



Fonctionnalisation de surface et intégration de colloïdes par assemblage dirigé

François-Damien Delapierre

► To cite this version:

François-Damien Delapierre. Fonctionnalisation de surface et intégration de colloïdes par assemblage dirigé. Bibliothèque électronique [cs.DL]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66383 . tel-00828146

HAL Id: tel-00828146

<https://theses.hal.science/tel-00828146>

Submitted on 30 May 2013

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 DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Physique

École doctorale : « La physique, de la particule au solide »

réalisée

à l'Institut Curie

présentée par

François-Damien DELAPIERRE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Fonctionnalisation de surface et intégration de colloïdes par
assemblage dirigé**

soutenue le 8 octobre 2012

devant le jury composé de :

**M^{me} Régine PERZYNSKI
M^{me} Anne-Marie GUÉ
M. Yves FOUILLET
M. Christophe VIEU
M. Jean-Louis VIOVY
M. Laurent MALAQUIN**

**Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Membre Invité**

Remerciements

Voici donc venu le moment des remerciements. De très nombreuses personnes m'ont accompagné au cours de ces années de thèse, et j'espère n'en oublier aucune.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à Jean-Louis et à Laurent pour m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de leur équipe, pour avoir dirigé mes travaux, et pour toutes les discussions très stimulantes scientifiquement que nous avons pu avoir ensemble. Je tiens aussi à les remercier pour leur façon toujours très positive de penser, ce qui est très agréable lorsque l'on est thésard.

Je tiens ensuite à remercier ceux avec qui j'ai travaillé : Guillaume Mottet, Jonathan, Scott, Velan, Naïs... ceux qui m'ont aidé matériellement ou scientifiquement : Angela Taddei, Clémentine Brocas, Myriam Ruault, Daniel Lopez, Jean-Hugues Codarbox, Benoit Lemaire, Remy Fert, Pascal Martin, Denis Bartolo, Axel Buguin et Pascal Silberzan...

Je souhaite aussi remercier ceux avec qui j'ai passé ces quatre années de thèse, à commencer par Sanae et Youba qui m'ont beaucoup encouragé lorsqu'il le fallait. Et toute l'équipe Viovy. Je vais commencer par les anciens qui m'ont chaleureusement accueilli : Giulia bien sûr, et Virginie, Laure, Sandrine, Aurélie, Pierre, Ludovic, Rafaële, Judith, Guillaume Colas, Nadia, Olivier, Francesca, Stefano, Paolo, Giovanni, Manu, Anne, Reza, Fabien... ! Je poursuivrai avec les membres de ma promotion et des premières promotions suivantes : Anaïs, Maeva, Nadège, Julien, Morgan, Karla, Scott, Guillaume Mottet, et je finirai par nos petits derniers : Stéphanie, Jérôme, Sylvain, Benoit, Velan, Bruno, Marine, Qihao, Ezgi, Iago...

Je tiens enfin à remercier ma famille qui m'a soutenu et encouragé au cours de ces laborieuses années...

A tous un grand merci !



Fonctionnalisation de surface et intégration de colloïdes par assemblage dirigé

Nous présentons des procédés de fonctionnalisation de surface par assemblage dirigé de colloïdes en suspension. La motivation de ce projet est de montrer que des techniques simples fondées sur des phénomènes de démouillage de suspensions colloïdales permettent de diriger le dépôt de particules sur des surfaces structurées, de façon déterministe avec une résolution micrométrique. L'objectif de ces travaux est de développer une technique de structuration simple, polyvalente et utilisable en routine. Deux verrous technologiques majeurs ont été levés : d'une part l'optimisation des paramètres d'assemblage a permis d'étendre considérablement les vitesses d'assemblage et d'autre part, l'optimisation des structures de capture a rendu possible le multiplexage des dépôts et la création de réseaux imbriqués de particules de types différents. Ce processus a été appliqué avec succès à des particules magnétiques. Ces particules fixées à la surface peuvent servir de points d'ancrage pour des colonnes magnétiques. Plusieurs exemples d'applications telles que la capture de cellules au sein de liquides biologiques, la fabrication de micro-flagelles artificielles, ou de micro-capteurs de force ont été développées. Ces techniques ont également été adaptées pour l'assemblage de cellules, de levures et de bactéries sur des surfaces. Cela a conduit au développement de substrats de capture et de mise en culture permettant la création de réseaux constitués de plusieurs types de cellules précisément localisées.

Surface patterning and integration of colloids by directed assembly

We present here a surface patterning process based on the directed assembly of colloids in a suspension. The technique uses a suspension drop which is dragged along a surface with or without structures. Due to capillary or hydrodynamic forces, colloids self-organize on the surfaces. This directed assembly process has been successfully used for the organization of particles at high speed. We focused our interest on the capture of magnetic particles that can be used as anchor points for the formation of magnetic columns. We developed several applications dedicated to the capture of cells in biological fluids, the fabrication of artificial microcilia and the development of force sensors. In the latter case, the stiffness of magnetic columns has been measured depending on several parameters, allowing us to estimate the forces acting on them by monitoring their deflection. These assembly techniques have been extended to the capture and deposition of yeasts or bacteria cells on surfaces. In the case of mammalian cells, specific patterns were designed for the selective trapping of colloids, thus allowing the creation of imbricated networks of different populations of particles. When functionalized with antibodies, these particles can induce the capture of a specific

cell type. Such networks of particles can be used to create complex cells assemblies with precise localization.

Mots-clefs:

Auto-assemblage

Assemblage capillaire

Mouillage

Particules magnétiques

Bio-patterning

Colonnes magnétiques

Keywords :

Self-assembly

Capillary assembly

Wetting

Magnetic particles

Biopatterning

Magnetic columns

Cette thèse a été préparée à l'Institut Curie, au laboratoire Physico-Chimie Curie (UMR 168).

Institut Curie

Laboratoire Physico-Chimie Curie

11 rue Pierre et Marie Curie

75005 PARIS

FRANCE

Sommaire

Remerciements	3
Glossaire	11
Introduction.....	13
I. L'assemblage capillaire et convectif.....	15
1. Contexte	15
2. L'auto-assemblage en suspension.....	17
a) La tension de surface.....	17
b) Vers un assemblage dirigé au sein de suspensions : Effet « coffee stain ».....	18
c) Micro et nano objets pour l'assemblage	20
3. Description des mécanismes d'assemblage.....	21
a) Organisation des particules en réseaux compacts à deux dimensions : l'assemblage convectif.....	21
b) Placement de particules isolées : l'assemblage capillaire	23
c) Approche expérimentale.....	24
4. L'assemblage convectif.....	27
a) Contrôle de la vitesse de croissance : température et taux d'évaporation	28
b) Croissance de couches multiples.....	30
c) Structure des couches assemblées	31
d) Influence de la taille des particules et de leur mobilité	35
5. L'assemblage capillaire.....	36
a) Contrôle de l'évaporation	36
b) Contrôle du mouillage	38
c) La vitesse du ménisque.	40
d) Influence de la forme et de la dimension des motifs.....	41
e) Influence de la nature des particules	44
6. Exemples d'applications.....	45
a) Les cristaux photoniques.....	45
b) Intégration de nanoparticules d'or : applications en optique et en électronique	46
c) Extension de l'assemblage capillaire aux systèmes biologiques : capture de cellules.....	47
7. Conclusion	49
II. Fonctionnalisation de surface par assemblage capillaire et applications.....	51
1. Description des protocoles et du montage expérimental.....	51
a) Système d'assemblage	51

b)	Fabrication des substrats	56
c)	Contrôle de l'angle de contact	59
2.	Vers un assemblage à haute vitesse.....	61
a)	Les paramètres influençant l'assemblage de particules en suspension.	61
b)	Cas des particules denses : application aux particules magnétiques.....	62
c)	Influence des conditions de mouillage.....	69
d)	Influence de la vitesse de déplacement du substrat.....	71
e)	Vers un assemblage à haute vitesse.....	73
3.	Transfert	76
a)	Principe général.....	76
b)	Résultats	77
4.	Application à l'assemblage de colonnes magnétiques.....	88
a)	Suspension magnétique sous champ	88
b)	Motifs complexes	92
c)	Réalisation de structures pour la capture de cellules	93
d)	Battement collectif de microcils artificiels	96
e)	Réalisation de microcapteurs de forces	97
5.	Synthèse	98
III.	Capture cellulaire et multiplexage	99
1.	Introduction.....	99
2.	Assemblage dirigé de cellules.....	100
a)	Contexte	100
b)	Assemblage de Levures	100
c)	Bactérie Escherichia. Coli.....	107
d)	Cellules de mammifères	115
e)	Conclusion	116
3.	Multiplexage de particules fonctionnalisées : application à l'immobilisation de cellules de mammifères.	117
a)	Contexte	117
b)	Principe.....	119
c)	Résultat.....	120
d)	Application à la capture de cellules humaines	125
e)	Conclusion	131
IV.	Intégration de colonnes magnétiques auto-assemblées : Application à la fabrication de microcapteurs de force.	133

1. Introduction.....	133
2. Applications.....	134
3. Notions de mécanique : raideur et raideur de pivot.....	135
4. Observation de la courbure de la colonne.....	138
5. Modèle	140
a) Organisation des dipôles	140
b) Raideur de la colonne.....	142
6. Matériel et méthode	145
a) Principe de la mesure.....	145
b) Technique de mesure.....	147
c) Champ magnétique et création de colonnes	148
7. Etude expérimentale de la raideur.....	149
a) Au sein d'une même colonne.....	150
b) Au sommet de plusieurs colonnes	151
c) Variation de K_p/L en fonction du champ	152
8. Verrous technologiques	154
a) Contrôler l'accrochage spécifique des particules.....	154
b) Contrôler la hauteur des colonnes	155
9. Conclusion	155
Conclusion	157
Bibliographie.....	159

Glossaire

BSA	- Bovine Serum Albumin (albumine de sérum bovin).
COC	- Cyclic Olefin Copolymer (polymère thermoplastique)
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium (milieu minimum essentiel de Eagle). Milieu de culture cellulaire.
EpCAM	- Epithelial cell adhesion molecule (glycoprotéine).
FACS	- Fluorescence Activated Cell Sorting (technique de cytométrie en flux).
FBS	- Fetal Bovine Serum (sérum fœtal de veau).
FFT	- Fast Fourier Transform (algorithme de calcul de la transformée de Fourier discrète).
G401	- Cellules de tumeurs rhabdoïdes du rein.
GBSS	- Gey's balanced salt solution (Solution saline de Gey).
Jurkat	- Cellules de leucémie (lymphocytes T).
LB	- Lysogeny Broth (milieu de culture pour bactéries).
MCF-7	- Acronyme de « Michigan Cancer Foundation – 7 », cellules de cancer du sein.
NOA 61	- Norland Optical Adhesive 61 (polymère photoréticulable).
Ovcar	- Human ovarian carcinoma (Cellules de carcinome d’ovaire humain).
Pattern	- Structure (Anglicisme).
Patterné	- Structuré (Anglicisme).
Patterning	- Fonctionnalisation ou structuration de surface (Anglicisme).
PBS	- Phosphate Buffered Saline (Tampon phosphate salin).
PDMA-AGE	- Poly(dimethylacrylamide)-co-allyl glycidyl ether.
PDMS	- Polydiméthylsiloxane.
PEG-DA	- Polyéthylèneglycol-diacrylate.

PMMA	- Polymethyl Methacrylate (Polyméthacrylate de méthyl).
PS	- Polystyrène.
Raji	- Lymphocytes B d'un lymphome de Burkitt.
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute medium. Milieu de culture cellulaire.
SDS	- Sodium Dodecyl Sulfate (Dodécylsulfate de sodium).
SU8-2002	- Résine époxy photosensible (MicroChem).
VLS	- Vapor liquid solid process (mécanisme de croissance de structure à 1D par dépôt chimique en phase vapeur).
YNBAS	- Yeast Nitrogen Bases (milieu de culture pour levures).

Introduction

Les importants progrès réalisés durant les dernières années dans le domaine des micro/nanotechnologies ont ouvert des perspectives fascinantes pour le développement d'applications dans les sciences du vivant.

D'un côté, les "problèmes" soulevés par la biologie sont à mettre en relation avec l'explosion des biotechnologies qui ont rendu possible le séquençage du génome humain et qui ouvrent désormais de nombreuses perspectives. La « biologie des systèmes », en particulier, n'a été rendue possible que par l'avènement de méthodes d'analyse biomoléculaire nouvelles, et constitue un nouveau paradigme en train de bouleverser profondément la biologie.

D'un autre côté, la physique de la matière a fait émerger de nouveaux "outils" pour maîtriser la structuration de la matière à l'échelle nanométrique. Il existe des enjeux majeurs consistant à mettre en œuvre les nouveaux savoir-faire issus des développements de la nanophysique (microscopes en champ proche, nanocomposants...) et les avancées spectaculaires de la chimie (polymères, auto-assemblage, chimie supramoléculaire, greffage,...) au service de l'étude des mécanismes biologiques fondamentaux à l'échelle de la biomolécule unique (croissance cellulaire, moteurs biologiques, activités enzymatiques, machineries ADN, ARN...).

Dans ce contexte, le développement de dispositifs permettant de contrôler d'une part l'organisation de molécules ou de cellules à une échelle micrométrique et d'autre part les interactions de ces mêmes entités avec leur environnement reste déterminant pour de nombreuses applications.

Si nous considérons par exemple la biologie cellulaire ou bien encore l'analyse de biomolécules, certaines applications requièrent l'immobilisation de cellules en des points précis d'un dispositif pour étudier leur comportement sur des temps longs en modifiant leur environnement ou encore pour réaliser des interactions avec des cellules immobilisées dans leur voisinage. D'autres applications d'analyse requièrent un dépôt localisé de biomolécules, par exemple pour réaliser des puces à protéines ou à ADN. D'un point de vue général, les techniques permettant de réaliser une bio-fonctionnalisation de surface doivent reposer sur des mécanismes simples et reproductibles, offrir une bonne résolution spatiale, permettre de répondre à des contraintes de rendement et bien sûr, conserver la fonctionnalité ou la viabilité des objets considérés.

Cette thèse étudie certaines techniques permettant de fonctionnaliser des surfaces à partir d'une suspension colloïdale. Ces colloïdes peuvent être des cellules vivantes ou bien des particules inertes qui peuvent être elles-mêmes porteuses d'une fonctionnalisation de surface ou bien être employées pour leurs propriétés physiques (conductivité, magnétisme, propriétés optiques...). Les techniques auxquelles nous nous sommes intéressés exploitent des procédés d'assemblages dirigés de colloïdes sur des surfaces. Elles sont fondées sur le contrôle de la topographie et du mouillage de la surface pour favoriser l'intégration de particules ou de cellules. Nous verrons que ces techniques permettent de procéder à des fonctionnalisations simplement, rapidement et à bas coût. Par ailleurs, elles sont compatibles avec la réalisation de dispositifs microfluidiques.

La première partie de ce manuscrit de thèse sera consacrée à une description des techniques d'assemblage capillaire et convectif ainsi qu'à un aperçu général de leurs applications actuelles. Ce chapitre se veut avant tout pédagogique: nous nous attarderons sur les différentes variantes proposées à ce jour, en proposant à la fois une description des mécanismes physiques impliqués et une discussion autour des contraintes expérimentales liées à leur mise en œuvre.

Dans un second temps, nous étudierons une nouvelle variante de ces procédés adaptée à l'assemblage de particules magnétiques. Nous décrirons également un procédé générique permettant de transférer et d'intégrer aisément les assemblages de colloïdes depuis un premier substrat vers d'autres surfaces. Nous verrons comment nous avons pu lever deux verrous technologiques majeurs : i) l'assemblage de particules lourdes peu mobiles, ii) l'amélioration des vitesses d'assemblage. Ces développements ont permis de transformer l'assemblage capillaire en technique de patterning générique. Nous montrerons des exemples d'applications que ces travaux ont permis de réaliser.

Dans le troisième chapitre nous montrerons qu'il est possible d'étendre le champ d'application de ces techniques au domaine des sciences du vivant, en particulier de la biologie cellulaire. Nous présenterons les méthodes originales que nous avons développées pour le patterning d'une surface avec des objets vivants (levures, bactéries, cellules de mammifère), ce qui permet d'envisager des études biologiques très intéressantes à l'échelle d'une cellule unique.

Enfin, sur la base des techniques d'assemblage mises au point et du savoir-faire que nous avons acquis tout au long de ces travaux autour de la manipulation de particules magnétiques, nous présenterons un dispositif micrométrique de mesure de force d'un genre nouveau ; depuis son élaboration, qui passe par l'emploi de surfaces fonctionnalisées par des colloïdes, jusqu'à ses applications potentielles en biophysique.

Bonne lecture.

I. L'assemblage capillaire et convectif

Ce chapitre est inspiré du chapitre 15 du livre¹ « Nanoscale Liquid Interfaces: Wetting, Patterning and Force Microscopy at the Molecular Scale » écrit par François-Damien Delapierre, Laurent Malaquin, Jean-Louis Viovy et publié par Pan Stanford Publishing (2012)

ISBN-13: 978-9814316453

1. Contexte

D'importants progrès ont été faits dans le domaine de la synthèse et de la production à large échelle de colloïdes et d'agrégats au cours des dernières décennies. Pouvoir synthétiser ces micro/nanoblocs de construction, de matériaux, formes et fonctionnalités variés est un enjeu essentiel pour le développement des nanosciences et l'avancement des techniques de miniaturisation. Bien que ces « éléments de construction » soient connus depuis longtemps, le développement des techniques de synthèse et de caractérisation ouvre de nouvelles perspectives d'applications.²⁻⁸ Les nanoparticules présentent en effet des propriétés uniques (électroniques, optiques, catalytiques...), du fait de leurs faibles dimensions, qui diffèrent nettement de celle du matériau massif les constituant, c'est à dire considéré à une échelle macrométrique. Un défi important demeure cependant : afin d'intégrer ces particules dans des dispositifs, il est nécessaire de contrôler leurs arrangements à 1D, 2D et/ou 3D, selon les applications. En effet, certaines des propriétés les plus remarquables n'apparaissent que lorsque ces particules s'arrangent en structures ordonnées. Les réseaux périodiques de particules, par exemple, présentent d'intéressantes propriétés optiques ou magnétiques qui sont essentielles pour développer des structures photoniques,⁹⁻¹¹ des capteurs chimiques¹² ou des systèmes de stockage de données.¹³ Pour ce type d'application, la qualité des assemblages de particules et les propriétés de symétrie des réseaux ont un impact immédiat sur les performances des systèmes. D'autres applications incluant l'électronique,¹⁴ la plasmonique¹⁵⁻¹⁷ ou la biologie¹⁸⁻²¹ reposent aussi sur le placement précis de particules sur une surface ou sur les propriétés qui émergent des effets de couplages entre objets au sein de réseaux réguliers.

Dans ce contexte, l'auto-assemblage de particules apparaît comme un procédé de structuration particulièrement intéressant. L'auto-assemblage^{2,6,22,23} peut se définir comme l'organisation spontanée d'entités mobiles en réseaux organisés. Il se réfère à des méthodes de structuration de

type « bottom-up » et peut s'appliquer à une large gamme d'objets, qu'il s'agisse de molécules, de nano ou micro particules...Ce procédé de structuration permet la création en parallèle et de façon spontanée d'un grand nombre de structures. Nous nous intéresseront uniquement à l'auto-assemblage sur des surfaces. L'auto-assemblage sur une surface découle des forces d'interaction qui apparaissent spontanément entre les particules elles-mêmes ou entre les particules et la surface du matériau. Pour engendrer un tel processus, il est nécessaire de disposer d'objets mobiles (les « briques »), de forces à longue portée qui assurent le transport de masse, et de forces à courte portée qui stabilisent et qui créent un ordre.

Comme nous le verrons tout au long de ce chapitre, les mécanismes à l'origine de l'auto-assemblage donnent accès, à eux seuls, à un nombre restreint de structures. La réalisation d'assemblages complexes nécessite d'introduire des forces supplémentaires de guidage et de confinement. Aussi, la dénomination « assemblage dirigé » est souvent préféré à celle d'auto-assemblage. Afin de contrôler la disposition des particules ou la formation de réseaux de périodicité et de compacité définie, l'auto-assemblage est associé avec des modifications locales de la surface : chimiques, électrostatiques, magnétiques ou topographiques. La mouillabilité, la charge ou le relief de telle ou telle zone de la surface sont modifiés préalablement afin d'agir sur le comportement des particules. L'introduction de ces nouvelles interactions de « guidage » permet à l'utilisateur d'employer simultanément plusieurs mécanismes d'organisation afin de fabriquer une structure.

2. L'auto-assemblage en suspension

La majorité des micro/nanoparticules commerciales sont disponibles sous forme de suspension en milieu liquide. Réaliser un auto-assemblage sur une surface directement à partir de la suspension serait donc pratique. Plusieurs processus d'auto-assemblage en suspension sont possibles. Nous nous intéresserons tout particulièrement à deux d'entre eux : l'auto-assemblage convectif et l'auto-assemblage capillaire. Nous parlerons simplement dans la suite d'assemblage convectif ou capillaire afin de ne pas alourdir la lecture. Avant d'aborder ces processus, il nous faut introduire quelques éléments de physique nécessaires à leur compréhension.

a) La tension de surface

Considérons un petit volume de liquide (figure 1.a). Il est constitué d'un grand nombre de molécules en interaction les unes avec les autres. Ces interactions, attractives, sont à l'origine de la cohésion du liquide. Une molécule prise au sein du liquide subit des interactions de ce type selon toutes les directions puisqu'elle est entourée de molécules. Une molécule à l'interface entre le liquide et le milieu extérieur par contre ne subit d'interactions que des molécules du liquide, lequel maintient ainsi sa cohésion. Ce déséquilibre des interactions implique une énergie potentielle plus élevée pour ces molécules, et est donc énergétiquement défavorable. Evidemment, plus la surface est importante et plus le nombre de molécules dans ce cas sera important. Le surcroît total d'énergie potentielle augmente donc avec la surface. Cette différence d'énergie, calculée par unité de surface, est la tension de surface (J.m^{-2}). La tension de surface est une énergie de surface. On peut aussi la considérer comme une force tangentielle (N.m^{-1}) exercée par unité de longueur à l'interface. Cette force s'oppose aux déformations locales de l'interface, à l'origine d'un accroissement de surface. Nous appellerons aussi cette force : « force capillaire ». Plus cette tension est élevée et plus le liquide tendra à minimiser le nombre de molécules à l'interface avec l'extérieur et, pour ce faire, à réduire au maximum sa surface en changeant de forme. Une goutte d'eau en apesanteur prendra par exemple une forme sphérique, forme qui correspond pour un volume donné au minimum de surface. Bien évidemment il s'agit là d'un cas idéal, et il faut compter en général avec les autres forces et interactions, comme le poids.

A l'interface entre deux liquides non miscibles ou entre un liquide et un solide, il y a, de même, dissymétrie des interactions, les molécules du premier liquide n'interagissant pas de la même manière entre elles et avec les molécules du second liquide ou du solide. D'où à nouveau une force capillaire.

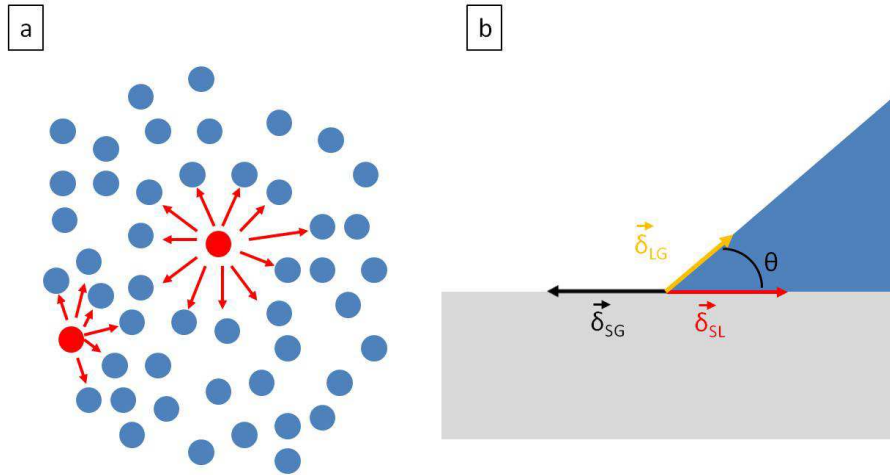


Figure 1 : A gauche, une représentation des interactions avec ses premiers voisins d'une molécule au sein d'un liquide et d'une molécule à son interface. A droite, le bilan des forces capillaires s'exerçant à la ligne de contact liquide/solide/gaz (appelée aussi ligne triple) pour une goutte posée sur un solide. L'interface air-liquide au niveau de la ligne triple (en bleu) est appelée ménisque.

Cette force capillaire joue un rôle particulièrement important lorsqu'il est question de petits volumes, le rapport $\frac{Surface}{Volume}$ étant alors très important.

On peut déduire de cette force capillaire l'angle θ que fera une goutte posée sur une surface dans une atmosphère donnée, en projetant l'équilibre des forces sur le plan solide (figure 1.b). Soit les forces de tensions de surface liquide/gaz δ_{LG} , gaz/solide δ_{GS} , solide/liquide δ_{SL} . On obtient la relation de Young :

$$\delta_{LG} \cos \theta = \delta_{SG} - \delta_{SL}$$

Équation 1

Notons enfin que dans le cas d'une goutte de suspension colloïdale, cette force est susceptible d'agir sur les colloïdes qui ne peuvent franchir l'interface du liquide sans la vaincre. Nous utiliserons dans la suite cet effet pour induire un dépôt sélectif de particules sur des surfaces.

b) Vers un assemblage dirigé au sein de suspensions : Effet « coffee stain »

En relation avec l'essor des micro et nanotechnologies, l'assemblage dirigé a été l'objet d'un intérêt croissant au cours de la dernière décennie.²⁴⁻²⁷ Des forces de guidage très variées ont été testées : magnétiques,²⁸⁻³³ électrostatiques,³⁴⁻³⁸ hydrodynamiques,³⁹ capillaires,^{40,41} gravitationnelles,⁴² chimiques,⁴³⁻⁴⁵ etc. Notre travail ayant surtout porté sur des suspensions de particules, nous nous sommes essentiellement intéressés aux méthodes utilisant les forces capillaires ou les flux de convection. Ces méthodes sont respectivement appelées « assemblage capillaire^{26,46,47} » et

« assemblage convectif^{39,48-51} ». Toutes deux emploient une goutte de suspension déposée sur une surface. Toutes deux profitent de l'effet du confinement des particules qui se produit au niveau de la ligne triple de la goutte (ou ligne de contact) et qui permet d'immobiliser ces particules après démouillage. Ces méthodes sont avantageuses à plus d'un titre. Tout d'abord elles emploient des particules en suspension, ce qui est la forme commerciale la plus habituelle pour celles-ci. Ensuite, ces méthodes, nous allons le voir, sont très simples d'emploi car elles ne nécessitent pas de technologies complexes (champs magnétiques, électriques...). Présentons à présent un exemple simple d'assemblage en suspension. Plus précisément d'assemblage convectif. Il s'agit de l'effet « coffee stain » ou effet « goutte de café ». Lorsqu'une goutte de café s'évapore sur une surface, on observe généralement la formation d'un anneau qui concentre la majeure partie des particules qui étaient en suspension dans la goutte (voir figure 2B).

Cet effet a été expliqué par Deegan et al. en 1997.⁵² Dans le cas d'une goutte de café la ligne de contact est fixe (figure 2A). Lorsque la goutte s'évapore, et perd du volume, elle réduit sa hauteur. La goutte s'évapore aussi au niveau de la ligne de contact, mais ne peut rétrécir en cette zone puisque la ligne de contact est fixe. Du liquide doit donc circuler de l'intérieur de la goutte vers la périphérie pour compenser l'évaporation à la ligne de contact. Ce flux transporte les particules de café sur le bord de la goutte et les y concentre. Celles-ci forment, à la périphérie, des couches de particules (voir figure suivante)

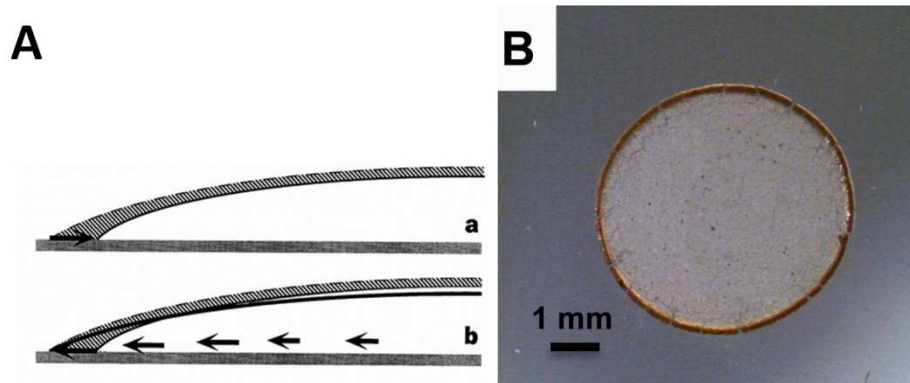


Figure 2 : A.⁵² En haut, une goutte de liquide et le déplacement de son ménisque pendant l'évaporation (flèche noire) si la ligne de contact est mobile. En bas représentation des flux de liquide et de l'évolution de la forme de la goutte (ligne noire) lorsque la ligne de contact est fixe. B. Une goutte de café séchée. On constate la forte concentration des particules sur la périphérie de la tache, d'où la formation d'un anneau brun.

Les particules de café s'arrangent spontanément en couche sur la périphérie de la goutte, du fait des flux d'évaporation et du blocage de la ligne de contact. Dans les procédés d'assemblage capillaire et convectif, ce sont des phénomènes analogues qui sont mis en œuvre et contrôlés afin de réaliser des structures organisées de particules.

c) Micro et nano objets pour l'assemblage

De nombreux objets sont susceptibles d'être organisés sur des surfaces par assemblage capillaire ou convectif. Ces objets doivent simplement être suffisamment mobiles pour être mis en mouvement par les forces à l'œuvre dans un liquide : ce peuvent être les forces capillaires ou les flux hydrodynamiques. Ces objets peuvent être des particules inertes ou des êtres vivants. Les particules peuvent avoir une taille nanométrique ou micrométrique. Il est même possible de manipuler par ces méthodes des molécules (d'ADN, par exemple).⁵³⁻⁵⁵

3. Description des mécanismes d'assemblage

Dans ce paragraphe, nous nous proposons de décrire en détails les deux mécanismes d'assemblage que nous avons mis en œuvre dans le cadre de ces travaux. Les deux mécanismes utilisent les phénomènes de confinement et les forces capillaires qui apparaissent au niveau de la ligne triple d'une suspension colloïdale sur une surface pour induire l'immobilisation de colloïdes. Nous allons voir que l'assemblage dit « capillaire » se produit pour des angles de contact élevés au ménisque de la goutte. L'assemblage dit « convectif » se produit pour des angles de contact faibles. Dans le cas de suspensions aqueuses, l'assemblage capillaire concernera donc des surfaces plutôt hydrophobes, l'assemblage convectif des surfaces plutôt hydrophiles.

a) Organisation des particules en réseaux compacts à deux dimensions : l'assemblage convectif

L'assemblage convectif se produit sur des surfaces de mouillabilité élevée, typiquement pour des angles de contact inférieurs à environ 20° (figure 3.a). Le mécanisme d'assemblage repose sur les flux de convection induits par l'évaporation de la suspension au niveau du ménisque.^{50,51,56} De cette évaporation résulte un flux hydrodynamique qui entraîne les particules suspendues vers la ligne de contact. Du fait du faible angle de contact, l'avant du ménisque est assimilable une fine couche de liquide : les particules y sont confinées verticalement. L'assemblage commence quand l'épaisseur de la couche de solvant devient comparable à la taille des particules : les forces capillaires (qui apparaissent lorsque le sommet des particules émergent de la surface et les fait s'attirer) organisent les particules en arrangements compacts, cristallins. Une fois l'assemblage initié, la formation de réseaux étendus peut facilement être réalisée en déplaçant le ménisque sur la surface. Les flux d'évaporation assurent alors le transport de masse vers le ménisque et alimentent la zone d'assemblage. Au fur et à mesure du balayage de la surface par le ménisque, l'assemblage est propagé à l'ensemble de la surface.

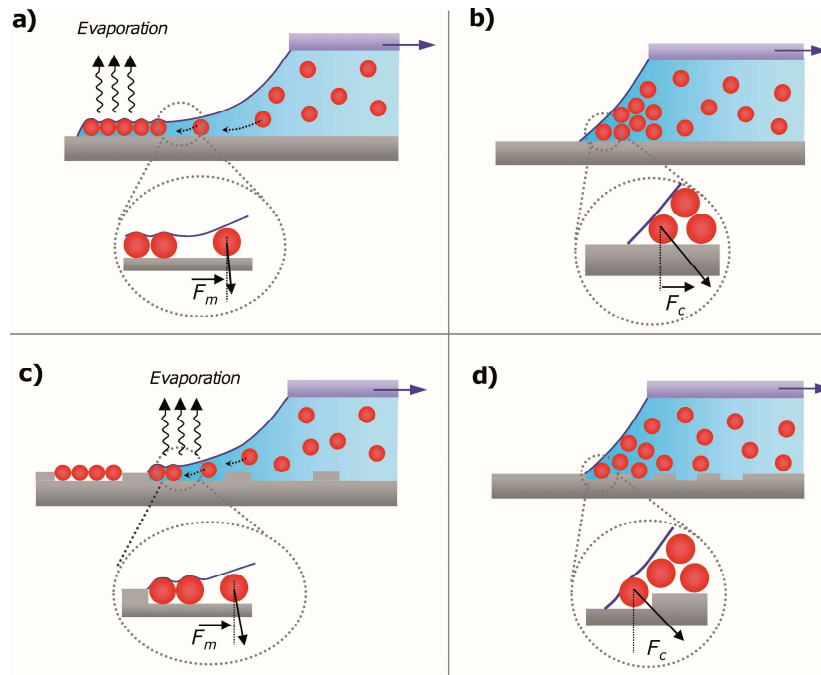


Figure 3 : Illustration des différents mécanismes d'assemblage fondés sur le confinement des particules à la ligne de contact d'une goutte de suspension colloïdale. L'assemblage convectif (a) est obtenu pour des faibles valeurs de l'angle de contact (typiquement $<20^\circ$) et conduit à la formation de structures continues 2D sur des surfaces planes ou à celles d'arrangements discontinus 2D sur des surfaces structurées (c). L'assemblage capillaire est obtenu pour des valeurs élevées de l'angle de contact (typiquement entre 30° et 60°) : aucun dépôt ne se produit sur une surface plane (b) mais sur une surface structurée les forces capillaires et le confinement géométrique (qui résulte du piégeage du ménisque sur les motifs) peuvent conduire à la capture d'une ou de plusieurs particules (d).⁵⁷

Sur une surface plane, l'assemblage convectif conduit spontanément à la formation de couches uniques ou multiples de particules (figure 4). Afin de contrôler la position et les paramètres des réseaux ainsi créés, il est également possible d'utiliser ce processus sur une surface structurée. Cette possibilité sera discutée plus loin.

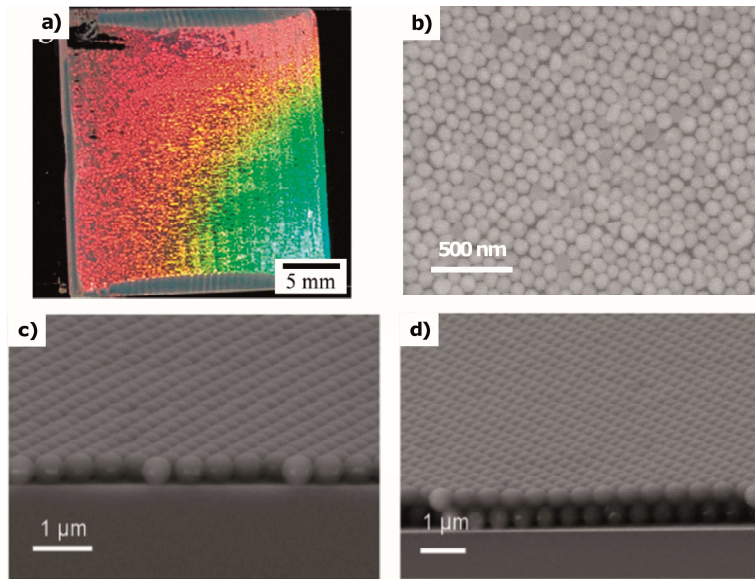


Figure 4 : Exemples de couches 2D fabriquées par assemblage convectif. (a) Exemple de monocouche cristalline obtenue à partir de particules polystyrène/latex. L'ordre cristallin est à l'origine de la diffraction colorée qui apparaît ici sous lumière blanche.⁴⁸ (b) Image en microscopie électronique d'une monocouche de nanoparticules d'or assemblées sur une surface de silicium. (c) mono et (d) bi-couche obtenues avec des particules de polystyrène de 500 nm. Ces structures ont d'abord été assemblées sur un substrat lisse en PDMS puis transférées sur silicium par contact.⁵⁷

b) Placement de particules isolées : l'assemblage capillaire

Lorsque l'angle de contact de la suspension s'accroît au-dessus d'une valeur seuil, la composante horizontale des forces exercées par le ménisque devient suffisante pour empêcher toute immobilisation des particules sur une surface plane (figure 3.b). Sur une surface structurée par contre, cette composante horizontale peut être contrecarrée par une structure verticale susceptible de piéger et de déformer le ménisque. (figure 3.d et figure 5)

Les effets conjoints des forces capillaires (résultant de la distorsion du ménisque au niveau de la structure) et du confinement géométrique (induit par la structure) immobilisent une ou plusieurs particules à proximité de l'obstacle, alors que rien n'est déposé sur les surfaces planes environnantes. Ce procédé est bien adapté à la création de structures discontinues.

Le mécanisme détaillé aboutissant à l'immobilisation d'une particule sur la surface est complexe. On suppose généralement que les forces capillaires créées au moment de la rupture du ménisque contrecarrent les fluctuations thermiques ou tout autre force répulsive qui s'exercerait sur la particule.^{26,46}

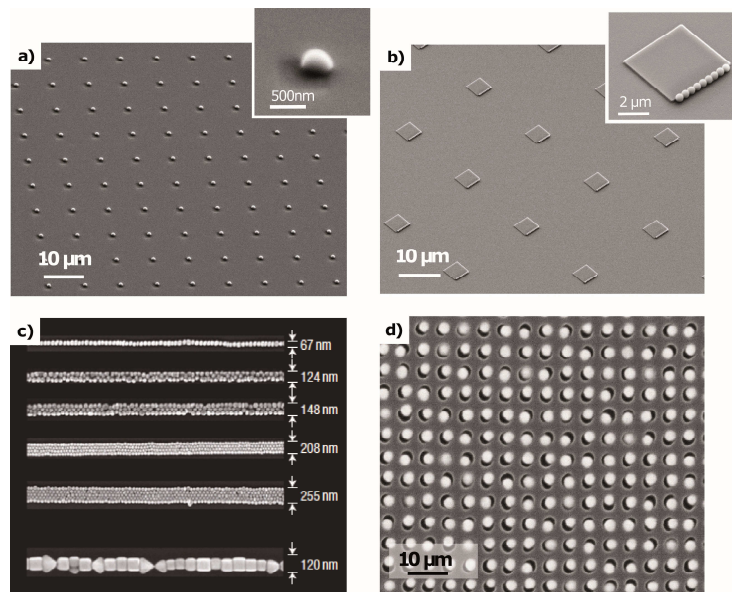


Figure 5 : Exemple de particules de 500 nm de polystyrène (a, b) et de particules d'or de 60-80 nm (c) immobilisées sur du PDMS par assemblage capillaire.⁵⁷⁻⁵⁹

c) Approche expérimentale

Le choix du dispositif permettant l'assemblage doit être effectué en tenant compte de la complexité de la structure à réaliser. De nombreuses méthodes simples permettent la fabrication de réseaux 2D étendus par assemblage convectif. Le contrôle précis de la position de particules par assemblage capillaire par contre est un peu plus délicat et nécessite un contrôle précis de l'évaporation et de la vitesse de démouillage du ménisque.

Les premières démonstrations d'assemblage convectif ont été réalisées sur des gouttes immobiles qui s'évaporaient.^{49,52,60,61} Dans la plupart des expériences qui emploient cette approche simple mais efficace (figure 6), le contrôle de la forme du ménisque est généralement employé pour déterminer le nombre de couches du réseau 2D.^{49,50,62-65} Le « spin-coating » ou enduction par centrifugation constitue aussi une méthode simple pour imposer un nombre de couches mais les problèmes d'homogénéité du résultats restent un point faible de la méthode.⁶⁶

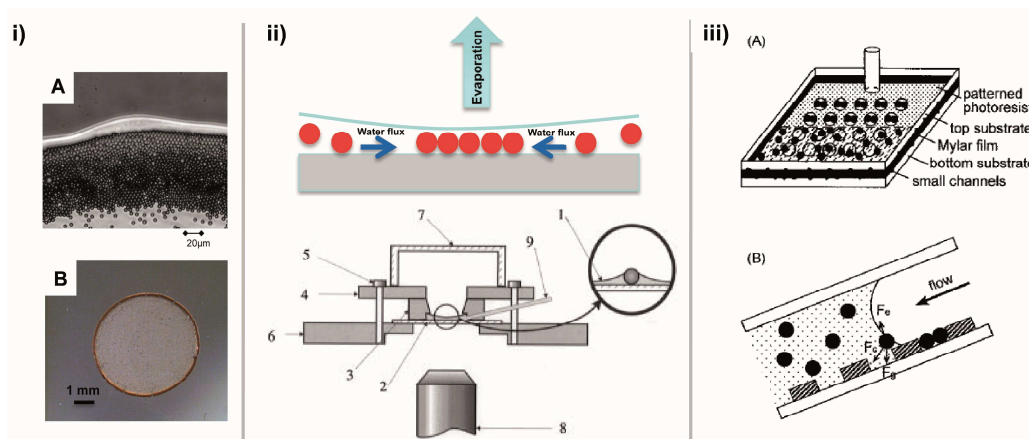


Figure 6 : i) Illustration de l'effet « goutte de café ». A) Le bord d'une goutte de suspension de particules (de 100 nm et de 5 µm). Durant le séchage, les particules se concentrent au bord de la goutte.^{52,67} B) Quand le séchage est terminé, cette concentration sur le bord fait apparaître un anneau. Ici une goutte de café classique. ii) Illustration du processus et du set-up expérimental utilisé par N.D. Denkov et son groupe pour l'assemblage de particules confinées dans un film mince de liquide.^{50,68} iii) Schéma de la procédure employée par Y. Xia et son groupe pour construire de petits agrégats avec des particules colloïdales. L'équilibre entre la force gravitationnelle, électrostatique (fonction des charges de surface) et capillaire conduit au piégeage des particules uniquement dans les motifs.²⁶

Afin de contrôler le taux d'évaporation, des stratégies reposant sur des cellules fermées ont été proposées. Une cellule fermée permet de régler le taux d'évaporation du liquide en agissant sur les échanges gazeux au sein du système et/ou en imposant une température.^{26,69–74} Dans les deux cas, le but est de stabiliser le ménisque et d'agir sur sa vitesse de déplacement. Cela ne permet cependant pas une action directe sur la vitesse. De telles approches sont aussi utilisables dans des canaux microfluidiques permettant la création de « rubans » de particules aux applications nombreuses en optique (guide d'onde)^{11,75–77} ou en biologie.^{73,78}

Le trempage du substrat offre un meilleur contrôle du mouvement du ménisque (figure 7.i)) et semble bien adapté à l'assemblage capillaire en particulier. Cette technique dérive de la méthode dite de Langmuir-Blodgett. Le substrat est généralement placé verticalement et plongé directement dans la suspension colloïdale.^{56,75,79–83} Le substrat est ensuite retiré verticalement du liquide. En ajustant la vitesse d'immersion et d'émersion du substrat à travers l'interface air-liquide, le transfert d'une unique couche de particules à chaque cycle est possible et permet l'obtention de cristaux colloïdaux en 3 dimensions. Un contrôle additionnel du taux d'évaporation est possible en imposant la température de la suspension ou en effectuant l'assemblage en atmosphère contrôlée, par exemple à faible pression.^{46,84}

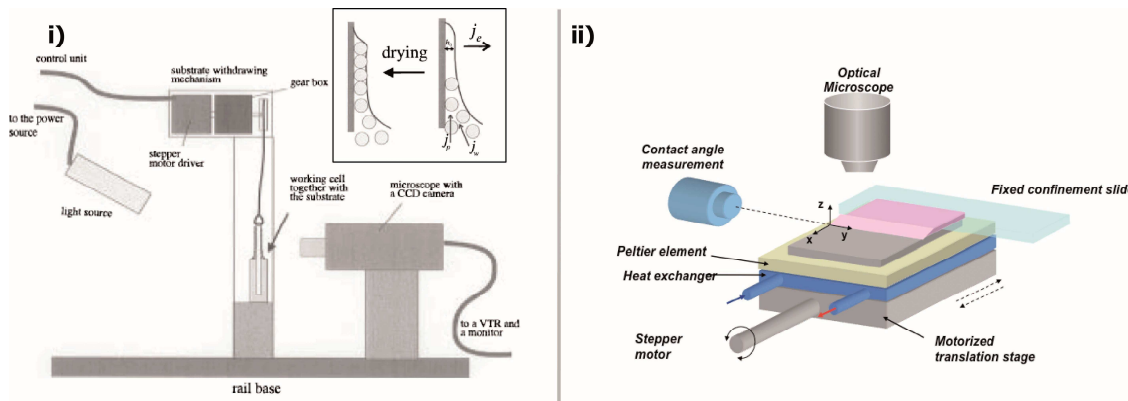


Figure 7 : Illustrations de systèmes expérimentaux utilisés pour l'assemblage capillaire et convectif i) par retrait d'un substrat plongé verticalement dans une suspension colloïdale⁵⁶ ii) A l'aide d'une platine de translation, en faisant glisser une goutte de suspension colloïdale sur un substrat de température contrôlée.⁵⁷

Une méthode originale permettant de découpler le taux d'évaporation de la vitesse du ménisque de la goutte s'effectue à l'horizontale : une platine de translation fait glisser une goutte de suspension sur une surface à une vitesse bien définie (figure 7 ii)). Cette disposition est avantageuse : i) elle peut être aisément montée sous un dispositif d'observation pour contrôler le processus ii) Elle permet de régler facilement la température (avec un Peltier par exemple) iii) La consommation de suspension peut être grandement réduite par rapport à une méthode de trempage puisque seul un faible volume de suspension est nécessaire pour effectuer l'assemblage. Ce petit volume glissera sur toute la surface.⁴⁶ Cette méthode est celle que nous avons employée au cours de ces travaux.

Il convient cependant de préciser que, du fait des petits volumes impliqués, l'assemblage est très sensible à l'évaporation qui fait varier la concentration des différents éléments de la suspension. Une amélioration possible serait d'approvisionner en permanence la suspension en liquide de façon à maintenir sa composition constante.

Plusieurs solutions ont été proposées dans la littérature pour améliorer la stabilité du processus en agissant sur le taux d'évaporation. On peut bien sûr modifier l'humidité du milieu environnant.⁴⁸ Une approche alternative a été proposée par Diguët et al. Elle consiste à aspirer l'air autour du ménisque avec un débit bien contrôlé.⁸⁵ Cette approche couplée à une régulation en température a permis d'améliorer la stabilité de l'évaporation et son homogénéité sur de larges surfaces.

4. L'assemblage convectif

La maîtrise des transferts de masse en direction du ménisque est fondamentale pour créer des couches de particules larges et continues. En effet, le mouvement relatif du substrat vis à vis du ménisque entraîne la couche de particules au fur et à mesure que celle-ci s'étend. La condition pour former une couche continue est donc d'atteindre un équilibre entre la vitesse du substrat v_s et celle de formation de la couche v_c . Pour un assemblage en régime « permanent », une équation qui décrit la vitesse de formation de la couche en fonction du flux de solvant et de l'accumulation de particules dans la région de séchage a été proposée par Dimitrov et Nagayama.⁵⁶

$$v_c = \frac{\beta j_e l \phi}{h(1 - \epsilon)(1 - \phi)}$$

Équation 2

Cette équation établit une relation entre la vitesse de croissance de la couche v_c , la porosité ϵ , la hauteur de la couche formée h , la fraction volumique de particules dans la suspension ϕ , un coefficient qui relie la vitesse du solvant à celle des particules β ($0 < \beta < 1$) et enfin le taux d'évaporation de l'eau pure j_e . La variable $l(x)$ est définie comme $l(x) = J_{\text{evap}}/J_e(x)$ où J_{evap} est l'intégrale du taux d'évaporation de l'eau, le long de l'axe parallèle au substrat et perpendiculaire à la ligne de contact, et $J_e(x)$ le taux d'évaporation en un point du même axe (figure 8.a).).

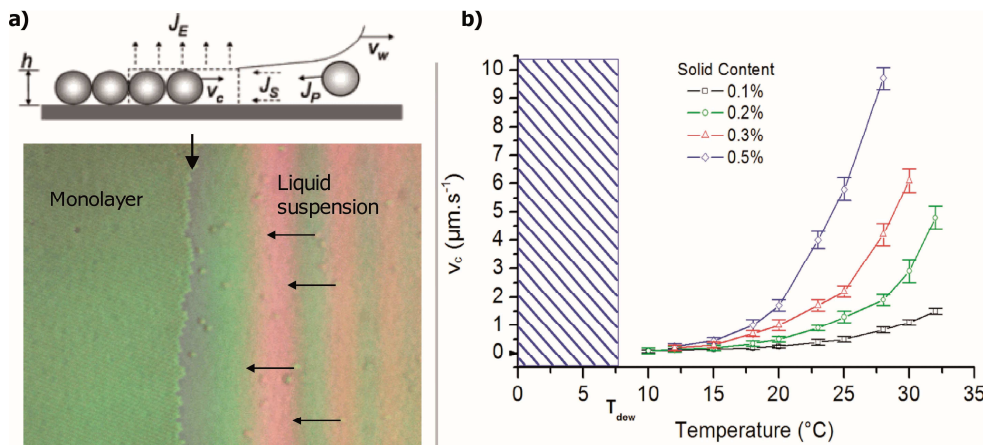


Figure 8 : a) Image en microscopie optique obtenue durant l'assemblage de particules de polystyrène (fraction solide : 0.2%, $T_s \approx 18^{\circ}\text{C}$) sur un substrat plat en PDMS traité au plasma oxygène. Sur la partie gauche de l'image, on peut voir la monocouche assemblée, tandis que la partie droite montre la suspension de particules. Au dessus : un schéma du mécanisme d'évaporation au cours de l'assemblage convectif.⁴⁸ b) Relation entre la température, la fraction solide et la vitesse de l'assemblage (obtenue pour des particules de polystyrène de 500 nm).⁵⁷

L'équation 2 montre que 3 paramètres clefs peuvent être employés pour contrôler l'épaisseur des couches : (i) la fraction volumique en particules ϕ , (ii) le taux d'évaporation du solvant J_{evap} et (iii) la vitesse du substrat v_s . Ce paramètre expérimental n'apparaît certes pas explicitement dans l'équation 2 qui concerne seulement un assemblage en régime permanent. Pour un taux d'évaporation donné et une fraction volumique donnée, une monocouche cristalline est obtenue si $v_c = v_s$ pour que le flux de particules vers le ménisque compense exactement la consommation de particules due à la croissance de la couche. Accroître la vitesse de substrat au dessus de la vitesse naturelle d'assemblage résulterait en la formation d'une couche incomplète. Diminuer la vitesse par contre provoquerait une accumulation de particules près du ménisque et conduirait à la formation de couches multiples. A une vitesse v_c donnée, les mêmes effets peuvent être observés en baissant ou en accroissant (respectivement) la fraction volumique des particules.

Le taux d'évaporation j_{evap} , lui, est non seulement le paramètre clef mais aussi le moteur du processus d'assemblage. Son action sera détaillée dans les paragraphes suivants.

La figure 8.a). montre un exemple de couches obtenues avec des particules en polystyrène (PS) sur une surface en Poly(diméthylsiloxane) (PDMS) oxydée au plasma. Du fait de leur distribution étroite de taille (coefficient de variation 1,3%), l'assemblage de telles particules donne naissance à une couche dense où l'arrangement des particules est hexagonal compact. Des couches de plusieurs cm^2 peuvent être préparées par cette méthode.^{39,48,56,57} Il est important de noter que la couche ainsi formée est constituée de plusieurs domaines cristallins (à symétrie hexagonale) d'orientations différentes. La dimension caractéristique d'un domaine se situe ici entre 100 et 250 μm . En effet, pendant la formation des couches cristallines, les couches qui viennent d'être assemblées près du ménisque demeurent imbibées de solvant. La longueur de séchage l , définit la distance sur laquelle le liquide pénètre dans le cristal colloïdal poreux avant d'être complètement évaporé. Loin de l , à mesure que la couche sèche, la perte de volume due à l'évaporation du solvant induit parfois des défauts, comme des dislocations ou des vides. La qualité des couches est quelque peu améliorée par une diminution de v_c . Il semble par contre ne pas y avoir d'influence notable du taux d'humidité sur la formation des dislocations ou le nombre de vides (environ $2,5 \cdot 10^2 \text{ mm}^{-2}$).⁵⁷

a) Contrôle de la vitesse de croissance : température et taux d'évaporation

Le taux d'évaporation au sein de la zone de séchage est influencé par la température de la suspension et par le taux d'humidité de l'environnement. On peut donc a priori jouer sur ces deux facteurs pour contrôler la vitesse de croissance du réseau cristallin. Néanmoins, le contrôle de l'humidité requiert des systèmes expérimentaux complexes et reste un mécanisme lent. Agir sur la

température semble plus simple expérimentalement : la figure 9 illustre la dépendance en température du taux d'évaporation, et donc du flux de convection. Dans cette expérience la température du substrat a été imposée afin de contrôler J_{evap} . L'assemblage a été effectué sur des surfaces en PDMS oxydées au plasma avec des particules de polystyrène de 500 nm suspendues dans de l'eau.

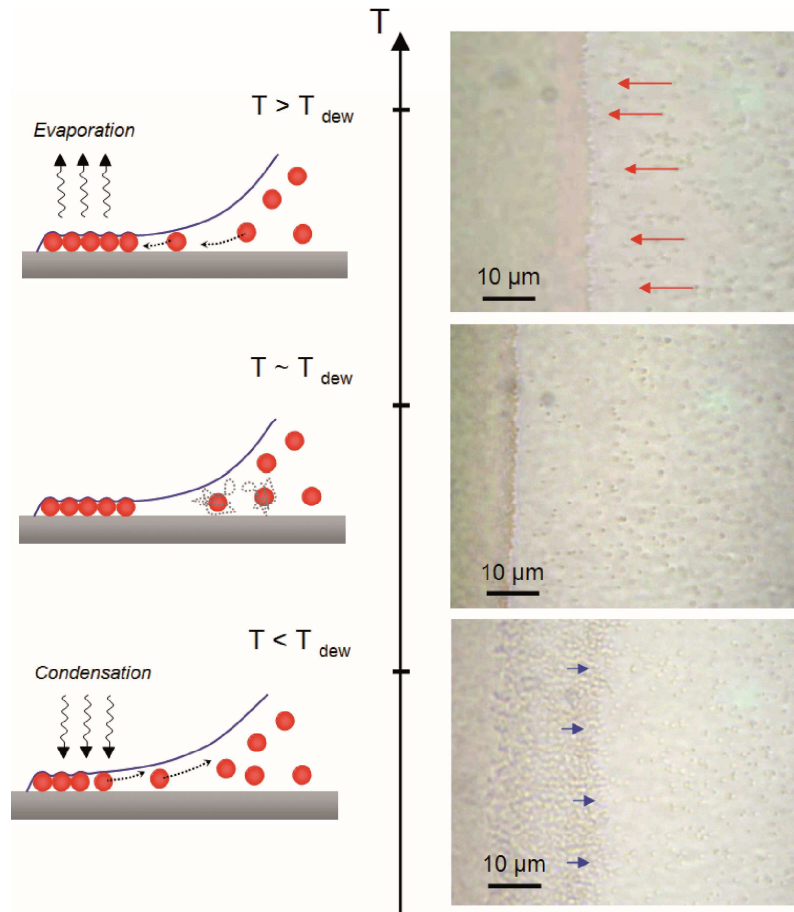


Figure 9 : Influence du taux d'évaporation sur le flux de convection impliqué dans l'assemblage convectif. Les expériences ont été effectuées sur des surfaces de PDMS traitées au plasma oxygène (particules de polystyrène de 500 nm, fraction solide : 0,2%).⁵⁷

La figure 8.b montre l'évolution du taux d'assemblage autour de la température du point de rosée T_{dew} . Le taux d'assemblage a été mesuré en ajustant la vitesse du substrat pour que le bord de la couche assemblée soit statique dans le champ d'observation. Cette méthode permet de créer des monocouches uniformes et procure une estimation de la vitesse de croissance de la couche puisque $v_c = v_s$ dans ce cas. L'expérience a été réalisée pour différents pourcentages de contenu solide ϕ allant de 0,1% à 0,5%. Cette fraction solide exerce une importance critique sur le nombre de couches formées, comme cela a été démontré par Prevo et al. (voir paragraphe suivant).⁴⁸ Le processus d'assemblage est aussi très sensible à la température. Il est ainsi possible de multiplier la vitesse du

processus par 10 en accroissant la température de 10 à 30°C. L'étude de l'assemblage pour des températures au-delà de 30°C demeure difficile du fait du taux d'évaporation élevé. Compte tenu des volumes initiaux de suspension relativement faibles, l'évaporation induit des variations rapides de la fraction solide de la suspension et le maintien de la condition $v_c = v_s$ reste délicat d'un point de vue expérimental. L'utilisation d'une goutte de plus grande taille ou un apport continu de liquide pourrait permettre de résoudre ce problème.

Trois régimes principaux correspondant aux conditions $T > T_{\text{dew}}$, $T = T_{\text{dew}}$, $T < T_{\text{dew}}$ sont distingués sur la figure 9 :

- $T > T_{\text{dew}}$: Au dessus du point de rosée, les flux de convection, causés par l'évaporation, provoque un afflux des particules vers la ligne de contact et la formation de réseaux bi dimensionnels organisés.
- $T = T_{\text{dew}}$: A mesure que la température décroît, l'assemblage ralentit. Près du point de rosée, l'évaporation du solvant est presque inexistante. Il n'y a pas d'apport de particules et l'assemblage est stoppé. Seul le mouvement brownien des particules reste visible.
- $T < T_{\text{dew}}$: Si la température décroît encore, la condensation prend le pas sur l'évaporation. De ce fait, le liquide afflux désormais des zones déjà assemblées vers la goutte. Cela conduit à la désagrégation des structures déjà construites. Le processus d'assemblage convectif est donc réversible.

L'existence de ces trois régimes aisément contrôlables via la température est fort pratique puisque non seulement l'assemblage peut être arrêté et repris à volonté, mais il est possible en plus de modifier ou de réparer une couche déjà formée (en ôter des défauts, changer le nombre des couches etc.) en diminuant la température en dessous de la température de rosée.

b) Croissance de couches multiples

Le contrôle de l'épaisseur de la structure formée, en particulier le nombre de couches de particules, est d'une importance critique pour nombre d'applications puisqu'elle joue directement sur ses propriétés optiques ou électriques.^{39,48,86,87} Rappelons encore une fois que selon l'équation 2, l'épaisseur de la structure h , directement liée au nombre de couches superposées est une fonction de la fraction solide de la suspension, de la vitesse du substrat et du taux d'évaporation. A fraction solide et température fixées (donc pour taux d'évaporation J_{evap} défini), la vitesse du substrat est un paramètre expérimental aisément accessible pour contrôler le nombre de couches déposées. On a vu que lorsque $v_c = v_s$, le flux de particules au ménisque compense exactement la consommation causée

par l'extension d'une monocouche. Si la vitesse augmente, une couche incomplète est formée. Si elle est réduite, une monocouche ne suffit pas à compenser le flux de particules et des empilements se mettent en place.^{48,56,57} Afin de ne pas trop réduire la vitesse, il est possible aussi d'intensifier les flux d'évaporation, par exemple en augmentant la température. La figure 4c-d présentait des exemples de simple et double couche préparées à partir de particules de polystyrène de 500 nm (fraction solide : 0,2%). Dans cette expérience, la vitesse du substrat a été fixée à 0,6 $\mu\text{m/s}$, et sa température a été modifiée de 20°C à 26.5°C pour passer d'un régime stable de formation d'une monocouche à un autre régime stable de formation d'une bicouche. Le nombre de couches peut être associé à des changements de couleur observables en microscopie optique (figure 10.a). En effet, une modification dans l'épaisseur de la couche induit un brusque changement de couleur du fait des interférences qui se produisent entre les rayons de lumière réfléchis par les différentes interfaces.

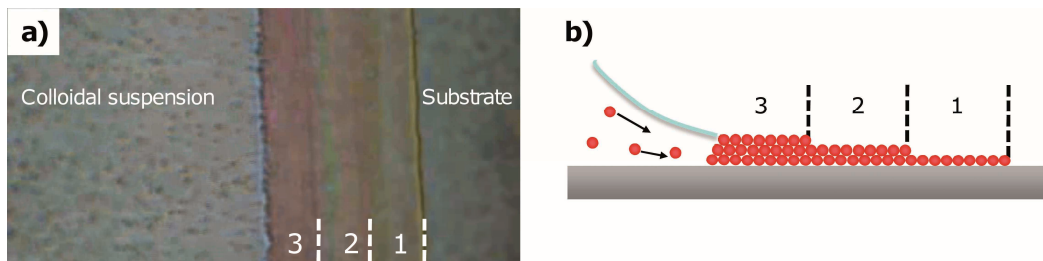


Figure 10: Illustration et image en microscopie visible de l'assemblage de particules de polystyrène de 500 nm en multicouches.

c) Structure des couches assemblées

i. Agir sur le mécanisme de croissance du cristal

L'assemblage convectif conduit si $v_c = v_s$ à la formation d'une structure polycristalline 2D avec des domaines cristallins compacts de différentes orientations. Il est possible de modifier les propriétés des domaines en jouant sur la vitesse ou la fraction solide. De manière surprenante, le taux d'évaporation ne semble pas jouer un rôle significatif. L'influence de ces différents paramètres a été étudiée par Prevo et al.⁴⁸ Cela a permis d'établir des diagrammes de phases (figure 11) reliant l'épaisseur des couches et leurs symétries aux paramètres de contrôle.

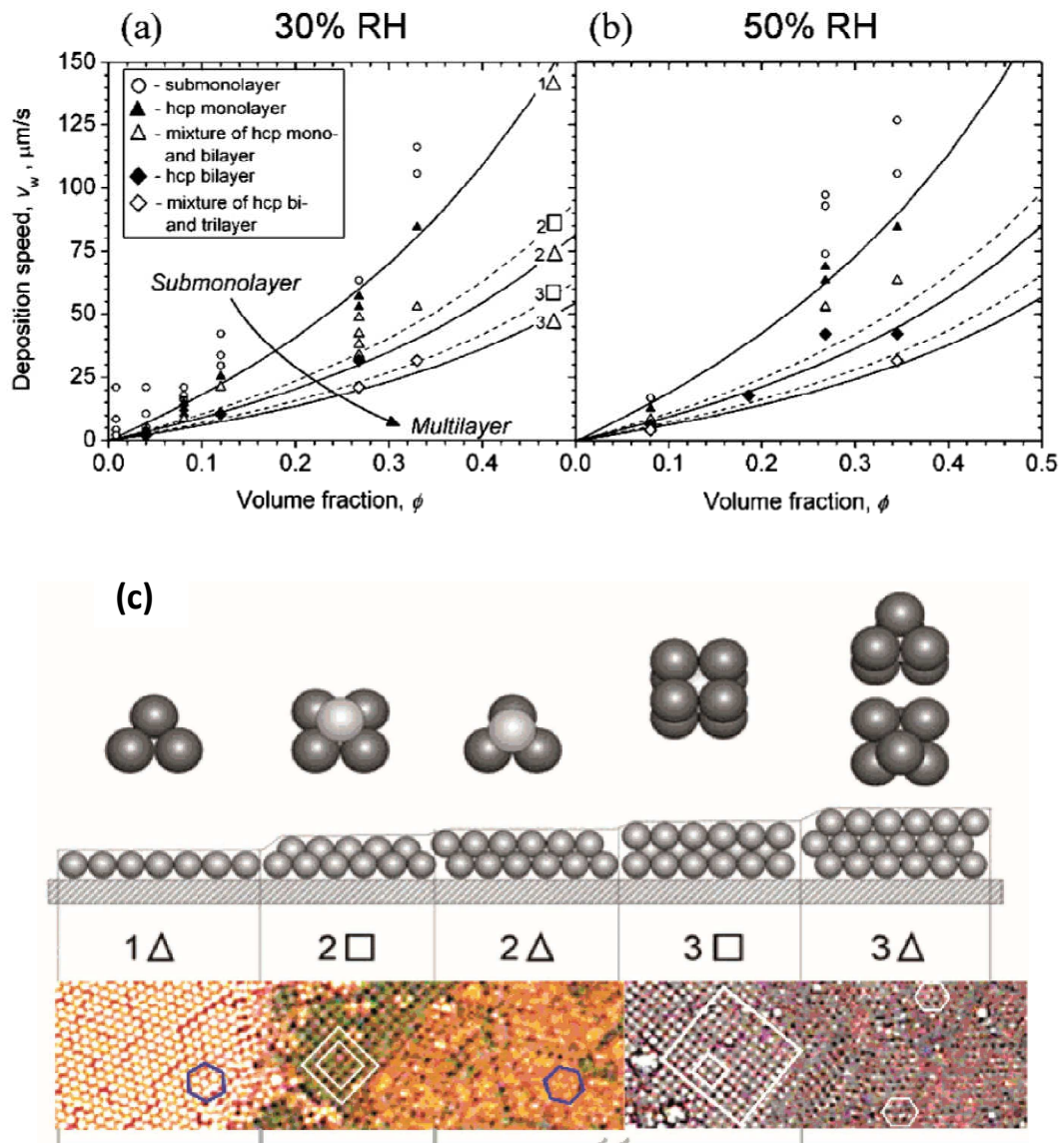


Figure 11 : Diagrammes de phases où le nombre de couches et leur nature (complète, incomplète, cubique ou hexagonale) sont portés en fonction de la vitesse d'assemblage et de la fraction solide, pour deux taux d'humidité différents (a) (b). Δ : réseau hexagonal \square : réseau cubique. Le chiffre indique le nombre de couches. (c) Evolution de la symétrie des couches de particules de polystyrène de 1,1 μm en fonction du nombre de couches.⁴⁸

Il a ainsi été démontré que la symétrie des réseaux peut être tantôt hexagonale (hcp) tantôt cubique (figure 11) selon les paramètres d'assemblage. Les expériences ont aussi montré la difficulté de stabiliser des couches de symétrie cubique sur de longues distances. Tout d'abord les particules tendent à maximiser la compacité du réseau et donc à évoluer vers une forme hexagonale. Deuxièmement, comme on peut le constater sur les diagrammes de phases, les jeux de paramètres permettant d'obtenir des réseaux cubiques constituent des fenêtres restreintes, contrairement au cas hexagonal.

Note : L'influence de la vitesse d'assemblage sur la qualité des couches n'est pas clairement établie. Il semble que, bien que l'homogénéité soit légèrement meilleure à de faibles vitesses, le nombre de lacunes et de dislocations ne puissent être directement relié à ce paramètre.

ii. Utilisation d'un substrat structuré

Dans ce paragraphe, nous verrons que l'assemblage convectif peut être combiné avec des substrats structurés pour définir quelles seront les zones d'assemblage ou bien pour modifier la cristallinité des couches assemblées. Nous nous focaliserons essentiellement sur les effets d'un confinement géométrique sur le mécanisme d'assemblage.

Dans la pratique, l'utilisation de forces d'interaction (électrostatiques, chimiques ...) n'est que rarement mise en œuvre. En effet, l'usage d'interactions locales limite la mobilité des particules au voisinage de la surface et donc leur capacité à s'auto-organiser en couche cristalline compacte.

- Assemblage localisé

Une première stratégie consiste à réaliser l'assemblage dans des géométries confinées comme des microcanaux.^{76-78,81,82} La structure du cristal peut être imposée par le rapport entre les dimensions des particules et des canaux.⁸⁸ Des approches reposant sur des contrastes de mouillage ou des interactions chimiques ont aussi été proposées pour créer des motifs continus comme des lignes.^{80,83}

L'usage de substrats structurés avec des structures de petites dimensions n'est généralement pas associé à l'assemblage convectif: en effet, les reliefs pourraient perturber le processus d'assemblage puisque chaque motif peut en principe se comporter comme un obstacle qui perturbe les flux hydrodynamiques et donc le mouvement des particules en direction de la ligne de contact. Néanmoins, certaines expériences ont démontré que l'usage de motifs de faibles hauteurs n'était pas incompatible avec le maintien de l'assemblage convectif à condition que i) le film liquide au-dessus des structures soit assez haut ii) la densité des structures soit assez faible pour que les particules puisse circuler autour.

La figure 12 montre des exemples de structures formées sur une surface en PDMS.

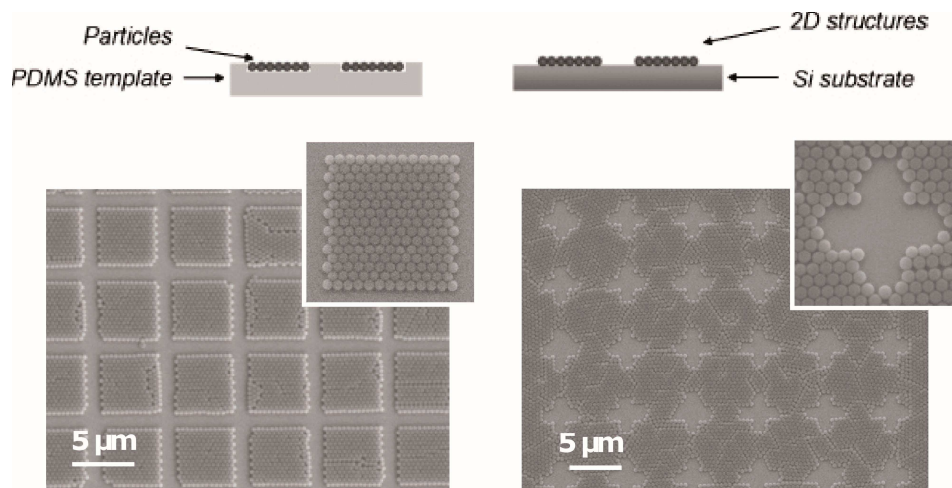


Figure 12 : Assemblage convectif sur substrat structuré. Des particules de polystyrène ont été assemblées sur un substrat en PDMS ($T_s=20^\circ\text{C}$, $v_s=1.5\ \mu\text{m.s}^{-1}$ avec des motifs de 200 nm de profondeur). Les structures réalisées ont été transférées sur silicium par contact.^{26,48}

- Orientation cristalline fixée

L'usage de structures peu profondes de dimensions latérales comparables à celles des particules est une méthode viable pour diriger la position des particules et ainsi imposer les paramètres de croissance du cristal.⁸⁹ Y. Xia et ses collaborateurs ont ainsi développé une procédure simple pour faire croître de larges cristaux colloïdaux à l'orientation cristalline prédéterminée en utilisant une surface patternée.^{90,91} Dans leurs travaux, ils ont procédé à la construction de cristaux sur des surfaces structurées par des cavités pyramidales ou par des rainures en formes de V. Des cristaux de colloïdes sphériques (>250 nm de diamètre) étendus sur plusieurs cm^2 ont été réalisés. La figure 13 montre des exemples de cristaux obtenus avec cette approche. Le confinement des particules est imposé par la forme des motifs, ce qui permet d'orienter les plans du cristal. Cette méthode a été appliquée avec succès à des colloïdes sphériques de diamètre allant de 300 nm à quelques μm . Pour des particules plus petites ou beaucoup plus grosses l'influence du patterning de surface est moindre.

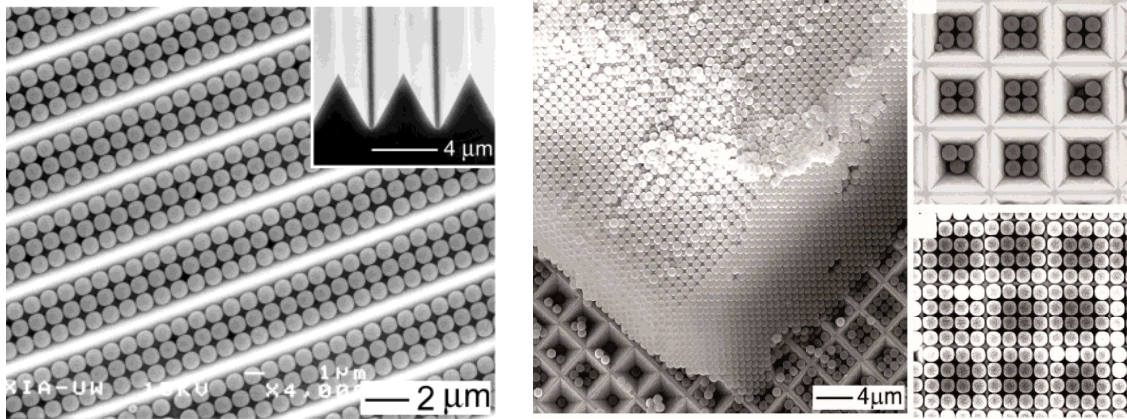


Figure 13 : Image en microscopie électronique de particules de 1 μm en polystyrène sur des surfaces présentant un réseau de rainures en forme de V (à gauche) ou des cavités pyramidales (à droite). L'assemblage a été réalisé par évaporation du solvant à température ambiante.^{90,91}

d) Influence de la taille des particules et de leur mobilité

Pour être mis en œuvre, l'assemblage convectif requiert des particules libres suspendues qui peuvent être aisément entraînées par les forces hydrodynamiques. Même si l'utilisation de suspension avec de larges distributions de formes et de tailles est généralement inadaptée à la création de réseaux cristallins de particules, le processus d'assemblage reste utilisable pour la production de couches d'épaisseur contrôlée.

Signalons enfin que contrairement à l'assemblage capillaire (voir paragraphe suivant), l'assemblage convectif de particules qui sédimentent vite comparé à la durée de l'expérience ou qui interagissent fortement avec le substrat est pratiquement impossible.

5. L'assemblage capillaire

Comme nous l'avons vu, déposer une goutte de suspension sur une surface mouillante (angle typique $< 20^\circ$) induit l'assemblage convectif de ces particules en structures continues bi-dimensionnelles. Sur des surfaces moins mouillantes, cependant, la force capillaire exercée par le ménisque présente une composante horizontale suffisante pour empêcher l'immobilisation des particules sur des surfaces planes. Il est possible de tirer avantage de la valeur élevée de l'angle de contact en l'associant à des surfaces convenablement structurées. En effet, des structures qui piègent ou déforment le ménisque peuvent être utilisées pour forcer localement le dépôt des particules. Le processus par lequel les particules sont immobilisées sur la surface structurée est une combinaison de confinement géométrique et des forces capillaires qui apparaissent quand le ménisque se déforme ou se rompt sur les patterns. Cette combinaison de forces compense les fluctuations thermiques et les forces de répulsion et cause le dépôt des particules. En adaptant la dimension des motifs au diamètre des particules, il est possible de restreindre les conditions de dépôts à un nombre défini de particules et d'immobiliser ces objets en un point précis de la surface.

Bien que le mécanisme à l'origine du dépôt des particules soit connu depuis longtemps, les paramètres qui le contrôlent sont nombreux et leur action respective complexe.^{26,46} Dans les paragraphes suivants, nous allons passer en revue les principaux paramètres de contrôle accessibles expérimentalement et étudier qualitativement leur influence sur le mécanisme d'assemblage.

a) Contrôle de l'évaporation

Bien que le comportement du ménisque diffère dans les mécanismes d'assemblage capillaire et convectif, l'évaporation joue dans les deux cas un rôle critique. Les flux hydrodynamiques créés par l'évaporation permettent d'amener les particules du cœur de la suspension vers la ligne de contact et donc de contrôler le transport de masse. Dans le cas de l'assemblage convectif, cette accumulation de particules au niveau de la ligne de contact conduit directement à la formation d'une couche. Dans le cas de l'assemblage capillaire, même si les forces capillaires empêchent le dépôt, ce processus d'accumulation reste essentiel pour que l'assemblage se fasse.^{57,58}

La figure 14 présente des expériences réalisées sur une surface de PDMS structurée pour étudier l'influence de l'évaporation sur le rendement de l'assemblage. Ces expériences ont été réalisées à deux températures différentes. A 27°C , aucun dépôt ne se produit sur le substrat. Quand la température passe à 32°C cependant, la capture sélective d'une unique particule dans chaque motif en forme de croix est observée (rendement 99%). Les observations montrent que la température agit

sur l'accumulation des particules au niveau de la ligne de contact. Ce phénomène se traduit par la formation d'une région brillante, opalescente, sur les images (figure 14, Region III). Cette observation suggère la présence d'arrangements polycristallins de particules dans cette région (de type cristal colloïdal puisque les particules restent mobiles).

Une étroite corrélation entre la formation de cette zone d'accumulation et le dépôt des particules peut être montrée. Il a été suggéré que l'accroissement local de la concentration en particules est nécessaire pour initier l'assemblage car : i) la densité locale de particule étant très importante, la probabilité de présence et de capture d'une particule dans une structure donnée augmente ii) l'accumulation des particules contribue à la réduction de leur mobilité (fluctuations thermiques notamment) ce qui facilite la capture. En effet, le coefficient d'autodiffusion des particules est très sensible à la fraction solide de la suspension qui s'accroît considérablement dans la zone d'accumulation.^{92,93}

La création d'une zone d'accumulation est fortement dépendante de l'évaporation du solvant et peut donc être contrôlée en utilisant la température. Comme dans le cas de l'assemblage convectif, l'évaporation crée un flux de particules J_i de la suspension vers le ménisque. L'accumulation de particules se produit quand la consommation de particules du fait du dépôt est inférieure à l'apport de particules. Ce mécanisme est illustré sur la figure 14 dans le cas de particules de polystyrène de 500 nm.

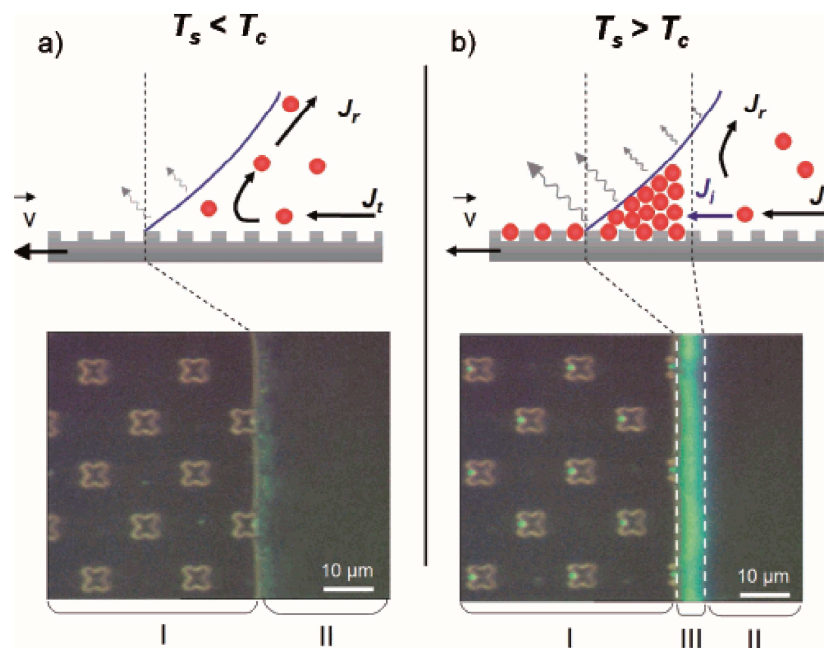


Figure 14: Images prises durant l'assemblage de particules de polystyrène de 500 nm sur un substrat structuré en PDMS (motifs de 200 nm de hauteur) pour deux températures différentes, $T_s=27^\circ\text{C}$ (a) et $T_s=32^\circ\text{C}$ (b). Expérience réalisée avec une suspension de colloïdes de fraction solide 0,1%. Le point de rosée est estimé à 7°C , l'angle de contact a été mesuré à 53° . Région I : le substrat structuré, Région II : la suspension. Vitesse du substrat fixée à $1\ \mu\text{m.s}^{-1}$.⁵⁷

Comme pour l'assemblage convectif, il existe une température seuil T_c pour l'assemblage capillaire. Cependant, alors que ce seuil correspondait au point de rosée dans le cas de l'assemblage convectif, dans le cas de l'assemblage capillaire, celui-ci correspond à une température bien supérieure. Cela laisse entendre que l'apport de particules du fait de l'évaporation et la perte de particules du fait du dépôt ne suffisent pas à équilibrer les transferts de masse. Une étude attentive du phénomène de transport de particules vers le ménisque montre qu'un mécanisme supplémentaire entre en compétition avec l'accumulation des particules. En effet, du fait de la condition de non-glissement à la surface du substrat, un flux de recirculation J_r se produit dans le liquide à mesure que la goutte glisse sur le substrat, lequel fait revenir les particules du ménisque vers l'arrière de la suspension (voir figure 14). Ce flux de particule contrebalance l'accumulation des particules créée par l'évaporation. Pour qu'une accumulation se produise, J_i doit compenser les pertes de particules dues au dépôt sur la surface et à la recirculation (et éventuellement aussi à la diffusion). Expérimentalement, cette condition peut être remplie en accroissant la température du substrat au-dessus d'une valeur seuil T_c . L'équilibre entre J_i et J_c est donc modifiable en jouant sur la température du substrat. On peut ainsi contrôler l'accumulation des particules et donc initier ou stopper le processus d'assemblage. La température n'est pas le seul paramètre expérimental accessible. En effet, le flux de particules peut être influencé par la fraction solide initiale de la suspension. Par ailleurs, le flux de recirculation peut être réglé jusqu'à un certain point, en ajustant la vitesse de la goutte sur le substrat.⁵⁷

b) Contrôle du mouillage

Comme nous l'avons déjà dit, l'immobilisation des particules sur une surface est dirigée par les effets des forces capillaires qui s'exercent au niveau du ménisque et par le confinement géométrique au niveau des motifs. Par conséquent le processus d'assemblage doit être sensible aux propriétés de mouillage de la suspension sur le substrat et aux dimensions des motifs.

Nous considérerons d'abord l'influence des propriétés de mouillage de la suspension colloïdale relativement à un substrat donné. Le rôle de la tension de surface sur le rendement de l'assemblage peut-être facilement étudiée en ajoutant des surfactants à la suspension. Il a par exemple été montré que l'assemblage de particules de 500 nm sur un substrat en PDMS est optimal pour un angle de contact entre 30° et 60°.* Ces résultats ont été obtenus en faisant varier l'angle de contact de la suspension grâce à un mélange de surfactants (SDS/Triton X45).⁵⁷ Accroître la concentration de surfactants provoque une diminution de l'angle de contact. Pour des valeurs d'angle de contact inférieures à 15-20°, le processus passe de l'assemblage capillaire à l'assemblage convectif. En effet,

en dessous de ces valeurs d'angle, la composante horizontale de la force capillaire est trop faible pour empêcher l'immobilisation des particules sur des surfaces plates, et la formation de structure 2D commence (structures en couche). Pour des valeurs supérieures à 60° , aucun dépôt n'est généralement observé, même si les particules s'accumulent au ménisque. Cette valeur seuil peut être directement reliée à la composante horizontale de la force capillaire qui, même dans le cas de structures profondes, est suffisante pour entraîner les particules et les maintenir en suspension.

La question de la forme des motifs et de son influence est plus complexe. Dans le cas de structures à fort rapport d'aspect, les propriétés de mouillage peuvent être affectées par la pression capillaire, ce qui peut aller jusqu'à la transformation de l'assemblage capillaire en assemblage convectif. Ce cas sera discuté dans la section I.5.d).

En plus de la forme et des dimensions des motifs, leur densité doit aussi être prise en considération. En effet, chaque motif pouvant piéger localement le ménisque (effet de piégeage ou « pinning » de la ligne de contact), l'utilisation de structures de densité élevée peut affecter le processus de dé mouillage et modifier l'angle de contact. Par ailleurs les motifs peuvent être considérés comme une rugosité de surface ayant un impact sur les propriétés de mouillage.^{58,94} Deux modèles sont utilisés pour prédire l'influence de la rugosité de surface sur l'angle de contact. Le premier modèle a été proposé par Wenzel : On considère une surface chimiquement homogène mais rugueuse. La rugosité est définie comme le rapport entre la surface réelle et sa projection dans le plan horizontal. Ce modèle est bien adapté à la modélisation de surfaces structurées par des motifs en relief. Un second modèle, le modèle de Cassie-Baxter, considère une surface plane constituée de deux matériaux différents. Ce modèle est bien adapté au cas de motifs en creux qui induisent localement un mouillage complet ou au contraire nul. Dans cette situation, le rapport entre les surfaces mouillantes et non mouillantes permet de prédire l'angle de contact.

Le domaine d'application de ces modèles reste limité. En effet, il concerne le calcul de l'angle statique. Ils ne tiennent pas compte des forces de friction qui affectent un processus de mouillage dynamique. Par ailleurs, l'impact de l'accumulation des particules sur le mouvement et le comportement du ménisque est difficile à prédire. Si ces modèles peuvent donner des tendances générales, ils ne peuvent cependant offrir de prédictions quantitatives fiables. Une étude expérimentale reste essentielle.

*Dans ces expériences, les angles de contact ont été mesurés pour une goutte se déplaçant sur le substrat à une vitesse de $1 \mu\text{m.s}^{-1}$. Précisons cependant qu'aucune influence significative de la vitesse sur l'angle de contact n'a été observée dans la gamme $0,5\text{-}10 \mu\text{m.s}^{-1}$.

c) La vitesse du ménisque.

i. Maitrise des flux de particules à la ligne de contact

Nous avons précédemment montré que l'existence d'une température seuil T_c résulte de l'équilibre entre l'afflux de particules au ménisque induit par l'évaporation et leur évacuation due à la recirculation, à la diffusion et au dépôt de particules. La vitesse v_s de la ligne de contact agit directement sur le taux de dépôt et la recirculation et donc sur la valeur de T_c . La figure 15 montre l'évolution de T_c pour des particules de polystyrène de 500 nm de diamètre assemblées sur du PDMS. L'influence de la fraction solide en particules est aussi présentée aussi sur la figure.

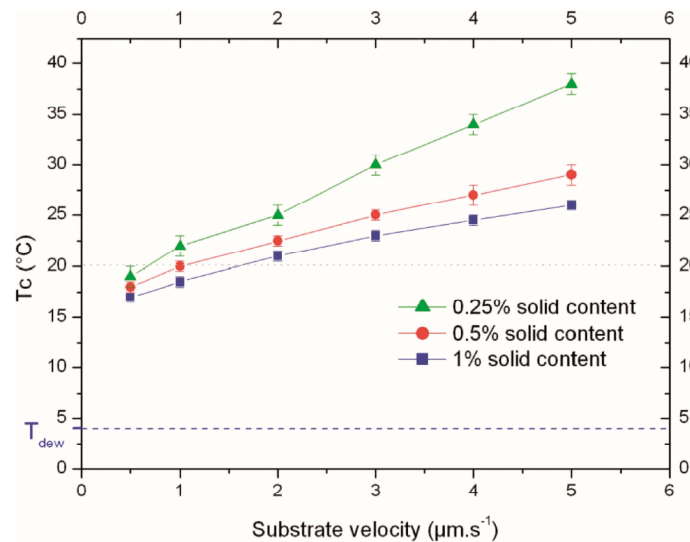


Figure 15: Evolution de la température seuil T_c en fonction de la vitesse V_s et de la fraction solide.⁵⁷

Comme on pouvait s'y attendre, T_c croît avec la vitesse du substrat. Cette croissance est pratiquement linéaire. Lorsque le flux de recirculation s'accroît, le taux d'évaporation doit augmenter pour compenser les pertes de particules dans la région d'accumulation. On constate aussi que l'accroissement de la fraction solide semble aider à minimiser T_c . En effet le flux de particule est directement lié au contenu solide contrairement à la diffusion et la recirculation. Une fraction solide plus importante déplace donc l'équilibre dans le sens d'une plus forte accumulation.

ii. Influence de la vitesse sur l'angle de contact

L'influence de la vitesse du ménisque sur le mouillage en régime dynamique doit aussi être considérée. On n'observe pas d'influence notable de v_s sur l'angle de contact pour des valeurs comprises entre 0 et $10 \mu\text{m.s}^{-1}$ (pour des suspensions aqueuses sur du PDMS). En effet pour de faibles vitesses, la valeur de l'angle reste proche de celle de l'angle de recul (régime quasi-statique). Cela n'est plus vrai pour des vitesses plus élevées. A mesure que la vitesse s'accroît, les forces de friction et les interactions entre le liquide et le substrat s'opposent au mouvement du ménisque et tendent à réduire l'angle de contact, ce qui modifie l'orientation de la force capillaire et donc la valeur de ses composantes horizontale et verticale. L'assemblage en est donc affecté. Nous développerons cet effet dans le chapitre II.

d) Influence de la forme et de la dimension des motifs

i. Influence de la géométrie et de l'orientation des motifs

L'immobilisation des particules sur la surface étant due à la combinaison du confinement géométrique et des forces capillaires, on s'attend à ce que la dimension et la forme des motifs jouent un rôle crucial sur l'efficacité de l'assemblage ainsi que sur le nombre et la disposition des particules assemblées (les unes par rapport aux autres et par rapport aux motifs). En particulier, l'amplitude et l'orientation des forces capillaires, induites par le piégeage de la ligne de contact, dépendent fortement de la géométrie des motifs. Cet effet peut être observé sur la figure 16 qui montre l'assemblage de particules de polystyrène de 500 nm sur des motifs cruciformes en relief de 200 nm. Trois orientations différentes des patterns par rapport à la ligne de contact ont été étudiées.

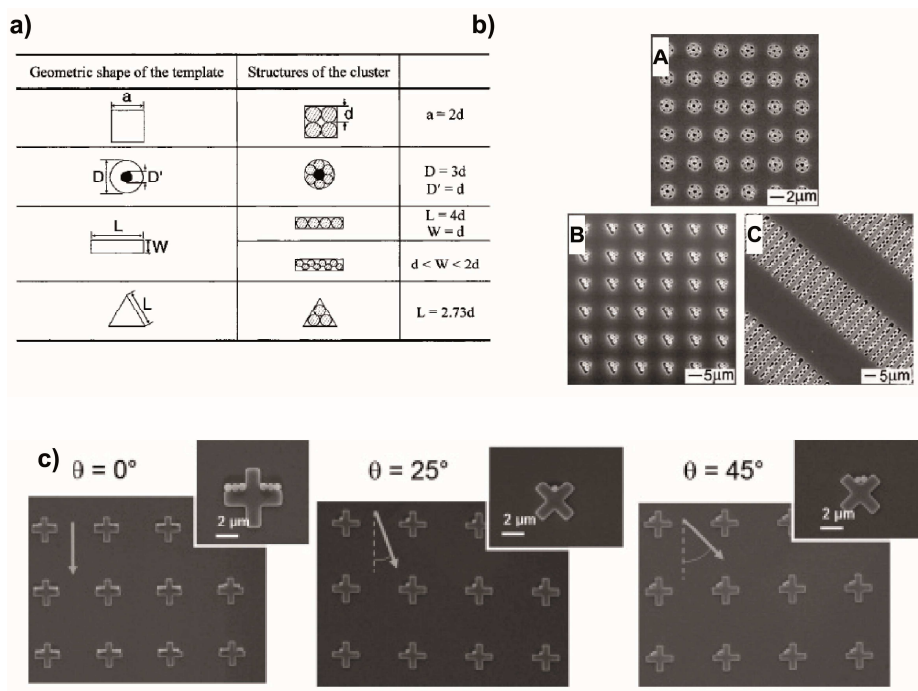


Figure 16: a) Illustration de l'influence de la géométrie des motifs sur la position et l'arrangement des particules déposées par assemblage capillaire.²⁶ b) Images en microscopie électronique d'assemblages de colloïdes dans des cavités circulaires (A), triangulaires (B), et en forme de ligne (C).⁹⁵ c) Illustration de l'impact de l'orientation des motifs sur les assemblages réalisés. Expérience réalisée sur du PDMS avec des billes de polystyrène de 500 nm (fraction solide 0.5%) à une vitesse de $1 \mu\text{m.s}^{-1}$ et à une température de 25°C . Motifs de 200 nm de hauteur.^{57,58}

Faire varier l'orientation des motifs par rapport à la ligne de contact modifie le mécanisme de piégeage du ménisque et les conditions de confinements des particules à proximité du motif juste avant la rupture du ménisque. Cet effet peut être utilisé pour moduler le nombre de particules qui seront déposées et leur position sur le motif.

ii. Structure à fort rapport d'aspect

L'influence du rapport d'aspect des structures sur l'assemblage des particules sera illustrée dans deux situations différentes.

Le premier exemple concerne les structures profondes « en creux » telles celles présentées sur la figure 17a-b. Comme nous l'avons expliqué auparavant, le mécanisme de démoillage dans ces structures est modifié par la pression capillaire qui tend à maintenir la surface mouillée. A mesure que le ménisque se déplace sur les structures, un volume bien défini de liquide y reste piégé. Du fait de l'accumulation des particules au niveau de la ligne de contact, cela conduit au remplissage complet des structures.

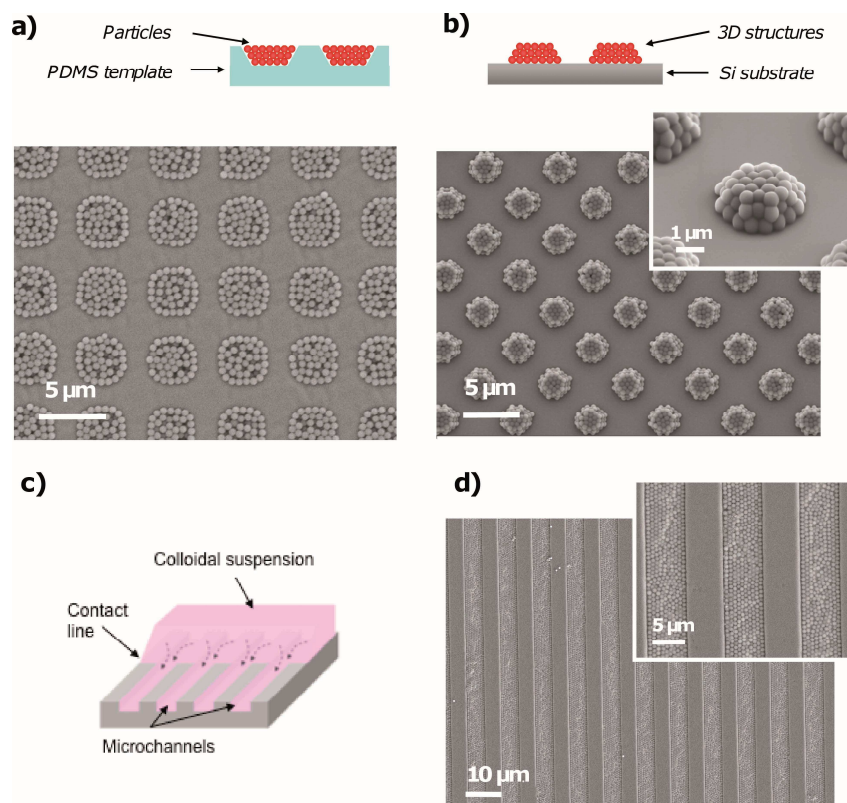


Figure 17: a) Nanoparticules de polystyrène de 500 nm assemblées dans des cavités évasées de 2.5 μm de profondeur sur du PDMS. b) Les structures obtenues après transfert sur du silicium. c,d) Les mêmes particules ont aussi été assemblées dans des « tranchées » de 500 nm de profondeur et de 5 μm de largeur sur du PDMS. Dans ces expériences, la vitesse du substrat est comprise entre 1 et 10 μm.s⁻¹.⁵⁹

Le second exemple concerne les structures en forme de lignes, les « tranchées », présentées sur la figure 17c-d. Du fait de la pression capillaire, ces structures peuvent se comporter comme des canaux microfluidiques et se remplir spontanément de suspension colloïdales.²⁶ Le liquide est piégé sur les bords supérieurs des structures. L'évaporation du solvant engendre un flux de particules depuis le ménisque vers l'extrémité du canal où se forme un arrangement compact des particules. Les observations ont montré que le mécanisme d'assemblage dans le canal est semblable à l'assemblage convectif, en particulier en ce qui concerne l'influence de la température. Sur les surfaces planes par contre, le mouillage n'est pas modifié et les forces capillaires empêchent le dépôt des particules. Cette méthode est extrêmement intéressante pour créer des bandes ou des rubans cristallins épais, de grandes dimensions qui peuvent par exemple être utilisés comme guides d'onde pour des applications à l'optique (voir I.6.a) ou encore comme gels artificiels pour la séparation ou la capture de composés.

e) Influence de la nature des particules

Tant l'assemblage convectif que l'assemblage capillaire ont montré qu'ils pouvaient fonctionner avec des nanoparticules aussi petites que certaines macromolécules (pour des diamètres inférieurs à 10 nm).²⁶ Malheureusement la localisation précise de l'immobilisation et l'organisation d'objets de cette dimension restent difficiles. Outre l'importance du mouvement brownien, ces résultats montrent également l'importance des interactions entre les objets et le substrat (Nous verrons au chapitre III que pour des objets vivants cela joue un rôle particulièrement important).

La compatibilité du mécanisme d'assemblage avec des particules dépassant quelques microns a été soigneusement étudiée. En effet, comme nous l'avons vu, la mobilité des particules est un facteur clef dans les deux mécanismes d'assemblage étudiés. Les assemblages capillaire et convectif sont généralement appliqués à des suspensions colloïdales où la sédimentation demeure négligeable sur le temps de l'expérience.

Ce critère est impératif dans le cas de l'assemblage convectif. Néanmoins, comme nous le verrons au chapitre II, il semble moins essentiel dans le cas de l'assemblage capillaire. Nous verrons notamment que l'assemblage capillaire peut avoir lieu avec des particules sédimentées tout en conservant efficacité et reproductibilité.

Assembler des particules anisotropes est une autre idée intéressante qui a été beaucoup étudiée dans le cadre de l'assemblage capillaire. Des particules complexes, par exemple de forme tétraédrique comme les nano tétrapodes cadmium telluride (CdTe), ont pu être assemblées avec succès.⁴⁶ L'assemblage de nanotiges et de nanofils a aussi été rapporté.⁹⁶⁻⁹⁸

6. Exemples d'applications

La flexibilité et la compatibilité de l'assemblage convectif et de l'assemblage capillaire avec une large gamme de particules de compositions et de dimensions différentes ouvrent des perspectives intéressantes pour la réalisation de structures complexes intégrées. Au-delà des applications immédiates de patterning de surface, ces méthodes offrent l'opportunité d'exploiter utilement non seulement les propriétés intrinsèques des particules mais aussi celles qui émergent des arrangements de particules. L'objectif de ce paragraphe est de montrer, à travers une courte liste d'exemples (bien évidemment non exhaustive) la variété des applications offertes par ces techniques en optique, électronique, microfluidique, biologie...

a) Les cristaux photoniques

Parmi les applications possibles des cristaux colloïdaux, la fabrication de dispositifs optiques a fortement attiré l'attention. Les matériaux à bandes électromagnétiques interdites (« photonic band gap structure ») sont probablement le meilleur exemple d'application de l'assemblage des colloïdes à ce domaine. La périodicité de ces structures est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde. La diffraction de Bragg⁹⁹ au sein d'un tel cristal est à l'origine de bandes de fréquences interdites. Les colloïdes d'intérêt pour la conception de cristaux photoniques ont généralement une forme sphérique et sont souvent constitués de silice ou de polymères comme le polyméthacrylate de méthyl (PMMA) ou le polystyrène (PS).

Le groupe de G.A. Ozin a été pionnier dans la fabrication de structures photoniques planes et dans la croissance de cristaux par évaporation. La figure 18 présente la méthode utilisée dans ces expériences et quelques exemples de cristaux photoniques.^{76,100,101} Des microcanaux ouverts sont immergés verticalement dans une suspension de microsphères de silice. L'assemblage est ensuite produit par l'évaporation de la suspension colloïdale. Alors que l'assemblage de particules de 100 à 500 nm est direct, un dispositif d'agitation additionnel est ajouté pour les suspensions de sphères supérieures à 1 μm pour compenser la sédimentation.

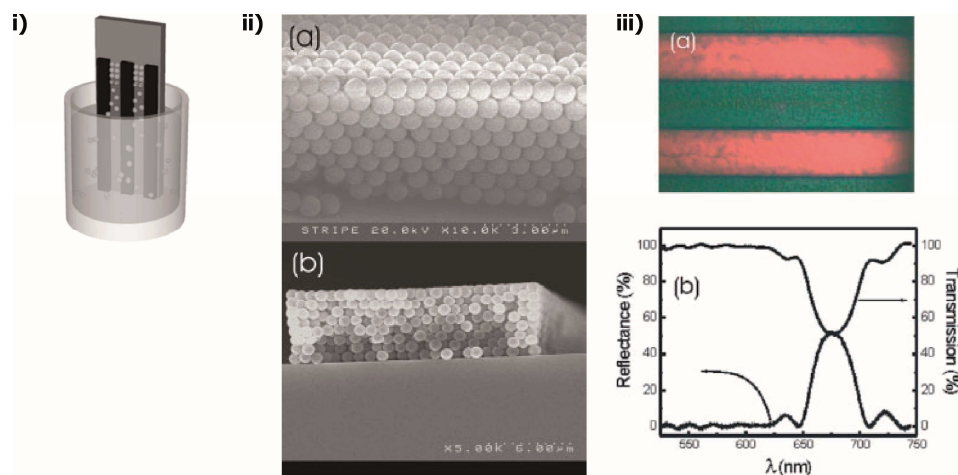


Figure 18: Illustration d'un mécanisme d'assemblage de cristaux photoniques. i) Des canaux ouverts sont immergés verticalement dans une suspension de microsphères de silice. Sous l'effet de l'évaporation, les canaux sont remplis de particules qui s'organisent en structure cristalline ii). Les propriétés optiques de telles structures sont illustrées en iii) (photo et spectre de réflexion/transmission).¹⁰⁰

b) Intégration de nanoparticules d'or : applications en optique et en électronique

Les nanocristaux de métal interagissent fortement avec les ondes électromagnétiques et offrent des propriétés remarquables dues à la résonnance plasmon de surface (SPR) qui induit, sous excitation optique, des champs électriques locaux très puissants. Cette propriété peut être exploitée, entre autre, pour la spectroscopie Raman (Surface-enhanced Raman spectroscopy).^{17,102,103}

L'assemblage capillaire a montré ses potentialités pour créer des assemblages de nanoparticules d'or avec une précision de l'ordre de la taille d'une particule unique. La fabrication de réseaux cristallins 2D, de réseaux de particules isolées, de chaînes ou de dimères a été démontrée et leurs propriétés électriques ou optiques analysées.^{86,104,105} Associé généralement à une étape de transfert par contact^{58,94,105-107} l'assemblage capillaire permet de fabriquer de telles structures avec un coût relativement réduit en utilisant des suspensions commerciales de nanoparticules.

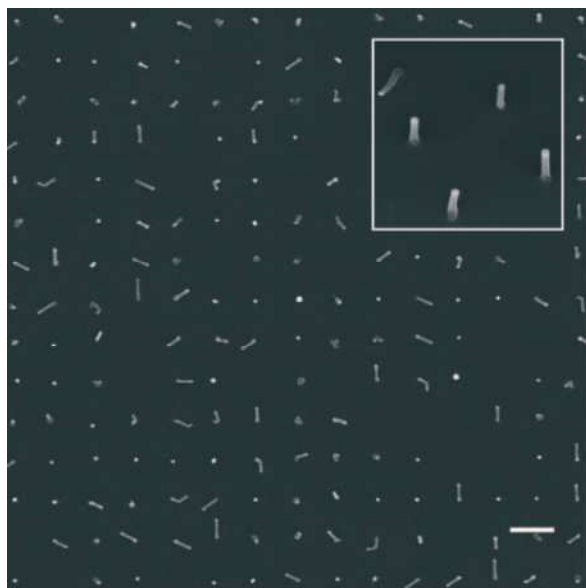


Figure 19: Des nanofils de silicium croissent à partir d'un réseau de billes d'or.⁵⁸

L'utilisation de nanoparticules d'or comme catalyseur offre aussi d'intéressantes opportunités, par exemple, pour la croissance de nanofils. La figure 19 montre un exemple de réseaux de nanofils de silicium obtenus par la méthode VLS (Vapor liquid solid process). Les particules d'or ont d'abord été assemblées sur du PDMS par assemblage capillaire puis transférées par contact sur du silicium.⁵⁸ Les nanofils nucléent et croissent à partir des particules d'or. De tels nanofils pourraient constituer des éléments de fabrication pour des transistors, des mémoires, ou des capteurs...

c) Extension de l'assemblage capillaire aux systèmes biologiques : capture de cellules

Pour étudier la réponse d'une large population de cellules à l'échelle de la cellule individuelle, de nombreux efforts ont été dédiés au développement d'une méthode simple pour placer précisément et en parallèle un grand nombre de cellules individuelles sur un substrat. Il a été récemment démontré que l'assemblage capillaire peut être adapté aux objets biologiques afin de créer des réseaux de cellules.

Un premier exemple d'application de l'assemblage capillaire à la biologie a été rapporté par L. Ressier et al. Une suspension aqueuse de bactéries *Escherichia Coli*. a été assemblée avec succès sur des motifs chimiques.¹⁰⁸ Autre exemple : Park et al.^{109,110} ont utilisé la force créée par un ménisque, en recul du fait de l'évaporation, pour capturer des cellules de levures dans des micropuits à l'intérieur d'un canal microfluidique. Les réseaux cellulaires obtenus sont présentés sur la figure 20.

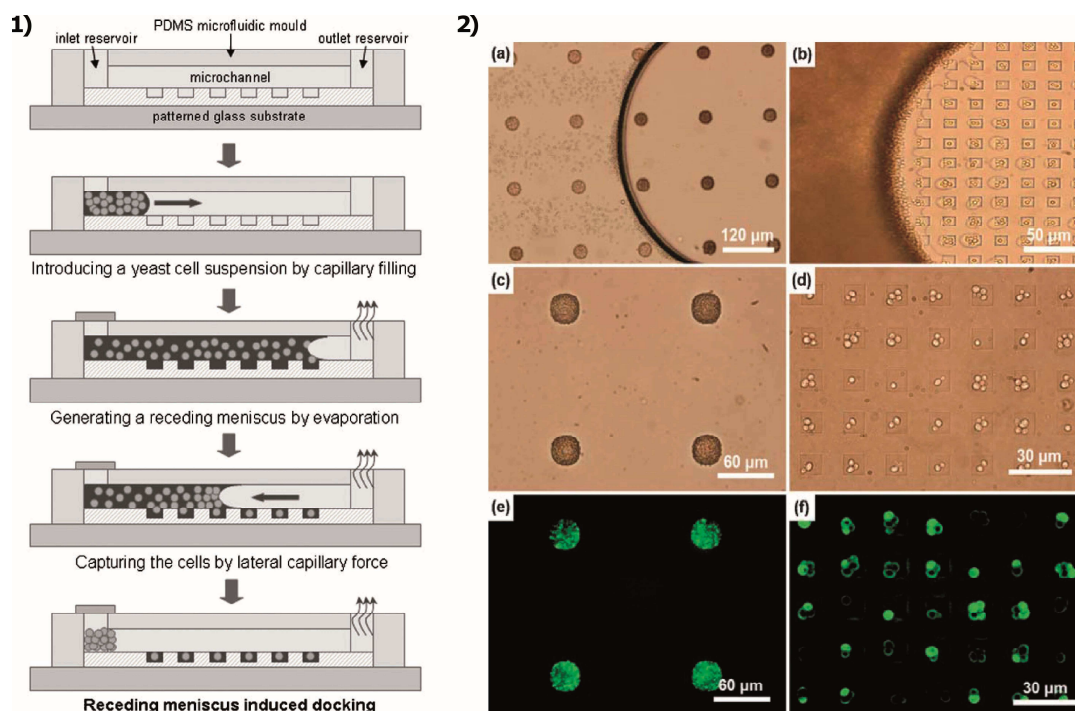


Figure 20 : 1) Schéma de principe de la méthode de capture de levures au sein d'un canal microfluidique. Des levures sont introduites dans le canal. Après l'obturation de l'entrée, le ménisque reflue du fait de l'évaporation et passe sur les micropuits. Après une étape de lavage, le canal est rempli d'un milieu adapté pour la culture ou l'analyse. 2) observations en microscopie optique du processus.¹¹¹

Il convient de préserver la mobilité des cellules au sein de la suspension pour préserver le mécanisme d'assemblage. La complexité des milieux employés et les interactions entre cellules ou entre les cellules et le substrat constituent clairement une limitation de la méthode. Dans ce travail, les auteurs ont démontré la viabilité des cellules après capture. Le réseau étant intégré dans un canal microfluidique, les cellules capturées peuvent être exposées à des traitements chimiques et les réponses peuvent être étudiées en temps réel à l'échelle d'une cellule unique.

7. Conclusion

Nous avons montré que les forces capillaires et les flux de convection peuvent être exploités pour assembler des colloïdes en structures complexes sur des surfaces planes ou structurées. Des particules isolées peuvent être précisément localisées et des arrangements à 1, 2 voire 3D peuvent être réalisés. Ces procédés sont compatibles avec une large gamme de particules de natures, formes et tailles variées. Des particules de quelques nanomètres à quelques microns peuvent être manipulées et immobilisées précisément sur une surface. Celles-ci doivent présenter une mobilité suffisante pour être sensibles aux forces impliquées et être dirigées vers un site d'immobilisation. Pour bien contrôler ces mécanismes, de nombreux paramètres peuvent être réglés. Deux sont particulièrement importants : La vitesse du substrat tout d'abord, et la température qui agit sur le taux d'évaporation. Dans le cas de l'assemblage convectif, le contrôle de la température permet d'agir sur la vitesse de l'assemblage et même de l'inverser. Dans le cas de l'assemblage capillaire, une température seuil de déclenchement de l'assemblage a été mise en évidence (du moins si les billes ne sédimentent pas sur le temps de l'expérience, comme nous le verront dans la partie suivante).

L'assemblage convectif et l'assemblage capillaire offrent des possibilités intéressantes pour construire des dispositifs complexes exploitant les propriétés des particules elles-mêmes ou celles qui émergent de leur arrangements ordonnés. Ceci est particulièrement pertinent en association avec des techniques de transfert.^{58,59} Peu coûteux, ils ont des applications nombreuses en optique ou en électronique. Des perspectives prometteuses en biologie s'annoncent par ailleurs. Combiner les propriétés optiques, magnétiques ou catalytiques des particules avec une reconnaissance spécifique, via une fonctionnalisation de surface des particules, ouvrent des perspectives dans le domaine de l'analyse ou de la détection. Enfin, il a été très récemment démontré que l'assemblage capillaire était aussi applicable à certaines cellules, comme les levures ou les bactéries.^{109,110} Des études biologiques à l'échelle de la cellule unique pourraient en résulter. L'emploi à des fins biologiques de ces techniques reste cependant peu développé, du fait de la nécessité de maintenir un environnement viable pour des cellules au cours des manipulations.

Bien que simples à mettre en œuvre et polyvalentes, ces techniques présentent malgré tout encore des limitations. Tout d'abord, elles semblent inadaptées aux particules de faibles mobilités, des particules lourdes qui sédimentent rapidement sur la surface par exemple. Par ailleurs, la vitesse de traitement d'une surface n'excède pas quelques $\mu\text{m.s}^{-1}$. Traiter une surface de quelques centimètres peut donc s'avérer long. Autre limitation importante: ces techniques ne mettent à chaque fois en jeu qu'un seul type de particules. On ne peut organiser de manière déterministe plusieurs types de particules sur une même surface. Au cours des travaux que nous allons présenter dans la suite, nous

avons cherché à étendre les possibilités de ces techniques en trouvant des solutions à chacune de ces difficultés et en les adaptant à la biologie cellulaire.

II. Fonctionnalisation de surface par assemblage capillaire et applications

L'objectif de ce chapitre est double: D'une part, il s'agit de décrire les spécificités du montage expérimental qui a été développé dans le cadre de cette thèse ainsi que les protocoles expérimentaux que nous avons mis au point pour l'assemblage et le transfert de particules. Nous nous attarderons notamment sur les améliorations que nous avons pu mettre en place pour augmenter la vitesse et la reproductibilité des méthodes d'assemblage. Nous montrerons également comment nous avons pu étendre le champ d'application de l'assemblage capillaire à des particules peu mobiles, telles que des particules magnétiques micrométriques. D'autre part, nous illustrerons le potentiel des techniques mises au point au travers de plusieurs applications développées dans le cadre de cette thèse qui concernent la biologie cellulaire, la biophysique ou l'hydrodynamique.

1. Description des protocoles et du montage expérimental

a) Système d'assemblage

Nous avons vu au chapitre I.3.) qu'il existait différentes techniques pour procéder à un assemblage capillaire. La méthode que nous avons choisie emploie une platine de translation pour faire glisser une goutte de suspension sur la surface à patterner. On redonne sur la figure suivante (voir aussi chapitre I figure 7) le schéma du montage expérimental.

Celui-ci est constitué d'une platine de translation asservie en vitesse sur laquelle est monté un support d'échantillon couplé à un dispositif de contrôle de température.

Le liquide est placé sur l'échantillon mobile, entre celui-ci et une lame de verre maintenue fixe afin de retenir le liquide par capillarité. Ainsi le liquide ne sera pas entraîné en bloc par le mouvement de la platine. Au contraire, du fait du mouvement relatif de l'échantillon par rapport à la lame de verre, le ménisque, retenu par la lame de verre, se déplace sur l'échantillon. C'est à l'avant du ménisque, au niveau de la ligne triple, que les processus d'assemblage prendront place.

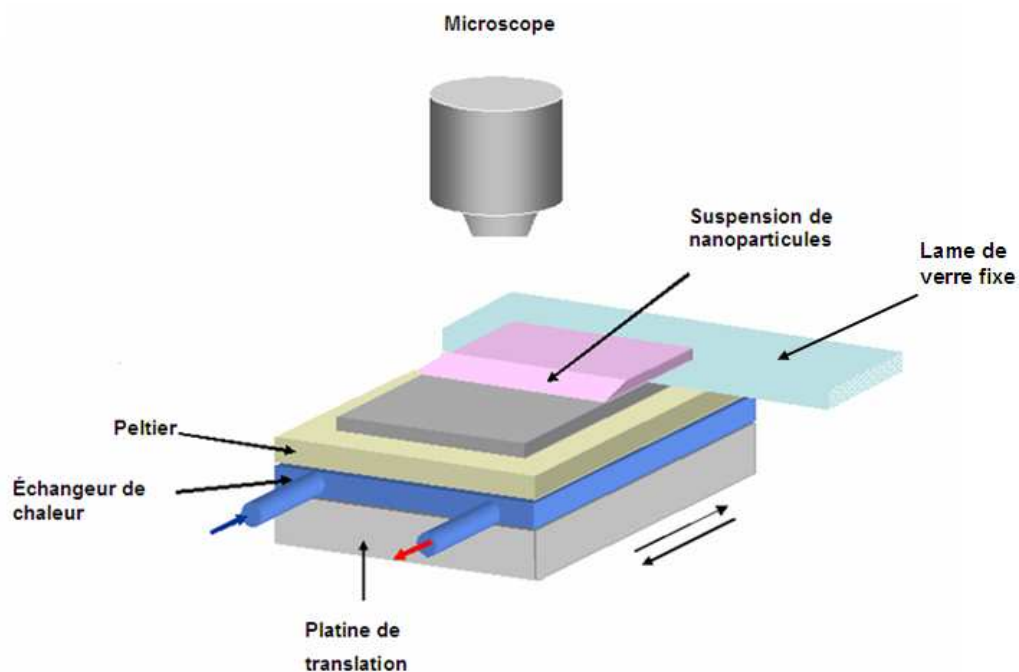


Figure 1: L'échantillon (en gris au centre) est entraîné sous la lame de verre fixe qui retient la goutte. Il est asservi en température grâce à un élément Peltier. L'observation est effectuée en champ clair par l'intermédiaire d'un microscope droit.

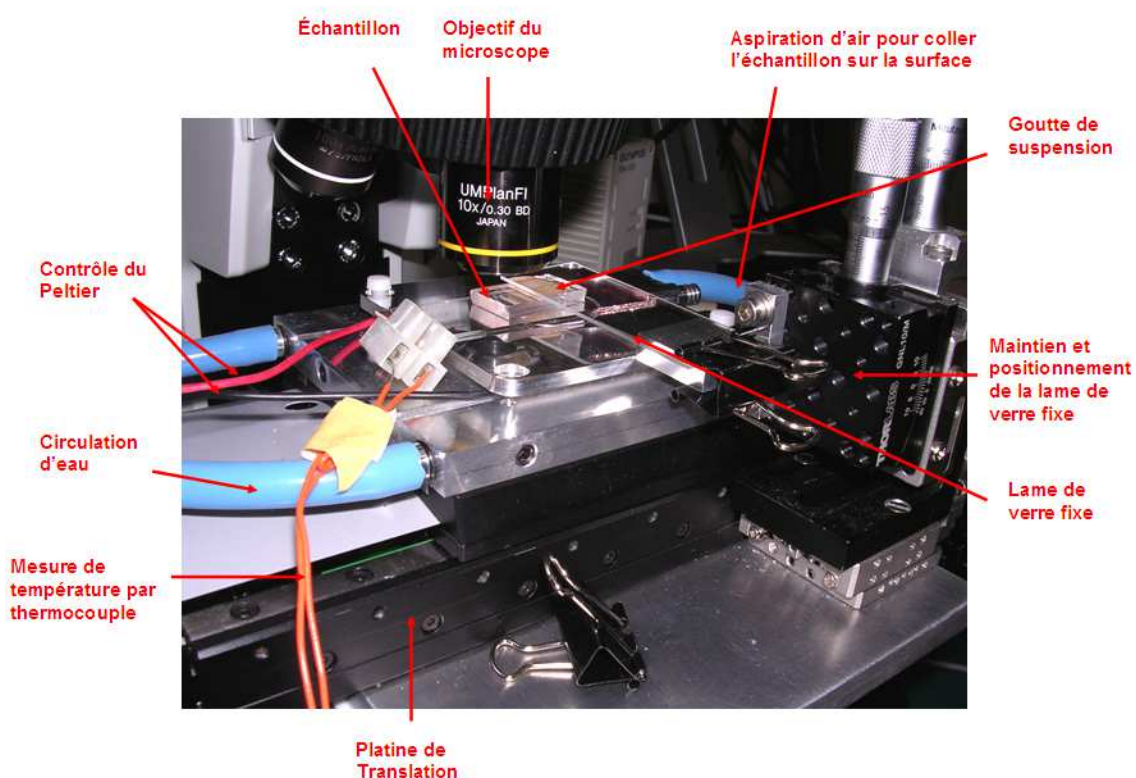


Figure 2 : Photo du cœur du montage. A comparer au schéma de principe précédent.

Le déplacement de l'échantillon est assuré par une platine de translation PI M-410DG équipée d'un moteur continu dont le mouvement est réglé par un dispositif interne d'encodage optique. L'intégration de l'encodeur optique permet d'atteindre une précision de placement de $0,1\text{ }\mu\text{m}$, et de contrôler des vitesses dans une gamme très large, de $0,1\text{ }\mu\text{m/s}$ à $1,5\text{ mm/s}$. Le moteur continu n'induit pas de vibrations lors du déplacement. On évite ainsi toute source potentielle de perturbation de l'organisation des particules.

La photo suivante (figure 3) montre différentes parties du montage expérimental. La platine de translation est posée en haut de l'image. L'ensemble est prévu pour être monté sur la platine d'un microscope afin de permettre l'observation de l'échantillon pendant l'assemblage. Du fait de l'encombrement du dispositif, des objectifs à longue distance de travail ($>3\text{mm}$) sont nécessaires. Une plaque de téflon est insérée entre la platine du microscope et la plaque de métal qui supporte la platine de translation pour pouvoir déplacer cet ensemble par rapport à l'objectif du microscope et observer la totalité de l'échantillon durant l'assemblage sans perturber celui-ci.

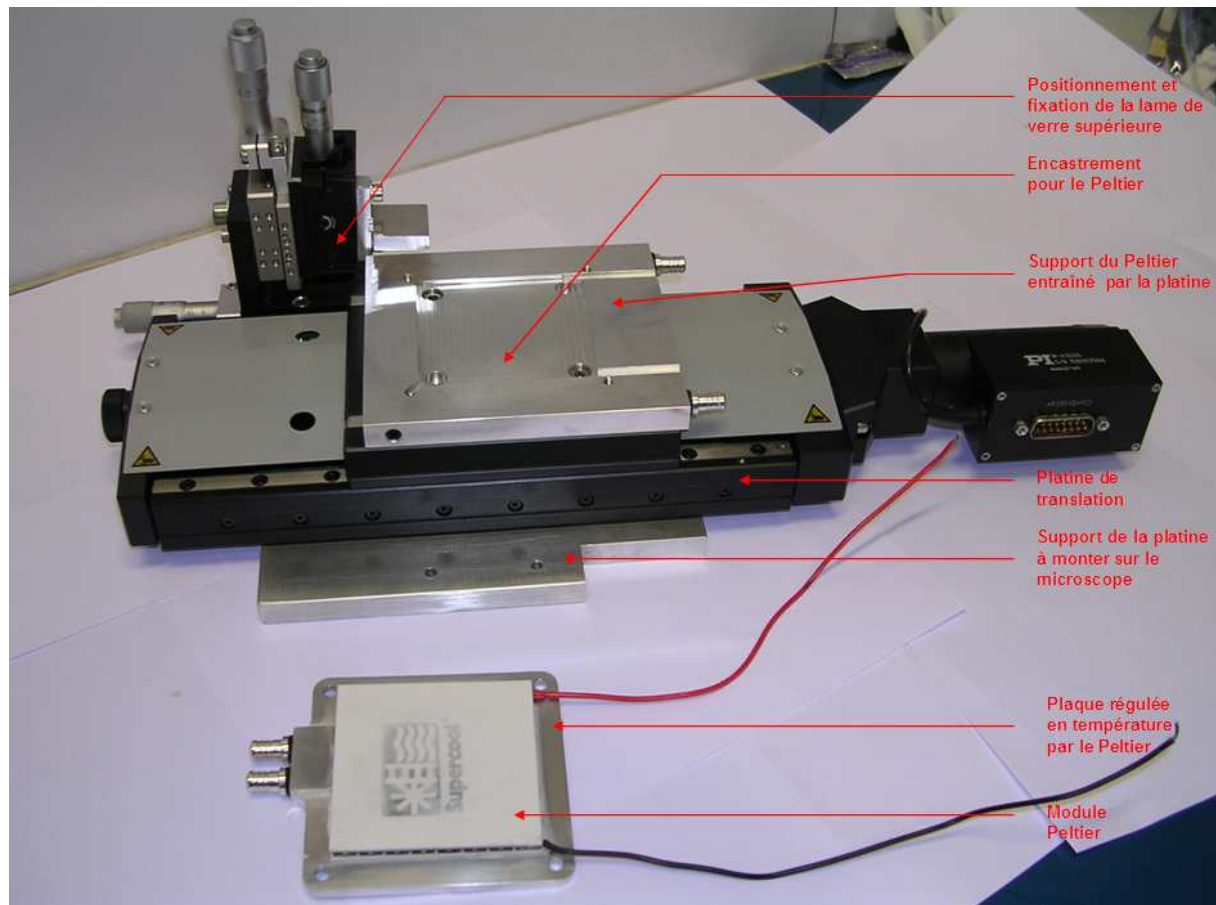


Figure 3: Les éléments clés du montage, qui supportent l'échantillon et contrôlent son mouvement et sa température.

L'asservissement en température est réalisé via un module Peltier. L'effet Peltier ou effet thermoélectrique fait migrer la chaleur d'une face du module vers l'autre à l'aide d'un courant électrique. On peut ainsi, selon la valeur du courant, refroidir ou bien réchauffer la face du Peltier en

contact avec la plaque qui supporte l'échantillon. Le Peltier et la plaque régulée en température sont présentés en bas de la figure 3.

Le support du Peltier, réalisé à l'atelier de mécanique de l'Institut Curie, contient un canal où l'on peut faire circuler un liquide, de l'eau par exemple. Il peut donc servir de thermostat en maintenant la face inférieure du Peltier à température fixe, c'est à dire en assurant le transfert thermique lors du réchauffement ou du refroidissement de celle-ci. Les faces du module Peltier sont enduites de pâte thermique silicone afin d'améliorer la conduction thermique.

Sur cette même photographie, on observe le support de la lame de verre, en haut à gauche, qui est constitué (voir photo suivante) de deux petites platines de translation et d'un goniomètre fixés sur une équerre permettant de régler la hauteur et l'angle de la lame de verre relativement au substrat. Ce petit montage permet également de contrôler manuellement la position du ménisque sur l'échantillon.

La plaque thermostatée par le Peltier a été usinée pour y intégrer des canaux d'aspiration qui sont reliés à une pompe de façon à maintenir l'échantillon durant l'assemblage. Celui-ci est généralement monté sur une plaque de verre rigide.

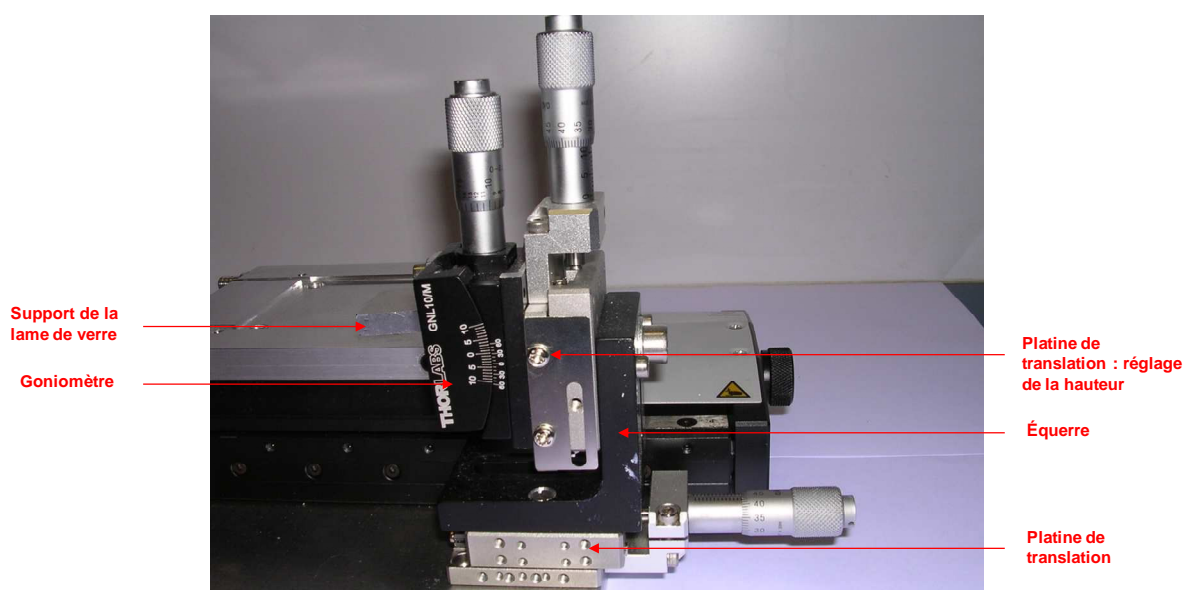


Figure 4: Dispositifs de contrôle de la position et de l'orientation de la lame de verre supérieure. Celle-ci est fixée sur son support à l'aide d'une pince.

La régulation de la vitesse et de la position de la platine se fait via le boîtier de contrôle Mercury C-863 DC Motor Controller, lui-même commandé par Labview. L'asservissement en température est effectué à l'aide d'une boucle PID par le boîtier Eurotherm régulateur de procédé 3508.

Ce régulateur a été intégré à un montage électronique afin de contrôler le Peltier. Il est lui-même commandé via Labview. Une interface Labview 7.1 a été développée pour gérer les asservissements thermique et mécanique de façon simultanée (voir figure suivante).

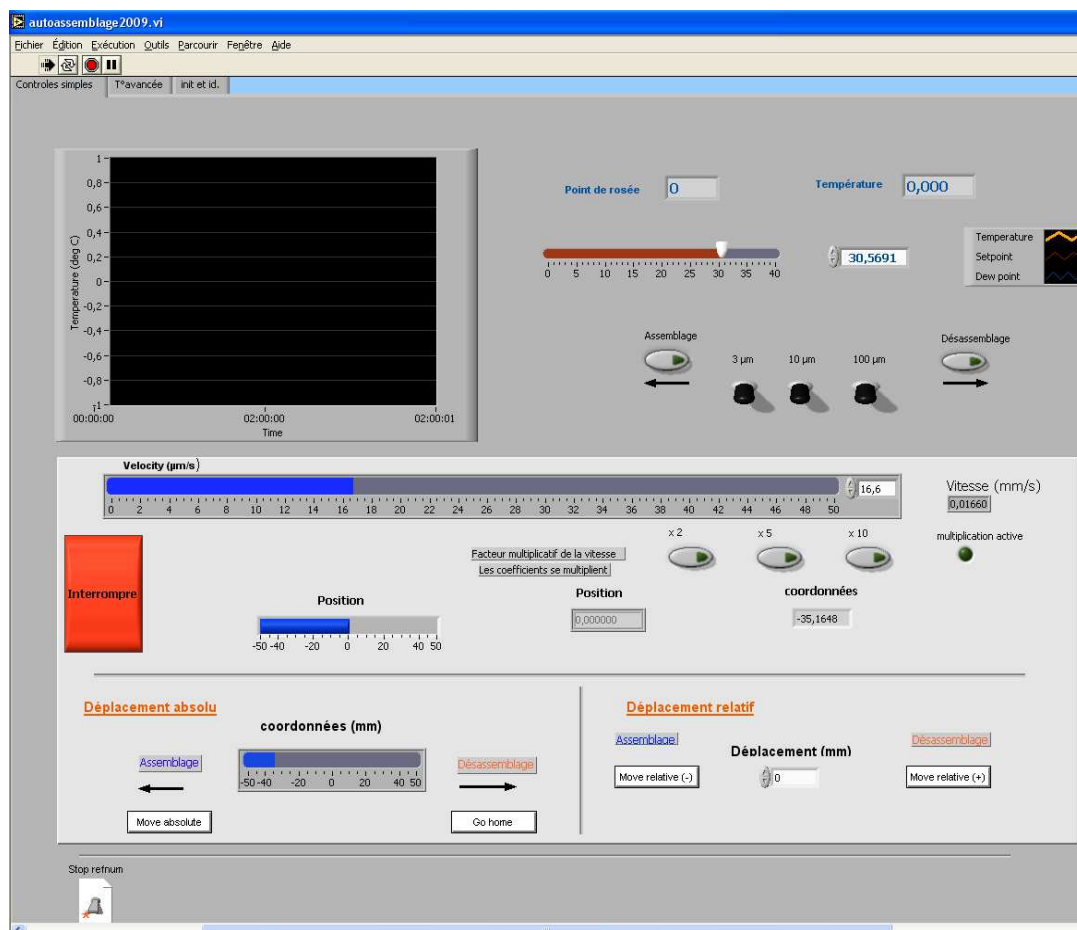


Figure 5 : Façade de l'interface Labview développée pour contrôler la température du substrat, sa vitesse et sa position.

Voici enfin une photo du montage final.

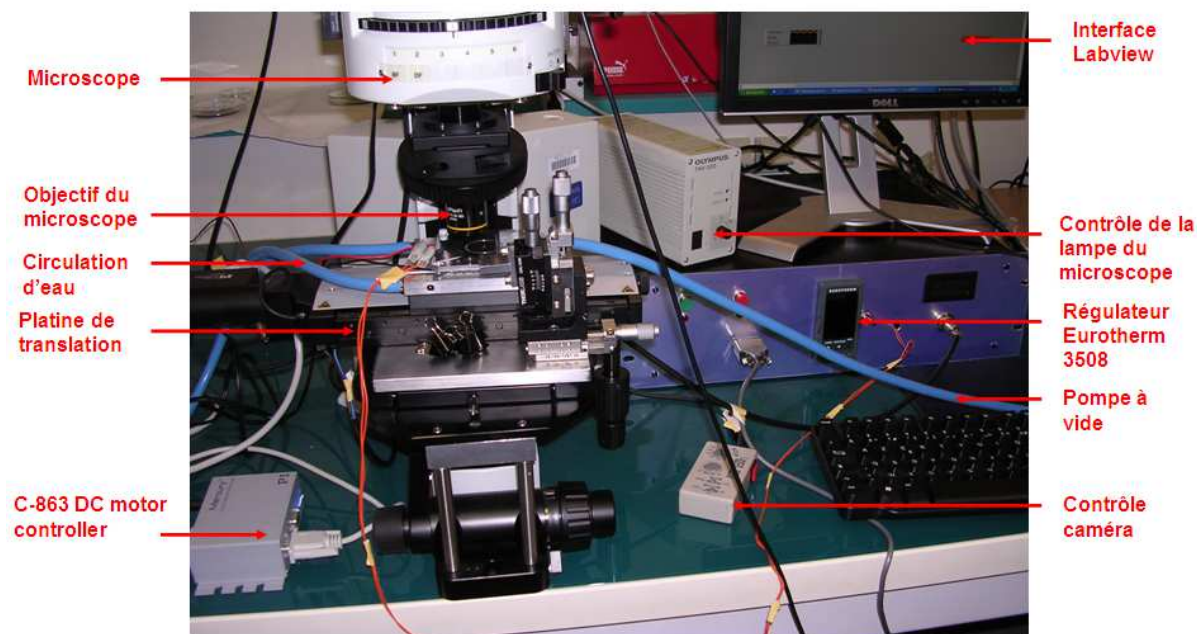


Figure 6: Le montage final.

Les performances du système sont résumées dans ce tableau.

Gamme de vitesses accessibles	De 0,1 $\mu\text{m/s}$ à 1,5 mm/s
Précision vitesse	0,1 $\mu\text{m/s}$
Précision Position	0,1 μm
Gamme de températures accessibles	-20°C à 80°C
Précision Température	< 0,1 °C
Vitesse des rampes de température.	$\approx 0,2$ °C/s
Résolution microscope	< 1 μm , observations confortables : quelques micromètres.

b) Fabrication des substrats

Pour réaliser un assemblage capillaire, un substrat structuré est nécessaire. On a généralement utilisé des substrats en polymère, essentiellement en Polydiméthylsiloxane (PDMS) ou en Cyclic Olefin Copolymer (COC, polymère thermoplastique), structurés avec des cavités ou au contraire avec

des motifs en relief. Ces substrats sont fabriqués à partir d'un moule en silicium ou en verre réalisé par photolithographie. On prépare ces moules à partir d'un morceau circulaire de verre ou de silicium, le wafer, d'environ 5 cm de diamètre.

i. Fabrication du moule

La préparation des moules est la suivante : les wafers de silicium ou de verre sont tout d'abord oxydés par plasma air (1 minute) puis placés sur une plaque chauffante à 120°C pendant 10 minutes de façon à déshydrater leur surface. Une couche de résine photosensible (SU8-2002) est ensuite enduite sur la surface du wafer par spin-coating. L'épaisseur de résine (entre 2 et 3 μm généralement) est contrôlée par la vitesse de rotation. Les wafers sont recuits à 65°C pendant 5 minutes puis à 95°C pendant 2 minutes. Ils sont ensuite placés sous un masque optique où sont dessinés les motifs à réaliser, puis insolés sous irradiation UV via un système de photolithographie (Karl Suss MJB3). Après recuit à 65°C et 95°C pendant 1 minute, les échantillons sont développés (produit fourni par le fabricant : SU8 developer) puis rincés à l'isopropanol. Le temps de développement a été ajusté par le contrôle de la formation des structures sous microscope optique (de 30 à 60 s pour 2,5-3 μm d'épaisseur). Enfin, la surface des wafers de silicium structurés a été traitée par oxydation au plasma air (nettoyage et oxydation de la surface) puis par silanisation en phase vapeur (Triméthylchlorosilane). Les wafers sont pour cela déposés pendant 5 minutes sous atmosphère saturée en silanes dans un dessiccateur sous faible pression.

ii. Puce en PDMS

Le PDMS est un polymère élastomère de la famille des silicones. On donne sa structure chimique sur la figure suivante. Sa structuration est aisée et peut être réalisée par simple moulage sur des plaques en silicium ou verre gravées par photolithographie en salle blanche. Le matériau de référence est le Sylgard 184 (Dow corning) qui est notamment utilisé dans le domaine de la microfluidique et des techniques de « soft lithography » (micro contact printing). C'est donc dans ce matériau que les substrats structurés ont été préparés.

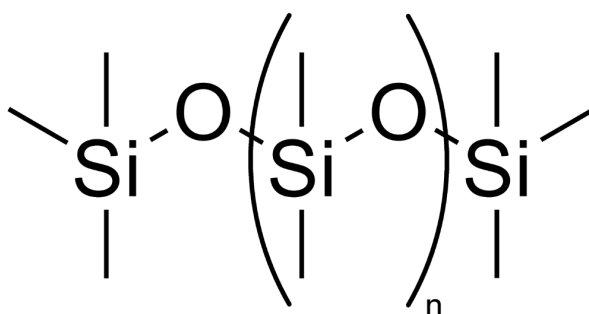


Figure 7: structure chimique du PDMS.

La préparation du PDMS est simple : On mélange 10 volumes de base (copolymères de vinylmethylsiloxane) à 1 volume d'agent de réticulation (copolymères methylhydrosiloxane dimethylsiloxane + catalyseur à base de platine). On verse ce mélange sur un moule réalisé par lithographie optique. Une fois déposé sur la surface des moules, le PDMS est ensuite réticulé à 65°C pendant 24h ou bien à température ambiante pendant au moins 48h. Il ne reste plus qu'à démouler et à découper la zone d'intérêt : on obtient ainsi un "timbre" de PDMS sur lequel se trouvent les motifs qui interviennent dans l'assemblage capillaire.

iii. *Puce en COC*

Le COC ou Cyclic Olefin Copolymer est un polymère transparent et amorphe qui est obtenu à partir d'un mélange de norbornène et d'éthylène en présence d'un catalyseur métallocène. On donne sa structure chimique ci-dessous. La part plus ou moins importante de norbornène dans le procédé permet de produire différents types de COC aux propriétés thermiques et mécaniques différentes. Nous avons utilisé du COC TOPAS®8007 (Polyplastics).

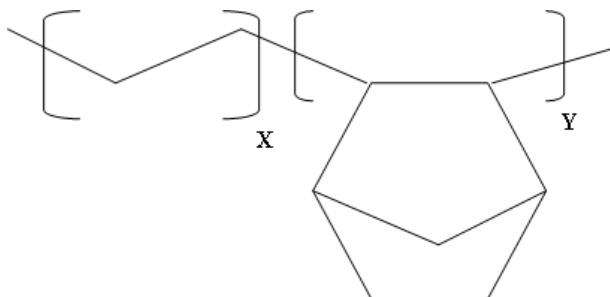


Figure 8: Structure chimique du COC (source : Wikipédia)

La structuration du COC a été effectuée par lamination suivant un procédé développé au laboratoire.¹¹² Brièvement, un film de COC (254 μm) est pressé à chaud (180°C) contre le moule. L'ensemble film+ moule est laminé (sur une machine « RLM 419 P Dry Film Laminator ») à une vitesse de l'ordre de 20 cm/min. Une fois les motifs transférés, le moule est séparé manuellement du film de COC qui est ensuite découpé en plusieurs échantillons.

c) Contrôle de l'angle de contact

Afin de faire varier l'angle de contact de la goutte de suspension, on a ajouté du tensioactif en proportion variable (proportion qui dans la suite sera systématiquement donnée en volume). Le tensioactif a été préparé de la façon suivante (proportions en volume):

- 50% d'une solution aqueuse de dodécylsulfate de sodium^a (SDS) à 10 mM.
- 50% d'une solution aqueuse de Triton X-45^b à 0,1 % en masse.

Sauf mention contraire, par « surfactants » ou « tensioactifs » nous entendrons systématiquement cette préparation.

On donne ci-après des mesures de l'angle de contact d'un mélange eau/surfactants sur du PDMS. Deux versions commerciales du matériau ont été comparées, le PDMS Sylgard® 184 de Dow Corning, et le PDMS RTV-615 de GE Silicones. On ne remarque pas de différences significatives de comportement. Dans la suite nous avons systématiquement employé du PDMS Sylgard® 184.

^a 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol

^b $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$

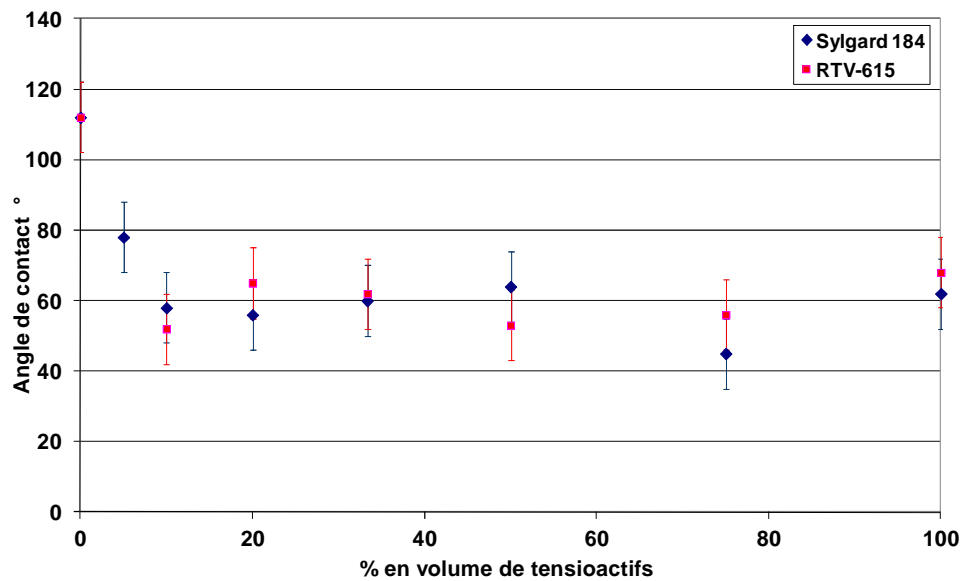


Figure 9 : Evolution de l'angle de contact d'une solution de surfactant dans de l'eau déionisée en fonction du volume de surfactant ajouté.

On remarque sur cette courbe qu'avec la concentration en surfactants l'angle de contact décroît rapidement puis se stabilise à partir d'une proportion d'environ 10% à un angle de l'ordre de 58°.

2. Vers un assemblage à haute vitesse

Comme nous venons de le voir au chapitre précédent, l'assemblage capillaire et convectif constituent des méthodes simples et polyvalentes pour l'intégration localisée de micro – nano objets sur des surfaces. Cependant, afin d'accroître les possibilités de la technique pour qu'elle puisse être utilisée comme une méthode de structuration à part entière (tout comme la lithographie optique couplée à des procédés de dépôt ou de structuration de matériaux), il est nécessaire d'en accroître la vitesse. En effet, les vitesses de déplacement de la ligne triple employées restent au mieux de l'ordre de quelques $\mu\text{m.s}^{-1}$. Bien que le ménisque (et donc la zone d'assemblage) ne soit pas limité dans sa dimension latérale, les surfaces traitables restent donc bien inférieures (en un temps donné) à celles obtenues par des techniques conventionnelles de lithographie et de dépôt de matériaux (comme la photolithographie ou le lift-off). La vitesse maximale accessible dépend principalement des phénomènes de transport de masse qui limitent l'approvisionnement en particules au niveau de la zone d'assemblage. De façon générale, la vitesse de dépôt est d'autant plus faible que la taille des particules et leur concentration sont faibles.

Nous nous sommes donc attachés à optimiser tous les paramètres expérimentaux accessibles pour obtenir le meilleur rendement possible à une vitesse la plus élevée possible, dans le cas d'un assemblage capillaire sur un réseau de cavités

a) Les paramètres influençant l'assemblage de particules en suspension.

Les paramètres influençant la vitesse d'assemblage pour un assemblage capillaire conventionnel ont été décrits en détail dans le chapitre I. Parmi les paramètres les plus importants nous pouvons citer :

- La concentration de la suspension, puisqu'il faut une accumulation importante de particules au niveau de la ligne de contact pour initier l'assemblage.
- Le taux d'évaporation, puisque les flux de liquide liés à l'évaporation transportent les particules à la ligne de contact.
- la taille des particules : qu'il s'agisse d'assemblage capillaire ou convectif, même dans des conditions où le transport de masse n'est pas limitant, les vitesses maximales de dépôt pour des nanoparticules diminuent avec leur diamètre. Il est probable que le mouvement brownien des particules s'oppose aux forces capillaires de confinement induites par le ménisque et limite fortement la probabilité d'immobilisation sur les surfaces.
- les phénomènes de recirculation au niveau de la ligne triple : ceux-ci sont induits pas le déplacement de la ligne triple au niveau du ménisque. Ils engendrent une déplétion de la

zone d'accumulation de par la création de flux hydrodynamiques depuis le ménisque vers le centre de la goutte.

Il est par ailleurs communément admis que les mécanismes d'assemblage capillaires et convectifs requièrent des particules mobiles, qui sont sensibles aux forces induites par les flux hydrodynamiques. Ces considérations sont donc applicables aux cas de particules en suspension.

b) Cas des particules denses : application aux particules magnétiques

i. La sédimentation

Nous nous sommes intéressés au cas particulier des particules magnétiques denses, c'est-à-dire pour lesquelles les temps de sédimentation sont du même ordre de grandeur que les temps caractéristiques d'assemblage ($<1h$). Ce travail a été en grande partie motivé par les perspectives d'application de ces particules dans de nombreux domaines à l'interface avec la biologie.

La sédimentation des particules au sein d'une suspension est un problème complexe qui dépend fortement de la concentration en particules. Imaginons une particule dans un liquide. Celle-ci subit, comme représentée sur la figure suivante, son poids, la poussée d'Archimède \vec{A} et la force de friction \vec{F}_T .

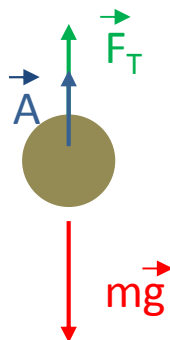


Figure 10: Représentation des forces qui s'exercent sur une particule en suspension dans un liquide

Nous allons nous placer dans un cas particulier où les mouvements de fluide mis en jeu pendant la sédimentation vérifient deux hypothèses.

1. Ils sont régis par la viscosité. Pour cela il faut que le nombre de Reynolds Re qui compare les effets de l'inertie et de la viscosité soit petit. On a :

$$Re = \frac{(\rho_{part} - \rho_{liq})VL}{\eta}$$

Équation 1

Où ρ_{part} est la masse volumique de la particule, ρ_{liq} est la masse volumique du liquide, η la viscosité du liquide (Pa.s), V la vitesse typique de la particule, et L sa taille caractéristique (son diamètre pour une sphère).

2. Les effets de la diffusion sont négligeables. Il faut pour cela que le nombre de Péclet massique qui compare les transports de masse par convection et diffusion soit grand. On le définit généralement par :

$$Pe = \frac{LV}{D_i}$$

Équation 2

Avec D_i le coefficient de diffusion de la particule.

Dans notre cas puisque l'on compare les effets du poids et de la poussée d'Archimède à ceux de la diffusion, il faut :

$$\frac{(\rho_{part} - \rho_{liq})gR^4}{KT} \gg 1$$

Équation 3

Où R est le rayon de la particule.

Si ces hypothèses sont vérifiées, pour une particule isolée qui chute dans un fluide de viscosité η , on obtient facilement la vitesse limite V_{sed} de sédimentation en appliquant le principe fondamental de la dynamique. Dans ce cas, on connaît en effet l'expression de la force de friction, proposée par Stokes en 1951.¹¹³

$$\vec{F}_T = -3\pi\eta D\vec{V}$$

Équation 4

Où D est le diamètre de la particule.

On a donc :

$$V_{sed} = \frac{2(\rho_{part} - \rho_{liq})gR^2}{9\eta}$$

Équation 5

Lorsque la suspension est concentrée le problème se complexifie, du fait des flux de recirculation produits dans le liquide par la chute des particules. En effet, celles-ci en sédimentant doivent prendre la place du liquide, qui remonte donc, ce qui induit un flux qui ralentit la sédimentation. Une loi phénoménologique très employée a été proposée dans ce cas par Richardson et Zaki (1954).¹¹⁴ La nouvelle vitesse de sédimentation V_{conc} est alors donnée par :

$$V_{conc} = V_{sed}(1 - \phi)^n$$

Équation 6

Où ϕ est la fraction volumique en particules et où n prend diverses valeurs en fonction du nombre de Reynolds, de la taille des particules et de celle de l'espace de sédimentation.

Au cours de ce travail, nous avons employé différents types de particules dont les vitesses de sédimentation sont très variables. On donne ci-dessous les vitesses de sédimentation de diverses particules et le temps nécessaire pour parcourir 1 mm à cette vitesse. Cette distance correspond à peu près à l'espace entre la lame de verre et le substrat. C'est donc le temps typique de sédimentation au sein de la goutte employée pour l'assemblage.

Particules	Composition	Densité	Diamètre (μm)	Pe	Re	V_{sed} (μm.s ⁻¹)	t_{sed}
Or (100 nm)	Or	19.3	0.1	3.10^{-4}	$1,8.10^{-7}$	0,1	≈3h
PS (1 μm)	Polystyrène	1.055	1	8.10^{-3}	$1,6.10^{-9}$	0,03	≈9h
PS (4μm)	Polystyrène	1.055	4.5	2	1.10^{-7}	0,5	≈45min
Bille magnétique ¹¹⁵ (Dynabeads)	Fer et polystyrène	1.7	1	0,1	$2,7.10^{-7}$	0,4	≈45min
Bille magnétique ¹¹⁵ (Dynabeads)	Fer et polystyrène	1.6	4.5	38	$1,8.10^{-5}$	6,6	≈2,5min

Tableau 1 : Informations sur différentes variétés de billes et conséquences sur le nombre de Reynolds, Péclet et sur la vitesse de sédimentation.

Les billes avec lesquelles nous avons essentiellement travaillé dans cette partie sont les billes magnétiques vendues par Invitrogen (Dynabeads). Ce sont des particules superparamagnétiques de 4,5 μm de diamètre constituées de fer et de polystyrène et recouvertes de protéines. Ces billes très denses sédimentent vite comme on peut le constater sur le tableau précédent. Notons cependant

que le temps de sédimentation indiqué n'est évidemment qu'un ordre de grandeur. Les suspensions concentrées constituent des milieux à la physique très complexe. On remarque aussi que l'approximation « grand nombre de Péclet » n'est pas valable (dans les exemples que nous avons donnés) sauf pour les particules de $4,5\ \mu\text{m}$, ce qui implique que l'on sous-estime le temps de sédimentation.

ii. Assemblage capillaire de particules sédimentées

Les mécanismes capillaires et convectifs ne semblent pas, à priori, adaptés au cas de particules denses qui sédimentent rapidement sur la surface d'assemblage. En effet, il n'est plus possible de tirer profit des flux induits par l'évaporation pour concentrer les particules au niveau du ménisque et favoriser leur assemblage. Toutefois nous avons démontré que l'assemblage dirigé (le positionnement localisé) de particules reste possible tant que les particules n'interagissent pas de façon spécifique avec la surface.

La figure 11 présente la ligne de contact d'une suspension de particules de $4,5\ \mu\text{m}$ observée à différents moments après le début du mouvement de la goutte sur une surface en PDMS. La vitesse est de $20\ \mu\text{m.s}^{-1}$ et la concentration en surfactant de 20%. On observe que les particules sédimentées forment des nappes sur la surface. On n'a plus en fait une vraie goutte de suspension, mais une goutte de liquide qui recouvre des amas de particules. Celles-ci sont très vite raclées sur la surface. En quelques dizaines de seconde à cette vitesse, on observe la saturation en particules de la ligne de contact. Evidemment, cette saturation sera plus rapide si la suspension de départ est plus concentrée, mais une fois cette zone d'accumulation formée, ladite concentration a peu d'importance. La seule source de perte de billes est alors le dépôt sur la surface là où il y a des motifs, ce qui est généralement insuffisant pour faire rétrécir la zone d'accumulation. On n'observe pas de flux de convection en arrière de cette zone. La dernière image de la figure présente un zoom sur la ligne de contact au niveau d'un réseau de cavités de $6\ \mu\text{m}$ de diamètre et $3\ \mu\text{m}$ de profondeur. On remarque la forte déformation du ménisque lors de la capture d'une particule par une cavité. On note aussi l'organisation régulière des particules au niveau de la ligne de contact. Les particules ont une faible mobilité les unes par rapport aux autres. Ce comportement est très différent de celui d'une suspension. Il s'agit d'une nouvelle forme d'assemblage capillaire.

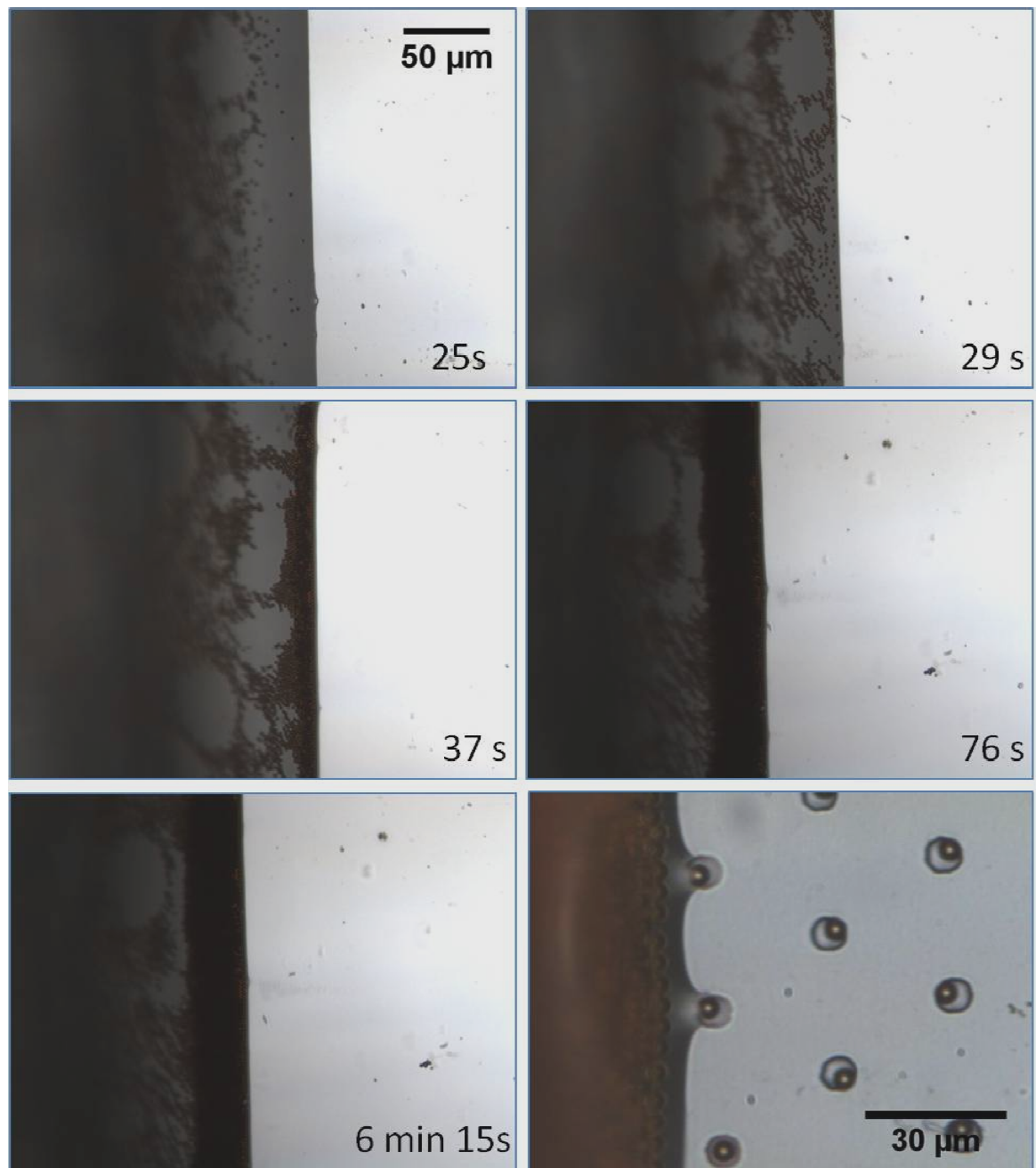


Figure 11 : Concentration avec le temps des particules au niveau de la ligne de contact. $t=0s$ est la mise en mouvement de la goutte. L'accumulation des particules est très rapide. La dernière image montre un zoom sur une capture dans une cavité.

En résumé, bien que les particules sédimentent très rapidement au cours de l'expérience et ne soient donc pas sensibles au flux d'évaporation, nous avons observé : i) que les particules immobilisées sur la surface étaient emportées par le ménisque et maintenues dans la phase liquide ii) après quelques dizaines de seconde la formation d'une zone d'accumulation au niveau de la ligne de contact.

Dans ces conditions expérimentales, il apparaît que le transport de masse vers la zone d'assemblage n'est plus assuré par l'évaporation mais directement par les forces capillaires exercées par le

ménisque pour maintenir les particules dans la phase aqueuse. Le ménisque agissant comme un « racloir » qui balaye la surface d'assemblage. De fait la température ne joue plus un rôle significatif. Une fois la zone d'accumulation générée, nous avons observé un dépôt localisé et sélectif dans les structures créées sur le substrat : les forces de confinement induites par les motifs géométriques sont à l'origine d'une immobilisation localisée des particules au niveau des motifs alors que le ménisque empêche tout dépôt sur les zones non structurées de la surface. La figure suivante présente un assemblage en cours sur un réseau de cavités. Le rendement et la propreté du résultat sont excellents.

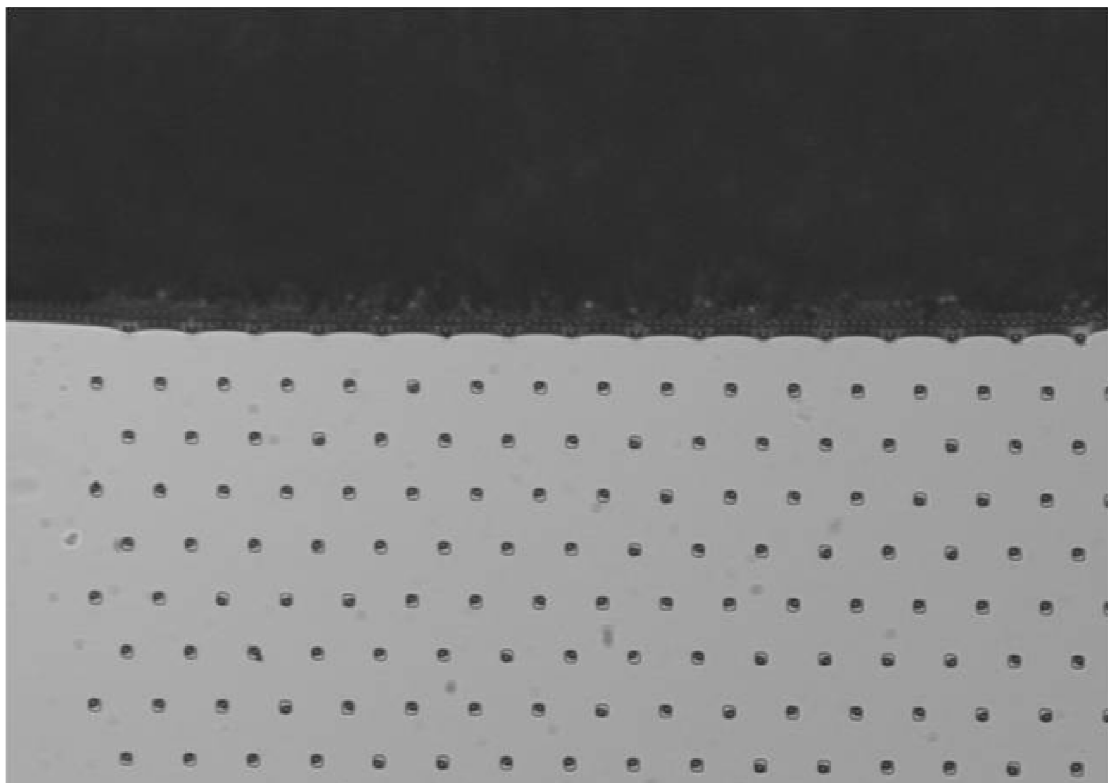


Figure 12 : Assemblage capillaire de particules magnétiques de $4,5\ \mu\text{m}$ sur un réseau en PDMS de cavités de $6\ \mu\text{m}$ de diamètre, de $2,5\ \mu\text{m}$ de profondeur. Pas du réseau hexagonal : $30\ \mu\text{m}$.

On présente enfin un agrandissement en microscopie optique et une image en microscopie électronique de particules immobilisées par cette technique sur du PDMS.

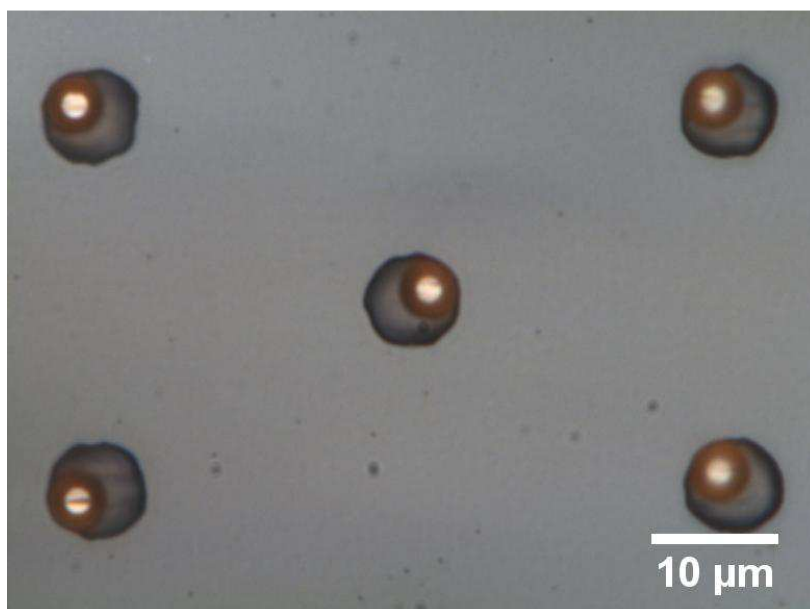
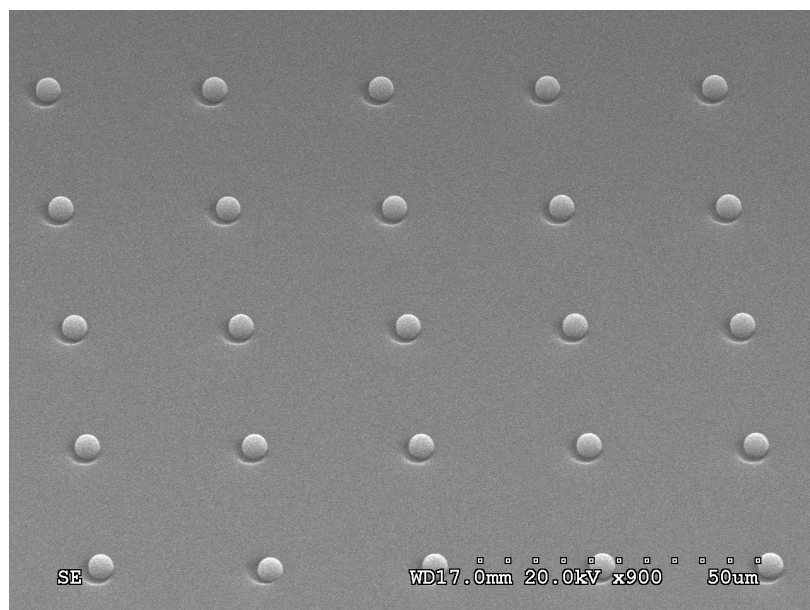


Figure 13 : En haut, image en microscopie électronique d'un assemblage de particules de $4,5\ \mu\text{m}$ sur du PDMS. En bas, zoom sur des particules de même taille. Les billes émergent largement de chaque cavité.

Cette technique permet d'obtenir aisément et avec une très bonne reproductibilité des réseaux de particules très propres (pas de captures hors des motifs). La quantité de particules nécessaire est encore plus faible que pour un assemblage capillaire classique compte tenu du mécanisme de concentration très efficace à la ligne de contact et de l'absence de flux de recirculation qui pourrait favoriser la déplétion du ménisque.

c) Influence des conditions de mouillage

Contrairement à l'évaporation qui n'a pas d'influence directe sur l'assemblage, les forces de capillarité jouent un rôle essentiel dans l'immobilisation de particules sédimentées. Afin de mettre en évidence l'effet de ce paramètre nous nous sommes intéressés au rendement d'assemblage sur des réseaux de cavités d'environ 6 μm de diamètre et 2,5-3 μm de profondeur. Nous avons considéré une définition très restrictive du rendement : celui ci ne tient compte que des cavités remplies par une seule bille exclusivement (Les remplissages multiples ont été considérés comme des échecs). Si l'on considère tous les remplissages, le rendement croît légèrement mais les résultats ne changent pas significativement.

La figure 14 présente le rendement en fonction de la concentration en tensioactifs sur des réseaux de cavités d'environ 6 μm de diamètre et 2,5-3 μm de profondeur pour une vitesse de déplacement du substrat de 5 $\mu\text{m.s}^{-1}$. La température a été fixée à 20°C.

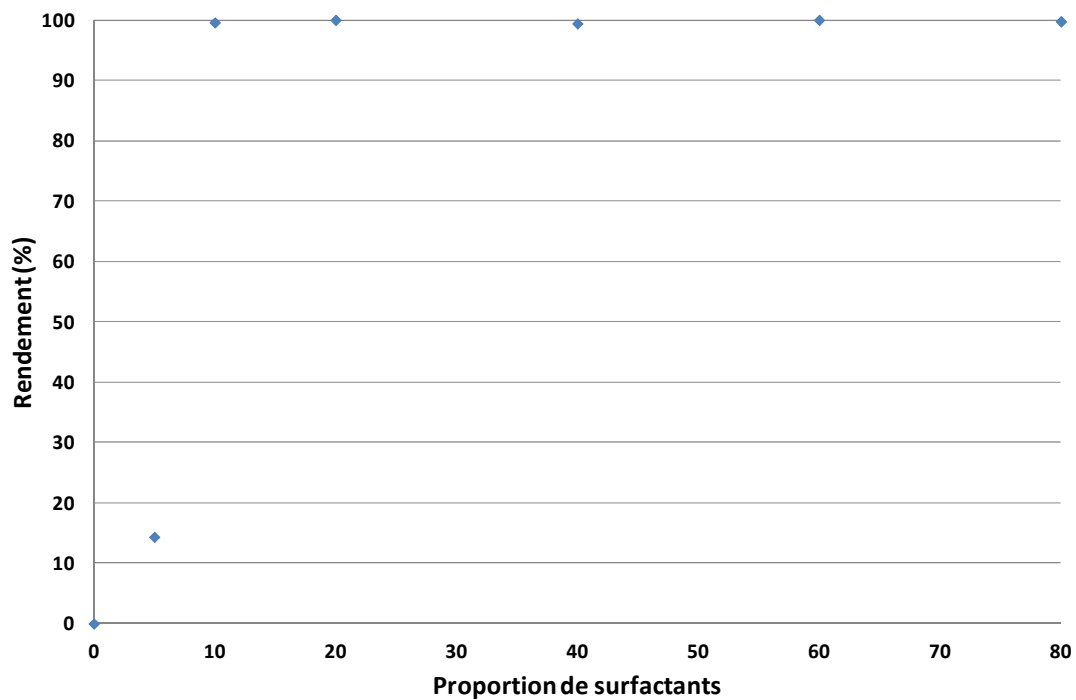


Figure 14 : Rendement de l'assemblage sur un réseau de cavités de 6 μm de diamètre et de 2,5 μm de profondeur, pour des particules magnétiques de 4,5 μm sur du PDMS. $T=20^\circ\text{C}$. $v_s=5 \mu\text{m.s}^{-1}$. Le rendement très faible au départ bondit rapidement avec la concentration en surfactants avant de se stabiliser.

Comme on peut le constater sur cette figure, lorsque la quantité de surfactant est faible (0-5%) le rendement est très bas. En effet pour de telles proportions de surfactants, l'angle de contact est trop élevé pour que les particules puissent s'immobiliser sur les structures. Si l'on se reporte à la figure 9, on constate qu'effectivement l'angle de contact est dans ce cas très supérieur à 60°, qui est l'angle

où l'on commence à observer généralement un assemblage efficace. A 10% par contre l'angle de contact est de l'ordre de 58° et effectivement comme on le constate sur la figure précédente, le rendement d'assemblage s'accroît considérablement et dépasse les 99%.

L'influence du mouillage est expliquée sur la figure suivante. Sur une surface plane, lorsque l'angle de contact est élevé, les particules situées au niveau de la ligne de contact subissent les forces capillaires qui s'opposent à la déformation de la surface de la goutte. La résultante de ces forces, notée \vec{R} sur cette figure, possède une composante importante dans le plan horizontal, laquelle s'oppose à « l'abandon » de la particule en avant de la goutte (figure 15). Ces forces maintiennent donc les particules au sein de la goutte. \vec{R} a aussi une composante verticale qui plaque la particule sur la surface. Cependant, en l'absence d'interactions spécifiques avec le substrat, les possibles effets d'adhésion de la bille au substrat ne sont pas suffisants pour contrebalancer la force horizontale qui entraîne les particules avec la goutte. Cependant si la particule rencontre un obstacle (voir figure 15), la composante horizontale est compensée (au moins partiellement si la paroi n'est pas complètement verticale) par la réaction du support (contact solide-solide). Reste la composante verticale qui plaque la particule sur le substrat. L'adhésion non spécifique qui en résulte est alors suffisante pour immobiliser la particule sur l'obstacle.

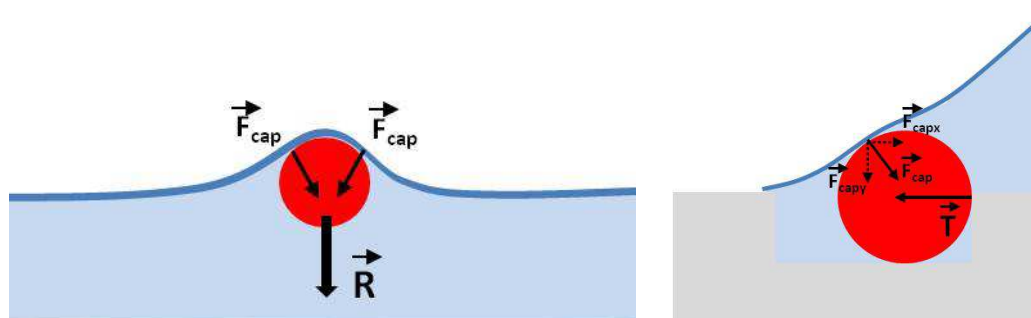


Figure 15 : A gauche, forces capillaires subies par la bille au niveau de la ligne de contact, vue de dessus. Ces forces entraînent la particule avec la goutte. A droite (vue de côté), au contact avec un obstacle, la composante horizontale des forces capillaires est compensée. La particule n'est plus entraînée et peut s'immobiliser.

Si la particule est plus grande que l'obstacle (c'est le cas ici, puisque nous piégeons des particules de $4,5\ \mu\text{m}$ dans des cavités de $2,5\text{-}3\ \mu\text{m}$), la particule peut être extraite de la cavité en se désengageant de la structure de capture. Cela se produira si la force horizontale est trop importante compte tenu de la friction exercée sur la bille par la surface. Or la composante horizontale est directement liée à l'angle de contact, puisque ce dernier change l'orientation de la force capillaire. Plus l'angle de contact est élevé et plus la composante horizontale est grande. Il existe donc un angle limite au-dessus duquel la composante horizontale est trop importante pour que les particules soient piégées contre les obstacles ($\approx 60^\circ$) et un angle limite au-dessus duquel les particules sont piégées dans les

obstacles mais pas sur une surface plane ($\approx 20-30^\circ$). En-dessous de ce dernier, si la mobilité des particules et les flux de convection sont suffisants un assemblage convectif est possible.

d) Influence de la vitesse de déplacement du substrat

Il apparaît que la vitesse de déplacement a aussi une influence sur le mouillage. En effet, l'angle de contact formé à l'interface solide/liquide/gaz par la goutte est modifié lorsque celle-ci se déplace car l'angle est alors déterminé par l'équilibre entre les forces visqueuses et les forces capillaires et non plus juste par les forces capillaires. De nombreux modèles ont été proposés pour décrire les angles de contact dynamiques.¹¹⁶⁻¹²¹ Les mouvements du liquide au niveau de la ligne de contact restent mal compris, les contraintes au sein du liquide présentant une singularité à la ligne de contact. Une loi a cependant été proposée par Voinov et Tanner¹²² :

$$\theta_d^3 - \theta_s^3 = ACa$$

Équation 7

Où θ_d est l'angle dynamique, θ_s l'angle statique et A une constante qui vaut environ $A \approx 94$. « Ca » est le « nombre capillaire » qui compare l'importance de la viscosité et celle de la tension de surface. On a :

$$Ca = \frac{\eta V}{\delta}$$

Équation 8

Avec η la viscosité (Pa.s^{-1}), δ la tension de surface liquide/solide et V la vitesse de la goutte. Dans cette formule, on conserve un signe à V et à Ca. On compte V positivement pour une avancée et négativement pour un recul. A l'aide d'un développement limité, lorsque Ca est petit, on obtient :

$$\theta_d - \theta_s \approx \frac{1}{3} \frac{ACa}{\theta_s^2}$$

Équation 9

Faire glisser la goutte sur la surface est équivalent à un recul. Le nombre capillaire « Ca » est donc négatif et l'on s'attend à une diminution de l'angle de contact avec la vitesse.

Comme on peut le voir sur la figure 16 pour de faibles concentrations en surfactants, ici 5%, le rendement d'assemblage est très fortement influencé par la vitesse du ménisque. En effet à ces

faibles concentrations en surfactants, l'angle de contact est a priori trop important pour que les particules soient piégées dans les structures. Cependant, l'angle diminue avec la vitesse. A une certaine vitesse, située dans le cas étudiée entre 25 et 35 $\mu\text{m.s}^{-1}$, l'angle chute sous la valeur limite en-dessous de laquelle un assemblage est possible ($\approx 60^\circ$). Le rendement d'assemblage s'accroît alors fortement.

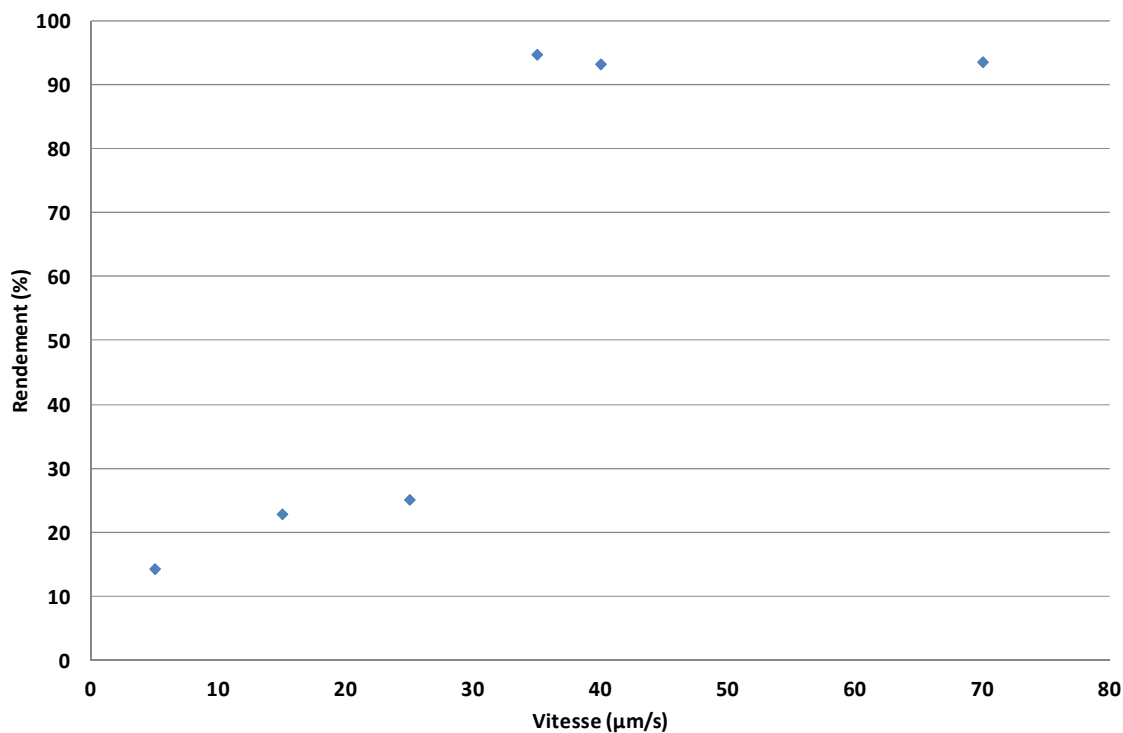


Figure 16 : Evolution du rendement d'assemblage en fonction de la vitesse sur un réseau de cavités de 6 μm de diamètre et de 2,5 μm de profondeur sur du PDMS avec 5% de surfactants. $T=20^\circ\text{C}$. Un saut de rendement très important se produit lorsque l'angle de contact dynamique atteint une valeur pour laquelle l'assemblage est possible.

On donne enfin sur la courbe suivante des résultats obtenus à différentes vitesses pour différentes concentrations de surfactants.

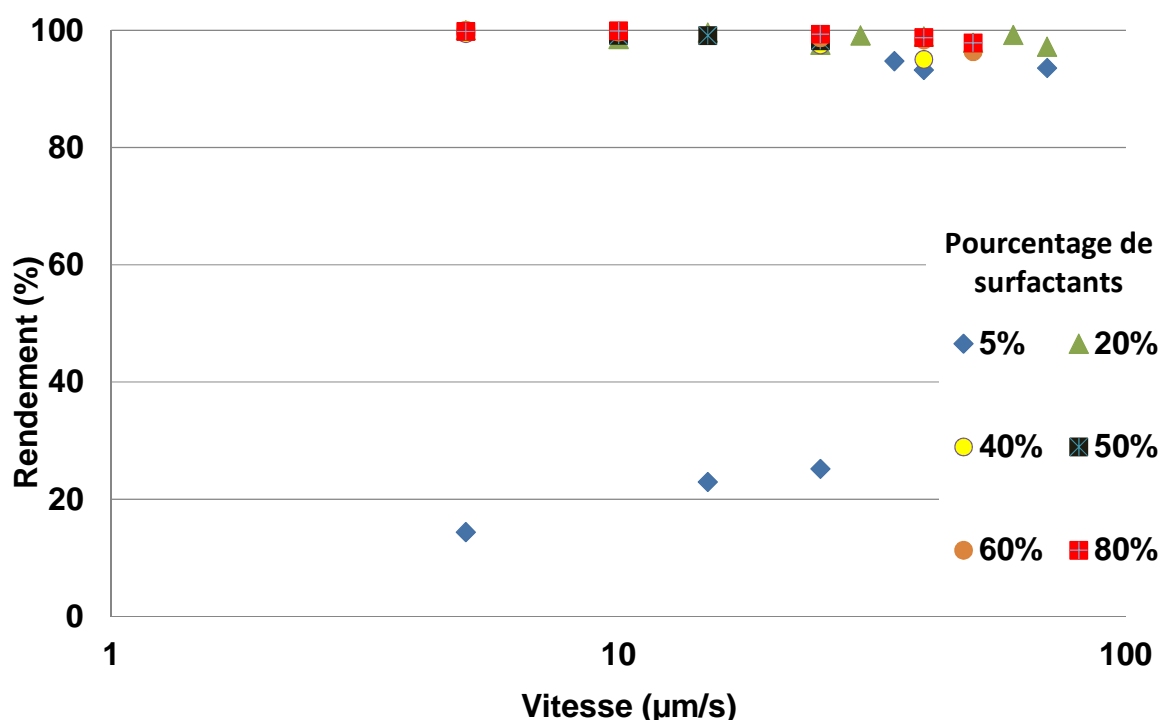


Figure 17 : Courbe représentant le rendement de cavités remplies par une unique particule en fonction de la vitesse et de la concentration en surfactants. Diamètre des cavités : 6 μm. profondeur : 2,5-3 μm. T=20°.

Pour des concentrations faibles de surfactants, comme on l'a vu, aucun dépôt n'est observé. Lorsque la vitesse atteint un seuil situé entre 25 et 30 $\mu\text{m.s}^{-1}$ le rendement augmente soudainement au-dessus de 95 % et reste stable aux vitesses plus élevées. Pour des concentrations élevées de surfactants (>5%) le rendement est relativement stable et demeure à des valeurs supérieures à 95% pour des vitesses allant jusqu'à 80 $\mu\text{m.s}^{-1}$. On observe cependant une légère décroissance avec la vitesse lorsque le rendement est élevé. Nous pouvons supposer un effet lié à la dynamique du procédé d'immobilisation : un passage trop rapide du ménisque sur les structures ne permet pas aux billes de trouver une position stable sur la surface pour leur immobilisation soit effective.

e) Vers un assemblage à haute vitesse

Afin d'accroître les possibilités de la technique d'assemblage capillaire, pour qu'elle puisse être utilisée couramment, il nous a paru nécessaire d'en accroître la vitesse. Nous avons démontré dans les paragraphes précédents que les conditions d'assemblage capillaires pour des particules micrométriques étaient compatibles avec des vitesses maximales de l'ordre de quelques dizaines de

micromètre par seconde, ce qui représente déjà une amélioration significative par rapport aux vitesses décrites dans la littérature. En effet, l'angle de contact diminue avec la vitesse. Or pour un angle de contact trop faible, l'assemblage capillaire n'est plus possible. Avec les particules magnétiques que nous avons employées, pour des angles de contact trop faibles on a tantôt des assemblages convectifs locaux si les particules sont encore en suspension, tantôt le dépôt chaotique de grands ensembles de particules. Le dépôt ne s'effectue plus spécifiquement sur les motifs. Pour atteindre des vitesses plus élevées, il n'est pas nécessaire de fondamentalement modifier le fonctionnement du système. Il faut simplement s'assurer que l'angle de contact ne chute pas trop bas. On réduit donc au minimum possible la concentration en surfactants

On a par ailleurs observé expérimentalement qu'une distance minimale entre la lame de verre et le substrat était nécessaire. Si cette distance n'est pas suffisante, la goutte s'allonge indéfiniment, et les particules se déposent aléatoirement sur la surface. L'origine de cet effet n'est pas clairement identifiée pour l'instant.

La figure suivante complète la figure précédente par une étude des rendements à haute vitesse. On s'est placé à la concentration en tensioactifs (10%) la plus faible qui permette un bon rendement même à basse vitesse, et on a fait croître la vitesse.

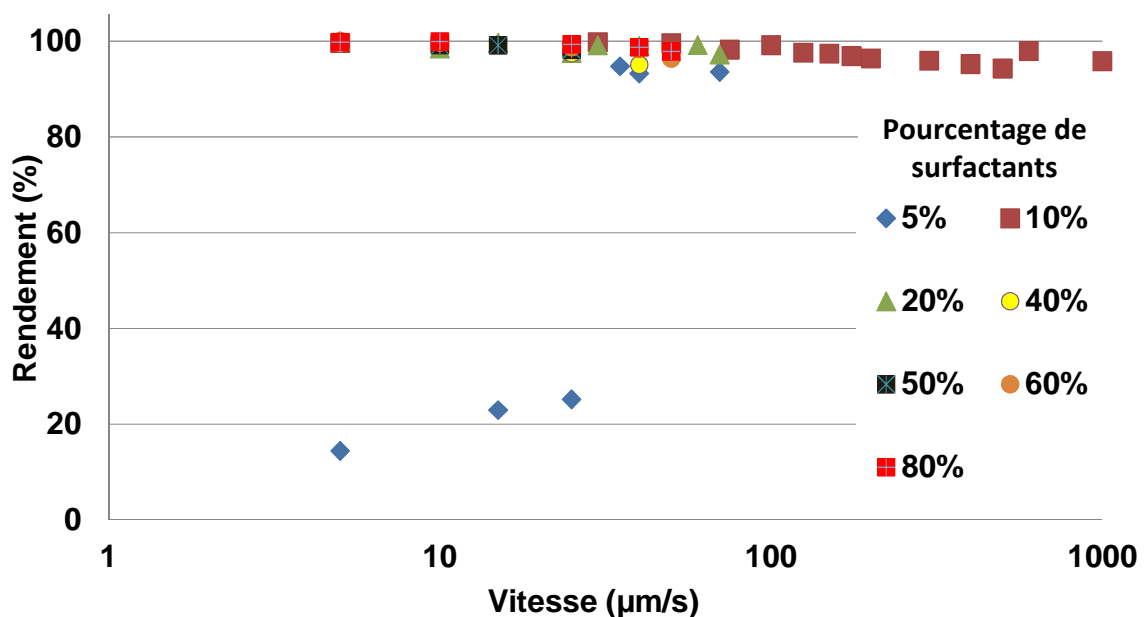


Figure 18: Courbe représentant le rendement de cavités remplies par une unique particule en fonction de la vitesse et de la concentration en surfactant. L'assemblage capillaire reste utilisable aux vitesses élevées. Diamètre des cavités : 6 μm. profondeur : 2,5-3 μm. T=20°.

Une vitesse de 1 mm.s⁻¹ a pu être atteinte avec des rendements de l'ordre de 95% (95,8% à 1mm/s). Si, pour le calcul du rendement, on considère toutes les cavités remplies indépendamment de leur remplissage, le rendement atteint 98,8% à 1 mm.s⁻¹.

Ces vitesses d'assemblage permettent de traiter de grandes surfaces de façon très rapide : si l'on prend l'exemple d'un échantillon de diamètre 10 cm, nous obtenons des temps d'assemblage inférieurs à 2 min, bien inférieurs aux durées typiques des procédés de structuration conventionnels. Ces résultats renforcent la praticité de la méthode, des surfaces considérablement plus grandes pouvant être traitées en un temps raisonnable et en utilisant un système expérimental simple et robuste.

3. Transfert

Nous avons vu dans les exemples précédents que des surfaces de PDMS décorées par des particules pouvaient être produites aisément par assemblage capillaire. Ces surfaces en PDMS ont elles-mêmes de nombreuses applications que nous verrons dans la partie II.4. Toutefois pour de nombreuses autres applications, il serait intéressant de disposer d'une méthode pour pouvoir transférer et intégrer les assemblages réalisés sur d'autres types de surfaces (ex : verre, silicium ...).

L'utilisation du PDMS comme timbre pour le transfert de molécules ou de particules par contact est une technique désormais bien connue, notamment au travers du micro-contact printing. De par ses propriétés de déformation et de conformation le PDMS permet un contact intime avec les surfaces cibles et un transfert homogène des espèces. Toutefois, l'efficacité de ces méthodes de transfert reste étroitement liée aux énergies d'adhésion des objets à transférer. Le transfert de particules auto-assemblées en employant du PDMS a déjà été proposé.⁵⁹ Toutefois le transfert de particules magnétiques n'a jamais été réalisé jusqu'à présent : cette technique présente un potentiel applicatif très fort en biologie mais également dans de nombreux domaines pour l'intégration de capteurs et la détection¹², le stockage d'information^{13,123}, etc. De par la complexité et la difficulté de mise en œuvre de procédés de structuration et de dépôt de matériaux magnétiques conventionnels (dépôts par pulvérisation, croissance électrolytique ...), une technique d'intégration simple, parallèle et à bas coût fondée sur des mécanismes d'auto-assemblage permettrait de réduire les contraintes technologiques et d'autre part de rendre possible l'intégration de matériaux magnétiques sur des matériaux fragiles ...

a) Principe général

Une fois la surface de PDMS décorée de particules, celles-ci peuvent être transférées sur d'autres substrats, par exemple en utilisant comme colles des polymères photoréticulables (figure 19). Ces polymères deviennent solides lorsqu'exposés à de la lumière ultraviolette. Une couche de polymères photoréticulables est tout d'abord enduite par spin-coating sur un substrat (verre ou silicium). Puis, le timbre est mis en contact avec le substrat. L'échantillon est ensuite placé sous une source lumineuse (lampe à vapeur de mercure) émettant en particulier dans la gamme des ultraviolets, et le polymère est insolé à travers le PDMS. Les deux surfaces sont ensuite décollées.

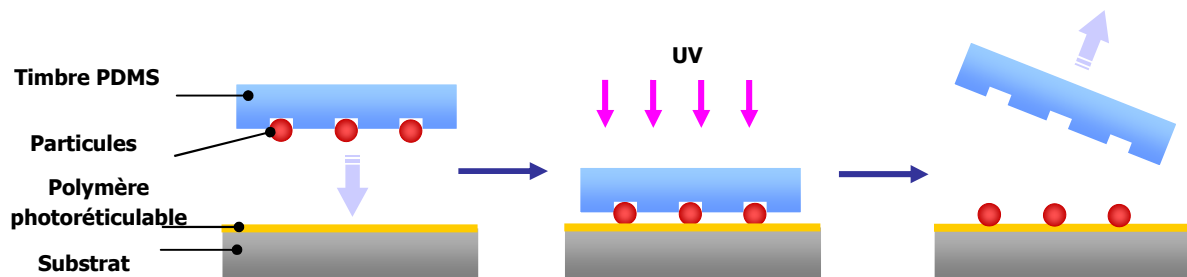


Figure 19 : schéma de principe du processus de transfert. Le substrat orné de billes est mis en contact avec la surface d'intérêt, puis l'insolation est effectuée à travers le PDMS. Les deux éléments sont ensuite séparés.

On souhaite obtenir une couche de polymère suffisante pour que le transfert s'effectue efficacement, mais qui ne recouvrira pas toute la surface de la bille, puisqu'on veut continuer à pouvoir bénéficier des propriétés de surface de la particule pour des applications

b) Résultats

Plusieurs polymères photoréticulables d'usage courant ont été testés :

- Le Polyéthylèneglycol-diacrylate (PEG-DA, $n = 200$ monomères), mélangé à 10% en volume de photoinitiateur (3hydroxy-2methyl-1phenyl-1propanone).
- Le PEG-DA ($n = 700$ monomères) mélangé à 5% de photoinitiateur, l'ensemble étant dilué avec 25% d'eau.
- La résine époxy SU8-2002 (Microchem).
- Le Norland Optical Adhesive 61 ("NOA 61").

Nous avons utilisé pour toutes ces expériences des particules magnétiques de $4,5 \mu\text{m}$ immobilisées dans des cavités de $2,5\text{-}3 \mu\text{m}$ sur du PDMS.

i. PEG-DA 200

Le Polyéthylène glycol est un polymère particulièrement utilisé en biologie pour ces propriétés de passivation de surfaces vis-à-vis de l'adsorption de protéines. Dans notre cas, les chaînes de polymères sont couplées à des groupements diacrylate qui vont permettre, en utilisant un photoinitiateur approprié^c, de créer des liaisons covalentes entre les chaînes et d'induire une réticulation du polymère. On donne sur la figure 20, la formule du PEG-DA.

^c 3-hydroxy-2-methyl-1-phenyl-1-propanone

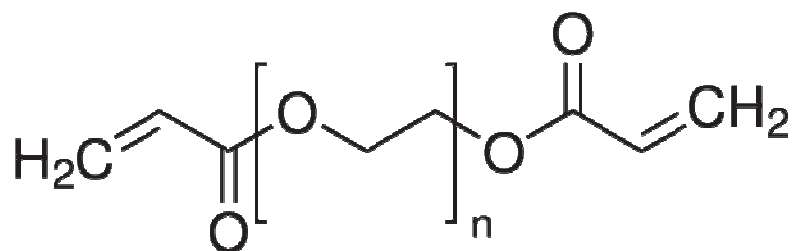


Figure 20 : Formule chimique du PEG-DA (source : <http://www.sigmaaldrich.com>)

Une fine couche de polymère est étalée sur un échantillon de silicium par spin-coating (60s, 3000 tours/minutes). Une épaisseur de 1,5 μm est obtenue (mesure par réflectométrie). On cherche à transférer sur cet élément de silicium des billes qui ont été assemblées sur un réseau de trous en PDMS. L'échantillon est mis en contact manuellement avec l'élément de PDMS où se trouvent les billes, et l'ensemble est insolé pendant 5 minutes sous lampe UV pour réticuler le polymère. On sépare alors les deux éléments. De façon à évaluer le rendement de transfert, des images ont été systématiquement prises sur le timbre PDMS avant transfert et sur le substrat de silicium après transfert. La figure 21 montre une image en microscopie optique d'un réseau de billes de 4,5 μm transférées en utilisant le protocole décrit. La structure du réseau a été parfaitement conservée. Quelques structures reconnaissables ont été surlignées en rose. En haut on observe le réseau de trous à la surface du PDMS. En dessous son négatif sur le silicium. Bien que le rendement de l'étape d'assemblage n'ait pas (sur cet exemple) été parfait, l'étape de transfert montre quant à elle un rendement de 100%. La figure 22 montre un agrandissement de l'échantillon sur lequel a été réalisé le transfert. On observe très clairement la présence des billes transférées mais également la formation autour des billes d'une empreinte correspondant aux motifs de capture présents dans le PDMS. La formation de ces motifs est aisément interprétable. Le PEG étant peu visqueux s'est engouffré à l'intérieur des cavités du PDMS, et les trous donnent donc des plots au démoulage. La bille est donc entourée de PEG.

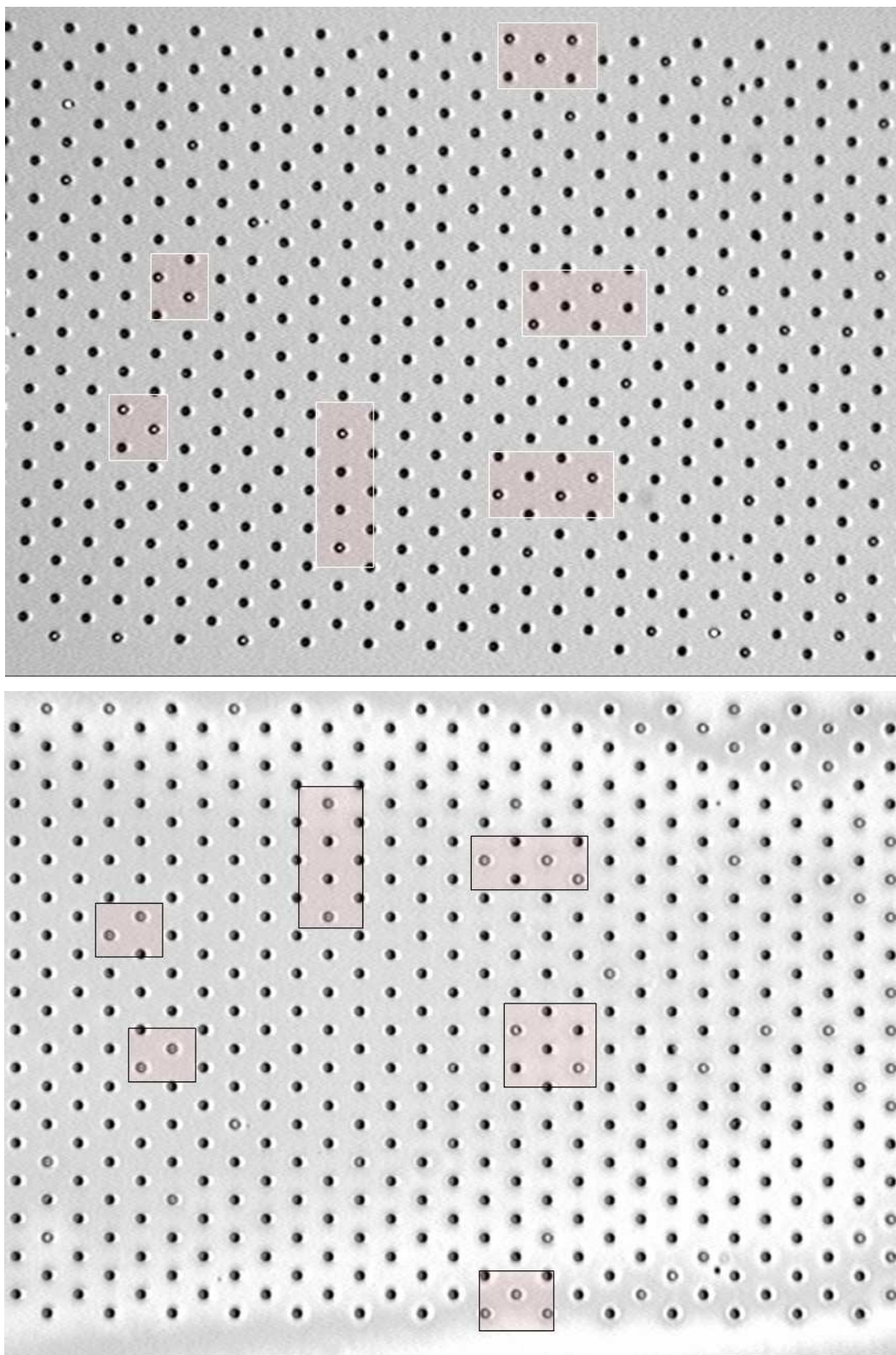


Figure 21: En haut, réseau sur le PDMS. Les petits ronds blancs sont des cavités vides, les cavités pleines apparaissent comme des taches circulaires noires. En bas, le négatif sur le silicium. Les ronds blancs sont des plots de PEG. Les billes apparaissent sous la forme d'une tache noire sur le côté du plot. Les motifs dessinés par les cavités vides ont permis de repérer précisément deux zones correspondantes, sur le PDMS et sur le silicium. Toutes les billes contenues dans des cavités du substrat PDMS ont été transférées dans un plot sur le silicium. Pas du réseau hexagonal : 30 μm .

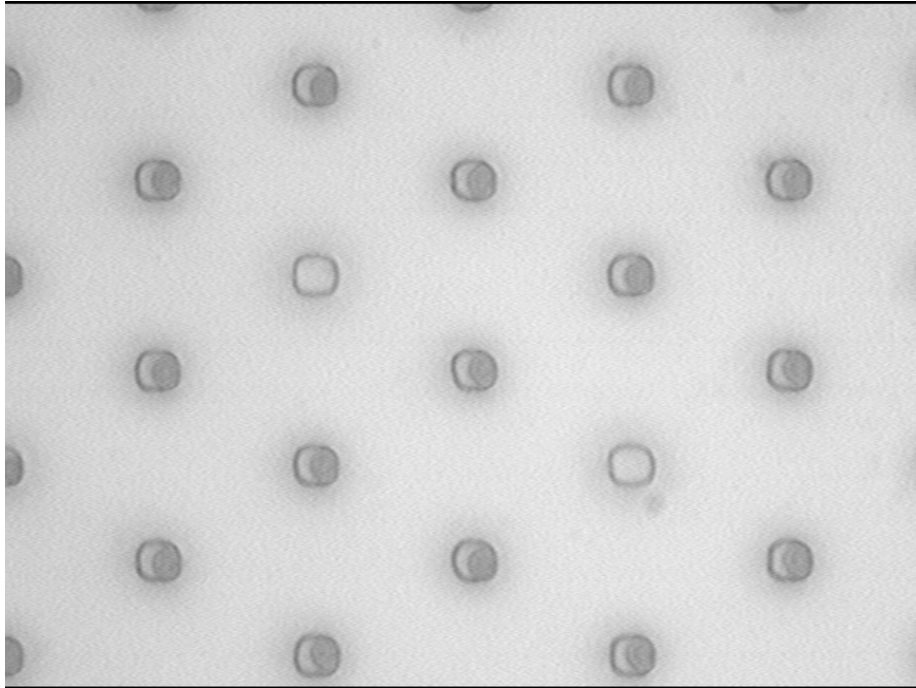


Figure 22: Plots de PEG 200 contenant des billes de 4,5 μm . On rappelle : le diamètre des billes vaut 4,5 μm , la profondeur des cavités entre 2,5 et 3 μm . Pas du réseau hexagonal : 30 μm .

ii. **PEG-DA 700**

Nous avons aussi voulu utiliser du PEG-DA d'un poids moléculaire différent : le PEG-DA 700. Celui-ci est plus visqueux que le PEG-DA 200, aussi l'avons-nous dilué avec un peu d'eau (25%). Cela nous a effectivement permis d'en réduire la viscosité et d'obtenir des couches très fines.

Nous avons réalisé un transfert avec du PEG-DA 700, mélangé à 5% de photoinitiateur (par rapport au PEG-DA) et 25% d'eau. Une enduction à 3000 tours/min pendant 60 s a permis de préparer des couches de 900 nm d'épaisseur. On place le timbre en contact du silicium et on insole sous lampe UV pendant 10 min. Nous avons observé, ici encore, un transfert des billes accompagné d'une réplication des motifs du timbre. La figure 23 montre une image du wafer de silicium après transfert.

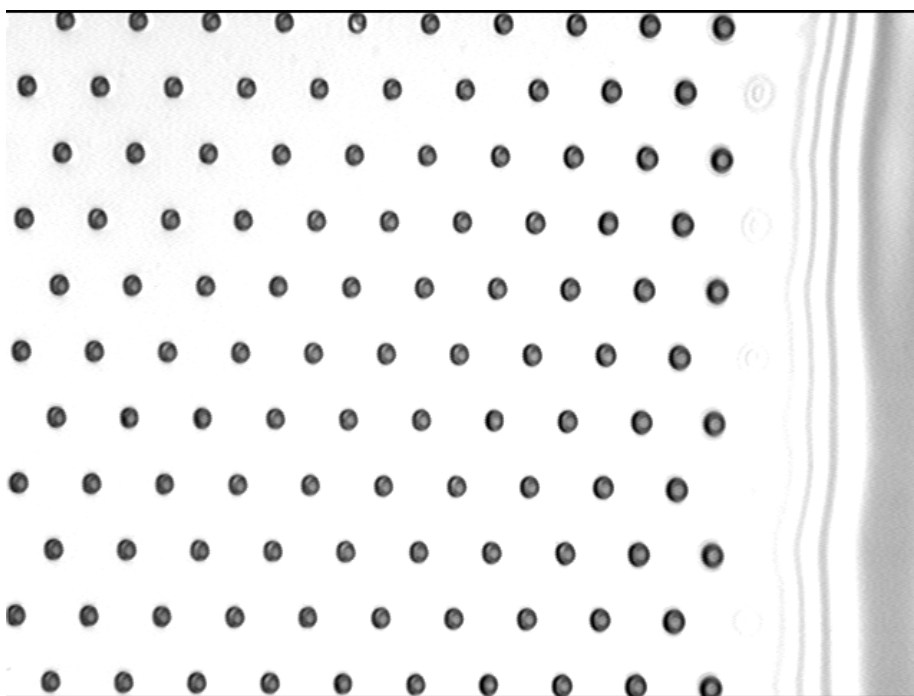


Figure 23: Billes de 4,5 μm dans des plots de polymères. A droite, les billes semblent de diamètres plus gros, il s'agit sans doute d'une illusion d'optique. Diamètre des billes : 4,5 μm . Profondeur des cavités : 2,5-3 μm . Pas du réseau hexagonal : 30 μm .

iii. **SU8-2002**

Les résines SU8, constituent une classe de résine époxy particulièrement utilisée en microélectronique notamment pour la réalisation de MEMS (Micro Electro Mechanical systems).

Cette résine optique très robuste offre une très bonne résolution et permet de créer des structures micrométriques avec des facteurs de forme pouvant dépasser 20.

La résine est tout d'abord déposée sur un échantillon de silicium par spin-coating à 3000 tours/min pendant 60s. L'échantillon est ensuite recuit pendant 5 minutes à 65 °C sur plaque chauffante pour éliminer les traces de solvant dans la résine. L'épaisseur de résine a été estimée à environ 2 μm . Le timbre de PDMS est ensuite mis en contact avec la surface de l'échantillon. On insole ensuite l'ensemble timbre/échantillon pendant 5 minutes. Une étape de recuit est effectuée pendant 5 minutes à 65°C pour réticuler la résine. On termine par quelques minutes sur une plaque chauffante à 120°C pour stabiliser les structures.

Dans ce cas de figure, nous avons obtenu un excellent transfert des assemblages et nous n'avons pas mis en évidence de sous-structures liées à la réplication des motifs du timbre PDMS. Nous pensons que la résine utilisée, présentant une viscosité élevée (notamment après recuit) n'a pas pu s'engouffrer dans les cavités du timbre. Des illustrations de ces résultats sont données dans la figure 24. En haut une zone du réseau sur le PDMS, et en bas une zone du réseau transférée sur le silicium. Les zones photographiées ne correspondent pas cette fois. On remarque la présence de vides dans la seconde photo. L'absence de plots est bien visible. Cela correspond à des zones sans billes sur le PDMS. En effet, aucune structure n'est transférée dans la couche de résine.

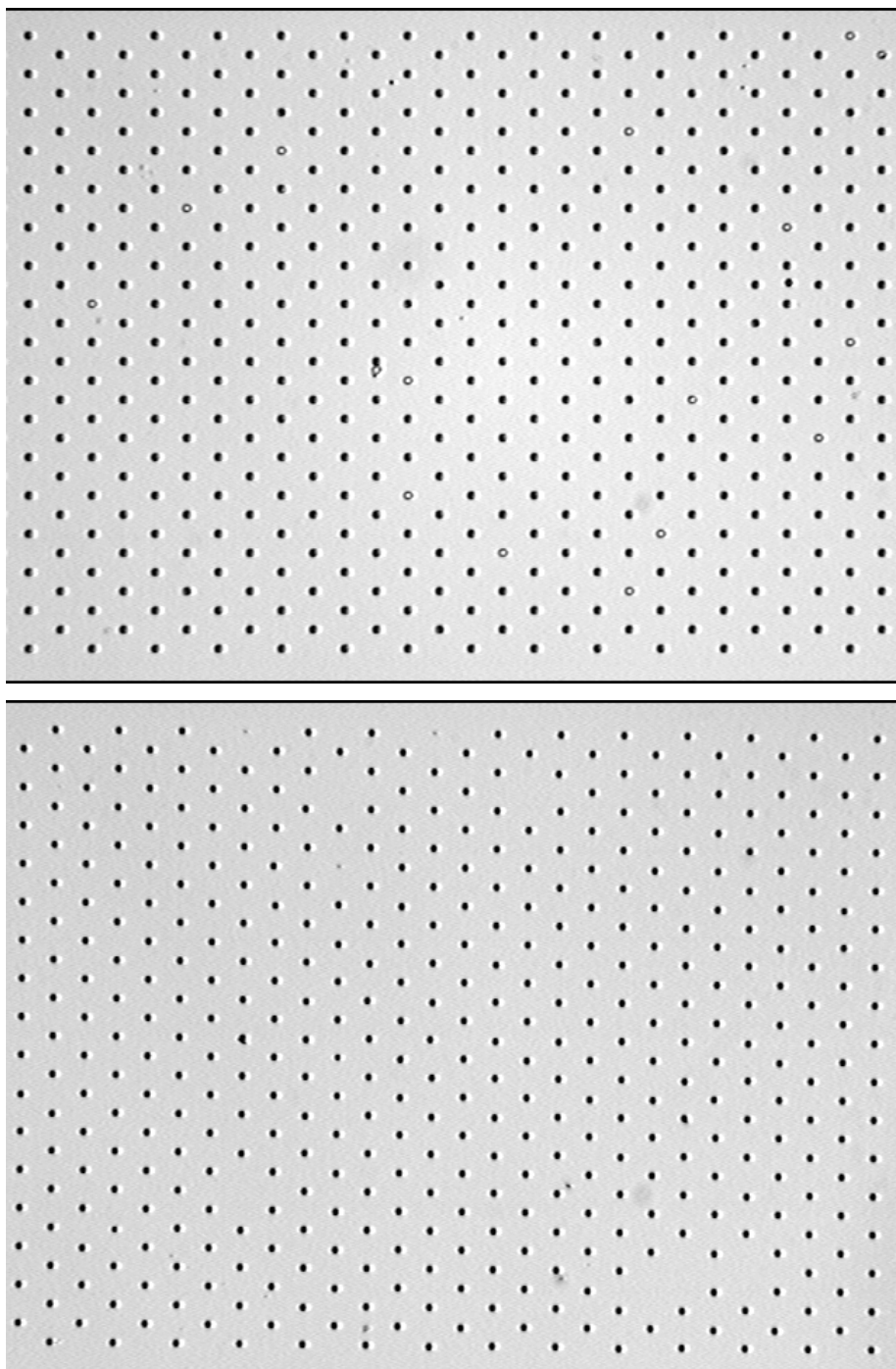


Figure 24 : Réseau de billes. En haut sur le PDMS, et en bas sur le silicium. Lorsqu'une cavité sur le PDMS ne contient pas de particule, on observe une lacune sur le silicium après transfert. Diamètre des billes : $4,5\text{ }\mu\text{m}$. Profondeur des cavités : $2,5\text{-}3\text{ }\mu\text{m}$. Pas du réseau hexagonal : $30\text{ }\mu\text{m}$.

iv. *Norland Optical Adhesive 61.*

Nous nous sommes également intéressés à une colle UV sensible couramment utilisée en microélectronique et en microfluidique, la Norland Optical Adhesive 61.

La colle est tout d'abord diluée dans l'acétone de façon à réduire sa viscosité et favoriser la préparation de couches minces sur des substrats de Silicium. Nous avons utilisé des dilutions de 1:4 (NOA61/Acétone). La colle est enduite par spin-coating à 5000 tours/minutes pendant 60s. On obtient alors une couche de 2,5 μm d'épaisseur. La réalisation d'un recuit (quelques dizaines de secondes à 120°C) n'a pas montré d'influence particulière sur la viscosité et l'épaisseur de la couche. Après mise en contact du timbre PDMS, on procède à 10 min d'insolation.

La figure suivante montre des images en microscopie optique de la surface du timbre avant transfert (en haut) et de la surface de l'échantillon (en bas) après transfert (les zones ne correspondent pas).

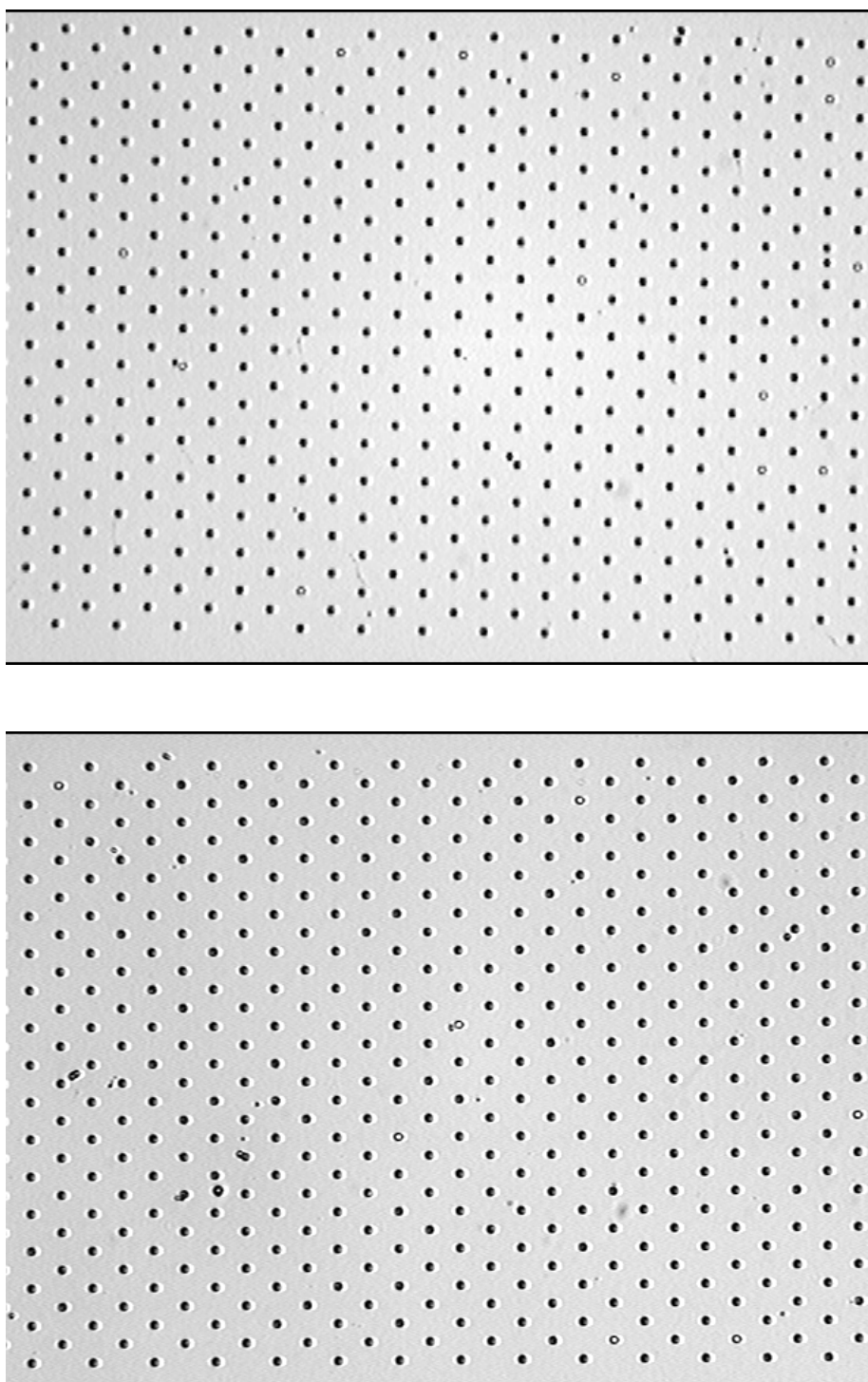


Figure 25: Réseau de billes. En haut sur le PDMS, et en bas sur le silicium après transfert grâce à la NOA61. Diamètre des billes : 4,5 μm . Profondeur des cavités : 2,5-3 μm . Pas du réseau hexagonal : 30 μm .

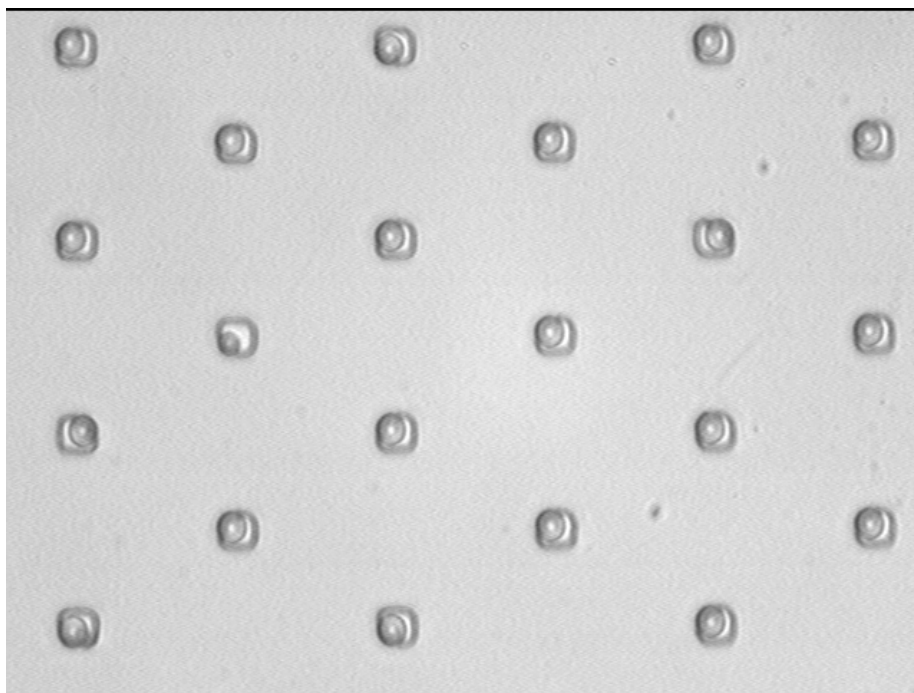


Figure 26 : Billes de 4,5 μm dans leurs plots de polymères. Diamètre des billes : 4,5 μm . Profondeur des cavités : 2,5-3 μm . Pas du réseau hexagonal : 30 μm .

Comme dans le cas du PEG-DA, le transfert s'effectue avec un rendement proche de 100% et laisse apparaître des sous-structures liées à la réplcation des motifs présents sur le timbre. Ce résultat est à mettre en corrélation avec la viscosité faible de la résine qui est de l'ordre de 300 cps, ce qui favorise la pénétration du liquide dans la cavité (voir figure 26).

v. *Bilan*

Un transfert d'excellent rendement peut être obtenu par ces méthodes. Celles-ci permettent d'élargir la gamme d'applications de l'assemblage capillaire, les structures construites pouvant être transférées sur une large gamme de substrats, et donc sur des substrats impropres à l'assemblage capillaire.

Il convient cependant de minimiser l'épaisseur de la couche de polymère utilisée de façon à préserver les propriétés des particules transférées et d'éviter de les enrober. Une viscosité faible permet d'obtenir des couches minces, mais favorise la pénétration du liquide dans les cavités. Il faut donc trouver un optimum en ce qui concerne l'épaisseur et la viscosité de la colle utilisée. La SU8 semble particulièrement bien adaptée de ce point de vue. Sa simplicité d'utilisation et le contrôle aisé de son épaisseur en font un produit tout à fait adapté pour le transfert de particules.

Notons cependant que ces méthodes modifient l'état des surfaces en les recouvrant d'une colle. Cela n'est pas gênant si l'on souhaite juste bénéficier des propriétés magnétiques des particules. Pour certaines applications par contre, cela représentera une importante limitation

Nous ne nous sommes intéressés ici qu'au transfert de matériaux inertes. Dans le chapitre suivant nous nous pencherons aussi sur le transfert d'objets vivants. Pour cela, nous privilégierons plutôt les hydrogels aux polymères photoréticulables, afin de maintenir les cellules dans des conditions physiologiques supportables.

4. Application à l'assemblage de colonnes magnétiques

Les particules magnétiques constituent des objets particulièrement intéressants pour des applications biologiques : elles sont très fréquemment utilisées comme support solide pour réaliser des opérations de capture.¹²⁴ Parmi les applications des structures en particules magnétiques construites par assemblage capillaire, on peut citer la construction de réseaux de colonnes magnétiques auto-assemblées. En effet, si nous considérons une surface en PDMS décorée de particules magnétiques dans des cavités, la surface présente des propriétés adhésives non spécifiques suffisantes pour que les particules placées dans les cavités y soient durablement piégées en l'absence de contraintes importantes. Ces particules fixées à la surface peuvent alors être utilisées comme points d'ancrage magnétiques pour des colonnes que nous envisageons de former. Après nous être intéressés au mécanisme de formation de ces colonnes, nous verrons plusieurs exemples d'applications qui ont été réalisées en collaboration dans le cadre de cette thèse.

a) Suspension magnétique sous champ

Penchons-nous tout d'abord sur le comportement d'une suspension de particules magnétiques exposée à un champ.

Si l'on dépose une goutte de suspension de particules magnétiques sur une surface, puis que l'on expose cette surface à un champ perpendiculaire, les particules en suspension s'aimantent et se comportent comme des dipôles, lesquels vont interagir en se repoussant ou en s'attirant en fonction de leur position respective.

L'énergie d'interaction entre deux dipôles 1 et 2 séparés d'une distance r (voir figure 27) dans un solvant est de la forme :

$$U_{12} = \frac{\mu_0 \mu_{\text{solvant}}}{4\pi r^3} [(\vec{m}_1 \cdot \vec{m}_2) - 3(\vec{m}_1 \cdot \vec{r})(\vec{m}_2 \cdot \vec{r})] \quad \text{avec} \quad \vec{r} = \frac{\vec{OM}}{OM}$$

Équation 10

Et la force que le dipôle 1 exerce sur le dipôle 2 :

$$\vec{F}_{12} = \frac{\mu_0 \mu_{\text{solvant}}}{4\pi r^4} \{ [(\vec{m}_1 \cdot \vec{m}_2) - 5(\vec{m}_1 \cdot \vec{r})(\vec{m}_2 \cdot \vec{r})] \vec{r} + (\vec{m}_2 \cdot \vec{r}) \vec{m}_1 + (\vec{m}_1 \cdot \vec{r}) \vec{m}_2 \}$$

Équation 11

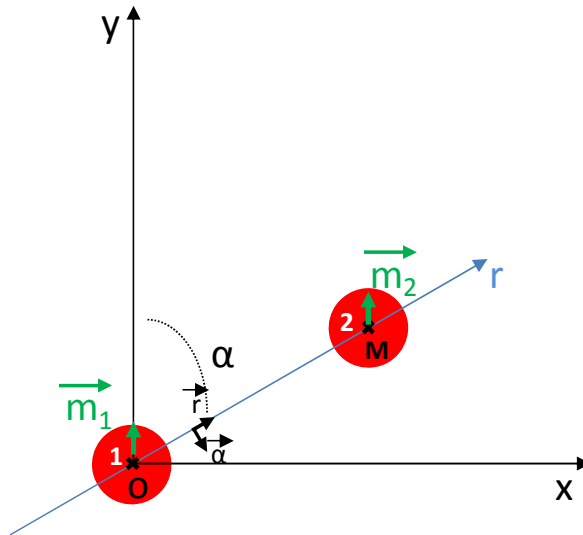


Figure 27: Deux dipôles magnétiques séparés d'une distance r en interaction dans un solvant.

Si les dipôles sont identiques et de moment \vec{m} , on a donc :

$$U_{12} = \frac{\mu_0 \mu_{\text{solvant}} m^2}{4\pi r^3} [1 - 3\cos^2 \alpha]$$

Équation 12

Et :

$$\vec{F}_{12} = \frac{\mu_0 \mu_{\text{solvant}} m^2}{4\pi r^4} [(1 - 3\cos^2 \alpha) \vec{r} - \sin(2\alpha) \vec{a}]$$

Équation 13

Le signe de la composante selon \vec{r} dépend de α . On en déduit qu'il y a attraction si $\alpha \leq 54,7^\circ \approx 55^\circ$

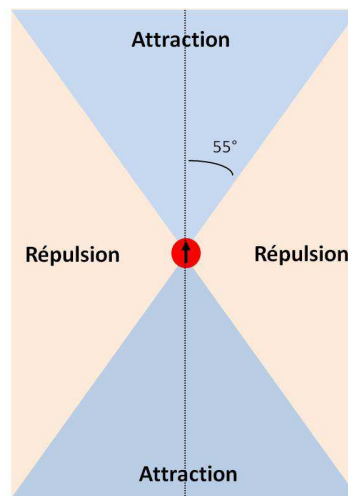


Figure 28: Zone d'attraction et de répulsion autour d'une sphère magnétique (équivalente à un dipôle). Les zones d'attraction constituent un double cône au-dessus et en-dessous de la bille.

On constate que les dipôles magnétiques s'attirent par le sommet et se repoussent par les côtés, ce qui résulte en la formation de colonnes parallèles à la direction du champ.^{125–127}

De façon à minimiser les énergies de répulsion entre colonnes, ces dernières s'organisent spontanément en réseau hexagonal (figure 30). L'intégration de billes magnétiques sur la surface permet de modifier cette organisation spontanée en créant des points de nucléation de position bien définis sur la surface (figure 29). Les colonnes se forment majoritairement sur les billes immobilisées.

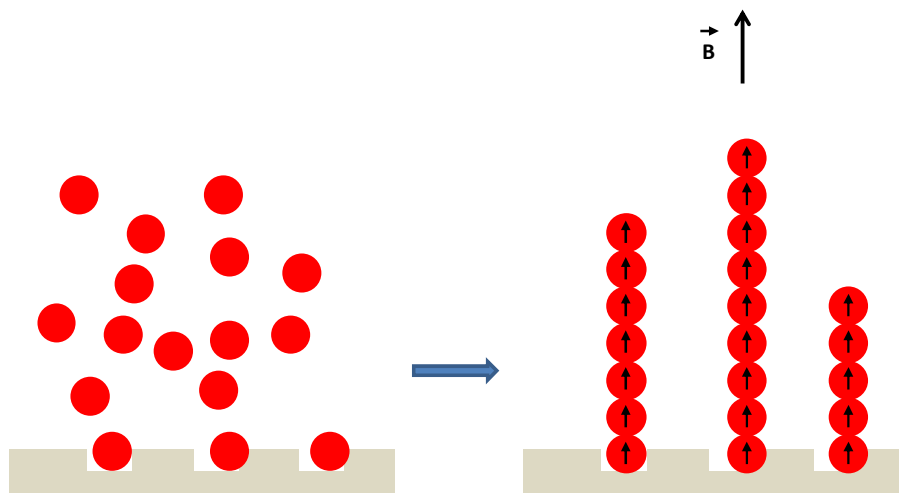


Figure 29: Formation de colonnes magnétiques à partir de particules fixes. L'organisation spontanée des colonnes est hexagonale, mais déplacer les billes fixes serait plus coûteux en énergie que de réorganiser les colonnes au-dessus d'elles.

La figure suivante est une image de colonnes magnétiques construites dans un canal microfluidique. Différentes structures sont présentes dans ce canal. Entre autre, en bas à droite un réseau carré de billes fixes a été préparé par assemblage capillaire. Une suspension magnétique a été injectée dans le canal et exposée à un champ. Deux types de colonnes magnétiques se sont formés : des colonnes libres et des colonnes fixées aux billes magnétiques capturées sur la surface. Comme on le constate sur cette image, les colonnes libres s'organisent en réseau hexagonal (au premier ordre). Le pas sur cette image est de l'ordre de la dizaine de microns. Dans la zone structurée avec des billes magnétiques en surface, l'organisation en hexagone cesse, et les colonnes s'organisent au dessus des billes immobilisées en surface.

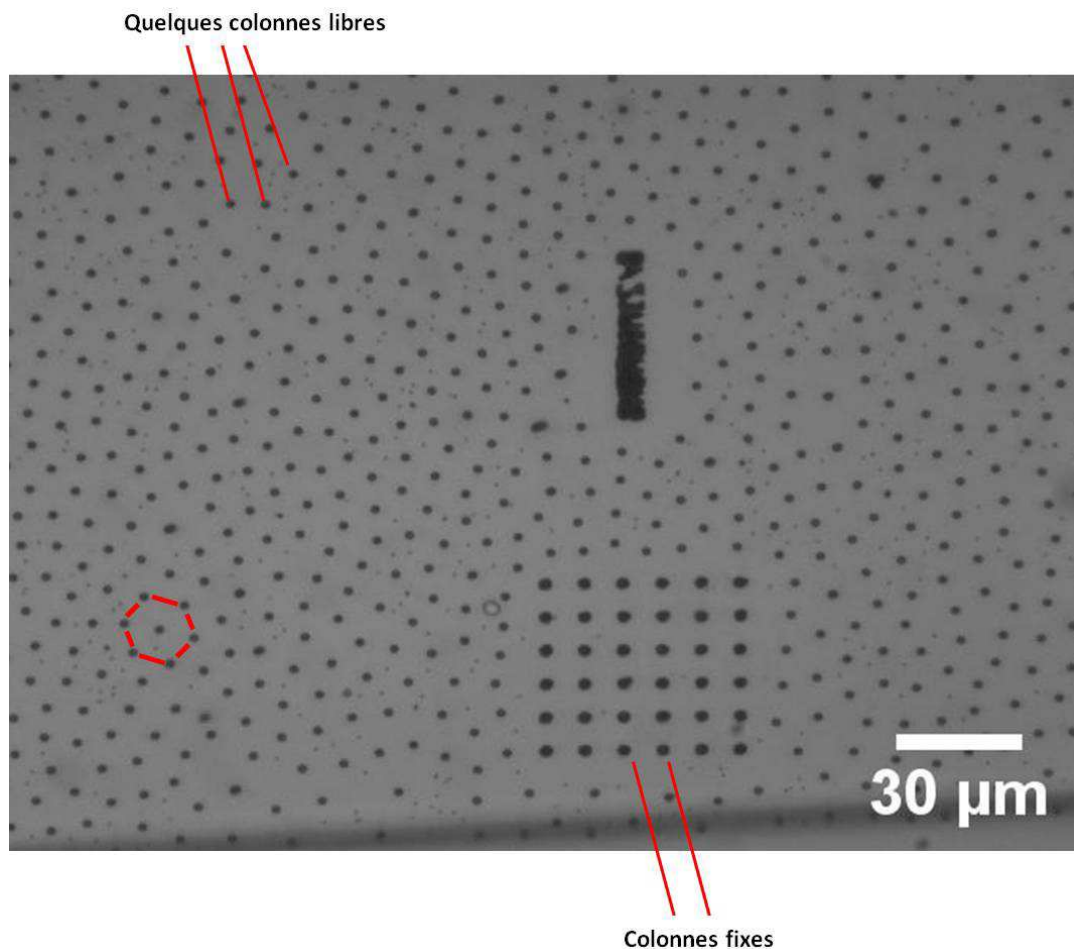


Figure 30: Réseau de colonnes magnétiques formées dans un canal microfluidique. Les colonnes libres s'organisent spontanément en hexagone (un hexagone est marqué en rouge). En présence de motifs magnétiques en surface, les colonnes s'ancrent dessus et adoptent l'organisation que ceux-ci leur imposent. Toutes les particules magnétiques employées ici font 4,5 µm de diamètre.

On constate qu'il est donc possible d'imposer une organisation aux colonnes via un patterning de surface. On verra dans la suite qu'on tirera profit de cette possibilité dans de nombreuses applications.

b) Motifs complexes

Des motifs très complexes constitués de colonnes peuvent être réalisés grâce à ces techniques. Les colonnes sont très fortement contraintes par les points d'ancrage magnétiques. Il est possible de les rapprocher très fortement. L'image suivante présente à gauche un « mur » de particules magnétiques constitué de colonnes magnétiques en alignement serré. Sur des packs (d'un diamètre de 6 μm) de particules de 1 μm , des colonnes de billes de 1 μm ont été formées. Les motifs magnétiques étant beaucoup plus larges que le diamètre d'une bille, on a formation de colonnes constituées, non d'une ligne de billes, mais d'un amas. Le schéma à droite décrit l'organisation de ces colonnes. Malgré la faible résolution de l'image, on constate qu'il est non seulement possible de passer outre l'organisation hexagonale spontanée des colonnes, à l'aide de motifs magnétiques en surface, mais également que l'on peut compenser les forces de répulsion latérales et forcer les colonnes à se rapprocher. Déplacer une bille qui adhère à la surface est plus coûteux en énergie que de rapprocher des colonnes qui se repoussent.

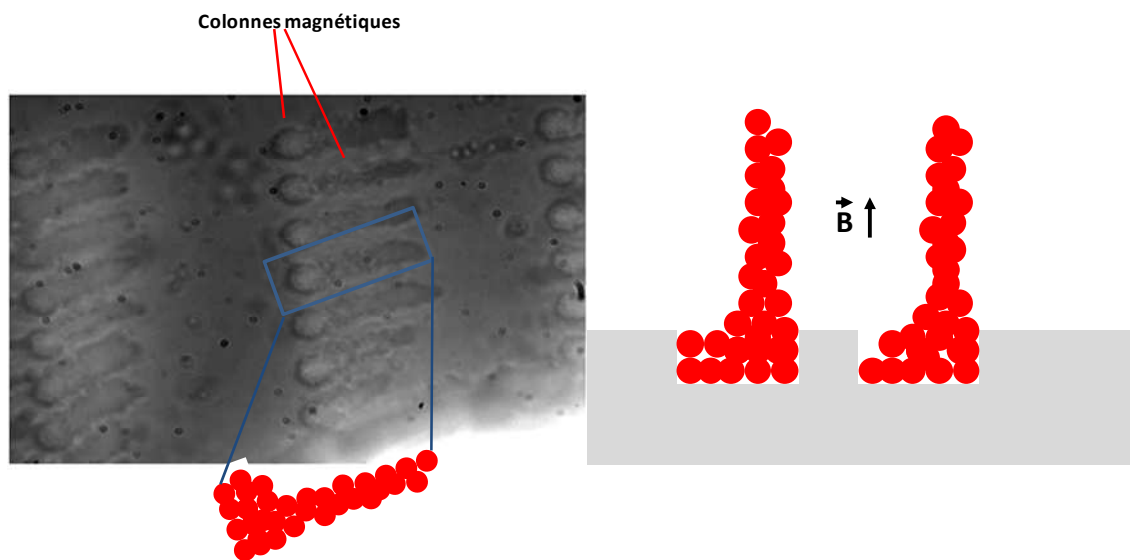


Figure 31: Quelques structures réalisées en colonnes magnétiques. A gauche, des colonnes de particules de 1 μm construites sur des packs de particules de même nature. Cette photo a été prise à l'extinction du champ magnétique au moment où la colonne se désagrège. On constate que dans ce cas les colonnes sont constituées d'un agrégat de particules. A droite : un schéma de la structure de ces colonnes.

On pourrait imaginer la mise au point de structures dynamiques en microfluidique par cette méthode ; encager des cellules par exemple ou réaliser des « scaffolds », c'est-à-dire des échafaudages pour la fabrication de tissus artificiels, comme présenté sur la figure suivante.

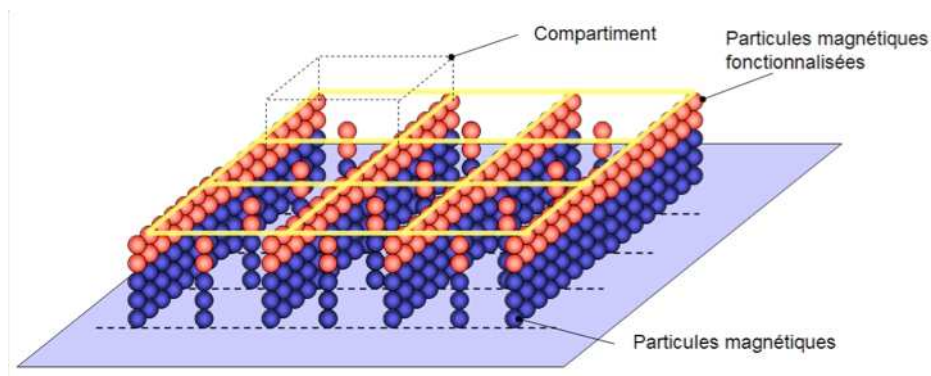


Figure 32: Schéma de structures magnétiques pour l'encagement de cellules ou la fabrication de tissu artificiel.

c) Réalisation de structures pour la capture de cellules

Si les particules magnétiques sont fonctionnalisées avec des anticorps il est possible d'employer ces réseaux de colonnes comme pièges pour des cellules porteuses de l'antigène correspondant. Si un fluide biologique circule à travers un réseau de colonnes, les différents éléments le constituant vont heurter les colonnes, mais seuls ceux qui portent l'antigène correspondant aux anticorps sur les billes restent fixés. Les autres continuent leur route. Cette technique permet par exemple d'isoler des cellules rares (cellules tumorales circulantes) dans du sang. La figure 33 présente un schéma et des photos vus de haut d'un réseau de colonnes formés dans ce but.¹²⁸ La dernière image montre des cellules capturées sur les colonnes.

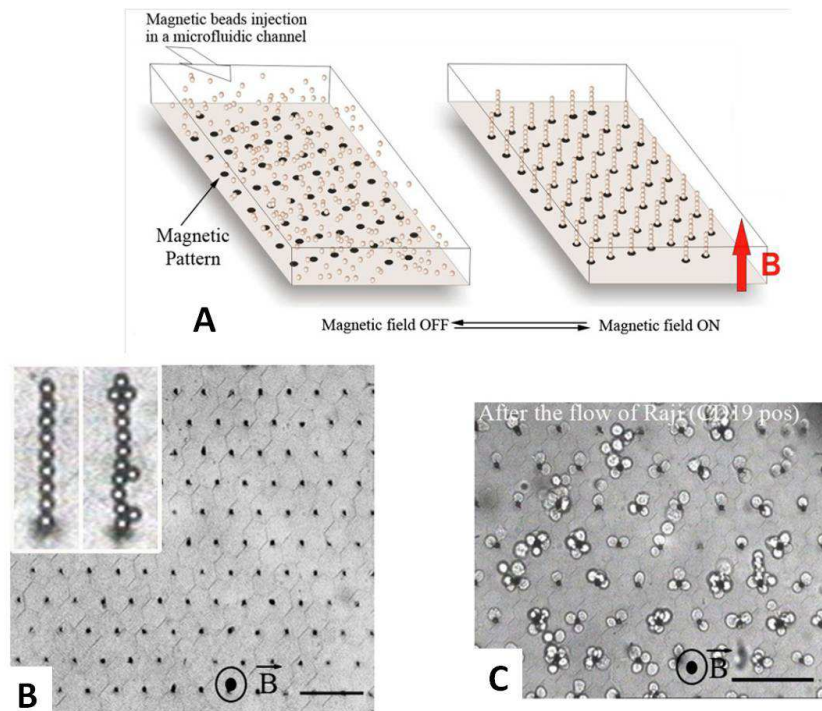


Figure 33: En haut, schéma de principe de la formation de colonnes au-dessus d'une surface portant des motifs magnétiques. Les colonnes se forment sélectivement au-dessus des motifs. Ces surfaces sont insérées dans un canal microfluidique pour pouvoir acheminer facilement ensuite les liquides à filtrer. En bas : A gauche, un réseau de colonne vu de haut. On présente aussi quelques structures typiques de colonnes. Comme on le constate, celles-ci ne sont pas toujours parfaitement droites. Les particules qui constituent ces colonnes sont fonctionnalisées avec des anticorps anti-cd19, susceptibles de capturer des cellules Raji (lymphome de Burkitt). A droite, le même réseau après le passage de 400 cellules Raji. On constate la capture de nombreuses cellules. Barre d'échelle : 80 μm .

Comme on le constate, ces réseaux peuvent constituer des filtres très efficaces pour un liquide biologique.

Un aspect critique de cette application réside dans l'ancrage des colonnes magnétiques au substrat. Une première solution consiste à déposer une encre magnétique (un ferrofluide) par microcontact printing.^{128,129} Bien que simple d'utilisation, cette technique reste peu pratique de part la faible quantité de matière magnétique déposée (qui limite la force d'attraction du point d'ancrage magnétique) et par le manque de reproductibilité et d'homogénéité des dépôts. La figure suivante présente une image du tampon qui sert à faire le microcontact printing et des images des dépôts de ferrofluide.¹³⁰

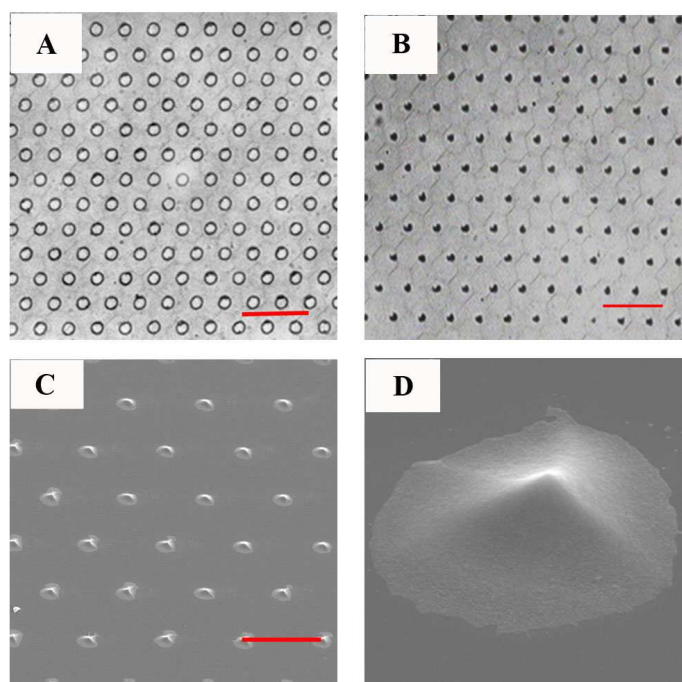


Figure 34 : A. Le tampon en PDMS B. Les plots de ferrofluide déposé sur du verre, visibles sous forme de petites taches noires. C-D. images en microscopie électronique des plots de ferrofluide. Barre d'échelle : (A-B) 80 μm (C) 40 μm .

La précision et la propreté des structures magnétiques formées ont été considérablement améliorées par la suite en employant l'assemblage capillaire pour déposer dans chaque cavité des billes magnétiques. Cette méthode, plus simple et plus reproductible, est celle qui a été mise en œuvre dans la suite de ces travaux sur la capture de cellules rares.¹³¹ Dans le cadre de cette thèse, nous avons notamment développé un deuxième prototype de montage expérimental adapté spécifiquement à ce projet. Ce montage est désormais utilisé en routine par les porteurs de ce projet. L'assemblage capillaire constitue une étape à part entière du procédé de fabrication des puces microfluidiques. Les assemblages sont réalisés sur des substrats de PDMS structurés avec des réseaux de motifs en creux (diamètre 15 μm , profondeur 10 μm) espacés de 40 à 60 μm dans lesquels plusieurs particules magnétiques de 2,8 μm sont immobilisées. Ce substrat est ensuite intégré dans le dispositif microfluidique dédié à la capture de cellule. La formation des colonnes est réalisée sous un champ magnétique de 30 mT en injectant sur le substrat une suspension de particules de 2,8 μm fonctionnalisées par des anticorps de capture. Après formation des colonnes, un tampon est injecté dans le dispositif de façon à éliminer les colonnes interstitielle i.e. les colonnes qui se sont formées sur les surfaces libres du PDMS. Ces colonnes ne sont pas ancrées sur la surface et sont donc sensibles au flux hydrodynamique. En revanche, il est intéressant de noter que les colonnes magnétiques fixes formées par ce procédé ont une résistance élevée aux flux : elles résistent à des

flux de 1 mm.s^{-1} sous un champ magnétique de 30 mT sans être arrachées. On donne ci-après un schéma résumant le principe du procédé.

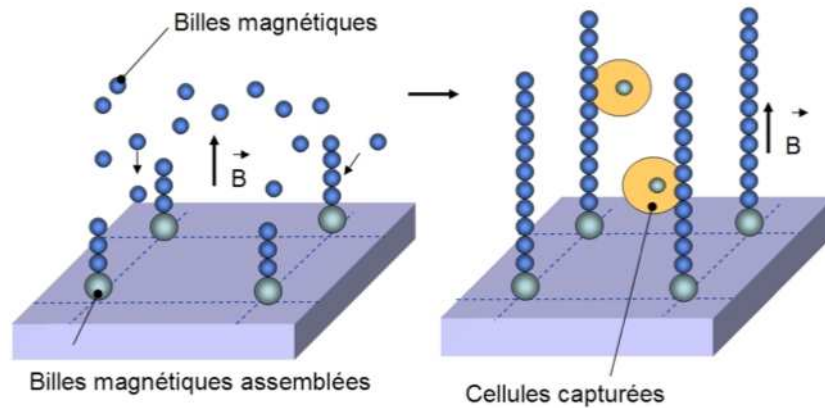


Figure 35: Principe de la capture de cellules sur des colonnes magnétiques formées sur des particules immobilisées par assemblage capillaire. Les colonnes se forment lorsqu'on applique un champ. On évacue les colonnes qui ne sont pas accrochées à des billes de surface à l'aide d'un flux, puis on fait passer le liquide contenant les cellules à capturer.

d) Battement collectif de microcils artificiels

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes (PMMH-UMR 7636), des surfaces fonctionnalisées par cette technique ont aussi servies à l'étude du battement de microcils artificiels.¹³² Pour ce faire des colonnes magnétiques sont construites dans un canal microfluidique dont le plancher présente des cavités contenant des particules magnétiques déposées par assemblage capillaire. La figure suivante décrit le protocole de fabrication des colonnes. On injecte une suspension de particules magnétiques dans le canal. Les particules sont dans une solution aqueuse contenant 0,1% en masse d'acide polyacrylique. Le flux de liquide est ensuite arrêté et l'ensemble est exposé à un champ magnétique vertical d'environ 24 mT. Les colonnes se forment et l'acide polyacrylique qui s'adsorbe sur les billes les lie de façon irréversible. On lave les colonnes qui ne se sont pas formées au-dessus des billes fixes avec un mélange eau/glycérol (50% en masse). Les colonnes formées sur les billes fixes, ne peuvent pas se déplacer.

Un champ magnétique est ensuite créé à l'aide de bobines de Helmholtz. Celui-ci est en rotation autour de la verticale du canal avec un angle et une vitesse bien contrôlés. Les colonnes tournent autour de la verticale et leur mouvement est enregistré.

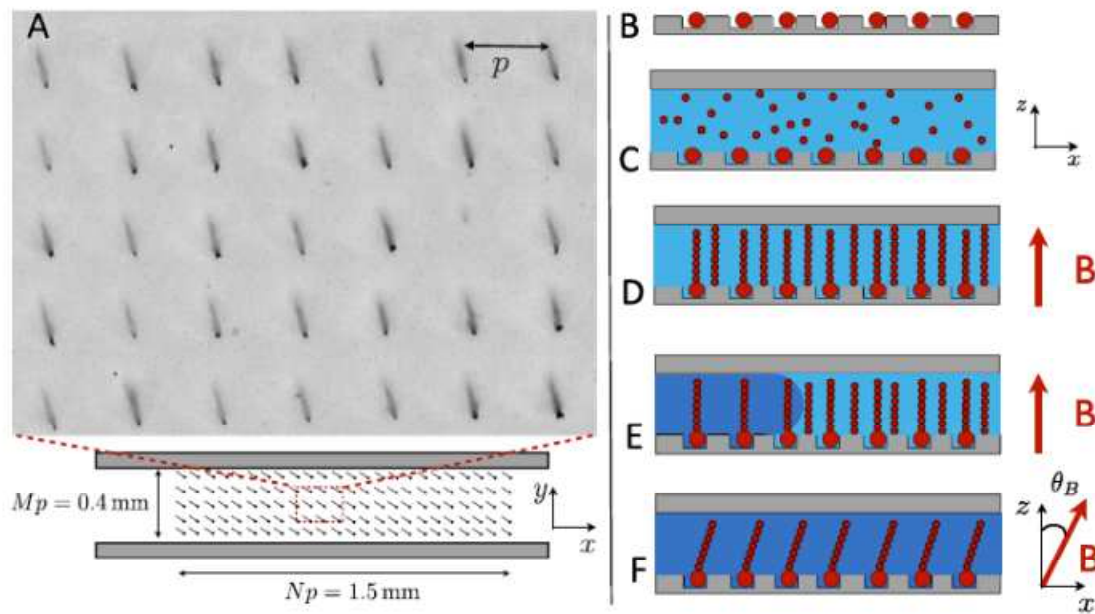


Figure 36: A gauche, photo et schéma d'un réseau de colonnes en rotation dans un canal microfluidique.¹³² A droite, schéma de principe de la fabrication de colonnes. La suspension est injectée au-dessus de la surface patternnée. Les colonnes sont construites par le champ. L'acide polyacrylique lie les colonnes. Enfin le canal est lavé.

Des observations intéressantes sur le comportement d'une telle assemblée de colonnes ont ainsi pu être effectuées par Naïs Coq et al.¹³² Il a par exemple été remarqué que les trajectoires étaient anisotropes dans le cas d'une assemblée, contrairement au cas d'une colonne isolée en rotation. La forme de ces trajectoires dépend essentiellement de la géométrie du réseau à grande échelle, les colonnes présentant des interactions hydrodynamiques à longue portée.

Ces résultats ont été publiés dans :

Naïs Coq, Antoine Bricard, François-Damien Delapierre, Laurent Malaquin, Olivia du Roure, Marc Fermigier, and Denis Bartolo, Collective Beating of Artificial Microcilia, *Physical Review Letters*, **107**, 014501 (2011).

e) Réalisation de microcapteurs de forces

Nous avons également employé des colonnes magnétiques pour réaliser des capteurs de forces. Pour cela, on étudie leur déflexion sous l'effet d'une force. Ce travail sera présenté dans le chapitre IV.

5. Synthèse

Nous avons au cours de ce travail cherché à élargir les possibilités de l'assemblage capillaire.

En particulier, nous avons montré que cette technique d'assemblage était compatible avec des objets denses, peu mobiles et mis en évidence un nouveau mécanisme de concentration de particules au niveau du ménisque. Ces résultats permettent d'étendre encore le champ d'application de l'assemblage capillaire pour l'intégration de matériaux sur des surfaces.

Par ailleurs, en accroissant la vitesse d'assemblage jusqu'à des valeurs de l'ordre de 1 mm.s^{-1} nous avons montré que cette méthode est compétitive en comparaison avec les procédés de fabrication conventionnels d'autant plus qu'elle ne requière que de faibles contraintes technologiques (température ambiante, pression atmosphérique, ...) et est compatible avec une large gamme de matériaux et de filières technologiques.

Enfin, nous avons démontré qu'un transfert vers d'autres types de surface était possible. D'une mise en œuvre simple et d'une grande précision, cette technique pourrait être de plus en plus employée à l'avenir dans des domaines très variés pour la structuration de surface ; par exemple pour la réalisation de capteurs, de structures de guidage, etc.

La biologie est aussi un domaine d'application privilégié pour ces particules magnétiques, du fait de leur grande variété de fonctionnalisations de surface disponibles.^{2,3} Nous approfondirons ce sujet dans le chapitre III.

III. Capture cellulaire et multiplexage

1. Introduction

Nous avons vu qu'il était possible de fonctionnaliser très efficacement des surfaces en y intégrant des micro ou nanoparticules de natures variées. Il serait intéressant à présent d'étendre encore le potentiel de l'assemblage capillaire en élargissant la gamme de « briques de construction » à notre disposition pour des applications en biologie. Il serait entre autre tentant d'adapter cette technique à des particules disposant d'une fonctionnalité biologique ou bien directement à des cellules vivantes. Par exemple, la création de réseaux organisés de particules fonctionnalisées par des anticorps pourrait permettre la réalisation de puces d'analyse, telles que des puces à protéines. Combinée à la microfluidique, cette approche permettrait la réalisation de dispositifs miniaturisés permettant des analyses statistiques sur un grand nombre d'échantillons.

Au delà de l'assemblage de micro ou nanoparticules, des applications particulièrement intéressantes en biologie pourraient être mises au point si la manipulation et l'immobilisation de cellules vivantes pouvait s'effectuer directement avec la facilité et la précision offerte par l'assemblage capillaire.

De nombreuses méthodes ont été proposées pour construire des réseaux réguliers de cellules isolées, ce qui ouvrirait la porte à des études statistiques sur les cellules et leur communication.^{109,111,133-142} Parmi les applications directement envisageables, on peut citer l'étude des effets de quorum ou encore l'étude du vieillissement de lignée cellulaire.¹⁴³⁻¹⁴⁶ En supposant possible la capture sélective d'un type de cellules (de formes et de tailles communes), des applications de tri cellulaire pourraient également bénéficier du potentiel technologique de l'assemblage capillaire.

Dans les deux cas, la question du multiplexage (i.e. la capacité à intégrer des particules de natures différentes sur la même surface) reste essentielle. Nous verrons dans la dernière partie de ce chapitre la solution que nous avons développée pour résoudre ce verrou technologique encore très peu abordé jusqu'à présent.

Nous allons à présent expliciter les adaptations de l'assemblage capillaire à la biologie que nous avons effectuées.

2. Assemblage dirigé de cellules

a) Contexte

Nous avons vu que Park et al. ont pu assembler des cellules de levures^{109,111} dans un canal microfluidique en employant les forces capillaires qui s'exercent au cours du reflux d'un liquide sous l'effet de l'évaporation (voir I.6.c)). Bien que cette approche repose sur les principes physiques que nous avons décrits dans le chapitre précédent, elle reste très peu flexible. En effet, la vitesse de démouillage dans le canal est difficilement contrôlable et le processus reste limité par la géométrie du canal et donc à de faibles surfaces. Il serait avantageux de pouvoir appliquer les méthodes décrites au chapitre II pour bénéficier d'une méthode d'assemblage en parallèle, à haute vitesse et sur de larges surfaces. Nous avons cherché la méthode la plus simple et la plus robuste pour pouvoir réaliser un assemblage dans ces conditions.

L'utilisation de cellules vivantes présente cependant des contraintes supplémentaires. Nous souhaitons avant tout rester dans les conditions les moins perturbatrices pour les cellules, c'est-à-dire les plus proches possibles de leurs conditions physiologiques. Alors que l'utilisation de surfactants ne pose pas de contraintes majeures dans le cas de micro ou nanoparticules, des précautions supplémentaires sont nécessaires dans le cas de cellules. En effet, les surfactants peuvent endommager les parois cellulaires. Aussi serait-il souhaitable d'utiliser directement le milieu de culture cellulaire comme suspension d'assemblage. De la même façon, le substrat doit être biocompatible, i.e. il ne doit pas perturber la physiologie des cellules (le PDMS est donc bien adapté). Enfin la température ne peut pas varier hors de la zone de tolérance de la cellule et l'hydratation doit continuellement être maintenue. Cette dernière condition est essentielle dans le cas de cellules de mammifères. Dans le cas de levures ou de bactéries, la déshydratation peut être tolérée un certain temps.

De part les contraintes imposées sur le liquide et sur le substrat, le contrôle de l'angle de contact semble plus délicat. Nous verrons que dans la plupart des cas, nous avons été confrontés à des angles de contact trop élevés qui ne permettaient pas l'immobilisation de cellules. Différents types de cellules ont été utilisées : des levures *Saccharomyces Cerevisiae*, des bactéries *Escherichia Coli*, des neurones de souris, et des cellules humaines cancéreuses variées.

b) Assemblage de Levures

Les levures constituent un type cellulaire de choix pour de premières expériences. En effet, elles sont faciles à manipuler, résistent à des stress importants (séchage,...), et possèdent une membrane

extérieure rigide dont on attend qu'elle leur confère un comportement mécanique semblable à celui des microparticules.

Les premiers tests ont été effectués avec des levures *S. Cerevisiae* achetées en pharmacie (Arkogélules®). Ces levures sont vendues à l'état lyophilisé sous forme de gélules. Chacune contient 445 mg de levures enrobées dans une gaine d'hydroxylpropylmethylcellulose. On les dilue dans de l'eau (minéralisée) ou dans un milieu de culture. La taille moyenne de ces levures varie de 4 à 10 μm (observation expérimentales et figure 1) suivant leur état dans le cycle cellulaire.

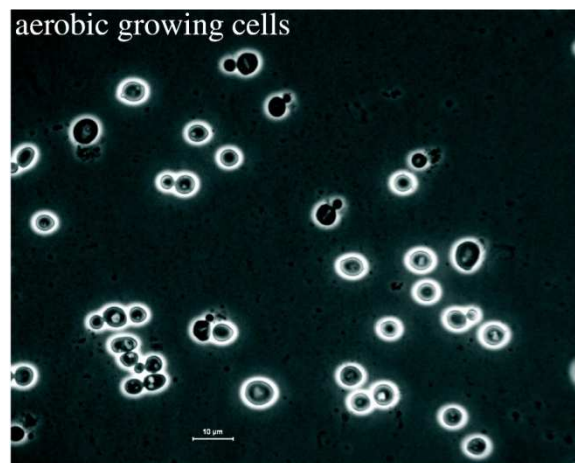


Figure 1 : Levures *S. Cerevisiae*. Dimension de la barre d'échelle : 10 μm . (Source: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/25/additional/>).

En effet les cellules se multiplient en bourgeonnant : la cellule mère bourgeonne une cellule fille plus petite. Dans le cas de nos expériences, les cellules, dont la durée de vie moyenne varie de 30 à 40 divisions, ne sont pas synchronisées dans leur cycle de division.

Des substrats d'assemblage en PDMS ou en COC constitués de réseaux de cavités ont été employés. Les dimensions des cavités sont de l'ordre de 10 μm pour une profondeur de 3 μm . On donne sur la figure suivante des images d'expériences avec leurs paramètres expérimentaux. L'assemblage a été effectué à température ambiante ($\approx 25^\circ\text{C}$) à une vitesse de 10 $\mu\text{m.s}^{-1}$.

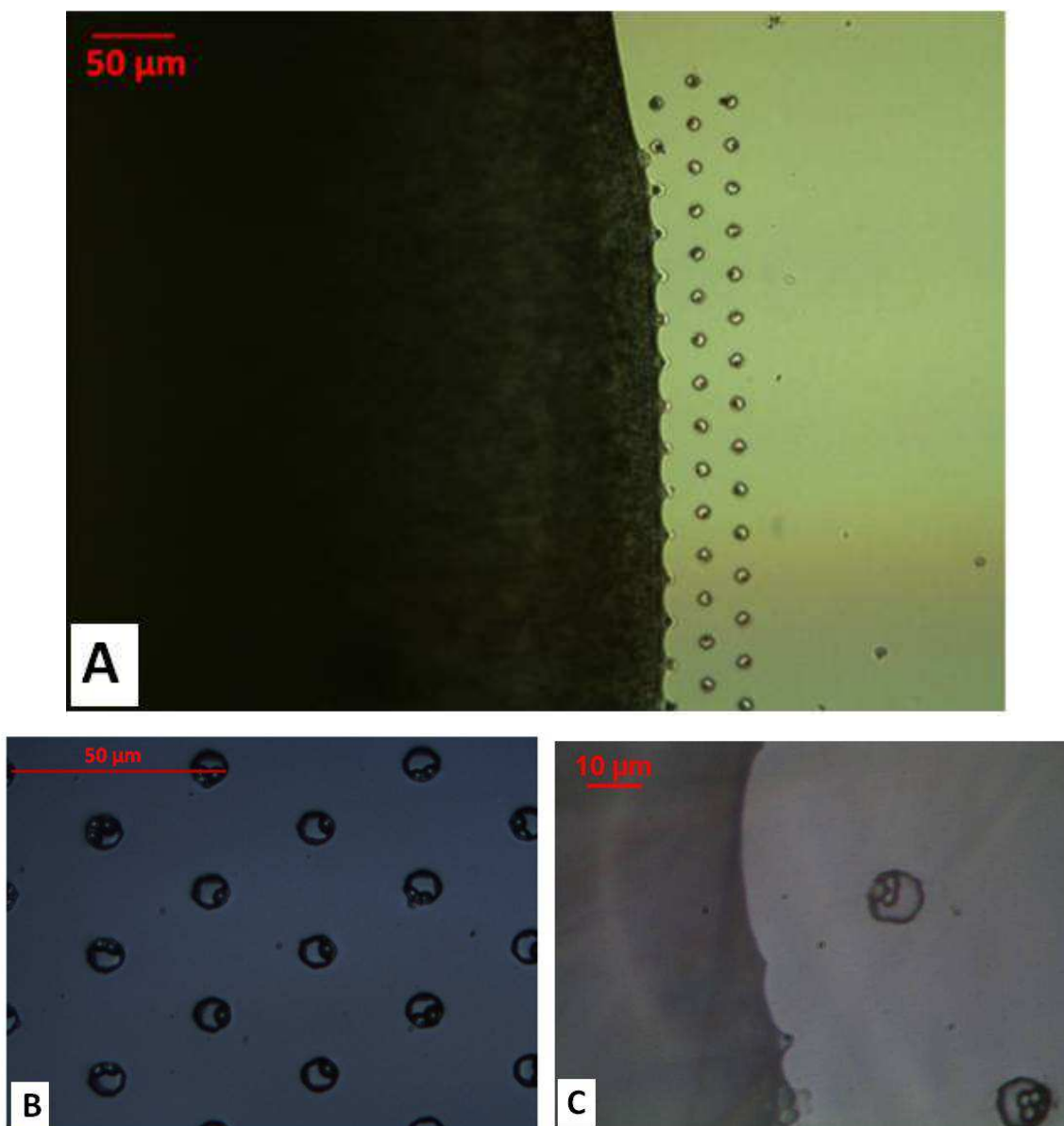


Figure 2 : A) Assemblage de levures lyophilisées dans des cavités micrométriques sur du PDMS, dans un mélange eau/surfactants à 70%. B) Levures lyophilisées dans un réseau de cavités en PDMS. C) Assemblage de levures sur un réseau de cavités en COC. Pas de surfactants. Dans toutes ces expériences : $V_{\text{substrat}}=10 \mu\text{m.s}^{-1}$, température ambiante.

Comme illustré sur la figure 2, l'assemblage se traduit par un dépôt localisé de une ou plusieurs levures dans chacun des motifs. Nous observons un dépôt sélectif dans les cavités et aucune levure sur les parties non structurées du substrat.

L'usage de levures fraîches (non lyophilisées) de souche *S. Cerevisiae* $\gamma\text{AT-340}^{\text{d}}$ dans leur milieu de culture a immédiatement suivi ces premières expériences. Le milieu employé est le « Yeast Nitrogen Bases » avec 2% de glucose (YNBAS+2% glu). Des tests ont été effectués sur des substrats de COC et PDMS. Ces levures sont modifiées pour exprimer la « Green fluorescent Protein » avec le gène RAP-1

^d Nous tenons à remercier l'équipe de A. Taddei qui nous a procuré cette souche cellulaire.

(expression dans les télomères) et la « Red Fluorescent Protein » avec le gène SIK-1 (expression dans le nucléole).

On donne sur la figure suivante des images de réseaux formés par ce procédé :

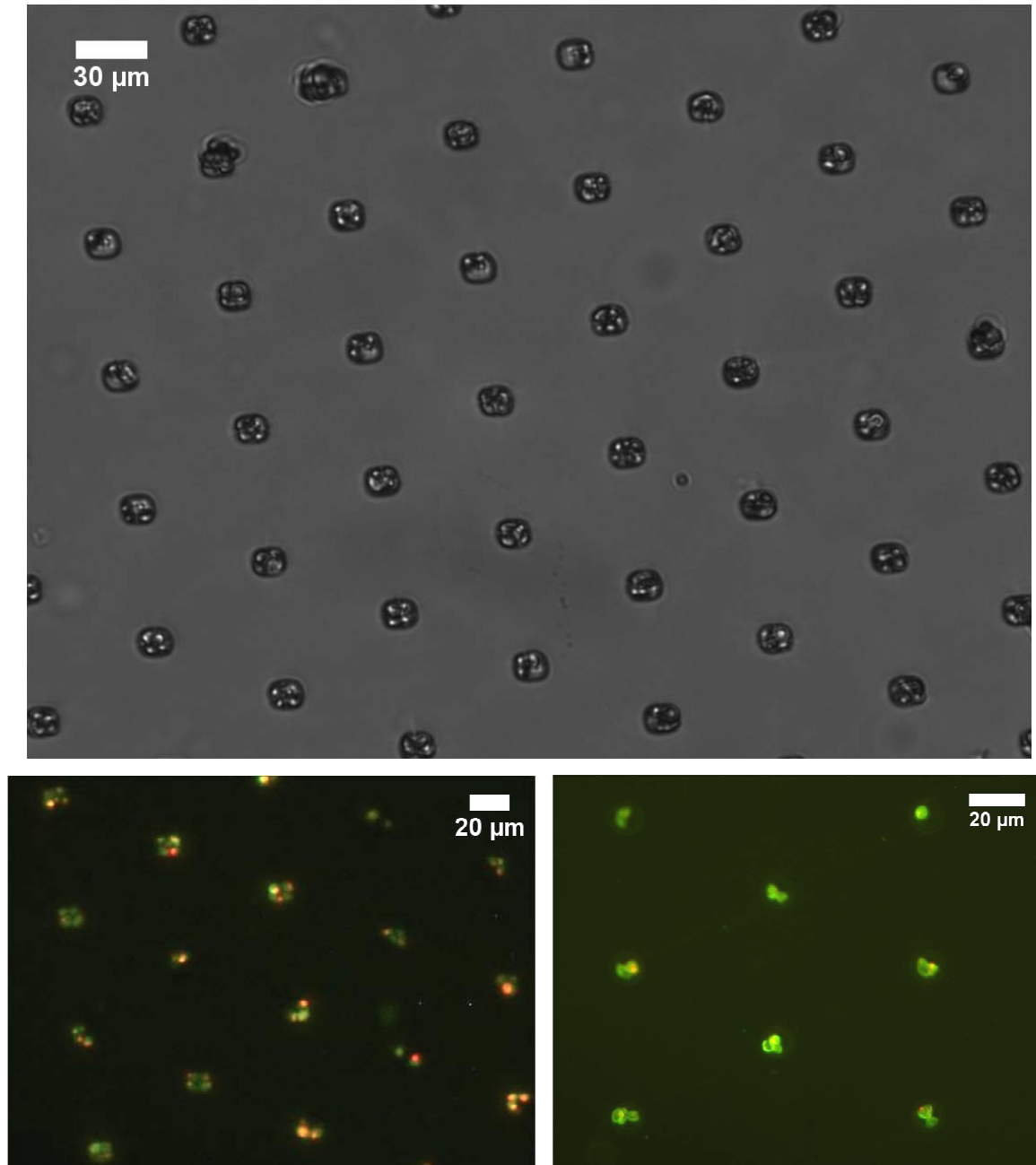


Figure 3: En haut : Levures γ AT-340 piégées dans des cavités sur du PDMS en microscopie visible. En bas à gauche, levures observées en fluorescence sur du PDMS. Assemblage réalisé avec 10% de surfactants. En bas à droite, levures observées en fluorescence sur COC (pas de surfactants pendant l'assemblage).

On a réussi dans les deux cas à immobiliser sélectivement des levures dans des cavités. La probabilité de capture est très élevée. Compte tenu de la taille assez importante des structures, on compte 1 à 5 cellules par site typiquement.

Certaines limitations sont apparues durant ces expériences :

D'une part, sans surfactant le démouillage sur PDMS est inhomogène et manque de reproductibilité. On remarque des zones d'assemblage qui apparaissent après des temps longs. Il semble que certaines zones deviennent plus mouillantes. Ce phénomène est très probablement lié à la pré-concentration de certains composés sous l'effet de l'évaporation qui modifient localement le comportement du ménisque. Par ailleurs, il reste très difficile d'obtenir de façon reproductible des captures de cellules uniques. Cela est probablement dû à la variabilité en taille des levures qui rend délicat la sélection d'une taille de piège. Enfin, sur COC cette fois, l'angle de contact a tendance à être trop faible. Si les motifs sont de faible densité, l'assemblage est efficace, mais si la densité des motifs s'accroît, du fait de la rugosité de surface plus importante qui en découle (et qui réduit l'angle de contact (voir I.5.b)), le mouillage est trop important et le dépôt ne s'effectue plus sélectivement dans les cavités mais partout sur la surface.

Nous avons donc cherché en premier lieu à augmenter l'efficacité des structures de capture sans induire de modification importante du milieu de la suspension. Nous nous sommes orientés vers des pièges, non en creux mais en relief, i.e. qui émergent de la surface, des expériences préliminaires ayant montrées l'efficacité de ce type de structures. Dans cette idée, nous avons cherché à adapter au mieux les structures à la morphologie des cellules : nous avons finalement choisi des structures de forme concave, comme celles présentées sur la figure suivante :



Figure 4: Nouvelles formes de pièges. Il ne s'agit pas cette fois de motifs en creux (cavités), mais de structures en relief. L'ouverture est adaptée à la taille de l'objet que l'on souhaite piéger. Pour les levures, les ouvertures sont typiquement de 3 à 6 μm et la hauteur des structures de 2-3 μm

Comme nous le verrons par la suite, ces structures, pour des dimensions du même ordre que les cavités (2-3 μm selon la direction verticale), sont d'une efficacité supérieure. Elles autorisent notamment des captures à des angles de mouillage plus élevés. On réussit à obtenir d'excellents rendements de capture (voir figure 7) sans ajouter le moindre tensioactif au milieu de culture.

Des résultats de la littérature ont montré que l'orientation d'un réseau de croix en relief par rapport à la ligne de contact influençait le nombre de particules capturées dans les angles de la croix, comme illustré sur la figure 5.⁵⁷

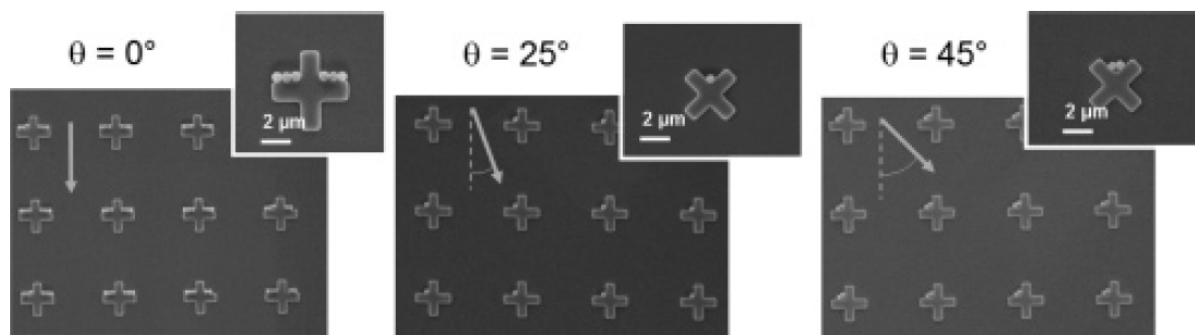


Figure 5: Images en microscopie électronique⁵⁷ de particules de polystyrène de 500 nm de diamètre capturées sur un réseau de croix en relief de 200 nm de haut par assemblage capillaire, en orientant la ligne de contact par rapport au réseau à des valeurs de 0°, 25° et 45°. $V_{\text{Substrat}}=1 \mu\text{m.s}^{-1}$, $T=25^\circ\text{C}$.

Nous avons donc testé différentes orientations de notre réseau. Effectivement, la capture de cellules uniques est quasiment systématique si l'angle entre le réseau et le ménisque (et donc aussi entre l'ouverture du piège et le ménisque) est de l'ordre de 25° (figure 6-7), comme dans l'article précité. S'il est de 0°, on a fréquemment des captures multiples. Ce résultat peut être expliqué au moins d'un point de vue qualitatif : la modification de l'orientation du motif vis à vis du ménisque permet de moduler les effets de confinement géométrique induits par une structure lors du passage de la ligne triple, avant le démouillage. Ainsi, pour une structure donnée, la modification de l'orientation permet de moduler le nombre de particules confinées.

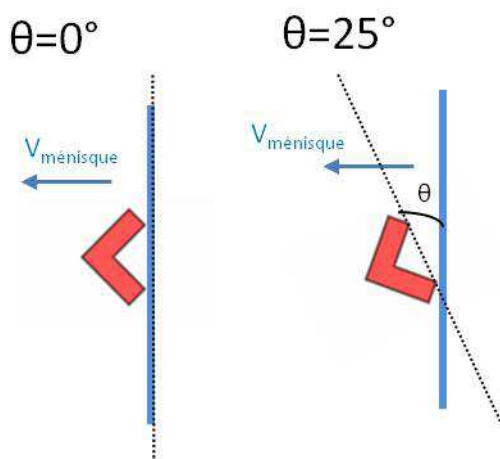


Figure 6 : représentation de l'orientation de la ligne de contact (en bleu) par rapport à l'ouverture d'un piège.

On donne ci-après des images illustrant ces résultats de captures uniques obtenus avec cette orientation à $10 \mu\text{m.s}^{-1}$.

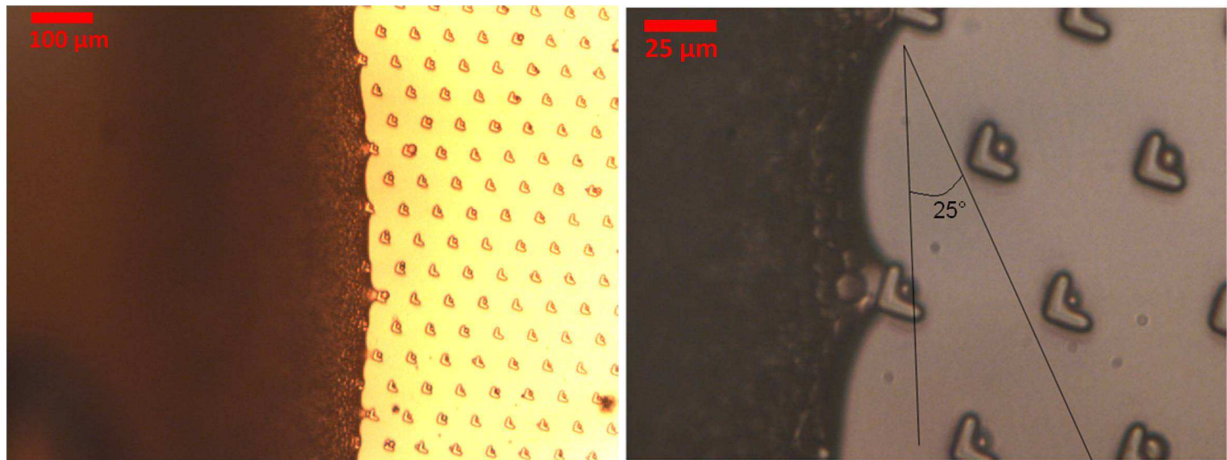


Figure 7 : A gauche: un assemblage capillaire de levures $\gamma\text{AT-340}$ en cours. A droite: un agrandissement. On remarque l'angle formé par l'ouverture des pièges et la ligne de contact. La capture de levures uniques est réalisable. Expériences réalisées à $10 \mu\text{m.s}^{-1}$ et à température ambiante, directement dans le milieu de culture sans ajout de surfactants.

L'objectif recherché d'une capture massive et précise de cellules uniques est donc atteint dans le cas des levures. Celles-ci comme nous l'avons dit plus haut constituent des cellules faciles à manipuler, puisqu'elles sont faciles à cultiver et résistantes au stress. Nous allons à présent nous intéresser à une autre catégorie de cellules au comportement bien plus complexe : les bactéries Escherichia Coli (E. Coli).

c) Bactérie *Escherichia. Coli*

Les bactéries *E. Coli* sont de petits micro-organismes en forme de bâtonnets de taille typique $0,5\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$. On en donne une image sur la figure suivante.

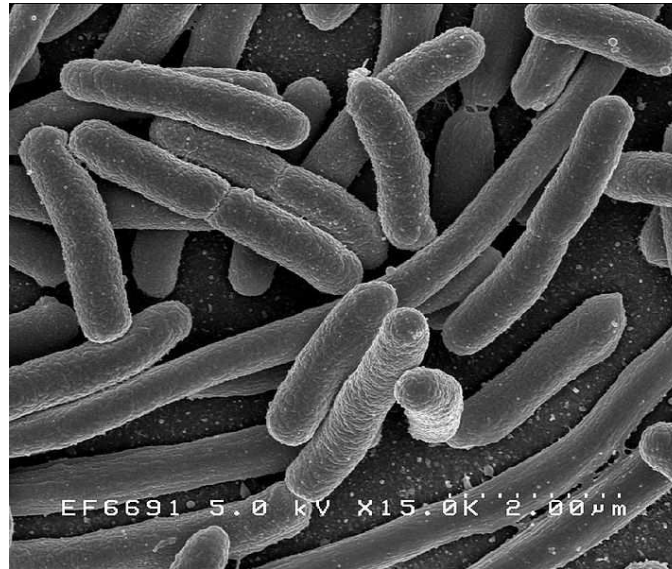


Figure 8 : Image en microscopie électronique de Bactérie *E. Coli* (Source : http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli).

Elles constituent un organisme modèle très employé en biologie. Nous avons observé que les bactéries *E. Coli* sont des organismes souples susceptibles de se déformer sous l'influence des forces de capillarité.

La souche que nous avons employée^e possède un plasmide de fluorescence et de résistance à l'ampicilline. Sa culture a été effectuée dans le milieu LB (*Lysogeny broth*) avec un peu d'ampicilline ($50\ \mu\text{g/mL}$)^f pour éviter la prolifération d'autres souches bactériennes.

i. Paramètres d'assemblage

L'assemblage a été effectué directement dans le milieu de culture à une vitesse allant de quelques $\mu\text{m.s}^{-1}$ à quelques dizaines de $\mu\text{m.s}^{-1}$. Aussi bien les motifs en relief que les cavités ont été testés sur des échantillons en PDMS.

La figure 9 donne des résultats d'assemblage de bactéries *E.Coli* sur un substrat de PDMS structuré par des cavités ($2\text{-}3\ \mu\text{m}$ de profondeur). Aucun tensioactif n'a été ajouté au cours de cette expérience. Les résultats montrent une large proportion de sites occupés. Le nombre de bactéries piégées est inhomogène et varie de une à plus d'une dizaine par structure. Nous avons remarqué que

^e Nous tenons à remercier l'équipe de P. Silberzan, en particulier D. Lopez, qui nous a donné accès à cette souche cellulaire.

^f On prépare une solution d'ampicilline dans un mélange eau/éthanol (50/50) à une concentration de $50\ \text{mg/mL}$. On ajoute ensuite au LB, $1\ \mu\text{L/mL}$ de cette solution.

plus la culture de bactéries est ancienne, plus son démouillage est difficile. Nous pensons que les sécrétions des cellules au cours de leur cycle ou au moment de leur mort (protéines, acides aminés, lipides,...) interagissent avec la surface de PDMS et influencent de façon significative le comportement du ménisque. Aussi, de façon à reproduire les expériences dans des conditions comparables, les suspensions de bactéries ont été systématiquement re-suspendues dans du milieu LB frais (avec de l'ampicilline) avant de procéder à l'assemblage. Dans ces conditions, une suspension de bactérie E.Coli sur du PDMS à une mouillabilité limite pour l'assemblage. Nous avons estimé l'angle de contact de recul à environ 45° dans ce cas.

Lorsque l'assemblage ne s'effectue pas spontanément, on ajoute une très faible quantité de surfactant peu toxique pour les cellules : le pluronic F-127 NF à environ 10 mg/L.

On donne ci-après des images d'assemblages obtenus par ce procédé sur des réseaux de cavités.

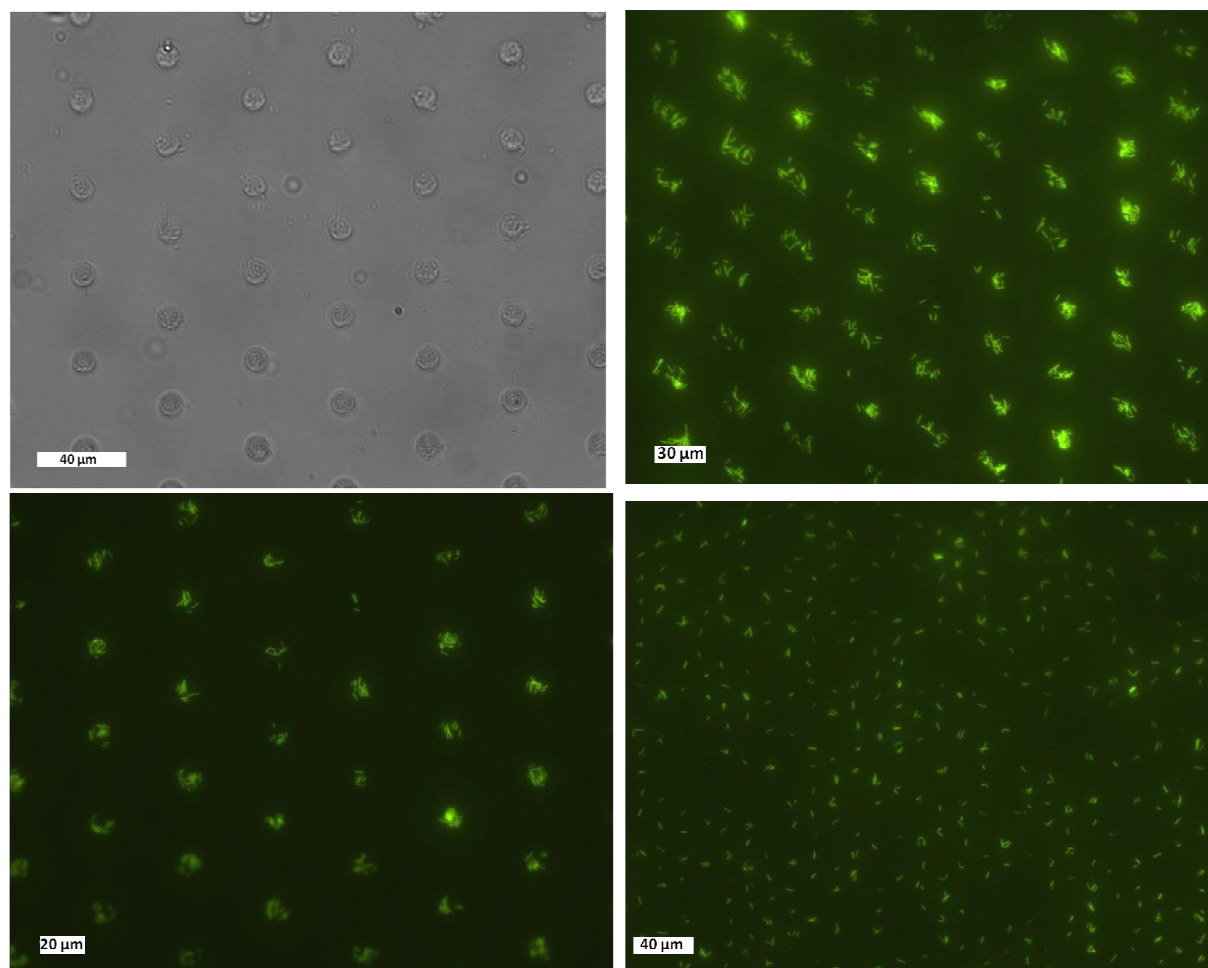


Figure 9: Après assemblage de bactéries E.coli sur des cavités en PDMS. En haut à gauche, une image en microscopie en champ clair. Les autres images ont été prises en fluorescence.

On donne aussi sur la figure suivante des images de capture réalisées sur des motifs en reliefs (2-3 μm de profondeur).

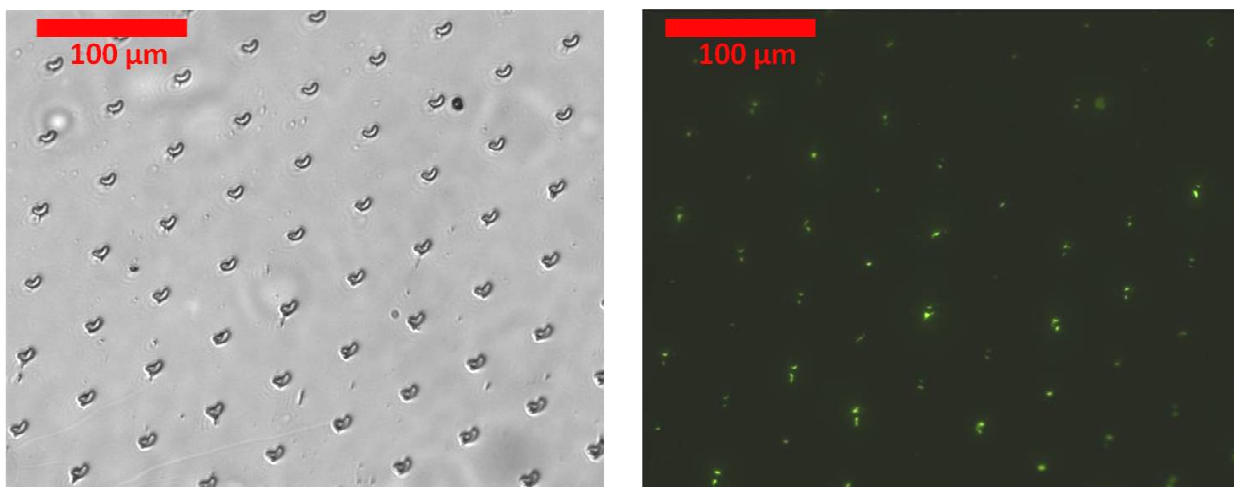


Figure 10: A gauche, Un réseau de motifs en relief en PDMS où viennent d'être capturées des bactéries. A droite, le même réseau vu en fluorescence. $V_{\text{assemblage}} = 2 \mu\text{m/s}$. Température ambiante.

Les observations expérimentales montrent que le processus de capture est différent de celui observé pour des particules magnétiques ou des levures. En effet, du fait de leur géométrie et de leur élasticité, les bactéries en contact avec une structure en relief peuvent se déformer ce qui diminue l'efficacité du confinement induit lors du démouillage. De fait, obtenir une cellule unique par piège s'est avéré difficile sur les motifs en relief. Dans le cas de structures en creux, les bactéries peuvent épouser la forme de la cavité ce qui diminue les contraintes imposées par le motif sur le confinement. Là encore, bien que le rendement de capture soit très élevé ($>98\%$) il est difficile de contrôler le nombre de bactéries piégées par motifs. Cependant, nous avons observé expérimentalement qu'en réduisant les forces de confinement en augmentant l'angle de contact jusqu'à la valeur seuil permettant l'assemblage ($\approx 45^\circ$ dans le cas présent), i.e. en resuspendant les bactéries dans du LB frais, on parvient à réaliser des captures de cellules uniques sur des zones relativement étendues (figure 11).

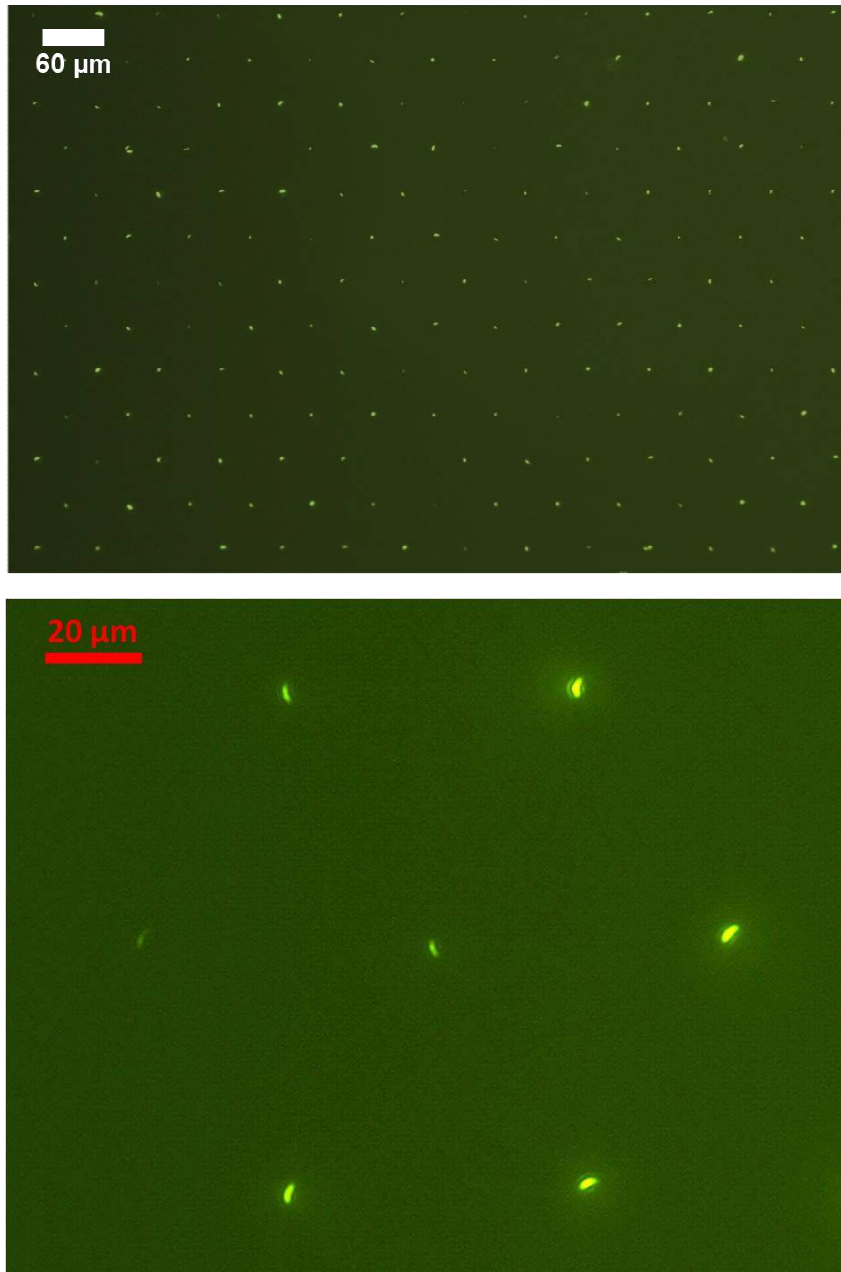


Figure 11: En haut : réseaux de bactéries sur une surface en PDMS. $V_{\text{Substrat}}=10 \mu\text{m.s}^{-1}$, $T=14^{\circ}\text{C}$ (Pas de surfactant ajouté pendant l'assemblage). Bien qu'il soit difficile de distinguer les unes des autres des bactéries en assemblage serré, nous pensons que ce réseau est majoritairement constitué de cellules isolées. En bas : un agrandissement.

La figure 12 montre que les conditions d'assemblage choisie offre une très bonne flexibilité quant aux motifs et aux densités des structures de capture.

Nous présentons ci-après quelques photos de structures originales obtenues par ce procédé.

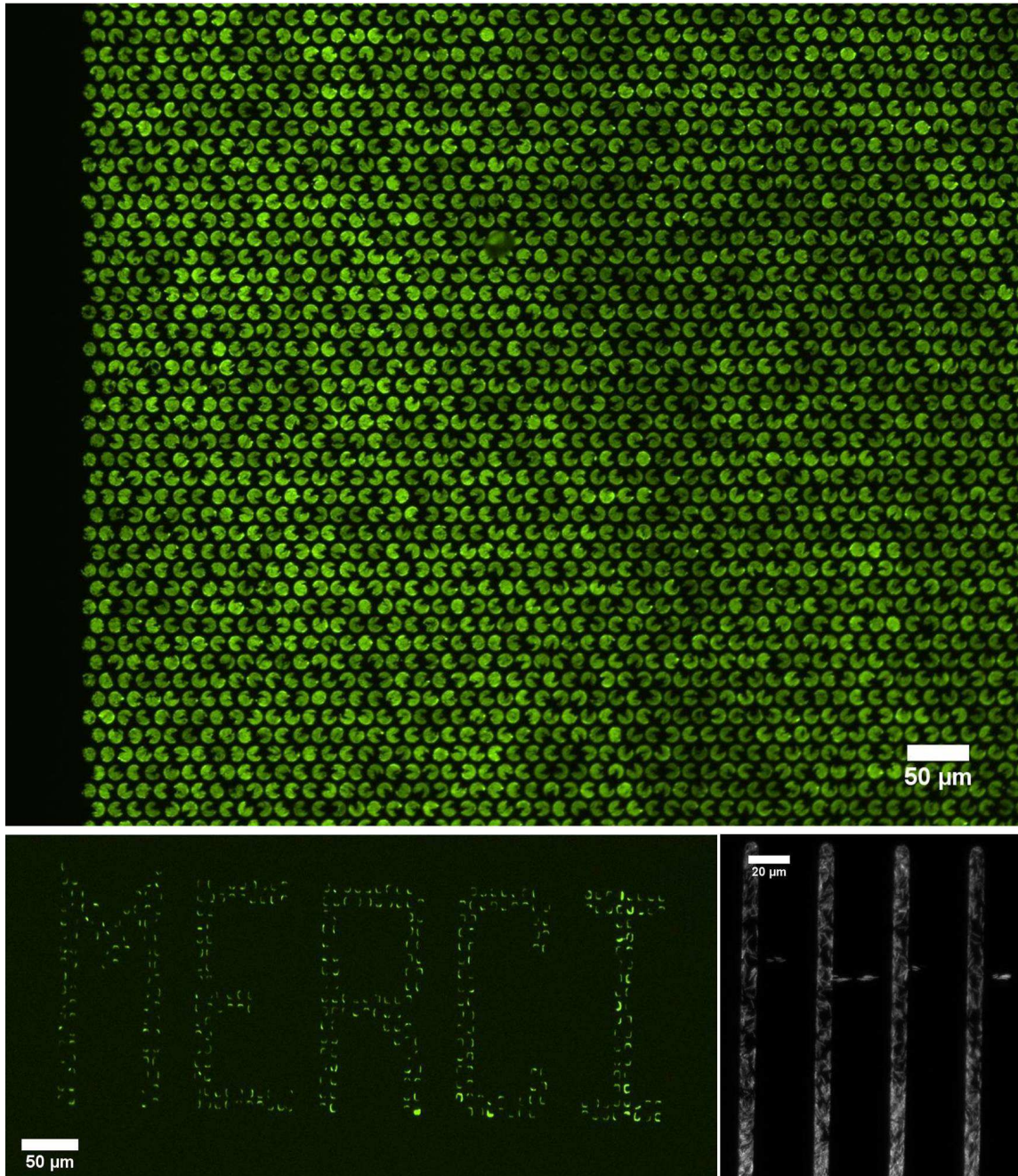


Figure 12: En haut: cavités remplies de bactéries E. Coli. Le remplissage s'est, à chaque fois, effectué en laissant une petite encoche vide. D'où un réseau de « Pacman ». En bas à gauche : Motifs obtenus en écrivant avec des cavités avant remplissage. En bas à droite : tranchées remplies de bactéries.

ii. Transfert

Les méthodes d'assemblage capillaires offrent la possibilité de générer des réseaux étendus de cellules sur des surfaces de PDMS. Une fois ces assemblages réalisés, on souhaiterait pouvoir observer la croissance des bactéries, leurs interactions (effets de quorum, etc.), les exposer à tel ou tel composé chimique (e.g. un antibiotique). Le PDMS présente l'avantage d'être aisément intégrable dans un dispositif microfluidique permettant via des canaux d'acheminer du milieu de culture ou d'autres composés. Toutefois, dans le cas d'une simple remise en culture, ce matériau n'est pas aussi bien adapté que les hydrogels tels l'agarose, qui sont communément utilisés en biologie cellulaire.

Comme nous l'avons indiqué dans les premiers chapitres, il est possible de combiner les méthodes d'assemblage capillaire et convectif avec des méthodes de transfert dérivées du micro contact printing. Dans le cas présent, nous avons cherché à transférer les bactéries assemblées dans les cavités en PDMS sur des substrats en agarose. Le principe du procédé est simple : une fois l'assemblage effectué sur un substrat de PDMS, un moulage du réseau de bactérie est réalisé avec de l'agarose encore liquide. La figure suivante illustre ce procédé :

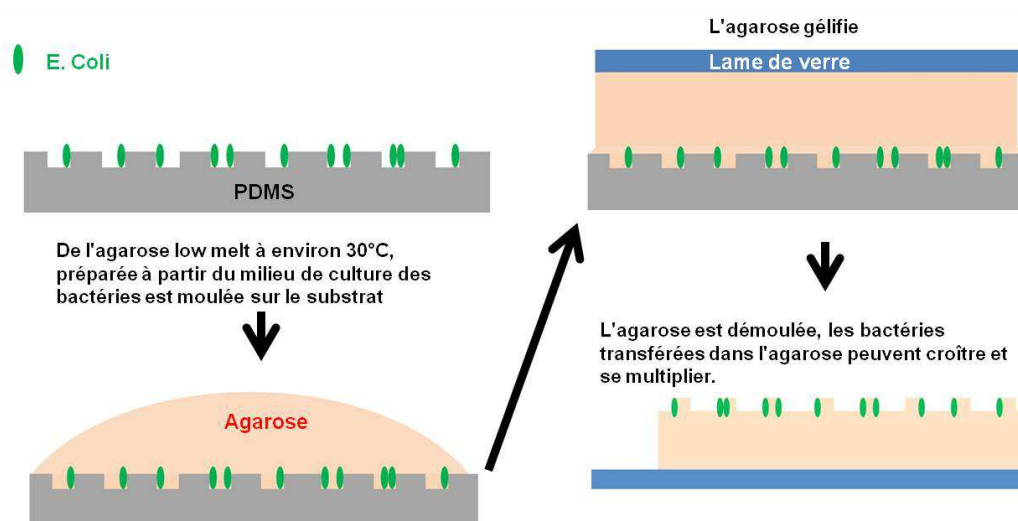


Figure 13: Principe du transfert des bactéries dans l'agarose. Le moulage est effectué sur les motifs contenant les bactéries avec de l'agarose à une température proche de son point de gélification.

Comme indiqué sur la figure 13, nous utilisons de l'agarose^g « low melt » qui possède un point de gélification à basse température (26.5°C à 1.5%). Dans ces conditions, les bactéries ne subiront donc pas de choc thermique. La poudre d'agarose est tout d'abord mélangée au milieu de culture des bactéries. Les gels sont préparés à des concentrations de 6% en masse afin d'obtenir une plus grande résistance mécanique à l'état solide. Le mélange est ensuite porté à ébullition quelques secondes

^g Agarose type LM-3 Euromedex

puis refroidit. Lorsque la température avoisine les 30°C, l'agarose est coulée sur le PDMS décoré de bactéries puis une lame de verre est déposée au contact de l'agarose. L'agarose à cette température est encore liquide bien que d'une grande viscosité. Une fois durcie à basse température, la couche d'agarose est décollée du substrat par le biais de la lame de verre qui sert de support rigide. Lors de ce processus, les bactéries sont entraînées par l'agarose. Le rendement de ce procédé de transfert a montré une très grande efficacité. La figure suivante présente quelques photos d'une structure d'agarose où des bactéries ont été transférées après avoir été capturée sur du PDMS dans des motifs en reliefs (figure 14).

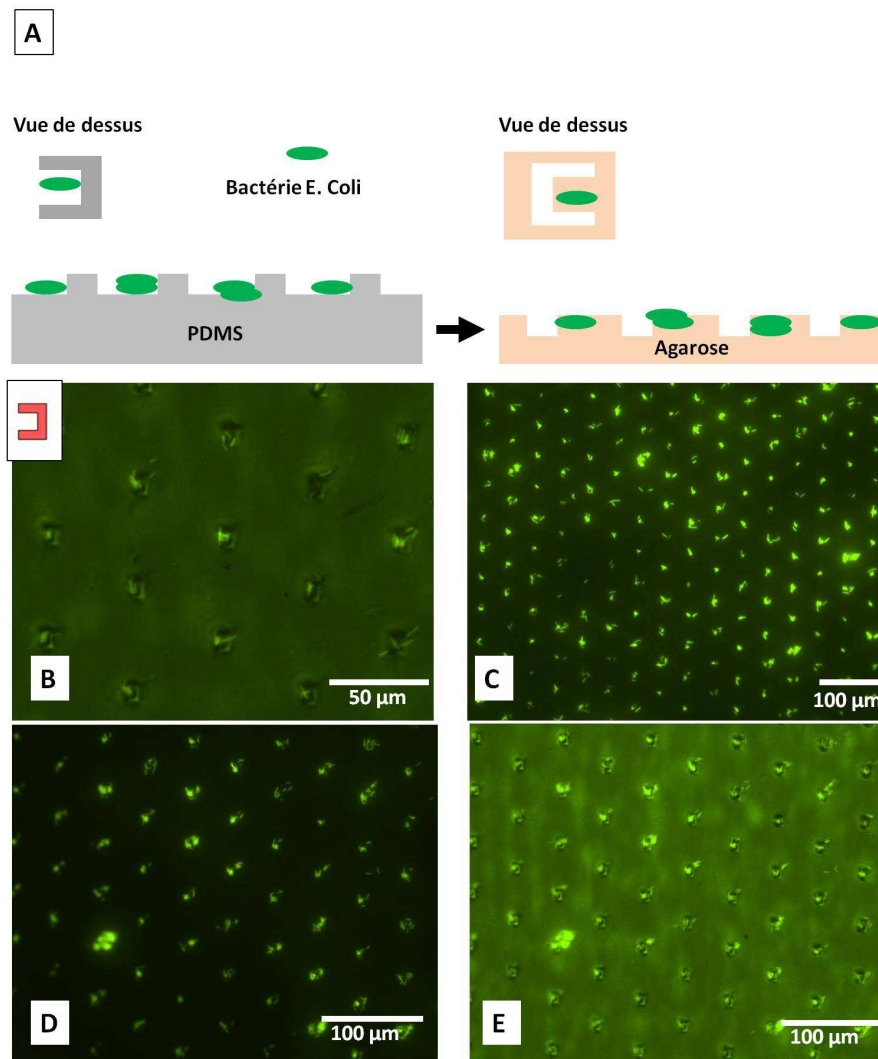


Figure 14 : A. Schéma présentant la forme des motifs obtenus sur l'agarose après transfert de bactéries immobilisées sur des motifs en relief. B-E. Images en fluorescence de bactéries transférées sur l'agarose. Ces images ont été réalisées au cours d'une expérience où les bactéries ont été piégées sur des réseaux en relief par petits groupes. Sur l'image B a été placé en insert un schéma du piège qui a servi à la capture des bactéries.

Une fois le transfert effectué, les bactéries sont maintenues en culture dans l'agarose pendant 24h à température ambiante. Bien que cela ne correspondent pas à des conditions parfaitement

physiologiques, on constate cependant la croissance de colonies bactériennes sur chaque motif transféré dans l'agarose. La figure 15 en présente quelques images. En revanche, on remarque que ces colonies ne sont pas fluorescentes, ce qui laisse supposer qu'une souche bactérienne est entrée en compétition avec la souche d'intérêt. En effet le protocole de transfert nécessite une étape de chauffage qui peut entraîner une dégradation au moins partielle de l'antibiotique, une contamination extérieure devient donc possible.

La coïncidence parfaite entre les motifs et le centre des colonies reste troublante. La bactérie non fluorescente a certainement été capturée par l'assemblage capillaire.

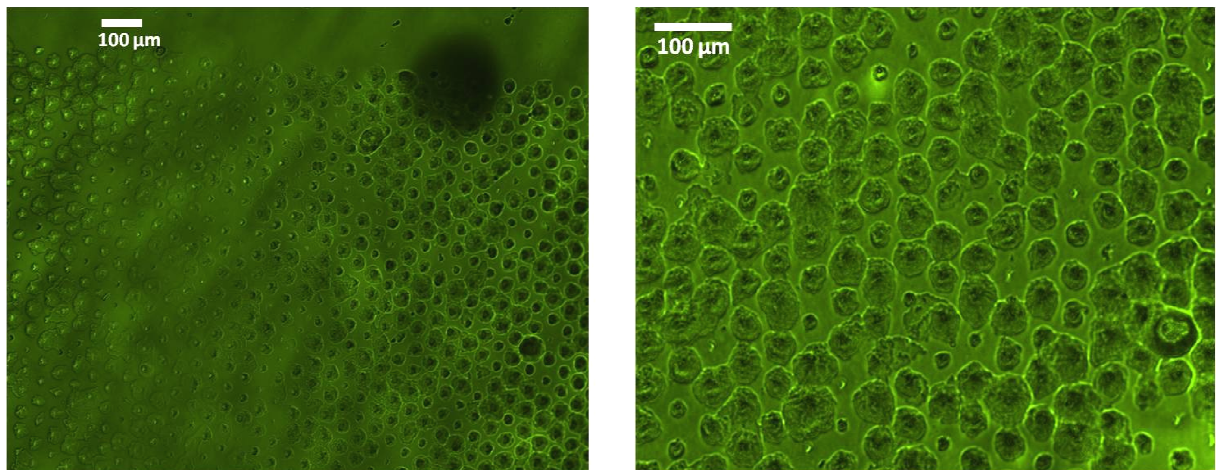


Figure 15: E. Coli, après 24h sur l'agarose

Ainsi, bien que le résultat de ces expériences ne soit pas concluant en terme de sélectivité, nous avons montré qu'il est possible de placer précisément de petits groupes de bactéries sur une surface et de transférer ces bactéries sur un milieu de culture typique. Les bactéries ne sont pas détruites par le processus et peuvent se multiplier rapidement par la suite.

d) Cellules de mammifères

Nous avons appliqué le même procédé d'assemblage à des cellules de mammifères. Nous avons travaillé avec plusieurs types cellulaires différents : des neurones d'embryons de souris, et plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines. Un tableau présenté ci-dessous liste les principales cellules testées.

Cellules	Milieu liquide employé pour l'assemblage	Substrat
Neurones d'embryons de souris	PBS, PBS+glucose, PBS+BSA, DMEM, GBSS+Glucose, RPMI	PDMS, PDMS et COC (avec traitement de surface au PDMA-AGE), Dynéon® (polymère fluoré)
Cellule épithéliale Raji, cellules cancéreuses va13 et 293T	RPMI, DMEM ^h	PDMS

Tableau 1 : Liste de tests effectués sur des cellules de mammifères. Acronymes : PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline). BSA : albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin). DMEM : milieu minimum essentiel de Eagle (Dulbecco's Modified Eagle Medium). GBSS: Gey's balanced salt solution. RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium. PDMA-AGE: Poly(dimethylacrylamide)-co-allyl glycidyl ether

^h Le RPMI et le DMEM sont en général complétés avec 10% de sérum fœtal de veau (fbs), de la L-glutamine à 0,5 mol.L⁻¹ et de la pénicilline et de la streptomycine à 0,01 mol.L⁻¹.

Deux difficultés importantes sont apparues :

D'une part, du fait de l'affinité des protéines de surface des cellules pour le PDMS, une forte adhésion non spécifique est observée. D'où une grande difficulté à placer de façon sélective les cellules dans les motifs. Un résultat typique obtenu avec des neurones d'embryons de souris fixées est présenté sur la figure suivante.

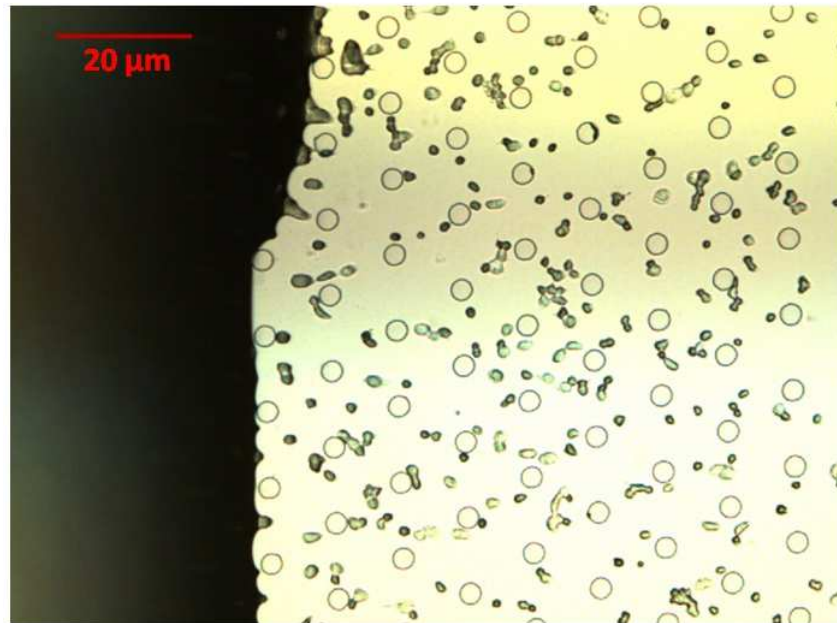


Figure 16 : Tentative d'assemblage capillaire sur du PDMS (dans du PBS) avec des neurones de souris fixées. $v_s = 5 \mu\text{m.s}^{-1}$.

D'autre part, les cellules de mammifères ne tolèrent pas la déshydratation, qui provoque très rapidement leur mort.

Ces problèmes nous ont conduits à rechercher d'autres solutions pour réaliser le placement précis de ces cellules sur des surfaces (Voir 3.d)).

e) Conclusion

Dans ce paragraphe, nous avons montré qu'il était possible de placer avec précision des cellules de levures et des cellules bactériennes sur des surfaces. La précision de la localisation est de l'ordre de la taille de la cellule elle-même. De larges réseaux de cellules (plusieurs mm^2) ont été ainsi construits avec une très bonne homogénéité. Ces réseaux peuvent être ensuite transférés sur de l'agarose ou bien intégrés dans un système microfluidique afin d'être étudiés. Dans le cas de cellules de mammifères, outre les problèmes de compatibilité de la méthode avec la survie des cellules, aucune condition expérimentale n'a pu être trouvée pour obtenir un assemblage direct.

3. Multiplexage de particules fonctionnalisées : application à l'immobilisation de cellules de mammifères.

a) Contexte

Nous avons démontré qu'il est possible de localiser précisément sur des surfaces des particules micrométriques inertes ou vivantes. Mais jusqu'à présent tous les assemblages que nous avons étudiés ne mettaient en jeu qu'un seul type de particule. Serait-il envisageable de capturer sur une même surface, non pas un, mais plusieurs types de particule, par exemple des billes aux fonctionnalisations de surface différentes ou bien des cellules de différentes natures susceptibles d'interagir ? Il s'agirait de les disposer avec précision au sein d'une même zone en fonction de leur nature. En disposant par exemple des paires de cellules (un lymphocyte et une bactérie, par exemple) des études à l'échelle de la cellule unique sur un très grand nombre de paires pourraient être effectuées sur un seul échantillon. C'est ce que nous nommerons dans la suite, le multiplexage.

Pour ce faire, il faut rendre sélectif les structures-pièges que nous utilisons pour capturer des particules, pour qu'elles ne puissent capturer qu'un seul type de particule. Il convient de choisir le critère sur lequel portera la sélectivité : un type de piège donné capturera-t-il des particules d'une taille donnée, d'une forme donnée ou d'une fonctionnalisation de surface donnée ?

Un piège « sélectif par la taille » est relativement simple à réaliser. Nous avons envisagé un réseau de structures de tailles multiples, par exemple, un réseau de 2 sortes de cavités, l'une de taille plus importante que l'autre. Si l'on fait passer sur la surface successivement des suspensions de particules de tailles décroissantes, on ne capturera dans les grandes cavités que les grandes billes. Si le rendement est proche de 100% et si l'espace occupé par une grande bille dans une grande cavité ne laisse pas assez d'espace pour qu'une petite bille vienne s'y loger, alors au second passage avec une suspension de plus petites billes, on ne capturera que des petites billes dans de petites cavités. Le procédé d'assemblage se comporte ainsi comme un filtre « passe haut ».

On peut augmenter le nombre de pièges de différentes tailles à condition de respecter certains critères sur les tailles des cavités et billes. Un raisonnement purement géométrique illustré sur la figure 17 est le suivant :

Soit N types de cavités circulaires c_n numérotées de 1 à N de diamètres D_n croissants, et N types de billes b_n de diamètres d_n croissants. La bille b_x doit être capturée par les cavités de type c_x . Les assemblages de billes sont effectués par ordre décroissant de diamètres et donc de numéros (les plus grosses billes sont assemblées en premier).

On doit avoir :

Pour que la bille b_n soit capturée par c_n : $D_n > d_n$ (la dimension des motifs doit être légèrement supérieure à la dimension de la bille pour permettre sa capture).

Pour que la bille b_n ne soit pas capturée par c_{n-1} : $d_n > D_{n-1}$.

Plus généralement, b_n ne doit être capturée par aucun autre type de cavités que c_n , donc :

$d_n > D_{n-y}$, pour n'importe quel y .

On a donc : $D_n > d_n > D_{n-y}$

Pour que la bille b_{n-y} de diamètre d_{n-y} qui arrivera par la suite ne soit pas capturée par l'interstice restant dans la cavité c_n après la capture de b_n , on doit avoir : $D_n - d_n < d_{n-y}$

Toutes les billes qui suivront doivent être plus grandes que l'interstice qui reste dans c_n après la capture de b_n .

D'où pour tout n et y :

$$d_{n-y} + d_n > D_n > d_n > D_{n-y}$$

Équation 1

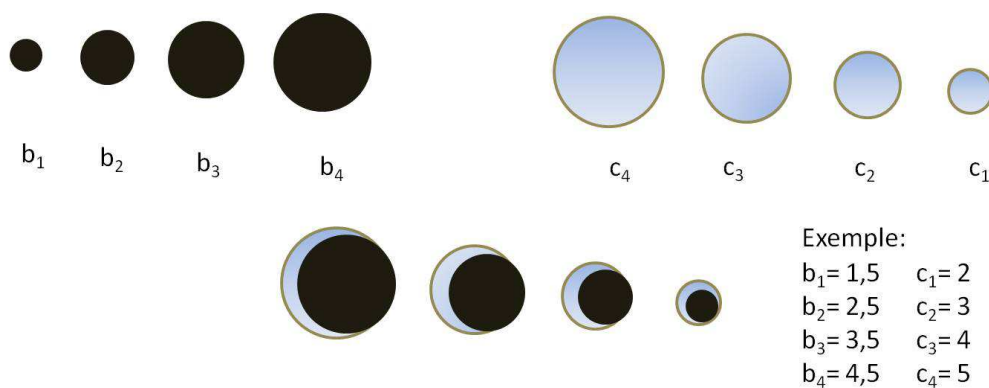


Figure 17 : Illustration d'une sélectivité induite par la taille du piège et de l'objet à piéger. Les suspensions de billes passent sur les réseaux de cavités par ordre décroissant de taille. Ainsi la bille b_4 est piégée par c_4 en laissant un espace trop faible pour que les billes b_1 , b_2 , b_3 puissent s'y loger. Plus cet espace est petit cependant, et plus l'assemblage de b_4 sera difficile. On donne un exemple de jeu de dimensions qui conviendrait.

Moyennant quoi il sera possible si le rendement est proche de 100% (égal à 100% en théorie) de placer sélectivement différents types de billes avec éventuellement des fonctionnalisations différentes précisément sur une surface. Evidemment plus le nombre de types de billes de diamètres différents est important et plus la sélectivité du procédé d'immobilisation vis à vis de la taille doit être grande pour permettre de discriminer deux tailles de motifs. Une contrainte supplémentaire vient du choix du diamètre des billes qui est limité, en particulier pour les billes commerciales fonctionnalisées qui nous intéressent.

Compte tenu de cette difficulté nous avons envisagé une autre alternative où la taille des différentes particules peut être la même : nous souhaiterions capturer uniquement les particules se déplaçant dans une direction donnée. Pour ce faire, nous avons utilisé la sélectivité liée à la forme des pièges.

b) Principe

Nous avons vu précédemment que l'orientation d'un motif permet de moduler le nombre de particules immobilisées. En effet, le confinement géométrique menant à l'immobilisation dépend d'une part de l'angle de contact et d'autre part de la forme et des dimensions des structures. Notre objectif est d'utiliser l'orientation des motifs pour moduler l'efficacité de l'assemblage et de procéder à plusieurs assemblages successifs selon différentes directions. La forme des pièges doit être convenablement choisie pour que les particules soient capturées efficacement lorsqu'elles viennent d'une direction et soient maintenues en suspension par le ménisque dans les autres cas.

Nous avons choisi de réaliser des pièges en relief en forme de croissant combinés à 4 directions d'assemblage. Comme illustré sur la figure 18, de telles structures n'offrent un confinement suffisant que lorsque le déplacement du ménisque est orienté vers la partie concave des structures. Les particules qui viennent d'autres directions seront emportées par les forces capillaires, la forme des motifs n'offrant pas de position de confinement stable.

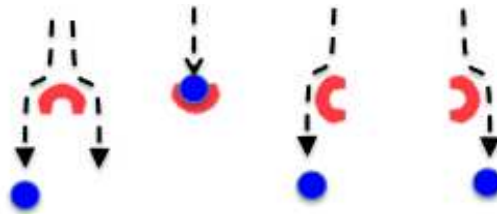


Figure 18 : Schéma d'un piège possédant une seule direction de capture. Si une particule entre dans l'ouverture du piège elle est capturée. Si elle arrive d'une autre direction au piège, elle contourne les flancs du piège et poursuit sa route. Pour favoriser ce contournement, la forme du piège est arrondie.

La figure suivante résume le principe de cette méthode :

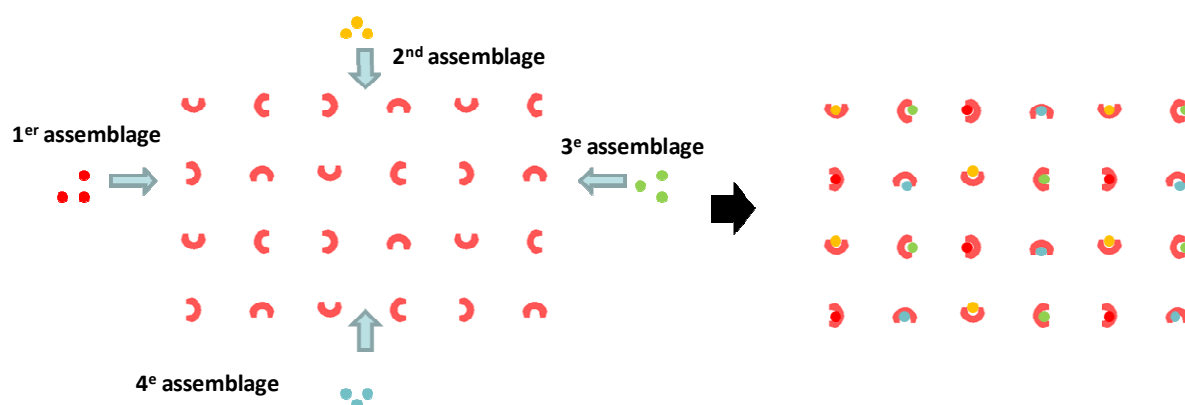


Figure 19: Principe du multiplexage. Un piège ne capture que ce qui arrive par son ouverture.

Nous avons réalisé de tels motifs sur du PDMS par moulage sur des substrats en silicium portant des structures en SU8. Ces structures ont été réalisées par lithographie. La figure suivante présente une image en 3D des motifs obtenus. Nous avons travaillé avec des structures d'environ $2\ \mu\text{m}$ de haut organisées en réseaux carrés d'environ $4\ \text{mm}^2$ et de périodicité $30\ \mu\text{m}$. On peut aussi considérer que les structures sont composées de 4 réseaux de motifs hexagonaux imbriqués si l'on considère séparément chaque orientation.

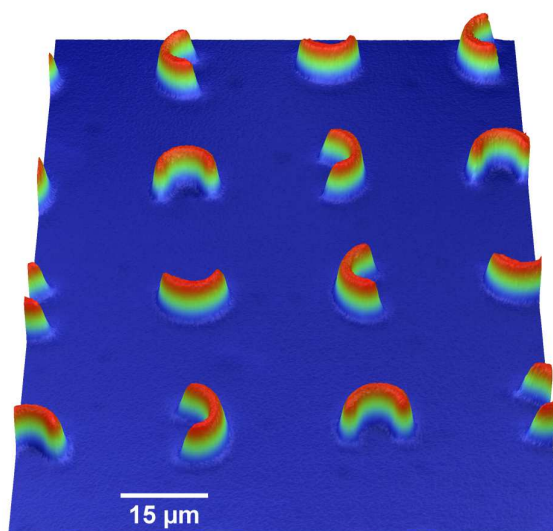


Figure 20: Scan 3D au profilomètre optique des structures réalisées. La hauteur des structures est d'environ $2\ \mu\text{m}$.

c) Résultat

Pour réaliser un assemblage sur ce type de structures, on procède comme précédemment sur des substrats en PDMS. La goutte de suspension glisse sur la surface et permet l'immobilisation de particules uniquement dans les pièges dont l'ouverture a la bonne orientation. La forme arrondie à

pour but de permettre le glissement des particules le long des structures non convenablement orientées. La suspension ne doit pas être trop mouillante afin de préserver la spécificité de capture des pièges.

On peut procéder à 4 passages avec ce type de pièges, avec une bonne sélectivité. Entre deux passages, la surface est séchée à l'air comprimé afin de favoriser l'adhésion des billes au PDMS.

Les images suivantes présentent les différentes étapes du processus réalisé avec des billes de 4 couleurs différentes. Le pas du réseau (distance entre 2 pièges quelle que soit leur orientation) est de 30 μm sur toutes ces images.

Les billes ont été lavées et suspendues directement dans le surfactant. L'assemblage a été réalisé à une vitesse de 20 $\mu\text{m/s}$. Dans l'exemple présenté, une phase de séchage à 65°C pendant 15 min a été réalisée entre deux assemblages pour renforcer encore l'adhésion. On espère ainsi ôter les traces d'eau résiduelles susceptible de perturber l'adhésion non spécifique au PDMS.

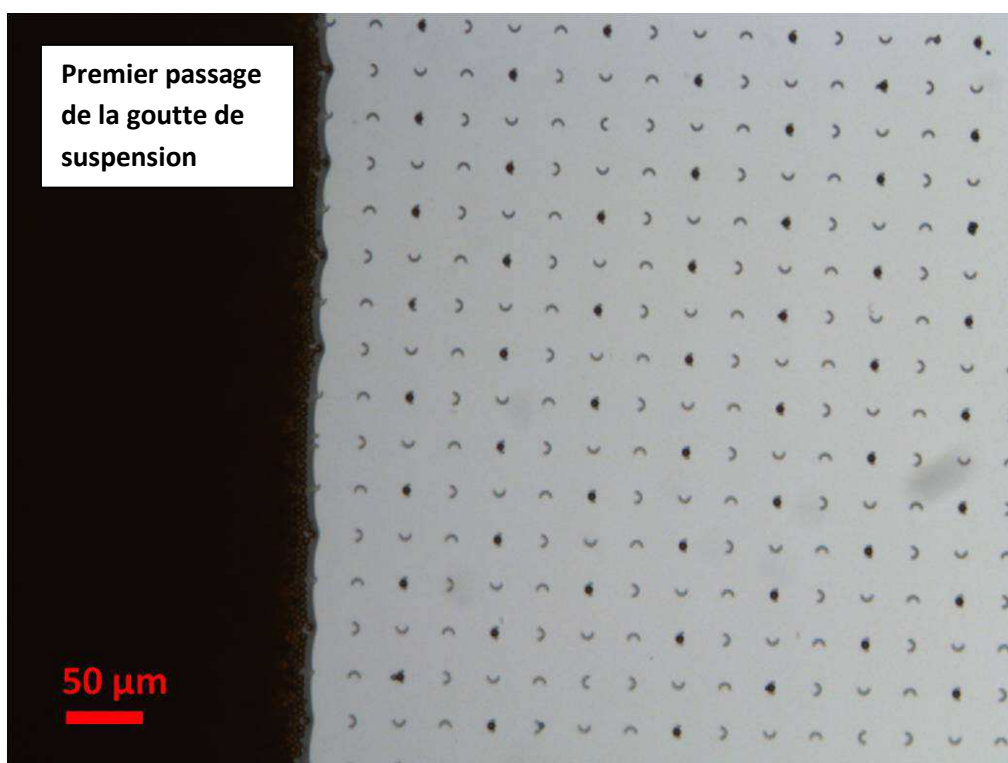


Figure 21: Premier passage de la goutte de suspension, la capture ne se produit que dans les pièges bien orientés. Le pas du réseau vaut 30 μm .

On constate sur la figure précédente qu'au premier passage, le rendement de capture est d'environ 95%. La sélectivité de l'assemblage est proche de 100% (aucune particule piégée dans un piège « mal orienté » n'est visible).

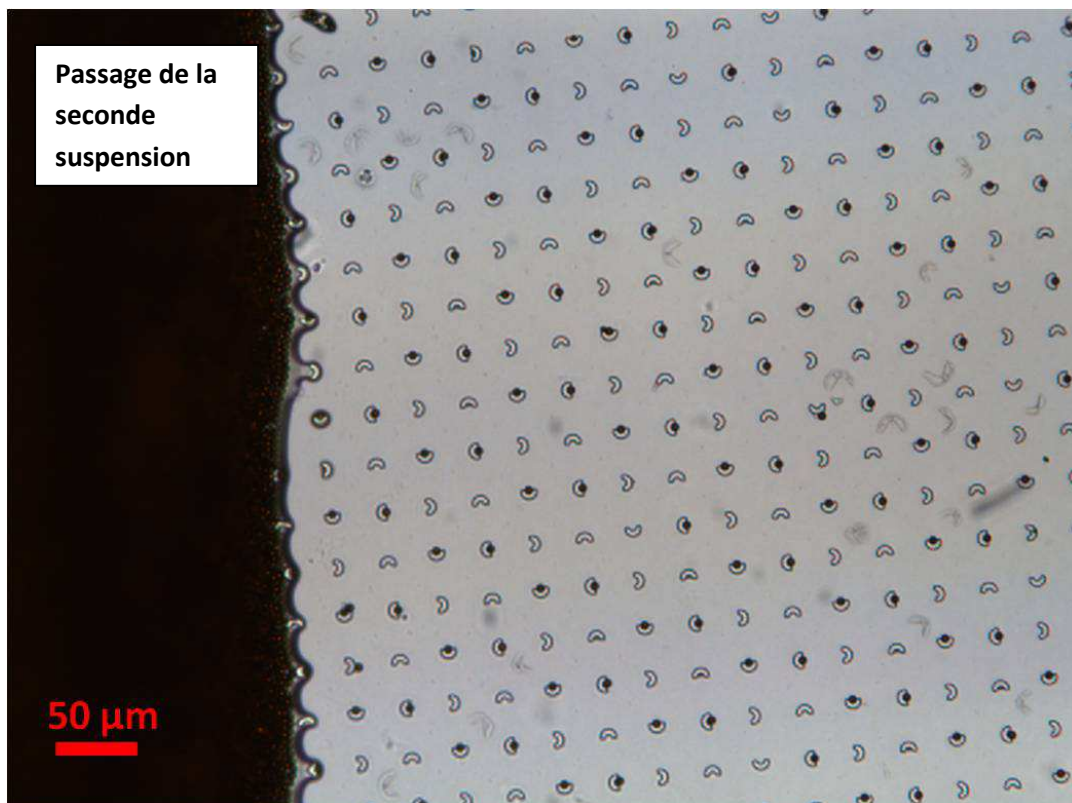


Figure 22: Passage de la seconde suspension. Les particules piégées au premier passage ne sont majoritairement pas libérées par le passage d'une seconde goutte. Les particules sont sélectivement piégées dans les motifs bien orientées.

Après le second passage, on observe un assemblage sélectif de particules dans les motifs convenablement orientés et aucun dépôt non spécifique. En revanche, certaines particules (qui étaient insuffisamment confinées ou qui n'adhéraient pas assez au PDMS) assemblées lors du premier passage sont remis en suspension par le ménisque (environ 15%).

Le troisième passage est présenté figure 23 et figure 24. Aucune particule n'est visible en dehors des motifs. Nous avons observé au 3^{ème} passage des rendements de bonnes captures allant jusqu'à environ 80%.

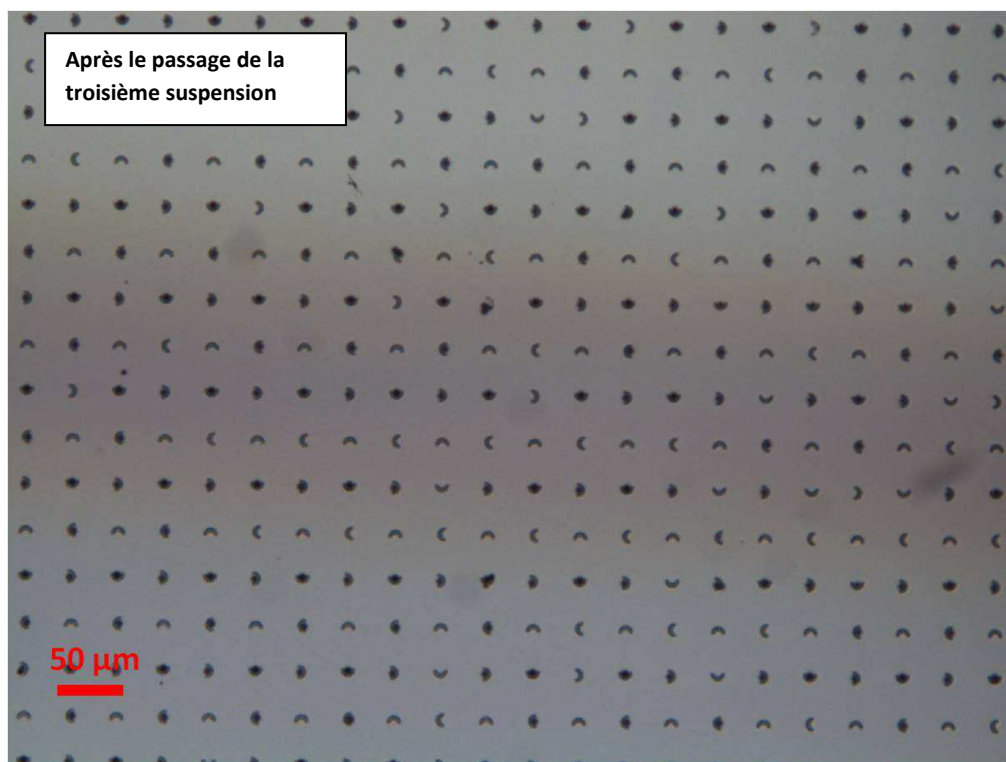


Figure 23: Après passage de la troisième suspension. On note qu'il y a eu un peu de relargage mais que la qualité de l'ensemble reste satisfaisante.

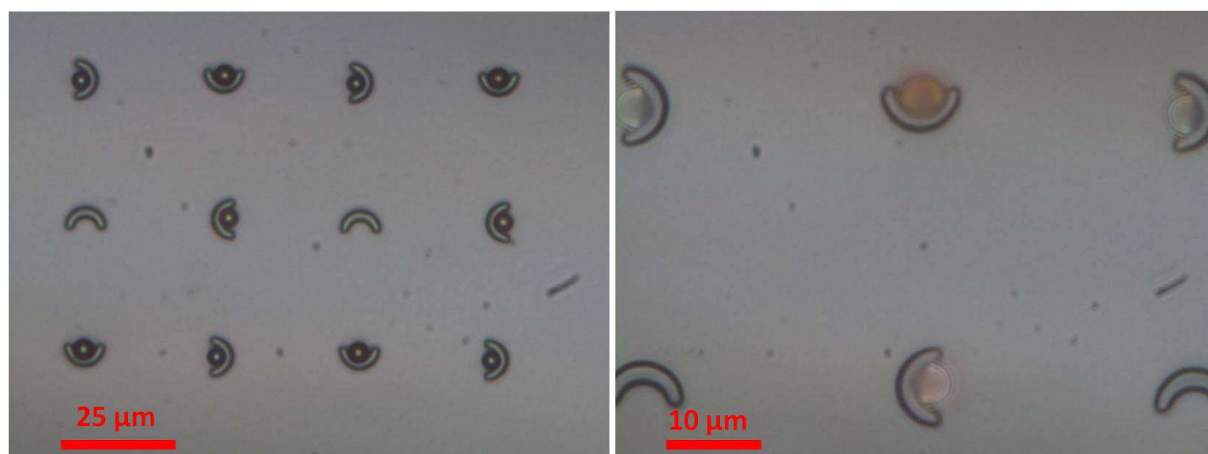


Figure 24 : Après le troisième passage, quelques zooms.

Enfin au quatrième passage (figure 25 et figure 26) la qualité se dégrade nettement. Bien que nous n'observons aucun dépôt en dehors des motifs de capture, nous avons noté la présence d'agrégats de particules sur certains motifs.

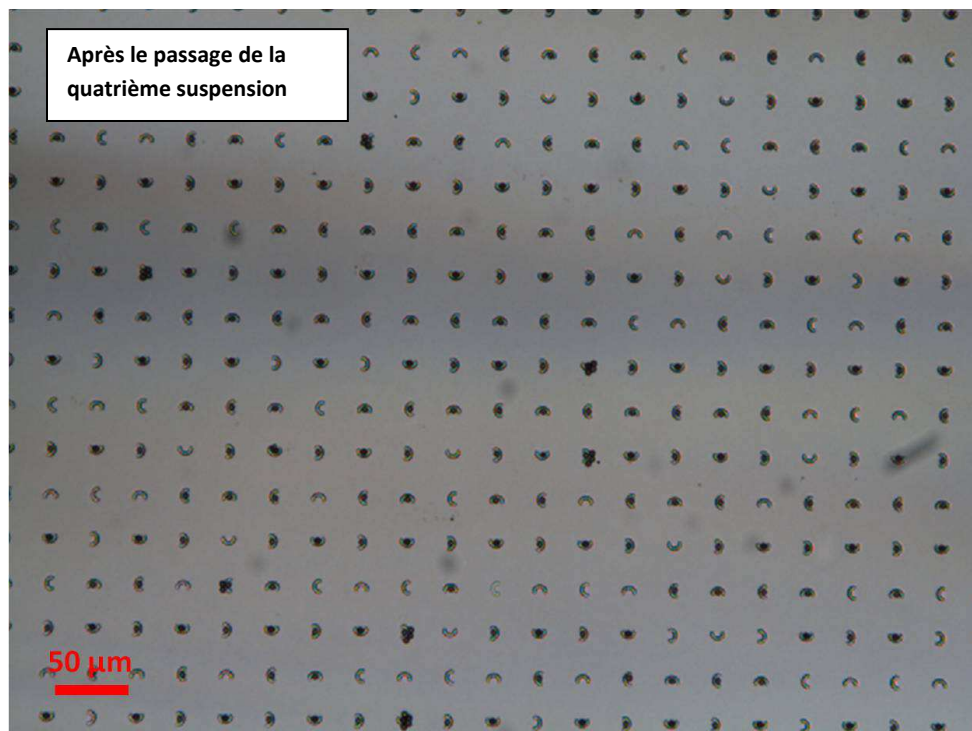


Figure 25: Après le quatrième passage. Vue globale. Le rendement global de remplissage est de l'ordre de 70%, du fait des relargages.

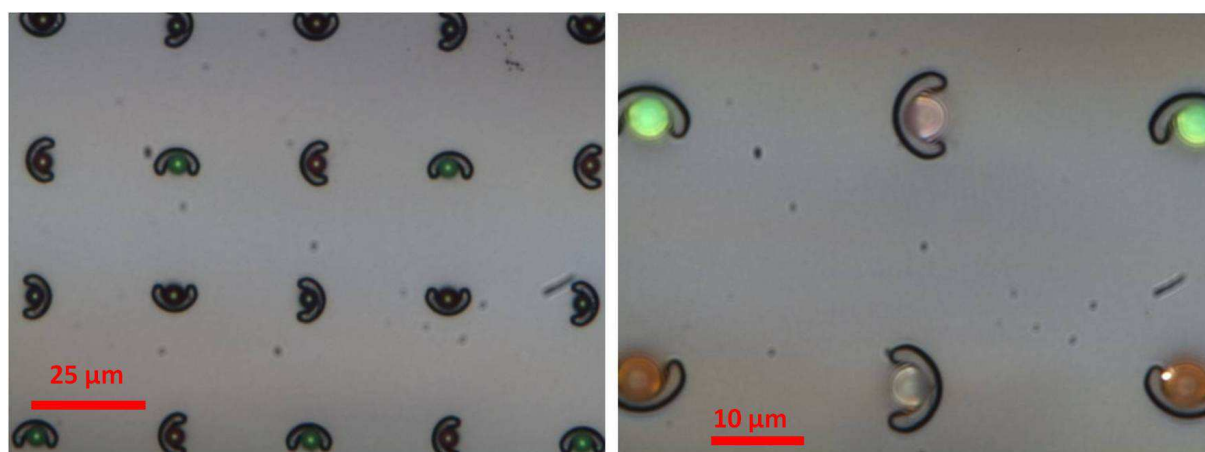


Figure 26 : Des agrandissements du réseau.

On observe une augmentation du nombre de captures non-spécifiques avec le nombre de passages. Plusieurs facteurs peuvent être avancés pour expliquer ce phénomène. En premier lieu, la formation d'agrégats sur les sites de capture qui constituent des obstacles susceptibles d'engendrer une immobilisation non spécifique lors des passages suivants. Par ailleurs, bien que nous ayons vu que les

propriétés du PDMS (tension de surface, déformabilité) permettent de fixer relativement bien des particules sur sa surface après séchage, une difficulté de la méthode reste le maintien de la stabilité des particules déjà immobilisées au cours des assemblages suivants. L'éventuel relargage de particules déjà piégée au cours d'un autre passage de la goutte pose deux problèmes : d'une part cela annule une capture et d'autre part la particule resuspendue est à nouveau en mouvement et susceptible d'être recapturée au cours du passage de la goutte dans un piège orienté pour capturer au cours de ce passage. Nous avons noté que l'étape de séchage entre deux passages joue à ce titre un rôle essentiel en favorisant l'adhésion. On peut sécher l'échantillon à température ambiante à l'air comprimé ou bien le chauffer quelques minutes. Si l'on souhaite préserver les fonctionnalités biologiques (anticorps) des particules, il est préférable de privilégier le séchage à l'ambiante.

d) Application à la capture de cellules humaines

i. Principe

Nous avons vu qu'il est possible de placer plusieurs types de particules différentes sur une surface. L'opportunité de modifier la fonctionnalité des particules apparaît comme particulièrement intéressante pour des applications en biologie. Par exemple, si des anticorps sont présents sur la surface des particules, il est alors possible de procéder à une capture spécifique d'antigènes cibles présents en solution ou encore sur la membrane de cellules.

Alors que l'assemblage capillaire direct de cellules semble délicat à réaliser (voir 2.d), cette méthode permettrait d'induire une capture spécifique d'un type cellulaire sur la base d'une interaction antigène-anticorps.

L'introduction du multiplexage permettrait ainsi de réaliser des assemblages complexes en augmentant le nombre de critères de capture et en induisant l'immobilisation de plusieurs types cellulaires donnés à des coordonnées précises sur la surface. Notons que cette technique pourrait également être appliquée à la capture directe d'antigènes libres en solution et permettre ainsi de réaliser des puces à protéines multiplexées.

Le principe de la méthode est présenté sur la figure suivante :

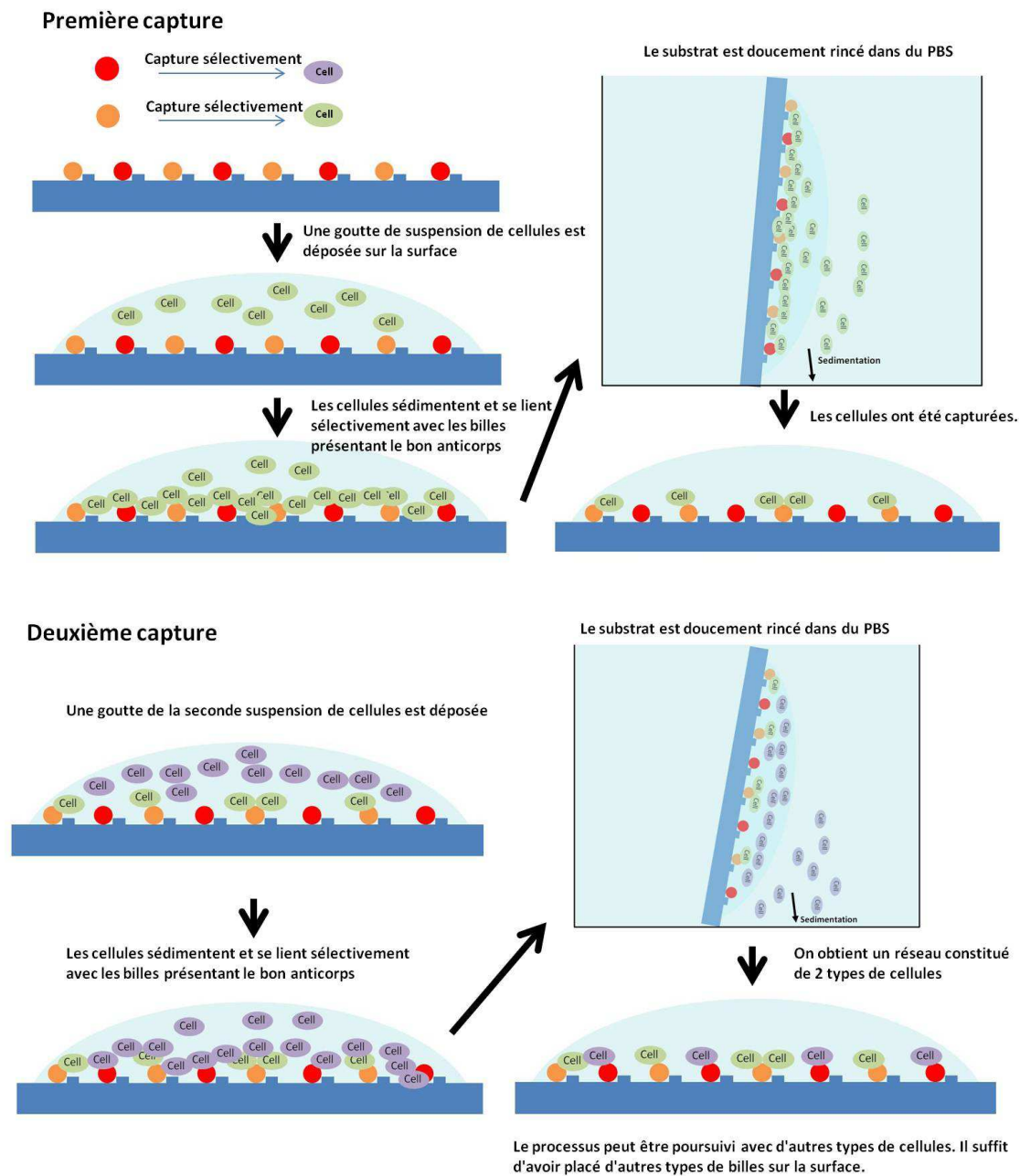


Figure 27: Principe de la capture de plusieurs types de cellules différents sur une surface. On commence par immobiliser des billes fonctionnalisées sur la surface puis on dépose les suspensions cellulaires. Une étape de lavage permet d'éliminer les cellules en excès et non capturées.

Un réseau de plusieurs types de particules possédant différents anticorps est réalisé sur du PDMS par la méthode que nous venons de présenter. La présence d'anticorps sur la surface des billes ne perturbe pas l'assemblage capillaire. Ce réseau une fois formé, une goutte de suspension de cellules (présentant l'antigène correspondant à l'anticorps porté par l'un des types de billes) est déposée sur la surface. On laisse les cellules sédimer et former une couche dense sur le réseau, puis on rince la

surface du substrat en l'immergeant dans du PBS en position verticale. On extrait doucement le substrat du bain de lavage en veillant à ce qu'il reste toujours du liquide sur la surface puis on redépose une goutte de suspension contenant des cellules porteuses d'un autre antigène sur la surface. Ces nouvelles cellules seront capturées par les particules qui portent l'anticorps correspondant. On peut réitérer plusieurs fois ce processus et ainsi réaliser des réseaux complexes avec plusieurs types différents de cellules.

ii. Résultats

Plusieurs types de cellules ont été testés (MCF7, G401, Ovar, Jurkat...). On donne ci-dessous des résultats obtenus avec des cellules Ovar (cellules de carcinome d'ovaire humain) et Jurkat (Lymphocyte T humain, leucémie).

Dans ces expériences des billes de 4,5 μm de chez Invitrogen ont été utilisées. Des Dynabeads fonctionnalisées par des anticorps anti-CD3, qui capturent les cellules Jurkat, et des Dynabeads Epithelial Enrichⁱ, qui capturent les cellules Ovar, ont été placées sur la surface. On resuspend dans du PBS avec 1% de BSA, les cellules Ovar et Jurkat après centrifugation (1000 tours/min, 92g). Sur le substrat, on dépose une goutte (quelques centaines de μL) de suspension de cellules Ovar puis après rinçage une suspension de cellules Jurkat dans un milieu identique.

ⁱ Présentant des anticorps anti-EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule)

Les figures suivantes présentent une surface décorée de cellules Ovar puis une surface décorée de cellules Ovar et Jurkat.

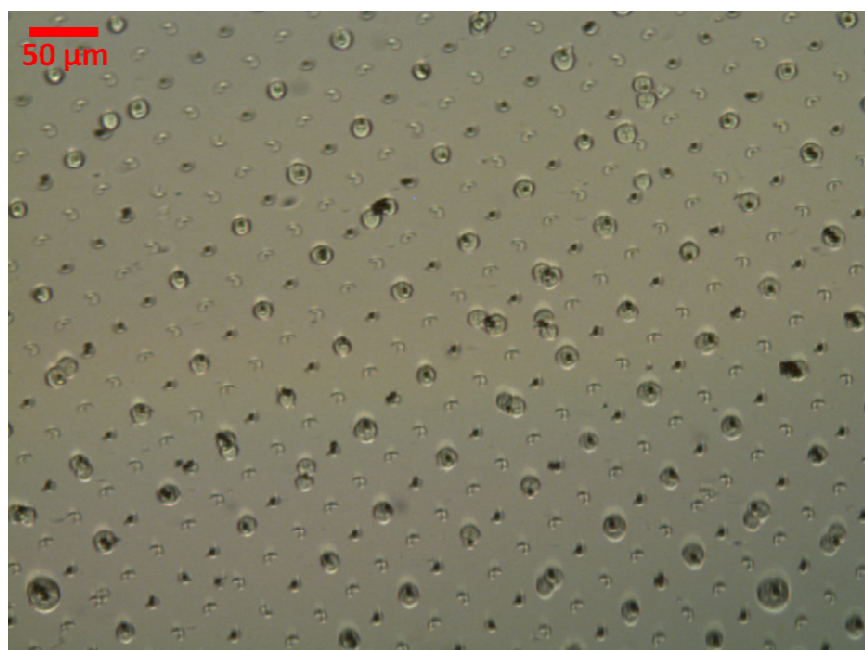


Figure 28: Cellules Ovar capturées sur un réseau de particules. Comme attendu, on voit qu'une particule sur deux seulement a capturé une cellule Ovar. Les particules qui n'ont pas capturé des cellules Ovar sont fonctionnalisées pour capturer Jurkat.

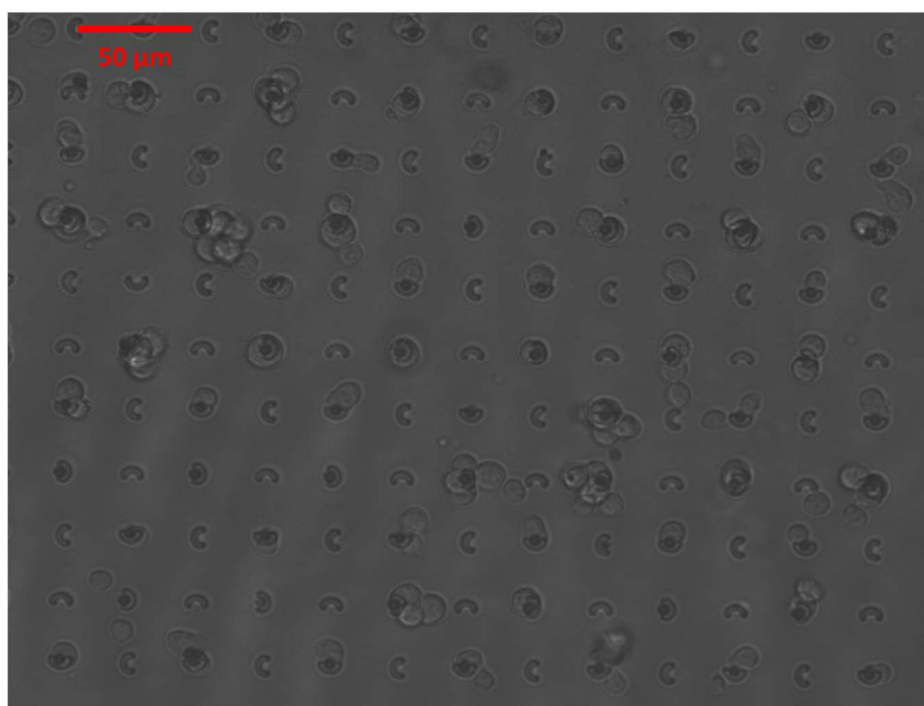


Figure 29 : Surface après la capture des cellules Jurkat et Ovar.

Comme on peut le constater sur la figure 28, la sélectivité de capture est très bonne. Les cellules ne sont pas capturées par une bille qui n'a pas la bonne fonctionnalisation.

Les cellules n'expriment pas toujours avec la même intensité l'antigène spécifique qui sert ensuite pour sa capture sur une particule. Il est possible d'estimer cette expression par analyse FACS.^j On donne ci-après une évaluation de l'expression de la protéine EpCAM par les cellules Ovar, qui sont capturées avec une grande efficacité par les billes « Epithelial Enrich », et par les cellules Jurkat qui ne l'expriment pas du tout, et ne sont donc pas capturées par ces billes.

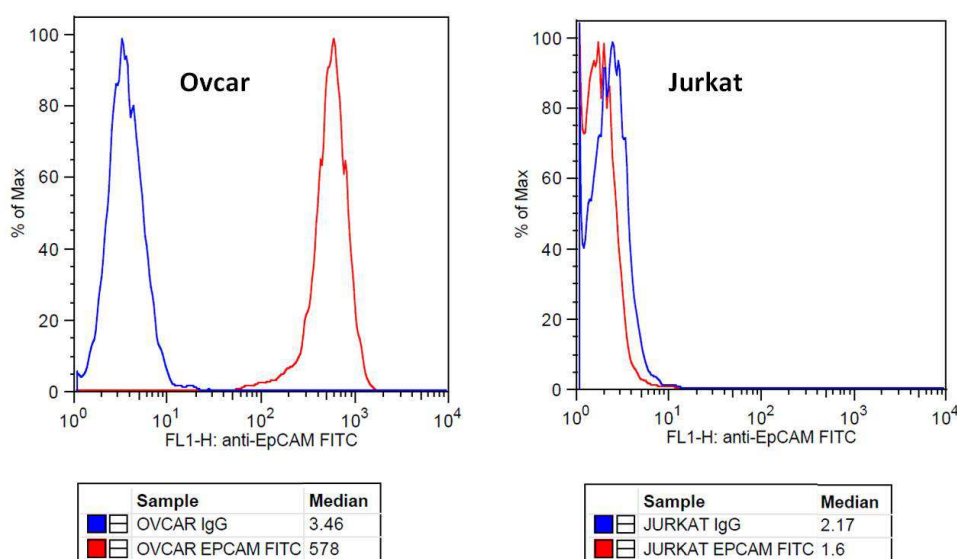


Figure 30: Résultats FACS permettant d'évaluer l'expression de la protéine EpCAM à la surface de cellules Ovar et Jurkat. Le pic d'intensité de fluorescence bleu est le témoin : il indique l'intensité de fluorescence émise par des anticorps qui s'adsorbent de façon non spécifique. Le pic rouge est l'intensité de fluorescence émise par des anticorps anti-EpCAM capturé spécifiquement par des antigènes de surface. Une forte intensité de fluorescence de ces anticorps (cas des Ovar) indique que beaucoup ont été capturés sur les cellules, qui expriment donc EpCAM. Une intensité du même ordre de que le témoin indique la non-expression d'EpCAM (cas des Jurkat).

Ce taux d'expression de l'antigène-cible modifie la probabilité de capture efficace et donc globalement le rendement.

Notons également que les étapes de séchage (à l'air comprimé et température ambiante) ne dégradent pas la fonctionnalité des anticorps. Le rendement de capture, très bon pour les cellules Ovar (de l'ordre de 100%), est cependant plus faible pour les Jurkat.

^j Fluorescence Activated Cell Sorting

Comme il est difficile de distinguer les deux types de cellules dans le visible, on donne ci-après des images en fluorescence des réseaux de cellules. Les cellules Ovar ont été marquées pour apparaître dans le bleu^k et les Jurkat dans le vert.^l

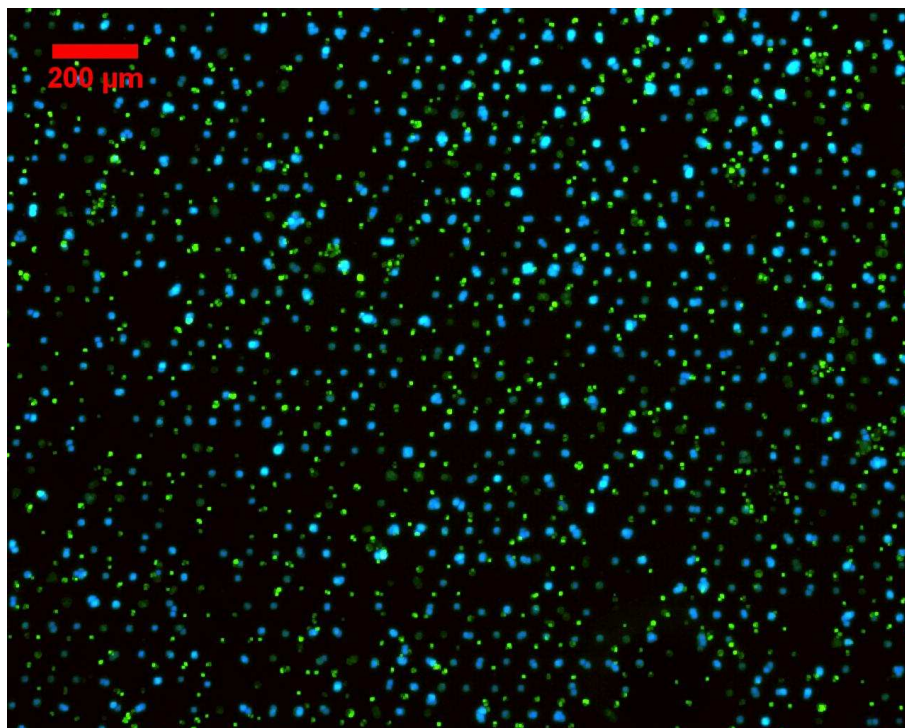


Figure 31: Réseau de cellules Jurkat et Ovar. La disposition des cellules sur ce réseau n'a rien de chaotique. On distingue nettement la répartition en hexagone.

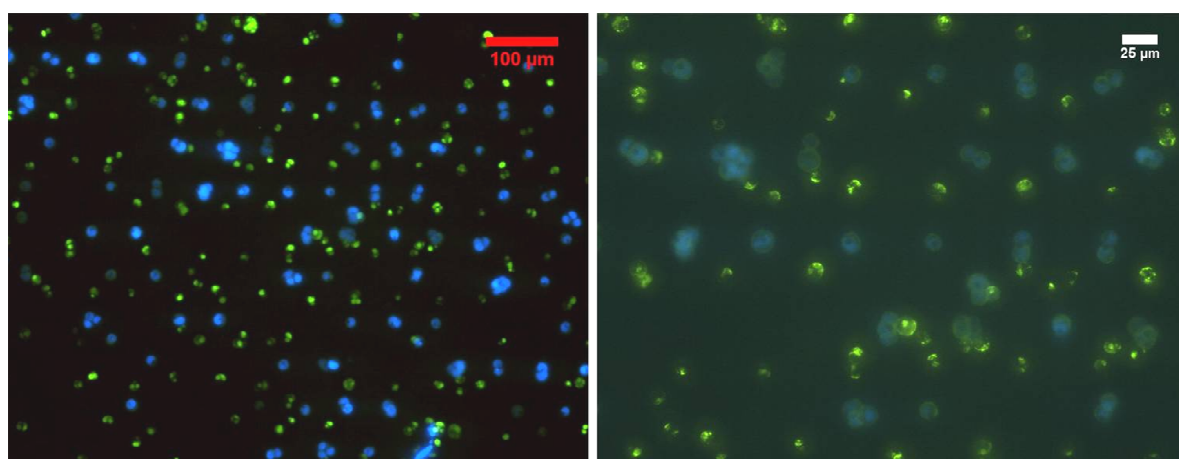


Figure 32: Même surface que précédemment avec des agrandissements.

^kMarquage au Hoechst 33342 trihydrochloridetrihydrate. 1μL/mL pendant 20 min, puis lavage par centrifugation (1000 tours/min, 92g).

^lMarquage à l'aide d'une solution de « Wheat germ agglutinine, Oregon Green® 488 conjugate » de Invitrogen à 1mg/mL. On ajoute 5μL/mL de cette solution dans la suspension de cellules. Après 20 min, lavage par centrifugation (1000 tours/min, 92g).

On distingue sur ces photos la structure hexagonale formée par les motifs de même orientation. On a construit deux réseaux imbriqués, respectivement de cellules Ovar et de cellules Jurkat. La figure suivante présente des images séparées de chaque réseau et leur transformée de Fourier.^m On constate qu'on a bel et bien deux réseaux réguliers hexagonaux de cellules.

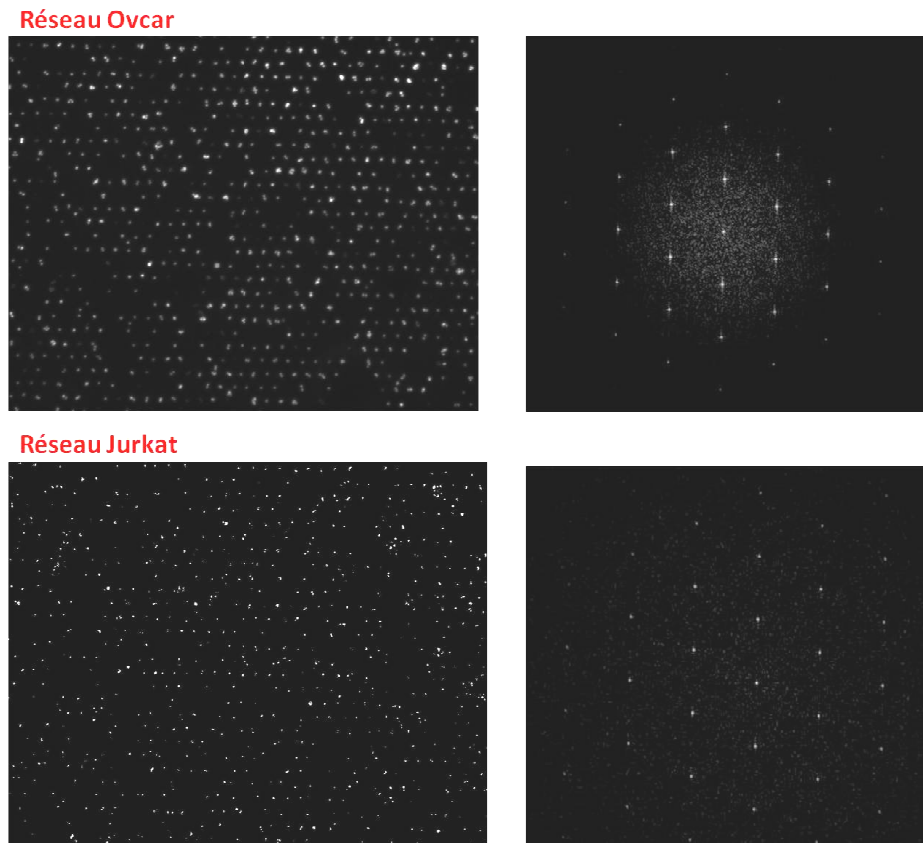


Figure 33: Images noir et blanc des réseaux de cellules Ovar (en haut) et Jurkat (en bas), considérées séparément en isolant l'émission de l'un ou l'autre type de cellules. On donne à chaque fois la transformée de Fourier qui met en évidence le caractère hexagonal et régulier du réseau.

Il semble que le rendement de capture puisse encore être amélioré. Pour ce faire, une solution simple, si l'on souhaite capturer un type précis de cellule, serait d'employer des assemblages de billes multiples pour accroître la surface et la probabilité d'adhésion.

e) Conclusion

Les techniques d'assemblage capillaire employées pour réaliser des assemblages d'un seul type de particules peuvent être adaptées pour réaliser des structures complexes constituées de plusieurs types de particules. Si ces particules sont fonctionnalisées par des anticorps, Il est possible de réaliser

^m Fast Fourier Transform (FFT) calculée sous ImageJ.

des structures 2D constituées de différents types de cellules. Ces structures peuvent être intégrées dans un système microfluidique, ce qui permet d'envisager un grand nombre d'études biologiques, portant par exemple sur les interactions cellulaires à l'échelle de la cellule unique. Un grand nombre de cellules peuvent être isolées par cette technique pour être étudiées individuellement (hybridation in situ en fluorescence, immunologie etc.). Le procédé développé dans ce chapitre pourrait aussi être appliqué à la capture directe de protéines en suspension.

IV. Intégration de colonnes magnétiques auto-assemblées : Application à la fabrication de microcapteurs de force.

Ce travail a été réalisé avec Jonathan Lee-Tin-Wah, sous la direction de Pascal Martin et Laurent Malaquin (Institut Curie UMR168).

1. Introduction

Nous avons vu que lorsqu'une suspension de particules magnétiques est placée dans un champ magnétique, les particules s'aimantent, créent elles-mêmes un champ, et s'organisent en colonnes en s'attirant par leurs pôles. Ces colonnes s'arrangent spontanément en réseau hexagonal mais si la surface présente localement des motifs magnétiques, par exemple des particules piégées dans des cavités, il est possible de contraindre la croissance et l'immobilisation de ces colonnes au-dessus de ces zones (voir chapitre II). Ces colonnes ont diverses applications, pour la capture de cellules par exemple. Puisqu'il est possible de placer précisément une colonne et de capturer avec elle ce que l'on souhaite, il serait tentant de vouloir s'en servir comme outil. C'est ce que nous avons cherché à faire dans le projet que nous allons présenter. L'idée consiste à intégrer des colonnes de billes magnétiques micrométriques comme capteurs de force.

Tout comme l'aimantation, les interactions entre les billes constituant une même colonne varient avec le champ magnétique appliqué, or on peut raisonnablement supposer que la raideur des colonnes fixées à une extrémité dépend des interactions entre les particules les composant. Ainsi la raideur des colonnes apparaît comme une fonction du champ magnétique et donc comme une caractéristique modifiable expérimentalement.

Soumise à une force latérale, une colonne s'inclinera d'un angle qui dépend de sa raideur (et donc du champ), de la force appliquée et de son point d'application. Si l'on connaît sa raideur et si l'on mesure la déflexion de la colonne, on peut en déduire une estimation de la force appliquée.

Une telle colonne pourrait constituer un capteur de force de rigidité variable, celle-ci pouvant être réglée en modifiant le champ magnétique.

2. Applications

Nous aimerions pouvoir nous servir de cette colonne pour mesurer les forces exercées par des moteurs moléculaires, par exemple des myosines.^{147,148} Supposons qu'un filament d'actine (le partenaire naturel de la myosine) soit fixé en un point de la colonne et mis en contact avec un tapis de myosines adsorbées sur un piédestal. Les moteurs vont alors exercer une traction sur le filament et donc sur la colonne : compte tenu du point de fixation et de la raideur de la colonne, nous pouvons déduire la valeur de la force exercée en observant l'amplitude de la déflexion.

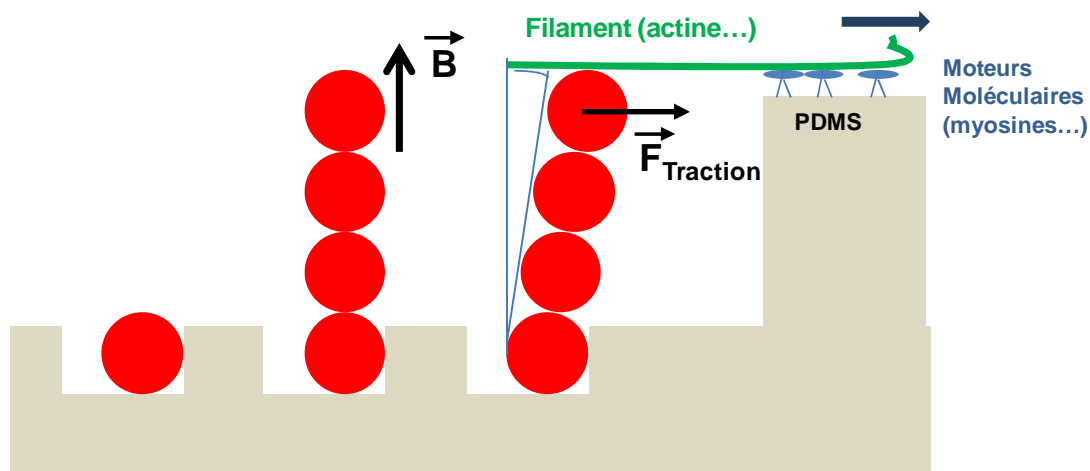


Figure 1 : Principe de la mesure de force en utilisant des colonnes magnétiques

Ce dispositif permettrait de caractériser les propriétés mécaniques des moteurs moléculaires et d'étudier les phénomènes oscillatoires que ceux-ci génèrent.^{149,150} Ces phénomènes oscillatoires, entre autre, joueraient un rôle important dans l'amplification des sons au sein de l'oreille interne. Les moteurs moléculaires de type myosine exercent des forces typiques de 1-3 pN chacun.¹⁵¹ Le nombre de moteurs moléculaires qui agissent sur un filament d'actine dépend de sa longueur. Typiquement, il est possible de faire interagir quelques dizaines de moteurs moléculaires avec un filament d'actine, produisant une force de l'ordre de la centaine de pN.

3. Notions de mécanique : raideur et raideur de pivot

Introduisons à présent quelques notions de physique nécessaires.

La raideur relie la force exercée sur un système en un point à la déflexion produite en ce point. Cette déflexion peut être l'extension d'un ressort, la flexion ou la rotation d'une poutre...

On la définit ainsi :

$$K = \frac{F}{\epsilon}$$

Équation 1

Où K est la raideur, F la force appliquée et ϵ la déflexion.

On donne sur la figure suivante un exemple de poutre défléchie.

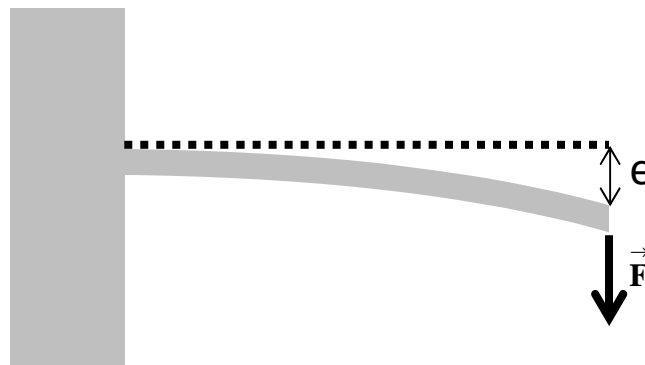


Figure 2 : poutre défléchie

La raideur n'est pas la même selon le point d'application de la force. Elle est plus élevée près de la base qu'à l'extrémité.

Une poutre rigide a, par définition, une raideur infinie. Cependant si elle pivote sur sa base sous l'action d'une force on peut définir une « raideur (ou rigidité) » de pivot de la même manière. Cette raideur mesurera la difficulté à faire pivoter le barreau (voir figure 3).

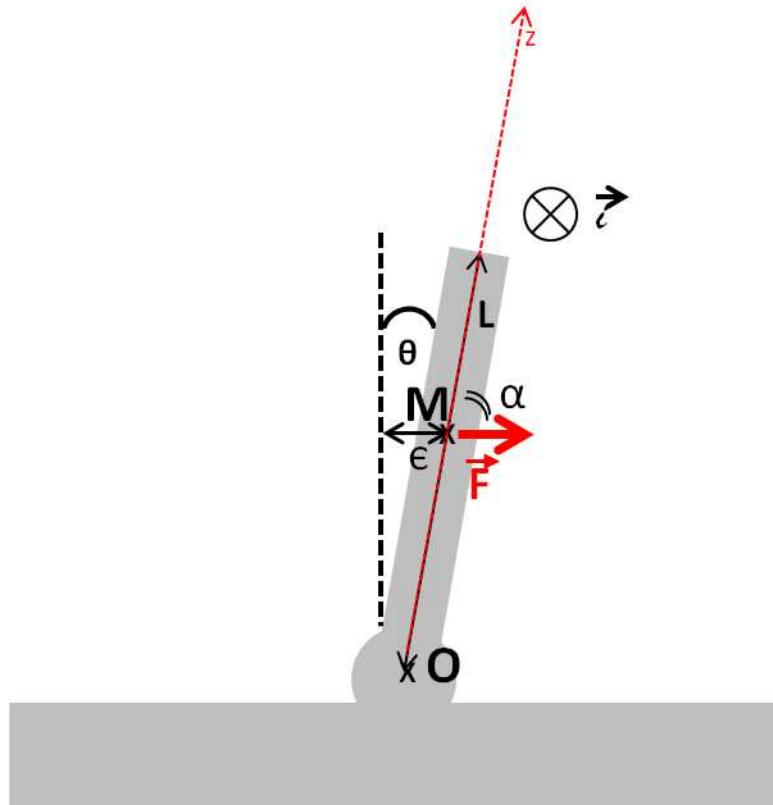


Figure 3 : poutre rigide sur un pivot.

Soit une poutre rigide de longueur totale L . On a, lorsqu'on exerce une force \vec{F} en un point M de la poutre de coordonnées (z, θ) , l'apparition d'un moment \vec{C} tel que :

$$\vec{C} = \overrightarrow{OM} \wedge \vec{F}$$

Équation 2

A l'équilibre, ce moment est contrebalancé par le moment qui s'oppose à la rotation, $\vec{\Gamma}$. Si l'on suppose que ce dernier moment $\vec{\Gamma}$ est proportionnel, au moins aux petits angles, à l'angle de rotation on a :

$$\vec{\Gamma} = K_p \theta \vec{t}$$

Équation 3

Puisque nous sommes dans le cas idéal d'un pivot, qui tourne d'un certain angle θ , la position du point d'application n'intervient nullement, K_p est donc indépendant du point d'application. On nommera K_p : la **rigidité ou raideur de pivot**.

D'où en norme:

$$zF \sin \alpha = K_p \theta$$

Équation 4

Où z est la distance OM du pivot au point d'application.

Or aux petits angles :

$$\sin \alpha = \cos \theta \approx 1$$

Équation 5

et:

$$\theta = \frac{\epsilon}{z}$$

Équation 6

On a donc :

$$K_p = \frac{z^2 F}{\epsilon} = z^2 K$$

Équation 7

On peut donc définir, pour une poutre rigide qui tourne sur un pivot, une raideur apparente K .

Pour une poutre rigide, si le couple est proportionnel à l'angle de rotation, K varie comme $\frac{1}{z^2}$

4. Observation de la courbure de la colonne

Nous avons voulu observer la forme prise par une colonne magnétique lorsqu'elle subit une force. Le dispositif expérimental que nous avons développé pour étudier le comportement des colonnes magnétiques est décrit sur la figure 4. Ce dispositif est adapté pour observer les colonnes latéralement.

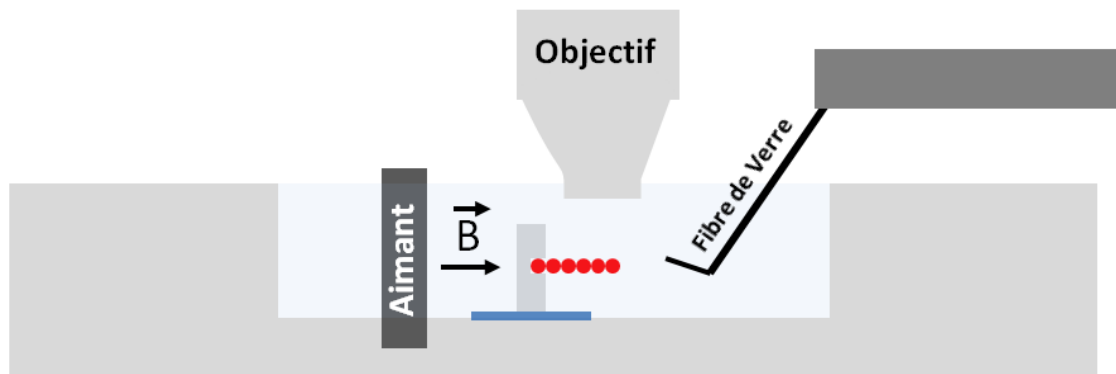


Figure 4 : Schéma du dispositif permettant d'observer les colonnes latéralement.

Pour ce faire, comme illustré sur la figure 4, on a disposé verticalement un substrat de PDMS présentant des cavités contenant des billes magnétiques sur une lame de verre. La figure suivante présente un exemple de substrat employé pour cette expérience. Dans des cavités circulaires de $6\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre et de 2 à $3\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur, des billes magnétiques de $4,5\text{ }\mu\text{m}$ ont été déposées par assemblage capillaire.

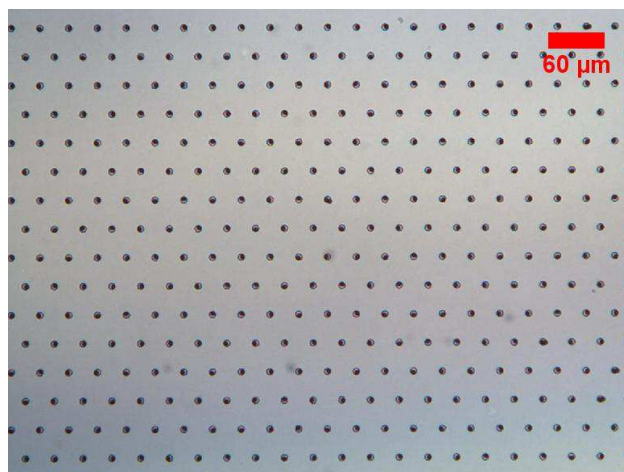


Figure 5 : Un réseau de cavités sur du PDMS. Chaque cavité contient une bille magnétique de $4,5\text{ }\mu\text{m}$ (Dynabeads®, Invitrogen). On crée un réseau de colonnes à partir d'un tel substrat.

L'ensemble est plongé dans un bain d'eau déionisée parallèlement à un aimant permanent. Quelques gouttes de suspension de particules magnétiques de $4,5\ \mu\text{m}$ sont déposées au niveau des motifs. Les colonnes se forment horizontalement sous l'effet du champ.

On donne sur la figure suivante la courbe d'aimantation¹¹⁵ de ces particules.

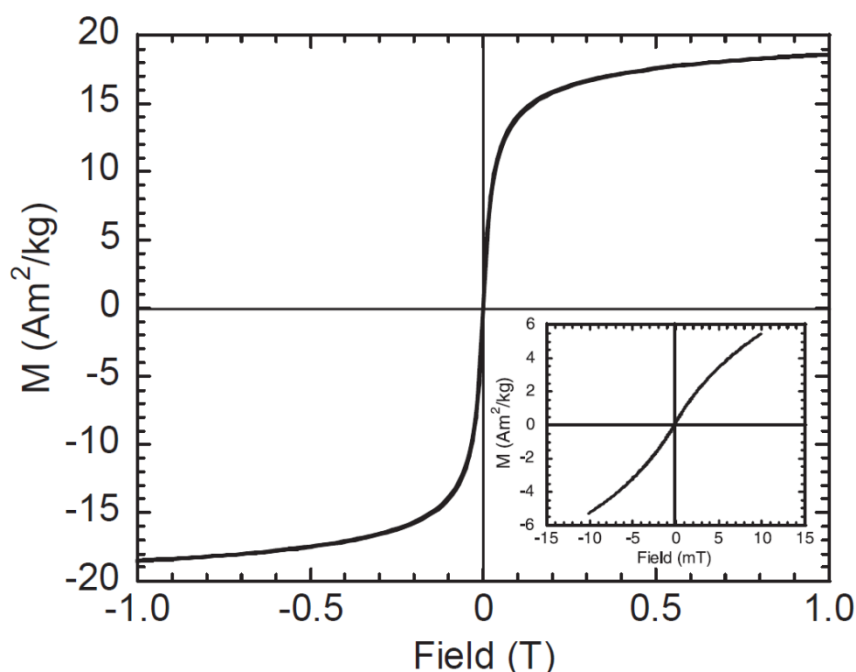


Figure 6: Courbe d'aimantation typique des Dynabeads de $4,5\ \mu\text{m}$.¹¹⁵

Le champ magnétique peut varier considérablement selon la distance aimant/motifs, d'une centaine de Gauss à plus de 1000 Gauss. Un objectif à immersion à eau permet l'observation des colonnes par le dessus du système (voir figure 4). Une fibre de verre courbée et montée sur platine micrométrique permet également d'exercer une poussée sur la colonne (figure 4 et figure 7.A.). On donne sur la figure 7 une image de la colonne ainsi obtenue. Cette fibre peut aussi être remplacée par une micropipette qui est utilisée en aspiration pour manipuler une bille et se fixer ainsi à la colonne (voir figure 7.B.). Dans cette expérience, le champ magnétique mesuré (variable selon la zone étudiée) était seulement compris entre 300 et 500 G, compte tenu de l'éloignement important entre l'aimant et la colonne.

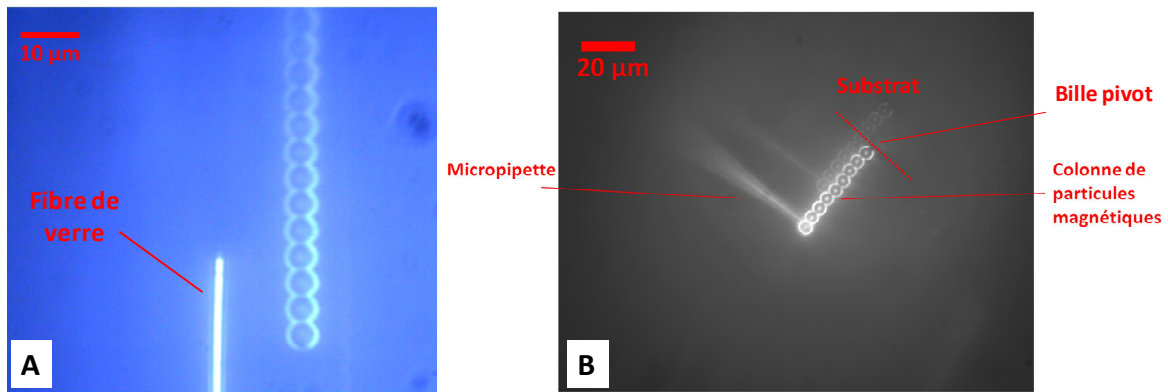


Figure 7: A droite : A. Colonne de côté. En bas à gauche, une fibre de verre. B. A gauche, stimulation de la colonne avec une micropipette. On aperçoit en arrière plan le reflet de la pipette et de la colonne. On a indiqué en pointillé la position du substrat (qui n'est pas visible sur cette image). La bille pivot est la bille fixe sur laquelle la colonne s'est construite.

Grâce à ce dispositif le mouvement de la colonne a pu être observé dans différentes conditions. Nous avons pu constater qualitativement que la colonne se comporte comme un barreau rigide qui pivote autour de la bille d'ancrage (on ne distingue pas de courbure) pour de petites déflexions.

5. Modèle

Nous avons vu que la colonne se comporte comme un barreau rigide qui pivote, du moins aux petites perturbations. Notre travail ayant porté sur des fluctuations thermiques extrêmement faibles, les modèles de comportement envisagés ont tous considéré la colonne comme un barreau rigide qui tourne sur un pivot.

a) Organisation des dipôles

Une colonne magnétique est composée de billes magnétiques sphériques aimantées. Elles se comportent comme des dipôles. Les dipôles magnétiques minimisent leur énergie potentielle en s'alignant avec le champ ambiant. Conséquemment ces dipôles magnétiques réagissent avec le champ extérieur imposé, et tendent à s'aligner avec celui-ci. Cependant, ces dipôles engendrent aussi un champ magnétique auxquels les autres dipôles vont réagir.

Deux cas de figures limites sont possibles :

- Les moments magnétiques sont alignés entre eux : l'interaction dipôle-dipôle prime sur l'interaction avec le champ extérieur.
- Les moments magnétiques sont alignés avec le champ : l'interaction avec le champ extérieur prime sur l'interaction dipôle-dipôle.

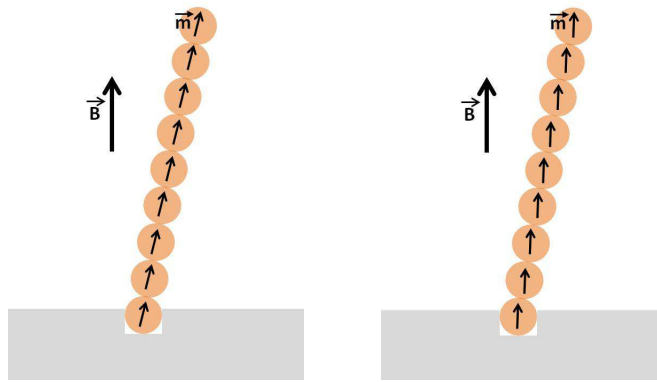


Figure 8 : Deux modèles décrivant le comportement des moments magnétiques au sein d'une colonne sous champ.

Le comportement dans les deux cas de figure ne sera pas le même en terme de raideur.

Pour trancher entre ces deux cas de figure, il convient de comparer les couples exercés sur un dipôle par le champ extérieur imposé et par le champ des autres dipôles.

A priori le comportement choisi dépend des propriétés magnétiques des billes. Nous avons travaillées sont des billes superparamagnétiques obtenues chez Lifetechnologie (Invitrogen). Ce sont des Dynabeads® de 4,5 μm de diamètre recouvertes de protéines. Les billes sont en polystyrènes et sont poreuses. Les pores renferment des microparticules d'oxyde de fer (Maghémite) présentant chacune une aimantation permanente. Il est important de remarquer que ces microparticules sont libres de se mouvoir dans les pores (plus grands). En l'absence d'un champ extérieur, l'orientation des particules est aléatoire et l'aimantation totale de la bille est donc nulle. En présence d'un champ extérieur, les particules magnétiques s'orientent dans le champ et la bille acquiert alors une aimantation. On donne ci-dessous leur propriétés¹¹⁵ :

Aimantation à saturation ($\text{A.m}^2.\text{kg}^{-1}$)	19,6
Densité	1,6
Masse (ng)	$7,6.10^{-2}$
Moment magnétique à saturation (A.m^2)	$1,5.10^{-12}$

Le couple exercé par un champ magnétique \vec{B} sur un moment magnétique \vec{m} vaut :

$$\vec{\Gamma} = \vec{m} \wedge \vec{B}$$

Équation 8

Pour un champ extérieur de 1000 Gauss (0,1 T) on obtient donc un couple typique de:

$$\|\vec{\Gamma}\| = 0,9.10^{-13} \text{ N.m}$$

L'aimantation valant alors environ 12 $\text{A.m}^2.\text{kg}^{-1}$.

Cela est très supérieur aux énergies mises en jeu par l'agitation thermique :

$$\|\vec{\Gamma}\| = 2,25.10^7 k_b T$$

Où k_b est la constante de Boltzmann. Les moments magnétiques ne ressentent donc que très faiblement les effets du mouvement Brownien.

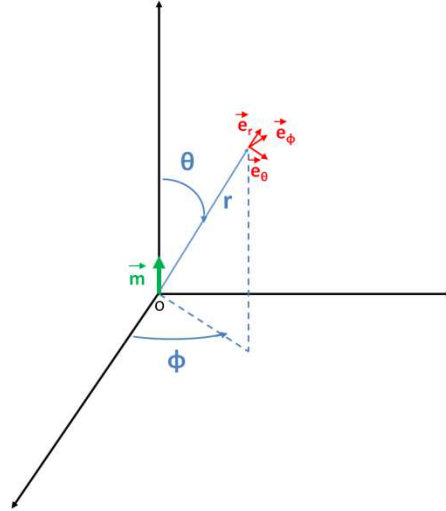


Figure 9 : Les coordonnées sphériques. Un moment magnétique \vec{m} est placé à l'origine

En coordonnée sphérique (voir figure 9), le champ \vec{B}_{dd} créé par un dipôle magnétique de moment \vec{m} en un point M (r, θ, Φ) est lui de la forme :

$$\vec{B}_{dd} = \frac{\mu_0 m}{4\pi r^3} [2\cos\theta \vec{e}_r + \sin\theta \vec{e}_\theta]$$

Équation 9

Deux billes aimantées identiques qui se touchent sont équivalentes à 2 dipôles magnétiques espacés de la distance d égale au diamètre des billes.

D'où un ordre de grandeur du couple maximal exercé $\vec{\Gamma}_{bb}$ par l'une sur l'autre (à saturation) :

$$\|\vec{\Gamma}_{dd}\| \approx \left\| \frac{\mu_0 m^2}{2\pi d^3} \right\| = 4,9.10^{-15} N.m = 1,25.10^6 k_b T$$

Le couple exercé par le champ extérieur est donc, à 1000 G, au moins 20 fois supérieur à celui exercé par les dipôles voisins. Les dipôles sont donc alignés avec le champ.

b) Raideur de la colonne

Considérons la première bille au sommet d'une colonne de longueur L faisant un angle θ avec la verticale. Cette colonne est constituée de N billes. Les dipôles magnétiques sont alignés avec le champ extérieur vertical \vec{B} . Le dipôle que constitue la première bille subit aussi le champ des autres

dipôles. D'où une force qui tend à réaligner les dipôles entre eux, et par conséquent la colonne avec la verticale.

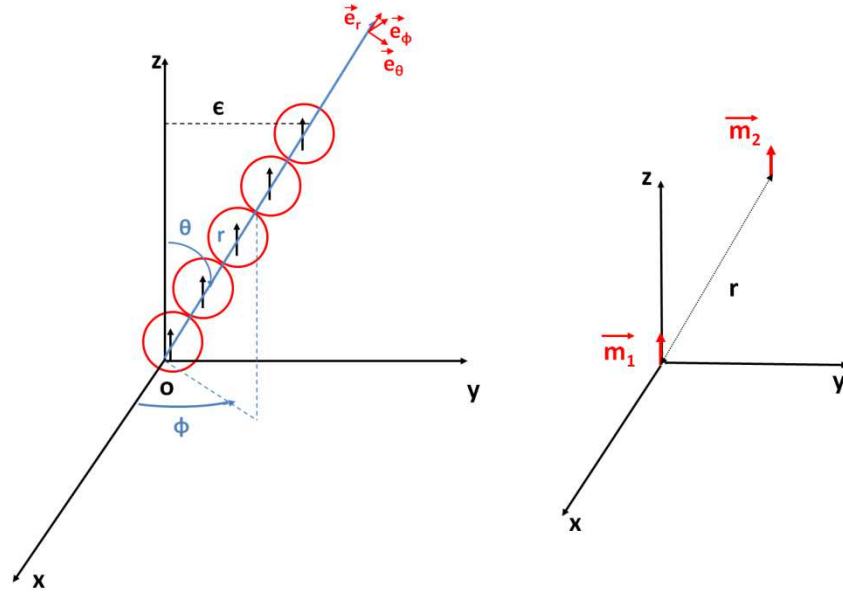


Figure 10: A gauche: colonne de N billes. Nous considérons la bille du sommet comme la première bille et la bille en contact avec le substrat comme la dernière. A droite : schéma de base pour le calcul de la force que \vec{m}_1 exerce sur \vec{m}_2 .

La force que fait subir le champ \vec{B}_{12} créé par le dipôle \vec{m}_1 d'une bille de la colonne sur une autre bille de moment \vec{m}_2 est égale à :

$$\vec{F}_{12} = \vec{\nabla}(\vec{m}_2 \cdot \vec{B}_{12})$$

Équation 10

On a pour \vec{m}_2 la relation suivante :

$$\vec{m}_2 = m_2(\cos\theta \vec{e}_r - \sin\theta \vec{e}_\theta)$$

Équation 11

D'où en utilisant l'équation 9 pour \vec{B}_{12} :

$$\vec{m}_2 \cdot \vec{B}_{12} = \frac{\mu_0 m_1 m_2}{8\pi r^3} (3\cos 2\theta + 1)$$

Équation 12

Et :

$$\vec{F} = \vec{\nabla}(\vec{m}_2 \cdot \vec{B}_{12}) = -\frac{3\mu_0 m_1 m_2}{8\pi r^4} [(3\cos 2\theta + 1)\vec{e}_r + 2\sin 2\theta \vec{e}_\theta]$$

Équation 13

Seule la composante de la force selon \vec{e}_θ nous intéresse. C'est elle qui tend à ramener la colonne à la verticale. La composante selon \vec{e}_r est, elle, compensée par la réaction solide/solide des billes entre elles. On a donc:

$$F_\theta = -\frac{3\mu_o m_1 m_2}{4\pi r^4} \sin 2\theta$$

Équation 14

Si nous supposons que les moments magnétiques au sein d'une colonne sont en première approximation égaux et de valeur \vec{m} , ce qui revient à négliger les effets de bord, on a :

$$F_\theta = -\frac{3\mu_o m^2}{4\pi r^4} \sin 2\theta$$

Équation 15

La force que le moment magnétique de la seconde bille exerce sur la première est donc égale (puisque celle-ci est située à une distance d, égale au diamètre) à :

$$F_\theta = -\frac{3\mu_o m^2}{4\pi d^4} \sin 2\theta$$

Équation 16

Considérons à présent la force \vec{F}_n exercée sur la première bille au sommet de la colonne par le nième voisin situé à la distance nd. On a selon \vec{e}_θ :

$$F_n^\theta = -\frac{3\mu_o m^2}{4\pi (nd)^4} \sin 2\theta$$

Équation 17

D'où la force magnétique totale qui s'exerce sur la première bille :

$$F_{Tot}^\theta = -\sum_1^{N-1} \left(\frac{1}{n^4} \right) \left[\frac{3\mu_o m^2}{4\pi d^4} \sin 2\theta \right]$$

Équation 18

Remarquons que $\sum_1^{N-1} \frac{1}{n^4}$ est une suite très rapidement convergente vers :

$$\zeta(4) = \sum_1^{\infty} \frac{1}{n^4} = \frac{\pi^4}{90} \sim 1,08$$

Équation 19

Aux petits angles, $\sin\theta \approx \theta$, d'où :

$$K = \left\| \frac{F_{Tot}^\theta}{\varepsilon} \right\| = \varsigma(4) \frac{3\mu_0 m^2}{2\pi d^4 L}$$

Équation 20

Car $\theta \sim \frac{\varepsilon}{L}$.

K est la rigidité mesurée sur la **première bille, au sommet de la colonne**.

On s'attend donc à une variation (avec la hauteur L) de la rigidité mesurée au sommet en $\frac{1}{L}$. Lorsque l'on mesure la rigidité, non sur la dernière bille, mais au sein de la colonne, on s'attend à ce que cette rigidité décroisse en z^2 si **effectivement la colonne se comporte comme un barreau rigide** qui pivote sur la bille fixe en surface.

6. Matériel et méthode

Une étude des propriétés des colonnes magnétiques s'impose. En particulier on regardera :

- La raideur de la colonne en fonction du champ exercée.
- La raideur de la colonne sur sa hauteur.
- La raideur de différentes colonnes de hauteurs variables

a) Principe de la mesure

Afin de mesurer la raideur de la colonne, on se propose de visualiser ses fluctuations latérales vue de haut (figure 11). A priori, si l'on n'impose pas de force à la colonne, elle n'est soumise qu'au seul mouvement brownien.

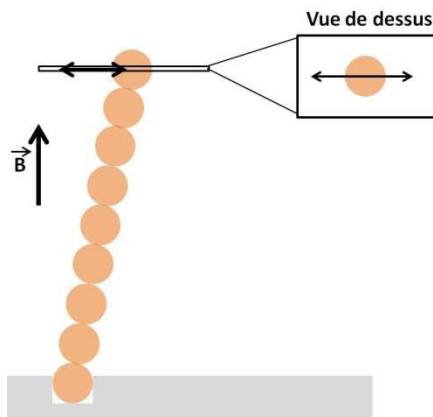


Figure 11 : Schéma de colonne magnétique qui fluctue. On observe les fluctuations vue de dessus.

Connaissant la température, il est alors possible de déduire de l'amplitude des fluctuations $X(t)$ la raideur de la colonne.¹⁵²

En effet si la colonne est en équilibre thermique avec le milieu environnant, on peut déduire une estimation de K du théorème d'équipartition de l'énergie :

$$\frac{1}{2}K \langle X(t)^2 \rangle = \frac{1}{2}k_b T \Leftrightarrow K = \frac{k_b T}{\langle X(t)^2 \rangle}$$

Équation 21

Où $\langle X(t)^2 \rangle$ est la moyenne quadratique des fluctuations, k_b la constante de Boltzmann, T la température et K la raideur de la colonne.

Un calcul plus précis de K est possible en résolvant l'équation de Langevin appliquée au cas de la colonne.^{149,153}

On a :

$$0 = -KX(t) - \varsigma \frac{dX(t)}{dt} + \eta(t)$$

Équation 22

Où ς est un coefficient de friction et $\eta(t)$ une force aléatoire représentée par un bruit blanc pour rendre compte du mouvement brownien. $\varsigma \frac{dX(t)}{dt}$ représente une force de frottement fluide qui s'exerce sur la colonne. En passant dans l'espace de Fourier, on obtient :

$$\tilde{X}(\omega) = \frac{\tilde{\eta}(\omega)}{K + i\omega\varsigma}$$

Équation 23

En prenant le carré du module de \tilde{X} et en appliquant le théorème fluctuation dissipation qui relie le module de $\tilde{\eta}$ à ς On obtient le spectre de puissance des fluctuations :

$$\tilde{C}(\omega) = \frac{|\tilde{X}(\omega)|^2}{T_{exp}} = \frac{2k_b T \varsigma}{K^2 + \omega^2 \varsigma^2}$$

Équation 24

Si on ajuste le spectre de puissance des fluctuations mesurées expérimentalement avec une Lorentzienne de la forme $f(\omega) = \frac{A}{1+(\frac{\omega}{\omega_c})^2}$ On peut extraire de A et ω_c la raideur de la colonne.

$$K = \frac{2k_b T}{A\omega_c}$$

Équation 25

b) Technique de mesure

Pour procéder aux mesures de fluctuations, un dispositif expérimental différent de celui présenté au 4. a été employé. Ce dispositif expérimental,¹⁵⁴ élaboré dans l'équipe de P. Martin (Institut Curie, Laboratoire Physico-Chimie Curie), a permis de mesurer les fluctuations de faibles amplitudes d'une colonne magnétique vue du sommet.

On en donne un schéma sur la figure suivante.

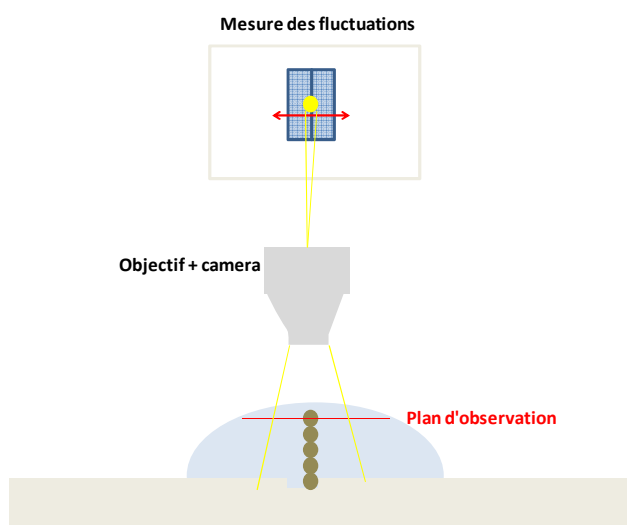


Figure 12 : Schéma du montage expérimental employé pour la mesure des fluctuations des colonnes magnétiques.

Le système est constitué d'un microscope optique droit qui utilise une diode photoélectrique à deux cadrans comme détecteur. L'image du plan équatorial d'une bille est projetée sur la diode, en partie sur chaque cadran. On mesure la différence de tension aux bornes de ces deux cadrans pour connaître la position de la bille. Lorsque les deux cadrans reçoivent la même intensité lumineuse, cette différence est nulle. Pour calibrer le signal des diodes, on impose des déplacements connus à la diode à l'aide d'un actionneur piézoélectrique afin de faire correspondre une variation de tension à un déplacement. On laisse ensuite la colonne fluctuer sous l'objectif en enregistrant les tensions. On en déduit la valeur des fluctuations, selon une direction (puisque nous n'avons que deux cadrans). Des courbes déplacement/temps obtenues est ensuite extrait le spectre de fréquence des fluctuations, dont l'ajustement par une Lorentzienne permet d'obtenir la raideur (voir 6.a) et figure 13). Un exemple de courbe est donné sur la figure 13. On peut y distinguer deux zones : un plateau aux basses fréquences et une partie décroissante aux hautes fréquences. Le point à laquelle la puissance des fluctuations vaut la moitié de la puissance maximale (au plateau) correspond à la fréquence de coupure nécessaire pour calculer la raideur.

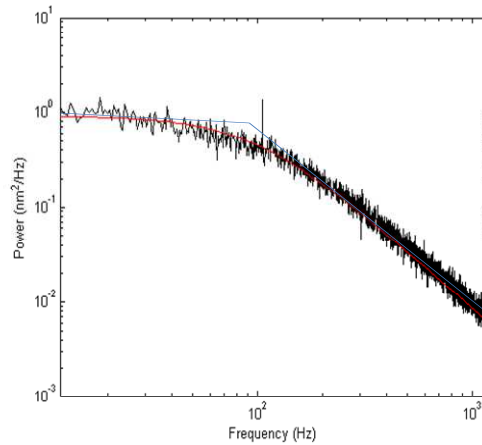


Figure 13: Spectre de puissance type.

Précisons que les valeurs obtenues avec cette méthode présente une relative variabilité et qu'il est nécessaire de multiplier les mesures pour obtenir un résultat fiable.

Une autre méthode de mesure utilise une caméra rapide qui filme les fluctuations de la colonne vue de haut. Bien que capable de filmer à des fréquences très élevées, la qualité des images obtenues, compte tenu du matériel à notre disposition, nous a fait préférer l'emploi de la diode pour la mesure des fluctuations.

c) Champ magnétique et création de colonnes

On a procédé à de nombreuses mesures de raideur sur des colonnes de différentes hauteurs et en différents points de celles-ci. On a employé des substrats en PDMS présentant des cavités. Chaque cavité contient une unique bille magnétique fixe (Dynal) de $4,5\ \mu\text{m}$ de diamètre. Cet échantillon est posé sur le cœur métallique (Supra 50 – Arcelor Mittal) d'une bobine magnétique (courant typique 0,5-2 A). En réglant l'intensité qui circule dans la bobine, il est possible de faire varier le champ magnétique auquel les colonnes sont exposées. On obtient typiquement des champs de quelques centaines de Gauss (figure 14). Le champ magnétique dépend également de la distance de l'échantillon à la surface du cœur métallique.

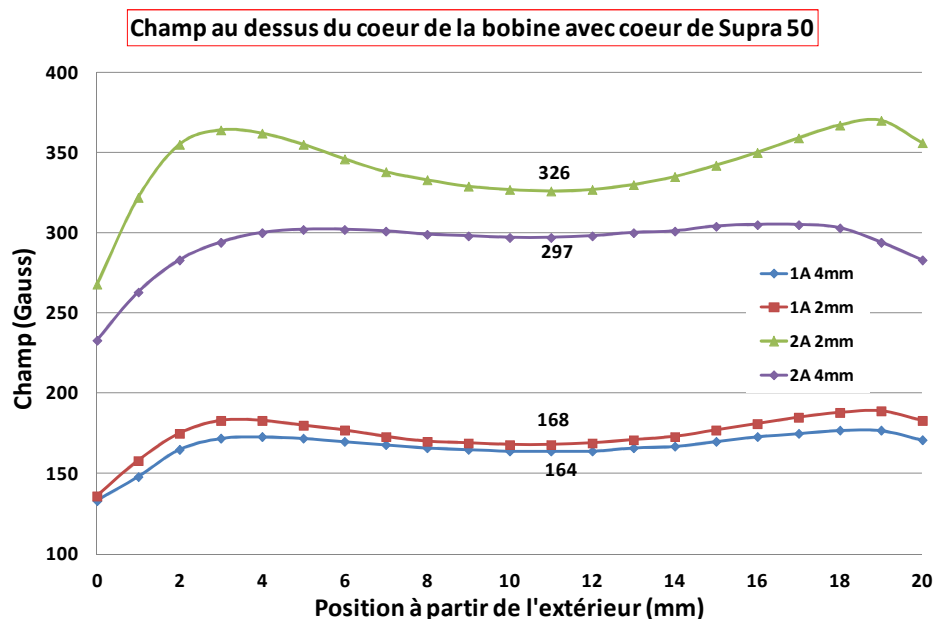


Figure 14 : Mesure du champ magnétique au-dessus du cœur magnétique de la bobine utilisée pour créer le champ magnétique et construire les colonnes. Le champ a été mesuré avec un teslamètre le long du diamètre du cœur à différentes hauteurs et pour différentes intensités de courant imposées.

Pour étudier des champs plus élevés, on remplace la bobine par un aimant permanent, ce qui permet d'atteindre des champs magnétiques de l'ordre de 1500 G.

Pour construire un réseau de colonnes, on dépose une goutte d'eau sur l'échantillon au niveau des billes magnétiques immobilisées dans les cavités. On plonge l'objectif dans cette goutte d'eau pour effectuer les observations. Puis, après avoir allumé le champ magnétique, on injecte dans cette goutte la suspension magnétique. Les colonnes se forment alors. La concentration en particules injectées doit rester faible, et il est préférable de l'ajuster peu à peu. En effet si on injecte trop de particules magnétiques, on verra la formation de colonnes très longues (dont les trop faibles rigidités sont difficiles à mesurer avec fiabilité sur ce setup) et de colonnes irrégulières, c'est-à-dire non constituées d'une simple ligne de billes, ce qui pose des problèmes en termes de reproductibilité.

7. Etude expérimentale de la raideur

On a procédé à deux types de mesures de raideur: au sein d'une même colonne et au sommet de plusieurs colonnes.

Nous tenons vivement à remercier Jonathan Lee-Tin-Wah qui a effectué une grande partie de ces mesures dans le cadre de sa thèse dans le groupe de Pascal Martin. L'analyse des résultats a également bénéficiée de discussions avec Jean Baudry,ⁿ Jean-François Joanny et Scott Atwell.^o Ces mesures ont toujours été effectuées au niveau du plan équatorial d'une bille, à une température de 25°C.

a) Au sein d'une même colonne

On procède à des mesures au sein d'une même colonne en partant de la bille du sommet et en descendant bille après bille le long de la colonne jusqu'à ce que les mesures ne soient plus possibles (raideur trop élevée impliquant de trop petites fluctuations). Dans ce cas, cela revient à fixer la longueur L de la colonne et à faire varier la hauteur z du point d'application de la force. Un résultat typique à environ 300 G est illustré sur la figure suivante. Comme on pouvait s'y attendre la raideur croît au fur et à mesure que l'on descend le long de la colonne.

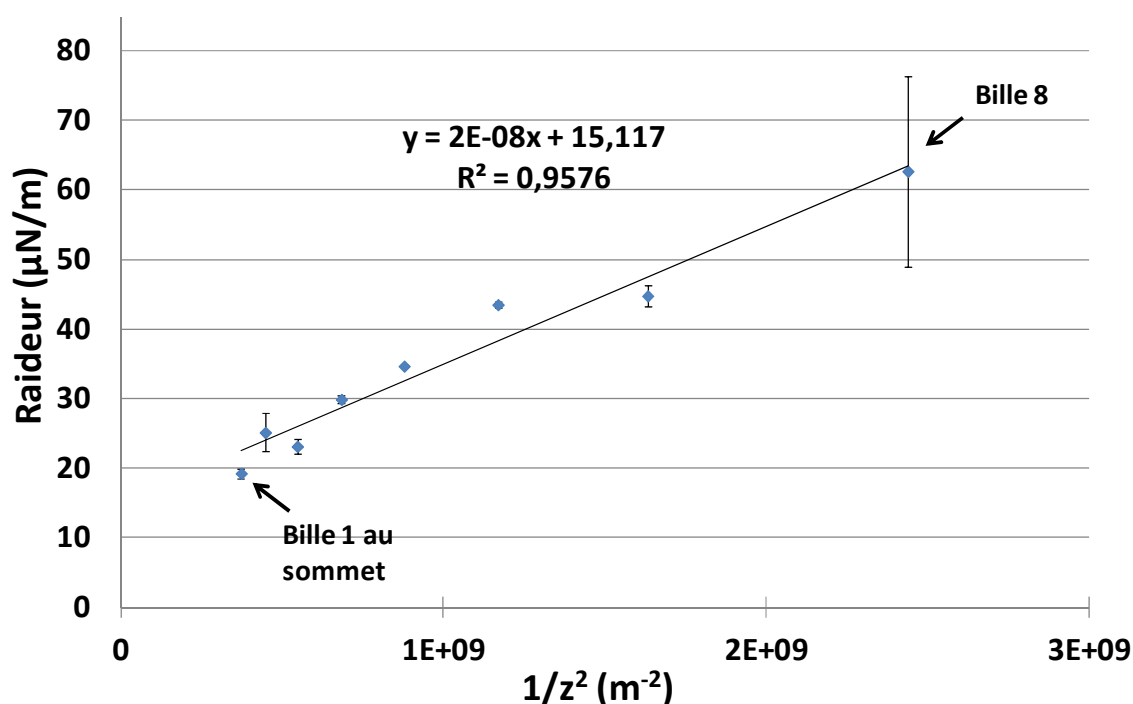


Figure 15 : Raideur en fonction de $\frac{1}{z^2}$ sur une colonne de 12 billes, de la bille 1 à la bille 8. On obtient une droite qui montre que la raideur évolue comme $\frac{1}{z^2}$.

La variation observée suit une loi en $\frac{1}{z^2}$. Ce qui tend à confirmer que la colonne se comporte comme un barreau rigide qui pivote autour de sa bille d'ancrage à la surface. En multipliant la raideur par z^2 ,

ⁿ Laboratoire Colloïdes et Matériaux divisés, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris.

^o Laboratoire Physico-Chimie Curie, Institut Curie.

on obtiendra donc la raideur de pivot K_p , constante pour une colonne donnée mais qui doit dépendre du champ magnétique.

b) Au sommet de plusieurs colonnes

On procède aussi à des mesures sur différentes colonnes de tailles variables L en se plaçant sur la première bille au sommet. Cette dernière méthode est plus simple du point de vue expérimental. Les images de la bille au sommet ne sont pas perturbées par les autres billes constituant la colonne, ce qui permet d'effectuer des mesures avec une meilleure résolution. Dans ce cas L n'est pas fixée mais on a $L=z$. Un résultat est donné sur la figure suivante. Conformément à la prédiction théorique donnée par l'équation 20, on constate effectivement que la raideur mesurée au sommet croît linéairement avec $\frac{1}{L}$ si l'on effectue des mesures sur des colonnes de plus en plus grandes. On donne ci-dessous un résultat obtenu à environ 300 Gauss.

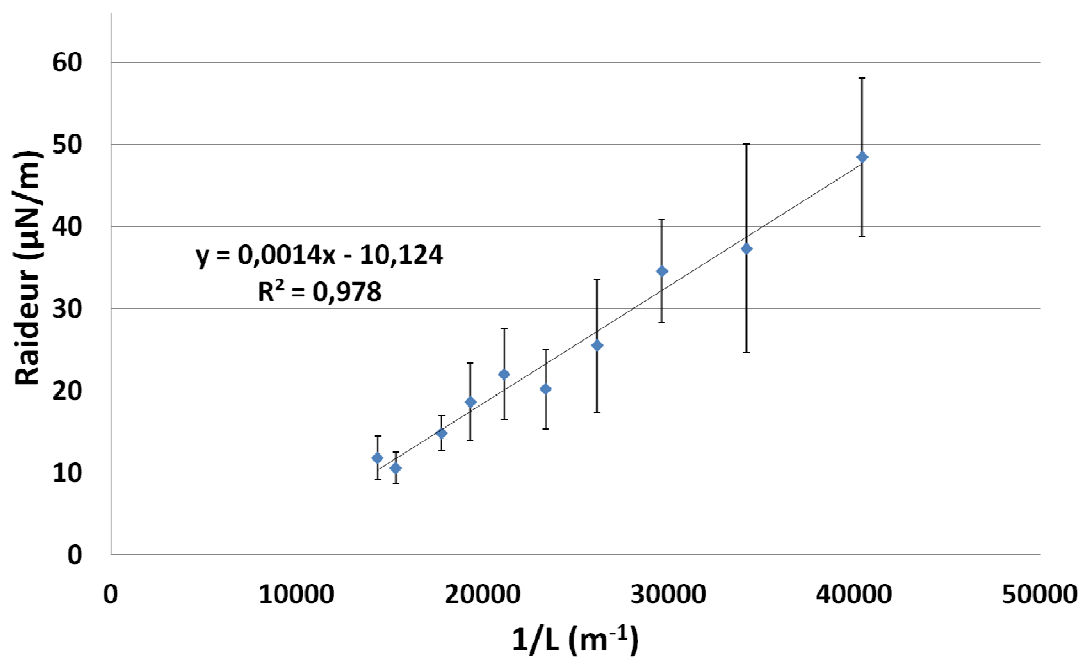


Figure 16 : Raideur en fonction de $\frac{1}{L}$. On obtient une droite qui montre que la raideur croît de manière inversement proportionnelle à la longueur de la colonne, du moins dans la gamme de tailles étudiées.

Puisque la raideur varie comme $\frac{1}{z^2}$ lorsque mesurée à longueur de colonne fixée le long d'une colonne et comme $\frac{1}{L}$ lorsque L varie avec $L=z$, on peut extraire de ces données une grandeur indépendante de la longueur totale de la colonne et du point d'application de la force en normalisant les résultats par $\frac{z^2}{L}$. Cette grandeur est la raideur de pivot divisée par la longueur de la colonne: $\frac{K_p}{L}$.

Nous pouvons à présent tracer cette grandeur en fonction du champ extérieur appliqué.

c) Variation de K_p/L en fonction du champ

On trace en fonction du champ la raideur de pivot par unité de longueur $\frac{K_p}{L}$, d'où peut-être déduite la raideur d'une colonne de longueur L à une hauteur z . Cette grandeur peut encore dépendre du champ, du rayon des particules, de leurs propriétés magnétiques...

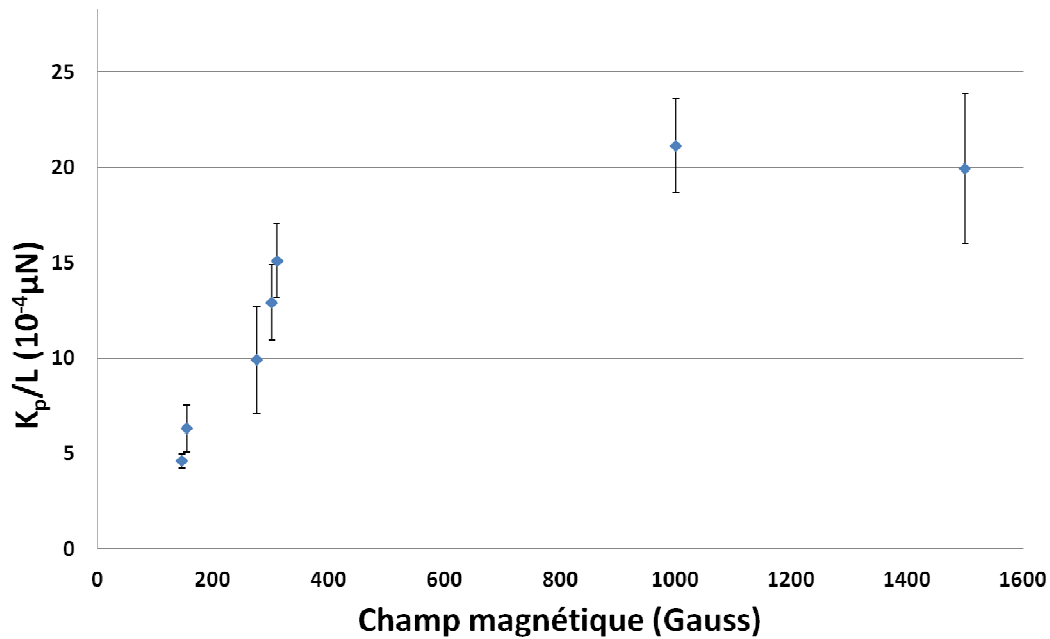


Figure 17 : Variation de $\frac{K_p}{L}$ en fonction du champ.

On constate une croissance rapide avec le champ qui semble ralentir fortement ensuite.

Comparons ce résultat à la formule 20, qui donne la rigidité de la colonne à son sommet.

$$K = \zeta(4) \frac{3\mu_0 m^2}{2\pi d^4 L}$$

De ce K , l'on peut extraire la rigidité de pivot d'une colonne de longueur L (en multipliant par L^2), et la rigidité de pivot par unité de longueur de la colonne (en divisant par L), $\frac{K_p}{L}$.

Cette grandeur indépendante du point d'application de la force et de la hauteur de la colonne vaut :

$$\frac{K_p}{L} = \zeta(4) \frac{3\mu_0 m^2}{2\pi d^4}$$

Équation 26

Connaissant l'aimantation pour les billes Dynal de 4,5 μm en fonction du champ magnétique, qui est donné sur la figure 6, il est possible de prédire la forme de $\frac{K_p}{L} \cdot p$

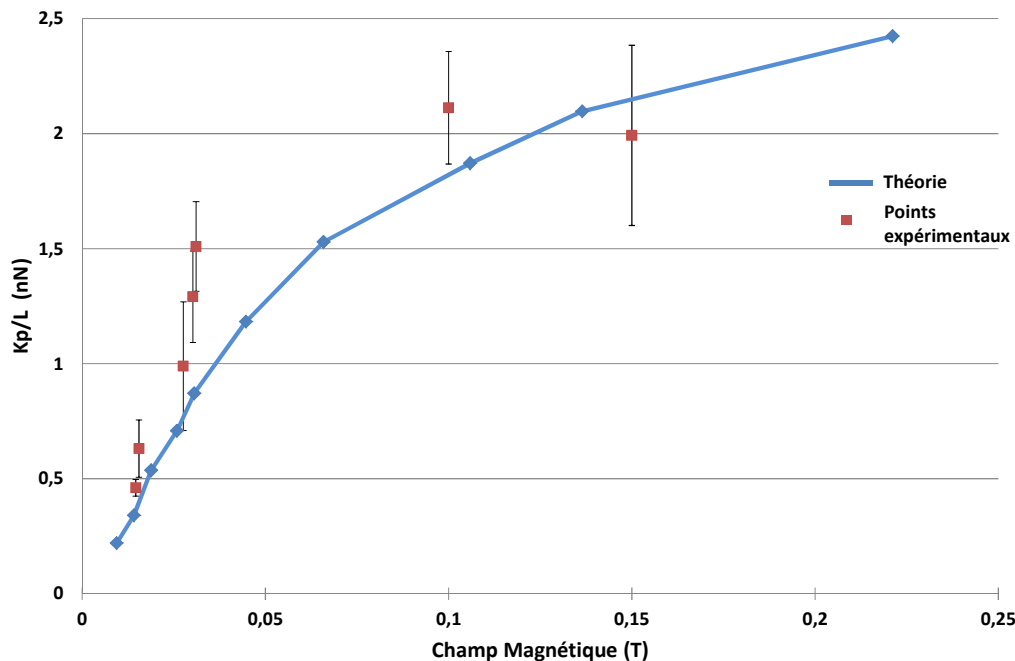


Figure 18 : Variation de $\frac{K_p}{L}$ en fonction du champ. Comparaison avec les prédictions déduites de la formule 26.

Comme on peut le constater, il semble y avoir un accord convenable entre la théorie et les mesures, ce qui est remarquable compte tenu du fait qu'il n'y a ici aucun paramètre ajustable.

Nous disposons donc d'un système à la raideur réglable autour de quelques dizaines de $\mu\text{N.m}^{-1}$. Considérons une colonne de particules d'environ 10 billes assemblées au-dessus d'une bille magnétique fixe, sa longueur totale fait environ 45 μm . A environ 300 G, sa raideur au sommet est de l'ordre de 20 $\mu\text{N.m}^{-1}$ (figure 16). Une déflexion de l'ordre du μm correspond à une force de l'ordre 20 pN, c'est-à-dire à l'action d'une dizaine de moteurs moléculaires. Une fibre d'actine sur laquelle agit une dizaine de ces moteurs subit donc une force mesurable à l'aide d'une colonne magnétique par simple observation de sa déflexion. Cela nécessite bien sûr un détecteur de position qui fonctionne dans une gamme de déplacements assez vaste. Les photodiodes dont nous disposons n'étant linéaires que dans une gamme de ± 100 nm, l'usage de la vidéo sera sans doute nécessaire.

^p On se reportera à la thèse de J. Lee-Tin-Wah pour plus de détails.

8. Verrous technologiques

Pour réaliser un dispositif permettant de mesurer des forces exercées par des protéines, tel celui présenté sur la figure 1, deux difficultés techniques doivent cependant être résolues :

- Il faut imposer l'accrochage d'un filament (actine) en sommet de colonne.
- Il nous faut contrôler la hauteur de la colonne.

Nous proposons ici des pistes de développement qui pourraient éventuellement être appliquées.

a) Contrôler l'accrochage spécifique des particules

Nous avons remarqué que si une petite proportion de particules plus petites (ici $1\ \mu\text{m}$) est ajoutée une fois les colonnes formées, celles-ci s'assemblent spécifiquement au sommet des colonnes (voir figure 19). Ce phénomène s'explique par la présence d'un gradient de champ magnétique induit par la dernière bille assemblée sur la colonne et par l'existence de forces de répulsion autour de la colonne. Il convient de procéder à cet ajout seulement une fois les colonnes formées, sinon ces particules sont susceptibles de se fixer dans l'espace situé entre deux billes au sein d'une colonne. Les colonnes déjà formées attirent par leur sommet et exerce une répulsion par les côtés. Si ces particules sont fonctionnalisées pour se fixer à un filament protéique, celui-ci pourrait donc être spécifiquement capturé par le sommet de la colonne.



Figure 19 : A gauche : schéma de côté d'une colonne de billes de $4,5\ \mu\text{m}$ surmontée de billes de $1\ \mu\text{m}$. A droite, une telle colonne vue de haut. En encart, un zoom sur la bille de $4,5\ \mu\text{m}$ ornée de billes de $1\ \mu\text{m}$.

b) Contrôler la hauteur des colonnes

Nous avons vu sur la figure 1 un exemple de configuration qui permettrait d'accrocher un filament protéique au sommet d'une colonne. On pourrait envisager d'étirer des filaments protéiques fixés sur une structure surélevée en PDMS jusqu'aux colonnes, via un flux. Idéalement il faudrait que cette structure ait la même hauteur que la colonne

Afin d'imposer une hauteur à la colonne on suggère de disposer les colonnes dans un canal microfluidique de hauteur ajustable.^{155,156} La figure 20 illustre cette méthode.

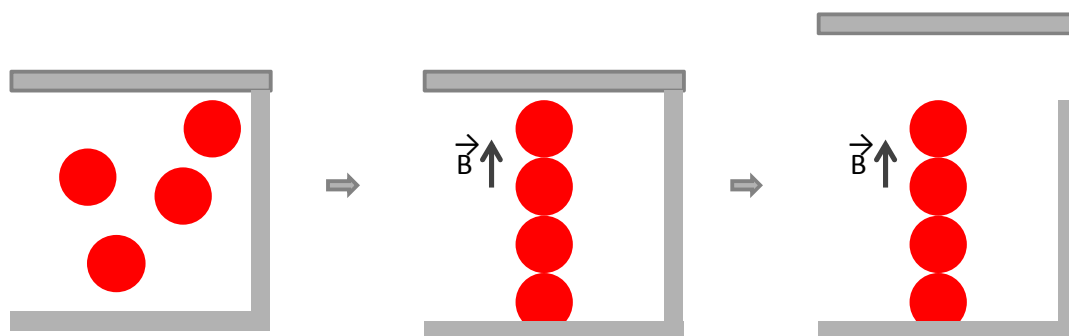


Figure 20: Schéma d'un dispositif envisageable pour contrôler la hauteur des colonnes. Le plafond pourrait être constitué par un canal perpendiculaire où l'on ferait varier la pression.¹⁵⁵

Plusieurs méthodes sont envisageables pour réaliser ce dispositif : une méthode originale serait d'utiliser une membrane de PDMS disposée sur le dispositif et dont la position verticale pourrait être ajustée précisément ; par exemple en appliquant une pression ou dépression sur cette dernière. Ce principe de fonctionnement est proche de celui des vannes microfluidiques développées par S. Quake.¹⁵⁵

9. Conclusion

Une étude de la raideur d'une colonne magnétique en fonction de divers paramètres a été entreprise. Elle a permis de montrer qu'une colonne se comporte comme un barreau rigide qui pivote à son point d'ancrage à la surface pour de petites fluctuations et que la raideur d'une colonne (quelques dizaines de $\mu\text{N.m}^{-1}$) peut être reliée au champ magnétique.

Bien que la reproductibilité des mesures doive encore être améliorée, les colonnes magnétiques semblent posséder une rigidité dans la bonne gamme de valeurs pour l'étude de petits ensembles (de l'ordre d'une dizaine) de moteurs moléculaires.

Plusieurs questions techniques (accrochage de protéines, hauteur de colonnes) nécessitent encore un travail important avant que les colonnes puissent effectivement servir de capteur de force.

Cependant, cette approche originale de développement d'un système électromécanique pour la biologie, par auto-assemblage, nous semble ouvrir des perspectives intéressantes pour cette discipline.

Conclusion

Nous espérons avoir montré tout au long de ce manuscrit, le potentiel des techniques d'assemblage dirigé capillaire et convectif pour l'intégration de colloïdes sur des surfaces. Ces procédés permettent de fonctionnaliser efficacement, et désormais rapidement, des surfaces avec des colloïdes, au prix d'une structuration de leur topographie. Au travers des différentes applications abordées dans ce manuscrit, nous espérons avoir convaincu le lecteur de la simplicité, de la polyvalence, du faible coût et de la résolution offertes par ces méthodes.

Nos travaux se sont articulés autour de deux volets principaux de développement:

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'amélioration des performances de l'assemblage capillaire. En particulier, nous nous sommes attachés à lever trois verrous technologiques majeurs : d'une part, alors que la majorité des techniques d'assemblage requièrent des objets mobiles, sensibles à des forces de guidage, nous avons montré que les procédés d'assemblage capillaire peuvent être étendus à des particules peu mobiles, lourdes, dont les temps de sédimentation sont bien inférieurs au temps caractéristiques des procédés. D'autre part, nous avons montré que les vitesses d'assemblages peuvent être étendues pour atteindre des valeurs de l'ordre du mm/s permettant de fonctionnaliser des surfaces de plusieurs dizaines de centimètres carrés en quelques minutes. De notre point de vue cette démonstration est essentielle pour pouvoir considérer l'assemblage capillaire comme une technique de structuration à part entière. Enfin, le multiplexage, c'est à dire la possibilité d'intégrer sur une même surface des particules de natures différentes a également été démontré en exploitant la sélectivité des procédés d'assemblage vis à vis de la géométrie des motifs de capture. Ceci permet d'accroître considérablement la complexité des dispositifs qu'il est possible de créer par assemblage capillaire. L'ensemble de ces améliorations a été exploité dans le cadre de plusieurs applications : de notre point de vue, la plus représentative concerne la fabrication de réseaux de motifs magnétiques pour la génération de colonnes de particules auto-assemblées. Outre l'application aux micro-nageurs réalisée en collaboration avec le groupe de D. Bartolo, nous souhaitons souligner le fait que l'assemblage capillaire est désormais utilisé en routine dans notre équipe pour la réalisation des puces microfluidiques de capture de cellules cancéreuses. Ces travaux ont également ouverts des perspectives intéressantes pour la réalisation et l'intégration de capteurs de force pour des applications en biophysique. La

collaboration initiée avec l'équipe de P. Martin a permis d'étudier la dynamique d'un réseau de colonnes et sera poursuivie pour l'étude de forces exercées par des moteurs moléculaires.

Le deuxième volet de ces travaux de recherche concerne l'application de l'assemblage capillaire à des cellules vivantes. Nous avons abordé ce domaine en proposant deux approches soit directement par assemblage capillaire, avec des levures et des bactéries, soit indirectement en assemblant d'abord sur une surface des colloïdes fonctionnalisés pour capturer des cellules. Cette dernière méthode permet de limiter les stress (en particulier le séchage) sur les cellules tout en conservant une grande précision sur le positionnement. Cette approche est compatible avec la méthode de multiplexage que nous avons développée et la possibilité de structurer une surface précisément avec plusieurs types de cellules a aussi été démontrée. Cela ouvre des perspectives très excitantes puisque des réseaux imbriqués de cellules vivantes peuvent désormais être fabriqués avec une grande facilité et en un temps très court.

L'utilisation de l'assemblage capillaire pour l'immobilisation de cellules est un domaine encore naissant. Parmi les développements à venir, l'augmentation des capacités du multiplexage (Nombre de types cellulaires au-delà de 4) et l'amélioration de la compatibilité des protocoles d'assemblage avec la manipulation directe de cellules sont les principales améliorations à apporter. L'efficacité de capture peut certes être encore améliorée, mais elle est suffisante pour que des études biologiques mettant en jeu plusieurs types de cellules soient d'ores et déjà envisagées au sein de notre équipe. Gageons que la simplicité de ces techniques, leur polyvalence, et leur faible coût permettront d'étendre leur champ d'application en biologie.

Bibliographie

1. Ondarcuhu T, Aime J-P. *Nanoscale Liquid Interfaces: Wetting, Patterning and Force Microscopy at the Molecular Scale*. Pan Stanford Publishing
2. Shipway AN, Katz E, Willner I. Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications. *ChemPhysChem*. 2000; 1(1):18-52.
3. Katz E, Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2004; 43(45):6042-108.
4. Parak WJ, Gerion D, Pellegrino T, et al. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*. 2003; 14(7):R15.
5. Xia Y, Gates B, Yin Y, Lu Y. Monodispersed Colloidal Spheres: Old Materials with New Applications. *Advanced Materials*. 2000; 12(10):693-713.
6. Niemeyer CM. Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. *Angewandte Chemie International Edition*. 2001; 40(22):4128-4158.
7. Willner I, Willner B. Functional nanoparticle architectures for sensoric, optoelectronic, and bioelectronic applications. *Pure and Applied Chemistry*. 2002; 74(9):1773-1783.
8. Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature biotechnology*. 2004; 22(1):47-52.
9. Schaak RE, Cable RE, Leonard BM, Norris BC. Colloidal crystal microarrays and two-dimensional superstructures: a versatile approach for patterned surface assembly. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2004; 20(17):7293-7.
10. Fan H, Yang K, Boye DM, et al. Self-assembly of ordered, robust, three-dimensional gold nanocrystal/silica arrays. *Science*. 2004; 304(5670):567-71.
11. Ozin G. The photonic opal--the jewel in the crown of optical information processing. *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2003; 21(21):2639-43.
12. Holtz JH, Asher SA. Polymerized colloidal crystal hydrogel films as intelligent chemical sensing materials. *Nature*. 1997; 389(6653):829-32.
13. Gourevich I, Pham H, Jonkman JEN, Kumacheva E. Multidye Nanostructured Material for Optical Data Storage and Security Labeling. *Chemistry of Materials*. 2004; 16(8):1472-1479.
14. Khondaker SI, Zhen Y. Fabrication of nanometer-spaced electrodes using gold nanoparticles. *Applied physics letters*. 2002; 81(24):4613-4615.
15. Wei Q-H, Su KH, Durant S, Zhang X. Plasmon resonance of finite one-dimensional Au nanoparticle chains. *Nano Letters*. 2004; 4(6):1067-1071.

16. Maier SA, Brongersma ML, Kik PG, et al. Plasmonics-A Route to Nanoscale Optical Devices. *Advanced Materials*. 2001; 13(19):1501-1505.
17. Hutter E, Fendler JH. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Advanced Materials*. 2004; 16(19):1685-1706.
18. Kotov NA, Liu Y, Wang S, et al. Inverted colloidal crystals as three-dimensional cell scaffolds. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2004; 20(19):7887-92.
19. Wang C, Yap FL, Zhang Y. Micropatterning of polystyrene nanoparticles and its bioapplications. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 2005; 46(4):255-60.
20. Pautot S, Wyart C, Isacoff EY. Colloid-guided assembly of oriented 3D neuronal networks. *Nature methods*. 2008; 5(8):735-40.
21. Gunderson KL, Kruglyak S, Graige MS, et al. Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome research*. 2004; 14(5):870-7.
22. Whitesides GM, Grzybowski B. Self-assembly at all scales. *Science (New York, N.Y.)*. 2002; 295(5564):2418-21.
23. Halley JD, Winkler DA. Consistent concepts of self-organization and self-assembly. *Complexity*. 2008; 14(2):10-17.
24. Dziomkina NV, Vancso GJ. Colloidal crystal assembly on topologically patterned templates. *Soft Matter*. 2005; 1(4):265.
25. Glotzer SC, Solomon MJ, Kotov NA. Self-assembly: From nanoscale to microscale colloids. *AIChE Journal*. 2004; 50(12):2978-2985.
26. Yin Y, Lu Y, Gates B, Xia Y. Template-assisted self-assembly: a practical route to complex aggregates of monodispersed colloids with well-defined sizes, shapes, and structures. *J. Am. Chem. Soc*. 2001; 123(36):8718–8729.
27. Dutta J, Hofmann H. Self-organization of colloidal nanoparticles. *Encyclopedia of nanoscience and Nanotechnology*. 2003: 617–640.
28. Alsberg E, Feinstein E, Joy MP, Prentiss M, Ingber DE. Magnetically-guided self-assembly of fibrin matrices with ordered nano-scale structure for tissue engineering. *Tissue engineering*. 2006; 12(11):3247-56.
29. Tierno P, Fischer TM, Johansen TH, Sagués F. Colloidal assembly on magnetically vibrated stripes. *Physical review letters*. 2008; 100(14):148304.
30. Yellen B, Friedman G, Feinerman A. Printing superparamagnetic colloidal particle arrays on patterned magnetic film. *Journal of Applied Physics*. 2003; 93(10):7331.
31. Helseth LE. Self-assembly of colloidal pyramids in magnetic fields. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2005; 21(16):7276-9.

32. Sahoo Y, Cheon M, Wang S, et al. Field-Directed Self-Assembly of Magnetic Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004; 108(11):3380-3383.
33. Boncheva M, Andreev SA, Mahadevan L, et al. Magnetic self-assembly of three-dimensional surfaces from planar sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(11):3924-9.
34. Leunissen ME, Vutukuri HR, van Blaaderen A. Directing Colloidal Self-Assembly with Biaxial Electric Fields. *Advanced Materials*. 2009; 21(30):3116-3120.
35. Rizwan T, Bhattacharjee S. Particle deposition onto charge-heterogeneous substrates. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2009; 25(9):4907-18.
36. Ting Z, Zhigang S, WINKLEMAN A, Whitesides GM. Mechanics of a process to assemble microspheres on a patterned electrode. *Applied physics letters*. 2006; 88(14).
37. Ozkan M, Esener SC, Bhatia SN. Electrokinetic Assembly of Microsphere and Cellular Arrays. *MRS Proceedings*. 2000; 662.
38. Tien J, Terfort A, Whitesides GM. Microfabrication through Electrostatic Self-Assembly. *Langmuir*. 1997; 13(20):5349-5355.
39. Prevo BG, Fuller JC, Velez OD. Rapid Deposition of Gold Nanoparticle Films with Controlled Thickness and Structure by Convective Assembly. *Chemistry of Materials*. 2005; 17(1):28-35.
40. Bowden N. Self-Assembly of Mesoscale Objects into Ordered Two-Dimensional Arrays. *Science*. 1997; 276(5310):233-235.
41. Bowden N, Arias F, Deng T, Whitesides GM. Self-Assembly of Microscale Objects at a Liquid/Liquid Interface through Lateral Capillary Forces. *Langmuir*. 2001; 17(5):1757-1765.
42. Lee W, Chan A, Bevan MA, Lewis JA, Braun PV. Nanoparticle-Mediated Epitaxial Assembly of Colloidal Crystals on Patterned Substrates. *Langmuir*. 2004; 20(13):5262-5270.
43. Foster EW, Kearns GJ, Goto S, Hutchison JE. Patterned Gold-Nanoparticle Monolayers Assembled on the Oxide of Silicon. *Advanced Materials*. 2005; 17(12):1542-1545.
44. Hsu JWP, Tian ZR, Simmons NC, et al. Directed spatial organization of zinc oxide nanorods. *Nano letters*. 2005; 5(1):83-6.
45. Kannan B, Kulkarni RP, Majumdar A. DNA-Based Programmed Assembly of Gold Nanoparticles on Lithographic Patterns with Extraordinary Specificity. *Nano Letters*. 2004; 4(8):1521-1524.
46. Cui Y, Björk M, Liddle J, et al. Integration of colloidal nanocrystals into lithographically patterned devices. *Nano Letters*. 2004; 4(6):1093–1098.
47. Juillerat F, Solak HH, Bowen P, Hofmann H. Fabrication of large-area ordered arrays of nanoparticles on patterned substrates. *Nanotechnology*. 2005; 16(8):1311-1316.
48. Prevo B, Velez OD. Controlled, rapid deposition of structured coatings from micro-and nanoparticle suspensions. *Langmuir*. 2004; 20(6):2099–2107.

49. Denkov N, Velev O, Kralchevski P, et al. Mechanism of formation of two-dimensional crystals from latex particles on substrates. *Langmuir*. 1992; 8(12):3183–3190.
50. Denkov ND, Velev OD, Kralchevsky PA, et al. Two-dimensional crystallization. *Nature*. 1993;361(6407):26-26.
51. Adachi E, Dimitrov A, Nagayama K. Stripe patterns formed on a glass surface during droplet evaporation. *Langmuir*. 1995; 11:1057-1060.
52. Deegan RD, Bakajin O, Dupont TF, et al. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*. 1997; 389(6653):827-829.
53. Bensimon D, Simon A, Croquette V, Bensimon A. Stretching DNA with a Receding Meniscus: Experiments and Models. *Physical Review Letters*. 1995; 74(23):4754-4757.
54. Michalet X, Ekong R, Fougereousse F, et al. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science (New York, N.Y.)*. 1997; 277(5331):1518-23.
55. Strick T, Allemand J-F, Croquette V, Bensimon D. Twisting and stretching single DNA molecules. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2000; 74(1-2):115-140.
56. Dimitrov AS, Nagayama K. Continuous convective assembling of fine particles into two-dimensional arrays on solid surfaces. *Langmuir*. 1996; 12(5):1303–1311.
57. Malaquin L, Kraus T, Schmid H, Delamarche E, Wolf H. Controlled particle placement through convective and capillary assembly. *Langmuir*. 2007; 23(23):11513–11521.
58. Kraus T, Malaquin L, Schmid H, et al. Nanoparticle printing with single-particle resolution. *Nature Nanotechnology*. 2007; 2(9):570–576.
59. Kraus T, Malaquin L, Delamarche E, et al. Closing the Gap Between Self-Assembly and Microsystems Using Self-Assembly, Transfer, and Integration of Particles. *Advanced Materials*. 2005; 17(20):2438–2442.
61. Hayashi S, Kumamoto Y, Suzuki T, Hirai T. Imaging by polystyrene latex particles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1991; 144(2):538-547.
62. Zhang J, Xue L, Han Y. Fabrication of gradient colloidal topography. *Langmuir*. 2005; 21(13):5667–5671.
63. Yan Q, Zhou Z, Zhao XS. Inward-growing self-assembly of colloidal crystal films on horizontal substrates. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2005; 21(7):3158-64.
64. Karakurt I, Leiderer P, Boneberg J. Size-dependent self-organization of colloidal particles on chemically patterned surfaces. *Langmuir*. 2006; 22(6):2415–2417.
65. Ikezoe Y, Kumashiro Y, Tamada K, et al. Growth of giant two-dimensional crystal of protein molecules from a three-phase contact line. *Langmuir*. 2008; 24(22):12836-41.

66. Jiang P, McFarland MJ. Large-scale fabrication of wafer-size colloidal crystals, macroporous polymers and nanocomposites by spin-coating. *Journal of the American Chemical Society*. 2004; 126(42):13778-86.
67. Monteux C, Lequeux F. Packing and Sorting Colloids at the Contact Line of a Drying Drop. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2011; 27(6):2917-2922.
68. Hadjiiski A, Dimova R, Denkov ND, Ivanov IB, Borwankar R. Film Trapping Technique: Precise Method for Three-Phase Contact Angle Determination of Solid and Fluid Particles of Micrometer Size. *Langmuir*. 1996; 12(26):6665-6675.
69. Yin Y, Xia Y. Growth of Large Colloidal Crystals with Their (100) Planes Orientated Parallel to the Surfaces of Supporting Substrates. *Advanced Materials*. 2002; 14(8):605.
70. Chen Z, Zhan P, Wang ZL, et al. Two- and Three-Dimensional Ordered Structures of Hollow Silver Spheres Prepared by Colloidal Crystal Templating. *Advanced Materials*. 2004; 16(5):417-422.
71. Ishii M, Nakamura H, Nakano H, Tsukigase A, Harada M. Large-domain colloidal crystal films fabricated using a fluidic cell. *Langmuir*. 2005; 21(12):5367–5371.
72. Ramiro-Manzano F, Meseguer F, Bonet E, Rodriguez I. Faceting and Commensurability in Crystal Structures of Colloidal Thin Films. *Physical review letters*. 2006; 97(2):28304.
73. Zeng Y, Harrison DJ. Confinement effects on electromigration of long DNA molecules in an ordered cavity array. *Electrophoresis*. 2006; 27(19):3747–3752.
74. Ramiro-Manzano F, Bonet E, Rodriguez I, Meseguer F. Colloidal Crystal Thin Films Grown into Corrugated Surface Templates. *Langmuir*. 2010; 26(7):4559–4562.
75. Yang SM, Míguez H, Ozin GA. Opal Circuits of Light-Planarized Microphotonic Crystal Chips. *Advanced Functional Materials*. 2002; 12(6-7):425-431.
76. Yang SM, Ozin GA. Opal chips: vectorial growth of colloidal crystal patterns inside silicon wafers. *Chemical Communications*. 2000; (24):2507-2508.
77. Shiu JY, Kuo CW, Chen P. Actively controlled self-assembly of colloidal crystals in microfluidic networks by electrocapillary forces. *J. Am. Chem. Soc*. 2004; 126(26):8096–8097.
78. Jemere AB, Oleschuk RD, Harrison DJ. Microchip-based capillary electrochromatography using packed beds. *Electrophoresis*. 2003; 24(17):3018-25.
79. Marquez M, Grady BP. The use of surface tension to predict the formation of 2D arrays of latex spheres formed via the Langmuir-Blodgett-like technique. *Langmuir*. 2004; 20(25):10998-1004.
80. Maury P, Escalante M, Reinhoudt DN, Huskens J. Directed Assembly of Nanoparticles onto Polymer-Imprinted or Chemically Patterned Templates Fabricated by Nanoimprint Lithography. *Advanced Materials*. 2005; 17(22):2718–2723.
81. Huang J, Tao AR, Connor S, He R, Yang P. A general method for assembling single colloidal particle lines. *Nano letters*. 2006; 6(3):524-9.

82. Fu Y, Jin Z, Liu Z, Liu Y, Li W. Self-assembly of colloidal crystals from polystyrene emulsion at elevated temperature by dip-drawing method. *Materials Letters*. 2008; 62(27):4286-4289.
83. Fustin C-A, Glasser G, Spiess HW, Jonas U. Parameters influencing the templated growth of colloidal crystals on chemically patterned surfaces. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2004; 20(21):9114-23.
84. Self-assembly C, Watanabe S, Inukai K, Mizuta S, Miyahara MT. Mechanism for Stripe Pattern Formation on Hydrophilic Surfaces by Using. *Langmuir*. 2009; (35):5553-5556.
85. Diguët A, Le Berre M, Chen Y, Baigl D. Preparation of phospholipid multilayer patterns of controlled size and thickness by capillary assembly on a microstructured substrate. *Small*. 2009; 5(14):1661-6.
86. Grisolia J, Viallet B, Amiens C, et al. 99% random telegraph signal-like noise in gold nanoparticle micro-stripes. *Nanotechnology*. 2009; 20(35):355303.
87. Jiang P, Bertone JF, Hwang KS, Colvin VL. Single-Crystal Colloidal Multilayers of Controlled Thickness. *Chemistry of Materials*. 1999; 11(8):2132-2140.
88. Kumacheva E, Garstecki P, Wu H, Whitesides GM. Two-dimensional colloid crystals obtained by coupling of flow and confinement. *Physical review letters*. 2003; 91(12):128301.
89. Zhang J, Alsayed A, Lin KH, et al. Template-directed convective assembly of three-dimensional face-centered-cubic colloidal crystals. *Applied Physics Letters*. 2002; 81(17):3176.
90. Yin Y, Xia Y. Growth of Large Colloidal Crystals with Their (100) Planes Orientated Parallel to the Surfaces of Supporting Substrates. *Advanced Materials*. 2002; 14(8):605.
91. Yin Y, Li ZY, Xia Y. Template-Directed Growth of (100)-Oriented Colloidal Crystals. *Langmuir*. 2003; 19(3):622-631.
92. Russel WB, Saville DA, Schowalter WR. *Colloidal Dispersions (Cambridge Monographs on Mechanics)*. Cambridge University Press; 1992: 544.
93. Ise N, Yoshida H, Matsuoka H, Yamanaka J, ITO K. Ordering a latex particles and ionic polymers in solutions. *Langmuir*. 1990; 6(2):296-302.
94. Lhoste K, Malaquin L, Billot L, Haghir-Gosnet AM, Chen Y. Fabrication of high density gold nanoparticle arrays on glass for high sensitivity bio-detection. *Microelectronic Engineering*. 2011; 88(8):2474-2477.
95. Xia Y, Yin Y, Lu Y. Template-Assisted Self-Assembly of Spherical Colloids into Complex and Controllable Structures. *Advanced Functional Materials*. 2003; 13(12):903-905.
96. Stebe KJ, Lewandowski E, Ghosh M. Oriented assembly of metamaterials. *Science*. 2009; 325(5937):159-60.
97. Huang Y, Duan X, Wei Q, Lieber CM. Directed assembly of one-dimensional nanostructures into functional networks. *Science*. 2001; 291(5504):630.

98. Messer B, Song JH, Yang P. Microchannel networks for nanowire patterning. *J. Am. Chem. Soc.* 2000; 122(41):10232–10233.
99. Bragg WL. The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society.* 1913; 17:43–57.
100. Yang SM, Miguez H, Ozin GA. Opal circuits of light-planarized microphotonic crystal chips. *Advanced Functional Materials.* 2002; 12(6-7):425–431.
101. Míguez H, Yang SM, Tétreault N, Ozin G a. Oriented Free-Standing Three-Dimensional Silicon Inverted Colloidal Photonic Crystal Microfibers. *Advanced Materials.* 2002; 14(24):1805-1808.
102. Freeman RG, Grabar KC, Allison KJ, et al. Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates. *Science.* 1995; 267(5204):1629-32.
103. Storhoff JJ, Lazarides AA, Mucic RC, et al. What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies. *Journal of the American Chemical Society.* 2000; 122(19):4640-4650.
104. Rivera TP, Lecarme O, Hartmann J, Inglebert RL, Peyrade D. Spectroscopic studies of plasmonic interactions in colloidal dimers fabricated by convective-capillary force assembly. *Microelectronic Engineering.* 2009; 86(4-6):1089-1092.
105. Cerf A, Molnár G, Vieu C. Novel approach for the assembly of highly efficient SERS substrates. *ACS applied materials & interfaces.* 2009; 1(11):2544-50.
106. Cerf A, Vieu C. Transfer printing of sub-100nm nanoparticles by soft lithography with solvent mediation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2009; 342(1-3):136-140.
107. Aizenberg J, Braun PV, Wiltzius P. Patterned colloidal deposition controlled by electrostatic and capillary forces. *Physical Review Letters.* 2000; 84(13):2997-3000.
108. Ressler L, Viallet B, Beduer A, et al. Combining convective/capillary deposition and AFM oxidation lithography for close-packed directed assembly of colloids. *Langmuir.* 2008; 24(23):13254-7.
109. Park MC, Hur JY, Cho HS, Park S-H, Suh KY. High-throughput single-cell quantification using simple microwell-based cell docking and programmable time-course live-cell imaging. *Lab on a chip.* 2011; 11(1):79-86.
110. Park MC, Hur JY, Kwon KW, Park S-H, Suh KY. Pumpless, selective docking of yeast cells inside a microfluidic channel induced by receding meniscus. *Lab on a chip.* 2006; 6(8):988-94.
111. Park MC, Hur JY, Kwon KW, Park SH, Suh KY. Pumpless, selective docking of yeast cells inside a microfluidic channel induced by receding meniscus. *Lab on a Chip.* 2006; 6(8):988–994.
112. Miserere S, Mottet G, Taniga V, et al. Fabrication of thermoplastics chips through lamination based techniques. *Lab on a chip.* 2012; 12(10):1849-56.

113. Stokes GG. On the effect of the internal friction of fluids on the motion of pendulums. *Cambridge Philos. Trans.* 1851; 9:8–106.
114. Richardson JF, Zaki WN. The sedimentation of a suspension of uniform spheres under conditions of viscous flow. *Chemical Engineering Science.* 1954; 3(2):65-73.
115. Fonnum G, Johansson C, Molteberg A, Mørup S, Aksnes E. Characterisation of Dynabeads® by magnetization measurements and Mössbauer spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2005; 293(1):41-47.
116. Boender W, Chesters A. K., Van Der Zanden AJJ. An approximate analytical solution of the hydrodynamic problem associated with an advancing liquid-gas contact line. *International journal of multiphase flow.* 1991; 17(5):661-676.
117. Dussan V. EB. The moving contact line: the slip boundary condition. *Journal of Fluid Mechanics.* 1976; 77(04):665-684.
118. Dussan EB. On the Spreading of Liquids on Solid Surfaces: Static and Dynamic Contact Lines. *Annual Review of Fluid Mechanics.* 1979; 11(1):371-400.
119. Dussan V. EB, Davis SH. On the motion of a fluid-fluid interface along a solid surface. *Journal of Fluid Mechanics.* 1974; 65(01):71-95.
120. Hocking LM. A moving fluid interface. Part 2. The removal of the force singularity by a slip flow. *Journal of Fluid Mechanics.* 1977; 79(02):209-229.
121. Shikhmurzaev YD. The moving contact line in a smooth solid surface. *International journal of multiphase flow.* 1993; 19(4):589-610.
122. Fermigier M, Jenffer P. An experimental investigation of the dynamic contact angle in liquid-liquid systems. *Journal of Colloid and Interface Science.* 1991; 146(1):226-241.
123. Kobayashi N, Egami C. High-resolution optical storage by use of minute spheres. *Optics letters.* 2005; 30(3):299-301.
124. Gijs MAM, Lacharme F, Lehmann U. Microfluidic applications of magnetic particles for biological analysis and catalysis. *Chemical reviews.* 2010; 110(3):1518-63.
125. Liu J, Lawrence E, Wu A, et al. Field-Induced Structures in Ferrofluid Emulsions. *Physical Review Letters.* 1995; 74(14):2828-2831.
126. Zhang H, Widom M. Field-induced forces in colloidal particle chains. *Physical Review E.* 1995; 51(3):2099-2103.
127. Doyle PS, Bibette J, Bancaud A, Viovy J-L. Self-assembled magnetic matrices for DNA separation chips. *Science (New York, N.Y.).* 2002; 295(5563):2237.
128. Saliba A-E, Saias L, Psychari E, et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010; 107(33):14524-9.

129. Xia Y, Whitesides G. Soft lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998; 28:153–184.
130. Saliba AE. Laboratoires-sur-puces et billes magnétiques auto-organisées pour l'analyse de cellules et d'ADN. 2009.
131. Saias L, Autebert J, Malaquin L, Viovy J-L. Design, modeling and characterization of microfluidic architectures for high flow rate, small footprint microfluidic systems. *Lab on a chip*. 2011; 11(5):822-32.
132. Coq N, Bricard A, Delapierre F-D, et al. Collective Beating of Artificial Microcilia. *Physical Review Letters*. 2011; 107(1).
133. Xu L, Robert L, Ouyang Q, et al. Microcontact printing of living bacteria arrays with cellular resolution. *Nano letters*. 2007; 7(7):2068-72.
134. Azioune A, Storch M, Bornens M, Théry M, Piel M. Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab on a chip*. 2009; 9(11):1640-2.
135. Ingham C, Bomer J, Sprenkels A, et al. High-resolution microcontact printing and transfer of massive arrays of microorganisms on planar and compartmentalized nanoporous aluminium oxide. *Lab on a chip*. 2010; 10(11):1410-6.
136. Solis DJ, Coyer SR, García AJ, Delamarche E. Large-scale arrays of aligned single viruses. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*. 2010; 22(1):111-4.
137. Kang L, Hancock MJ, Brigham MD, Khademhosseini A. Cell confinement in patterned nanoliter droplets in a microwell array by wiping. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2010; 93(2):547-57.
138. Suo Z, Yang X, Deliorman M, Cao L, Avci R. Capture efficiency of Escherichia coli in fimbriae-mediated immunoimmobilization. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2012; 28(2):1351-9.
139. Rozhok S, Fan Z, Nyamjav D, et al. Attachment of motile bacterial cells to prealigned holed microarrays. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2006; 22(26):11251-4.
140. Sivagnanam V, Song B, Vandevyver C, Bünzli J-CG, Gijs MAM. Selective breast cancer cell capture, culture, and immunocytochemical analysis using self-assembled magnetic bead patterns in a microfluidic chip. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2010; 26(9):6091-6.
141. Ino K, Okochi M, Konishi N, et al. Cell culture arrays using magnetic force-based cell patterning for dynamic single cell analysis. *Lab on a chip*. 2008; 8(1):134-42.
142. Zawko SA, Schmidt CE. Simple benchtop patterning of hydrogel grids for living cell microarrays. *Lab on a chip*. 2010; 10(3):379-83.
143. Ahmer BMM. Cell-to-cell signalling in Escherichia coli and Salmonella enterica. *Molecular microbiology*. 2004; 52(4):933-45.

144. Chan K-G, Puthucheary SD, Chan X-Y, et al. Quorum sensing in *Aeromonas* species isolated from patients in Malaysia. *Current microbiology*. 2011; 62(1):167-72.
145. Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA. Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging cell*. 2006; 5(4):345-57.
146. Fabrizio P, Longo VD. Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochimica et biophysica acta*. 2008; 1783(7):1280-5.
147. Howard J. Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature*. 1997; 389(6651):561-7.
148. Ishiwata S, Shimamoto Y, Suzuki M. Molecular motors as an auto-oscillator. *HFSP journal*. 2010; 4(3-4):100-4.
149. Plaçais P-Y. Propriétés mécaniques de la myosine II in vitro : de la molécule unique aux effets collectifs. 2008.
150. Plaçais P-Y, Balland M, Guérin T, Joanny J-F, Martin P. Spontaneous Oscillations of a Minimal Actomyosin System under Elastic Loading. *Physical Review Letters*. 2009; 103(15):158102.
151. Howard J. *Mechanics of Motor Proteins & the Cytoskeleton*. Sinauer Associates; 2001: 367.
152. Tinevez J-Y. Mouvements actifs, régulés par le calcium, de la touffe ciliaire mécanosensible des cellules ciliées de l'oreille interne. 2006.
153. Barral J. L'amplificateur ciliaire des cellules ciliées de l'oreille interne. 2011.
154. Tinevez J-Y, Jülicher F, Martin P. Unifying the various incarnations of active hair-bundle motility by the vertebrate hair cell. *Biophysical journal*. 2007; 93(11):4053-67.
155. Unger MA. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science*. 2000; 288(5463):113-116.
156. Zheng Y, Dai W, Wu H. A screw-actuated pneumatic valve for portable, disposable microfluidics. *Lab on a chip*. 2009; 9(3):469-72.