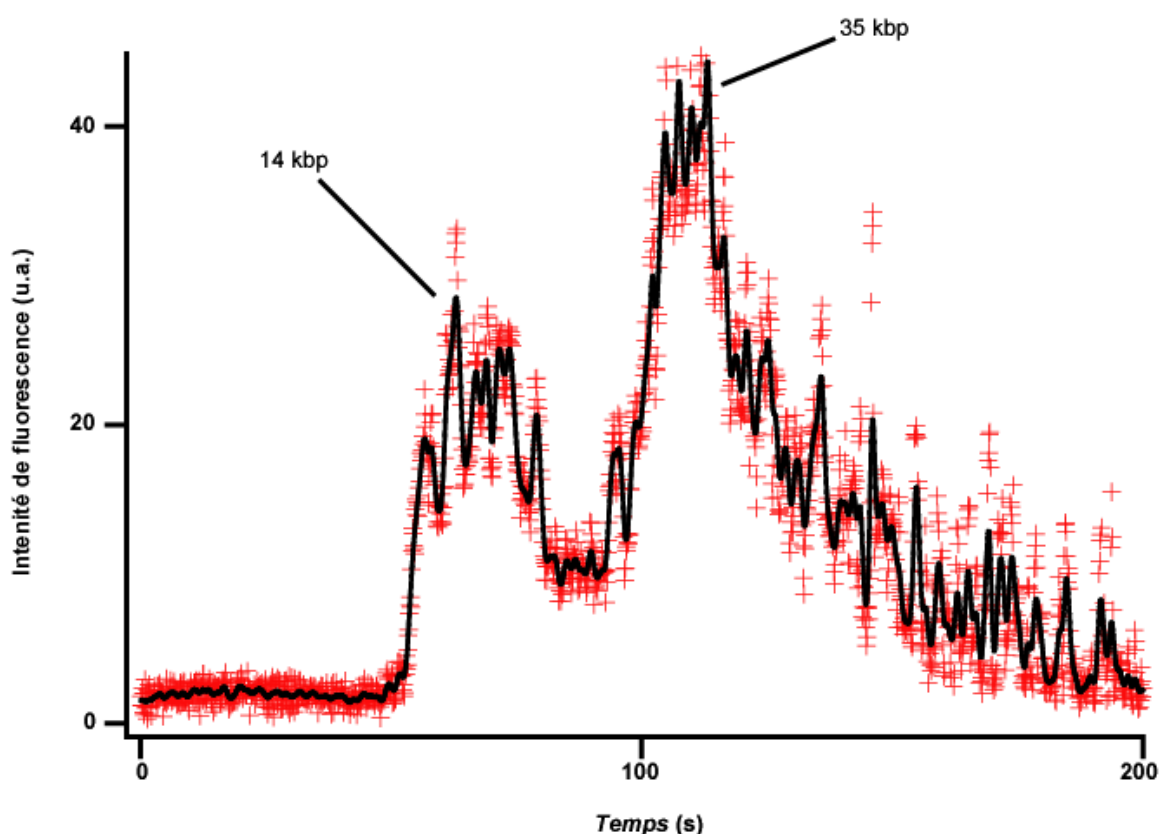


Figure 4.19 : un mélange contenant des chaînes de 14 et 35 kbp à concentrations égales a été introduit dans le dispositif schématisé sur la figure 4.18, et l'intensité de fluorescence a été mesurée au cours du temps dans la zone de détection.

Cette expérience démontre ainsi que notre technologie permet de réaliser une séparation en taille en moins de 2 minutes. De plus, la résolution de séparation, définie comme le rapport de la distance entre les deux pics par la largeur moyenne des pics, est estimée à 2.3. Ces performances sont supérieures à celles des gels conventionnels, qui requièrent un temps de séparation d'au moins une heure. Ils sont en outre comparables aux résultats de séparation électrophorétiques rapportées par Kaji et al et Ou et al., bien que ces auteurs aient montré des séparations efficaces pour une gamme de tailles d'ADN étendue (Kaji et al. 2004 ; Ou et al.

2009). Nous souhaitons souligner que l'efficacité de séparation de nos dispositifs pourrait être aisément améliorée en diminuant la largeur de la bande d'injection, simplement définie dans nos dispositifs par les dimensions des trous d'accès, de 200 μm environ dans notre cas, à 50 μm voire moins en construisant un canal d'accès réalisé par photolithographie standard.

4.3.2. Estimation de la diffusion dans nos dispositifs

Il a récemment été suggéré (D. W. Olson, Dutta, et al. 2011) que la dispersion lors d'une séparation électrophorétique provenait de la combinaison de durées de collisions variables, associées à des distances parcourues entre deux collisions consécutives variables elles-aussi. Nous avons montré précédemment que l'utilisation de flux hydrodynamiques permettait de réduire l'espace des configurations en cours de collision, ceci devant en conséquence réduire la variation des temps de collision, et donc la dispersion des molécules lors de la séparation. Cependant, les flux hydrodynamiques introduisent une contribution supplémentaire, provenant du couplage entre les flux paraboliques et la diffusion transverse des molécules (Taylor 1953 ; (Armand Ajdari, Bontoux, et Stone 2006 ; Fig. 4.20). Cette dispersion est dite « de Taylor », en référence à G. I. Taylor qui donna les bases d'une analyse théorique de ce phénomène.

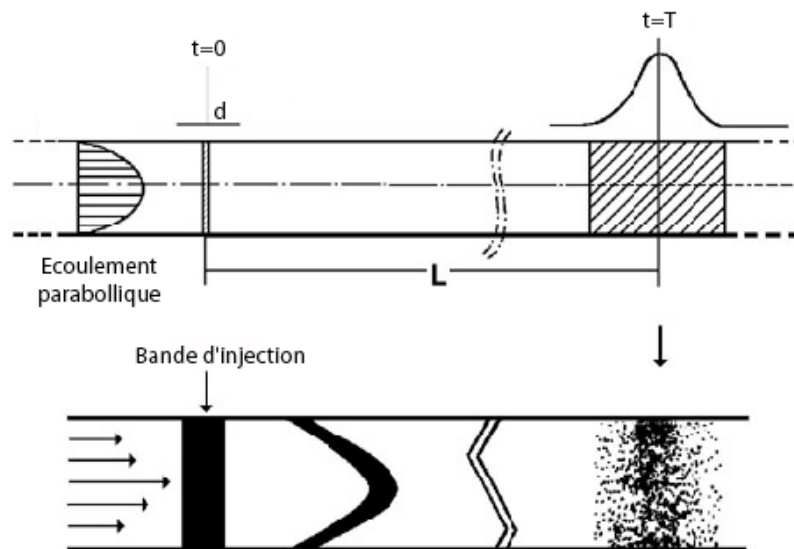


Figure 4.20: la diffusion de Taylor est un phénomène lié à la présence d'un flux de cisaillement pouvant augmenter la dispersion d'une espèce. L'application d'un flux de Poiseuille à une espèce présente dans un microcanal à une concentration homogène sur une bande de largeur d va entraîner son déplacement dans la direction de l'écoulement à une vitesse U . Au bout d'un temps T , la bande aura progressé d'une distance $T.U$ et se sera élargie du fait de la diffusion de Taylor. Son profil de concentration est alors parabolique.

Lorsque le temps caractéristique d'advection L/U (L est la position du dispositif de mesure par rapport à la zone d'injection et U la vitesse du flux) est supérieur au temps de diffusion transverse h^2/D (h la demi-hauteur du canal et D le coefficient de diffusion de la molécule considérée), le coefficient de diffusion apparent est amplifié, et il peut s'exprimer sous la forme (Aurélien Bancaud et al. 2005):

$$D_{eff} = D \left(1 + \frac{1}{210} Pe^2 \right) = D \left(1 + \frac{h^2 U^2}{210 D^2} \right) \quad (4.26)$$

Dans l'expérience de séparation que nous avons présentée, le temps d'advection est

$$\frac{L}{U} = \frac{L}{50 \cdot 10^{-6}} \text{ et le temps de diffusion transverse est } \frac{h^2}{D} = \frac{(4 \cdot 10^{-7})^2}{4 \cdot 10^{-13}} = 0.4 \text{ s}$$

L'équation 4.26 est donc applicable à partir d'une longueur $L = 20 \text{ } \mu\text{m}$. Comme notre zone de détection, placée à la sortie du réseau, est distante d'environ 4 mm de la zone d'injection, nous pouvons en déduire que la dispersion totale dans notre dispositif peut s'écrire

$$D_{eff} = D \left(1 + \frac{h^2 U^2}{210 D^2} \right) = D \left(1 + \frac{(4 \cdot 10^{-7})^2 \cdot (50 \cdot 10^{-6})^2}{210 \cdot (4 \cdot 10^{-13})^2} \right) \approx 13D$$

Reste maintenant à déterminer l'importance de la diffusion de Taylor par-rapport à la dispersion totale engendrée par notre dispositif de séparation. Ainsi, en connaissant la largeur de la bande d'injection (en l'occurrence environ $200 \text{ } \mu\text{m}$), nous pouvons déterminer la dispersion théorique associée à la diffusion de Taylor. En la comparant avec la dispersion effective, nous pourrions alors estimer son importance.

Si l'on considère que $D_{eff} = 13D \approx 5.2 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{s}$, alors au bout d'un intervalle de temps ΔT , cette largeur de bande sera élargie de $(D_{eff} \Delta T)^{0.5} \text{ } \mu\text{m}$. Comme le temps de séparation (que nous associons au temps nécessaire aux molécules les plus grandes d'arriver dans la zone de détection) est d'environ 110 s, nous nous attendons à un élargissement

$$\Delta L = (5.2 \times 110)^{0.5} = 24 \text{ } \mu\text{m}$$

Or nous constatons expérimentalement que la largeur du dernier pic (déterminée à mi-hauteur du pic), est de 28 s, ce qui correspond à une largeur de bande de $50 \times 28 = 1400 \text{ } \mu\text{m}$. Ce calcul certes approximatif met cependant en relief l'impact négligeable de la diffusion de Taylor sur la dispersion globale générée par nos dispositifs de séparation. Dès lors, il convient de s'interroger sur les origines de cette dispersion, plus de 50 fois plus importante qu'attendue par dispersion fluidique. Il semble donc qu'il y ait une dispersion de collisions, que nous allons à présent qualitativement examiner.

La probabilité ρ pour une molécule de subir une collision avec un obstacle peut être approximée comme étant le rapport du rayon de giration R_g de la molécule sur le paramètre de maille a du réseau ((Mohan et Doyle 2007)). Dans nos expériences de séparation, nous pouvons en déduire que la probabilité de collision est d'environ $0.73/3 = 0.24$.

Nous savons également que les molécules ont parcouru 4 mm pendant la séparation, soit 1333 lignes d'obstacles environ. Au cours de leur déplacement à travers le réseau, elles doivent donc avoir subi environ 320 collisions, ce qui est bien évidemment largement surévalué. En effet, les molécules de 35kpb ont une longueur de relaxation d'environ 40 μm lorsqu'elles subissent une collision en épingle à cheveu à 50 $\mu\text{m/s}$. Elles parcourent donc en moyenne 13 lignes du réseau avant de retrouver leur conformation en pelote. Il semble donc assez pertinent (d'un point de vue qualitatif), de diviser le nombre de collisions attendues par molécule au cours de la traversée du réseau par un facteur 10. Nous pouvons donc évaluer grossièrement le nombre de collisions par molécule à 32. Ce nombre semble réaliste et relativement faible, ce qui peut expliquer selon nous en partie la dispersion importante engendrée par nos dispositifs de séparation, largement supérieure à la dispersion de Taylor.

En effet, le temps d'interaction entre une molécule d'ADN et un obstacle suit une distribution complexe (M. Joswiak, Ou, et Dorfman en cours de publication), qui sera d'autant plus large que l'échantillon considéré est petit. Or en raison de la géométrie de nos dispositifs ($h \sim 0.8 \mu\text{m}$), nous détectons un faible nombre de molécules pendant l'acquisition présentée sur la figure 4.19 (pas de superposition possible, $R_g \sim 0.73 \mu\text{m}$). Nous détectons un nombre restreint de molécules, qui ont subi en moyenne une trentaine de collisions. Nous pensons que ce faible nombre d'évènements considérés est une des sources de dispersion, que l'on pourrait améliorer en augmentant le nombre d'évènements (en particulier le nombre de lignes d'obstacles dans nos dispositifs).

Enfin, outre la géométrie du réseau, le dispositif en lui-même pourrait être considérablement amélioré en ajoutant un microcanal d'injection qui pourrait nous permettre de réduire d'un facteur 10 au moins la largeur de notre bande d'injection, réduisant ainsi la dispersion constatée.

Nous avons malgré tout présenté dans cette section des résultats de séparation en taille de molécules d'ADN dans des réseaux d'obstacles microfabriqués comparables aux meilleurs résultats publiés. Nous ne comprenons toujours pas dans sa totalité la dynamique globale d'une molécule d'ADN dans ce type de réseaux, des conditions optimales n'ont pu être définies que partiellement, affectant de fait le pouvoir de séparation que nous avons obtenu. Les résultats obtenus nous semblent cependant satisfaisants et prometteurs. Jamais testée

auparavant (jusqu'au stade de preuve de concept), la séparation hydrodynamique dans des réseaux d'obstacles nanométriques pourrait être une voie vers laquelle orienter les nouveaux dispositifs de séparation. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *SMALL*. Le manuscrit, dont l'édition est en cours de production, est présenté en annexe.

Chapitre 5

Étude des collisions entre des molécules d'ADN et des obstacles asymétriques



5.1. Éléments théoriques relatifs aux obstacles asymétriques

Proposée par Volkmuth et Austin voici près de 20 ans, la séparation de molécules d'ADN dans un réseau d'obstacles microfabriqués semblait promise à un avenir radieux. En effet, les procédés de fabrication des matrices de microplots sont robustes et contrôlés à toutes les échelles, ce qui ouvre la voie à des stratégies de conception rationnelles pour obtenir des résolutions de séparation optimales. Cette approche diffère des méthodes empiriques de chimie analytique qui, si elles ont permis d'obtenir des séparations rapides et très résolues, sont souvent fondées sur des tests systématiques de familles de polymères de poids moléculaire variable, dont on compare les performances (Barbier et al. 2002). Après 20 ans de recherche, pourtant, les matrices de séparation restent essentiellement de beaux outils de laboratoire, restés au stade de la preuve de concept. Ce grand écart entre les promesses et la réalité technologique actuelle est lié à deux problèmes. D'abord, la description des mécanismes d'interaction ADN-obstacles a été trop simplifiée dans les premières études (TAJ Duke et Austin 1998b). Les travaux de Randall et Doyle ont permis de mieux cerner la zoologie de ces dynamiques d'interaction à la fois complexes et hétérogènes (G. C. Randall et Doyle 2005). Les modèles permettant de décrire la migration d'ADN à travers un réseau de plots ont été régulièrement améliorés au cours des 20 dernières années, et il existe maintenant des prédictions analytiques décrivant la séparation d'une population de molécules et le pouvoir de séparation à partir d'un nombre limité de paramètres microscopiques (modèle de CTRW). Les conditions pour la fabrication de matrices de séparation d'ADN optimisées sont peut-être maintenant réunies, même s'il reste des recherches à effectuer pour tester la meilleure « configuration » de microplots dans les mécanismes de séparation d'ADN. En particulier, des simulations ont été récemment conduites pour étudier la dynamique de collision de molécules d'ADN avec un obstacle ellipsoïdal, donc asymétriques (J. Cho, Kumar, et Dorfman 2010). Cette étude a montré que la répartition du champ électrique est modifiée par la géométrie des obstacles, et que la dynamique de collision est altérée suivant l'asymétrie de l'interaction, ce qui suggère une dépendance du pouvoir de séparation selon la géométrie du plot. Il est donc raisonnable de se demander quelle géométrie s'avère la plus efficace pour séparer des molécules d'ADN : l'étude que nous avons menée s'inscrit dans cette problématique.

Dans cette perspective, il est intéressant de noter que d'autres dispositifs de séparation de biomolécules utilisent des obstacles asymétriques pour générer des champs de contrainte plus

complexes. Nous avons par exemple décrit dans la section 1.4.3. les dispositifs de « *Brownian Ratchets* », dont le principe de séparation repose sur les différences de diffusion moléculaire entre ADN de différentes tailles, lorsqu'il sont placés dans une matrice à obstacles rectangulaires. Des obstacles asymétriques (et denses) ont également été incorporés dans des matrices de séparation pour étudier les performances de séparation de ces réseaux (Chan, Zohar, et Lee 2009). Les mesures de vitesse moyenne des molécules à travers le réseau dépendent ainsi de la géométrie des obstacles, mais une analyse plus fine à l'échelle des collisions individuelles reste à faire. Nous nous proposons donc à présent de sonder les dynamiques de collision ADN-obstacle asymétrique à l'échelle de la molécule unique, et d'étudier l'influence de l'orientation de ces obstacles sur ces dynamiques.

5.2. Effets de l'asymétrie sur les écoulements

Nous avons étudié en détail dans le chapitre 4 les dynamiques de collisions de molécules d'ADN dans des réseaux d'obstacles cylindriques. Ces obstacles perturbent le flux circulant dans le dispositif, et autour de l'obstacle, le flux est inhomogène. Ce flux inhomogène se traduit par l'apparition d'un taux de contrainte à proximité de l'obstacle. Pour quantifier ce taux de contrainte à proximité d'un obstacle, il est courant d'utiliser le nombre de Deborah, un nombre sans dimension défini comme le produit du taux de contrainte maximal ressenti par une molécule d'ADN à proximité d'un obstacle par son temps de relaxation.

Pour décrire ce nombre de manière intuitive, décrivons d'abord la réponse d'un ADN dans une constriction. En effet, comme l'illustre la figure 5.1, un obstacle, tout comme une constriction, engendre un gradient de vitesse. Tous les segments d'une chaîne d'ADN ne se déplacent donc pas à la même vitesse ce qui engendre une contrainte élongationnelle tendant à étirer la chaîne. Si le temps caractéristique de la contrainte, défini comme l'inverse du gradient de vitesse $(\delta U / \delta x)^{-1}$ est inférieur au temps de relaxation de la chaîne, le flux va entraîner l'étirement de la molécule : on parle de flux élongationnel. Le nombre de Deborah est donc un nombre pertinent pour caractériser la déformation d'une molécule d'ADN dans un écoulement élongationnel.

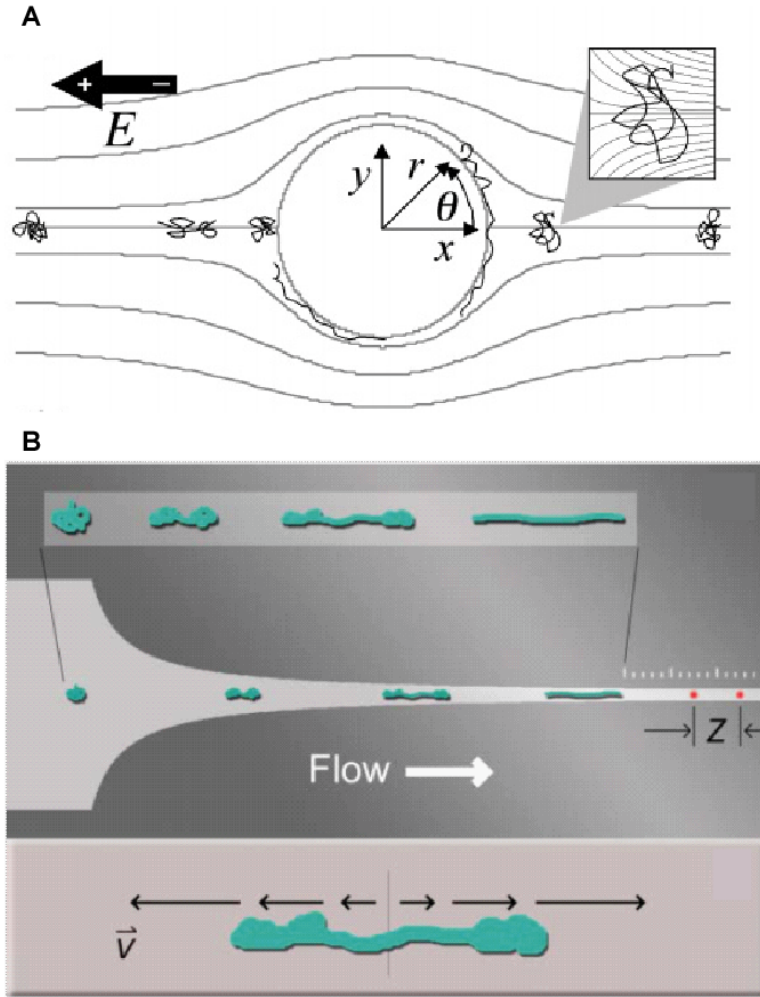


Figure 5.1: (A) schéma d'une géométrie typique engendrant un écoulement élongationnel. Tiré de (G. C. Randall et Doyle 2005). De la même façon, la présence d'une constriction (B) engendre un gradient de vitesse important le long d'une molécule d'ADN, ce qui est responsable de son étirement. Illustration tirée de (J. W. Larson et al. 2006).

Revenons au cas d'obstacles cylindriques, le taux de contrainte est alors :

$$\dot{\epsilon}_c = \frac{2UR_{obs}}{r^3} \quad (5.1)$$

et ne dépend que de la distance r avec l'obstacle (G. C. Randall et Doyle 2005) Fig. 5.1-A). Comme le taux maximal de contrainte est localisé à la surface de l'obstacle (G. Randall et Doyle 2004) ; (G. C. Randall et Doyle 2005), on peut en déduire le taux de contrainte maximal

$$\dot{\epsilon}_c^{\max} = \frac{2U}{R_{obs}} \quad (5.2)$$

Le nombre de Deborah s'exprime ainsi

$$De = \frac{2U\tau}{R_{obs}} \quad (5.3)$$

Il a été montré (Randall et Doyle 2004, 2005) que le nombre de Deborah était un nombre critique pour décrire la dynamique d'une collision. Or il est attendu qu'en brisant la symétrie du réseau, on génère des gradients de vitesse plus complexes, susceptibles d'affecter les dynamiques de déformation et donc les dynamiques de collision des molécules d'ADN avec un obstacle (J. Cho, Kumar, et Dorfman 2010). L'utilisation de plots ellipsoïdaux est donc la façon la plus naturelle de prolonger l'étude des interactions ADN-obstacles cylindriques.

5.3. Réalisation et caractérisation de plots asymétriques

Nous disposons d'une technologie de fabrication très pertinente pour la réalisation contrôlée de tels obstacles (cf. chapitre 2). Nous avons donc réalisé des expériences à nombre de Péclet constant, avec des tailles d'obstacle comparables (nous noterons leur grand diamètre D et leur petit diamètre d) en changeant leur orientation vis-à-vis du flux hydrodynamique que nous noterons α . Les différentes configurations sont présentées sur la figure 5.2. Notons que dans la configuration où α est le plus grand (configuration 3), les obstacles sont légèrement plus petits.

Nous avons vu dans la section 4.2.3. que les dynamiques de désengagement tendent à être accélérées lorsqu'on diminue la taille de l'obstacle, ce que nous avons associé à un couplage longue distance des flux hydrodynamiques, d'autant plus marqué que l'obstacle est grand. Ici, nous ne modifions pas la taille de l'obstacle mais son orientation, laissant supposer que ce couplage est identique quelle que soit la configuration. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mené des simulations COMSOL des écoulements dans nos géométries (figure 5.3-A), qui nous ont permis de conclure que l'intensité des flux hydrodynamiques entre les obstacles était identique pour les trois configurations testées. Dès lors, en changeant l'orientation α , nous nous attendons à ne modifier que le taux de contrainte autour de l'obstacle et donc le nombre de Deborah.

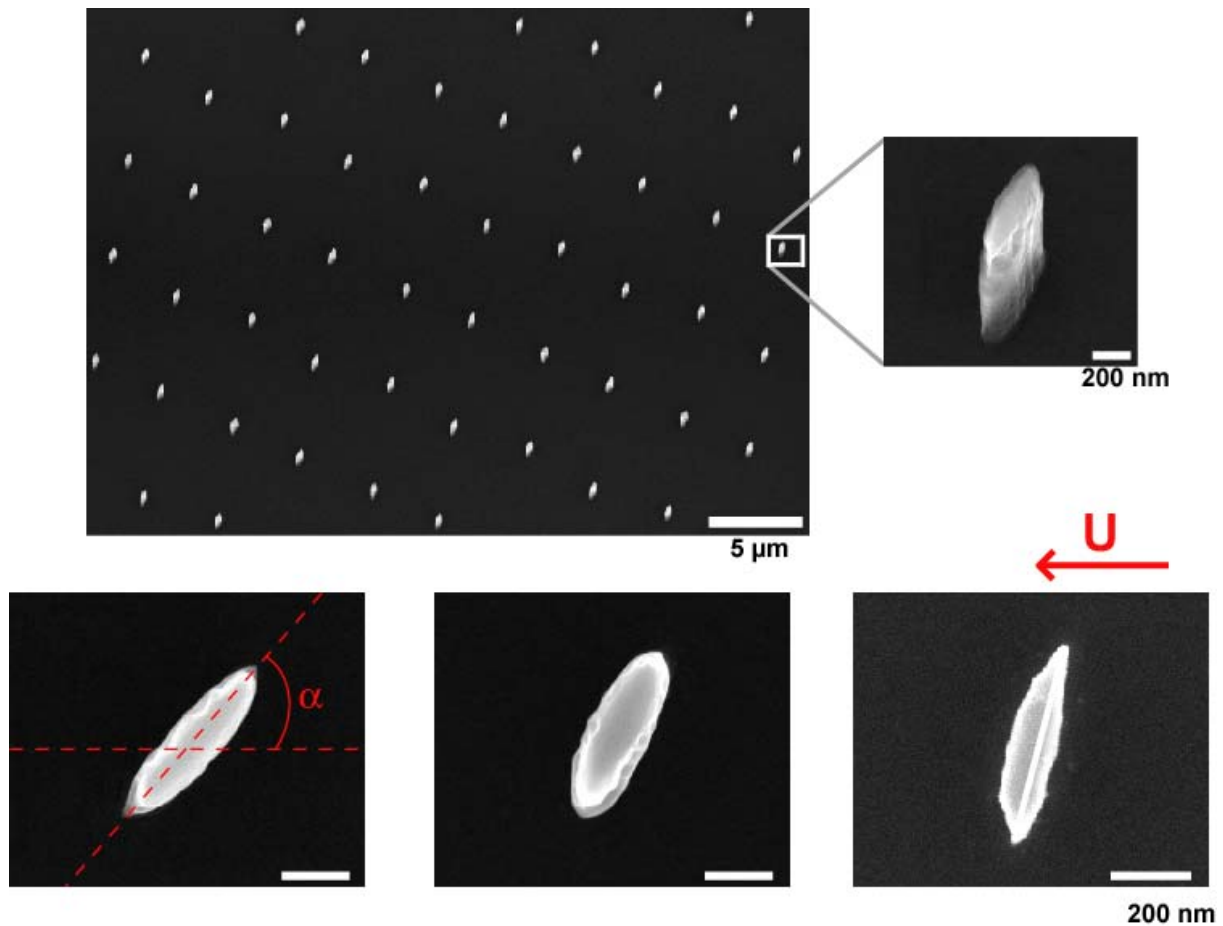


Figure 5.2: images MEB des différentes orientations d'obstacles ellipsoïdaux utilisés dans nos expériences. Dans la configuration 1 (**gauche**), les obstacles sont caractérisés par $D=645$ nm, $d=240$ nm et $\alpha=47^\circ$; dans la configuration 2 (**milieu**), les obstacles sont caractérisés par $D=580$ nm, $d=200$ nm, et $\alpha=63^\circ$. En fin dans la configuration 3 (**droite**), les obstacles sont caractérisés par $D=500$ nm, $d=130$ nm et $\alpha=76^\circ$. La flèche représente la direction du flux hydrodynamique.

Analytique dans le cas d'obstacles cylindriques, le calcul du taux de contrainte, et donc de De , s'avère beaucoup moins facile pour un obstacle asymétrique (Cho, Kumar, et Dorfman 2010). Nous avons donc mené des simulations à l'aide du logiciel COMSOL pour calculer la répartition du taux de contrainte autour de nos obstacles. Nous avons utilisé les géométries réelles de nos dispositifs, tant en taille qu'en orientation vis-à-vis du flux, ceci dans un système à deux dimensions. Ces simulations sont illustrées sur la figure 5.3. Elles mettent en évidence le fait que plus le décalage angulaire augmente, plus le taux de contrainte au voisinage des obstacles est grand. Les valeurs maximales pour un flux hydrodynamique de $40 \mu\text{m/s}$ sont de 473, 307 et 238 s^{-1} pour des décalages angulaires de 76° , 63° et 47° respectivement, correspondant à des nombres de Deborah de 80, 52 et 40 environ. Autrement dit, le nombre de Deborah varie suivant un facteur 2 dans nos expériences. Rappelons enfin

que le flux hydrodynamique loin des obstacles est le même quelque soit l'orientation de l'obstacle par rapport au flux (Fig. 5.3-A), ce qui suggère que les forces imposées aux molécules lors de leur désengagement sont similaires (cf. section 4.2.3). Aussi, le changement d'orientation du plot par rapport au flux hydrodynamique introduit une variation de contrainte au sommet du plot. Nous disposons donc d'un outil pertinent pour comprendre la dynamique d'interaction ADN-obstacles dans le cas de géométrie d'obstacles complexes.

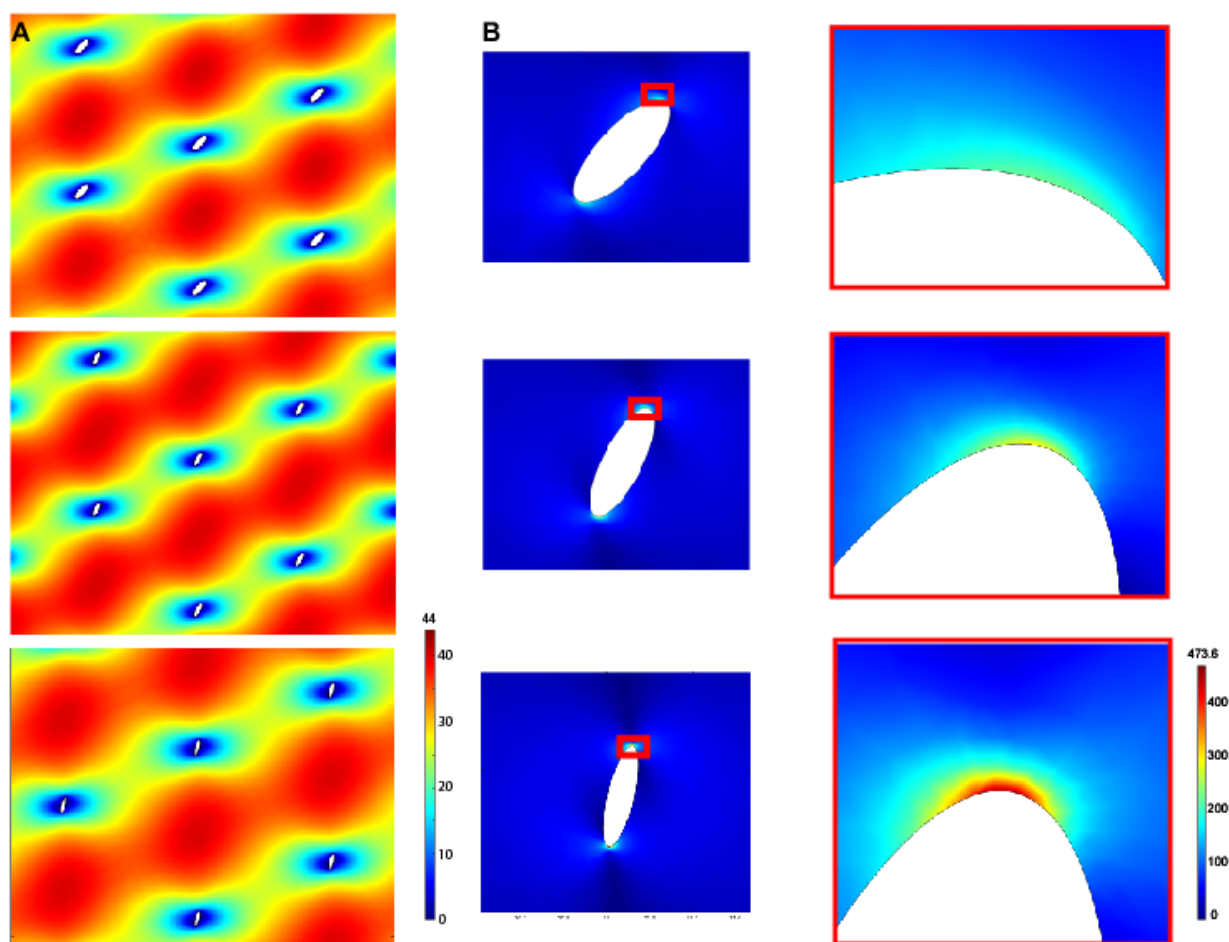


Figure 5.3: simulations COMSOL en 2D menées dans des réseaux d'obstacles ellipsoïdaux (géométrie réelle).

(A) Distribution du flux hydrodynamique en fonction du décalage angulaire α . La vitesse maximale, dans les zones interstitielles, a été fixée à 40 $\mu\text{m/s}$. La vitesse inter-obstacle est identique quelle que soit l'orientation α (27 $\pm$ 1 $\mu\text{m/s}$). (B) Répartition du taux de contrainte autour d'un obstacle dans nos dispositifs. Les fenêtres de droite sont des zooms (la taille de la fenêtre est d'environ 100x100 nm) des parties supérieures des obstacles, pour mieux visualiser la répartition des taux de contrainte. L'échelle de couleur révèle un taux de contrainte qui croît avec le décalage angulaire.

5.4. Présentation des résultats expérimentaux

5.4.1 Résultats moyennés sur un ensemble de molécules

Dans un premier temps, nous avons mesuré manuellement, à l'aide du logiciel imageJ, les durées de collision de molécules d'ADN- λ soumises à un flux hydrodynamique de 40 $\mu\text{m/s}$, pour des réseaux d'obstacles ellipsoïdaux décalées de 47, 63 et 76° par rapport au flux. Nous avons mesuré cette durée, que nous noterons T_H (« *Hooking Time* ») pour respectivement 200, 350 et 300 évènements, et tracé leur proportion dans la figure 5.4 (par soucis de visibilité, nous n'avons représenté que les histogrammes des orientations 47 et 76°). Notons que dans ce régime toutes les collisions que nous avons détectées se présentaient comme des U/J (voir paragraphe 4.2.1). Nous constatons une légère augmentation du temps moyen de collision (316 à 370 ms pour des molécules se déplaçant avec une vitesse de 40 $\mu\text{m/s}$) lorsque α diminue (de 76 à 47°, correspondant à un nombre de Deborah passant de 80 à 40).

A ce stade, nous remarquons que l'augmentation du taux de contrainte, décrite par les variations de De par un facteur 2, est nettement plus significative que la diminution du temps de collision. En effet, le temps moyen de collision est de 370 ms pour les obstacles décalés de 47° et de 316 ms pour les obstacles décalés de 76°, soit une diminution d'environ 15%. Ce résultat peut s'expliquer par la petite taille des obstacles. En effet, au cours de son désengagement, la plus grande partie de la molécule est située loin de l'obstacle, en tous cas suffisamment loin pour ne pas être influencée par la contrainte élongationnelle, située au voisinage immédiat des obstacles (notons que les fenêtres zoomées de la figure 5.3 ont pour dimension approximative 120x100 nm, à comparer avec la longueur bout-à-bout de la molécule d'ADN- λ , avoisinant les 21 μm).

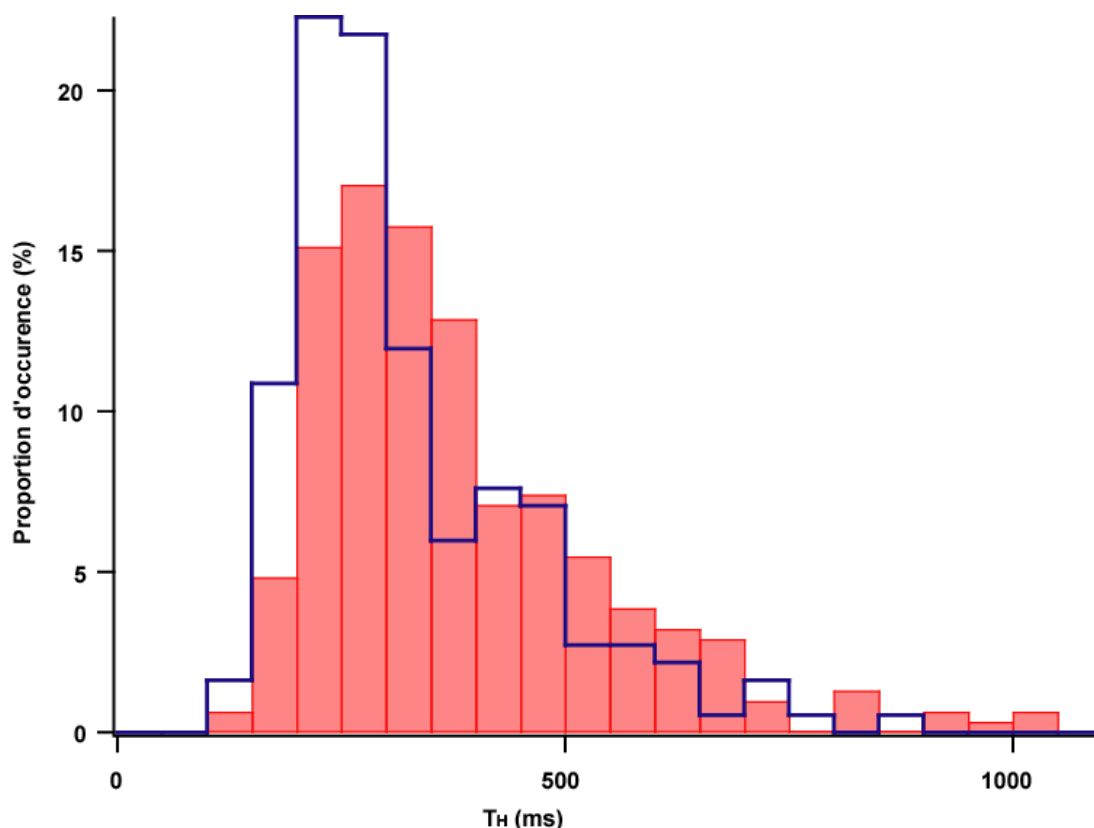


Figure 5.4: répartition des durées de collision de molécules d'ADN- λ soumises à un flux hydrodynamique de 40 $\mu\text{m/s}$ avec des obstacles ellipsoïdaux décalés de 47° (histogramme rouge) et 76° (trait bleu) par rapport au flux.

Ces résultats sont en désaccord avec les simulations de Cho et Dorfman qui prévoient une légère augmentation du temps moyen de collision avec le décalage angulaire des obstacles asymétriques, malgré l'augmentation associée du taux de contrainte. Cependant, dans un papier en cours de soumission dans la revue *Electrophoresis* (Joswiak et al. 2011), Joswiak et Dorfman ont mesuré expérimentalement les temps de collision de molécules d'ADN à différents De et retrouvent les tendances que nous dégagons ($\langle T_H \rangle$ augmente de 0.26 à 0.285 s lorsque De diminue de 136 à 46). Ces résultats sont assez surprenants car ils semblent indiquer que des effets extrêmement locaux ont une influence sur les dynamiques globales de désengagement.

La mise en évidence du rôle joué par le taux de contrainte sur les dynamiques d'interaction ADN-obstacle modifie partiellement les conclusions que nous avons présentées dans la section 4.2.3. En effet, nous avons attribué la diminution du temps de désengagement avec la taille des obstacles au couplage longue distance des flux à l'intérieur des réseaux d'obstacle, d'autant plus marqué que l'obstacle est grand. Or il est admis qu'une diminution de la taille des obstacles est associée à une augmentation du taux de contrainte autour des obstacles (Randall et Doyle 2004). L'influence du taux de contrainte sur les dynamiques de collision

ADN-obstacle que nous venons de mettre en évidence semble indiquer que le couplage longue distance n'est pas la seule explication des modifications de dynamiques avec la taille des obstacles observées dans le cas d'obstacles cylindriques. La variation du taux de contrainte maximal semble elle aussi jouer un rôle. Pour trancher cette question, il serait intéressant d'étudier l'influence du nombre de Deborah sur les dynamiques de collision ADN-obstacle dans le cas d'obstacles nanométriques cylindriques, afin de ne pas tenir compte uniquement du nombre de Péclet comme c'est le cas dans la plupart des expériences rapportées.

5.4.2 Etude à l'échelle de la molécule individuelle

Dans la mesure où l'essentiel des collisions sont de type U/J, il nous est apparu utile de corréler les distributions à des variables microscopiques de la collision, comme nous l'avons fait pour le cas des plots cylindriques (cf. section 4.2.1). Nous avons donc mesuré pour chaque orientation d'obstacle le temps de désengagement en fonction de la configuration initiale de la molécule, et comparé nos résultats expérimentaux avec le modèle de Randall et Doyle, ce qui nous permet d'aboutir à une valeur du temps de désengagement caractéristique τ_c (équation 4.18 et figure 5.5). Nous avons effectué ces mesures pour deux tailles d'ADN (35 et 49 kpb), afin de fiabiliser nos résultats expérimentaux. Pour ces populations d'ADN, nous avons constaté que le temps de désengagement suivait le même comportement que le temps moyen de collision, à savoir une diminution des temps de désengagement lorsque le décalage angulaire de l'obstacle augmente. Nous avons donc mis en évidence un argument supplémentaire tendant à montrer que la modification de l'orientation des obstacles, donc la modification du taux de contrainte et donc *in fine* du nombre de Deborah, tend à influencer sur les dynamiques de collision, et de désengagement, des molécules soumises à un flux hydrodynamique.

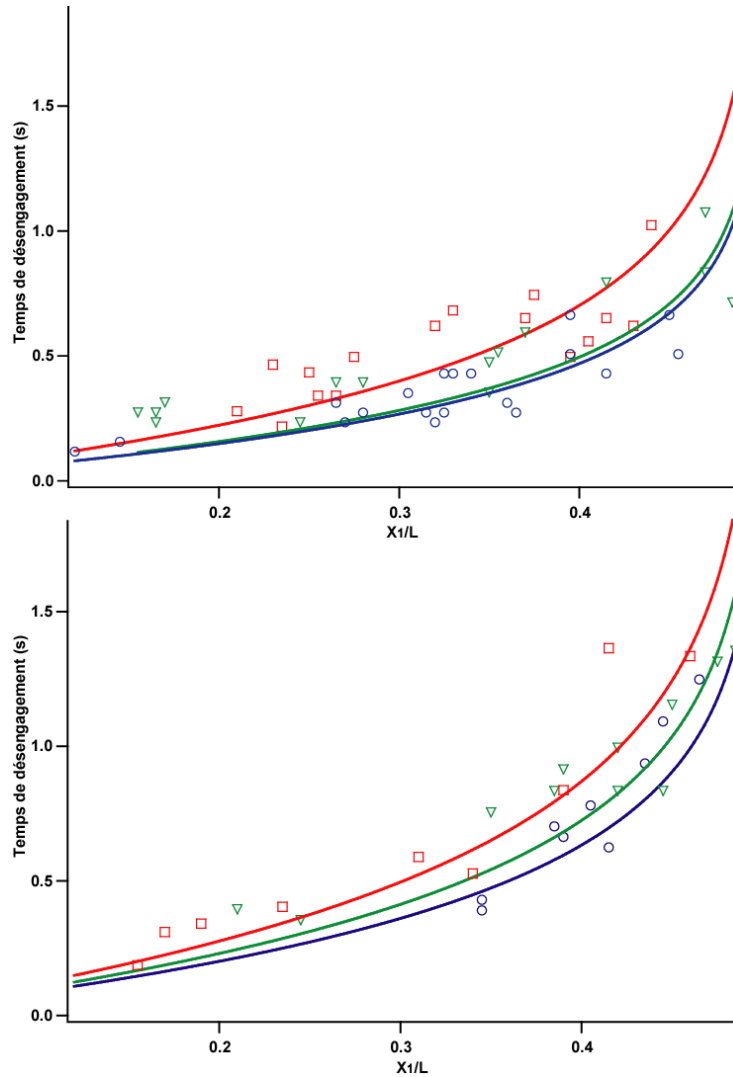


Figure 5. 5: Ces deux graphes représentent le temps de désengagement en fonction de la conformation initiale de la molécule, en fonction de l'orientation des obstacles. Les expériences ont été menées à $20 \mu\text{m/s}$ pour deux tailles de molécules, à savoir des fragments de 35 kpb (haut) ou des molécules d'ADN- λ . Nous avons représenté sur un même graphe les temps de désengagement pour des obstacles orientés à 47° (rouge), 63° (vert) et 76° (bleu). Ces données ont été ajustées par la loi de désengagement de Randall et Doyle présentée dans la section 4.1.2.

Ces temps de désengagement caractéristiques ont ensuite été tracés en fonction du décalage angulaire α pour ces deux tailles d'ADN, dans le but de caractériser le pouvoir de séparation du processus de collision ADN-obstacle asymétrique (fig. 5.6). Nous observons une évolution des temps de désengagement caractéristiques avec l'orientation α similaire pour les deux tailles de fragment étudiées. Aux vues des barres d'erreur, nous en déduisons que le taux de contrainte, donc le nombre de Deborah, n'influe pas sur le pouvoir de séparation d'une collision individuelle. Les temps de désengagement diminuent lorsqu'on augmente le taux de contrainte maximal autour de l'obstacle, mais le rapport des temps caractéristiques pour des

tailles de 35 et 49 kpb ne varie que faiblement. Il semble donc que des configurations d'obstacles responsables de collisions plus longues ne sont pas nécessairement plus favorables pour la séparation en taille de molécules d'ADN.

Pour conclure, les dynamiques d'interaction ADN/obstacle semblent être altérées par des obstacles asymétriques, mais nous ne pouvons pas en conclure qu'une orientation soit plus favorable pour la séparation. Il faut noter que notre étude est la première de ce type (tant en termes de géométrie d'obstacles considérés que de la manipulation hydrodynamique des molécules). Elle ouvre des perspectives sur les dynamiques de collision ADN-obstacles nanométriques dans le cas d'obstacles asymétriques qui brisent la symétrie de la matrice d'obstacles. Il semble clair que d'autres travaux sont nécessaires, notamment sonder plus précisément la position de la molécule d'ADN par rapport à l'obstacle et mieux élucider au niveau moléculaire les dynamiques de désengagement en fonction de De . Il est important de noter que des modèles d'interaction ADN-obstacle nanométrique restent à développer : nous avons en effet comparé nos dynamiques expérimentales avec le modèle de Randall et Doyle, construit pour des interactions ADN-obstacle micrométrique. La réalisation de travaux complémentaires pourrait ainsi permettre de créer le premier modèle d'interaction ADN-obstacle à ces échelles.

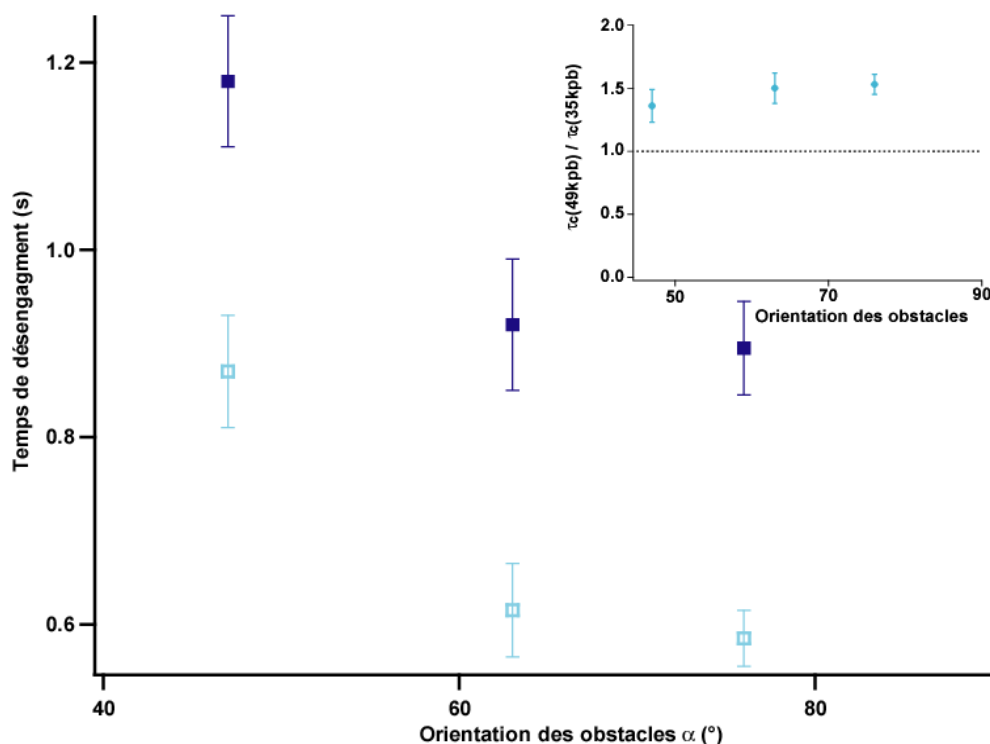


Figure 5.6 : Temps caractéristique de désengagement obtenu par la formule de Randall et Doyle en fonction de l'orientation des obstacles et de la taille des molécules, fragments de 35 kpb (clair) ou molécules d'ADN- λ de 49kpb (foncé). Le flux hydrodynamique est imposé à 40 $\mu\text{m/s}$ ($Pe \sim 4$). L'insert représente le rapport des temps caractéristiques de collision de fragments de 49 et 35 kpb en fonction du décalage angulaire des obstacles.

5.5. Conclusion

Nous venons de présenter la première étude des dynamiques de collision entre des molécules d'ADN en fonction de l'asymétrie des obstacles, mettant en évidence leur influence sur les temps de collision et de désengagement. Ce travail s'inscrit dans le contexte actuel de mise en place d'un modèle complet visant à établir les dynamiques de molécules d'ADN dans des réseaux d'obstacles, unités de base des dispositifs de séparation par collisions. Ces dynamiques doivent être parfaitement comprises pour pouvoir offrir des performances de séparation capables de présenter une amélioration par rapport aux dispositifs actuellement à la pointe en séparation.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons développé des dispositifs micro/nanofluidiques pour la séparation en taille de molécules d'ADN. Ces dispositifs sont constitués de matrices d'obstacles nanométriques à travers lesquels l'ADN se faufile avec un comportement dépendant de sa taille. Ce travail constitue un exemple concret de nanobiotechnologie. L'optimisation de ces dispositifs a nécessité de comprendre les dynamiques d'interaction ADN-obstacle à l'échelle de la molécule unique, encore peu connues.

Pour ce faire, nous avons travaillé selon deux axes principaux. Le premier a trait au développement technologique des dispositifs, puisque nous avons mis au point une stratégie robuste pour produire de façon générique, rapide et à peu de frais des réseaux d'obstacles nanométriques intégrés dans des dispositifs fluidiques fonctionnels, et nous avons développé un banc optique optimisé pour le suivi de molécules uniques. Le second axe concerne la physique du processus de séparation dans des réseaux d'obstacles. Nous avons manipulé des molécules d'ADN dans nos matrices pour sonder leurs dynamiques d'interaction afin d'améliorer notre compréhension des interactions ADN-obstacle et tenter d'améliorer les pouvoirs de séparation des réseaux d'obstacles micro-nanofabriqués.

Concernant le volet technologique, nous détaillons la première adaptation de la méthode de lithographie par décalage de phase pour la fabrication de dispositifs micro-nanofluidiques. Cette technologie ne nécessite que des équipements standards de photolithographie présents dans l'ensemble des centrales technologiques dédiées à la microélectronique et s'avère particulièrement pertinente pour du prototypage. La photolithographie conventionnelle nous permet de fabriquer des obstacles de dimension minimale avoisinant le micron tandis que la photolithographie par projection nous permet de réaliser des obstacles de dimension minimale 300 nm environ. Le développement de la lithographie par décalage de phase nous a permis de réaliser de façon reproductible des obstacles dont les dimensions minimales atteignent 80 nm de diamètre, de façon reproductible, à haut débit et à bas coût, avec la possibilité de contrôler à la fois la taille et la forme des obstacles. Nous avons donc validé ce développement technologique qui, nous le pensons, peut s'avérer un outil puissant pour le prototypage de dispositifs nanofluidiques.

A la suite de ce développement technologique, nous avons engagé un travail sur la manipulation de molécules d'ADN dans des réseaux d'obstacles. La nouveauté de ce travail vient de l'utilisation de l'hydrodynamique pour guider les molécules dans les matrices

d'obstacles. Nous montrons que l'utilisation de cette approche altère les dynamiques d'interaction ADN-obstacle et réduit l'espace configurationnel accessible aux molécules pendant les collisions, ce qui suggère que l'utilisation de l'hydrodynamique réduit la dispersion de séparation des matrices d'obstacles.

Ce travail nous a conduit jusqu'à la réalisation d'un système de concept pour la séparation de longues molécules d'ADN de plusieurs dizaines de kpb. Comparables aux meilleures études publiées, nos résultats sont toutefois sous-optimisés au niveau de l'injection, ce qui nous suggère que l'utilisation d'un flux hydrodynamique devrait permettre d'améliorer sensiblement le pouvoir de séparation des dispositifs formés d'obstacles nanofabriqués.

La taille et la forme des obstacles ne semblent jouer qu'un rôle mineur dans le processus de séparation. Ainsi, les modifications des cinétiques d'interaction induites par une augmentation du diamètre de plots cylindriques de 80 à 500 nm, ou par un décalage de l'orientation de plots ellipsoïdaux de 46 à 76° n'excèdent pas 40%.

A l'heure du bilan de cette thèse, nous pouvons nous demander quels restent les enjeux de ce sujet de recherche. Il nous semble que les matrices doivent être dimensionnées pour séparer des petits fragments d'ADN avec une résolution idéalement à la paire de base, pour espérer apporter une plus-value par rapport aux dispositifs capillaires, actuellement le standard académique et industriel de la séparation. Le nano-obstacle est un objet pertinent pour la séparation de petits fragments d'ADN et semble être une voie pertinente à explorer. En particulier, nous souhaiterions sonder l'influence de la densité de la matrice sur la résolution de séparation afin de déterminer si la séparation d'ADN en champ continu dans un réseau d'obstacle est une voie susceptible de supplanter les technologies ultra-résolutives existantes. La construction d'un modèle analytique des dynamiques d'interaction ADN-obstacle nanométrique, inexistante, est une étape clé dans cette perspective.

Nous souhaiterions tester le pouvoir de séparation de nos réseaux d'obstacles dans des dispositifs de séparation optimisés, contenant un microcanal d'injection pouvant réduire la largeur de notre bande d'injection d'un facteur 15 au minimum, et augmentant par là-même la résolution de séparation.

Enfin, d'un point de vue plus théorique, nous souhaiterions compléter ce travail par l'étude d'autres régimes de migration. En augmentant la densité du réseau et en augmentant la taille des molécules injectées (par exemple en utilisant de l'ADN T4 de longueur 180 kpb environ, soit près de 4 fois plus que l'ADN- λ étudié dans cette thèse), nous nous attendons à observer des dynamiques de migration par reptation. Modèle de migration des molécules d'ADN dans un gel, la reptation été intensivement étudiée dans le cas d'une actuation électrophorétique.

Nous avons montré que l'utilisation d'un champ hydrodynamique altérerait les dynamiques de migration dans le cas de matrices d'obstacles dilués, et nous pensons que la reptation sera elle aussi altérée par la présence d'un écoulement de cisaillement. Menées pour la première fois sous flux hydrodynamique, ces études pourraient proposer un nouveau regard sur les mécanismes de reptation qui sont connus depuis plus de 20 ans et apporter des éléments nouveaux concernant la physique d'une molécule d'ADN.

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

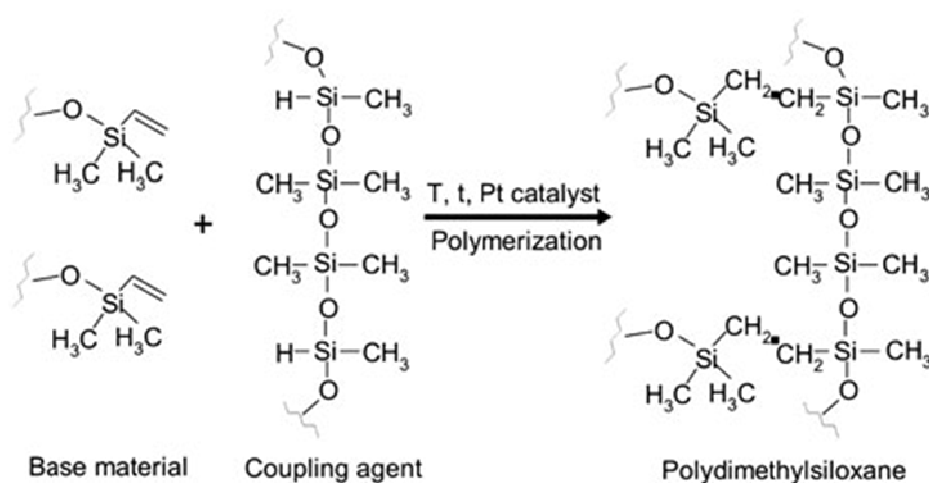


Figure A1.1 : schéma de la réaction de réticulation du PDMS. Schéma tiré de Cai et Neyer 2010

A1.2. Formulation du hard 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 <i>(Methyhydrosiloxane dimethylsiloxane cop.)</i>	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 2: Tenues mécaniques du soft et du hard-PDMS

A2.1. Etude de stabilité de motifs réalisés en soft et hard-PDMS

Pour étudier la stabilité d'un motif, on utilise généralement le rapport d'aspect, soit le rapport de la largeur d'un motif par sa profondeur, comme valeur de référence. H.Schmidt et al. ont montré que le h-PDMS permettait d'utiliser des reliefs de largeur inférieure à 80 nm, pour un rapport d'aspect de 1.25, ce qui convient bien aux exigences concernant nos dispositifs.

Pan Mao et al. ont comparé les comportements en stabilité du h-PDMS et du PDMS 184, et leurs résultats montrent que pour notre configuration, l'utilisation du PDMS 184 est inadaptée, car on peut s'attendre à un effondrement systématique de nos structures (Mao 2006). C'est pourquoi, après quelques tests qui ont montré cet effondrement, nous nous sommes arrêtés en détail sur le h-PDMS.

Nous avons testé des réseaux de canaux de deux profondeurs différentes (450 et 250 nm), pour des largeurs allant de 2 à plus de 50 μm (fig. A2.1).

Ainsi, pour une profondeur de 450 nm, nous avons réussi à souder des canaux allant jusqu'à 35 μm de large, soit un rapport d'aspect de près de 80, (comme on peut le voir sur la photo ci-après, le canal commence à devenir instable aux alentours de 40 μm) et pour une profondeur de 250 nm, nous avons réussi à sceller des canaux de 8 μm de large, soit le maximum qui nous était disponible (rapport d'aspect de 32), ce qui semble cohérent vis-à-vis des résultats de Pan Mao et al.

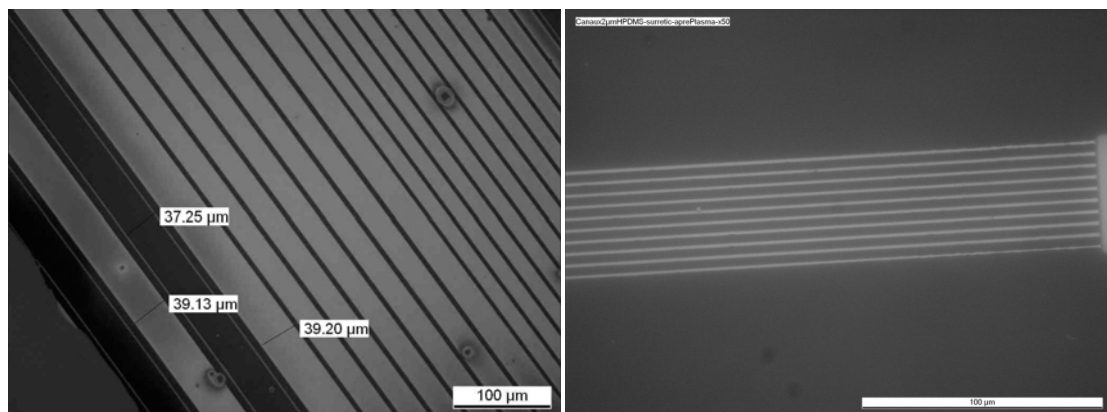


Figure A2.1 : Image par microscopie optique de canaux h-PDMS après scellement irréversible sur verre.

(gauche) : structures de 450 nm de profondeur, elles commencent à être instables à partir de 40 μm de largeur environ ; (droite) : structures de 250 nm de profondeur pour 2 μm de largeur, bien stabilisées.

Il est important de noter que nous avons également étudié des configurations bicouches, à savoir une couche de PDMS 184 déposée sur une couche de h-PDMS préalablement réticulée. En effet, le h-PDMS réticulé se révèle être un matériau très cassant, fissurable, donc très délicat à manipuler. L'ajout d'une couche de PDMS 184 permet d'avoir une cellule beaucoup plus confortable d'utilisation. Nous n'avons pas constaté de différence significative quant aux résultats de scellement entre des canaux réalisés en h-PDMS pur ou en configuration bicouche.

Pour faire une synthèse de ces résultats, reprenons plusieurs travaux qui ont analysé la stabilité de motifs en PDMS. K.J.Hsia, Y.Huang et al. [5] ont utilisé un modèle identifiant un paramètre sans dimension Γ défini comme le rapport de l'énergie d'adhésion sur la surface par rapport à l'énergie de déformation d'un profil, et qui renseigne sur la stabilité d'une structure :

$$\Gamma = \frac{8\gamma a}{E'h^2} \quad (\text{A2.1})$$

avec : γ l'énergie d'adhésion par unité de longueur du PDMS sur le substrat, ici du verre, en N/m

a et h respectivement la largeur et la hauteur du canal (en m)

$E' = \frac{E}{(1-\nu^2)}$ le module d'Young en contrainte plane (en Pa), E étant le module d'Young et ν le coefficient de Poisson.

Nous avons constaté que les motifs de 450 nm de profondeur commençaient à être instables pour des largeurs de l'ordre de 35 μm , donc pour un rapport $\frac{a}{h^2} = \frac{35}{0.45^2} = 173$.

A2.2. Etude de la déformation du PDMS soumis à une contrainte

A2.2.1. Présentation du dispositif expérimental

Pour les applications micro-nanofluidiques que nous visons, nous pourrions éventuellement être amenés, en cas de difficultés pour remplir les canaux, à devoir pousser le liquide par surpression. Cette dernière engendrera une déformation des canaux, puisque le PDMS est un matériau élastique. Nous avons donc mis au point un procédé simple destiné caractériser la déformation du PDMS, fondé sur la microscopie de fluorescence pour des cellules en PDMS 184 standard, et pour des cellules bicouches (PDMS standard coulé sur du h-PDMS pré-réticulé, leur intérêt a été présenté dans le paragraphe précédent).

Après ajustement des différents paramètres possibles (notamment l'épaisseur des couches, la température de réticulation des PDMS, le process de perçage des réservoirs, et le plasma O₂, destiné à bonder irréversiblement les cellules aux lamelles de microscope), nous avons pu obtenir un protocole efficace et reproductible dans le but de réaliser facilement plusieurs dispositifs. En effet, même si ces structures sont très différentes de celles que nous devons réaliser pour la suite du projet, les conditions de préparation sont identiques, et le protocole sera réutilisé lorsque nous pourrons travailler avec le design final.

Les expériences menées se sont basées sur l'utilisation du dispositif MFCS de Fluigent®, qui permet un contrôle en pression sur plusieurs entrées en parallèle. La gamme de surpression accessible varie entre 0 et 1 Bar (fig. A2.2).

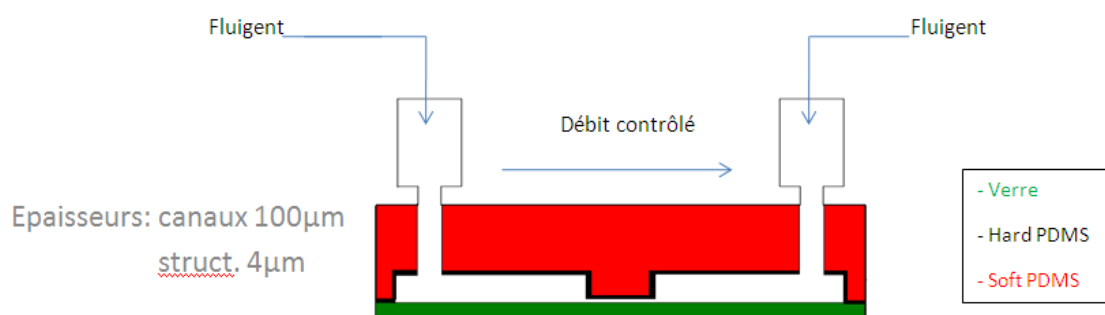


Figure A2.2 : schéma du dispositif expérimental utilisé : la membrane centrale se déforme sous l'effet de la surpression imposée par le dispositif « fluigent »

La différence de pression entre les deux réservoirs a été maintenue constante (30 mBar). Le principe de l'expérience repose sur le fait que plus la pression imposée est importante, plus la structure centrale se déforme, en gonflant. De ce fait, la quantité de liquide à l'intérieur augmente, suivant l'augmentation du volume accessible. En mesurant l'intensité de fluorescence à l'aide d'un microscope inversé, on peut suivre l'évolution de la déformation : plus la structure est déformée, plus l'intensité de fluorescence est importante (fig. A2.3). Un logiciel de traitement d'image (ImageJ) permet de tracer les profils d'intensité de fluorescence, et donc le profil de la structure. En effet, la profondeur des canaux d'arrivée est connue (100 µm), et sert d'étalon à notre mesure : la valeur d'intensité de fluorescence mesurée à pression nulle correspondra à la valeur 100 µm, et nous permet d'avoir le profil de la structure en unité réelle, ce qui est indispensable pour une analyse quantitative des résultats.

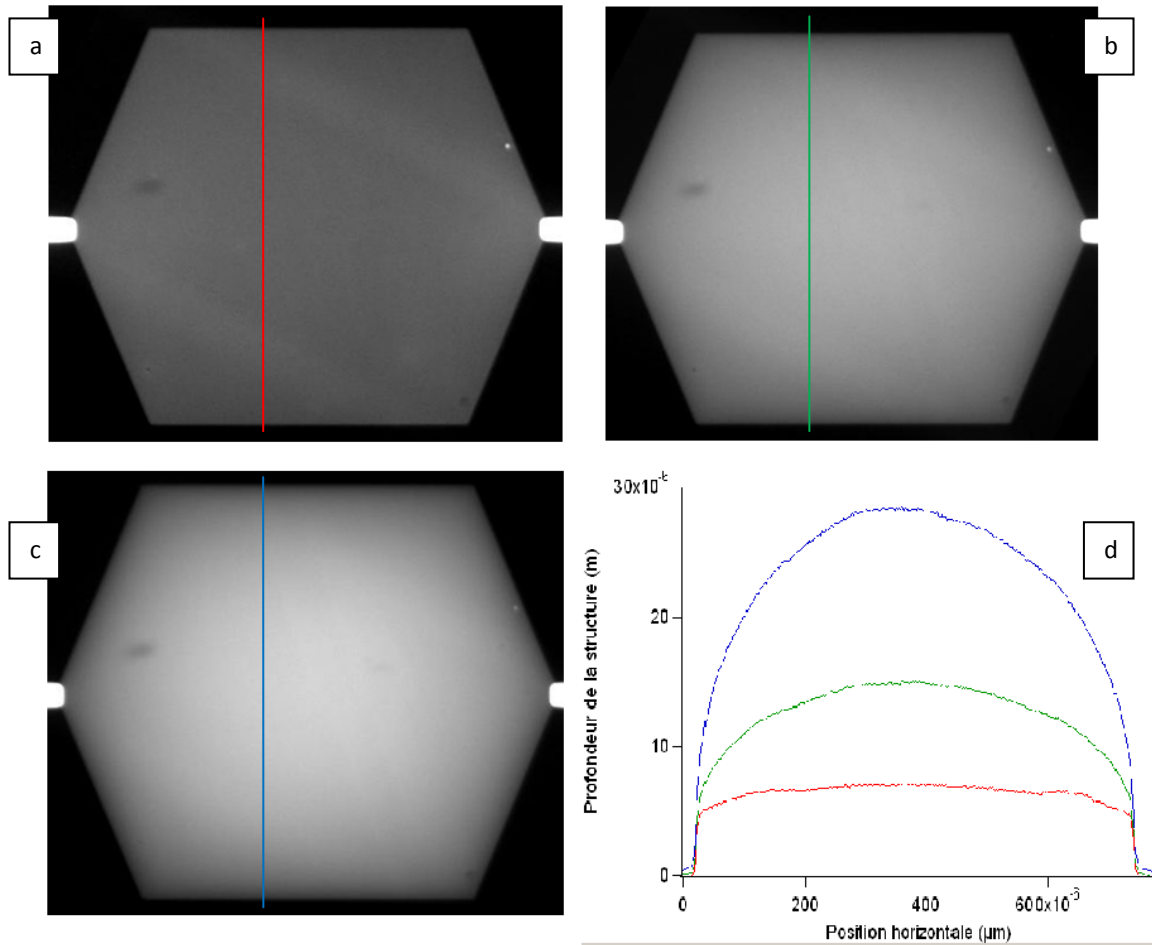


Figure A2.3 : Images par microscopie de fluorescence d'une structure PDMS soumise à 3 pressions différentes. (a) : avec 50 mBar de surpression ; (b) : avec 300 mBar de surpression ; (c) avec 900 mBar de surpression ; (d) profils d'intensité de fluorescence dans les trois cas.

A2.2.2. Exploitation des données expérimentales

Comme on peut le voir sur la fig. 8, les profils de déformation sont paraboliques. Cela nous a amenés à utiliser la loi de Laplace, qui donne la différence de pression entre deux milieux dont la surface de séparation est incurvée (ici l'interface PDMS/air) :

$$(P_{int} - P_{ext}) = \sigma * \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (A2.2)$$

avec R_1 et R_2 les rayons de courbure de la structure déformée, selon deux directions perpendiculaires.

A partir d'un ajustement par une parabole (fig. A2.4), nous pouvons déduire la dérivée seconde au sommet. Or, cette grandeur est inversement proportionnelle au rayon de courbure, ce qui nous permet de mesurer d'après la relation de Laplace la tension de surface en fonction de la pression appliquée (fig.A2.5).

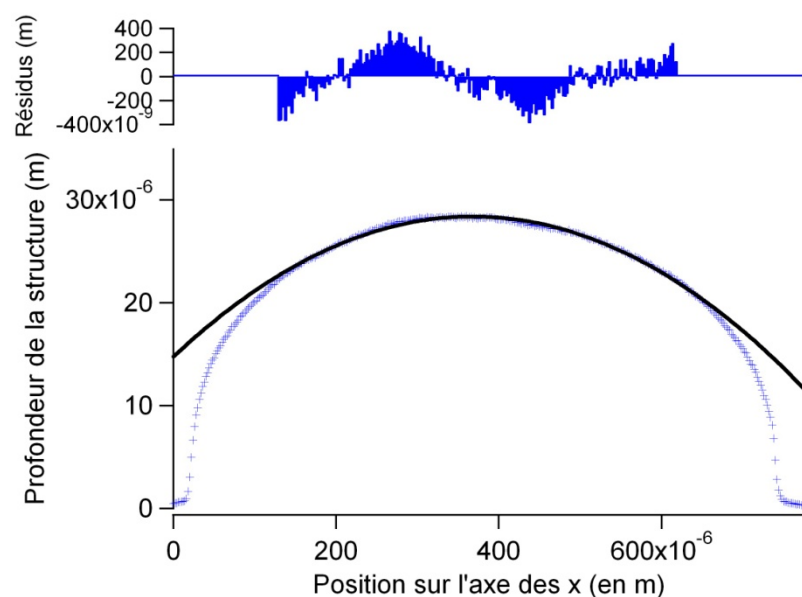


Figure A2.4 : Représentation d'un profil d'intensité avec le logiciel IGOR (données bleues dans le graphe du bas), et son ajustement avec un modèle polynomial (courbe noire). En haut, le résidu de l'ajustement est représenté.

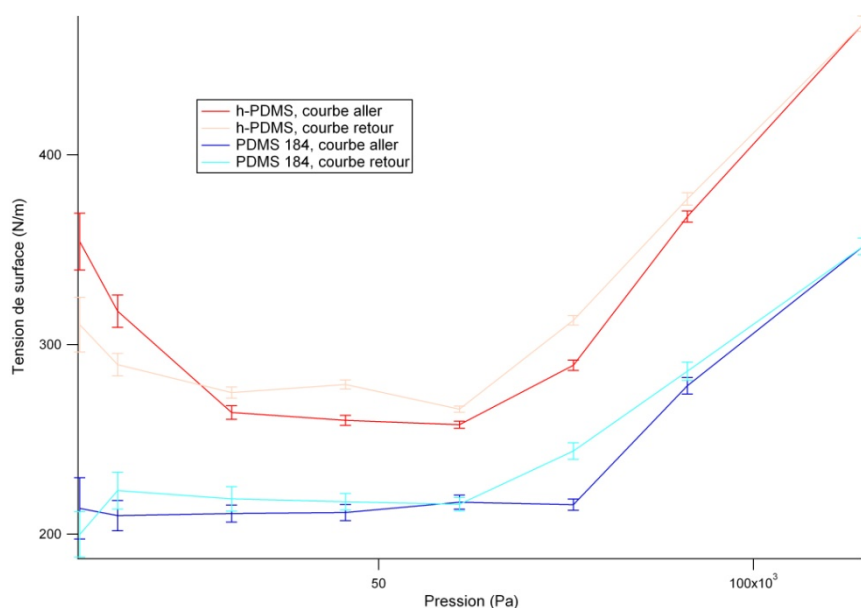


Figure A2.5 : Tension de surface en fonction de la pression imposée pour du PDMS 184 classique et du h-PDMS, en configuration montée ou descente en température.

Les résultats obtenus permettent d'identifier une gamme de pression comprise entre 100-600 mBar pour laquelle le PDMS (et le h-PDMS) sont en régime élastique (σ constant). Il est évident que c'est dans ce régime que nous devons travailler, mais la manipulation d'électrophorèse envisagée ne nécessite qu'une légère surpression éventuellement pour

remplir les canaux, et nous espérons ne pas avoir à dépasser des pressions de l'ordre de 6.10^5 Pa (environ 600mBar).

Nous avons souhaité remonter, à l'aide de cette expérience, à une donnée connue afin de valider notre expérience, en l'occurrence le module de Young. Cependant, les systèmes d'équations à utiliser sont complexes, et nous avons décidé d'effectuer des approximations, en s'appuyant sur [6], afin d'obtenir un ordre de grandeur pour ce paramètre.

Ainsi, nous nous plaçons dans une situation où la contrainte est uniforme sur l'ensemble du matériau, qui se déforme uniaxialement selon l'axe z. En réponse aux forces dues à la contrainte imposée γ , en l'occurrence à la surpression ΔP , $\gamma \sim \Delta P$.

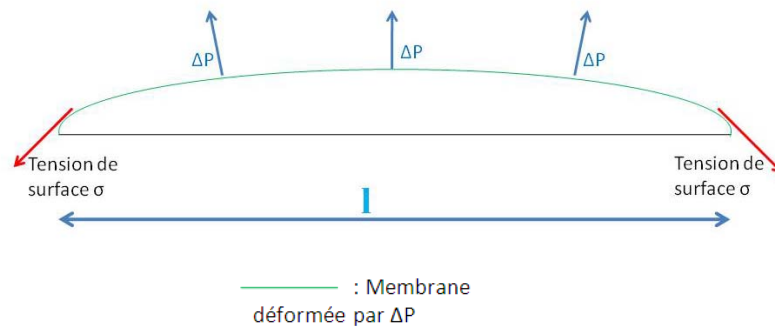


Figure A2.6 : Représentation d'une cellule déformée et de l'équilibre des contraintes.

Le matériau se déforme, ce qui va engendrer une tension de surface, tangentielle, qui vient contrebalancer ces forces sur une longueur caractéristique (figure A2.6). L'équilibre des forces nous donne $\Delta P \cdot l \sim \sigma$, et on aboutit à une relation approximée entre la contrainte et la tension de surface :

$$\gamma \approx E \frac{\sigma}{l} \quad (\text{A2.3})$$

D'autre part, la loi de Hooke nous dit que l'allongement subit par le matériau est proportionnel à la contrainte appliquée :

$$\gamma = E \frac{\Delta l}{l} \quad (\text{A2.4})$$

avec γ la contrainte appliquée (en N/m^2), E le module de Young (en N/m^2), et Δl l'allongement du matériau.

Les équations (A2.3) et (A2.4) nous permettent donc de déduire un ordre de grandeur du module de Young à partir de la tension de surface (déterminée quantitativement), et on a :

$$\gamma = E * \Delta l / l \sim \sigma / l \text{ et donc } E \sim \sigma / \Delta l$$

A.N : A 450 mBar, les résultats donnent $\sigma_{\text{PDMS}} \sim 220 \text{ N/m}$ et $\sigma_{\text{h-PDMS}} \sim 280 \text{ N/m}$.

De plus, à 450 mBar, $\Delta l_{\text{PDMS}} \sim 27-4 = 23 \text{ } \mu\text{m}$ et $\Delta l_{\text{h-PDMS}} \sim 21-4 = 17 \text{ } \mu\text{m}$.

D'où $E_{\text{PDMS}} \sim 10 \text{ MPa}$ et $E_{\text{h-PDMS}} \sim 16 \text{ MPa}$

Bien que ce ne soient que des ordres de grandeur, nous avons, grâce à une expérience simple et à des approximations importantes mais raisonnables, réalisé une étude comparative entre deux matériaux, avec des valeurs numériques cohérentes ($E_{\text{PDMS}} \sim 2 \text{ MPa}$ et $E_{\text{h-PDMS}} \sim 9 \text{ MPa}$). La rigidité du h-PDMS comparativement au PDMS 184 apparaît clairement dans cette expérience, et explique l'intérêt que nous avons porté à ce matériau.

EFFICIENT PROTOTYPING OF LARGE-SCALE PDMS AND SILICON NANOFLUIDIC DEVICES USING PDMS-BASED PHASE SHIFT LITHOGRAPHY

Y. Viero^{1,2,*}, Q. He^{1,2,*}, L. Mazenq^{1,2}, H. Ranchon^{1,2}, J.Y. Fourniols^{1,2}, A. Bancaud^{1,2}

¹ CNRS ; LAAS ; 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse Cedex 4, France

² Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE ; UT1, UTM, LAAS ; F-31077 Toulouse Cedex 4, France

* these authors equally contributed to this work

Correspondance: abancaud@laas.fr

Abstract

In this study, we explore the potential of Poly-DiMethylSiloxane (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 cm² 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 non-specific 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 in order to perform complex chemical or biochemical procedures with enormous benefits in cost, reduced sample volumes, and improved performances (Sanders et 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, Tezuka, Takamura, Ueda, Nishimoto, Nakanishi, Horiike, et Baba 2004b). Moreover, the confined geometry of nanofluidic systems allows to monitor the environment of single molecules, and the conformation of single DNA molecules was successfully manipulated inside nanochannels (Reisner, Morton, Riehn, Wang, Yu, Rosen, Sturm, Chou, Frey, et Austin 2005a) (Jonas O. 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 (George M. Whitesides 2011b). 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 exposures. Moreover, the typical write field for an e-beam of 1 mm^2 is relatively small for a separation device (Kevin 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 90s and has been shown to be adapted to fabricate 25 nm features (Stephen Y. Chou, Krauss, et Renstrom 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 (Jia Ou, Joswiak, Carpenter, et Dorfman 2011a).

In this article, we demonstrate that PDMS-based Phase Shift Lithography (PPSL) is a useful technology for a broad range of applications in nanofluidics. PPSL, which was initially pioneered by Whitesides and colleagues in 1997 (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 5-fold increased Young modulus (Schmid et 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 et Seidel 2003). The relevance of PPSL for nanofluidic devices

fabrication yet remains to be demonstrated, and we provide different solutions for the integration of ~100 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 vs. silicon nanochannels is specifically investigated, showing an unexpectedly slow mobility in PDMS likely associated to non specific 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:

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

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 ~350 nm, the light intensity at the edges of the gaps is reduced to zero for $h \sim 500$ 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 ~90 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 μ m linear patterns repeated every 8 μ m (Fig. 1A). Note that we coated silicon wafers with an HexaMethylDiSiloxane (HMDS) layer by vapor priming in order to promote adhesion of AZ1505. Unreticulated PDMS (Sylgard 184, Corning) was poured on these structures, and cured at 75 °C during 3 hours. 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/cm² (h-line) using a conventional SUSS Microtech® Ma6 mask aligner, and subsequently developed during 20 s with AZ developer. Linear patterns of ~200 nm were obtained with this protocol (Fig. 1B, left panel), and smaller motifs of ~100 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 cm², so that one key benefit of PPSL stems for its capacity to generate very long features characterized by a length-to-width ratio of $\sim 10^4$ (5 mm / 200 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 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 in order 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 4000 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 $1.3 \cdot 10^{-3}$ mBar or $7.2 \cdot 10^{-2}$ mBar and RF powers set to 450 W or 2800 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 nano-channels were systematically connected because the arrays of nanochannels covered areas of several cm^2 , and the typical distance between microchannels was much lower of $\sim 500\ \mu\text{m}$ (cartoon in Fig. 2B). The microchannels were etched by RIE over depths of $\sim 2\ \mu\text{m}$ (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 $\sim 100\ \text{nm}$ 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 $100\ \text{nm}$ 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 nano-structures for $2\ \mu\text{m}$ thick microchannels (Supplementary Fig. S2), and this artifact was significantly improved using $700\ \text{nm}$ thick microchannels (Fig. 2C). Note that the width of microchannels was carefully adjusted to $30\ \mu\text{m}$ 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 minutes in order to obtain anti-fouling surfaces. Unreticulated h-PDMS was then spin coated on the mold at $1000\ \text{rpm}$ during $30\ \text{s}$ to produce a $40\ \mu\text{m}$ layer that was cured at $75\ ^\circ\text{C}$ during 45 minutes. $30\ \text{g}$ of conventional PDMS prepolymer was subsequently poured on the wafer, and the baking was prolonged during 2 hours at $75\ ^\circ\text{C}$. 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 hours 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 minutes at $800\ \text{W}$, and $30\ \text{s}$ at $200\ \text{W}$, respectively,

before being placed in conformal contact. The bonding strength was enhanced by curing the resulting chip at 100°C during 20 minutes (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 (4000 rpm), which was cured at 75°C for 2 hours, and then activated using the same protocol as for h-PDMS chip bonding. We checked by optical microscopy that 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 nm 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 non specific 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 et Tuite 1996). An ANDOR iXon-885 camera was used to observe single DNAs using a binning of 4x4, and a pixel size of 0.33 μm . Exposure times varied from 10 ms 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 to 1000 mBar, or a GW INSTRON® 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, Tezuka, Takamura, Ueda, Nishimoto, Nakanishi, Horiike, et Baba 2004b);(Jia Ou, Joswiak, Carpenter, et Dorfman 2011a). 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 μm to 5 mm (Fig. 3B). The confinement inside nanochannels expectedly induced an entropic spreading of the molecules to a length of $\sim 4\text{ }\mu\text{m}$ (plateau in Fig. 3B and histogram in inset), representing a degree of stretching of 28% given that fluorescently labeled λ -DNA measures $\sim 22\text{ }\mu\text{m}$ (T. 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 (Holger Becker et 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 nm $\times$ 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 5 molecules under at least 4 different tensions, was $2\text{-}3 \times 10^{-4}\text{ cm}^2/\text{Vs}$ 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. (Jia Ou, Cho, Olson, et Dorfman 2009b) (G. C. Randall et Doyle 2006b)). The migration of DNA was also characterized in nanochannels, showing a 10-fold 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 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 (J. L. Viovy 2000b). One may therefore hypothesized 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, Gelfi, et Righetti 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 $1.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ (Fig. 4A) in 100 nm x 100 nm glass nanochannels or in our own silicon 200 nm x 200 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 (G. C. Randall et Doyle 2006b). 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 24h. 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 2-fold enhanced in microchannels and 10-fold 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 non-specific interactions between PDMS and DNA. Interestingly we assayed the electrophoretic response of 100 nm carboxyl-nanoparticles, *i.e.* a nano-object with a different surface chemistry, in untreated PDMS and with 0.5X 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 nano-objects is sharply slowed down in nanochannels, generalizing the idea that the migration of nano-objects 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 nano-posts 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 10-fold 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.V. and H.R. thank DGA and for PhD fellowship funding, and we thank TEAM research facility for support in fabrication. This work and the fellowship of Q.H. were supported by the ANR program JC08_341867.

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

Yannick Viero^{1,2}, Qihao He^{1,2}, Aurélien Bancaud^{1,2}

¹ CNRS ; LAAS ; 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse Cedex 4, France

² Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE ; UT1, UTM, LAAS ; F-31077 Toulouse Cedex 4, France

Correspondance: abancaud@laas.fr

Keywords: nanofluidics, DNA-post interaction, hydrodynamic actuation, DNA separation

Abstract

Micro- or nano-fabricated obstacles arrays have been widely used as model matrices to perform fast DNA separations by electrophoresis. In this report, we use a gallery of obstacles of radius spanning from 40 to 250 nm to investigate the dynamics of hydrodynamic-field-driven DNA-nanopost collisions at the single molecule level. Our 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. We also demonstrate that the use of hydrodynamic flow fields to convey DNA molecules is associated to changes in the configurational space of hooking events, and to altered relaxation dynamics between consecutive collisions. This study allows us to define experimental conditions for the efficient separation of DNA fragments of tens of base pairs, and it 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. Yet, this condition is not fulfilled for DNA in free solution because electric forces and hydrodynamic drags linearly depend on the length of the molecule (Olivera, Baine, et Davidson 1964). 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 to perform DNA electrophoresis consists of a slab gel, but high performance separations are performed with capillaries $\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ in diameter and tens of cm in length due to their excellent heat dissipation and reduction of convection (Mitnik et al. 1995). In addition, arrays of capillaries increase DNA analysis throughput by a factor of at least 10 in comparison to conventional slab-gels (Woolley et Mathies 1994), and this technology enabled to complete 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 (Volkmuth et Austin 1992b). 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 DNAs of $\sim 100\text{ }10^3$ base pairs (kbp) (Olgica Bakajin, Duke, Tegenfeldt, Chou, Chan, Austin, et Cox 2001b), which are otherwise analyzed by pulsed-field gel electrophoresis during excessively long periods spanning several hours to days. Researches in artificial separation matrices have mostly been conducted with micron-scale obstacles (Volkmuth et al. 1995)-(R. Ogawa, Ogawa, Oki, Hashioka, et Horiike 2007a), 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 (Cao et al. 2002),(Y. C. Chan, Lee, et Zohar 2006). The promises of nanotechnologies were confirmed experimentally, as some of the most impressive separation data were produced with $\sim 250\text{ nm}$ and $\sim 200\text{ nm}$ obstacles in radius (Kaji, Tezuka, Takamura, Ueda, Nishimoto, Nakanishi, Horiike, et Baba 2004a),(Jia Ou, Joswiak, Carpenter, et Dorfman 2011b).

So far, separation experiments in micro- or nano-posts arrays have been mostly carried out using electrophoretic actuation, although hydrodynamics provides an alternative solution to convey DNA molecules through arrays of pillars (Kenward et Slater 2006a)(Tecemariam

et al. 2007), and the processes of DNA trapping and unhooking were shown to be similar with electrophoresis and hydrodynamics (Teclamarium et al. 2007). Interestingly hydrodynamic forces enable to circumvent an intrinsic problem of electrophoresis, which arise 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 (Murat et Grest 1989) may introduce a bias in the physics of unhooking from nanopost.

Here, we perform the first single molecule comprehensive study of pressure-driven DNA-nanopost disengagement dynamics using DNA molecules of two different sizes of 49 and 35 kbp, and nanoposts of size spanning 40 to 250 nm in radius. First, DNA unhooking dynamics is compared using electric vs. 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 interaction (Long, Viovy, et Ajdari 1996). Interestingly though, the agreement of our 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, we demonstrate 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 our observation of slowed down DNA relaxation dynamics with hydrodynamics, which suggests that the presence of shear in the flow field enhances the deformability of DNA. We subsequently assay DNA unhooking dynamics for different obstacle sizes, hydrodynamic flows, and DNA lengths in order to define optimal conditions for size separation experiments. This study finally allows us to separate a mix 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. Experimental

2.1. Nanofabrication

We decided to fabricate a gallery of silicon nanopillars of radius spanning 40 to 250 nm, and 800+/-100 nm in height (Fig. 1). PDMS-based phase shift photolithography, as described in (Viero, He, et Bancaud), or projection lithography were used to obtain 70 and 140 nm, or 250 nm nanoposts, respectively (Fig. 1B-D). Our collection of pillars was completed with an array of 40 nm nanoposts (Fig. 1A), 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 (Supplementary Fig. S1). Note that the comparison of electric- vs. hydrodynamic-driven DNA-nanopost interaction required to grow a 100 nm insulating layer of silicon dioxide on 250 nm nanoposts, so that nanoposts for electrophoretic experiments measured 300 nm in radius. The distance between nanoposts was set to $\sim 3 \mu\text{m}$, 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 diluted to semi-diluted array (Kevin Dorfman 2010), 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 (Viero, He, et Bancaud) for details of the protocol), which was activated by oxygen plasma in order to bond silicon and PDMS surfaces brought into conformal contact. Note that this bonding technology did not require high pressures or temperatures, and thus did not induce the collapse of nanopillars. Overall, we devised a complete toolbox to monitor DNA-post interactions at the nanoscale.

2.2. 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 nm and 488 nm, respectively. The buffer was 0.1X TBE (Tris-HCl 8 mM, Borate 8 mM, EDTA 0.5 mM), and it was supplemented with 5% Dithiothreitol to reduce photo-induced damages, and with 2% Poly-vinylpyrrolidone (PVP, 360 kDa) to suppress non specific interactions and electro-osmotic flows. Note that this relatively high concentration of polymer in comparison to reference experiments (e.g. (G. C. Randall et Doyle 2006a)) could

affect the viscoelasticity of the flow inside our microchannel, and we assume that the relatively low molecular weight of PVP should not have 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 Supplementary 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 to 1000 mBar. Migration speeds were controlled with an accuracy of 15% from one experiment to the other.

3. Single molecule study of DNA unhooking dynamics

3.1. Model

The dynamics of DNA-obstacle interaction has been thoroughly studied at the microscale in order to unravel the sieving mechanisms that lead to size separation in gel electrophoresis (see e.g. (Nixon et Slater 1994)(Popelka, Kabatek, Viovy, et Gas 1999a)). For small sized obstacles, the hydrodynamic number that characterizes DNA-obstacle interaction is the Péclet number (Pe). According to the formulation of Randall and Doyle (G. C. Randall et Doyle 2006a), its expression is:

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

with U , l_p , and D the velocity, the persistence length, and the 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 coefficient of 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 (Supplementary Fig. 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 (D. E. Smith, Perkins, et Chu 1996), given that the moderate confinement associated to the height of 0.8 μm of the channels is expected to slow down the diffusion coefficient by $\sim 10\%$ (Brochard et de Gennes 1977). The velocity of DNA spans 20 to 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ with electrophoretic or

hydrodynamic actuation and we use the most conservative value for DNA persistence length of 50 nm (J. L. Viovy 2000a), bearing in mind that low salt conditions tend to increase l_p (Manning 2006), but the effect of YOYO on DNA persistence length remains debated (see e.g. (O. B. Bakajin, Duke, et al. 1998)(Günther, Mertig, et Seidel 2010)). Consequently, Pe spans 2 to 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 unraveling of the molecule around the post, the hooking of DNA around obstacles has been described with 4 states coined W, X, J and U conformations (G. C. Randall et Doyle 2006a). J and U collisions are the most frequent at low Pe (G. C. Randall et Doyle 2006a), and they follow the same DNA folding principle, which is characterized by symmetric or asymmetric hooks, respectively (see sketches in Fig. 1E). X, which involve a partial extension of the molecule (G. C. Randall et Doyle 2006a), and even more so W conformations tend to be rare in our experiment (see more below), and we will not analyze their dynamics in the manuscript.

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 (Popelka, Kabatek, Viovy, et Gas 1999a),(Nicolas Minc, Viovy, et Dorfman 2005). The disengagement is driven by the differential force exerted on the two DNA arms, and by assuming a series of simplifications (G. C. Randall et Doyle 2006a), it is possible to write the unhooking time as a function of the disequilibrium of the molecule conformation (Eq. (2)):

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

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 interaction (G. C. Randall et Doyle 2006a). Our data on hydrodynamic-driven DNA unhooking were analyzed using Eq. (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.

To conclude, we used the conventional rope-over-pulley model 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 our experiments are conducted in the presence of parabolic flow fields (Fig. 1E). 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 that we describe in the following sections.

3.2. Electric- vs. hydrodynamic-driven DNA unhooking dynamics

We first compared DNA unhooking dynamics 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 nanoposts arrays at two migration different speeds of 20 and 40 $\mu\text{m s}^{-1}$, which correspond to $Pe \sim 2$ and 4, respectively. First, we examined the conformations of hooked DNA. At $Pe=2$, the occurrence of X collisions was relatively frequent in electrophoresis ($\sim 60\%$, $n=45$; this high occurrence was already detected in (G. C. Randall et Doyle 2006a)), whereas this conformation was rare with hydrodynamics ($\sim 5\%$, $n=40$), and U/J collisions were predominantly detected ($\sim 95\%$, $n=50$). This trend was further accentuated at $Pe=4$ because the percents of X collisions increased in electrophoresis ($> 90\%$, $n=50$), while U/J events remained preponderant with hydrodynamics ($\sim 90\%$, $n=50$). In fact, the threshold to observe significant proportions of X collisions was shifted towards larger Pe with hydrodynamics, for we scored $\sim 80\%$ of X events at $Pe \sim 10$ ($n=45$). We thus conclude that one first advantage of flow-driven DNA-nanopost collisions lies on the simple configurational space with one predominant type of collision for a broad range of Pe spanning $\sim 2-8$. As we will discuss below, this feature is bound to the anomalous dynamics of DNA in our system.

Next, we focused on DNA unhooking dynamics by measuring disengagement times for different initial DNA conformations described by the length $x_I(0)$ of the shorter arm (Fig. 1E). The characteristic timescale of disengagement τ_c was extracted for hydrodynamics and electrophoresis, and for migration speeds of 20 and 40 $\mu\text{m s}^{-1}$ (Fig. 2A). This study showed longer disengagement times with hydrodynamic actuation (compare the blue and red datasets in Fig. 2A). 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 2.9-fold accelerated 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 with

hydrodynamics or electrophoresis, respectively (Fig. 2A, right panel). These results are somewhat surprising because (i) the predictions of τ_c should rather fit the output of electrophoresis experiments (G. C. Randall et Doyle 2006a); and (ii) they are in contradiction with the assumption that electric and hydrodynamic forces generate equivalent effects on DNA during collisions with posts (Long, Viovy, et Ajdari 1996). Notably, this equivalence between electric and hydrodynamic forces was demonstrated for homogeneous flow fields, an assumption that is not validated with Poiseuille flows (Fig. 1E). 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 with electrophoresis at same Péclet. At this step, we thus set out to elucidate the difference in unhooking dynamics by monitoring disengagement events at the single molecule level.

For this, we recorded the temporal evolution of the center of mass of individual molecules during collisions. Hydrodynamics-driven collisions were characterized by a standard profile (Fig. 2B), following (i) a linear increase of the center of mass over time until the DNA impacts the obstacle; (ii) a plateau associated to 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 Fig. 2B). In the case of electrophoresis, an unusual dynamics was detected because the speed of the molecule increased 1.8 ± 0.3 -fold right after the collision (dashed lines and histogram in Fig. 2C), as was already described for DNA collisions with columns of magnetic particles (Nicolas Minc, Viovy, et Dorfman 2005). It was initially suggested that this anomalous response aroused from the difference in drag between an extended *vs.* coiled conformation DNA (Nicolas Minc, Viovy, et Dorfman 2005), but this interpretation was ruled out by model experiments with microposts (G. C. Randall et Doyle 2006a). 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 interpret 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 micronscale obstacles (Popelka, Kabatek, Viovy, et Gas 1999a), provide a better description of hydrodynamic-driven disengagement kinetics with nanoscale obstacles.

We thus decided to move one step ahead and study the physics of hydrodynamic-driven DNA migration through a nanoposts array. At first, we focused on the intrinsic dynamics of DNA, which constitutes a critical component of disengagement kinetics (Popelka, Kabatek, Viovy, et Gas 1999a).

3.3. Relaxation of DNA with hydrodynamic and electric actuation

Our nanoposts arrays are semi-diluted, so DNA chains, which are extended after collisions, can completely recoil in the interstices of the array, and we monitored these relaxations at the single molecule level for different Pe . 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 $Pe=2.7$ and 5.5 (dashed lines in fig. 3A). The relaxation timescale was systematically slowed down with hydrodynamic flow fields (blue datasets and time series in Fig. 3A), and the maximum departure between hydrodynamics vs. electrophoresis, which was associated to a 4-fold deceleration of recoiling times, was reached at low Pe of ~ 2 . Furthermore, we noted a clear dependence of the relaxation time with Pe , which is reminiscent of shear-dependent dynamics of DNA in shear flows (D. E. Smith, Babcock, et Chu 1999a)(LeDuc et al. 1999). The parabolic flow in channels of 800 nm in height is indeed associated to shear rates spanning $\sim 50\text{-}250$ 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 (P. S Doyle, Ladoux, et Viovy 2000), 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, we envision that the shear in the flow field may induce cyclic movements within the chain that slow down its relaxation. This anomalous dynamics 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 (Brochard-Wyart 1995). 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 $Pe < 8$.

Now, because the motion of DNA between two consecutive collisions was already shown to be a critical step for the modeling of electrophoretic separations (Kevin Dorfman 2010), and the next-hooking probability is higher for coils than for extended chains due to their larger breadth (N. Minc, Bokov, Zeldovich, F\\"utterer, et al. 2005), it is important to evaluate the

length travelled by the DNA before it *de novo* adopts a coiled conformation. The relaxation length was defined as the distance travelled by the center of mass of the molecule after unhooking, that is the sum of DNA half length plus the product of the DNA relaxation time by its velocity (schematics in Fig. 3B). According to this definition, the migration distance increases with Pe in the case of electrophoresis (dashed lines in Fig. 3B). The slowed down relaxations with hydrodynamics lead to increased relaxation lengths (blue datasets in Fig. 3B). We anticipate that these long relaxation lengths lead to a reduction of the number of collision during the migration through nanoposts arrays, and potentially degrade their performances for size separation (Kevin Dorfman 2010), although this hypothesis remains to be tested experimentally.

Altogether our 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. We then wished to investigate the physics of collisions *per se* using obstacles and DNAs of variable sizes.

3.4. Unhooking dynamics vs. 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 (Fig. 4A). Unhooking dynamics thus appeared to be slowed down for large obstacles. We suggest 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, we ran 2D COMSOL simulations with realistic obstacle sizes and spatial distributions (fig. 4B). The flow velocity in the interstices of the array was set to $\sim 40 \mu\text{m s}^{-1}$, 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 DNAs measure $\sim 12 \mu\text{m}$, these molecules explore the inter-obstacle space in the J conformation, and they undergo lower drag forces with larger posts. More precisely, following the simplified model of Popelka et al. (Popelka, Kabatek, Viovy, et Gas 1999a), we can assume that the disengagement time is proportional to the drag force exerted on the two arms, and we deduce that the disengagement time should be increased $27/17 \sim 1.6$ -fold for 240 vs. 40 nm obstacles, in keeping with the experimental onset in unhooking time of $0.48/0.35 \sim 1.4$.

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.

3.5. Unhooking dynamics vs. DNA size

We wished to investigate unhooking dynamics for different DNA sizes. We analyzed J collisions with 35 and 49 kbp molecules at migration velocities of 20, 40 and 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ using nanoposts arrays of 70 nm. The elongation of DNA during J collisions was first studied, showing that the extension of molecules expectedly increased with the flow (blue datasets in the insets of Fig. 5A-B). Interestingly though, the elongation was always greater than the predictions of Mohan and Doyle (Mohan et Doyle 2007), and Holleran and Larson (Holleran et Larson 2008) (dotted curves in the insets of Fig. 5A-B). We attribute that this enhanced stretching to (i) the greater deformability of DNA using hydrodynamic actuation (see above), and (ii) the moderate entropic stretching associated to the confinement induced by the 800 nm thick channels (Reisner, Morton, Riehn, Wang, Yu, Rosen, Sturm, Chou, Frey, et Austin 2005b). Interestingly, the lower extension of DNA in the context of electrophoresis (green dataset in the inset of Fig. 5A) supports our interpretation of a higher deformability of DNA induced by hydrodynamic flow fields.

We then studied disengagement kinetics, which appeared to be faster for increasing migration paces (Fig. 5A-B). This result is anticipated because disengagements are driven by the hydrodynamic forces exerted on the long and the short arm (G. C. Randall et Doyle 2006a)(Popelka, Kabatek, Viovy, et Gas 1999a). Furthermore, the predictions for the disengagement time τ_c (Eq. (2)) were in good agreement with our experimental data at low Pe (Fig. 5C). Interestingly though, a consistent departure of $\sim 50\%$ between the model and our results was detected at high Pe . This difference may be due to the existence of an additional drag force produced by the excess of bending constraints associated to the sharp curvature of the DNA around the nanopost, as proposed in [43]. To test this suggestion, the disengagement dynamics of 35 kbp DNAs was 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, we ruled out this hypothesis. We thus suggest that the shear stress exerted on the molecule at high Pe cannot be disregarded to model the physics of unhooking, and we envision that this effect should be investigated with quantitative models in the future.

To conclude on hydrodynamic-driven unhooking dynamics, our work suggests that DNA should be manipulated in sparse nanoposts arrays at $Pe \lesssim 8$, a regime in which the physics of disengagement is reasonably well described by standard electrophoresis models. We finally decided to move one step ahead and perform size separation experiments to test the potential of our matrices for bioanalytical analysis.

4. DNA size separation: proof of principle

Starting from a device composed of 70 nm nanopillars, we drilled two lateral holes on each side of the separation channel (Fig. 6A) in order to inject a DNA mix at a defined position. The DNA migration speed was thus set to $50 \mu\text{m s}^{-1}$ (that is, $Pe=5$ and $D_{eff} \sim 5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ 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 (Fig. 5B). Interestingly, the difference in intensity between the two peaks is consistent with the fact that our DNA sample 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 to perform size separations in less than 2 minutes. 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 . These performances outperform conventional slab gel electrophoresis, which requires at least 1 hour to separate such long species (data not shown). They are comparable to the electrophoresis separation results reported in refs. (Kaji, Tezuka, Takamura, Ueda, Nishimoto, Nakanishi, Horiike, et Baba 2004a)-(Jia Ou, Joswiak, Carpenter, et Dorfman 2011b), 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 (Fig. 6A), from $\sim 200 \mu\text{m}$ in the current device (data not shown) to $50 \mu\text{m}$ using conventional photolithography.

5. Conclusion

In this report, we provide a detailed study of hydrodynamic-driven DNA-nanopillars collisions 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 down 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 nm given a spacing of $3\text{ }\mu\text{m}$. Interestingly, electrophoretic disengagement dynamics appear to be four-fold accelerated 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 data points 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 dispersion associated to the variance of the duration of a collision, and the variance in the distance between collisions (D. W. Olson, Ou, Tian, et Dorfman 2011b). 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 (Taylor 1953)⁵, (Armand Ajdari, Bontoux, et Stone 2006). This “Taylor” dispersion, which has been shown to introduce adverse effects in bioassays (Aurélien Bancaud et al. 2005), is characterized by an effective diffusion coefficient:

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

with $h=400$ nm the channels’ half-height. Given that the molecular diffusion of ~ 30 kpb DNA should be $\sim 0.5\text{ }\mu\text{m}^2\text{ s}^{-1}$, we deduce that the second term becomes dominant for $U > 20\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$. 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-nanoposts disengagement dynamics, as shown in Fig. 5C. 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 complemented by modeling that will enable to define 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 to produce ovoidal posts [19], we will be particularly interested in studying DNA unhooking dynamics for different geometries.

Acknowledgement:

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 TEAM research facility for support in fabrication. This work and the fellowship of Q.H. were supported by the ANR program JC08_341867.

Bibliography

- [1] B. M. Olivera, P. Baine, N. Davidson, *Biopolymers* **1964**, 2, 245-257.
- [2] L. Mitnik, L. Salomé, J. L. Viovy, C. Heller, *Journal of Chromatography A* **1995**, 710, 309–321.
- [3] A. T. Woolley, R. A. Mathies, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **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, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, 92, 6887.

- [7] W. D. Volkmuth, T. Duke, M. C. Wu, R. Austin, A. Szabo, *Physical Review Letters* **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, *Journal of micromechanics and microengineering* **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, *Physical review letters* **1996**, 76, 3858–3861.
- [19] Y. Viero, Q. H. He, A. Bancaud, *Microfluidics and Nanofluidics*, submitted
- [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, *Physical Review E* **1994**, 50, 5033-5039.
- [23] E. M. Sevick, D. R. M. Williams, *Physical Review E* **1994**, 50, 3357-3360.
- [24] S. Popelka, Z. Kabatek, J. L. Viovy, B. Gas, *Journal of Chromatography 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, *The Journal of Chemical Physics* **1977**, 67, 52-56.
- [27] J. L. Viovy, *Reviews of Modern Physics* **2000**, 72, 813.
- [28] G. S. Manning, *Biophysical journal* **2006**, 91, 3607–3616.
- [29] O. B. Bakajin, T. A. J. Duke, C. F. Chou, S. S. Chan, R. H. Austin, E. C. Cox, *Physical review letters* **1998**, 80, 2737–2740.
- [30] C. U. Murade, V. Subramaniam, C. Otto, M. L. Bennink, *Biophysical journal* **2009**, 97, 835–843.
- [31] K. Günther, M. Mertig, R. Seidel, *Nucleic acids research* **2010**, 38, 6526-6532.

- [32] N. Minc, J.-L. Viovy, K. Dorfman, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, DOI 10.1103/PhysRevLett.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, *The Journal of Fluid Mechanics* **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, *Physical review letters* **2000**, *84*, 4769-4772.
- [38] F. Brochard-Wyart, *EPL (Europhysics Letters)* **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*, DOI 10.1103/PhysRevLett.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, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **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

Figure 1: Fabrication of nanoposts arrays for hydrodynamic manipulation of DNA

(A-B-C-D) The four panels represent scanning electron micrographs of the different nanoposts 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_l throughout the manuscript.

Figure 2: 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 $x_l(0)$ (see Fig. 1E). 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 (G. C. Randall et Doyle 2006a), which was shown to accurately reproduce electrophoretic collisions at the micron scale. Note that the black curves were extracted based on the length of DNA during hydrodynamic-driven collisions ($L=12.2\pm0.7 \mu\text{m}$), which is slightly more extended than with electric actuation ($L=10.3\pm0.5 \mu\text{m}$). (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 plot as in (B) 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 μm .

Figure 3: DNA relaxation after collision

(A) The upper insets show fluorescence micrographs in the time course of the relaxation at two different migration speeds. The plot shows the relaxation time 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 vs. 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 code as in **(A)**.

Figure 4: Unhooking dynamics for different obstacle size

(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 $x_I(0)$, and for different obstacle size of 40 nm, 70 nm, 135 nm, and 240 nm (red, black, blue, and green datasets, respectively, and their corresponding single parameter fits using Eq. (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 $\sim 40 \mu\text{m s}^{-1}$, and we 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).

Figure 5: 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 $x_I(0)$, 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 Eq. (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 $Pe > \sim 10$.

Figure 6: 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 nanoposts. **(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.

Fig. 1

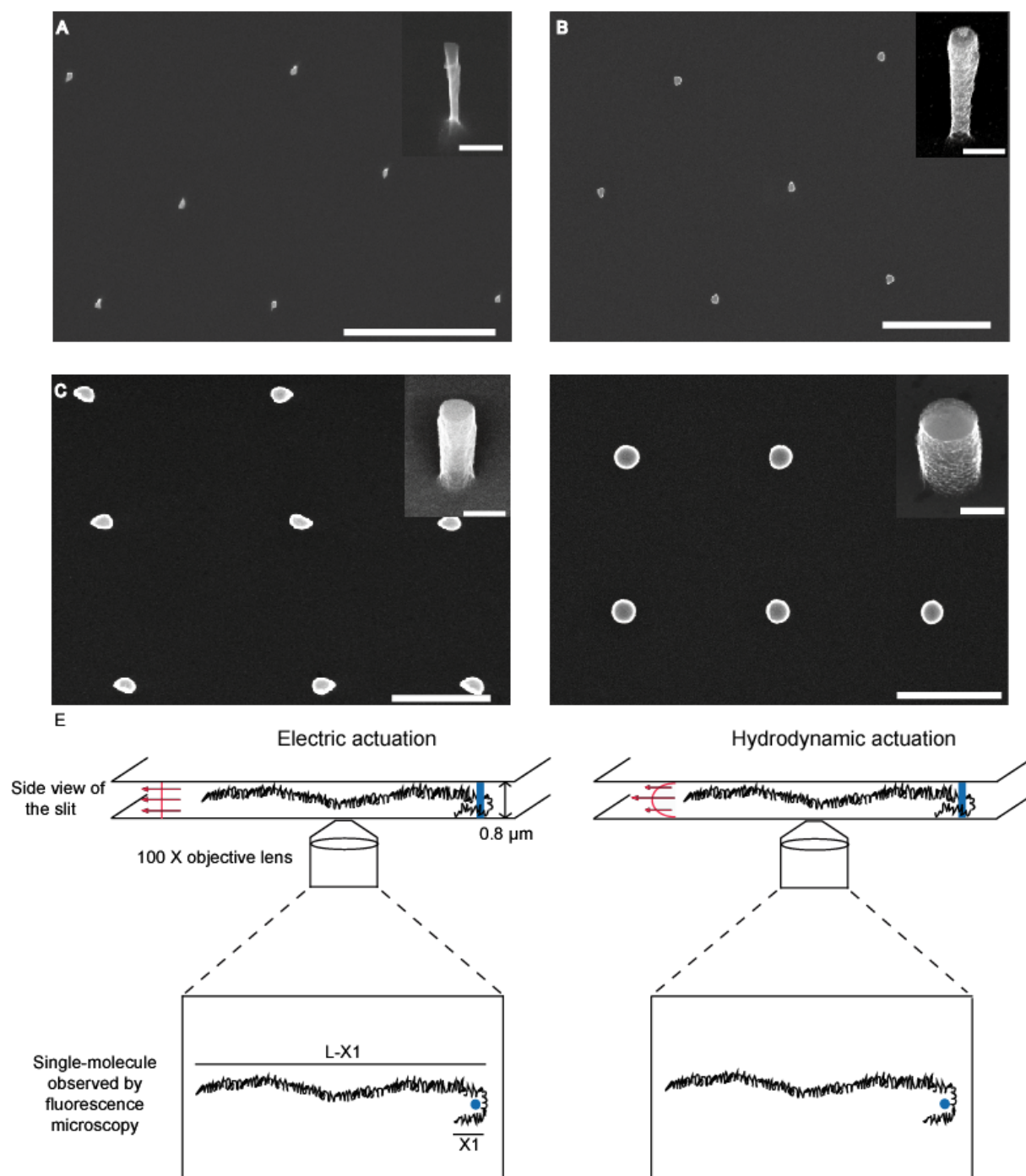


Fig. 2

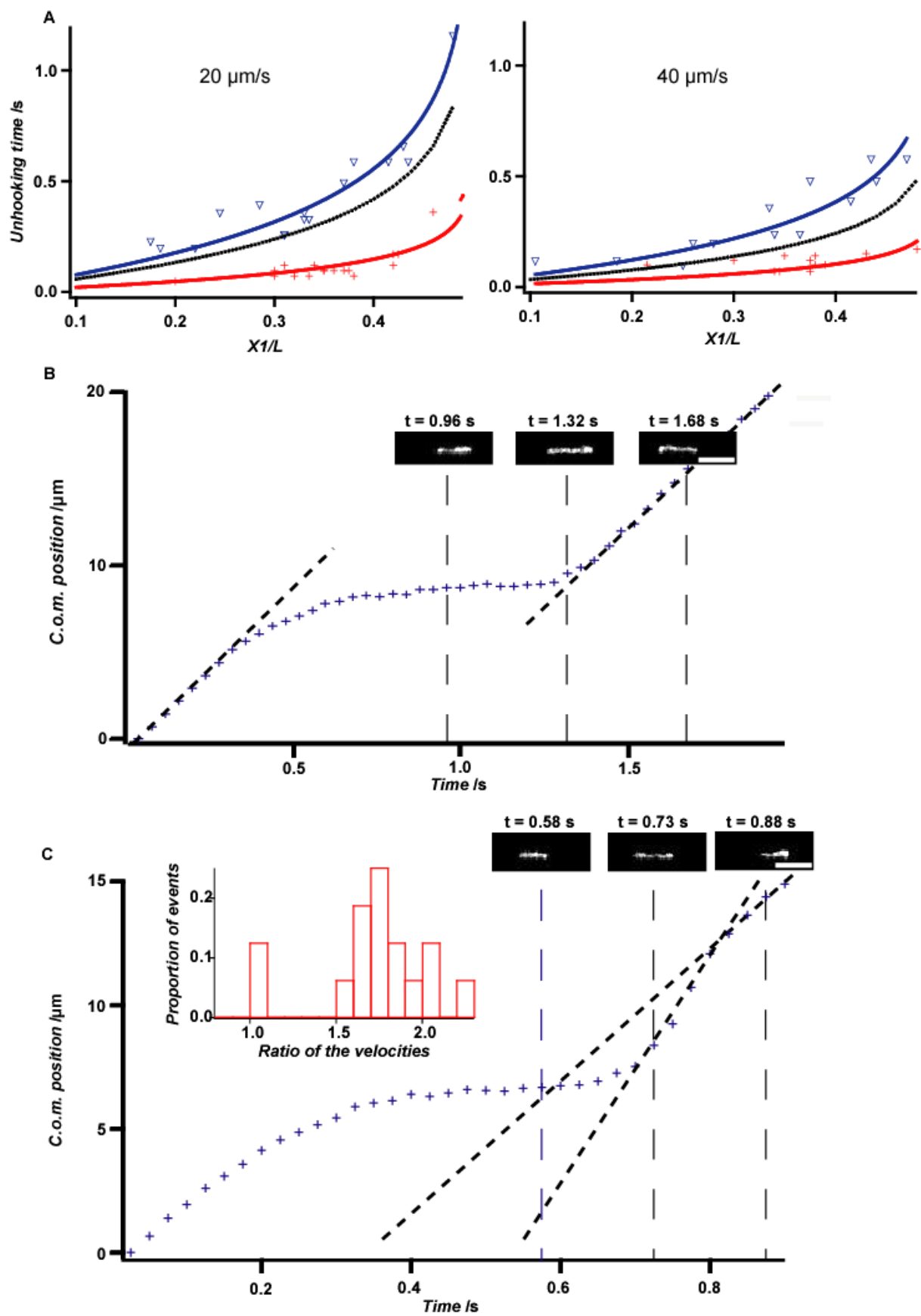


Fig. 3

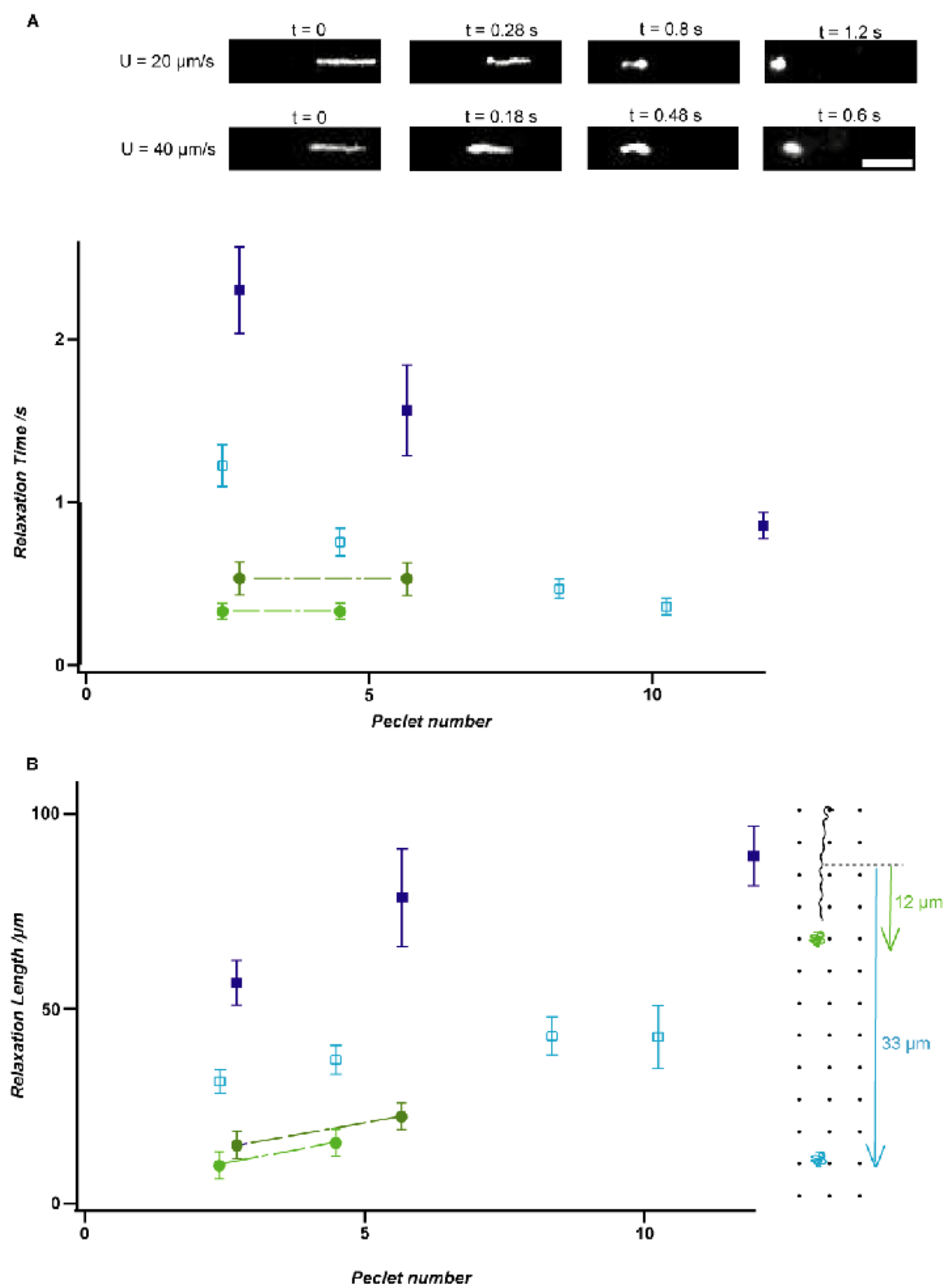
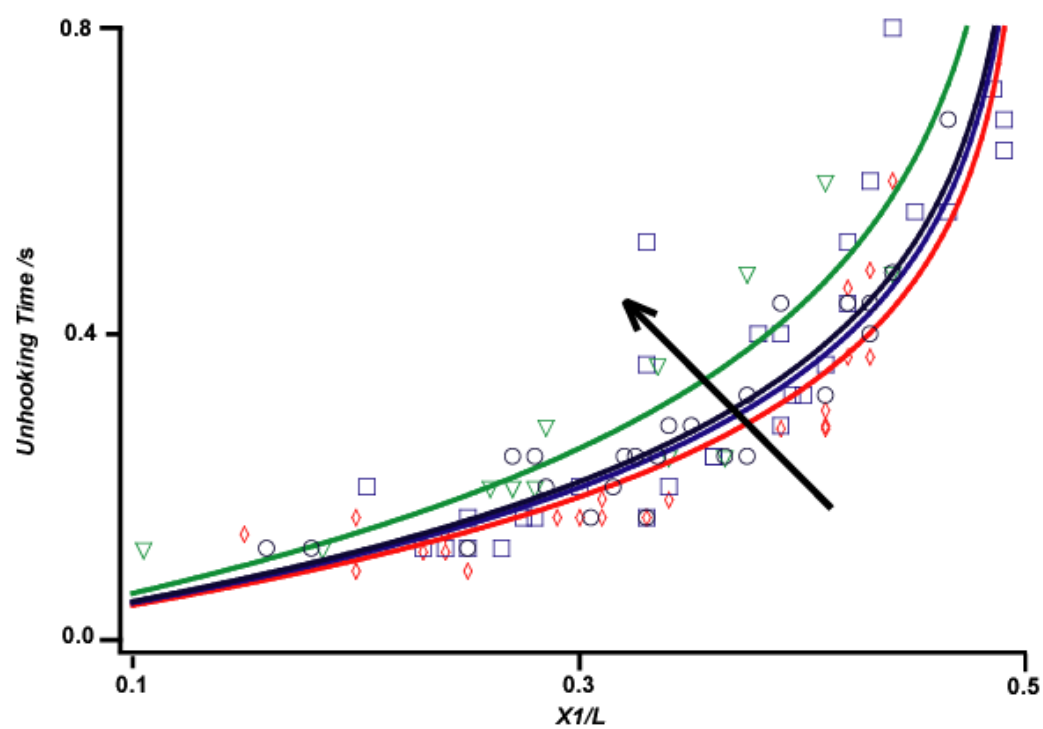


Fig. 4

A



B

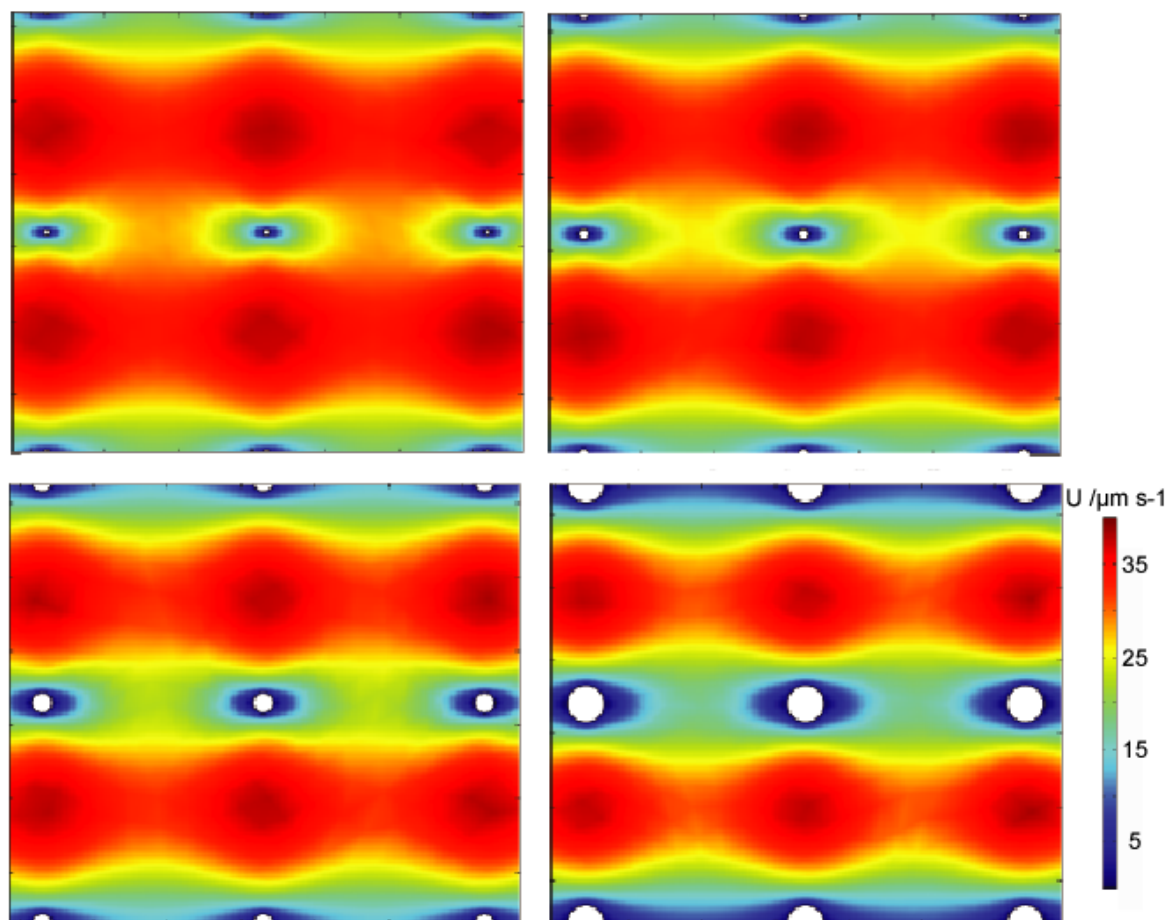


Fig.5

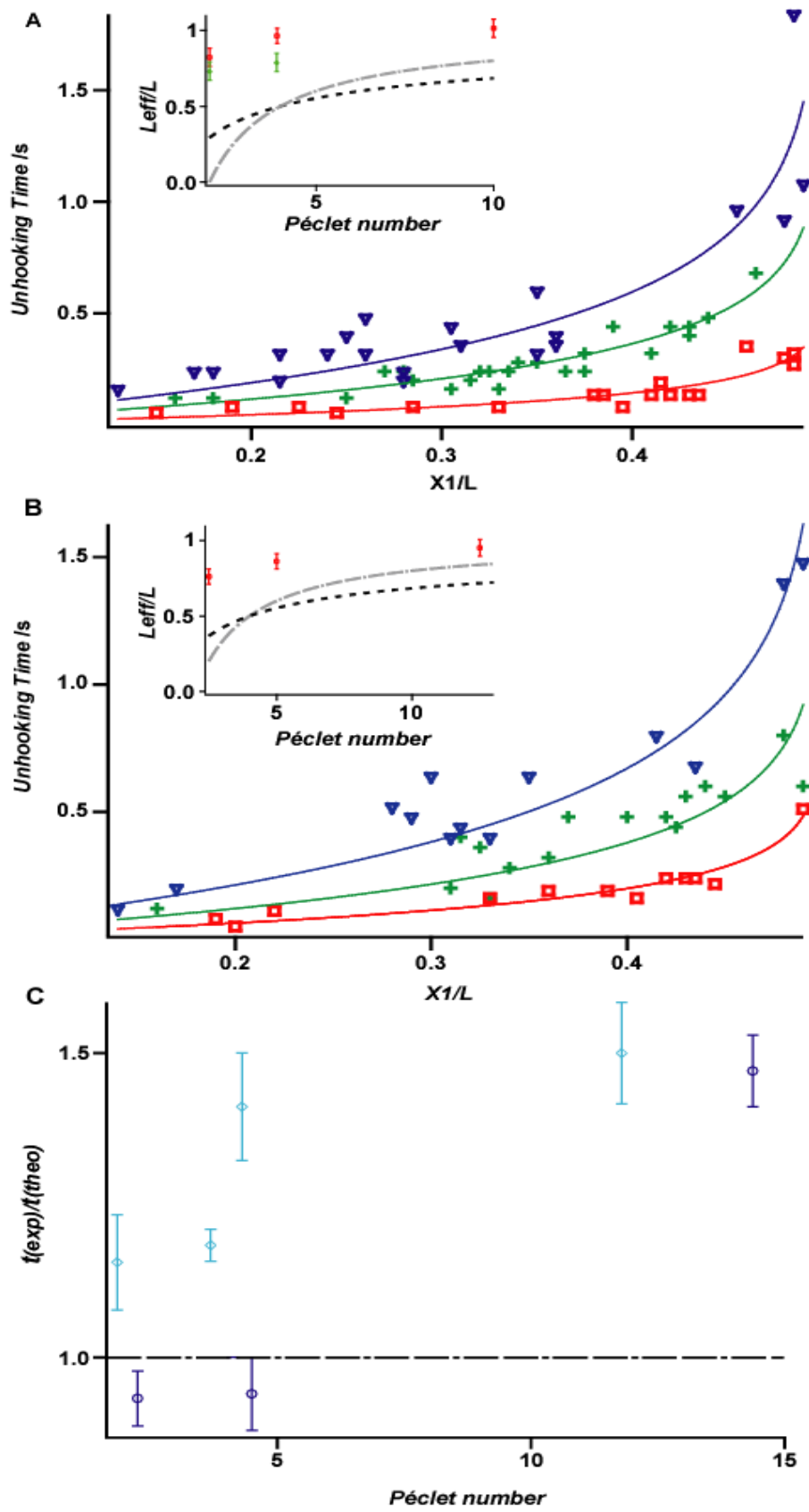
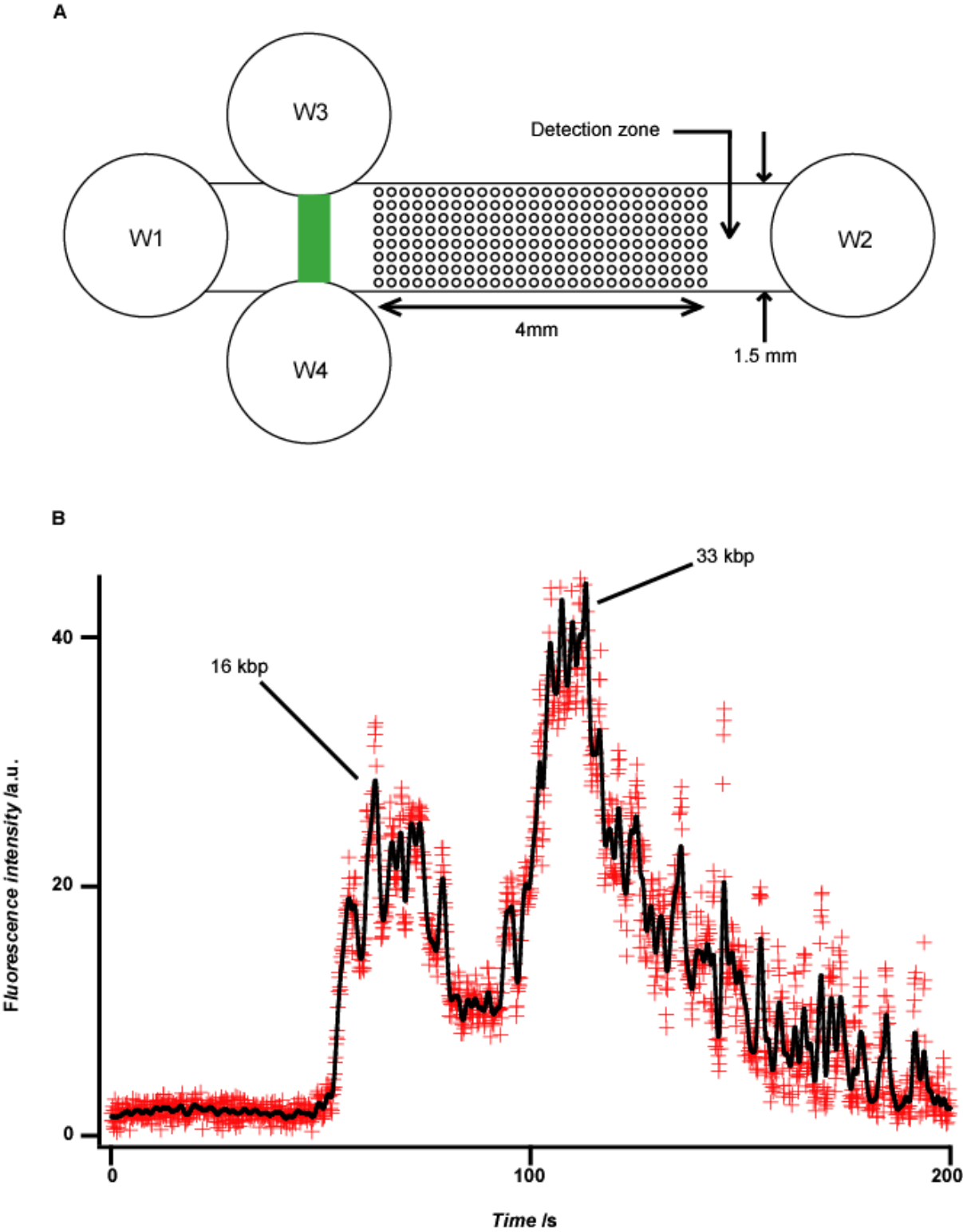


Fig. 6



Bibliography

- \AAkerman, B., et E. Tuite. 1996. « Single-and double-strand photocleavage of DNA by YO, YOYO and TOTO ». *Nucleic acids research* 24 (6): 1080.
- Abou-Shanab, R. A. I., J.-H. Hwang, Y. Cho, B. Min, et B.-H. Jeon. 2011. « Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as apotential source for biodiesel production ». *Applied Energy* 88: 3300-3306.
- Ajdari, Armand, Nathalie Bontoux, et Howard A. Stone. 2006. « Hydrodynamic Dispersion in Shallow Microchannels: the Effect of Cross-Sectional Shape ». *Analytical Chemistry* 78 (2) (janvier): 387-392. doi:10.1021/ac0508651.
- Albaugh, K. B. 1991. « Electrode Phenomena during Anodic Bonding of Silicon toSodium Borosilicate Glass ». *J. Eletrochem. Soc.* 138 (10): 3089.
- Araki, N., E.S. Aydil, et K.D. Dorfman. 2010. « Collision of a long DNA molecule with an isolated nanowire ». *Electrophoresis*.
- Arvanitidou, E., et D. Hoagland. 1991. « Chain-length dependence of the electrophoretic mobility in random gels ». *Physical review letters* 67 (11): 1464–1466.
- Bakajin, O. B., T. A. J. Duke, C. F. Chou, S. S. Chan, R. H. Austin, et E. C. Cox. 1998. « Electrohydrodynamic stretching of DNA in confined environments ». *Physical review letters* 80 (12): 2737–2740.
- Bakajin, OB, TAJ Duke, CF Chou, SS Chan, RH Austin, et EC Cox. 1998. « Electrohydrodynamic stretching of DNA in confined environments ». *Physical review letters* 80 (12): 2737–2740.
- Bakajin, Olgica, Thomas A. J. Duke, Jonas Tegenfeldt, Chia-Fu Chou, Shirley S. Chan, Robert H. Austin, et Edward C. Cox. 2001a. « Separation of 100-Kilobase DNA Molecules in 10 Seconds ». *Analytical Chemistry* 73 (décembre): 6053-6056. doi:10.1021/ac015527o.
- . 2001b. « Separation of 100-Kilobase DNA Molecules in 10 Seconds ». *Analytical Chemistry* 73 (24) (décembre): 6053-6056. doi:10.1021/ac015527o.
- Bancaud, Aurélien, Gaudeline Wagner, Kevin D. Dorfman, et Jean-Louis Viovy. 2005. « Measurement of the Surface Concentration for Bioassay Kinetics in Microchannels ». *Analytical Chemistry* 77 (3) (février): 833-839. doi:10.1021/ac048996+.
- Barbier, V., B.A. Buchholz, A.E. Barron, et J.L. Viovy. 2002. « Comb-like copolymers as self-coating, low-viscosity and high-resolution matrices for DNA sequencing ». *Electrophoresis* 23 (10): 1441.
- Barron, A. E., D. S. Soane, et H. W. Blanch. 1993. « Capillary electrophoresis of DNA in uncross-linked polymer solutions ». *Journal of Chromatography A* 652 (1): 3-16.
- Bartlett, R.C. 1963. « Rapid cellulose acetate electrophoresis: I. Serum proteins ». *Clinical Chemistry* 9 (3): 317.
- Batley, J., et D.A. Clayton. 1978. « The transcription map of mouse mitochondrial DNA ». *Cell* 14 (1): 143–156.
- Baumann, C.G., S.B. Smith, V.A. Bloomfield, et C. Bustamante. 1997. « Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (12): 6185.
- Becker, H., et C. Gärtner. 2000. « polymermicrofabrication methods for microfluidic analytical applications ». *Electrophoresis* 21: 12-26.
- Becker, Holger, et Claudia Gärtner. 2007. « Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (1) (novembre): 89-111. doi:10.1007/s00216-007-1692-2.
- Berk, A.J., et P.A. Sharp. 1977. « Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids ». *Cell* 12 (3): 721–732.
- Betzig, E., G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W.

- Davidson, J. Lippincott-Schwartz, et H.F. Hess. 2006. « Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution ». *Science* 313 (5793): 1642.
- Bode, H.-J. 1977. « The use of liquid polyacrylamide in electrophoresis: I. Mixed gels composed of agar-agar and liquid polyacrylamide ». *Analytical Biochemistry* 83 (1): 204-210.
- Braslavsky, I., B. Hebert, E. Kartalov, et S.R. Quake. 2003a. « Sequence information can be obtained from single DNA molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (7): 3960.
- . 2003b. « Sequence information can be obtained from single DNA molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (7): 3960.
- Brochard, F., et P. G. de Gennes. 1977. « Dynamics of confined polymer chains ». *The Journal of Chemical Physics* 67 (1): 52-56.
- Brochard-Wyart, F. 1995. « Polymer chains under strong flows: stems and flowers ». *EPL (Europhysics Letters)* 30: 387.
- Burlatsky, S., et J. Deutch. 1993. « Influence of Solid Friction on Polymer Relaxation in Gel Electrophoresis ». *Science* 260: 1782-1784.
- Cabodi, Mario, Stephen W. P. Turner, et Harold G. Craighead. 2002. « Entropic Recoil Separation of Long DNA Molecules ». *Analytical Chemistry* 74 (octobre): 5169-5174. doi:10.1021/ac025879a.
- Campbell, L. C., M. J. Wilkinson, A. Manz, P. Camilleri, et C. J. Humphreys. 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. See <http://www.rsc.org/suppdata/lc/b3/b312592k/> ». *Lab on a Chip* 4 (3): 225. doi:10.1039/b312592k.
- Cao, Han, Jonas O. Tegenfeldt, Robert H. Austin, et Stephen Y. Chou. 2002. « Gradient nanostructures for interfacing microfluidics and nanofluidics ». *Applied Physics Letters* 81 (16): 3058. doi:10.1063/1.1515115.
- Carle, G. F., et M. V. Olson. 1984. « Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gelelectrophoresis ». *Nucleic Acids Research* 12 (14): 5647-5664.
- Carle, G. F., M. Frank, et M. V. Olson. 1986. « Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field ». *Science* 232 (4746): 65-68.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, et D. C. Prasher. 1994. « Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression ». *Science* 263.
- Chan, Y. C., Y.-K. Lee, et Y. Zohar. 2006. « High-throughput design and fabrication of an integrated microsystem with high aspect-ratio sub-micron pillar arrays for free-solution micro capillary electrophoresis ». *Journal of micromechanics and microengineering* 16: 699-707.
- Chan, Y.C., Y.K. Lee, et Y. Zohar. 2006. « High-throughput design and fabrication of an integrated microsystem with high aspect-ratio sub-micron pillar arrays for free-solution micro capillary electrophoresis ». *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16: 699.
- Chan, Yick Chuen, Yitshak Zohar, et Yi-Kuen Lee. 2009. « Effects of embedded sub-micron pillar arrays in microfluidic channels on large DNA electrophoresis ». *ELECTROPHORESIS* 30 (septembre): 3242-3249. doi:10.1002/elps.200900127.
- Chhina, S. K., A. Bajwa, M. Rahbar, A. A. Kaleibar, P. C. H. Li, et M. Parameswaran. 2011. « Ultra-low-cost PMMA Microfluidic Device Fabrication and Electrophoretic Pinch Injection ». *Journal of Medical and Biological Engineering* 31 (2): 105-110.
- Cho, Jaeseol, Satish Kumar, et Kevin D. Dorfman. 2010. « Electrophoretic collision of a DNA molecule with a small elliptical obstacle ». *ELECTROPHORESIS* 31 (5) (mars): 860-867. doi:10.1002/elps.200900491.
- Chou, C.F., O. Bakajin, S.W.P. Turner, T.A.J. Duke, S.S. Chan, E.C. Cox, H.G. Craighead, et

- R.H. Austin. 1999. « Sorting by diffusion: An asymmetric obstacle course for continuous molecular separation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (24): 13762.
- Chou, S.Y., P.R. Krauss, et P.J. Renstrom. 1996. « Nanoimprint lithography ». *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* 14 (6): 4129–4133.
- Chou, Stephen Y., Peter R. Krauss, et Preston J. Renstrom. 1995. « Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers ». *Applied Physics Letters* 67 (21): 3114. doi:10.1063/1.114851.
- Chu, G., D. Vollrath, et R. W. Davis. 1986. « Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields ». *Science* 234 (4783): 1582-1585.
- Clark, S. M., B.W. Birren, E. Lai, et L. Hood. 1988. « A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogeneous electric fields ». *Science* 241 (4870): 1203-1205.
- Consden, R., AH Gordon, et AJP Martin. 1944. « Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper ». *Biochemical Journal* 38 (3): 224.
- Coons, A.H., et M.H. Kaplan. 1950. « Localization of antigen in tissue cells ». *The Journal of experimental medicine* 91 (1): 1.
- David H. Boal. 2002. *Mechanics of the Cell*. Cambridge University Press.
- Davidson, JN, et RMS Smellie. 1952. « Phosphorus compounds in the cell. 2. The separation by ionophoresis on paper of the constituent nucleotides of ribonucleic acid ». *Biochemical Journal* 52 (4): 594.
- Davis, B.J. 1964. « DISC ELECTROPHORESIS—II METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS* ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 121 (2): 404–427.
- Deniz, A.A., M. Dahan, J.R. Grunwell, T. Ha, A.E. Faulhaber, D.S. Chemla, S. Weiss, et P.G. Schultz. 1999. « Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Förster distance dependence and subpopulations ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (7): 3670.
- Destro-Bisol, G., et S.A. Santini. 1995. « Electrophoresis on cellulose acetate and cellogel: current status and perspectives ». *Journal of Chromatography A* 698 (1-2): 33–40.
- Deutsch, J. M., et T. L. Madden. 1989. « Theoretical studies of DNA during gel electrophoresis ». *J. Chem. Phys.* 90 (4): 2476-2485.
- Dorfman, Kevin. 2006. « DNA electrophoresis in microfluidic post arrays under moderate electric fields ». *Physical Review E* 73 (juin). doi:10.1103/PhysRevE.73.061922. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.73.061922>.
- . 2010. « DNA electrophoresis in microfabricated devices ». *Reviews of Modern Physics* 82 (4) (octobre): 2903-2947. doi:10.1103/RevModPhys.82.2903.
- Dovichi, N.J. 1997. « DNA sequencing by capillary electrophoresis ». *Electrophoresis* 18 (12-13): 2393–2399.
- Doyle, P. S., B. Ladoux, et J. L. Viovy. 2000. « Dynamics of a tethered polymer in shear flow ». *Physical review letters* 84 (20): 4769–4772.
- Doyle, P. S., E. S. G. Shaqfeh, et A. P. Gast. 1997. « Dynamic simulation of freely draining flexible polymers in steady linear flows ». *J. Fluid Mech.* 334: 251-291.
- Doyle, P.S., J. Bibette, A. Bancaud, et J.L. Viovy. 2002a. « Self-assembled magnetic matrices for DNA separation chips ». *Science* 295 (5563): 2237.
- . 2002b. « Self-assembled magnetic matrices for DNA separation chips ». *Science* 295 (5563): 2237.
- Doyle, P.S., B. Ladoux, et J.L. Viovy. 2000. « Dynamics of a tethered polymer in shear flow ». *Physical review letters* 84 (20): 4769–4772.
- Duffy, D. C., J. C. McDonald, J. A. Schueller, et G. M. Whitesides. 1998. « Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane) ». *Analytical Chemistry* 70: 4974-4984.

- Duke, T.A.J., R.H. Austin, E.C. Cox, et S.S. Chan. 1996. « Pulsed-field electrophoresis in microlithographic arrays ». *Electrophoresis* 17 (6): 1075–1079.
- Duke, TAJ, et RH Austin. 1998a. « Microfabricated sieve for the continuous sorting of macromolecules ». *Physical review letters* 80 (7): 1552–1555.
- . 1998b. « Microfabricated sieve for the continuous sorting of macromolecules ». *Physical review letters* 80 (7): 1552–1555.
- Edman, L., U. Mets, et R. Rigler. 1996. « Conformational transitions monitored for single molecules in solution ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (13): 6710.
- Edwards, SF. 1967. « The statistical mechanics of polymerized material ». *Proceedings of the Physical Society* 92: 9.
- Evered, D F. 1959. « Ionophoresis of acidic and basic amino acids on filter paper using low voltages ». *Biochim. Biophys. Acta* 36: 14.
- Flint, J. 1977. « The topography and transcription of the adenovirus genome. » *Cell* 10: 153-166.
- Flory, P. J., et M. Volkenstein. 1969. « Statistical mechanics of chain molecules ». *Biopolymers* 8 (5): 699-700.
- Fontana, R. E., J. Katine, M. Rooks, R. Viswanathan, J. Lille, S. MacDonald, E. Kratschmer, et al. 2002. « E-beam writing: a next-generation lithography approach for thin-film head critical features ». *Magnetics, IEEE Transactions on* 38 (1): 95–100.
- Frigault, M. M., J. Lacoste, J. L. Swift, et C. M. Brown. 2009. « Live-cell microscopy – tips and tools ». *Journal of Cell Science* 122: 753-767.
- Gaertner, C., H. Becker, B. Anton, A. P. O’Neil, et O. Roetting. 2003. « Polymer based microfluidic devices: examples for fluidic interfaces and standardization concepts ». *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems* 4982: 99-104.
- Garbers, D. L. 1979. « Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. » *The Journal of Biological Chemistry* 254: 240-243.
- Gardiner, K. 1991. « Pulsed field gel electrophoresis ». *Analytical chemistry* 63 (7): 658–665.
- de Gennes, P. G. 1971. « Reptation of a Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles ». *Journal of Chemical Physics* 55 (2): 572-589.
- de Gennes, P.G. 1979. « Effect of cross-links on a mixture of polymers ». *Journal de Physique Lettres* 40: 69-72. doi:10.1051/jphyslet:0197900400406900.
- Gibson, D. G., J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R.-Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, et al. 2010. « Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome ». *Science* 329 (mai 20): 52-56. doi:10.1126/science.1190719.
- Gilroy, T. E., et C. A. Thomas Jr. 1983. « The analysis of some new Drosophila repetitive DNA sequences isolated and cloned from two-dimensional agarose gels ». *Gene* 23 (1): 41-51.
- Gingell, D., OS Heavens, et JS Mellor. 1987. « General electromagnetic theory of total internal reflection fluorescence: the quantitative basis for mapping cell-substratum topography ». *Journal of cell science* 87 (5): 677.
- Goering, R.V. 2010. « Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease ». *Infection, Genetics and Evolution*.
- Goetzinger, W., L. Kotler, E. Carrilho, M.C. Ruiz-Martinez, O. Salas-Solano, et B.L. Karger. 1998. « Characterization of high molecular mass linear polyacrylamide powder prepared by emulsion polymerization as a replaceable polymer matrix for DNA sequencing by capillary electrophoresis ». *Electrophoresis* 19 (2): 242–248.
- Goldberg, D.A. 1980. « Isolation and partial characterization of the Drosophila alcoholdehydrogenase gene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (10): 5794-5798.

- Goodwin, S. B., R. E. Schneider, et W. E. Fry. 1995. « Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans* ». *Plant Disease* 79: 1181-1185.
- Gould, H. 1966. « The Specific Cleavage of Ribonucleic Acid from Reticulocyte Ribosomal Subunits ». *Biochemistry* 5 (3): 1103–1108.
- Grabar, P., et C. A. Williams. 1953. « Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin ». *Biochim. Biophys. Acta* 10: 193.
- Günther, K., M. Mertig, et R. Seidel. 2010. « Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA ». *Nucleic acids research* 38 (19): 6526-6532.
- Guttman, A. Capillary electrophoresis using replaceable gels.
- Ha, T. 2001. « Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer ». *Methods* 25: 78-86.
- Ha, T., T. Enderle, DF Ogletree, DS Chemla, PR Selvin, et S. Weiss. 1996. « Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (13): 6264.
- Haglund, H., et A. Tiselius. 1950. « Zone Electrophoresis in a Glass Powder Column ». *Acta Chemica Scandinavica* 4: 957-962.
- Hales, C. N., et P. J. Randle. 1963. « Immunoassay of Insulin with Insulin-Antibody Precipitate ». *Biochem. J.* 88: 137.
- Hammond, HA, L. Jin, CT Caskey, et R. Chakraborty. 1994. « Evaluation of 13 Short Tandem Repeat Loci for Use in Personal Identification Applications ». *American journal of human genetics* 55 (1): 190.
- Hammond, R.W., H. Oana, J.J. Schwinefus, J. Bonadio, R.J. Levy, et M.D. Morris. 1997. « Capillary electrophoresis of supercoiled and linear DNA in dilute hydroxyethyl cellulose solution ». *Analytical chemistry* 69 (6): 1192–1196.
- Han, J., et H.G. Craighead. 2000. « Separation of Long DNA Molecules in a Microfabricated Entropic Trap Array ». *Science* 288 (5468): 1026-1029.
- Han, J., SW Turner, et HG Craighead. 1999. « Entropic trapping and escape of long DNA molecules at submicron size constriction ». *Physical review letters* 83 (8): 1688–1691.
- Harada, F., RC Sawyer, et JE Dahlberg. 1975. « A primer ribonucleic acid for initiation of in vitro Rous sarcoma virus deoxyribonucleic acid synthesis. » *Journal of Biological Chemistry* 250 (9): 3487.
- Hardy, WB. 1905. « Colloidal Solution. The Globulins. » *The Journal of Physiology* 30 (4-5): 251-337.
- Hardy, WB, et WCD Whetham. 1899. « On the coagulation of proteid by electricity ». *The Journal of Physiology* 24 (3-4): 288.
- Harley, E. H., et J. S. White. 1972. « THE RESOLUTION OF POLYOMA DNABY POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS ». *FEBS LETTERS April* 22 (1): 41-45.
- Harris, T. D., P. R. Buzby, H. Babcock, E. Beer, J. Bowers, I. Braslavsky, M. Causey, et al. 2008. « Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome ». *Science* 320 (avril 4): 106-109. doi:10.1126/science.1150427.
- Heim, R., D.C. Prasher, et R.Y. Tsien. 1994. « Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (26): 12501.
- Heller, C., S. Magnusdottir, et J.-L. Viovy. 2001. « Robust Field Inversion Capillary Electrophoretic Separation of Long DNA Fragments ». *Methods in Molecular Biology* 162: 293-305.
- Henriques, R., et M.M. Mhlanga. 2009. « PALM and STORM: What hides beyond the

Rayleigh limit? » *Biotechnology journal* 4 (6): 846–857.

Hesjedal, T., et W. Seidel. 2003. « Near-field elastomeric mask photolithography fabrication of high-frequency surface acoustic wave transducers ». *Nanotechnology* 14: 91.

Hess, S. T., T. P. K. Girirajan, et M. D. Mason. 2006. « Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy ». *Biophysical Journal* 91: 4258-4272.

Hjertén, S. 1963. « “Molecular-sieve” electrophoresis in cross-linked polyacrylamide gels ». *Journal of Chromatography A* 11: 66-70.

Holleran, Sean P., et Ronald G. Larson. 2008. « Multiple Regimes of Collision of an Electrophoretically Translating Polymer Chain against a Thin Post ». *Macromolecules* 41 (13) (juillet): 5042-5054. doi:10.1021/ma0712596.

Hubert, S. J., G. W. Slater, et J.-L. Viovy. 1996. « Theory of Capillary Electrophoretic Separation of DNA Using Ultradilute Polymer Solutions ». *macromolecules* 29 (3): 1006-1009.

Huh, Dongeun, K. L. Mills, Xiaoyue Zhu, Mark A. Burns, M. D. Thouless, et Shuichi Takayama. 2007. « Tuneable elastomeric nanochannels for nanofluidic manipulation ». *Nature Materials* 6 (6) (mai): 424-428. doi:10.1038/nmat1907.

Ingram, V. M. 1958. « Abnormal human haemoglobins: I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by “fingerprinting” » 28. *Biochim. Biophys. Acta*: 539-545.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. « Finishing the euchromatic sequence of the human genome ». *Nature* 431: 931-945.

Jaqaman, K., D. Loeke, M. Mettlen, H. Kuwata, S. Grinstein, S.L. Schmid, et G. Danuser. 2008. « Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences ». *Nature methods* 5 (8): 695–702.

Jeong, Yongwon, Songyi Kim, Kukjin Chun, Junkeun Chang, et Doo Soo Chung. 2001. « Methodology for miniaturized CE and insulation on a silicon substrate ». *Lab on a Chip* 1 (2): 143. doi:10.1039/b103796j.

Jeppesen, P. G. N. 1980. « Separation and Isolation of DNA Fragments using Linear Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis ». *Methods in Enzymology* 65: 305-319.

Jo, K., D. M Dhingra, T. Odijk, J. J De Pablo, M. D Graham, R. Runnheim, D. Forrest, et D. C Schwartz. 2007. « A single-molecule barcoding system using nanoslits for DNA analysis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (8): 2673.

Jones, E. P., et E. Chi. 1997. « DNA isolation in agarose plugs for sizing and characterization of bacterial artificial chromosome (BAC) clones ». *Technical Tips Online* 2: 174-176.

Jorgenson, J.W., et K.D.A. Lukacs. 1981. « Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries ». *Analytical Chemistry* 53 (8): 1298–1302.

Joswiak, M., J. Ou, et K. Dorfman. en cours de publication. « Statistical Properties of the Electrophoretic Collision of a Long DNA Molecule with a Small Obstacle ». *Electrophoresis* ———. 2011. « Statistical Properties of the Electrophoretic Collision of a Long DNA Molecule with a Small Obstacle ». *Electrophoresis*.

Kaji, Noritada, Yojiro Tezuka, Yuzuru Takamura, Masanori Ueda, Takahiro Nishimoto, Hiroaki Nakanishi, Yasuhiro Horiike, et Yoshinobu Baba. 2004a. « Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chips under a Direct Current Electric Field ». *Analytical Chemistry* 76 (1) (janvier): 15-22. doi:10.1021/ac030303m.

———. 2004b. « Separation of long DNA molecules by quartz nanopillar chips under a direct current electric field ». *Analytical Chemistry* 76 (1) (janvier 1): 15-22. doi:10.1021/ac030303m.

Kalaidzidis, Y. 2007. « Intracellular objects tracking ». *European journal of cell biology* 86 (9): 569–578.

Kaplan, B. 1998. « Application of polyacrylamide slab gel electrophoresis to the analysis and small-scale purification of amyloid proteins ». *Analytica Chimica Acta* 372: 161-172.

- Karger, B.L., et A. Guttman. 2009. « DNA sequencing by CE ». *Electrophoresis* 30 (S1): S196–S202.
- Kasper, T. J., M. Melera, P. Gozel, et R. G. Brownlee. 1988. « Separation and detection of DNA by capillary electrophoresis. » *J Chromatogr* 458: 303-312.
- Kendall, J., et ED Crittenden. 1923. « The separation of isotopes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 9 (3): 75.
- Kenward, M., et G. W. Slater. 2006a. « Molecular-dynamics simulations with explicit hydrodynamics II: On the collision of polymers with molecular obstacles ». *The European Physical Journal E* 20 (2) (juin): 125-141. doi:10.1140/epje/i2006-10008-2.
- . 2006b. « Molecular-dynamics simulations with explicit hydrodynamics II: On the collision of polymers with molecular obstacles ». *The European Physical Journal E* 20 (juin 16): 125-141. doi:10.1140/epje/i2006-10008-2.
- Kim, Y., et M.D. Morris. 1994. « Pulsed field capillary electrophoresis of multikilobase length nucleic acids in dilute methyl cellulose solutions ». *Analytical chemistry* 66 (19): 3081–3085.
- . 1995. « Rapid pulsed field capillary electrophoretic separation of megabase nucleic acids ». *Analytical chemistry* 67 (5): 784–786.
- Klobusitzky, D, et P König. 1939. « Biochemical study of snake venom from the genus Bothrops ». *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. Naunyn-Schmiedeberg* 192: 271.
- Kohn, J. 1957. « A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis ». *Clinica Chimica Acta* 2 (4): 297-303.
- Krieg, PA, et DA Melton. 1984. « Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs ». *Nucleic Acids Research* 12 (18): 7057.
- Kumar, A., et G. M. Whitesides. 1993. « Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching ». *Applied Physics Letters* 63 (14): 2002-2004.
- Laemmli, U. K. 1970. « Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 ». *Nature* 227: 680-685.
- Lanyon, J. P., et R. Williamson. 1968. « The Fractionation of Ribonucleic Acid on a Preparative Scale by Polyacrylamide Gel Electrophoresis ». *FEBS letters* 1 (5): 279-282.
- Larson, Jonathan W., Gregory R. Yantz, Qun Zhong, Rebecca Charnas, Christina M. D’Antoni, Michael V. Gallo, Kimberly A. Gillis, et al. 2006. « Single DNA molecule stretching in sudden mixed shear and elongational microflows ». *Lab on a Chip* 6: 1187. doi:10.1039/b602845d.
- LeDuc, P., C. Haber, G. Bao, et D. Wirtz. 1999. « Dynamics of individual flexible polymers in a shear flow ». *Nature* 399: 564-566.
- Lee, J.B., K. Hayashi, M. Hashimoto, T. Nakano, et T. Hayashi. 2004. « Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu) ». *Chemical & pharmaceutical bulletin* 52 (9): 1091–1094.
- Lehrach, H., D. Diamond, J.M. Wozney, et H. Boedtker. 1977. « RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination ». *Biochemistry* 16 (21): 4743–4751.
- Lerman, L. S., et H. L. Frisch. 1982. « Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? » *Biopolymers* 21 (5): 995-997.
- Liu, K.J., T.D. Rane, Y. Zhang, et T.H. Wang. 2011. « Single-Molecule Analysis Enables Free Solution Hydrodynamic Separation Using Yoctomole Levels of DNA ». *Journal of the American Chemical Society*.
- Long, D., J. L Viovy, et A. Ajdari. 1996. « Simultaneous action of electric fields and nonelectric forces on a polyelectrolyte: Motion and deformation ». *Physical review letters* 76

(20): 3858–3861.

Lu, H. P. 1998. « Single-Molecule Enzymatic Dynamics ». *Science* 282 (décembre 4): 1877–1882. doi:10.1126/science.282.5395.1877.

Lumpkin, O. J., et B. H. Zimm. 1982. « Mobility of DNA in gel electrophoresis ». *Biopolymers* 21 (11): 2315–2316.

Lyssenko, V., A. Jonsson, P. Almgren, N. Pulizzi, B. Isomaa, T. Tuomi, G. Berglund, D. Altshuler, P. Nilsson, et L. Groop. 2008. « Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes ». *New England Journal of Medicine* 359 (21): 2220–2232.

Manning, G. S. 2006. « The persistence length of DNA is reached from the persistence length of its null isomer through an internal electrostatic stretching force ». *Biophysical journal* 91 (10): 3607–3616.

Mannion, J. T., C. H. Reccius, J. D. Cross, et H. G. Craighead. 2006. « Conformational analysis of single DNA molecules undergoing entropically induced motion in nanochannels ». *Biophysical journal* 90 (12): 4538–4545.

Manz, A., N. Graber, et H. M. Widmer. 1990. « Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 1: 244–248.

Manz, A., D. J. Harrison, H. Lüdi, et H. M. Widmer. 1992. « Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip ». *Journal of Chromatography A* 593: 253–258.

Mao, Pan. 2006. *Fabrication and Characterization of Nanofluidic Channels for Studying Molecular Dynamics in Confined Environments*. Massachusetts Institute of Technology, avril.

Markham, R., et J. D. Smith. 1952. « The Structure of Ribonucleic Acids ». *Biochem. J.* 52: 552.

Martinez, A.W., S.T. Phillips, B.J. Wiley, M. Gupta, et G.M. Whitesides. 2008. « FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices ». *Lab Chip* 8 (12): 2146–2150.

Masubuchi, Y., H. Oana, M. Akiyama, M. Matsumoto, et M. Doi. 1995. « Dynamics of a DNA Molecule Hanging over an Obstacle in Gel Electrophoresis ». *Journal of the Physical Society of Japan* 64 (4): 1412–1420.

Mathies, R. A., et X. C. Huang. 1992. « Capillary array electrophoresis : an approach to high-speed, high-throughput DNA sequencing ». *Nature* 359 (6391): 167–169.

Matthews, C., et C. Favard. 2007. « Theory, principles and applications of fluorescent technologies in cellular biology and cancer research ». *Bulletin du Cancer* 94 (1): 115–25.

Mawatari, Kazuma, Takehiko Tsukahara, Yasuhiko Sugii, et Takehiko Kitamori. 2010. « Extended-nano fluidic systems for analytical and chemical technologies ». *Nanoscale* 2 (9): 1588. doi:10.1039/c0nr00185f.

Maxam, A.M., et W. Gilbert. 1977. « A new method for sequencing DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (2): 560.

McDonald, J.C., D. C. Duffy, H. Wu, O.J.A. Schueller, et G.M. Whitesides. 2000. « Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane) ». *Electrophoresis* 21: 27–40.

McPhie, P., J. Hounsell, et WB Gratzer. 1966. « The Specific Cleavage of Yeast Ribosomal Ribonucleic Acid with Nucleases ». *Biochemistry* 5 (3): 988–993.

Mebrahtu, Y. B., P. G. Lawyer, D. Koech, P. V. Perkins, C. R. Roberts, J. B. Were, et L. D. Hendricks. 1992. « Biochemical Characterization and Zymodeme Classification of Leishmania Isolates from Patients, Vectors, and Reservoir Hosts in Kenya ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47: 852–892.

Michaelis, L. 1909. « Electric transfer of fermentation I. The invertin. » *Biochemische Zeitschrift* 16: 81–86.

- Minc, N., P. Bokov, K. B. Zeldovich, C. Fütterer, J. L. Viovy, et K. D. Dorfman. 2005. « Motion of single long DNA molecules through arrays of magnetic columns ». *Electrophoresis* 26 (2): 362–375.
- Minc, N., P. Bokov, K.B. Zeldovich, C. Fütterer, J.L. Viovy, et K.D. Dorfman. 2005. « Motion of single long DNA molecules through arrays of magnetic columns ». *Electrophoresis* 26 (2): 362–375.
- Minc, N., C. Fütterer, K.D. Dorfman, A. Bancaud, C. Gosse, C. Goubault, et J.L. Viovy. 2004. « Quantitative microfluidic separation of DNA in self-assembled magnetic matrixes ». *Analytical chemistry* 76 (13): 3770–3776.
- Minc, Nicolas, Jean-Louis Viovy, et Kevin Dorfman. 2005. « Non-Markovian Transport of DNA in Microfluidic Post Arrays ». *Physical Review Letters* 94 (19) (mai). doi:10.1103/PhysRevLett.94.198105. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.94.198105>.
- Mitnik, L., L. Salomé, J. L. Viovy, et C. Heller. 1995. « Systematic study of field and concentration effects in capillary electrophoresis of DNA in polymer solutions ». *Journal of Chromatography A* 710 (2): 309–321.
- Mohan, Aruna, et Patrick S. Doyle. 2007. « Stochastic Modeling and Simulation of DNA Electrophoretic Separation in a Microfluidic Obstacle Array ». *Macromolecules* 40 (24) (novembre): 8794–8806. doi:10.1021/ma071354e.
- Mujico, J. R., M. Lombardia, M. Carmen Mena, E. Méndez, et J. P. Albar. 2011. « A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients ». *Food Chemistry* 128: 795–801.
- Mülsch, A., et R. Gerzer. 1991. « Preparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis Apparatus for Purification of Guanylyl Cyclase ». *Methods in Enzymology* 195: 355–363.
- Murade, C. U., V. Subramaniam, C. Otto, et M. L. Bennink. 2009. « Interaction of oxazole yellow dyes with DNA studied with hybrid optical tweezers and fluorescence microscopy ». *Biophysical journal* 97 (3): 835–843.
- Murat, M., et G. S. Grest. 1989. « Structure of a grafted polymer brush: A molecular dynamics simulation ». *Macromolecules* 22 (10): 4054–4059.
- Ng, J. M. K., I. Gitlin, A. D. Stroock, et G. M. Whitesides. 2002. « Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems ». *Electrophoresis* 23: 3461–3473.
- Nie, S., D. T. Chiu, et R. N. Zare. 1995. « Research Article Real-Time Detection of Single Molecules in Solution by Confocal Fluorescence Microscopy ». *Analytical Chemistry* 67 (17): 2849–2857.
- Nie, S., et R.N. Zare. 1997. « Optical detection of single molecules ». *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 26 (1): 567–596.
- Nixon, G. I., et G. W. Slater. 1994. « DNA electrophoretic collisions with single obstacles ». *Physical Review E* 50 (6): 5033–5039.
- Norton, I. T., D. M. Goodall, K. R. J. Austen, E. R. Morris, et D. A. Rees. 1986. « Dynamics of molecular organization in agarose sulphate ». *Biopolymers* 25 (6): 1009–1029.
- Odom, T. W., V. R. Thalladi, J. C. Love, et G. M. Whitesides. 2002. « Generation of 30- 50 nm Structures Using Easily Fabricated, Composite PDMS Masks ». *J. Am. Chem. Soc* 124 (41): 12112–12113.
- Ogawa, R., H. Ogawa, A. Oki, S. Hashioka, et Y. Horiike. 2007a. « Fabrication of nano-pillar chips by a plasma etching technique for fast DNA separation ». *Thin Solid Films* 515 (12): 5167–5171.
- . 2007b. « Fabrication of nano-pillar chips by a plasma etching technique for fast DNA separation ». *Thin Solid Films* 515 (12): 5167–5171.
- Olivera, B.M., P. Baine, et N. Davidson. 1964. « Electrophoresis of the nucleic acids ». *Biopolymers* 2 (3): 245–257.
- Olson, Daniel W., Sarit Dutta, Nabil Laachi, Mingwei Tian, et Kevin D. Dorfman. 2011.

- « Continuous-time random walk models of DNA electrophoresis in a post array: Part II. Mobility and sources of band broadening ». *ELECTROPHORESIS* 32 (5) (février): 581-587. doi:10.1002/elps.201000467.
- Olson, Daniel W., Jia Ou, Mingwei Tian, et Kevin D. Dorfman. 2011a. « Continuous-time random walk models of DNA electrophoresis in a post array: Part I. Evaluation of existing models ». *ELECTROPHORESIS* 32 (février): 573-580. doi:10.1002/elps.201000466.
- . 2011b. « Continuous-time random walk models of DNA electrophoresis in a post array: Part I. Evaluation of existing models ». *ELECTROPHORESIS* 32 (5) (février): 573-580. doi:10.1002/elps.201000466.
- Orbach, M. J., D. Vollrath, R. W. Davis, et C. Yanofsky. 1988. « An Electrophoretic Karyotype of *Neurospora crassa* ». *Molecular and Cellular Biology* 8 (4): 1469-1473.
- Ou, Jia, Jaeseol Cho, Daniel Olson, et Kevin Dorfman. 2009a. « DNA electrophoresis in a sparse ordered post array ». *Physical Review E* 79 (juin). doi:10.1103/PhysRevE.79.061904. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.79.061904>.
- . 2009b. « DNA electrophoresis in a sparse ordered post array ». *Physical Review E* 79 (6) (juin). doi:10.1103/PhysRevE.79.061904. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.79.061904>.
- Ou, Jia, Mark N. Joswiak, Samuel J. Carpenter, et Kevin D. Dorfman. 2011a. « Plasma thinned nanopost arrays for DNA electrophoresis ». *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 29 (1): 011025. doi:10.1116/1.3531693.
- . 2011b. « Plasma thinned nanopost arrays for DNA electrophoresis ». *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 29 (1): 011025. doi:10.1116/1.3531693.
- Park, S., Y. S. Huh, H. G. Craighead, et D. Erickson. 2009. « A method for nanofluidic device prototyping using elastomeric collapse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (37): 15549.
- Patel, Prateek D., et Eric S. G. Shaqfeh. 2003. « A computational study of DNA separations in sparse disordered and periodic arrays of posts ». *The Journal of Chemical Physics* 118: 2941. doi:10.1063/1.1532729.
- Pawley, J. 1995. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2^e éd. Springer.
- Perkins, T. T., S. R. Quake, D. E. Smith, et S. Chu. 1994. « Relaxation of a Single DNA Molecule Observed by Optical Microscopy ». *Science* 264 (5160): 822-826.
- Perkins, TT, DE Smith, RG Larson, et S Chu. 1995. « Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow ». *Science* 268 (5207): 83-87.
- Persson, F., P. Bingen, T. Staudt, J. Engelhardt, J. O. Tegenfeldt, et Stefan W. Hell. 2011. « Fluorescence Nanoscopy of Single DNA Molecules by Using Stimulated Emission Depletion (STED) ». *Angewandte Chemie International Edition* 50 (juin 6): 5581-5583. doi:10.1002/anie.201100371.
- Pielesz, A., et W. Binias. 2010. « Cellulose acetate membrane electrophoresis and FTIR spectroscopy as methods of identifying a fucoidan in *Fucus vesiculosus* Linnaeus ». *Carbohydrate research*.
- Piruska, Aigars, Maojun Gong, Jonathan V. Sweedler, et Paul W. Bohn. 2010. « Nanofluidics in chemical analysis ». *Chemical Society Reviews* 39 (3): 1060. doi:10.1039/b900409m.
- Popelka, S., Z. Kabatek, J. L. Viovy, et B. Gas. 1999a. « Peak dispersion due to geometration motion in gel electrophoresis of macromolecules ». *Journal of Chromatography A* 838 (1-2): 45-53.
- Popelka, S., Z. Kabatek, J.L. Viovy, et B. Gas. 1999b. « Peak dispersion due to geometration motion in gel electrophoresis of macromolecules ». *Journal of Chromatography A* 838 (1-2): 45-53.
- Porath, J., et P. Flodin. 1959. « Gel Filtration: A Method for Desalting and Group

Separation ». *Nature* 183 (4676): 1657-1659.

Probst, R F. 1994. *Physicochemical Hydrodynamics: An Introduction*. 2^e éd. New York: John Wiley & Sons Inc.

Qiao, R. 2006. « Effects of molecular level surface roughness on electroosmotic flow ». *Microfluidics and Nanofluidics* 3 (1) (juin): 33-38. doi:10.1007/s10404-006-0103-x.

Ranade, S. S., C. Bomann Chung, G. Zon, et V. L. Boyd. 2009. « Preparation of genome-wide DNA fragment libraries using bisulfite in polyacrylamide gel electrophoresis slices with formamide denaturation and quality control for massively parallel sequencing by oligonucleotide ligation and detection ». *Analytical Biochemistry* 390: 126-135.

Randall, Greg C., et Patrick S. Doyle. 2005. « DNA Deformation in Electric Fields: DNA Driven Past a Cylindrical Obstruction ». *Macromolecules* 38 (mars): 2410-2418. doi:10.1021/ma048073g.

———. 2006a. « Collision of a DNA Polymer with a Small Obstacle ». *Macromolecules* 39 (22) (octobre): 7734-7745. doi:10.1021/ma061375t.

———. 2006b. « Collision of a DNA Polymer with a Small Obstacle ». *Macromolecules* 39 (22) (octobre): 7734-7745. doi:10.1021/ma061375t.

Randall, Greg, et Patrick Doyle. 2004. « Electrophoretic Collision of a DNA Molecule with an Insulating Post ». *Physical Review Letters* 93 (juillet). doi:10.1103/PhysRevLett.93.058102. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.93.058102>.

Rayan, Gamal, Jean-Erik Guet, Nicolas Taulier, Frederic Pincet, et Wladimir Urbach. 2010. « Recent Applications of Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) to Membrane Bio-Macromolecules ». *Sensors* 10 (juin 10): 5927-5948. doi:10.3390/s100605927.

Reisner, Walter, Keith Morton, Robert Riehn, Yan Wang, Zhaoning Yu, Michael Rosen, James Sturm, Stephen Chou, Erwin Frey, et Robert Austin. 2005a. « Statics and Dynamics of Single DNA Molecules Confined in Nanochannels ». *Physical Review Letters* 94 (19) (mai). doi:10.1103/PhysRevLett.94.196101. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.94.196101>.

———. 2005b. « Statics and Dynamics of Single DNA Molecules Confined in Nanochannels ». *Physical Review Letters* 94 (19) (mai). doi:10.1103/PhysRevLett.94.196101. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.94.196101>.

Reyes, Darwin R., Dimitri Iossifidis, Pierre-Alain Auroux, et Andreas Manz. 2002. « Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology ». *Analytical Chemistry* 74 (12) (juin): 2623-2636. doi:10.1021/ac0202435.

Rigler, R., Ü. Mets, J. Widengren, et P. Kask. 1993. « Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion ». *European Biophysics Journal* 22 (3): 169-175.

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

Rogers, J. A., K. E. Paul, R. J. Jackman, et G. M. Whitesides. 1997. « Using an elastomeric phase mask for sub-100 nm photolithography in the optical near field ». *Applied Physics Letters* 70: 2658.

———. 1998. « Generating 90 nanometer features using near-field contact-mode photolithography with an elastomeric phase mask ». *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* 16: 59.

Ruiz-Martinez, M.C., J. Berka, A. Belenkii, F. Foret, A.W. Miller, et B.L. Karger. 1993. « DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection ». *Analytical chemistry* 65 (20): 2851-2858.

Rust, Michael J., Mark Bates, et Xiaowei Zhuang. 2006. « Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) ». *Nature Methods* 3 (août 9): 793-796. doi:10.1038/nmeth929.

Sanders, Giles, H.W., et Andreas Manz. 2000. « Chip-based microsystems for genomic

and proteomic analysis ». *Trends in Analytical Chemistry* 19 (6): 364-378.

Sanger, F., S. Nicklen, et A.R. Coulson. 1977. « DNA sequencing with chain-terminating inhibitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463.

Saville, P. M., et E. M. Sevick. 1999. « Collision of a Field-Driven Polymer with a Finite-Sized Obstacle: A Brownian Dynamics Simulation ». *Macromolecules* 32 (février): 892-899. doi:10.1021/ma981049g.

Saxton, M.J. 2009. « Single Particle Tracking ». *Fundamental Concepts in Biophysics*: 1-33.

Schmid, H., et B. Michel. 2000. « Siloxane Polymers for High-Resolution, High-Accuracy Soft Lithography ». *Macromolecules* 33 (8) (avril): 3042-3049. doi:10.1021/ma982034l.

Schon, E., T. Evans, J. Welsh, et A. Efstratiadis. 1983. « Conformation of promoter DNA: fine mapping of S1-hypersensitive sites ». *Cell* 35 (3): 837-848.

Schütz, G. J., et P. Hinterdorfer. 2002. « Single molecule fluorescence and force microscopy ». *Experimental Gerontology* 37: 1493-1509.

Schwartz, D.C., et C.R. Cantor. 1984. « Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis ». *Cell* 37 (1): 67-75.

Selvin, P.R. 2000. « The renaissance of fluorescence resonance energy transfer ». *nature structural biology* 7 (9): 730-734.

Sergé, Arnauld, Nicolas Bertaux, Hervé Rigneault, et Didier Marguet. 2008. « Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes ». *Nature Methods* 5 (juillet 6): 687-694. doi:10.1038/nmeth.1233.

Sevick, E. M., et D. R. M. Williams. 1994. « Motion of polyelectrolyte chain hooked around a post ». *Physical Review E* 50 (5): 3357-3360.

Shaffer, E.O.I.I., et M. Olvera de La Cruz. 1989. « Dynamics of gel electrophoresis ». *Macromolecules* 22 (3): 1351-1355.

Siliprandi, D, H Siliprandi, et H Lis. 1954. « Separation and determination of vitamin B6 group (pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxal-phosphate and pyridoxamine-phosphate: Separation by paper electrophoresis of riboflavin (riboflavin, FMN, and FAD) and of nicotinamide (nicotinamide, DPN and TPN) groups ». *Biochim. Biophys. Acta* 14: 212.

Slater, G. W., et J. Noolandi. 1985. « New Biased-Reptation Model For Charged Polymers ». *Physical Review Letters* 55 (15): 1579-1582.

Smith, D. C., et W. Murchison. 1959. « The routine use of cellulose acetate strips in serum protein zone electrophoresis. » *The Journal of medical laboratory technology* 16: 197-200.

Smith, D. E, H. P Babcock, et S. Chu. 1999a. « Single-polymer dynamics in steady shear flow ». *Science* 283 (5408): 1724.

Smith, D. E, T. T Perkins, et S. Chu. 1996. « Dynamical scaling of DNA diffusion coefficients ». *Macromolecules* 29 (4): 1372-1373.

Smith, D.E., H.P. Babcock, et S. Chu. 1999b. « Single-polymer dynamics in steady shear flow ». *Science* 283 (5408): 1724.

Smithies, O. 1955. « Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults ». *Biochemical Journal* 61 (4): 629.

Smithies, O., et N. F. Walker. 1955. « Genetic Control of some Serum Proteins in Normal Humans ». *Nature* 176: 1265-1266.

Soni, G. V., et A. Meller. 2007. « Progress toward Ultrafast DNA Sequencing Using Solid-State Nanopores ». *Clinical Chemistry* 53 (septembre 21): 1996-2001. doi:10.1373/clinchem.2007.091231.

Spiering, V. L., S. Bouwstra, et R. M. E. J. Spiering. 1993. « On-chip decoupling zone for package-stress reduction ». *Sensors and Actuators A* 39: 149-156.

Steck, T. R. 1994. « Use of low-melt agarose for the efficient isolation of large DNA fragments ». *BioTechniques* 17 (4): 676-678.

Stellwagen, N. C., C. Gelfi, et P. G Righetti. 1997. « The Free Solution Mobility of DNA ».

Biopolymers 42: 687-703.

Swerdlow, H., S. Wu, H. Harke, et N. J. Dovichi. 1990. « Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing : Laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette ». *Journal of Chromatography A* 516 (1): 61-67.

Tang, K. C., E. Liao, W. L. Ong, J. D. S. Wong, A. Agarwal, R. Nagarajan, et L. Yobas. 2006. « Evaluation of bonding between oxygen plasma treated polydimethyl siloxane and passivated silicon ». *Journal of micromechanics and microengineering* 16: 155-161.

Tatarkova, Svetlana, et David Berk. 2005. « Probing single DNA mobility with fluorescence correlation microscopy ». *Physical Review E* 71 (avril). doi:10.1103/PhysRevE.71.041913. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.71.041913>.

Taylor, G. 1953. « Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 219 (1137): 186-203.

Tecler, M., Nerayo P., Victor A. Beck, Eric S. G. Shaqfeh, et Susan J. Muller. 2007. « Dynamics of DNA Polymers in Post Arrays: Comparison of Single Molecule Experiments and Simulations ». *Macromolecules* 40 (10) (mai): 3848-3859. doi:10.1021/ma062892e.

Tegenfeldt, Jonas O., Christelle Prinz, Richard L. Huang, Robert H. Austin, Stephen Y. Chou, Edward C. Cox, James C. Sturm, et Han Cao. 2004. « Micro- and nanofluidics for DNA analysis ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (7) (avril): 1678-1692. doi:10.1007/s00216-004-2526-0.

Tinland, B., A. Pluen, J. Sturm, et G. Weill. 1997. « Persistence length of single-stranded DNA ». *Macromolecules* 30 (19): 5763-5765.

Tiselius, Arne. 1937. « A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures ». *Transactions of the Faraday Society* 33: 524. doi:10.1039/tf9373300524.

Toda, T., T. Fujita, et M. Ohashi. 1982. « Two-dimensional electrophoresis on the layers of cellulose acetate membrane ». *Analytical Biochemistry* 119 (1): 167-176.

Turmel, C., E. Brassard, G.W. Slater, et J. Noolandi. 1990. « Molecular detrapping and band narrowing with high frequency modulation of pulsed field electrophoresis ». *Nucleic acids research* 18 (3): 569.

Turner, S., M. Cabodi, et H. Craighead. 2002. « Confinement-Induced Entropic Recoil of Single DNA Molecules in a Nanofluidic Structure ». *Physical Review Letters* 88 (mars). doi:10.1103/PhysRevLett.88.128103. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.88.128103>.

Viero, Y., Q. H. He, et A. Bancaud. « Efficient Prototyping of large-Scale PDMS and Silicon Nanofluidic devices using PDMS-base Phase Shift Lithography ». *Microfluidics and Nanofluidics*.

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

———. 2000b. « Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms ». *Reviews of Modern Physics* 72 (3): 813.

Voelkerding, K. V., S. A. Dames, et J. D. Durtschi. 2009. « Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics ». *Clinical Chemistry* 55 (février 6): 641-658. doi:10.1373/clinchem.2008.112789.

Volkmuth, W D, et R H Austin. 1992a. « DNA electrophoresis in microlithographic arrays ». *Nature* 358 (6387) (août 13): 600-602. doi:10.1038/358600a0.

Volkmuth, W. D., T. Duke, R. H. Austin, et E. C. Cox. 1995. « Trapping of branched DNA in microfabricated structures ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (15): 6887.

Volkmuth, W. D., T. Duke, M. C. Wu, R. Austin, et A. Szabo. 1994. « DNA Electrodifusion in a 2D Array of Posts ». *Physical Review Letters* 72 (13): 2117-2120.

Volkmuth, W. D., T. Duke, M. C. Wu, et R. H. Austin. 1994. « DNA Electrodifusion in a 2D Array of Posts ». *Physical Review letters* 72 (13): 2117-2120.

Volkmuth, W. D., et R H Austin. 1992b. « DNA electrophoresis in microlithographic arrays ». *Nature* 358: 600-602.

Wang, X., C. Cheng, S. Wang, M. Zhao, P.K. Dasgupta, et S. Liu. 2009. « Nanocapillaries for Open Tubular Chromatographic Separations of Proteins in Femtoliter to Picoliter Samples ». *Analytical chemistry* 81 (17): 7428–7435.

Wang, X., V. Veerappan, C. Cheng, X. Jiang, R.D. Allen, P.K. Dasgupta, et S. Liu. 2009. « Free Solution Hydrodynamic Separation of DNA Fragments from 75 to 106 000 Base Pairs in A Single Run ». *Journal of the American Chemical Society* 132 (1): 40–41.

Wang, X., S. Wang, V. Veerappan, C.K. Byun, H. Nguyen, B. Gendhar, R.D. Allen, et S. Liu. 2008. « Bare Nanocapillary for DNA Separation and Genotyping Analysis in Gel-Free Solutions without Application of External Electric Field ». *Analytical chemistry* 80 (14): 5583–5589.

Weiss, M. 2004. « Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments ». *Traffic* 5 (9): 662–671.

Weiss, S. 1999. « Fluorescence spectroscopy of single biomolecules ». *Science* 283 (5408): 1676.

Wennmalm, S., L. Edman, et R. Rigler. 1997. « Conformational fluctuations in single DNA molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (20): 10641.

Whitesides, George M. 2011a. « What Comes Next? » *Lab on a Chip* 11: 191. doi:10.1039/c0lc90101f.

———. 2011b. « What Comes Next? » *Lab on a Chip* 11 (2): 191. doi:10.1039/c0lc90101f.

Woolley, A. T, et R. A Mathies. 1994. « Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (24): 11348.

Yuen, P. K. 2008. « SmartBuild-a truly plug-n-play modular microfluidic system. » *Lab on a Chip* 8 (8): 1374-1378.

Zhou, W., Y. Huang, E. Menard, N. R. Aluru, J. A. Rogers, et A. G. Alleyne. 2005. « Mechanism for stamp collapse in soft lithography ». *Applied Physics Letters* 87 (25): 251925. doi:10.1063/1.2149513.

Figure 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 nm 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.

Figure 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 nm 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 μm . Note that micropillars were engraved in microchannels in order 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)).

Figure 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 (0.5X TBE, $n=30$). Scale bars = 10 μm . Red arrows indicate the direction of DNA migration.

Figure 4: DNA electrophoresis in h-PDMS nanochannels

(A) The graphs represents the migration speed of λ -DNA for different electric fields inside 70 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ microchannels (left panel), and 200 nm $\times$ 200 nm nanochannels etched in PDMS or in silicon (blue and red datasets, respectively, in the right panel). Note that we systematically assessed the micro- vs. nano-fluidic 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} cm²/Vs) inside micro- and nano-channels in different buffer conditions. Note that our estimates of the mobility were stable over periods of at least 2 hours.

Supplementary Information

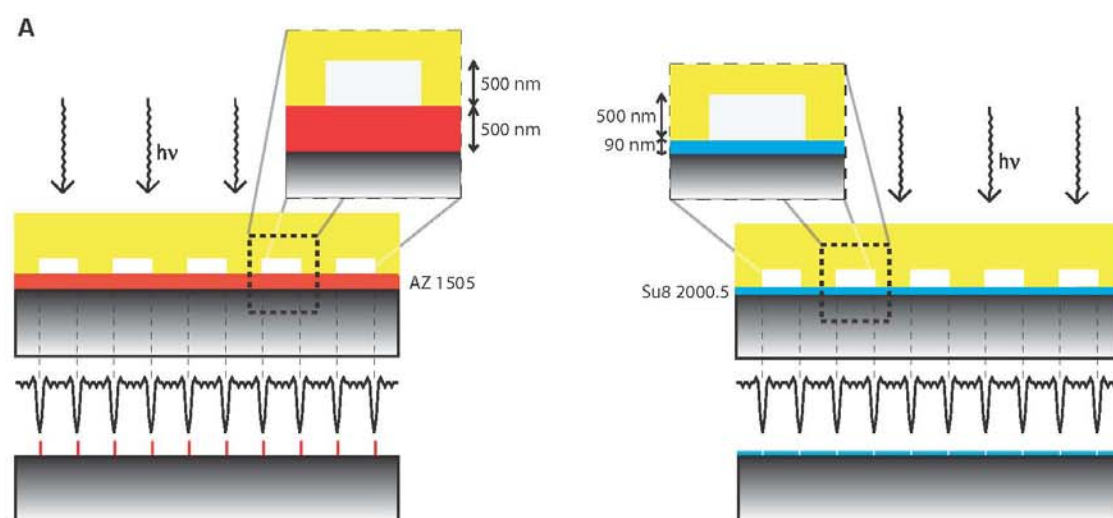
Figure S1: Nanoposts size distribution

The plot shows the size distribution of silicon cylindrical nanopost obtained by image analysis using the “fit ellipse” function in ImageJ of magnified SEM views of individual nanoposts, as shown in the insets of Fig. 2A. Gaussian fit gives a mean diameter of 268.3 nm, with a standard deviation of 7.5 nm, that is less than 3%.

Figure S2: Resolution loss at the interface micro/nanochannels for 2 μm thick microchannels

SEM of h-PDMS nanochannel chips with 2 μm thick microchannels, which are located on the left of the SEM image. The lateral dimension of nanochannels is ~ 700 nm at their entrance, and it then reduces to reach 200 nm ~ 15 μm apart from the entrance. Scale bar = 5 μm .

Fig. 1



B

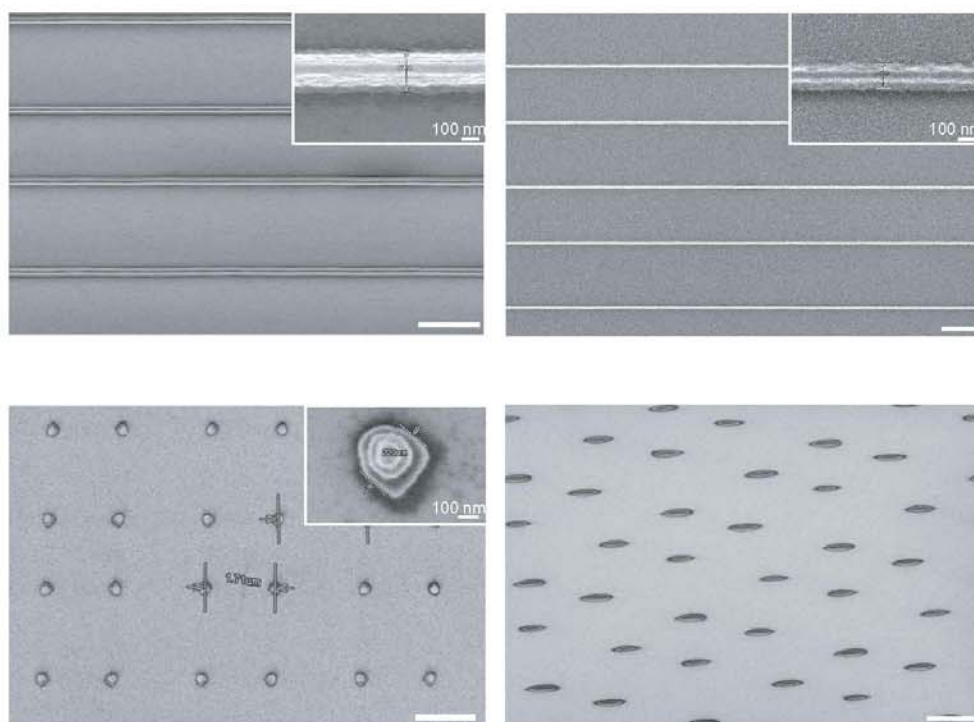




Fig. 3

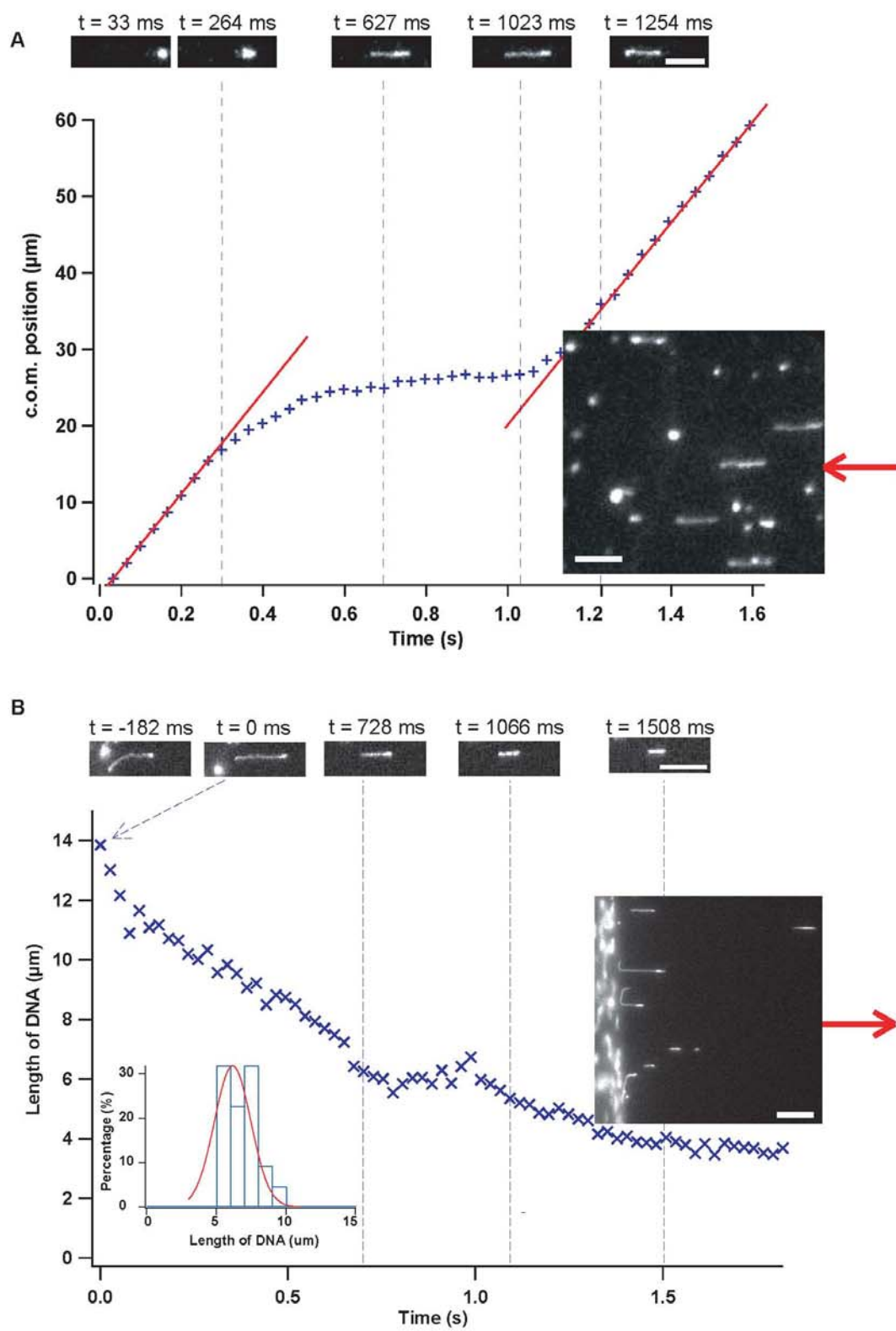
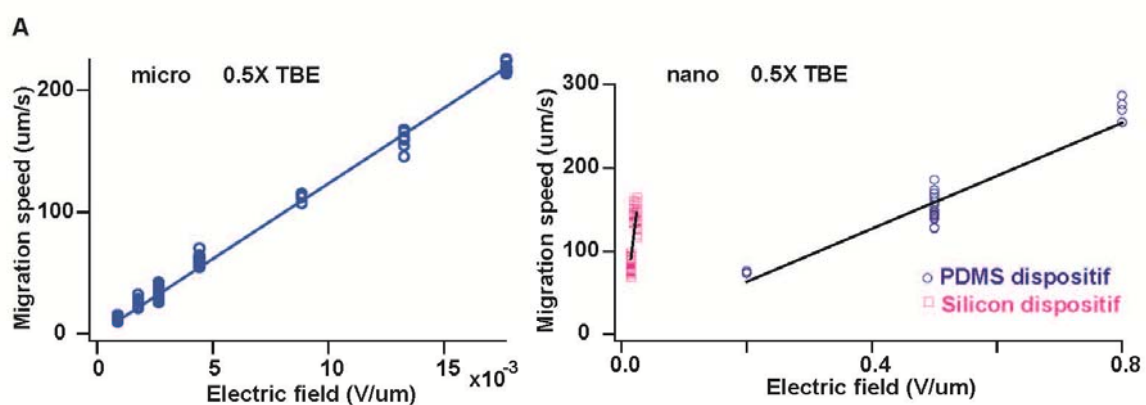


Fig.4



B

Condition	micro	nano
0.05x TBE	2.5	0.13
0.1x TBE	2.8	0.09
0.5x TBE	3.2	0.17
1x TBE	2.4	0.14
2x TBE	2.1	0.21
phosphate pH=5.3	2.2	0.22
phosphate pH=7.2	2.2	0.24
phosphate pH=8.6	2.4	0.13
super saturated. 0.5x TBE	2.8	0.12
rinsed with EDTA. 0.5x TBE	5.1	0.03
100nm fluo particles. 0.5x TBE	1.6	0.03
0.5x TBE in silicon dispositif	2.1	1.09

Fig. S1

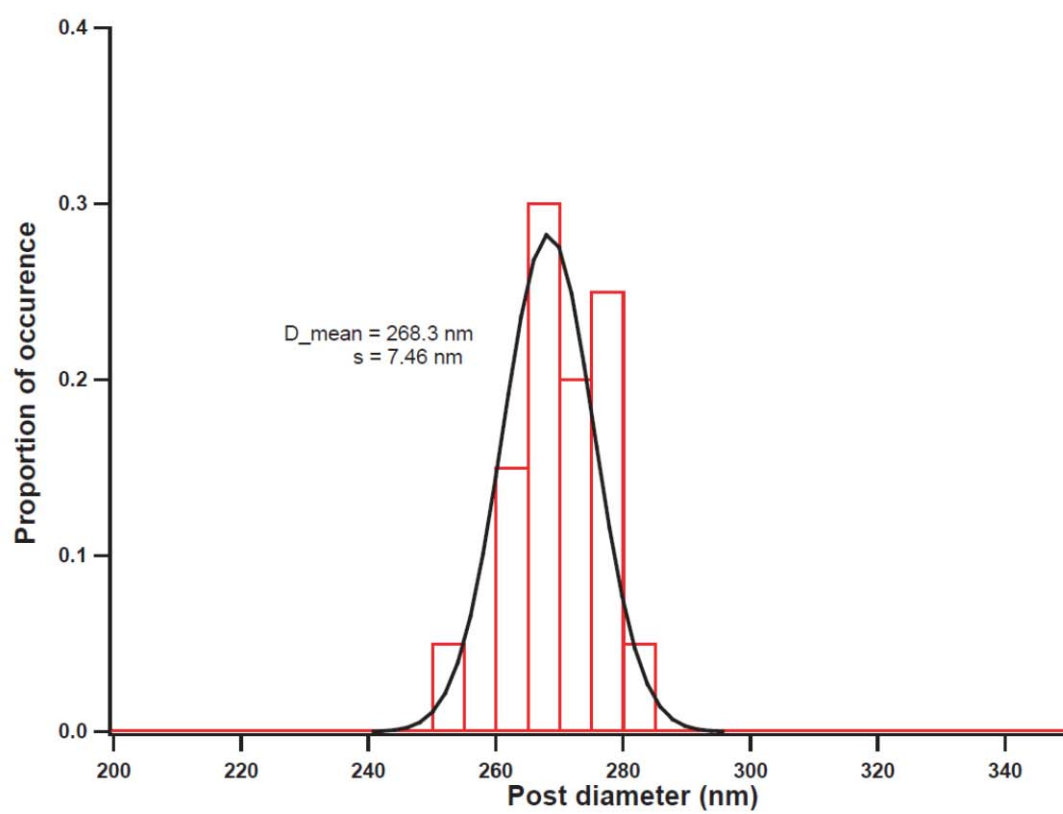
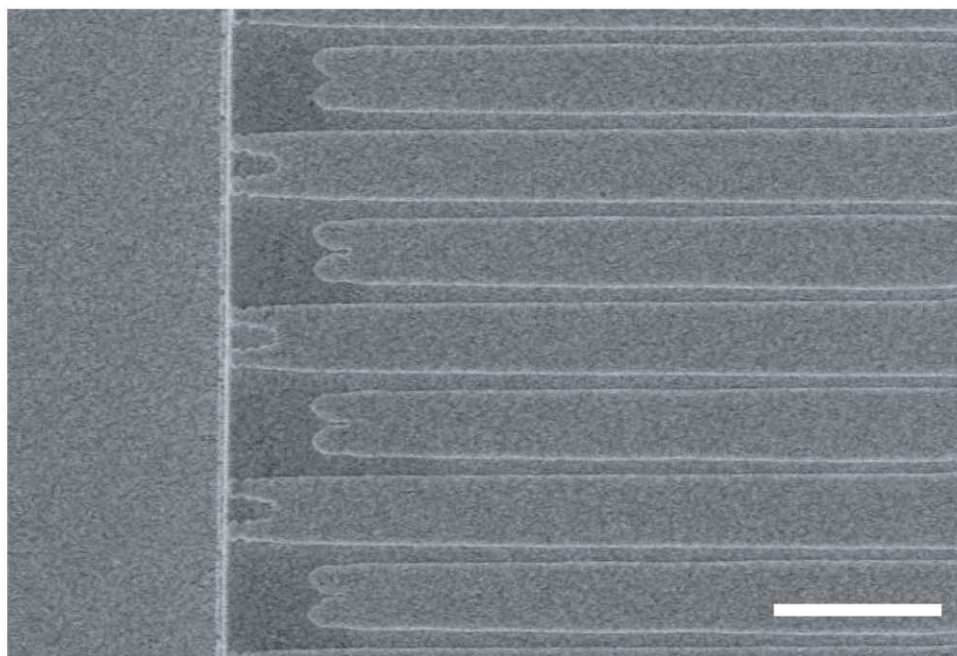


Fig. S2



Références

- AAkerman, B., et E. Tuite. 1996. « Single-and double-strand photocleavage of DNA by YO, YOYO and TOTO ». *Nucleic acids research* 24 (6): 1080.
- Abou-Shanab, R. A. I., J.-H. Hwang, Y. Cho, B. Min, et B.-H. Jeon. 2011. « Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as apotential source for biodiesel production ». *Applied Energy* 88: 3300-3306.
- Ajdari, Armand, Nathalie Bontoux, et Howard A. Stone. 2006. « Hydrodynamic Dispersion in Shallow Microchannels: the Effect of Cross-Sectional Shape ». *Analytical Chemistry* 78 (2) (janvier): 387-392. doi:10.1021/ac0508651.
- Albaugh, K. B. 1991. « Electrode Phenomena during Anodic Bonding of Silicon toSodium Borosilicate Glass ». *J. Eletrochem. Soc.* 138 (10): 3089.
- Araki, N., E.S. Aydil, et K.D. Dorfman. 2010. « Collision of a long DNA molecule with an isolated nanowire ». *Electrophoresis*.
- Arvanitidou, E., et D. Hoagland. 1991. « Chain-length dependence of the electrophoretic mobility in random gels ». *Physical review letters* 67 (11): 1464–1466.
- Bakajin, O. B., T. A. J. Duke, C. F. Chou, S. S. Chan, R. H. Austin, et E. C. Cox. 1998. « Electrohydrodynamic stretching of DNA in confined environments ». *Physical review letters* 80 (12): 2737–2740.
- Bakajin, OB, TAJ Duke, CF Chou, SS Chan, RH Austin, et EC Cox. 1998. « Electrohydrodynamic stretching of DNA in confined environments ». *Physical review letters* 80 (12): 2737–2740.
- Bakajin, Olgica, Thomas A. J. Duke, Jonas Tegenfeldt, Chia-Fu Chou, Shirley S. Chan, Robert H. Austin, et Edward C. Cox. 2001a. « Separation of 100-Kilobase DNA Molecules in 10 Seconds ». *Analytical Chemistry* 73 (décembre): 6053-6056. doi:10.1021/ac015527o.
- . 2001b. « Separation of 100-Kilobase DNA Molecules in 10 Seconds ». *Analytical Chemistry* 73 (24) (décembre): 6053-6056. doi:10.1021/ac015527o.
- Bancaud, Aurélien, Gaudeline Wagner, Kevin D. Dorfman, et Jean-Louis Viovy. 2005. « Measurement of the Surface Concentration for Bioassay Kinetics in Microchannels ». *Analytical Chemistry* 77 (3) (février): 833-839. doi:10.1021/ac048996+.
- Barbier, V., B.A. Buchholz, A.E. Barron, et J.L. Viovy. 2002. « Comb-like copolymers as self-coating, low-viscosity and high-resolution matrices for DNA sequencing ». *Electrophoresis* 23 (10): 1441.
- Barron, A. E., D. S. Soane, et H. W. Blanch. 1993. « Capillary electrophoresis of DNA in uncross-linked polymer solutions ». *Journal of Chromatography A* 652 (1): 3-16.
- Bartlett, R.C. 1963. « Rapid cellulose acetate electrophoresis: I. Serum proteins ». *Clinical Chemistry* 9 (3): 317.

- Battey, J., et D.A. Clayton. 1978. « The transcription map of mouse mitochondrial DNA ». *Cell* 14 (1): 143–156.
- Baumann, C.G., S.B. Smith, V.A. Bloomfield, et C. Bustamante. 1997. « Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (12): 6185.
- Becker, H., et C. Gärtner. 2000. « polymicrofabrication methods for microfluidic analytical applications ». *Electrophoresis* 21: 12-26.
- Becker, Holger, et Claudia Gärtner. 2007. « Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (1) (novembre): 89-111. doi:10.1007/s00216-007-1692-2.
- Berk, A.J., et P.A. Sharp. 1977. « Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids ». *Cell* 12 (3): 721–732.
- Betzig, E., G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, et H.F. Hess. 2006. « Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution ». *Science* 313 (5793): 1642.
- Bode, H.-J. 1977. « The use of liquid polyacrylamide in electrophoresis: I. Mixed gels composed of agar-agar and liquid polyacrylamide ». *Analytical Biochemistry* 83 (1): 204-210.
- Braslavsky, I., B. Hebert, E. Kartalov, et S.R. Quake. 2003a. « Sequence information can be obtained from single DNA molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (7): 3960.
- . 2003b. « Sequence information can be obtained from single DNA molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (7): 3960.
- Brochard, F., et P. G. de Gennes. 1977. « Dynamics of confined polymer chains ». *The Journal of Chemical Physics* 67 (1): 52-56.
- Brochard-Wyart, F. 1995. « Polymer chains under strong flows: stems and flowers ». *EPL (Europhysics Letters)* 30: 387.
- Burlatsky, S., et J. Deutch. 1993. « Influence of Solid Friction on Polymer Relaxation in Gel Electrophoresis ». *Science* 260: 1782-1784.
- Cabodi, Mario, Stephen W. P. Turner, et Harold G. Craighead. 2002. « Entropic Recoil Separation of Long DNA Molecules ». *Analytical Chemistry* 74 (octobre): 5169-5174. doi:10.1021/ac025879a.
- Campbell, L. C., M. J. Wilkinson, A. Manz, P. Camilleri, et C. J. Humphreys. 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. See <http://www.rsc.org/suppdata/lc/b3/b312592k/> ». *Lab on a Chip* 4 (3): 225. doi:10.1039/b312592k.

- Cao, Han, Jonas O. Tegenfeldt, Robert H. Austin, et Stephen Y. Chou. 2002. « Gradient nanostructures for interfacing microfluidics and nanofluidics ». *Applied Physics Letters* 81 (16): 3058. doi:10.1063/1.1515115.
- Carle, G. F., et M. V. Olson. 1984. « Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gelelectrophoresis ». *Nucleic Acids Research* 12 (14): 5647-5664.
- Carle, G. F., M. Frank, et M. V. Olson. 1986. « Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field ». *Science* 232 (4746): 65-68.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, et D. C. Prasher. 1994. « Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression ». *Science* 263.
- Chan, Y. C., Y.-K. Lee, et Y. Zohar. 2006. « High-throughput design and fabrication of an integrated microsystem with high aspect-ratio sub-micron pillar arrays for free-solution micro capillary electrophoresis ». *Journal of micromechanics and microengineering* 16: 699-707.
- Chan, Y.C., Y.K. Lee, et Y. Zohar. 2006. « High-throughput design and fabrication of an integrated microsystem with high aspect-ratio sub-micron pillar arrays for free-solution micro capillary electrophoresis ». *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16: 699.
- Chan, Yick Chuen, Yitshak Zohar, et Yi-Kuen Lee. 2009. « Effects of embedded sub-micron pillar arrays in microfluidic channels on large DNA electrophoresis ». *ELECTROPHORESIS* 30 (septembre): 3242-3249. doi:10.1002/elps.200900127.
- Chhina, S. K., A. Bajwa, M. Rahbar, A. A. Kaleibar, P. C. H. Li, et M. Parameswaran. 2011. « Ultra-low-cost PMMA Microfluidic Device Fabrication and Electrophoretic Pinch Injection ». *Journal of Medical and Biological Engineering* 31 (2): 105-110.
- Cho, Jaeseol, Satish Kumar, et Kevin D. Dorfman. 2010. « Electrophoretic collision of a DNA molecule with a small elliptical obstacle ». *ELECTROPHORESIS* 31 (5) (mars): 860-867. doi:10.1002/elps.200900491.
- Chou, C.F., O. Bakajin, S.W.P. Turner, T.A.J. Duke, S.S. Chan, E.C. Cox, H.G. Craighead, et R.H. Austin. 1999. « Sorting by diffusion: An asymmetric obstacle course for continuous molecular separation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (24): 13762.
- Chou, S.Y., P.R. Krauss, et P.J. Renstrom. 1996. « Nanoimprint lithography ». *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* 14 (6): 4129-4133.
- Chou, Stephen Y., Peter R. Krauss, et Preston J. Renstrom. 1995. « Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers ». *Applied Physics Letters* 67 (21): 3114. doi:10.1063/1.114851.
- Chu, G., D. Vollrath, et R. W. Davis. 1986. « Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields ». *Science* 234 (4783): 1582-1585.
- Clark, S. M., B.W. Birren, E. Lai, et L. Hood. 1988. « A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogeneous electric fields ». *Science* 241 (4870): 1203-1205.

- Consden, R., AH Gordon, et AJP Martin. 1944. « Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper ». *Biochemical Journal* 38 (3): 224.
- Coons, A.H., et M.H. Kaplan. 1950. « Localization of antigen in tissue cells ». *The Journal of experimental medicine* 91 (1): 1.
- David H. Boal. 2002. *Mechanics of the Cell*. Cambridge University Press.
- Davidson, JN, et RMS Smellie. 1952. « Phosphorus compounds in the cell. 2. The separation by ionophoresis on paper of the constituent nucleotides of ribonucleic acid ». *Biochemical Journal* 52 (4): 594.
- Davis, B.J. 1964. « DISC ELECTROPHORESIS—II METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS* ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 121 (2): 404–427.
- Deniz, A.A., M. Dahan, J.R. Grunwell, T. Ha, A.E. Faulhaber, D.S. Chemla, S. Weiss, et P.G. Schultz. 1999. « Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Förster distance dependence and subpopulations ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (7): 3670.
- Destro-Bisol, G., et S.A. Santini. 1995. « Electrophoresis on cellulose acetate and cellogel: current status and perspectives ». *Journal of Chromatography A* 698 (1-2): 33–40.
- Deutsch, J. M., et T. L. Madden. 1989. « Theoretical studies of DNA during gel electrophoresis ». *J. Chem. Phys.* 90 (4): 2476–2485.
- Dorfman, Kevin. 2006. « DNA electrophoresis in microfluidic post arrays under moderate electric fields ». *Physical Review E* 73 (juin). doi:10.1103/PhysRevE.73.061922. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.73.061922>.
- . 2010. « DNA electrophoresis in microfabricated devices ». *Reviews of Modern Physics* 82 (4) (octobre): 2903–2947. doi:10.1103/RevModPhys.82.2903.
- Dovichi, N.J. 1997. « DNA sequencing by capillary electrophoresis ». *Electrophoresis* 18 (12-13): 2393–2399.
- Doyle, P. S, B. Ladoux, et J. L Viovy. 2000. « Dynamics of a tethered polymer in shear flow ». *Physical review letters* 84 (20): 4769–4772.
- Doyle, P. S., E. S. G. Shaqfeh, et A. P. Gast. 1997. « Dynamic simulation of freely draining flexible polymers in steady linear flows ». *J. Fluid Mech.* 334: 251–291.
- Doyle, P.S., J. Bibette, A. Bancaud, et J.L. Viovy. 2002a. « Self-assembled magnetic matrices for DNA separation chips ». *Science* 295 (5563): 2237.
- . 2002b. « Self-assembled magnetic matrices for DNA separation chips ». *Science* 295 (5563): 2237.
- Doyle, P.S., B. Ladoux, et J.L. Viovy. 2000. « Dynamics of a tethered polymer in shear flow ». *Physical review letters* 84 (20): 4769–4772.
- Duffy, D. C., J. C. McDonald, J. A. Schueller, et G. M. Whitesides. 1998. « Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane) ». *Analytical Chemistry* 70:

4974-4984.

Duke, T.A.J., R.H. Austin, E.C. Cox, et S.S. Chan. 1996. « Pulsed-field electrophoresis in microlithographic arrays ». *Electrophoresis* 17 (6): 1075–1079.

Duke, TAJ, et RH Austin. 1998a. « Microfabricated sieve for the continuous sorting of macromolecules ». *Physical review letters* 80 (7): 1552–1555.

———. 1998b. « Microfabricated sieve for the continuous sorting of macromolecules ». *Physical review letters* 80 (7): 1552–1555.

Edman, L., U. Mets, et R. Rigler. 1996. « Conformational transitions monitored for single molecules in solution ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (13): 6710.

Edwards, SF. 1967. « The statistical mechanics of polymerized material ». *Proceedings of the Physical Society* 92: 9.

Evered, D F. 1959. « Ionophoresis of acidic and basic amino acids on filter paper using low voltages ». *Biochim. Biophys. Acta* 36: 14.

Flint, J. 1977. « The topography and transcription of the adenovirus genome. » *Cell* 10: 153-166.

Flory, P. J., et M. Volkenstein. 1969. « Statistical mechanics of chain molecules ». *Biopolymers* 8 (5): 699-700.

Fontana, R. E., J. Katine, M. Rooks, R. Viswanathan, J. Lille, S. MacDonald, E. Kratschmer, et al. 2002. « E-beam writing: a next-generation lithography approach for thin-film head critical features ». *Magnetics, IEEE Transactions on* 38 (1): 95–100.

Frigault, M. M., J. Lacoste, J. L. Swift, et C. M. Brown. 2009. « Live-cell microscopy – tips and tools ». *Journal of Cell Science* 122: 753-767.

Gaertner, C., H. Becker, B. Anton, A. P. O’Neil, et O. Roetting. 2003. « Polymer based microfluidic devices: examples for fluidic interfaces and standardization concepts ». *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems* 4982: 99-104.

Garbers, D. L. 1979. « Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. » *The Journal of Biological Chemistry* 254: 240-243.

Gardiner, K. 1991. « Pulsed field gel electrophoresis ». *Analytical chemistry* 63 (7): 658–665.
de Gennes, P. G. 1971. « Reptation of a Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles ». *Journal of Chemical Physics* 55 (2): 572-589.

de Gennes, P.G. 1979. « Effect of cross-links on a mixture of polymers ». *Journal de Physique Lettres* 40: 69-72. doi:10.1051/jphyslet:0197900400406900.

Gibson, D. G., J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R.-Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, et al. 2010. « Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome ». *Science* 329 (mai 20): 52-56. doi:10.1126/science.1190719.

- Gilroy, T. E., et C. A. Thomas Jr. 1983. « The analysis of some new *Drosophila* repetitive DNA sequences isolated and cloned from two-dimensional agarose gels ». *Gene* 23 (1): 41-51.
- Gingell, D., OS Heavens, et JS Mellor. 1987. « General electromagnetic theory of total internal reflection fluorescence: the quantitative basis for mapping cell-substratum topography ». *Journal of cell science* 87 (5): 677.
- Goering, R.V. 2010. « Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease ». *Infection, Genetics and Evolution*.
- Goetzinger, W., L. Kotler, E. Carrilho, M.C. Ruiz-Martinez, O. Salas-Solano, et B.L. Karger. 1998. « Characterization of high molecular mass linear polyacrylamide powder prepared by emulsion polymerization as a replaceable polymer matrix for DNA sequencing by capillary electrophoresis ». *Electrophoresis* 19 (2): 242–248.
- Goldberg, D.A. 1980. « Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcoholdehydrogenase gene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (10): 5794-5798.
- Goodwin, S. B., R. E. Schneider, et W. E. Fry. 1995. « Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans* ». *Plant Disease* 79: 1181-1185.
- Gould, H. 1966. « The Specific Cleavage of Ribonucleic Acid from Reticulocyte Ribosomal Subunits ». *Biochemistry* 5 (3): 1103–1108.
- Grabar, P., et C. A. Williams. 1953. « Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin ». *Biochim. Biophys. Acta* 10: 193.
- Günther, K., M. Mertig, et R. Seidel. 2010. « Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA ». *Nucleic acids research* 38 (19): 6526-6532.
- Guttman, A. Capillary electrophoresis using replaceable gels.
- Ha, T. 2001. « Single-Molecule Fluorescence Resonance EnergyTransfer ». *Methods* 25: 78-86.
- Ha, T., T. Enderle, DF Ogletree, DS Chemla, PR Selvin, et S. Weiss. 1996. « Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (13): 6264.
- Haglund, H., et A. Tiselius. 1950. « Zone Electrophoresis in a Glass Powder Column ». *Acta Chemica Scandinavica* 4: 957-962.
- Hales, C. N., et P. J. Randle. 1963. « Immunoassay of Insulin with Insulin-Antibody Precipitate ». *Biochem. J.* 88: 137.

- Hammond, HA, L. Jin, CT Caskey, et R. Chakraborty. 1994. « Evaluation of 13 Short Tandem Repeat Loci for Use in Personal Identification Applications ». *American journal of human genetics* 55 (1): 190.
- Hammond, R.W., H. Oana, J.J. Schwinefus, J. Bonadio, R.J. Levy, et M.D. Morris. 1997. « Capillary electrophoresis of supercoiled and linear DNA in dilute hydroxyethyl cellulose solution ». *Analytical chemistry* 69 (6): 1192–1196.
- Han, J., et H.G. Craighead. 2000. « Separation of Long DNA Molecules in a Microfabricated Entropic Trap Array ». *Science* 288 (5468): 1026-1029.
- Han, J., SW Turner, et HG Craighead. 1999. « Entropic trapping and escape of long DNA molecules at submicron size constriction ». *Physical review letters* 83 (8): 1688–1691.
- Harada, F., RC Sawyer, et JE Dahlberg. 1975. « A primer ribonucleic acid for initiation of in vitro Rous sarcoma virus deoxyribonucleic acid synthesis. » *Journal of Biological Chemistry* 250 (9): 3487.
- Hardy, WB. 1905. « Colloidal Solution. The Globulins. » *The Journal of Physiology* 30 (4-5): 251-337.
- Hardy, WB, et WCD Whetham. 1899. « On the coagulation of proteid by electricity ». *The Journal of Physiology* 24 (3-4): 288.
- Harley, E. H., et J. S. White. 1972. « THE RESOLUTION OF POLYOMA DNABY POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS ». *FEBS LETTERS April* 22 (1): 41-45.
- Harris, T. D., P. R. Buzby, H. Babcock, E. Beer, J. Bowers, I. Braslavsky, M. Causey, et al. 2008. « Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome ». *Science* 320 (avril 4): 106-109. doi:10.1126/science.1150427.
- Heim, R., D.C. Prasher, et R.Y. Tsien. 1994. « Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (26): 12501.
- Heller, C., S. Magnusdottir, et J.-L. Viovy. 2001. « Robust Field Inversion Capillary Electrophoretic Separation of Long DNA Fragments ». *Methods in Molecular Biology* 162: 293-305.
- Henriques, R., et M.M. Mhlanga. 2009. « PALM and STORM: What hides beyond the Rayleigh limit? » *Biotechnology journal* 4 (6): 846–857.
- Hesjedal, T., et W. Seidel. 2003. « Near-field elastomeric mask photolithography fabrication of high-frequency surface acoustic wave transducers ». *Nanotechnology* 14: 91.
- Hess, S. T., T. P. K. Girirajan, et M. D. Mason. 2006. « Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy ». *Biophysical Journal* 91: 4258-4272.
- Hjertén, S. 1963. « “Molecular-sieve” electrophoresis in cross-linked polyacrylamide gels ». *Journal of Chromatography A* 11: 66-70.
- Holleran, Sean P., et Ronald G. Larson. 2008. « Multiple Regimes of Collision of an

Electrophoretically Translating Polymer Chain against a Thin Post ». *Macromolecules* 41 (13) (juillet): 5042-5054. doi:10.1021/ma0712596.

Hubert, S. J., G. W. Slater, et J.-L. Viovy. 1996. « Theory of Capillary Electrophoretic Separation of DNA Using Ultradilute Polymer Solutions ». *macromolecules* 29 (3): 1006-1009.

Huh, Dongeun, K. L. Mills, Xiaoyue Zhu, Mark A. Burns, M. D. Thouless, et Shuichi Takayama. 2007. « Tuneable elastomeric nanochannels for nanofluidic manipulation ». *Nature Materials* 6 (6) (mai): 424-428. doi:10.1038/nmat1907.

Ingram, V. M. 1958. « Abnormal human haemoglobins: I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by “fingerprinting” » 28. *Biochim. Biophys. Acta*: 539-545.
International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. « Finishing the euchromatic sequence of the human genome ». *Nature* 431: 931-945.

Jaqaman, K., D. Loeke, M. Mettlen, H. Kuwata, S. Grinstein, S.L. Schmid, et G. Danuser. 2008. « Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences ». *Nature methods* 5 (8): 695–702.

Jeong, Yongwon, Songyi Kim, Kukjin Chun, Junkeun Chang, et Doo Soo Chung. 2001. « Methodology for miniaturized CE and insulation on a silicon substrate ». *Lab on a Chip* 1 (2): 143. doi:10.1039/b103796j.

Jeppesen, P. G. N. 1980. « Separation and Isolation of DNA Fragments using Linear Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis ». *Methods in Enzymology* 65: 305-319.
Jo, K., D. M. Dhingra, T. Odijk, J. J. De Pablo, M. D. Graham, R. Runnheim, D. Forrest, et D. C. Schwartz. 2007. « A single-molecule barcoding system using nanoslits for DNA analysis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (8): 2673.

Jones, E. P., et E. Chi. 1997. « DNA isolation in agarose plugs for sizing and characterization of bacterial artificial chromosome (BAC) clones ». *Technical Tips Online* 2: 174-176.
Jorgenson, J.W., et K.D.A. Lukacs. 1981. « Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries ». *Analytical Chemistry* 53 (8): 1298–1302.

Joswiak, M., J. Ou, et K. Dorfman. en cours de publication. « Statistical Properties of the Electrophoretic Collision of a Long DNA Molecule with a Small Obstacle ». *Electrophoresis* ———. 2011. « Statistical Properties of the Electrophoretic Collision of a Long DNA Molecule with a Small Obstacle ». *Electrophoresis*.

Kaji, Noritada, Yojiro Tezuka, Yuzuru Takamura, Masanori Ueda, Takahiro Nishimoto, Hiroaki Nakanishi, Yasuhiro Horiike, et Yoshinobu Baba. 2004a. « Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chips under a Direct Current Electric Field ». *Analytical Chemistry* 76 (1) (janvier): 15-22. doi:10.1021/ac030303m.

———. 2004b. « Separation of long DNA molecules by quartz nanopillar chips under a direct current electric field ». *Analytical Chemistry* 76 (1) (janvier 1): 15-22. doi:10.1021/ac030303m.

Kalaidzidis, Y. 2007. « Intracellular objects tracking ». *European journal of cell biology* 86

(9): 569–578.

Kaplan, B. 1998. « Application of polyacrylamide slab gel electrophoresis to the analysis and small-scale purification of amyloid proteins ». *Analytica Chimica Acta* 372: 161-172.

Karger, B.L., et A. Guttman. 2009. « DNA sequencing by CE ». *Electrophoresis* 30 (S1): S196–S202.

Kasper, T. J., M. Melera, P. Gozel, et R. G. Brownlee. 1988. « Separation and detection of DNA by capillary electrophoresis. » *J Chromatogr* 458: 303-312.

Kendall, J., et E.D. Crittenden. 1923. « The separation of isotopes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 9 (3): 75.

Kenward, M., et G. W. Slater. 2006a. « Molecular-dynamics simulations with explicit hydrodynamics II: On the collision of polymers with molecular obstacles ». *The European Physical Journal E* 20 (2) (juin): 125-141. doi:10.1140/epje/i2006-10008-2.

———. 2006b. « Molecular-dynamics simulations with explicit hydrodynamics II: On the collision of polymers with molecular obstacles ». *The European Physical Journal E* 20 (juin 16): 125-141. doi:10.1140/epje/i2006-10008-2.

Kim, Y., et M.D. Morris. 1994. « Pulsed field capillary electrophoresis of multikilobase length nucleic acids in dilute methyl cellulose solutions ». *Analytical chemistry* 66 (19): 3081–3085.

———. 1995. « Rapid pulsed field capillary electrophoretic separation of megabase nucleic acids ». *Analytical chemistry* 67 (5): 784–786.

Klobusitzky, D., et P. König. 1939. « Biochemical study of snake venom from the genus Bothrops ». *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. Naunyn-Schmiedeberg* 192: 271.

Kohn, J. 1957. « A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis ». *Clinica Chimica Acta* 2 (4): 297-303.

Krieg, P.A., et D.A. Melton. 1984. « Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs ». *Nucleic Acids Research* 12 (18): 7057.

Kumar, A., et G. M. Whitesides. 1993. « Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching ». *Applied Physics Letters* 63 (14): 2002-2004.

Laemmli, U. K. 1970. « Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 ». *Nature* 227: 680-685.

Lanyon, J. P., et R. Williamson. 1968. « The Fractionation of Ribonucleic Acid on a Preparative Scale by Polyacrylamide Gel Electrophoresis ». *FEBS letters* 1 (5): 279-282.

Larson, Jonathan W., Gregory R. Yantz, Qun Zhong, Rebecca Charnas, Christina M. D’Antoni, Michael V. Gallo, Kimberly A. Gillis, et al. 2006. « Single DNA molecule stretching in sudden mixed shear and elongational microflows ». *Lab on a Chip* 6: 1187. doi:10.1039/b602845d.

- LeDuc, P., C. Haber, G. Bao, et D. Wirtz. 1999. « Dynamics of individual flexible polymers in a shear flow ». *Nature* 399: 564-566.
- Lee, J.B., K. Hayashi, M. Hashimoto, T. Nakano, et T. Hayashi. 2004. « Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu) ». *Chemical & pharmaceutical bulletin* 52 (9): 1091–1094.
- Lehrach, H., D. Diamond, J.M. Wozney, et H. Boedtker. 1977. « RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination ». *Biochemistry* 16 (21): 4743–4751.
- Lerman, L. S., et H. L. Frisch. 1982. « Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? » *Biopolymers* 21 (5): 995-997.
- Liu, K.J., T.D. Rane, Y. Zhang, et T.H. Wang. 2011. « Single-Molecule Analysis Enables Free Solution Hydrodynamic Separation Using Yoctomole Levels of DNA ». *Journal of the American Chemical Society*.
- Long, D., J. L Viovy, et A. Ajdari. 1996. « Simultaneous action of electric fields and nonelectric forces on a polyelectrolyte: Motion and deformation ». *Physical review letters* 76 (20): 3858–3861.
- Lu, H. P. 1998. « Single-Molecule Enzymatic Dynamics ». *Science* 282 (décembre 4): 1877-1882. doi:10.1126/science.282.5395.1877.
- Lumpkin, O. J., et B. H. Zimm. 1982. « Mobility of DNA in gel electrophoresis ». *Biopolymers* 21 (11): 2315-2316.
- Lyssenko, V., A. Jonsson, P. Almgren, N. Pulizzi, B. Isomaa, T. Tuomi, G. Berglund, D. Altshuler, P. Nilsson, et L. Groop. 2008. « Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes ». *New England Journal of Medicine* 359 (21): 2220–2232.
- Manning, G. S. 2006. « The persistence length of DNA is reached from the persistence length of its null isomer through an internal electrostatic stretching force ». *Biophysical journal* 91 (10): 3607–3616.
- Mannion, J. T., C. H. Reccius, J. D. Cross, et H. G. Craighead. 2006. « Conformational analysis of single DNA molecules undergoing entropically induced motion in nanochannels ». *Biophysical journal* 90 (12): 4538–4545.
- Manz, A., N. Graber, et H. M. Widmer. 1990. « Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 1: 244-248.
- Manz, A., D. J. Harrison, H. Lüdi, et H. M. Widmer. 1992. « Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip ». *Journal of Chromatography A* 593: 253-258.
- Mao, Pan. 2006. Fabrication and Characterization of Nanofluidic Channels for Studying Molecular Dynamics in Confined Environments. Massachusetts Institute of Technology, avril.

- Markham, R., et J. D. Smith. 1952. « The Structure of Ribonucleic Acids ». *Biochem. J.* 52: 552.
- Martinez, A.W., S.T. Phillips, B.J. Wiley, M. Gupta, et G.M. Whitesides. 2008. « FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices ». *Lab Chip* 8 (12): 2146–2150.
- Masubuchi, Y., H. Oana, M. Akiyama, M. Matsumoto, et M. Doi. 1995. « Dynamics of a DNA Molecule Hanging over an Obstacle in Gel Electrophoresis ». *Journal of the Physical Society of Japan* 64 (4): 1412-1420.
- Mathies, R. A., et X. C. Huang. 1992. « Capillary array electrophoresis : an approach to high-speed, high-throughput DNA sequencing ». *Nature* 359 (6391): 167-169.
- Matthews, C., et C. Favard. 2007. « Theory, principles and applications of fluorescent technologies in cellular biology and cancer research ». *Bulletin du Cancer* 94 (1): 115–25.
- Mawatari, Kazuma, Takehiko Tsukahara, Yasuhiko Sugii, et Takehiko Kitamori. 2010. « Extended-nano fluidic systems for analytical and chemical technologies ». *Nanoscale* 2 (9): 1588. doi:10.1039/c0nr00185f.
- Maxam, A.M., et W. Gilbert. 1977. « A new method for sequencing DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (2): 560.
- McDonald, J.C., D. C. Duffy, H. Wu, O.J.A. Schueller, et G.M. Whitesides. 2000. « Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane) ». *Electrophoresis* 21: 27–40.
- McPhie, P., J. Hounsell, et WB Gratzer. 1966. « The Specific Cleavage of Yeast Ribosomal Ribonucleic Acid with Nucleases ». *Biochemistry* 5 (3): 988–993.
- Mebrahtu, Y. B., P. G. Lawyer, D. Koech, P. V. Perkins, C. R. Roberts, J. B. Were, et L. D. Hendricks. 1992. « Biochemical Characterization and Zymodeme Classification of Leishmania Isolates from Patients, Vectors, and Reservoir Hosts in Kenya ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47: 852-892.
- Michaelis, L. 1909. « Electric transfer of fermentation I. The invertin. » *Biochemische Zeitschrift* 16: 81-86.
- Minc, N., P. Bokov, K. B Zeldovich, C. Fütterer, J. L Viovy, et K. D Dorfman. 2005. « Motion of single long DNA molecules through arrays of magnetic columns ». *Electrophoresis* 26 (2): 362–375.
- Minc, N., P. Bokov, K.B. Zeldovich, C. Fütterer, J.L. Viovy, et K.D. Dorfman. 2005. « Motion of single long DNA molecules through arrays of magnetic columns ». *Electrophoresis* 26 (2): 362–375.
- Minc, N., C. Fütterer, K.D. Dorfman, A. Bancaud, C. Gosse, C. Goubault, et J.L. Viovy. 2004. « Quantitative microfluidic separation of DNA in self-assembled magnetic matrixes ». *Analytical chemistry* 76 (13): 3770–3776.

- Minc, Nicolas, Jean-Louis Viovy, et Kevin Dorfman. 2005. « Non-Markovian Transport of DNA in Microfluidic Post Arrays ». *Physical Review Letters* 94 (19) (mai). doi:10.1103/PhysRevLett.94.198105. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.94.198105>.
- Mitnik, L., L. Salomé, J. L Viovy, et C. Heller. 1995. « Systematic study of field and concentration effects in capillary electrophoresis of DNA in polymer solutions ». *Journal of Chromatography A* 710 (2): 309–321.
- Mohan, Aruna, et Patrick S. Doyle. 2007. « Stochastic Modeling and Simulation of DNA Electrophoretic Separation in a Microfluidic Obstacle Array ». *Macromolecules* 40 (24) (novembre): 8794-8806. doi:10.1021/ma071354e.
- Mujico, J. R., M. Lombardia, M. Carmen Mena, E. Méndez, et J. P. Albar. 2011. « A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheatcontamination in gluten-free food for celiac patients ». *Food Chemistry* 128: 795-801.
- Mülsch, A., et R. Gerzer. 1991. « Preparative Polyacrylamide Gel ElectrophoresisApparatus for Purification of Guanylyl Cyclase ». *Methods in Enzymology* 195: 355-363.
- Murade, C. U., V. Subramaniam, C. Otto, et M. L Bennink. 2009. « Interaction of oxazole yellow dyes with DNA studied with hybrid optical tweezers and fluorescence microscopy ». *Biophysical journal* 97 (3): 835–843.
- Murat, M., et G. S Grest. 1989. « Structure of a grafted polymer brush: A molecular dynamics simulation ». *Macromolecules* 22 (10): 4054–4059.
- Ng, J. M. K., I. Gitlin, A. D. Stroock, et G. M. Whitesides. 2002. « Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems ». *Electrophoresis* 23: 3461–3473.
- Nie, S., D. T. Chiu, et R. N. Zare. 1995. « Research ArticleReal-Time Detection of Single Molecules in Solution by Confocal Fluorescence Microscopy ». *Analytical Chemistry* 67 (17): 2849-2857.
- Nie, S., et R.N. Zare. 1997. « Optical detection of single molecules ». *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 26 (1): 567–596.
- Nixon, G. I., et G. W. Slater. 1994. « DNA electrophoretic collisions with single obstacles ». *Physical Review E* 50 (6): 5033-5039.
- Norton, I. T., D. M. Goodall, K. R. J. Austen, E. R. Morris, et D. A. Rees. 1986. « Dynamics of molecular organization in agarose sulphate ». *Biopolymers* 25 (6): 1009-1029.
- Odom, T. W, V. R Thalladi, J. C Love, et G. M Whitesides. 2002. « Generation of 30- 50 nm Structures Using Easily Fabricated, Composite PDMS Masks ». *J. Am. Chem. Soc* 124 (41): 12112–12113.
- Ogawa, R., H. Ogawa, A. Oki, S. Hashioka, et Y. Horiike. 2007a. « Fabrication of nano-pillar chips by a plasma etching technique for fast DNA separation ». *Thin Solid Films* 515 (12): 5167–5171.
- . 2007b. « Fabrication of nano-pillar chips by a plasma etching technique for fast DNA

separation ». *Thin Solid Films* 515 (12): 5167–5171.

Olivera, B.M., P. Baine, et N. Davidson. 1964. « Electrophoresis of the nucleic acids ». *Biopolymers* 2 (3): 245-257.

Olson, Daniel W., Sarit Dutta, Nabil Laachi, Mingwei Tian, et Kevin D. Dorfman. 2011. « Continuous-time random walk models of DNA electrophoresis in a post array: Part II. Mobility and sources of band broadening ». *ELECTROPHORESIS* 32 (5) (février): 581-587. doi:10.1002/elps.201000467.

Olson, Daniel W., Jia Ou, Mingwei Tian, et Kevin D. Dorfman. 2011a. « Continuous-time random walk models of DNA electrophoresis in a post array: Part I. Evaluation of existing models ». *ELECTROPHORESIS* 32 (février): 573-580. doi:10.1002/elps.201000466.
———. 2011b. « Continuous-time random walk models of DNA electrophoresis in a post array: Part I. Evaluation of existing models ». *ELECTROPHORESIS* 32 (5) (février): 573-580. doi:10.1002/elps.201000466.

Orbach, M. J., D. Vollrath, R. W. Davis, et C. Yanofsky. 1988. « An Electrophoretic Karyotype of *Neurospora crassa* ». *Molecular and Cellular Biology* 8 (4): 1469-1473.

Ou, Jia, Jaeseol Cho, Daniel Olson, et Kevin Dorfman. 2009a. « DNA electrophoresis in a sparse ordered post array ». *Physical Review E* 79 (juin). doi:10.1103/PhysRevE.79.061904. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.79.061904>.
———. 2009b. « DNA electrophoresis in a sparse ordered post array ». *Physical Review E* 79 (6) (juin). doi:10.1103/PhysRevE.79.061904. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.79.061904>.

Ou, Jia, Mark N. Joswiak, Samuel J. Carpenter, et Kevin D. Dorfman. 2011a. « Plasma thinned nanopost arrays for DNA electrophoresis ». *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 29 (1): 011025. doi:10.1116/1.3531693.
———. 2011b. « Plasma thinned nanopost arrays for DNA electrophoresis ». *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 29 (1): 011025. doi:10.1116/1.3531693.

Park, S., Y. S Huh, H. G Craighead, et D. Erickson. 2009. « A method for nanofluidic device prototyping using elastomeric collapse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (37): 15549.

Patel, Prateek D., et Eric S. G. Shaqfeh. 2003. « A computational study of DNA separations in sparse disordered and periodic arrays of posts ». *The Journal of Chemical Physics* 118: 2941. doi:10.1063/1.1532729.

Pawley, J. 1995. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2^e éd. Springer.

Perkins, T. T., S. R. Quake, D. E. Smith, et S. Chu. 1994. « Relaxation of a Single DNA Molecule Observed by Optical Microscopy ». *Science* 264 (5160): 822-826.

Perkins, TT, DE Smith, RG Larson, et S Chu. 1995. « Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow ». *Science* 268 (5207): 83-87.

Persson, F., P. Bingen, T. Staudt, J. Engelhardt, J. O. Tegenfeldt, et Stefan W. Hell. 2011. « Fluorescence Nanoscopy of Single DNA Molecules by Using Stimulated Emission Depletion (STED) ». *Angewandte Chemie International Edition* 50 (juin 6): 5581-5583. doi:10.1002/anie.201100371.

Pielesz, A., et W. Binias. 2010. « Cellulose acetate membrane electrophoresis and FTIR spectroscopy as methods of identifying a fucoidan in *Fucus vesiculosus* Linnaeus ». *Carbohydrate research*.

Piruska, Aigars, Maojun Gong, Jonathan V. Sweedler, et Paul W. Bohn. 2010. « Nanofluidics in chemical analysis ». *Chemical Society Reviews* 39 (3): 1060. doi:10.1039/b900409m.

Popelka, S., Z. Kabatek, J. L. Viovy, et B. Gas. 1999a. « Peak dispersion due to geometration motion in gel electrophoresis of macromolecules ». *Journal of Chromatography A* 838 (1-2): 45-53.

Popelka, S., Z. Kabatek, J.L. Viovy, et B. Gas. 1999b. « Peak dispersion due to geometration motion in gel electrophoresis of macromolecules ». *Journal of Chromatography A* 838 (1-2): 45-53.

Porath, J., et P. Flodin. 1959. « Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation ». *Nature* 183 (4676): 1657-1659.

Probstein, R F. 1994. *Physiochemical Hydrodynamics: An Introduction*. 2^e éd. New York: John Wiley & Sons Inc.

Qiao, R. 2006. « Effects of molecular level surface roughness on electroosmotic flow ». *Microfluidics and Nanofluidics* 3 (1) (juin): 33-38. doi:10.1007/s10404-006-0103-x.

Ranade, S. S., C. Bomann Chung, G. Zon, et V. L. Boyd. 2009. « Preparation of genome-wide DNA fragment libraries using bisulfite in polyacrylamide gel electrophoresis slices with formamide denaturation and quality control for massively parallel sequencing by oligonucleotide ligation and detection ». *Analytical Biochemistry* 390: 126-135.

Randall, Greg C., et Patrick S. Doyle. 2005. « DNA Deformation in Electric Fields: DNA Driven Past a Cylindrical Obstruction ». *Macromolecules* 38 (mars): 2410-2418. doi:10.1021/ma048073g.

———. 2006a. « Collision of a DNA Polymer with a Small Obstacle ». *Macromolecules* 39 (22) (octobre): 7734-7745. doi:10.1021/ma061375t.

Randall, Greg, et Patrick Doyle. 2004. « Electrophoretic Collision of a DNA Molecule with an Insulating Post ». *Physical Review Letters* 93 (juillet). doi:10.1103/PhysRevLett.93.058102. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.93.058102>.

Rayan, Gamal, Jean-Erik Guet, Nicolas Taulier, Frederic Pincet, et Wladimir Urbach. 2010. « Recent Applications of Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) to Membrane Bio-Macromolecules ». *Sensors* 10 (juin 10): 5927-5948. doi:10.3390/s100605927.

Reisner, Walter, Keith Morton, Robert Riehn, Yan Wang, Zhaoning Yu, Michael Rosen, James Sturm, Stephen Chou, Erwin Frey, et Robert Austin. 2005a. « Statics and Dynamics of Single DNA Molecules Confined in Nanochannels ». *Physical Review Letters* 94 (19) (mai).

doi:10.1103/PhysRevLett.94.196101. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.94.196101>.
———. 2005b. « Statics and Dynamics of Single DNA Molecules Confined in Nanochannels ». *Physical Review Letters* 94 (19) (mai). doi:10.1103/PhysRevLett.94.196101. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.94.196101>.

Reyes, Darwin R., Dimitri Iossifidis, Pierre-Alain Auroux, et Andreas Manz. 2002. « Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology ». *Analytical Chemistry* 74 (12) (juin): 2623-2636. doi:10.1021/ac0202435.

Rigler, R., Ü. Mets, J. Widengren, et P. Kask. 1993. « Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion ». *European Biophysics Journal* 22 (3): 169–175.

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

Rogers, J. A., K. E Paul, R. J Jackman, et G. M Whitesides. 1997. « Using an elastomeric phase mask for sub-100 nm photolithography in the optical near field ». *Applied Physics Letters* 70: 2658.

———. 1998. « Generating 90 nanometer features using near-field contact-mode photolithography with an elastomeric phase mask ». *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* 16: 59.

Ruiz-Martinez, M.C., J. Berka, A. Belenkii, F. Foret, A.W. Miller, et B.L. Karger. 1993. « DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection ». *Analytical chemistry* 65 (20): 2851–2858.

Rust, Michael J, Mark Bates, et Xiaowei Zhuang. 2006. « Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) ». *Nature Methods* 3 (août 9): 793-796. doi:10.1038/nmeth929.

Sanders, Giles, H.W., et Andreas Manz. 2000. « Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis ». *Trends in Analytical Chemistry* 19 (6): 364-378.

Sanger, F., S. Nicklen, et A.R. Coulson. 1977. « DNA sequencing with chain-terminating inhibitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463.

Saville, P. M., et E. M. Sevick. 1999. « Collision of a Field-Driven Polymer with a Finite-Sized Obstacle: A Brownian Dynamics Simulation ». *Macromolecules* 32 (février): 892-899. doi:10.1021/ma981049g.

Saxton, M.J. 2009. « Single Particle Tracking ». *Fundamental Concepts in Biophysics*: 1–33.

Schmid, H., et B. Michel. 2000. « Siloxane Polymers for High-Resolution, High-Accuracy Soft Lithography ». *Macromolecules* 33 (8) (avril): 3042-3049. doi:10.1021/ma982034l.

Schon, E., T. Evans, J. Welsh, et A. Efstratiadis. 1983. « Conformation of promoter DNA: fine mapping of S1-hypersensitive sites ». *Cell* 35 (3): 837–848.

Schütz, G. J., et P. Hinterdorfer. 2002. « Single molecule fluorescence and force microscopy ». *Experimental Gerontology* 37: 1493-1509.

- Schwartz, D.C., et C.R. Cantor. 1984. « Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis ». *Cell* 37 (1): 67–75.
- Selvin, P.R. 2000. « The renaissance of fluorescence resonance energy transfer ». *nature structural biology* 7 (9): 730–734.
- Sergé, Arnauld, Nicolas Bertaux, Hervé Rigneault, et Didier Marguet. 2008. « Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes ». *Nature Methods* 5 (juillet 6): 687-694. doi:10.1038/nmeth.1233.
- Sevick, E. M., et D. R. M. Williams. 1994. « Motion of polyelectrolyte chain hooked around a post ». *Physical Review E* 50 (5): 3357-3360.
- Shaffer, E.O.I.I., et M. Olvera de La Cruz. 1989. « Dynamics of gel electrophoresis ». *Macromolecules* 22 (3): 1351–1355.
- Siliprandi, D, H Siliprandi, et H Lis. 1954. « Separation and determination of vitamin B6 group (pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxal-phosphate and pyridoxamine-phosphate: Separation by paper electrophoresis of riboflavin (riboflavin, FMN, and FAD) and of nicotinamide (nicotinamide, DPN and TPN) groups ». *Biochim. Biophys. Acta* 14: 212.
- Slater, G. W., et J. Noolandi. 1985. « New Biased-Reptation Model For Charged Polymers ». *Physical Review Letters* 55 (15): 1579-1582.
- Smith, D. C., et W. Murchison. 1959. « The routine use of cellulose acetate strips in serum protein zone electrophoresis. » *The Journal of medical laboratory technology* 16: 197-200.
- Smith, D. E, H. P Babcock, et S. Chu. 1999a. « Single-polymer dynamics in steady shear flow ». *Science* 283 (5408): 1724.
- Smith, D. E, T. T Perkins, et S. Chu. 1996. « Dynamical scaling of DNA diffusion coefficients ». *Macromolecules* 29 (4): 1372–1373.
- Smith, D.E., H.P. Babcock, et S. Chu. 1999b. « Single-polymer dynamics in steady shear flow ». *Science* 283 (5408): 1724.
- Smithies, O. 1955. « Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults ». *Biochemical Journal* 61 (4): 629.
- Smithies, O., et N. F. Walker. 1955. « Genetic Control of some Serum Proteins in Normal Humans ». *Nature* 176: 1265-1266.
- Soni, G. V., et A. Meller. 2007. « Progress toward Ultrafast DNA Sequencing Using Solid-State Nanopores ». *Clinical Chemistry* 53 (septembre 21): 1996-2001. doi:10.1373/clinchem.2007.091231.
- Spiering, V. L., S. Bouwstra, et R. M. E. J. Spiering. 1993. « On-chip decoupling zone for package-stress reduction ». *Sensors and Actuators A* 39: 149-156.

- Steck, T. R. 1994. « Use of low-melt agarose for the efficient isolation of large DNA fragments ». *BioTechniques* 17 (4): 676-678.
- Stellwagen, N. C., C. Gelfi, et P. G Righetti. 1997. « The Free Solution Mobility of DNA ». *Biopolymers* 42: 687-703.
- Swerdlow, H., S. Wu, H. Harke, et N. J. Dovichi. 1990. « Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing : Laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette ». *Journal of Chromatography A* 516 (1): 61-67.
- Tang, K. C., E. Liao, W. L. Ong, J. D. S. Wong, A. Agarwal, R. Nagarajan, et L. Yobas. 2006. « Evaluation of bonding between oxygen plasma treated polydimethyl siloxane and passivated silicon ». *Journal of micromechanics and microengineering* 16: 155-161.
- Tatarkova, Svetlana, et David Berk. 2005. « Probing single DNA mobility with fluorescence correlation microscopy ». *Physical Review E* 71 (avril). doi:10.1103/PhysRevE.71.041913. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.71.041913>.
- Taylor, G. 1953. « Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 219 (1137): 186-203.
- Teclemariam, Nerayo P., Victor A. Beck, Eric S. G. Shaqfeh, et Susan J. Muller. 2007. « Dynamics of DNA Polymers in Post Arrays: Comparison of Single Molecule Experiments and Simulations ». *Macromolecules* 40 (10) (mai): 3848-3859. doi:10.1021/ma062892e.
- Tegenfeldt, Jonas O., Christelle Prinz, Richard L. Huang, Robert H. Austin, Stephen Y. Chou, Edward C. Cox, James C. Sturm, et Han Cao. 2004. « Micro- and nanofluidics for DNA analysis ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (7) (avril): 1678-1692. doi:10.1007/s00216-004-2526-0.
- Tinland, B., A. Pluen, J. Sturm, et G. Weill. 1997. « Persistence length of single-stranded DNA ». *Macromolecules* 30 (19): 5763-5765.
- Tiselius, Arne. 1937. « A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures ». *Transactions of the Faraday Society* 33: 524. doi:10.1039/tf9373300524.
- Toda, T., T. Fujita, et M. Ohashi. 1982. « Two-dimensional electrophoresis on the layers of cellulose acetate membrane ». *Analytical Biochemistry* 119 (1): 167-176.
- Turmel, C., E. Brassard, G.W. Slater, et J. Noolandi. 1990. « Molecular detrapping and band narrowing with high frequency modulation of pulsed field electrophoresis ». *Nucleic acids research* 18 (3): 569.
- Turner, S., M. Cabodi, et H. Craighead. 2002. « Confinement-Induced Entropic Recoil of Single DNA Molecules in a Nanofluidic Structure ». *Physical Review Letters* 88 (mars). doi:10.1103/PhysRevLett.88.128103. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.88.128103>.
- Viero, Y., Q. H. He, et A. Bancaud. « Efficient Prototyping of large-Scale PDMS and Silicon Nanofluidic devices using PDMS-base Phase Shift Lithography ». *Microfluidics and*

Nanofluidics.

- Viovy, J. L. 2000a. « Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms ». *Reviews of Modern Physics* 72 (3): 813.
- . 2000b. « Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms ». *Reviews of Modern Physics* 72 (3): 813.
- Voelkerding, K. V., S. A. Dames, et J. D. Durtschi. 2009. « Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics ». *Clinical Chemistry* 55 (février 6): 641-658. doi:10.1373/clinchem.2008.112789.
- Volkmuth, W D, et R H Austin. 1992a. « DNA electrophoresis in microlithographic arrays ». *Nature* 358 (6387) (août 13): 600-602. doi:10.1038/358600a0.
- Volkmuth, W. D., T. Duke, R. H. Austin, et E. C. Cox. 1995. « Trapping of branched DNA in microfabricated structures ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (15): 6887.
- Volkmuth, W. D., T. Duke, M. C. Wu, R. Austin, et A. Szabo. 1994. « DNA Electrodifffusion in a 2D Array of Posts ». *Physical Review Letters* 72 (13): 2117-2120.
- Volkmuth, W. D., T. Duke, M. C. Wu, et R. H. Austin. 1994. « DNA Electrodifffusion in a 2D Array of Posts ». *Physical Review letters* 72 (13): 2117-2120.
- Volkmuth, W. D., et R H Austin. 1992b. « DNA electrophoresis in microlithographic arrays ». *Nature* 358: 600-602.
- Wang, X., C. Cheng, S. Wang, M. Zhao, P.K. Dasgupta, et S. Liu. 2009. « Nanocapillaries for Open Tubular Chromatographic Separations of Proteins in Femtoliter to Picoliter Samples ». *Analytical chemistry* 81 (17): 7428–7435.
- Wang, X., V. Veerappan, C. Cheng, X. Jiang, R.D. Allen, P.K. Dasgupta, et S. Liu. 2009. « Free Solution Hydrodynamic Separation of DNA Fragments from 75 to 106 000 Base Pairs in A Single Run ». *Journal of the American Chemical Society* 132 (1): 40–41.
- Wang, X., S. Wang, V. Veerappan, C.K. Byun, H. Nguyen, B. Gendhar, R.D. Allen, et S. Liu. 2008. « Bare Nanocapillary for DNA Separation and Genotyping Analysis in Gel-Free Solutions without Application of External Electric Field ». *Analytical chemistry* 80 (14): 5583–5589.
- Weiss, M. 2004. « Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments ». *Traffic* 5 (9): 662–671.
- Weiss, S. 1999. « Fluorescence spectroscopy of single biomolecules ». *Science* 283 (5408): 1676.
- Wennmalm, S., L. Edman, et R. Rigler. 1997. « Conformational fluctuations in single DNA molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (20): 10641.
- Whitesides, George M. 2011a. « What Comes Next? » *Lab on a Chip* 11: 191. doi:10.1039/c0lc90101f.
- . 2011b. « What Comes Next? » *Lab on a Chip* 11 (2): 191. doi:10.1039/c0lc90101f.

Woolley, A. T, et R. A Mathies. 1994. « Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (24): 11348.

Yuen, P. K. 2008. « SmartBuild-a truly plug-n-play modular microfluidic system. » *Lab on a Chip* 8 (8): 1374-1378.

Zhou, W., Y. Huang, E. Menard, N. R. Aluru, J. A. Rogers, et A. G. Alleyne. 2005. « Mechanism for stamp collapse in soft lithography ». *Applied Physics Letters* 87 (25): 251925. doi:10.1063/1.2149513.

Development of fluidic systems dedicated to DNA manipulation through nanopilar arrays: study at the single-molecule scale and application to separation.

In most cases, separation by size of DNA molecules, a crucial step for sequencing, is realized by gel electrophoresis, unadapted to long molecule separation: it is consequently relevant to investigate alternative separation techniques. We have used an alternative fabrication technology, Phase Shift Lithography, to fabricate obstacle matrices which sizes range from 80 to 500 nm, with cylindrical or ellipsoidal shapes. These matrices allowed us to investigate DNA-obstacle collision dynamics at the single molecule scale, by the characterisation of actuation effects (electrophoretic or hydrodynamic) and of the size and shape of the obstacles on these dynamics, involved in the separation by size process. We finally showed the first hydrodynamic separation of DNA fragments into nanopilar matrices.

AUTEUR : Yannick VIERO

TITRE : Développement de systèmes fluidiques dédiés à la manipulation d'ADN dans des réseaux de nanoplots : étude à l'échelle de la molécule unique et application à la séparation

DIRECTEURS DE THESE : Jean-Yves FOURNIOLS et Aurélien BANCAUD

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 13 décembre 2011 au LAAS/CNRS

RESUME :

Dans la majeure partie des cas, la séparation en taille de molécules d'ADN, étape primordiale lors d'un séquençage, est réalisée par électrophorèse sur gels, inadaptée à la séparation de longues molécules : la recherche de techniques de séparation alternatives est donc primordiale. Nous avons utilisé une technologie de fabrication alternative, la Lithographie par Décalage de Phase, pour fabriquer des matrices d'obstacles de 80 à 500 nm de diamètre, de formes cylindrique ou ellipsoïdale. Ces matrices nous ont permis de mener une étude des dynamiques de collision ADN-obstacle à l'échelle de la molécule individuelle, par la caractérisation des effets de l'actionnement (électrophorétique ou hydrodynamique), de la dimension et de la forme des obstacles sur ces dynamiques, impliquées dans le processus de séparation en taille. Nous montrons enfin la première séparation hydrodynamique de fragments d'ADN dans des réseaux d'obstacles nanométriques.

MOTS-CLES :

Micro-nanofluidique, Phase-Shift Lithography, nanoplots, ADN, molécule unique, séparation hydrodynamique

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Micro-Nanosystèmes

LABORATOIRE : Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes, 7 avenue du colonel Roche, 31077 Toulouse cedex 4