



HAL
open science

Micro et nanosystèmes mécaniques : problématiques afférentes à la réduction en taille et aux interfaces pour des applications dans le domaine de la chimie et de la biologie

Christian Bergaud

► To cite this version:

Christian Bergaud. Micro et nanosystèmes mécaniques : problématiques afférentes à la réduction en taille et aux interfaces pour des applications dans le domaine de la chimie et de la biologie. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2005. tel-00011363

HAL Id: tel-00011363

<https://theses.hal.science/tel-00011363>

Submitted on 12 Jan 2006

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.

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Préparée au
Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS

par
Christian Bergaud
Docteur - Ingénieur INSA de LYON

**Micro et nanosystèmes mécaniques : problématiques
afférentes à la réduction en taille et aux interfaces pour des
applications dans le domaine de la chimie et de la biologie**

Soutenue le 3 mai 2005, devant le jury:

Président	Jacques GRAFFEUIL, Professeur à l'Université Paul Sabatier
Directeur scientifique	Augustin MARTINEZ, Professeur à l'INSA de Toulouse
Rapporteurs	Daniel BARBIER, Professeur à l'INSA de Lyon Yong CHEN, Professeur à l'ENS Paris Bruno LE PIOUFLE, Professeur à l'ENS Cachan
Examineurs	Tony COLEMAN, Directeur de recherche au CNRS Michel DE LABACHELERIE, Directeur de recherche au CNRS

Rapport LAAS N°***
Habilitation préparée au Laboratoire d'Architecture et d'Analyse des Systèmes du CNRS
7, avenue du colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex 4, France

TABLE DES MATIERES

Remerciements IX

Résumé – Summary XI

Avant-propos XIII

PARTIE I	MICRO ET NANOSYSTEMES ELECTROMECHANIQUES : ETAT DE L'ART
-----------------	---

Introduction 3

I. Les micro et nanosystèmes électromécaniques 3

I.1. Miniaturisation des systèmes mécaniques 4

I.2. Lois d'échelle pour quelques grandeurs physiques 6

I.3. Modélisation et simulation 7

II. Déformations statiques et modes résonants : cas particulier des poutres et des ponts 8

II.1 Déformations statiques 8

II.2. Modes résonants 13

II.2.1. Paramètres caractéristiques d'un résonateur mécanique 14

a. *Domaine de linéarité* 14

b. *Dynamique de mesure* 14

c. *Bande-passante* 15

d. *Sensibilité en masse* 15

e. *Résolution – masse minimum détectable* 15

II.2.2. Pertes énergétiques dans un système mécanique oscillant 16

a. *Caractéristiques opératoires d'un point de vue énergétique* 17

b. *Amortissement thermo-élastique dû aux frictions internes structurales* 17

c. *Amortissement dû aux pertes énergétiques à la surface de la structure* 18

d. *Amortissement dû aux pertes énergétiques aux encastremets* 18

II.3. Intégration de fonctions d'actionnement et de détection 19

II.3.1. Actionnement 19

II.3.2. Détection 20

a. *Mesure externe de la flexion* 20

b. *Mesure intégrée de la flexion* 20

- Détection piézoélectrique 21

III. Vers un système complet : notion d'adressage et architecture générale 22

IV. Quelles stratégies et quelles applications pour les micro et nanosystèmes en chimie et en biologie 24

IV.1. Pertinence d'une réduction en taille en chimie et en biologie 24

IV.2. Cas particulier des biopuces et biocapteurs 25

IV.2.1. Structuration chimique et biochimique sur surface avec motifs prédéfinis 26

IV.2.2. Structuration chimique et biochimique par dépôt localisé sur surface uniforme 26

IV.3. Micro et nanofluidique 28

IV.3.1. Ecoulements fluidiques en géométries confinées : influence des propriétés de surface 29

IV.3.2. Détermination des constantes cinétiques d'association et de dissociation : cas particulier où la réaction est limitée par le transfert de masse 29

V. Vers les nanobiotechnologies : domaine où les surfaces et les interfaces jouent un rôle prépondérant 31

Conclusion 33

Références 33

PARTIE II : TRAVAUX ET RESULTATS 1997-2005

Introduction 43

I. La technologie : de la fabrication de structures test à la conception de capteurs et actionneurs élaborés 45

I.1. Structures test et micropointes 45

I.2. Capteurs et Actionneurs 46

I.2.1. Dispositifs piézoélectriques 46

I.2.2. Dispositifs piézorésistifs 48

I.3. Quelques publications marquantes concernant les aspects technologiques 50

II. Caractérisation et modélisation	51
II.1. Mode statique : modèle énergétique du flambement spécifique aux ponts micro-usinés, précontraints en compression	51
II.2. Mode dynamique	53
II.2.1. Fréquences de résonance de ponts bicouches SiO ₂ /Au en flambement	53
II.2.2. Facteurs de qualité	54
II.3. Caractérisations électromécaniques de membranes piézo-électriques : extraction du coefficient piézoélectrique d_{31}	55
II.4. Caractérisations en bruit de microleviers piézorésistifs	57
II.5. Quelques publications marquantes concernant les aspects caractérisation et modélisation	58
III. Quelques applications	59
III.1. Connectique électrique, optique et mécanique	59
III.1.1. Caractérisation électrique de nanodispositifs à l'aide d'un microtesteur sous pointes	59
III.1.2. Connexion optique dans le champ proche avec des microleviers en nitrure de silicium	61
III.1.3. Microviscosimètre	61
III.2. Biopuces et biocapteurs	64
III.2.1. Résonateurs mécaniques de type pont ou poutre : effet induit par l'adsorption de nanoparticules d'or sur les propriétés mécaniques en régime dynamique	64
III.2.2. Utilisation de résonateurs piézoélectriques en milieu liquide : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or à une interface liquide/solide	66
a. Fonctionnalisation de surface	66
b. Préparation de la puce	67
c. Résultats expérimentaux et théoriques : cinétiques d'adsorption et sensibilité	68
III.2.3. Fabrication de biopuces en utilisant des microleviers : étapes préliminaires vers la conception de nanobiopuces	69
a. Technologie de fabrication et plateforme expérimentale	69

b. Résultats expérimentaux	70
c. Vers un système complet : électronique rapprochée et problématiques d'interfaçage	72
III.2.4. Vers une véritable biopuce : dépôt et détection	74
III.3. Publications marquantes concernant les aspects applications	74
Conclusion	76

PARTIE III : PROSPECTIVE DE RECHERCHE, ANNEXES, BIBLIOGRAPHIE
--

I. Prospective de recherche	79
I.1. Thématique I: actionneurs et capteurs pour la chimie et la biologie	80
I.2. Thématique II: nanosystèmes électromécaniques	81
I.3. Thématiques III: nanobiotechnologies	82
ANNEXE I : Techniques et technologies de fabrication de nanodispositifs	85
I. L'approche descendante (Top-Down)	86
I.1. Nano-impression et lithographie douce	86
I.2. Techniques de lithographie en parallèle, dérivées des techniques de microscopie de champ proche	89
I.3. Caractérisation physique et adressage à l'échelle du nanomètre	92
II. L'approche Ascendante « Bottom-up »	93
II.1. Chimie de synthèse et chimie supramoléculaire aux interfaces	93
II.2. Structuration de surface avec des molécules, des nanoparticules organiques et inorganiques etc., par auto-assemblage, peignage, mouillage et séchage	93
ANNEXE II : Greffage chimique, biochimique et traitements de surface : quelques stratégies	97
I. Le greffage : réaction chimique et interaction affine	97
I.1. La chimie du greffage	97
I.1.1. La stratégie mise en œuvre	97
I.1.2. Interaction biospécifique : greffage de type affin	98

I.1.3. Formation par greffage covalent sur surface d'or ou d'oxyde de silicium de couches auto-assemblées possédant un site afffin (biotine) 98

I.2. Nanoparticules, colloïdes, quantum dots 99

II. La caractérisation des édifices obtenus 100

Références 102

PARTIE IV : CV DETAILLE

Curriculum vitae 107

Production scientifique 109

Autres activités liées au métier de chercheur 116

Publications significatives 123

Remerciements

Mes activités de recherche ont été effectuées pour la plus grande partie au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du Centre National de la Recherche Scientifique (LAAS - CNRS) sous les directions successives de Messieurs Alain COSTES, Jean-Claude LAPRIE et Malik GHALLAB. Une partie de ces recherches a été effectuée au LIMMS/CNRS-IIS (UMI 2820) à l'Université de Tokyo.

Durant mon parcours scientifique, j'ai toujours bénéficié du soutien indéfectible de nombreuses personnes. Parmi elles, Monsieur Augustin MARTINEZ, professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, mérite une mention spéciale pour m'avoir mis le pied à l'étrier dans le monde de la recherche dès 1989 lors du stage ingénieur que j'ai effectué au LAAS sous sa direction. Durant toutes les années qui ont suivi, il a toujours été présent pour m'épauler dans mes démarches tout en préservant mon indépendance. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également aux responsables des différents groupes dont j'ai été membre : Messieurs Gabriel BLASQUEZ et Gérard SARRABAYROUSE pour le groupe "Technologies des Micro- et Nano-structures" (TMN) et Christophe VIEU pour le groupe « Nanoadressage et Nanobiotechnologies » (NANO). Ils m'auront permis de développer mes activités de recherche dans d'excellentes conditions.

Je remercie vivement tous les membres du jury : Monsieur Jacques GRAFFEUIL, Professeur à l'université Paul Sabatier de Toulouse, Monsieur Daniel BARBIER, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Monsieur Yong CHEN, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Paris, Monsieur Bruno LE PIOUFLE, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Cachan, Monsieur Tony COLEMAN, directeur de recherche à l'IBCP (Institut de Biologie et Chimie des Protéines) à Lyon, et Michel DE LABACHELERIE, directeur de recherche à FEMTO-ST (Franche-Comté Electronique, Mécanique, Thermique et Optique - Sciences et Technologies) à Besançon, pour avoir accepté de participer à ce jury et pour l'attention particulière qu'ils ont portée à ce mémoire en tant que rapporteur ou examinateur.

Mes remerciements vont également à tous les stagiaires, doctorants et post-doctorants qui auront très largement contribué à la réussite des travaux de recherche qui sont synthétisés dans ce mémoire : Liviu NICU, Emeline COCHETEAU, Pascal BELAUBRE, Yannick TAURAN, Matthieu GUIRARDEL, Thierry LEICHLE, Daisuke SAYA, Peter LOW.

Je n'oublie pas mes collègues de travail du LAAS avec une mention très spéciale pour Liviu NICU, le soutien indéfectible tant sur le plan scientifique que sur le plan humain, il dirige de mains de maître les activités de l'équipe au LAAS depuis j'ai pris la direction du LIMMS à l'Université de Tokyo en avril 2004. Qu'il soit ici remercié très amicalement pour son aide précieuse de tous les instants.

Benoît BELIER, post-doctorant quand nous avons orienté nos travaux vers la thématique « Biopuces » en 2000, actuellement ingénieur de recherche à l'Institut d'Electronique Fondamentale (IEF) à Paris. Son opiniâtreté et sa bonne humeur constantes auront permis de débiter cette aventure dans les meilleures conditions.

Jean-Bernard POURCIEL, incollable sur tous les problèmes d'automatique, de traitements du signal, de drivers informatiques, de technologies sans fil et autres patches pour

PC à la dérive. Fabrice MATHIEU, l'électronicien de haut vol qui peut donner le vertige si on est en état d'hypoglycémie lorsqu'il entre dans des considérations très techniques.

Je tiens à les remercier très chaleureusement car leur contribution a été essentielle pour la mise en place de l'activité « biopuces » au sein de l'équipe.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble du personnel des services TEAM (Salle blanche) et 2I (Informatique et Instrumentation) pour leur contribution scientifique et technique indispensable au bon déroulement des activités de recherche qui sont présentées dans ce mémoire.

Enfin, je voudrais décerner un satisfecit à la « fine équipe » : Jean-Pierre, Christian, Liviu, Emmanuel, Pierre, François... pour ne citer que les piliers, ils ont toujours fait preuve d'une rigueur inébranlable et d'une diligence hors du commun pour organiser en des temps records des ateliers de travail sur des thématiques très diverses comme la cueillette des cèpes, les barbecues escalquinois, les déménagements en estafette de location, les escapades à l'aube pour taquiner la truite fario, les dégustations d'alcools fins ou moins fins suivant l'arrivage et la cuvée... Il y a fort à parier que de nouvelles thématiques devraient apparaître pour les prochains ateliers dès mon retour du Japon en avril 2006.

Micro et nanosystèmes électromécaniques : problématiques afférentes à leur réduction en taille pour des applications dans le domaine de la chimie et de la biologie

Résumé

Dans la première partie de ce mémoire, nous proposons un état de l'art dans le domaine des micro et nanosystèmes électromécaniques en mettant en exergue les problématiques afférentes à leur réduction en taille en termes de technologies de fabrication, d'électronique associée, de sources de bruit extrinsèques et intrinsèques, de rapport signal sur bruit... Plus spécifiquement, nous évaluons la pertinence d'une miniaturisation des dispositifs électromécaniques pour des applications dans le domaine de la chimie ou de la biologie en soulignant le rôle prépondérant des effets de surface et d'interface par rapport aux effets de volume: pertes énergétiques, équilibres thermodynamiques, cinétiques de réaction... Le cas particulier des biopuces et des biocapteurs est ensuite abordé : dynamique de mesure, domaine de linéarité, sensibilité, résolution ultime.

Cet état de l'art nous permet de positionner, sur le plan national et international, nos activités de recherche, dont le bilan est dressé dans la deuxième partie. Il a également pour objectif de justifier le choix de nos orientations thématiques à plus long terme vers le domaine des nanobiotechnologies, ces orientations faisant l'objet d'une dernière partie.

Mots clés : microsystèmes et nanosystèmes électromécaniques, microtechnologies, nanotechnologies, actionneur, capteur, biocapteur, biopuce, nanobiotechnologies, sensibilité, résolution ultime.

Micro and nano-electromechanical systems: problems related to their reduction in size in view of applications in chemistry and biology

Summary

In the first part of this document, a state of the art in the field of micro and nano-electromechanical systems is proposed with emphasis on problems related to their reduction in size in terms of fabrication technologies, associated electronics, extrinsic and intrinsic sources of noise, signal-to-noise ratio... More specifically, the relevance of a miniaturization of electromechanical devices devoted to chemical or biological applications is evaluated by highlighting the prevailing role of surface and interface effects with respect to volume effects: energetic losses, thermodynamic equilibria, reaction kinetics... The particular case of biochips and biosensors is then presented: dynamic range of measurement, linear range, sensitivity, ultimate resolution.

This state of the art enables us to establish, on the national and international level, the relative position our research activities, whose survey is drawn up in the second part. It is also aimed at justifying the choice of our long-term thematic orientations towards the field of nanobiotechnologies, these orientations being presented in the last part.

Key words: micro-electromechanical systems, nano-electromechanical systems, microtechnologies, nanotechnologies, actuator, sensor, biosensor, biochip, nanobiotechnologies, sensitivity, ultimate resolution.

Avant-propos

Mes activités de recherche ont débuté en 1991 avec ma thèse de doctorat qui portait sur la formation de jonctions p+/n ultra-minces par implantation ionique de bore dans du silicium préamorphisé. Je ne détaillerai pas cette étude dans ce mémoire car c'est une thématique que j'ai abandonnée après ma thèse. Je soulignerai simplement que les problématiques associées à la réduction en taille des zones actives dans les composants CMOS 0,25µm constituait déjà le fil conducteur des mes travaux, ce fil conducteur étant vraisemblablement ce qui définit le mieux le cheminement de mes activités de recherche aux cours de ces dernières années. Nous verrons d'ailleurs que les études que j'avais menées pendant ma thèse ont été mises à profit dans le cadre de mes activités de recherche pour l'élaboration de couches piézorésistives ultra-minces.

Mes études post-doctorales au LIMMS/CNRS-IIS à l'Université de Tokyo ont porté sur l'optimisation de l'interface entre micro et nanostructures pour la mise au point de nouvelles techniques de caractérisation physique à l'échelle du nanomètre. Mon recrutement au CNRS en Janvier 1997 m'aura permis de poursuivre cette activité en l'enrichissant grâce à de nombreuses collaborations tant d'un point de vue des technologies de fabrication mises en œuvre, des études théoriques et expérimentales que d'un point de vue des applications (électronique moléculaire, champ proche optique...).

Les champs d'applications se sont ensuite élargis aux domaines de la chimie et de la biologie. Ce changement thématique a constitué une prise de risques très importante dans la mesure où aucune activité de ce type n'était développée au LAAS et peu d'équipes en France s'étaient engagées dans cette voie si l'on excepte le CEA-Leti avec l'équipe de Thierry Livache (qui a donné naissance à la start-up « Sysbio » devenue « Apibio » depuis) et l'Ecole Centrale de Lyon avec l'équipe d'Eliane Souteyrand (Projet Rosa et start-up Rosatech).

Chronologiquement, c'est Francis Galibert, responsable du programme Génome du CNRS et du programme Puces à ADN, et Dany Vandromme, chargé de mission du département SPI, qui lors d'une visite au LAAS en septembre 1998, m'auront mis le pied à l'étrier pour cette nouvelle aventure en m'accordant un financement pour un projet que j'avais proposé sur la fabrication de puces à ADN en utilisant des microleviers en silicium. Des collaborations se sont ensuite mises en place avec l'ESPCI notamment et en particulier les équipes de Claude Boccara (Laboratoire d'Optique Physique) et de Marie-Claude Potier (Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire dirigé par Jean Rossier). Ce sera finalement la création du Génomipole Toulouse Midi-Pyrénées en 1999 qui aura permis de renforcer cette activité grâce à des financements conséquents et la mise en place d'un réseau de collaborations entre laboratoires publics et privés de la région Midi-Pyrénées dont les activités relevaient pour la plupart du domaine de la chimie et de la biologie.

Finalement, avec le recul, il est indéniable que ce changement thématique se justifiait à travers les différentes collaborations engagées depuis lors en particulier dans le cadre de deux projets européens retenus dans le 6^{ième} PCRD en mars 2004, mais également en considérant la production scientifique et les dépôts de brevet s'y rapportant.

Le développement de mes activités de recherche a coïncidé avec l'émergence des biopuces, en particulier des puces à ADN à la fin des années 90. L'introduction des micro et nanotechnologies dans ce domaine a constitué une véritable révolution. Parmi toutes les approches développées dans ce domaine, deux illustrent parfaitement notre changement thématique et l'ont même probablement conditionné. Il s'agit d'une part, de la technique

« Dip-pen » initialement proposée par le groupe de H.J. Butt de l'Université de Mayence¹ et reprise avec succès par C. Mirkin de l'Université de Northwestern aux Etats-Unis² et d'autre part, des micro et nanosystèmes mécaniques utilisés à des fins de détection. Ces deux approches reposent dans la plupart des cas sur l'utilisation de microleviers en silicium ou en matériaux dérivés et étaient donc parfaitement compatibles avec les activités que je développais jusqu'alors. Je pouvais donc aborder le domaine de la chimie et de la biologie sans modifier radicalement mes activités de recherche mais plutôt en les enrichissant par la confrontation à de nouvelles problématiques.

Je reparlerai de ces nouvelles approches dans ce mémoire qu'elles concernent l'état de l'art ou mes propres activités de recherche. En revanche, je n'aborderai pas les retombées économiques des micro et nanotechnologies encore balbutiantes concernant le domaine des biopuces et des biocapteurs — la lecture des documents édités par la société Yole Développement³ est conseillé pour cela —, et je ne débattrai pas non plus du bien fondé technique ou technologique de certaines approches développées actuellement dans ce domaine, l'Observatoire des Micro et Nanotechnologies éditant régulièrement de très bons documents de synthèse sur ces différents aspects. Je restreindrai mon propos aux problématiques scientifiques du domaine des micro et nanosystèmes mécaniques en privilégiant la description d'approches simples permettant d'appréhender de manière rigoureuse des phénomènes complexes plutôt que le recours à des systèmes sophistiqués qui est une voie trop souvent choisie lorsque les micro et nanotechnologies sont mises au service de la biologie.

Ce mémoire est composé de trois parties. La première est consacrée à un état de l'art non exhaustif sur les micro et nanosystèmes mécaniques et les problématiques afférentes à la réduction en taille et aux interfaces en vue de leur utilisation dans le domaine de la chimie et de la biologie. En définissant aussi précisément que possible les problématiques associées à cette thématique, il s'agit non seulement de positionner nos travaux de recherche par rapport à l'état de l'art mais également de justifier le choix de nos orientations scientifiques à plus long terme.

La deuxième partie intitulée « Travaux et Résultats » qui constitue le cœur de ce mémoire est exclusivement consacrée à mes travaux de recherche. Je me référerai à l'état de l'art de la première partie le cas échéant mais j'ai voulu éviter la juxtaposition disjointes de parties « Etat de l'art » et « Résultats » qui n'aurait pas permis de faire apparaître clairement le fil conducteur de mes activités. Enfin, une dernière partie plus courte sera dédiée au bilan et aux perspectives de mes activités de recherche.

Deux annexes à la fin de ce mémoire permettent, pour la première, de resituer dans un contexte plus général les approches techniques et technologiques conventionnelles et émergentes pour la fabrication de nanostructures et pour la seconde, de présenter plus en détail quelques stratégies que nous avons privilégiées pour le greffage chimique, biochimique et les traitements de surface.

¹ M. Jaschke and H.J. Butt, "Deposition of organic material by the tip of a scanning force microscope", *Langmuir* 1995, 11, 1061-1064.

² <http://www.chem.northwestern.edu/~mkngrp/>

³ <http://www.yole.fr/>

PARTIE I

MICRO ET NANOSYSTEMES ELECTROMECHANIQUES : ETAT DE L'ART

Introduction

Précisons tout d'abord avant d'aborder cette partie qu'une miniaturisation extrême ne constitue pas une fin en soi pour certains microsystemes comme c'est le cas pour la microélectronique. La vocation première des microsystemes restant d'interagir directement avec leur environnement en isolant certains phénomènes physiques du monde macroscopique (pression, inertie, lumière, etc.), il existe des frontières en deçà desquelles la miniaturisation peut leur être défavorable. Il s'agit en particulier des microsystemes dont le principe de fonctionnement repose sur l'exploitation de phénomènes inertiels.

En revanche, tous les systèmes dont les principes de fonctionnement reposent sur l'exploitation de phénomènes de surface gagnent à être réduits en taille.

Nous devons également garder à l'esprit, lorsque nous aborderons le domaine de la chimie et de la biologie, que la réduction en taille ne doit pas être considérée comme une finalité pour bien des applications. Le micromètre, voire le millimètre, reste des ordres de grandeur qu'il faudra très souvent privilégier pour le diagnostic médical, le criblage, les études de toxicologie ou de pharmacologie, etc.

Ajoutons enfin que la diversité des micro et nanosystemes mécaniques que ce soit dans les techniques et technologies de fabrication (conventionnelles ou non) qui leur sont associées, leurs principes de fonctionnement ou plus généralement encore leurs champs d'applications, interdit à ces quelques pages toute prétention à l'exhaustivité. Toutefois, pour positionner notre projet et justifier nos choix, nous avons ajouté en fin à la fin de ce document deux annexes où sont présentées de manière succincte différentes stratégies ou techniques envisageables dans les domaines que nous avons abordés ou que nous serons amenés à aborder dans le cadre de notre prospective de recherche.

I. Les micro et nanosystemes électromécaniques

C'est sans aucun doute l'invention du microscope à force atomique (AFM : Atomic Force Microscope en anglais) en 1986 [1], en parallèle avec la sophistication des techniques de microfabrication collective développées grâce à l'émergence des microsystemes dans les années 80, qui aura permis au domaine des capteurs micromécaniques de connaître un regain d'intérêt soudain pour des applications en chimie et en biologie, en particulier tous les capteurs dont le principe de fonctionnement repose sur l'utilisation de structures mécaniques cantilever déformables ou mobiles. En effet, si l'on excepte les composants piézoélectriques à ondes de surface ou de volume développés depuis plusieurs décennies maintenant pour être utilisés majoritairement comme capteurs chimiques ou biologiques, peu d'études visant à utiliser des structures mécaniques mobiles comme corps d'épreuve pour des reconnaissances chimiques ou biochimiques ont été développées jusqu'à l'apparition de l'AFM [2]. La raison en est simple : les techniques de détection développées pour l'AFM en mode contact (détection en mode statique) ou résonant (détection en mode dynamique) ont permis de repousser considérablement les limites de sensibilité et de résolution tout en améliorant fortement la stabilité du signal mesuré et donc la reproductibilité de la mesure, propriétés qui faisaient souvent défaut auparavant à ce type de capteurs. Il n'est donc pas étonnant de constater que toutes les techniques de détection développées pour les capteurs mécaniques chimiques ou biochimiques ont été initiées en utilisant la configuration d'un microscope à force atomique dont le principe de fonctionnement repose sur la mesure de la déflexion d'un faisceau laser réfléchi sur la structure mécanique mobile.

Précisons toutefois que les effets physiques ou physico-chimiques à l'origine des variations de propriétés mécaniques des structures mécaniques mobiles dans le cas d'un microscope à force atomique – où les interactions sont localisées au niveau de la pointe à l'extrémité du microlevier –, et d'un capteur chimique ou biochimique – où les interactions sont dans la plupart des cas réparties sur toute la surface de la structure mécanique – sont sensiblement différents.

Cette remarque est importante car nos activités de recherche sont, pour une partie, étroitement liées aux techniques de microscopie à force atomique, à leur développement (techniques dérivées), à l'optimisation de l'interface entre micro- et nano-objets et enfin au développement de capteurs chimiques ou biochimiques. Cette distinction apparaîtra d'ailleurs clairement au fur et à mesure de l'évolution de nos thématiques.

Dans cette partie qui situe le contexte général de nos activités de recherche que nous allons exposer dans la deuxième partie de ce mémoire, il apparaîtra qu'une grande partie des problématiques concernant la microélectronique restent tout à fait pertinentes en ce qui concerne les micro et nanosystèmes mécaniques. Néanmoins, une hiérarchisation des problématiques sera possible dans notre cas lorsque nous aborderons le domaine très spécifique de la chimie et de la biologie. En effet, nous verrons par exemple qu'une très forte intégration en termes de nombre de composants sur une surface donnée n'est pas obligatoirement pertinente lorsqu'on parle de biopuces ce qui fera passer au second plan les problèmes liés à la connectique électrique ou fluidique ou même l'électronique de contrôle et le multiplexage; pour nos applications, des approches très conventionnelles s'avèreront très souvent tout à fait satisfaisantes. En d'autres termes, actuellement la tendance forte qui prévaut dans le domaine des micro et nanosystèmes dédiés à des applications en chimie ou en biologie, c'est la réduction en taille associée à une augmentation de la sensibilité et de la résolution avec une très excellente intégrité du signal plutôt que la densité d'intégration. Dans un contexte plus général, nous verrons que les problématiques liées aux surfaces et interfaces deviennent alors particulièrement marquées lors d'une réduction en taille des dispositifs.

I.1. Miniaturisation des systèmes mécaniques

Dans un article de revue intitulé « Nanoelectromechanical Systems », M.L. Roukes de l'Institut de Technologie de Californie (Caltech) décrit de manière très convaincante le bénéfice d'une réduction en taille des systèmes électromécaniques vers des dimensions submicroniques en privilégiant dans ce cas une approche descendante (top-down) [3]. Une telle réduction permet d'atteindre des fréquences de résonance mécaniques très élevées (plusieurs centaines de MHz voire quelques GHz) avec une sensibilité de détection extrême. A cela s'ajoute une réduction de la puissance consommée qui va de pair avec une réduction des dimensions et la possibilité d'utiliser avantageusement des non-linéarités sans avoir recours à des excitations externes de fortes amplitudes.

Toutefois, l'énumération de ces avantages, inhérents à une réduction en taille des microsystèmes, fait apparaître très clairement plusieurs difficultés. La première concerne **les technologies** qu'il faut mettre en œuvre pour fabriquer de tels systèmes. La seconde a trait à la taille extrêmement réduite de ces systèmes par rapport aux circuits de commande et de mesure qui conduisent à faire face à de véritables goulots d'étranglement au niveau **des interfaces électroniques et des connectiques associées**. La même difficulté se posera pour les connectiques fluidiques. La troisième difficulté est liée au rapport surface/volume qui tend à s'accroître avec la réduction des systèmes ce qui génère **une prédominance des effets de surface par rapport aux effets de volume** sur les réponses mécaniques qu'ils soient intrinsèques (dissipation d'énergie par exemple) ou extrinsèques au système (phénomènes de

surface comme la capillarité par exemple ou encore l'adsorption et la désorption de molécules). Enfin, la dernière difficulté concerne **les caractéristiques opératoires non conventionnelles** (fréquences de fonctionnement extrêmement élevées, bandes-passantes fortement réduites, larges dynamiques de mesure, rapports signal/bruit très faibles...) qu'il faut parfaitement maîtriser.

Si l'on veut s'affranchir de ces difficultés, **des transducteurs ultrasensibles avec des fréquences de fonctionnement extrêmement élevées et des dynamiques de mesure étendues** sont nécessaires. Il faut d'autre part **un contrôle parfait de la qualité de la surface** de ces systèmes mécaniques réduits en taille en ayant recours éventuellement des couches auto-assemblées ou adsorbées (physisorption, chimisorption...) qui permettront de fonctionnaliser leur surface en vue d'une interaction ultérieure dans des conditions optimales avec un milieu à analyser. **Des modes d'actionnement efficaces à l'échelle du nanomètre** doivent être également envisagés. **De nouvelles approches de nanofabrication** (usinages de surface et de volume) permettant de fabriquer ces nanosystèmes mécaniques de manière simple, robuste et parfaitement reproductible doivent être développées. Enfin, pour tous ces aspects, hormis peut-être l'aspect technologique, il faudra avoir recours à **des outils de modélisation et de simulation**.

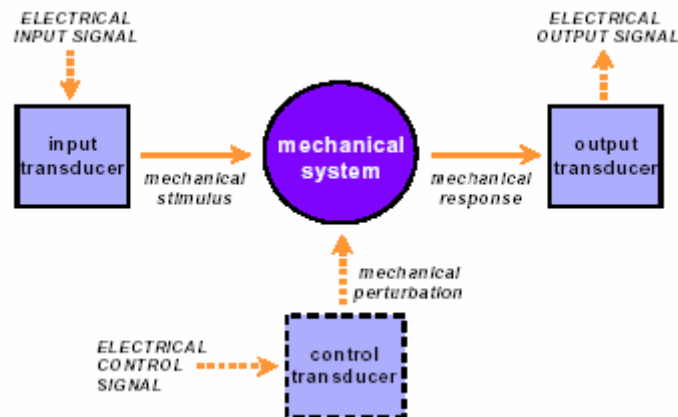


Fig. 1 : Représentation schématique d'un système électromécanique comprenant un signal d'entrée, un signal de sortie et une modulation mécanique. D'après [3]

Un schéma de principe d'un système électromécanique est présenté **Fig.1**. Il comprend un étage d'entrée qui permet de traduire un signal électrique en une variation mécanique, un étage de sortie qui assure la fonction inverse puisqu'il permet de traduire une variation mécanique en un signal électrique et enfin une modulation électromécanique. Cette modulation permet de générer des perturbations électriques quasi-statiques ou variant dans le temps qui sont converties en perturbations mécaniques via une transduction électromécanique. On retrouve ici le schéma de principe d'un transistor où la partie électronique (canal) est remplacée par une partie mécanique. On notera qu'excepté la perturbation mécanique contrôlée qui apparaît sur ce schéma de principe, les perturbations extérieures non contrôlées qui modifient la réponse statique et/ou dynamique du système mécanique ne sont pas représentées. Cette perturbation peut être indésirable (interactions parasites, variation de température, modification de la viscosité...) ou désirée dans le cas où le système mécanique est utilisé comme capteur (pression, accélération, adsorption de molécules en phase liquide ou gazeuse...).

La fonction d'un micro ou nanosystème électromécanique étant d'agir en tant que capteur ou actionneur, son fonctionnement repose sur un principe de transduction

électromécanique. Les transducteurs sont des dispositifs qui transforment une forme d'énergie en une autre forme. Dans le cas des systèmes électromécaniques, c'est l'énergie électrique qui est transformée en énergie mécanique (ou acoustique) et *vice-versa* [4]. Ce caractère de réversibilité n'est pas systématique : certains types de transduction comme celui basé sur le phénomène piézoélectrique permettront d'utiliser le système en tant que capteur et actionneur (en s'appuyant toutefois dans certains cas sur une conception spécifique permettant de découpler efficacement les deux phénomènes); dans le cas de la piézorésistivité, seule la fonction de capteur est envisageable.

I.2. Lois d'échelle pour quelques grandeurs physiques

Comme le souligne fort justement Patrick Tabeling dans son ouvrage « Introduction à la microfluidique », on peut raisonnablement parler de physique à l'échelle micrométrique [5]. En toute rigueur, il s'agira surtout de rendre compte d'un nouvel équilibre de forces car la force de gravité qui prévaut à notre échelle peut être souvent négligée dans le bilan des forces s'appliquant à un objet de taille micrométrique. Ainsi, à l'échelle des microsystèmes et *a fortiori* à celle des nanosystèmes, les forces de surface telles que la capillarité, le mouillage, l'adhésion contribuent largement à instaurer de nouveaux équilibres (ce nouvel équilibre de forces est d'ailleurs essentiel à la formation de suspension colloïdale lors de la mise en solution de nanoparticules). La description macroscopique de tels systèmes devra donc être amendée voire dans certains cas purement et simplement abandonnée. Dans le cas des micro et nanosystèmes mécaniques, il s'agira en particulier de prendre en compte les effets du bruit thermique (mouvement brownien) sur la sensibilité, la résolution ultime ou bien encore les conséquences des pertes dissipatives via la surface sur la réponse du système.

Lorsque l'on veut analyser l'équilibre des forces qui prévaut à une échelle micrométrique ou nanométrique, il est utile d'introduire la notion de loi d'échelle. Il s'agit tout simplement d'une loi de variation de grandeurs physiques avec la taille l du système. Les lois d'échelle de quelques grandeurs physiques sont présentées dans le **tableau I**.

Grandeur physique	Loi d'échelle
Force de Van der Waals intermoléculaire	l^{-7}
Force de Van der Waals entre interfaces	l^{-3}
Force capillaire	l^1
Vitesse d'écoulement	l^1
Puissance thermique transférée par conduction	l^1
Force électrostatique	l^2
Temps de diffusion	l^2
Volume	l^3
Masse	l^3
Force de gravité	l^3
Force magnétique sous champ extérieur	l^3
Force magnétique sans champ extérieur	l^4
Force centrifuge	l^4
Force électrique motrice	l^3

Tableau I : Lois d'échelle pour quelques grandeurs physiques [5]

Une conséquence positive d'une réduction en taille concerne en particulier l'optimisation de dispositifs dont le principe de fonctionnement repose sur l'utilisation d'un

champ électrique. Un des avantages que l'on peut souligner, si on sait s'affranchir des phénomènes de non-linéarités, a trait aux champs électriques très élevés que l'on peut atteindre avec des tensions appliquées du plus en plus faibles via la réduction des distances inter-électrodes. De plus, la miniaturisation des dispositifs électriques permet de réduire l'élévation de température résultant de la production de chaleur par effet Joule [6]. En effet, du fait de l'augmentation du rapport surface/volume, les échanges thermiques avec le milieu environnant sont favorisés ce qui limite l'augmentation de température à champ équivalent.

Plus généralement, d'un point de vue énergétique, la valeur critique pour un système correspond à l'agitation thermique, elle est de l'ordre de $k_B T = 4,21 \times 10^{-21}$ J. Cette valeur met en jeu majoritairement des interactions électrostatiques et de Van der Waals, elle définit d'ailleurs le domaine de la matière molle où les systèmes ont une énergie de cohésion de cet ordre de grandeur. De la même façon, l'énergie typique des phénomènes biologiques est donnée par l'agitation thermique, tandis que la distance d'action est le nanomètre. Le rapport de ces deux quantités correspond à une force de quelques picoNewtons, c'est typiquement cette force qu'il faut développer pour étirer une molécule d'ADN. Cette valeur, extrêmement faible, est difficilement détectable avec les dispositifs de mesure classiques : on a souvent recours dans ce cas à la microscopie à force atomique, aux pinces optiques ou magnétiques.

Nous évoquerons plus précisément ces nouveaux équilibres de forces générés par une réduction en taille dans un paragraphe consacré au cas particulier des micro et nanosystèmes mécaniques utilisés dans le domaine de la chimie et de la biologie.

I.3. Modélisation et simulation

Dans bien des cas, en régime dynamique, nous nous bornerons à étudier un système discret à un degré de liberté ce qui nous permettra de privilégier des approches analytiques en premier lieu (oscillateurs harmonique ou anharmonique en vibration libre ou forcée, amortie ou non amortie). Ces approches peuvent conduire à une résolution directe dans quelques cas (rares il faut en convenir). Dans la plupart des cas, des logiciels de résolution d'un système d'équations comme MATLAB, MATHCAD, MATHEMATICA nous permettront d'obtenir une solution numérique approchée parfois après quelques simplifications le plus souvent obtenues grâce à des procédures de linéarisation ou en définissant des conditions de fonctionnement linéaire en s'affranchissant par exemple des non-linéarités à fortes amplitudes de vibration : effet « Hard Spring » ou « Soft Spring » [7]. Nous aurons recours assez rarement à des simulations numériques de type éléments finis avec les logiciels FEMLAB¹ ou COVENTORWARE² par exemple sauf si le problème se simplifie difficilement (c'est le cas parfois pour l'étude de phénomènes couplés : thermomécanique, piézoélectrique, électrochimique...) ou si l'on veut étudier le comportement du système pour des conditions aux limites très particulières ou bien encore lorsque les procédures de linéarisation sont inexploitable à moins de perdre toute réalité physique pour les phénomènes mis en jeu. Quoiqu'il en soit, avant toute simulation numérique par éléments finis, on prendra soin d'avoir défini approximativement un domaine de convergence qui corresponde à une réalité physique.

Soulignons également que les systèmes discrets peuvent être modélisés au moyen de circuits équivalents basés sur l'analogie avec les systèmes électriques. H.A. Tilmans a

¹ <http://www.comsol.com>

² <http://www.coventor.com>

exploité cette approche très puissante pour les microsystèmes mécaniques dans un article de référence [8-10]. Cette approche est à privilégier pour l'étude et la conception du système complet dans la mesure où elle permet de modéliser sous forme d'équivalents circuits les parties mécaniques et ainsi de faciliter l'étude et la conception du système complet par l'utilisation d'un même type de représentation.

II. Déformations statiques et modes résonants : cas particulier des poutres et des ponts

Deux aspects doivent être pris en compte concernant le comportement mécanique des micro et nanosystèmes. Un régime statique où le comportement du système est intimement lié à la raideur mécanique de sa partie mécanique mobile. Un régime dynamique où le comportement du système est dépendant non seulement de la raideur mais également de la masse effective de la partie mécanique mobile. Ces deux aspects seront illustrés lorsque nous aborderons la partie de ce mémoire consacrée aux capteurs mécaniques.

Comme le montre le **Tableau II**, si l'on considère l'aspect dynamique, la réduction en taille des microsystèmes mécaniques permet d'atteindre aisément des fréquences de résonance de plusieurs centaines de MHz voire de quelques GHz pour des dimensions nanométriques relativement accessibles en utilisant des techniques de nanofabrication bien maîtrisées actuellement. Ces valeurs ont été obtenues pour des structures en silicium monocristallin sans tenir compte des phénomènes d'amortissement et, dans le cas particulier des ponts, en l'absence de contrainte interne. Nous verrons que cette hypothèse est erronée puisque dans la plupart des cas, les micro et nanosystèmes, constitués généralement d'un empilement de plusieurs couches, sont le siège de contraintes internes résiduelles (gradient ou contrainte moyenne) qui modifient très fortement leur comportement mécanique tant d'un point de vue statique que dynamique. Cette influence peut toutefois être utilisée avantageusement pour augmenter la sensibilité de résonateurs mécaniques de type pont. Nous verrons également que l'on peut tirer profit de contraintes de surface générées lors d'interactions biospécifiques dans des configurations bien particulières pour concevoir des capteurs mécaniques extrêmement sensibles dans le cas d'applications en chimie et en biologie.

	<i>Dimension du résonateur (Longueur x Largeur x Epaisseur en μm^3)</i>			
	100x3x0,1	10x0,2x0,1	1x0,05x0,05	0,1x0,01x0,01
Poutre	12 kHz	1,2 MHz	60 MHz	1,2 GHz
Pont	77 kHz	7,7 MHz	380 MHz	7,7 GHz

Tableau II: Fréquences de résonance pour le mode fondamental d'une poutre ou d'un pont en silicium monocristallin en fonction de leurs dimensions. Ces valeurs ont été obtenues en considérant une valeur de 2330 kg/m^3 pour la densité et une valeur de 130 GPa pour le module d'Young. D'après [3].

II.1. Déformations statiques

En l'absence de forces externes (gravitationnelles, électrostatiques ou magnétiques), la déformation d'une poutre peut être reliée sans ambiguïté à un gradient de contraintes mécaniques généré en surface ou dans le volume de la structure. En fonction de l'origine particulière de ces contraintes, des modèles analytiques permettant une analyse quantitative

de la réponse de la structure seront exploitables ou non. A titre d'exemple, des modèles simples reliant contraintes et déformations sont exploitables dans le cas d'une contrainte thermomécanique induite par une réaction chimique ou biochimique exothermique (réaction enzymatique dans la plupart des cas) à la surface d'une structure mécanique composée de deux matériaux dont les coefficients de dilatation thermique sont différents (effet bilame) [11]. En mettant à profit cet effet, Barnes et al. [12] ont obtenu des sensibilités de l'ordre du femtojoule en utilisant des microleviers pour microscopie à force atomique comme calorimètres.

Il est cependant difficile de séparer les effets thermomécaniques des effets de gradients de contraintes pures, dans la mesure où une couche adsorbée sur une surface libre génère également un changement de contrainte en surface [13, 14]. C'est d'ailleurs cet effet de contrainte pure qui est privilégié lorsque l'adsorption d'espèces en surface ne génère pas de variation thermique ou que celle-ci est négligeable. L'adsorption de molécules sur une surface modifie en effet l'énergie libre de surface (aussi appelée tension de surface), la conséquence mécanique observée est alors une flexion due à la contrainte en surface.

Cependant, ces deux notions d'énergie libre de surface et de contrainte surfacique sont bien distinctes [15]. Il faut en effet différencier l'énergie libre de surface γ qui est le travail réversible par unité d'aire nécessaire pour créer de manière plastique une nouvelle surface, c'est-à-dire exposer de nouveaux atomes en surface, et la contrainte de surface σ , travail réversible par unité d'aire nécessaire pour créer par une déformation élastique une nouvelle surface, c'est-à-dire changer la densité d'atomes en surface [16].

L'équation de Shuttleworth permet de relier la contrainte de surface σ à l'énergie de surface libre γ [17]:

$$\sigma = \gamma + \frac{\partial \gamma}{\partial \varepsilon_e} \quad (1)$$

avec ε_e déformation élastique de la surface :

$$\varepsilon_e = \frac{\Delta S_e}{S} \quad (2)$$

où ΔS_e est la variation de la surface S due à la déformation élastique.

Le terme $\frac{\partial \gamma}{\partial \varepsilon_e}$ est nul pour une interface entre deux fluides (liquide ou gazeux), en effet quand un fluide est étiré, de nouveaux atomes ou molécules se déplacent de telle sorte que le nombre d'atomes par unité d'aire demeure constant. De ce fait, l'énergie libre de surface γ est égale à la contrainte de surface σ , on la nomme en général dans ce cas tension de surface.

Dans le cas des solides, ce terme traduit le fait que la surface est élastiquement déformée ce qui modifie la distance inter-atomique qui n'est plus celle qui minimisait initialement l'énergie de surface γ : une modification de l'énergie de surface est donc nécessaire pour passer d'une surface non contrainte à une surface contrainte. Dans ce cas de

figure, $\frac{\partial \gamma}{\partial \varepsilon_e}$ est de l'ordre de grandeur de l'énergie de surface, la contrainte pouvant être positive (tension) ou négative (compression). Obtenir une relation entre l'énergie libre de surface γ et la déformation élastique n'est pas trivial du fait des multiples possibilités de reconstruction de la surface. Il n'est pas aisé en effet d'estimer rigoureusement la contrainte générée par la variation de l'énergie de surface [16] et par conséquent de prédire le comportement d'une structure mécanique libre lors d'une absorption en surface.

NB : Il est important de souligner que, quelle que soit l'origine de la contrainte de surface, dans le cas des microleviers utilisés comme capteurs chimiques ou biochimiques, une des faces doit être passivée pour réduire au maximum les réactions avec la molécule à détecter, l'autre face étant quant à elle fonctionnalisée de manière à être très réactive et très sélective. On voit par là l'importance des traitements de surface qui doivent être localisés dans ce cas précis sous peine de voir la réponse du capteur complètement inhibée par l'apparition de contraintes de même intensité mais de signe contraire sur les deux faces opposées.

Pour tenter d'appréhender finement les mécanismes physico-chimiques qui entrent en jeu lors de la sorption d'une espèce chimique ou biochimique sur une surface et qui conduisent à une variation de la réponse d'une structure mécanique de type poutre en mode statique, il convient de considérer trois modèles distincts correspondant à des configurations bien particulières.

- **Un premier modèle** sera considéré lorsque les interactions entre la surface de la structure et l'environnement impliquent majoritairement des phénomènes de surface. Une espèce chimique ou biochimique interagissant avec une surface peut être simplement physisorbée (faibles énergies de liaison $< 0,1$ eV) ou chimisorbée (fortes énergies de liaison $> 0,3$ eV). La physisorption est en général associée à des interactions électrostatiques, interactions de polarisation mutuelle et liaisons hydrogène entre l'adsorbat et la surface adsorbante ce qui peut conduire à la formation de plusieurs couches. La chimisorption est associée quant à elle à des interactions plus fortes à caractère covalent, ionique ou métallique. Dans ce cas, il y a en général saturation pour des quantités de l'ordre d'une couche monoatomique.

De manière générale, les variations de la contrainte de surface peuvent être attribuées à des variations de l'énergie libre de Gibbs associée au processus d'adsorption. Ainsi, dans la mesure où le processus d'adsorption spontané est généré par un excès d'énergie libre de surface, il est généralement accompagné d'une réduction de la contrainte de surface. En d'autres termes, une surface tend généralement à s'accroître lorsqu'elle est le siège d'un phénomène d'adsorption. Ce type de contrainte de surface est défini comme étant compressif car il conduirait à un état compressif si la surface revenait dans sa configuration initiale (cf. **Fig. 2**).

Il apparaît donc que plus l'énergie surfacique initiale d'une structure est grande, plus le changement de contrainte surfacique induit par une adsorption spontanée sur sa surface est important [18].

Dans ce cas de figure, l'équation de Stoney est généralement utilisée pour exprimer la relation entre la courbure de la structure et les contraintes dans la couche sensible [19] :

$$\frac{1}{R} = \frac{6(1-\nu)}{Et^2} (\Delta\sigma_1 - \Delta\sigma_2) \quad (3)$$

où R représente le rayon de courbure de la microstructure, E le module d'Young, ν le coefficient de Poisson, t l'épaisseur et $\Delta\sigma_1$ et $\Delta\sigma_2$ sont respectivement la variation de contrainte de surface entre la face supérieure et la face inférieure de la microstructure.

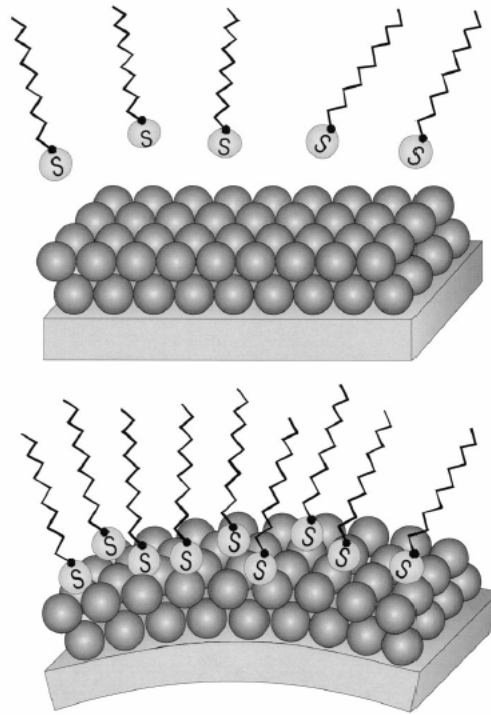


Fig. 2 : Représentation schématique d'une chemisorption de molécules à base de radicaux thiols sur la surface d'une poutre recouverte d'or. Le processus d'adsorption spontané est généré par un excès d'énergie libre de surface, il est généralement accompagné d'une réduction de la contrainte de surface qui se traduit ici par l'apparition d'une contrainte compressive. D'après [2].

A partir de cette expression de la courbure, il devient possible de déterminer la flexion en tout point de la poutre et en particulier la flèche Δz_{\max} (flexion de l'extrémité) :

$$\Delta z_{\max} = \frac{3l^2(1-\nu)}{Et^2}(\Delta\sigma_1 - \Delta\sigma_2) \quad (4)$$

où l représente la longueur de la micropoutre.

NB : Il faut noter que cette équation n'est théoriquement valable que si la contrainte est uniforme dans le plan et l'épaisseur de la couche sensible. Ceci suppose que l'épaisseur de la couche sensible est faible par rapport à l'épaisseur de la structure et que ses dimensions latérales sont importantes par rapport à son épaisseur.

- **Un second modèle** sera pris en compte lorsque la surface de la structure mécanique est modifiée avec une couche active dont l'épaisseur est supérieure à celle de quelques monocouches. Dans ce cas, le mécanisme prédominant qui est à l'origine de la flexion de la structure mécanique peut être décrit comme une déformation due à un gonflement de la couche active sous l'effet de l'interaction avec les molécules présentes dans le milieu environnant (cf **Fig. 3**). Ce type de gonflement peut être décrit en s'appuyant sur des approches développées en science des polymères et des colloïdes où des phénomènes de

contraintes ou de pression générées par des forces électrostatiques, stériques, osmotiques, de solvation... agissent de manière concomitante. Pour simplifier le modèle développé pour de telles approches, il peut être opportun de considérer si la couche active se comporte comme un solide, dans ce cas les effets de contraintes seront prépondérants, ou comme un gel, dans ce cas ce sont les effets de pression qui prédomineront [20]. Le comportement des matériaux à empreinte moléculaire, qui connaissent un essor très important actuellement, correspond à ce type de description [21, 22].

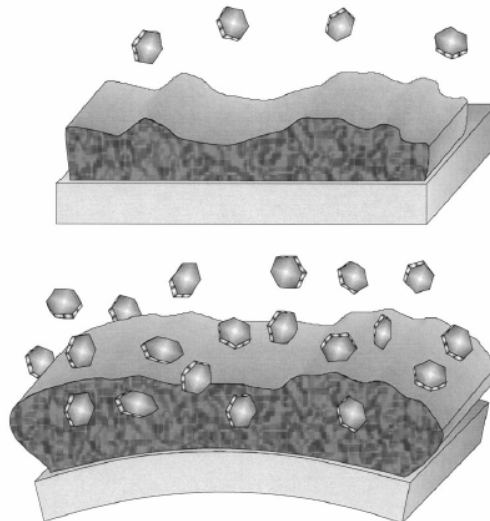


Fig. 3 : Représentation schématique de la déformation d'un microlevier induite par l'adsorption d'un analyte dans une couche perméable préalablement déposée sur la surface du microlevier. D'après [2].

Précisons que la contrainte résultant de l'ensemble de ces forces dans le plan multipliée par l'épaisseur de la couche active donne une variation apparente de la contrainte de surface qui est compatible avec le modèle proposé par Stoney. On notera ainsi que la variation apparente de cette contrainte de surface augmente avec l'épaisseur de la couche active.

- **Le troisième modèle** est plus approprié lorsque la surface de la structure mécanique a été préalablement nanostructurée, par exemple avec une couche de nanoparticules ou de colloïdes. Pour une surface projetée équivalente, cette approche s'avère être extrêmement pertinente pour augmenter la réponse du capteur avec une surface active beaucoup plus importante. Cette configuration facilite en effet une conversion efficace de l'énergie libérée lors de l'interaction chimique ou biochimique en énergie mécanique qui se traduit par une flexion de la structure mécanique. Des études récentes ont montré que la réponse mécanique pouvait être augmentée de deux ordres de grandeur quand la couche active est déposée sur une surface nanostructurée plutôt que sur une surface parfaitement plane [23]. Cette nanostructuration peut consister en une étape de gravure de la surface par faisceau d'ions par exemple ou en un dépôt de monocouches de nanoparticules sphériques sur la surface du microlevier.

De manière générale, les amplitudes de flexion de la structure mécanique induites par de telles couches (ou des couches de type gel) lors des interactions avec les molécules du milieu environnant sont difficilement quantifiables de manière rigoureuse en s'appuyant sur les modèles mentionnés précédemment. Toutefois, il est toujours judicieux de raisonner en terme d'énergie en considérant une valeur maximale de l'énergie disponible après une interaction via les différences forces qui entrent en jeu et en multipliant cette énergie par le

nombre de sites potentiels d'interaction. La conversion de cette énergie en énergie mécanique sera alors obtenue en considérant qu'il y a conservation de l'énergie totale [24].

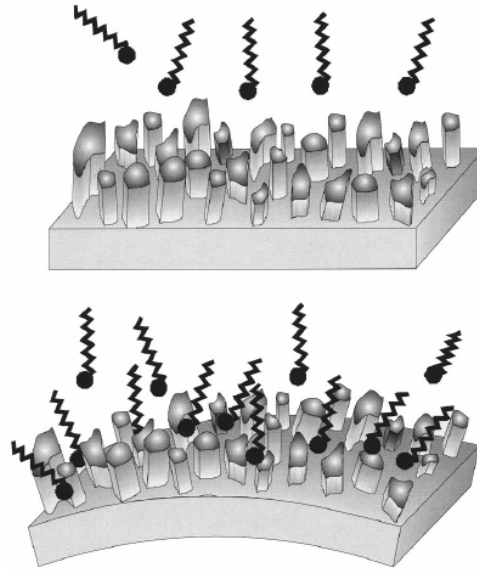


Fig. 4 : Représentation schématique de la déformation d'un microlevier induite par l'adsorption d'un analyte dans une couche préalablement structurée à la surface du microlevier. Dans ce cas, la déformation est due à une combinaison d'effets de surface et de volume. D'après [2].

II.2. Modes résonants

Nous n'aborderons pas ici les équations différentielles aux dérivées partielles permettant de décrire le mouvement de vibration libre d'un système continu à n degrés de liberté dans le cas d'une poutre, nous limiterons notre propos à une description de type oscillateur à un degré de liberté. Cette approche permet en effet d'obtenir de manière très directe des estimations des fréquences propres de résonance d'un système à masse répartie et s'avère extrêmement pertinente pour rendre compte des effets induits par l'adsorption d'une couche de molécules sur les propriétés mécaniques d'un système oscillant.

La pulsation propre de résonance pour le mode fondamental d'une poutre homogène encastree-libre en oscillation libre non amortie est donnée par :

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{0,24m}} \quad (5)$$

où $k = 3\hat{E}I/l^3$ et $\hat{E} = E/(1-\nu^2)$, module d'Young effectif, $I = bh^3/12$ le moment d'aire quadratique, où E est le module d'Young, ν le coefficient de Poisson, l la longueur, b la largeur de la poutre, h son épaisseur et $m = \rho l b h$, sa masse.

Si une masse supplémentaire m_s est ajoutée en bout de poutre, l'expression de la fréquence de résonance devient :

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{(0,24m + m_s)}} \quad (6)$$

Si la masse supplémentaire m_s est ajoutée de façon répartie sur toute la poutre, l'expression de la fréquence de résonance devient :

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{0,24(m + m_s)}} \quad (7)$$

Cette approche suppose qu'on néglige toute modification de la raideur de la structure mécanique lors de l'interaction ce qui n'est pas toujours justifié [25-27].

II.2.1. Paramètres caractéristiques d'un résonateur mécanique

a. Domaine de linéarité

Dans le cas d'un résonateur mécanique utilisé à des fins de détection, le résonateur est excité à une amplitude donnée et les variations de fréquence ou d'amplitude du résonateur sont mesurées en présence de perturbations extérieures. Pour maximiser le rapport signal sur bruit, il faut appliquer une amplitude d'excitation maximale sans donner naissance à des phénomènes non linéaires trop importants. On définit en général une amplitude moyenne rms de vibration $\langle x_c \rangle$ qui permet de rester dans le domaine linéaire. Par exemple, dans le cas d'un levier encastré-encastré (pont), on peut obtenir la relation suivante à partir du critère d'instabilité de Duffing [28] :

$$\langle x_c \rangle = \frac{d\sqrt{2}}{\sqrt{0,528Q(1 - \nu^2)}} \quad (8)$$

où d est l'épaisseur du levier, Q le facteur de qualité et ν le coefficient de Poisson. On montre aisément que dans le cas d'un nanotube de carbone mono-feuillet, cette valeur critique est inférieure au nanomètre ce qui est problématique si on veut rester en régime linéaire avec un rapport signal sur bruit important.

b. Dynamique de mesure

La dynamique de mesure d'un capteur est donnée par le rapport du signal maximal exploitable (sans qu'il ait apparition de phénomène de saturation) et le signal minimal mesurable supérieur à son bruit propre. Plus précisément, elle se définit en décibel comme le rapport entre l'énergie maximale de commande utilisable pour mettre le résonateur en oscillation sans phénomène de saturation et l'énergie thermomécanique $k_B T$:

$$DR(\text{dB}) = 10 \log(E_c / k_B T) \quad (9)$$

avec $E_c = M_{\text{eff}} \omega_0^2 \langle x_c^2 \rangle$, $\langle x_c \rangle$ est l'amplitude de vibration rms du résonateur. On prend en général en considération l'amplitude maximale qui permet de s'affranchir des effets non linéaires.

Il apparaît ainsi que la réduction en taille des nanosystèmes mécaniques permet d'obtenir des dynamiques de mesure très importantes de plusieurs dizaines de dB en régime linéaire.

c. Bande-passante

Pour un résonateur en fonctionnement en boucle ouverte, la bande passante est d'autant plus étroite que le facteur de qualité est élevé. En revanche, dans le cas d'un fonctionnement en boucle fermée dans un circuit de type oscillateur, la bande passante n'est plus limitée par la réponse mécanique du résonateur mais par celle de l'électronique d'amplification.

d. Sensibilité en masse

La sensibilité S d'un capteur est son aptitude à détecter et à amplifier de faibles variations d'une grandeur physique. Dans le cas d'un résonateur mécanique pour la détection de masse, elle peut se définir de la façon suivante :

$$\delta\omega_0 \approx \frac{\omega_0}{2M_{\text{eff}}} \delta M = S \delta M \quad (10)$$

Cette relation implique que le facteur de qualité et la raideur du résonateur ne sont pas affectés par la masse ajoutée. Cette hypothèse est acceptable dans la mesure où $\delta M \ll M_{\text{eff}}$.

Dans l'absolu, on considère que la sensibilité du capteur est donnée par la masse détectable δM_{min} obtenu pour un glissement de la fréquence égal à la moitié de la bande passante de mesure, c'est-à-dire lorsque $\delta\omega_0$ est égal à $\omega_0/2Q$.

On obtient alors la relation suivante pour la sensibilité S du capteur :

$$S \approx \left(\frac{\omega_0}{2M_{\text{eff}}}\right) \left(\frac{2Q}{\omega_0}\right) \approx \frac{Q}{M_{\text{eff}}} \quad (11)$$

Il apparaît donc que la sensibilité en masse d'un résonateur mécanique augmente quand le facteur de qualité augmente et quand la masse effective du résonateur diminue, c'est-à-dire lorsqu'on diminue ses dimensions. Nous avons vu en revanche que le facteur de qualité tend à diminuer lorsque l'on diminue les dimensions du résonateur. Il s'agira donc de trouver un compromis entre diminution de la masse effective et diminution du facteur de qualité.

e. Résolution – masse minimum détectable

La résolution du capteur se définit en considérant le glissement de fréquence minimal que l'on peut mesurer dans un environnement bruité. La limite fondamentale intrinsèque est imposée par le bruit thermomécanique.

Pour des opérations à bande passante finie B et pour une amplitude d'oscillation $\langle w_{\text{osc}}^2 \rangle^{1/2}$, Albrecht et al. [29] ont montré que Δf_{min} peut s'écrire :

$$\langle \Delta f_{\min} \rangle = \frac{1}{2\pi \langle w_{osc}^2 \rangle^{1/2}} \sqrt{\frac{k_B T B f_0}{k Q}} \quad (12)$$

On peut ainsi de définir une masse minimum détectable théorique pour le mode fondamental de résonance donnée par l'expression :

$$\langle \Delta m_{\min} \rangle = \frac{1}{0.24 (2\pi f_0)^{5/2} \langle w_{osc}^2 \rangle^{1/2}} \sqrt{\frac{4kk_B T B}{Q}} \quad (13)$$

Cette relation est valable dans le cas d'une masse ajoutée uniformément répartie sur la surface de la poutre. Le calcul montre ainsi que l'on peut aisément atteindre une masse minimum détectable de l'ordre du femtogramme pour des fréquences de résonance de l'ordre du MHz et des amplitudes de vibration de l'ordre de 50 nm [30].

Cependant, en règle générale, cette masse minimum détectable théorique n'est pas atteinte car d'autres sources de bruit sont à considérer dans le cas des nanorésonateurs notamment celles dues aux fluctuations thermiques (la faible capacité calorifique des nanorésonateurs les rend très sensibles à la moindre variation de température ce qui génère des variations de fréquence de résonance), celles dues aux phénomènes d'adsorption-désorption, au bruit de phase ou encore celles générées par les chocs aléatoires de molécules dans le gaz environnant à la surface du nanorésonateur [31-34]. Quelle que soit la source de bruit prépondérante, on définit ainsi une limite intrinsèque ultime associée au résonateur et à son environnement physique.

La limite réelle sera finalement imposée par la résolution de l'appareil de mesure qui donne la valeur minimale du glissement de fréquence mesurable et également par le bruit de l'électronique associée au capteur. Cette limite réelle permet de définir la résolution du capteur considéré dans sa globalité. Pour des résonateurs en SiC de type pont, Ekinci et al. ont obtenu des sensibilités expérimentales de l'ordre de quelques Hz/attogramme [35].

II.2.2. Pertes énergétiques dans un système mécanique oscillant

Les relations précédentes (cf. § II.2.1) sont couramment utilisées pour estimer la sensibilité en masse d'une poutre en oscillation non amortie, c'est-à-dire oscillant dans le vide. D'un point de vue énergétique, la réponse dynamique d'un microlevier en vibration transversale libre et non-amortie que nous venons d'examiner auparavant se traduit par la transformation cyclique de la totalité de l'énergie potentielle du système en énergie cinétique et inversement, ce qui correspond à un comportement dynamique idéal [36].

Cependant, dans le cas où le système est en oscillation dans un liquide, il convient de prendre en compte, dans la dynamique réelle du système, les mécanismes d'amortissement qui sont responsables de pertes énergétiques pendant la vibration et qui peuvent entraîner un décalage des pulsations de résonance vers des valeurs plus faibles en même temps que la diminution des amplitudes de vibration.

De manière générale, dans le cas de micro et nanosystèmes mécaniques, les mécanismes d'amortissement peuvent avoir cinq sources potentielles :

- l'amortissement de compression (squeeze damping en anglais) ;
- l'amortissement visqueux dû aux interactions avec le milieu environnant ;
- l'amortissement viscoélastique dû aux frictions internes structurales ;
- l'amortissement dû à la dissipation de l'énergie à la surface de la structure ;
- enfin, l'amortissement dû aux pertes énergétiques dans le support de la structure.

Des cinq mécanismes d'amortissement cités, seul l'amortissement visqueux sera considéré comme dominant dans le comportement dynamique des microleviers en oscillation dans un milieu liquide ou dans l'air dans la mesure où l'amortissement de compression peut être négligé si l'espace microlevier – substrat est suffisamment important. Expérimentalement, cette configuration est obtenue aisément dans le cas des micro et nanorésonateurs utilisés à des fins de détection. Dans le vide, en revanche, l'amortissement de compression et l'amortissement visqueux pourront être négligés.

a. Caractéristiques opératoires d'un point de vue énergétique

On peut obtenir la puissance énergétique minimale P_{\min} nécessaire au fonctionnement d'un résonateur mécanique en divisant l'énergie thermomécanique $k_B T$ par le temps caractéristique τ du transfert énergétique entre le mode considéré à la pulsation ω_0 et le milieu environnant. τ est égal à Q/ω_0 . On obtient ainsi l'expression suivante :

$$P_{\min} = \frac{k_B T \omega_0}{Q} \quad (14)$$

Cette valeur représente la puissance minimale qu'il faut injecter dans le système pour obtenir une amplitude de vibration égale à celle engendrée par les fluctuations thermiques. Pour des dimensions submicroniques facilement accessibles avec les techniques de nanofabrication actuelles, il apparaît que cette puissance est extrêmement faible, de l'ordre de quelques attowatts. Si on prend en considération un facteur de 10^6 d'amplification pour obtenir un très bon rapport signal sur bruit et un ensemble de 10^6 résonateurs en parallèle, la puissance nécessaire n'est que de quelques μ watts !

b. Amortissement dû aux frictions internes structurales : amortissement thermo-élastique

Ce mécanisme d'amortissement gouverne le comportement dynamique de toute structure soumise à une contrainte cyclique (mouvement de vibration transversale, par exemple). La flexion d'un microlevier provoque la compression de tous les plans xy positionnés au-dessus du plan longitudinal contenant l'axe central de la structure et la dilatation de tous les plans xy situés en dessous de ce même plan central. Or, une structure qui subit un effort compressif voit sa température augmenter. Inversement, un effort de traction provoque une baisse de température.

Une partie de l'énergie mécanique de vibration est donc irréversiblement transformée en énergie thermique matérialisée par l'apparition d'un gradient de température dans la structure

[37, 38]. Cet effet est d'autant plus marqué que la taille du système est faible [38] mais il peut être masqué par les effets de surface pour des dimensions submicroniques [39].

c. Amortissement dû à la dissipation de l'énergie à la surface de la structure

Il s'agit ici d'un mécanisme d'amortissement qui rend compte d'éventuelles pertes énergétiques par la surface de la structure et qui se manifeste lorsque le rapport surface/volume est important (*e.g.* dans le cas de microleviers ultraminces [40]). Ce phénomène est dû à la redistribution des contraintes mécaniques en surface du microlevier, provoquée par la présence d'une couche fine de contamination ou par l'apparition de dislocations structurelles très localisées. Ainsi, comme la dissipation d'énergie en surface est proportionnelle avec le carré de la déformation maximale intégrée sur toute la surface du microlevier [39], il est clair que la redistribution de la contrainte peut influencer sur le bilan énergétique global du microlevier.

d. Amortissement dû aux pertes énergétiques aux encastremets

Ce type de pertes énergétiques doit être pris en compte si la vibration du système étudié est susceptible de provoquer la vibration du support. Cependant, cet amortissement peut être considéré comme négligeable lorsque ce même support est rigidement fixé. Par ailleurs, Hosaka *et al.* [41] ont montré que, pour des configurations expérimentales où les dimensions du support sont très importantes par rapport à celles de la structure en vibration, le fait de négliger ce type d'amortissement est tout à fait justifié.

En résumé, il apparaît donc que dans le cas d'une réduction en taille de systèmes mécaniques en oscillation dans le vide, la prépondérance des effets de surface va accroître les pertes énergétiques via la surface au détriment des effets de volume (frictions internes). On observe ainsi une diminution du facteur de qualité dans le vide qui peut être corrélée avec l'augmentation du rapport surface/volume comme le montre la **Fig 5**.

En revanche, dans le cas d'un système oscillant dans un liquide ou dans l'air, les pertes par amortissement visqueux seront prépondérantes et masqueront tous les autres types de pertes énergétiques. Dans ce cas, il est possible de relier la fréquence de résonance d'une poutre en vibration avec le facteur de qualité Q :

$$f_{0,Q} = \frac{1}{2^{3/2} \pi} \sqrt{\frac{k}{M_{\text{eff}}}} \frac{\sqrt{2Q-1}}{Q} \quad (15)$$

Une étude détaillée a été publiée par Yasumura *et al.* sur les différents mécanismes de pertes énergétiques pour des micropoutres en vibration [39]. Une étude concernant l'influence de la température sur le facteur de qualité a également été proposée récemment [42].

Plus généralement, la stratégie à mettre en œuvre pour obtenir un facteur de qualité aussi élevé que possible dans le vide est de réduire au maximum les pertes énergétiques. Dans le cas d'une réduction en taille des résonateurs, ces pertes se font préférentiellement via des effets de surface. Un contrôle aussi parfait que possible de la qualité de la surface (rugosité, granulométrie...) via l'optimisation des conditions de dépôt et de recuit de monocouches [39, 43-45] et une passivation des surfaces à l'aide de couches auto-assemblées par exemple sont

des méthodes très efficaces pour réduire les pertes énergétiques via la surface [46-48]. En outre, ces techniques s'avèrent particulièrement pertinentes pour augmenter la durée de vie de tels systèmes et leur fiabilité.

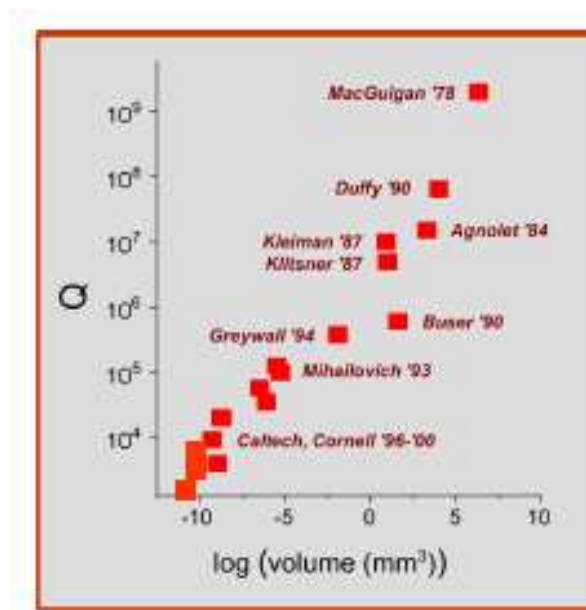


Fig. 5 : Variation du facteur de qualité dans le vide d'un résonateur mécanique en fonction de son volume. On notera que le facteur de qualité diminue lorsque le volume du résonateur diminue, c'est-à-dire lorsque le rapport surface/volume augmente. D'après Roukes [3].

II.3. Intégration de fonctions d'actionnement et de détection

II.3.1. Actionnement

La technique la plus directe consiste à utiliser le bruit thermomécanique associé au mouvement brownien. Dans ce cas, aucune sollicitation extérieure n'est nécessaire car à température non nulle, la microstructure mobile est le siège d'agitation thermique (effet bilame de la couche en silicium (ou dérivés)/métal ou simplement agitation thermique des atomes constituant le levier) qui génère un mouvement aléatoire comparable à un bruit blanc. Malheureusement, cette approche ne permet pas d'obtenir un rapport signal/bruit exploitable dans le plupart des configurations utilisées dans le domaine des capteurs chimiques.

Pour pallier cet inconvénient, plusieurs modes d'actionnement peuvent alors être employés pour générer le mouvement de la microstructure. Les plus répandus sont : l'actionnement piézoélectrique, l'actionnement électromagnétique et l'actionnement électrostatique. Ces trois types d'actionnement intégrés sont des actionnements couramment utilisés dans le domaine des microsystèmes. Nous ne parlerons ici que de l'actionnement piézoélectrique puisque c'est celui que nous avons privilégié pour nos études, il présente en outre l'avantage d'être facilement exploitable en milieu liquide ce qui n'est pas toujours le cas d'une excitation électrostatique par exemple [49, 50].

Dans le cas de l'actionnement piézoélectrique, c'est l'effet inverse du phénomène piézoélectrique qui est exploité. Il se traduit, pour les matériaux piézoélectriques, par une déformation du matériau en présence d'une polarisation électrique. L'actionnement piézoélectrique peut être externe si l'excitation est obtenue à l'aide d'un transducteur

piézoélectrique sur lequel le dispositif est rapporté. C'est cette technique qui est privilégiée dans la plupart des cas.

Il peut être également intégré si le matériau piézoélectrique est partie intégrante de la structure du microactionneur. Dans ce cas, l'actionnement d'une microstructure peut se faire en appliquant une différence de potentiel aux bornes d'un matériau piézoélectrique (PZT, AlN, etc.) déposé sur cette structure : la contraction de la couche piézoélectrique provoque par effet bilame la flexion de la structure. Des nombreux exemples de capteurs chimiques et biochimiques utilisant ce principe d'actionnement ont été proposés dans la littérature [34, 52-54].

Signalons également une autre technique d'excitation prometteuse qui est basée sur un phénomène photothermique [55-57]. Une autre technique reposant sur l'utilisation d'ondes acoustiques a été également proposée par Quate et al. [57, 58] pour exciter un microlevier AFM en milieu liquide. Une technique comparable a été développée par R.H. Blick, elle consiste à utiliser des ondes acoustiques de surface pour exciter le résonateur mécanique [59].

II.3.2. Détection

a. Mesure externe de la flexion

En ce qui concerne les micro et nanosystèmes mécaniques de type poutre ou pont utilisés en tant que biocapteurs, toutes les techniques de détection envisageables pour la mesure de la flexion ont été développées initialement pour la microscopie à force atomique. Dans la plupart des cas, on a recours à une détection optique externe de type déflection laser (Optical Beam Deflection OBD en anglais) dont le principe de fonctionnement consiste à focaliser un faisceau laser sur la partie mécanique en mouvement, le faisceau est alors réfléchi sur un photodétecteur de position comme illustré sur la figure 6. Les variations de l'amplitude de flexion induisent une variation du photo-courant détecté [26, 35, 60-65]. Cette technique permet de mesurer des amplitudes de l'ordre de l'Angstrom pour une bande passante de plusieurs centaines de kHz. Elle suppose cependant de focaliser très précisément le faisceau laser à l'extrémité de la microstructure mobile. Ceci peut s'avérer rédhibitoire dans le cas où plusieurs capteurs sont utilisés en parallèle en milieu liquide.

De manière générale, le problème majeur que l'on rencontre avec les méthodes de détection optiques externes quelles qu'elles soient, réside dans le fait qu'elles font intervenir un ou plusieurs éléments physiques extérieurs au capteur afin de mesurer la flexion de la structure mobile. Suivant la méthode utilisée, cet élément extérieur sera une fibre optique, une diode laser, un photo-détecteur, etc. La réduction de l'encombrement du système complet peut donc s'avérer problématique et reste difficilement compatible avec les tendances actuelles en termes de miniaturisation et d'intégration des microsystèmes en particulier si un système fluide pour acheminer des gaz ou des liquides vers la partie sensible est associé au capteur. Enfin, une détection optique externe ne permet pas de s'affranchir des artefacts optiques liés par exemple à un changement de propriétés du milieu dans lequel se trouve le capteur. Elle est de plus inutilisable en milieu non transparent ou fortement diffusif.

b. Mesure intégrée de la flexion

Pour pallier les problèmes inhérents à l'utilisation d'une détection optique externe, on peut avoir recours dans certains cas à une détection intégrée. Comme nous l'avons souligné

dans l'introduction, les capteurs utilisés sont en général en silicium ou en matériaux dérivés. Le développement des microtechnologies compatibles avec les procédés de fabrication de la technologie CMOS a donc permis d'envisager tout naturellement l'intégration de fonctions de détection sur des microstructures mécaniques. En intégrant la détection, l'utilisation d'une matrice de microcapteurs devient envisageable dans la mesure où un signal électrique propre à chaque capteur est exploitable. Les techniques de multiplexage permettent dans ce cas d'optimiser les temps de réponse du système et le cas échéant de travailler en mesure différentielle avec un capteur de référence.

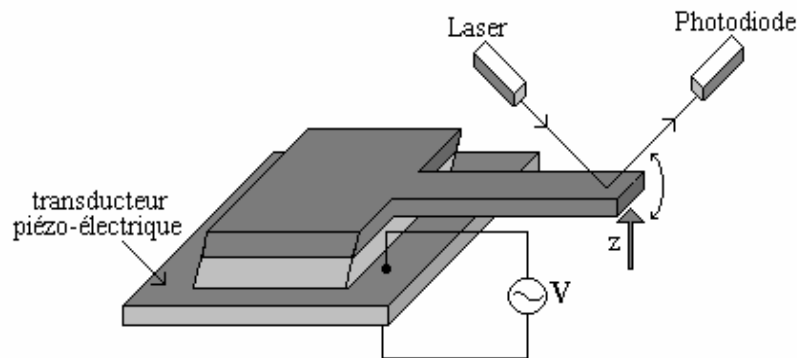


Fig. 6 : Mesure de l'amplitude par déflection optique.

Deux principaux types de détection intégrée sont en général privilégiés : la détection piézoélectrique et la détection piézorésistive. Nous ne parlerons pas ici de la détection capacitive que nous n'avons pas utilisée et qui n'est pas compatible avec des mesures en milieu liquide.

- Détection piézoélectrique

L'effet piézoélectrique direct est un phénomène caractérisé par l'apparition de charges électriques à la surface de certains cristaux lorsqu'ils sont soumis à une contrainte mécanique. Lorsqu'il est utilisé pour des capteurs à microstructures mobiles, cet effet permet de détecter des déplacements de l'ordre du nanomètre [52, 66]. Pour ce type d'application, une couche piézoélectrique (oxyde de zinc ZnO, Titano-Zirconate de Plomb PZT...) est déposée en film mince sur la surface de la microstructure. La flexion de la structure mobile va générer une contrainte dans le film piézoélectrique qui va se traduire par l'apparition de charges.

Il faut noter que ce mode de détection est peu utilisé pour les mesures statiques de flexion à cause de courants de fuites importants mais est par contre bien adapté pour les mesures en mode dynamique.

- Détection piézorésistive

L'approche consiste à intégrer une piézorésistance à la surface de la structure mobile. La déformation de la microstructure engendre une contrainte qui se traduit par une variation de la résistance. Cette approche est souvent privilégiée car elle est simple à mettre en œuvre : il s'agit en effet de réaliser une zone piézorésistive à la surface du silicium (par exemple par dopage localisé). La détection piézorésistive est très largement utilisée pour les capteurs de pression. Dans le domaine de la microscopie à force atomique, ce type de détection a été initialement proposé par Tortonese et al. [67, 68]. Elle a été adaptée depuis avec succès au domaine des capteurs à structure mobile notamment en intégrant la piézorésistance servant à la mesure dans un pont de Wheatstone [69-73].

De manière générale, le problème de la limite technologique et physique concernant la taille des microleviers et des parties actives (effet de miniaturisation sur les propriétés piézoélectriques ou piézorésistives en particulier) se pose inexorablement sachant que le rapport surface/volume devient de plus en plus défavorable : les effets de surface deviennent prépondérants par rapport aux effets de volume (interactions parasites avec le milieu extérieur via la surface, augmentation du bruit, dépolarisation des couches piézoélectriques ...) [31].

III. Vers un système complet : notion d'adressage et architecture générale

Dans un système complet, comme le montre l'exemple de la micro-électronique, c'est la performance de l'ensemble qui conditionne les caractéristiques du système et non celle de chaque sous-partie considérée isolément. Cette remarque reste évidemment valable pour les micro et nanosystèmes mécaniques car ils font partie intégrante d'un système complet. Il faut donc prendre en compte les modules d'assemblage et de conditionnement dès le début de l'étape de conception. Dans la mesure où capteurs, actionneurs, interconnexions, acquisition et traitement du signal, et système de commande sont associés, il faut concevoir l'architecture interne, les entrées-sorties et la relation avec l'environnement. Les contraintes liées aux bandes passantes, à l'utilisation de techniques de multiplexage, à l'utilisation de systèmes de contrôle automatique et/ou robotique, aux faibles rapports signal/bruit et au bruit électronique vont conditionner la réponse globale du système et ses potentialités d'utilisation pour des applications bien spécifiques.

L'expérience récente montre en effet que le développement des micro et nanosystèmes est étroitement lié à la résolution des problèmes de connectiques, d'assemblage et de conditionnement. Plusieurs critères peuvent être utilisés pour définir les performances des micro et nanosystèmes mécaniques et leur compatibilité avec la chaîne de mesure. Il s'agit de caractéristiques purement mécaniques (impédance mécanique), électriques (impédance électrique) ou optiques (adaptation d'indices) [4]. Nous avons été confrontés à ces problèmes lorsqu'une électronique rapprochée a été conçue pour la lecture multiplexée de microleviers piézorésistifs utilisés pour l'élaboration de biopuces. En microscopie à force atomique, les critères d'adaptation d'impédance mécanique sont incontournables car ils conditionnent le choix de la raideur de la pointe en fonction de la dureté de l'échantillon par exemple. Dans d'autres cas au contraire, de fortes variations d'impédances mécaniques entre les parties fixes et les parties oscillantes doivent être privilégiées car elles permettent de limiter les pertes énergétiques via les encastremements pour un système mécanique résonant.

De manière plus générale, les propriétés mécaniques des systèmes que nous étudierons devront être compatibles avec celles de l'objet caractérisé associées à celles du milieu environnant (effets viscoélastiques associés à un milieu liquide par exemple). Ces problèmes d'adaptations mécaniques et électriques ont été abordés dans le cadre de nos activités en particulier celles concernant les résonateurs piézoélectriques utilisés en milieu liquide.

Les limites intrinsèques ultimes que nous avons évoquées précédemment liées au bruit dans un système mécanique seront souvent masquées par le bruit électronique (notamment le bruit en $1/f$ à basses fréquences) des composants et circuits utilisés pour l'acquisition du signal utile. Par exemple, pour un montage électronique de type oscillateur, il est possible d'exprimer le décalage en fréquence Δf_{bruit} dû à une variation de phase $\Delta\theta$ du montage électronique :

$$\Delta f_{\text{bruit}} \approx \frac{f_0 \Delta \theta}{2Q} \quad (16)$$

Ce bruit dépendant de la fréquence de résonance, un fonctionnement à haute fréquence pour augmenter la sensibilité du capteur peut avoir des répercussions néfastes sur la résolution qui est directement liée au rapport du signal délivré par le capteur et du signal dû au bruit.

En revanche, l'ajout d'une contre-réaction électronique positive peut s'avérer bénéfique car elle permet de contrôler le gain et le déphasage du signal entre l'étage d'entrée (excitation) et l'étage de sortie (détection), il est ainsi possible d'ajuster ces deux paramètres pour augmenter le facteur de qualité [74-80].

On montre en effet aisément que pour une valeur de déphasage $\varphi = \pi/2$ dans le cas d'une contre-réaction positive, la fréquence propre de résonance et le gain statique de la micropoutre restent inchangés. En revanche, le facteur de qualité Q est augmenté et devient :

$$Q' = \frac{Q}{1 - G_0 H_0 Q} \quad (17)$$

Le réglage du gain G_0 et du déphasage φ sont critiques pour obtenir une amplification du facteur de qualité (H_0 est le gain statique du système en boucle ouverte). En particulier, une augmentation du gain permet de compenser l'amortissement visqueux subi par la micropoutre mais il ne peut être augmenté indéfiniment sous peine de rendre le système instable. Soulignons également que l'augmentation notable du facteur de qualité que l'on peut obtenir avec cette méthode ne doit pas faire oublier que le montage électronique utilisé génère un bruit supplémentaire qui limite les performances de l'ensemble du système. D'autre part, cette approche reste pertinente seulement si la variation de masse lors de l'adsorption est faible par rapport à la masse totale de la poutre. En effet, si la masse totale de la micropoutre évolue sensiblement au cours du temps, l'hypothèse de base de cette approche qui repose sur une invariance de la fréquence de résonance pour un déphasage $\varphi = \pi/2$ n'est plus valable. Dans ce cas, on a recours à des rétroactions plus complexes qui peuvent limiter la pertinence de ce type d'approche.

Enfin, pour que le système complet soit parfaitement optimisé d'un point de vue de son fonctionnement, il conviendra de contrôler la température avec une précision de l'ordre du dixième de degré voire du centième de degré (c'est la précision avec laquelle sont effectuées les mesures avec le système Biacore³ ou avec le système QCM de QSense⁴). Toutefois, un contrôle de la température avec cette précision n'est pas simple à mettre en œuvre et le recours à une mesure en différentiel entre le capteur sensible et un capteur de référence est le moyen le plus sûr de s'affranchir des variations de température. En outre, cette approche permet de limiter les effets d'autres types d'interactions parasites notamment les interactions non spécifiques dans le cas des biocapteurs.

³ <http://www.biacore.com>

⁴ <http://www.qsense.com>

IV. Quelles stratégies et quelles applications pour les micro et nanosystèmes en chimie et en biologie ?

IV.1. Pertinence d'une réduction en taille en chimie et en biologie

En chimie et en biologie, il est évident qu'une réduction en taille des systèmes utilisés va de pair avec une réduction du volume utile ce qui se traduit tout naturellement par une réduction des coûts. Cette évidence dont la pertinence sur le plan économique est irréfutable ne peut bien évidemment pas justifier à elle seule le développement de nouvelles approches scientifiques et techniques dans le domaine de la chimie et de la biologie.

En fait, l'idée générale qui sous-tend l'utilisation des micro et nanosystèmes mécaniques en chimie et en biologie est qu'une réaction chimique (biochimique ou biologique) peut modifier les caractéristiques mécaniques d'un transducteur mécanique de telle sorte que le changement qui en résulte peut être traduit en un signal électrique ou optique mesurable. Comme nous l'avons souligné précédemment, une réduction en taille des systèmes mécaniques vers des dimensions nanométriques s'accompagne d'une augmentation de la fréquence de résonance du système correspondant à des modes vibrationnels proches de ceux d'un atome ou d'une molécule ce qui rend la détection de quelques atomes ou molécules envisageable. Récemment par exemple, une masse minimum détectable de l'ordre de l'attogramme a été obtenue en utilisant un nanotube de carbone comme structure résonante [81].

En statique, l'utilisation de microleviers a été très largement développée pour la détection de biomolécules en milieu liquide (brins d'ADN, protéines...) à des concentrations inférieures au nM [14, 74, 82-87].

On est donc en droit d'attendre des sensibilités extrêmes avec ce type d'approche. Cependant, il est important de souligner que la détection à l'échelle de la molécule unique suppose de pouvoir s'affranchir des interactions non spécifiques de manière exhaustive, c'est donc avant tout les traitements de surface qui permettront de satisfaire cette condition qui est un des aspects le plus limitant actuellement.

D'un point de vue du biophysicien, pourquoi étudier des molécules uniques ? L'idée générale est d'avoir accès aux fluctuations qui sont noyées dans une mesure d'ensemble. Il y a deux types de fluctuations auxquelles on peut avoir accès : les fluctuations statiques et les fluctuations dynamiques. Les premières permettent de séparer des sous-populations dans un échantillon non homogène ce qui n'est pas possible quand on travaille sur un ensemble de molécules. Les secondes permettent de suivre la dynamique de processus qui ne sont pas synchronisés dans un même échantillon. C'est important si l'on étudie par exemple un moteur moléculaire ou une réaction enzymatique. On peut ainsi avoir accès aux différentes étapes du processus : interactions, réactions, séparations...

Gardons à l'esprit que la détection d'une molécule unique sera associée dans bien des cas à des phénomènes stochastiques très fortement aléatoires (hors équilibre) et non plus statistiques, ce qui pose la question de la représentativité de la mesure [88] mais surtout rend très difficile l'accès à des cinétiques de réaction dans la mesure où les conditions d'équilibre thermodynamique ne sont plus satisfaites. Des artefacts liés aux appareils de mesure peuvent également perturber totalement le signal utile et conduire à des extractions de paramètres entièrement erronées [88].

NB : Cette remarque prend toute sa pertinence pour les applications de type diagnostic médical où les tests sont effectués dans le cadre de normes très strictes sur des volumes de l'ordre du ml. La présence d'une seule bactérie dans ce volume rend le test positif car on considère dans ce cas qu'il y a un risque de prolifération non négligeable. Si on réduit le volume étudié à quelques nl ou fl, la probabilité de détecter cette bactérie devient très faible voire nulle et le test sera négatif. Des étapes préalables pour concentrer l'échantillon à traiter seront donc nécessaires si l'on veut conserver la pertinence du test. Il apparaît donc que la détection d'une molécule unique avec des systèmes ultra-sensibles ne permet pas de s'affranchir d'étapes d'amplification de type PCR ou de préconcentration en ayant recours à des techniques beaucoup plus conventionnelles.

Pour un point de vue plus général, extrêmement pertinent, mettant en avant la nécessité de faire « du nano » sans oublier « le micro » lorsqu'on aborde le domaine des nanobiotechnologies, nous recommandons vivement la lecture de l'article de Georges Whitesides, « *The right size in nanobiotechnology* » publié dans le Journal Nature Biotechnology en 2003.⁵

IV.2. Cas particulier des biopuces et biocapteurs

Dans le cas de la biologie, l'application visée définira un cadre assez strict (biocompatibilité, traitements de surface spécifiques...). Dans le cas particulier des biopuces et des biocapteurs, pour les applications de type **diagnostic**, les critères de **performances** (sensibilité, spécificité) et de coût seront prépondérants. Pour le **criblage haut débit**, la **rapidité** du test pourra se révéler cruciale, alors que la portabilité du système sera accessoire. Au contraire, certaines applications requièrent des **systèmes portables** (légers, peu gourmands en énergie) destinés à être **utilisés sur le terrain** (contrôle de l'environnement, défense,...).

Quel que soit le type d'application visée, pour la fabrication de puces à ADN, à peptides, à protéines, etc., la première étape consiste à structurer la surface utilisée afin de définir des régions fonctionnalisées où seront localisées les interactions biospécifiques. La surface peut être structurée préalablement à la formation de la couche auto-assemblée ou bien la surface est uniformément recouverte du même matériau et le dépôt s'effectue localement sur la surface pour former une couche auto-assemblée sur une région particulière.

L'environnement d'un site de reconnaissance d'une molécule active greffée sur une surface est fortement anisotrope et de ce fait, les propriétés de reconnaissance sont fortement altérées par la présence de la surface. Ainsi, la constante d'association « locale » à laquelle on peut accéder va différer substantiellement de la constante d'association « intrinsèque » obtenue en milieu isotrope, c'est-à-dire en solution à l'équilibre thermodynamique. La détermination de la constante d'association d'une paire ligand-récepteur sur une surface nécessite donc de parfaitement maîtriser la structuration de l'interface à une échelle moléculaire. Ceci est d'autant plus vrai que la surface active du capteur est faible [89].

Trois propriétés fondamentales de cette interface doivent être impérativement contrôlées : (a) la densité de sites de reconnaissance actifs sur la surface ; (b) l'accessibilité à

⁵ Georges Whitesides, « *The right size in nanobiotechnology* », Nature Biotechnology, **21**, 10, pp. 1161-1165, 2003.

ces sites de reconnaissance qui est en général fortement dépendante de la densité de sites ; (c) l'homogénéité de la couche de sites actifs dans le plan de la surface dans le sens où chaque site doit avoir le même environnement.

Un autre aspect qui n'est pas intimement lié aux propriétés de reconnaissance des sites actifs mais qui peut jouer un rôle non négligeable quant à la détermination des constantes d'association, est le contrôle de sites de reconnaissance non spécifiques sur la surface. De manière générale, les biomolécules interagissent au niveau des interfaces via différents types d'interactions non spécifiques comme les forces électrostatiques, de Van der Waals, hydrophobes, stériques, entropiques. Ces forces peuvent être à l'origine de reconnaissances non spécifiques ou causer un enrichissement du nombre de sites de reconnaissance à proximité de la surface. Dans la mesure où il n'est pas possible de supprimer totalement ce type d'interactions non spécifiques, l'introduction au niveau de la surface de forces de répulsion pour contrebalancer ces effets d'attractions est une technique très pertinente. A cette fin, des couches de polymères comme les PEG (polyéthylène glycol) sont souvent utilisées mais cela ne doit pas perturber les propriétés de reconnaissances des sites actifs sur la surface. On voit ici toute l'importance du contrôle de la chimie de surface sans lequel aucune étude rigoureuse n'est envisageable. En annexe II, nous donnons à ce propos quelques stratégies que nous avons mises en œuvre dans le cadre de certaines de nos études.

IV.2.1. Structuration chimique et biochimique sur surface avec motifs prédéfinis

La photolithographie. La première des techniques envisageables, et la plus classique, est la photolithographie. Elle permet de structurer des surfaces avec des motifs de taille micrométrique de nature différente de celle du matériau constituant la surface offrant ainsi la possibilité de réaliser des plots d'or sur une surface d'oxyde de silicium sur lesquels il sera possible de greffer spécifiquement des objets fonctionnalisés *via* la chimie de greffage adéquate. Cette méthode permet d'obtenir simplement et avec une excellente reproductibilité des réseaux de plots. Pour cette raison, elle est incontournable et peut être utilisée, le cas échéant, pour des études préliminaires afin de définir, dans les étapes de greffage, la spécificité d'interaction sur l'or par rapport à l'oxyde de silicium par exemple. Toutefois, cette approche nécessite des équipements particuliers en salle blanche, ce qui constitue un frein à leur mise en œuvre dans des laboratoires de biologie notamment. C'est pour cette raison que d'autres techniques sont actuellement privilégiées: la lithographie douce et la lithographie « dip-pen ».

IV.2.2. Structuration chimique et biochimique par dépôt localisé sur surface uniforme

La lithographie douce. [90] [91] [92]. Cette seconde technique offre la possibilité d'imprimer directement par contact avec une résolution submicronique (**Fig. 7**). Cette technique est basée sur l'utilisation d'un polymère malléable : le polydiméthylsiloxane ou PDMS qui a une longue durée de vie (réutilisable plus de 100 fois), est biocompatible et transparent jusqu'à 300 nm. Après la réalisation d'un masque mère de silicium par des techniques de gravure classiques, la surface est recouverte de PDMS qui est ensuite démoulé afin de réaliser un tampon. L'étape d'impression se fait alors directement par contact. L'avantage le plus important et non négligeable de cette méthode est sa facilité de mise en œuvre, son faible coût de revient pour des résolutions submicroniques. Elle peut être avantageusement utilisée en vue de réaliser des puces destinées à l'analyse de l'interaction récepteur-ligand avec un des composants du complexe greffé sur la surface.

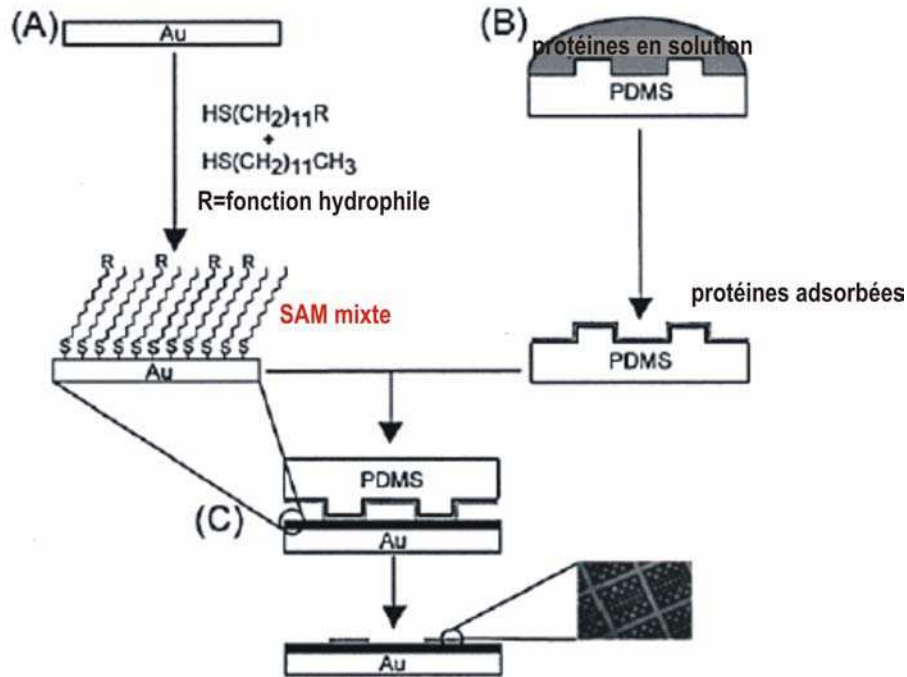


Fig. 7 : Illustration de la méthode de lithographie douce. Une surface d'or est au préalable modifiée par la présence de SAM mixtes présentant des fonctions hydrophiles et hydrophobes (A). La proportion de chacune de deux molécules a été optimisée afin de faciliter le transfert des protéines du tampon de PDMS (B) vers la surface (C). D'après Chen [93].

Une technique dérivée de celle-ci consiste à utiliser des tampons en PDMS pour former des canaux fluidiques en surface de l'échantillon, le contact entre le tampon et la surface est donc permanent dans ce cas. Le passage de solutions différentes dans ces canaux permet de déposer localement des molécules de nature diverse et ce, indépendamment des régions définies par les canaux adjacents [94].

La « dip-pen » lithographie. [95] [91] [96]. L'utilisation d'une troisième technique automatisable peut être également envisagée afin de réaliser des réseaux de plots fonctionnalisés indépendamment les uns des autres : il s'agit du dépôt de type « crayon-plume » ou « dip-pen lithographie ». Ce mode de dépôt, qui a été initialement proposé par H. Butt [95], a été développé par Mirkin et al. [96] [97-99], utilise de manière détournée les microleviers utilisés pour la microscopie à force atomique (**Fig. 8**). La pointe du microlevier est initialement trempée dans la solution à déposer puis positionnée sur la surface; dans une enceinte à atmosphère contrôlée, la condensation qui se forme entre la pointe et la surface permet un dépôt très localisé. Les puces de faible densités (une centaine de spots) ainsi obtenues sont utilisées pour tester l'action d'un substrat vis-à-vis d'un grand nombre de protéines greffées. Cette approche permet de développer des techniques de criblage qui ne peuvent être abordées avec la technique précédente. Des techniques dérivées sont apparues depuis, notamment celles consistant à appliquer un champ entre la pointe et la surface pour effectuer des dépôts assistés par champ [100] [101]. L'électrospray de protéines à partir de ces techniques est également envisageable dans la mesure où le champ appliqué dépasse le champ critique pour obtenir une nébulisation et une atomisation du liquide sous forme de gouttelettes.

Comme nous l'avons déjà précisé, c'est cette approche que nous avons privilégiée avec des améliorations notables notamment en ce qui concerne l'optimisation du chargement du liquide.

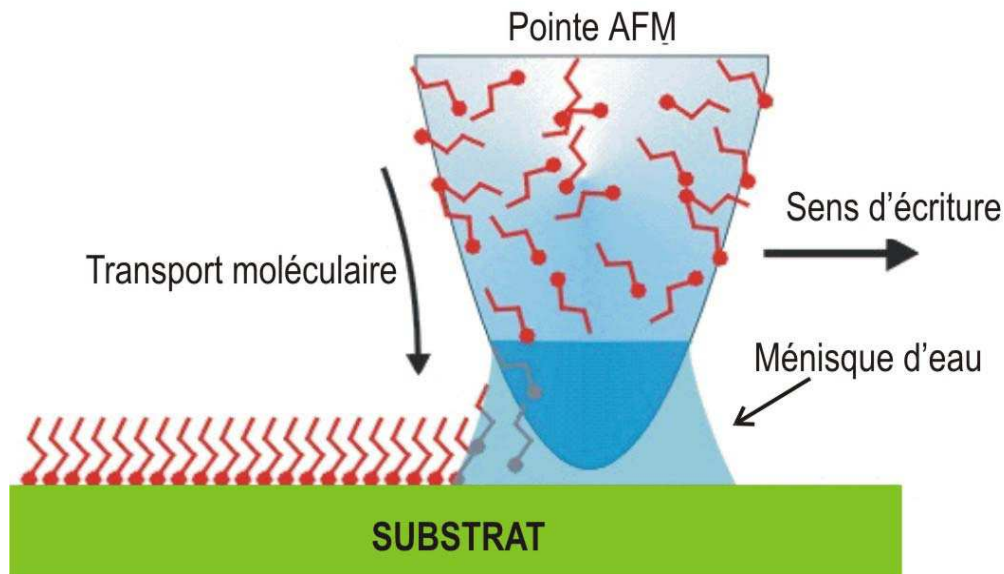


Fig. 8 : Illustration de la méthode « crayon-plume » ou « dip pen » lithographie. Une pointe de microscope à force atomique est initialement trempée dans la solution à déposer puis positionnée sur la surface dans une enceinte à atmosphère contrôlée, la condensation qui se forme entre la pointe et la surface permet un dépôt très localisé. D'après Mirkin et al. [96].

D'autres approches ont été développées notamment celle basée sur l'utilisation de la technique « jet d'encre » mais elles ont montré leur limite en particulier à cause de la complexité des systèmes fluidiques qui leur sont associés. En outre, ces approches ne sont pas compatibles avec une réduction en taille. Il est en effet impossible d'éjecter des gouttes de diamètre inférieur au micron du fait de la limite imposée par la pression de Laplace ($\Delta P = \gamma / 2R$) qui conduirait à appliquer des pressions énormes que ne supporterait pas la buse contenant le liquide.

Soulignons pour conclure cette partie, que dans le domaine des biopuces en particulier pour le criblage, la tendance qui prévaut actuellement est la conception et la fabrication de nanoarrays en utilisant les techniques décrites précédemment [102].

IV.3. Micro et nanofluidique

Nous ne détaillerons pas dans ce mémoire le domaine de la micro et nanofluidique bien trop vaste et qui n'est pas notre thématique principale. Il reste toutefois incontournable pour nos applications, nous donnerons donc quelques exemples illustrant l'importance de phénomènes de surface lors d'une réduction en taille sur les propriétés fluidiques dans le cas de géométries confinées. Nous insisterons également sur l'importance que revêt la conception d'une fluidique parfaitement adaptée au type de micro et nanosystèmes que l'on étudie en particulier pour la détermination des constantes d'association et de dissociation.

IV.3.1. Ecoulements fluidiques en géométries confinées : influence des propriétés de surface

Lorsqu'un diélectrique est immergé dans un électrolyte, une charge de surface peut apparaître spontanément s'il y a protonisation des terminaisons silanes Si-O-H en surface du diélectrique. En fluidique, l'existence de ces charges de surface a des répercussions d'autant plus importantes que le diamètre du canal est faible du fait de l'augmentation du rapport surface sur volume. Il faudra donc veiller à prendre en compte l'influence de ces charges sur les propriétés d'écoulement d'une solution tampon ou d'un électrolyte dans des géométries confinées [5]. En particulier, la présence de ces charges fixes induit une réorganisation des charges mobiles dans un électrolyte sous forme d'une double couche à proximité de la surface chargée dont l'épaisseur est donnée par la longueur de Debye. La présence de cette double couche est d'ailleurs utilisée à profit pour générer un mouvement du fluide par électro-osmose avec des profils de vitesse à l'intérieur du canal qui sont très fortement influencés par le rapport entre le diamètre du canal et l'épaisseur de la double couche.

Ces effets sont également exacerbés dans le cas de l'électromouillage et de la diélectrophorèse⁶ [89, 103-111]. Nous y avons eu recours pour optimiser les propriétés de mouillage de la surface de microleviers lors de leur utilisation pour la fabrication de biopuces. Soulignons également que des phénomènes d'écrantage peuvent apparaître du fait de la présence de cette double couche et perturber les propriétés de reconnaissance de sites actifs sur une surface dans le cas des biocapteurs.

IV.3.2. Détermination des constantes cinétiques d'association et de dissociation : cas particulier où la réaction est limitée par le transfert de masse

Pour accéder aux valeurs des constantes cinétiques intrinsèques (constantes d'association et de dissociation) à partir de mesures obtenues après interaction avec une surface, il est primordial de déterminer si la cinétique d'interaction est limitée par la diffusion (transfert de masse) ou par la réaction en surface. En effet, si la cinétique est limitée par la diffusion – c'est le cas lorsque la constante de diffusion est plus faible que les constantes cinétiques de réaction ou que le nombre de molécules dans la solution est trop faible ou s'appauvrit au cours du temps – les constantes cinétiques globales auxquelles ont accès seront une valeur moyenne incluant les effets de diffusion et de réaction comme illustré sur la figure suivante.

Pour s'affranchir de ce type de phénomènes, deux approches sont possibles. La première est purement technique ou technologique, elle consiste d'une part à concevoir de manière optimale le circuit microfluidique qui permet d'acheminer les molécules en solution vers la surface du capteur et d'autre part à réduire la densité de sites actifs sur cette surface. En effet, les effets de transfert de masse sont particulièrement marqués dans la couche intermédiaire entre la surface et le volume du canal (cf. **Fig. 9**), l'épaisseur de cette couche sera d'autant plus faible que le flux du liquide sera important. En outre, il a été montré qu'en réduisant le nombre de sites de greffage sur la surface on diminuait fortement la probabilité de ré-association après dissociation qui peut conduire à une surestimation de la constante d'association. Tous ces aspects ont été parfaitement identifiés et maîtrisés par la société BIACORE qui commercialise un système de détection basée sur le phénomène de résonance

⁶ <http://www.ece.rochester.edu/users/jones/>

de plasmon. C'est d'ailleurs ces aspects qui ont été brevetés et non pas le principe de détection qui a été mis au point bien avant⁷.

La seconde solution consiste à prendre en compte dans le modèle mathématique décrivant le processus d'interaction les effets de diffusion pour extraire les valeurs intrinsèques des constantes cinétiques. Dans le cas des écoulements et interactions en géométries confinées, cette solution sera incontournable dans bien des cas même en optimisant la conception de la cellule fluïdique.

Ce type d'optimisation, qu'il soit d'ordre technologique ou mathématique, revêt une importance capitale pour extraire les paramètres d'intérêt de manière fiable et ainsi repousser les limites de résolution des nanobiocapteurs [112].

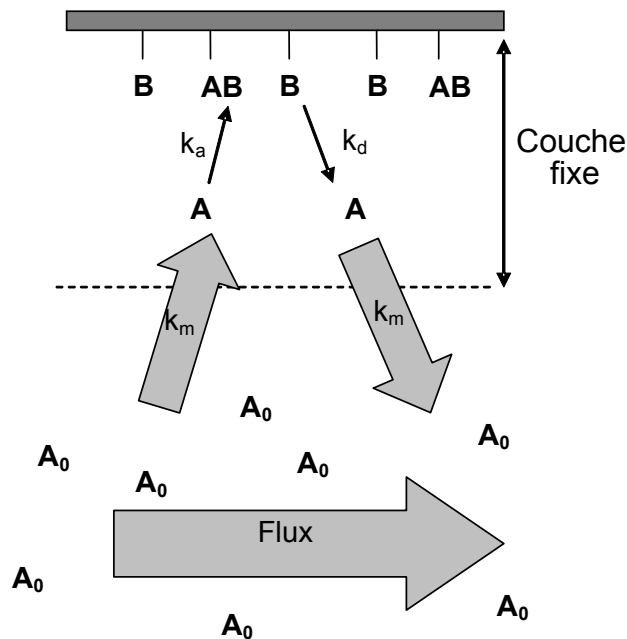


Fig. 9 : Représentation schématique mettant en évidence les phénomènes d'interaction qui entrent en jeu à la surface d'un biocapteur. Le ligand (B) est immobilisé sur la surface du capteur. Durant la phase d'association, l'analyte (A_0) se déplace à proximité de la surface. k_m est le coefficient de transfert de masse utilisé pour décrire le phénomène de diffusion de l'analyte à travers la couche stagnante. k_a et k_d sont les constantes d'association et de dissociation intrinsèques qui décrivent la formation du complexe (AB). D'après Article Cammann [89].

Ajoutons que dans le cas d'auto-organisation de biomolécules ou de nanoparticules sur une surface sans avoir recours à un flux via un système microfluidique, c'est-à-dire lorsque la surface sensible est positionnée dans un cellule liquide faisant office de réservoir sans entrée-sortie, un phénomène supplémentaire lié à la réduction des sites accessibles au cours du temps apparaît ce qui donne naissance à des cinétiques d'adsorption fortement non linéaires [113]. Différents modèles peuvent être utilisés dans ce cas notamment le modèle RSA (Random Sequential Adsorption) qui permet de rendre compte de cet effet [114].

⁷ <http://www.biacore.com>

V. Vers les nanobiotechnologies : domaine où les surfaces et les interfaces jouent un rôle prépondérant

Nous avons souligné dans la partie précédente l'importance du contrôle de la qualité de la surface et des traitements de surface pour l'optimisation de la réponse mécanique des micro et nanosystèmes d'un point de vue énergétique. Dans cette partie, nous parlerons plutôt d'interfaces dont le rôle est d'autant plus marqué que les particules ou molécules sont de petites tailles et en très grand nombre dans une solution liquide [115]. Nous avons vu dans la partie concernant la détection par microlevier en mode statique que l'on pouvait mettre à profit cette influence des interfaces en nanostructurant la surface du capteur (en utilisant par exemple une monocouche de nanoparticules pour augmenter la sensibilité du capteur). Il faut cependant bien garder à l'esprit que les états d'équilibre qui s'instaurent en présence de nanoparticules sont en général fortement instables car ils dépendent fortement des énergies de surface et donc des propriétés du milieu environnant (pH, température, concentration ionique...). Nous allons donc aborder **les lois d'échelle en milieu liquide en définissant quelques longueurs caractéristiques qui conditionnent ces états d'équilibre**.

Il existe une échelle de longueur κ^{-1} en deçà de laquelle la gravité devient négligeable. Cette longueur s'appelle **la longueur capillaire**. Elle est estimée en comparant la pression de Laplace γ/κ^{-1} à la pression hydrostatique $\rho g \kappa^{-1}$. Cette longueur, de l'ordre de 2 mm, permet de définir une limite en deçà de laquelle les effets capillaires sont dominants, un nouvel équilibre de forces s'instaure [116].

La longueur de Debye est également une longueur caractéristique très importante car elle définit la longueur de portée des interactions entre entités chargées dans un milieu liquide en présence de phénomènes d'écrantage [117]. Cette longueur est l'inverse de la constante de Debye κ qui est donnée par la relation suivante :

$$\kappa^2 = \frac{e^2}{\epsilon k T} \sum_i n_i z_i^2 \quad (18)$$

où e est la charge élémentaire de l'électron, ϵ la permittivité du milieu, et n_i et z_i sont respectivement la concentration (en molécules par m^3) et la valence des espèces ioniques i présentes dans la solution. Il est important de noter que cette longueur κ^{-1} décroît avec la concentration en ions d'autant plus rapidement que la valence des ions est élevée. Cette longueur vaut 960 nm pour de l'eau pure (en présence uniquement des ions H_3O^+ et OH^-), de 30,4 nm pour une solution de 10^{-4} M de NaCl et de 0,96 nm pour une solution de 0,1 M de NaCl [118].

Une autre grandeur caractéristique très importante en fluidique, puisqu'elle définit l'épaisseur de la double couche de contre-ions qui se forme lorsqu'un diélectrique est immergé dans un électrolyte, est la **longueur de Debye-Huckel** qui est donnée par la relation suivante :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{D\epsilon}{\sigma}} \quad (19)$$

où σ est la conductivité électrique, ϵ la permittivité diélectrique et D le coefficient de diffusion des ions de la double couche. L'épaisseur de cette couche est de l'ordre de 10 nanomètres pour une solution ionique de sel de 1 mM.

De la même façon, il existe une taille critique en deçà de laquelle la gravité, et donc la sédimentation, devient négligeable par rapport au mouvement brownien dû à l'agitation thermique dont l'ordre de grandeur est kT . Cette taille critique permet de définir dans le cas des nanoparticules **la limite colloïdale** et peut s'écrire sous la forme [118] :

$$R_c = \left(\frac{kT\eta^2}{\rho^3 g^2} \right)^{1/2} \quad (20)$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité, ρ la masse volumique et g l'accélération due à la pesanteur.

On obtient une valeur de l'ordre de 1 μm pour des valeurs courantes de masse volumique et de viscosité ($kT = 4 \times 10^{-21}$ J, $\eta = 10^{-3}$ Pa, $\rho = 10^3$ kg/m³, $g = 10$ m/s²).

Pour des particules dont la taille est supérieure au micron, on parlera de suspensions. Pour une taille inférieure, on parlera de dispersions colloïdales. Elles ne sédimentent pas spontanément (il faut des accélérations supérieures à 10000 g pour séparer phase liquide et phase solide) sauf en cas de floculation lorsque les phénomènes de répulsion électrostatique entre particules sont écrantés (on retrouve ici l'importance de la longueur de Debye telle que nous l'avons définie précédemment) car l'énorme quantité d'interfaces qu'elles contiennent (de l'ordre de 100 m² par gramme de matière) les rend très sensibles à tout phénomène qui modifie les interactions entre interfaces. On passe ainsi facilement d'un état liquide à divers états pâteux, gélifiés, granulaires : les dispersions colloïdales présentent donc des propriétés qui ne sont ni celles de la phase solide ni celles de la phase liquide [119].

Différentes stratégies peuvent être utilisées pour éviter que les particules ne s'agrègent (ou floculent) sous l'effet de l'interaction de Van der Waals. Il s'agit de s'affranchir des phénomènes d'écrantage en conservant les effets de répulsion électrostatique entre particules de manière directe (charges en surface) ou via l'utilisation de polymères chargés (dans les deux cas on parle de stabilisation par répulsion électrostatique DLVO du nom de la théorie proposée par Deryaguin, Landau, Verwey, Overbeek) ou bien en isolant « physiquement » les particules les unes des autres à l'aide de polymères, adsorbés ou greffés sur leur surface, qui jouent le rôle d'espaceurs [118]. Pour illustrer notre propos, signalons que ce phénomène de précipitation lors d'interaction spécifique entre brins d'ADN complémentaires greffés sur des colloïdes a été mis à profit par l'équipe de Chad Mirkin pour la détection de réaction d'hybridation. On passe en effet d'un couleur rose-rouge si la solution reste dispersée c'est-à-dire s'il n'y a pas de réaction d'hybridation ; elle devient gris-noir s'il y a agrégation (floculation), c'est-à-dire s'il y a une réaction d'hybridation [54].

Il sera impératif de garder à l'esprit ces tailles caractéristiques qui conditionnent les états d'équilibre de solutions contenant des nanoparticules. Nous avons été confrontés à ces phénomènes pour toutes les études effectuées en milieu liquide et basées sur l'utilisation de colloïdes métalliques, nanoparticules, quantum dots...

Conclusion

Dans cette première partie, nous avons proposé un état de l'art dans le domaine des micro et nanosystèmes électromécaniques en mettant en exergue les problématiques afférentes à leur réduction en taille en termes de technologies de fabrication, d'électronique associée, de sources de bruit extrinsèques et intrinsèques, de rapport signal sur bruit... Plus spécifiquement, nous avons évalué la pertinence d'une miniaturisation des dispositifs électromécaniques pour des applications dans le domaine de la chimie ou de la biologie en soulignant le rôle prépondérant des effets de surface et d'interface par rapport aux effets de volume: pertes énergétiques, équilibres thermodynamiques, cinétiques de réaction... Le cas particulier des biopuces et des biocapteurs a été ensuite abordé : dynamique de mesure, domaine de linéarité, sensibilité, résolution ultime.

Cet état de l'art nous permet de positionner, sur le plan national et international, nos activités de recherche, dont le bilan est dressé dans la deuxième partie. Il a également pour objectif de justifier le choix de nos orientations thématiques vers le domaine des nanobiotechnologies à plus long terme, ces orientations faisant l'objet d'une dernière partie. Il apparaît en effet que les potentialités des nanotechnologies et nanosciences dans le domaine de la chimie et de la biologie sont énormes mais elles ne doivent pas nous faire oublier, que tout n'est pas nano, comme l'a très bien décrit Georges Whitesides dans son article « *The right size in nanobiotechnology* ». ⁸ En effet, dans certains cas, l'échelle « micro » reste et restera plus pertinente. On songe en particulier aux études concernant les cellules vivantes qui ont des dimensions de quelques microns au minimum ou encore aux outils de diagnostic dont la sensibilité de détection extrême ne doit pas faire oublier le temps d'analyse requis et la représentativité de la mesure lorsque celle-ci est effectuée sur une très faible quantité de solution.

Références

- [1] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, "Atomic force microscope," *Physical Review Letters*, vol. 56, pp. 930-933, 1986.
- [2] N. V. Lavrik, M. J. Sepaniak, and P. G. Datskos, "Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors," *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, pp. 2229-2253, 2004.
- [3] M. L. Roukes, "Nanoelectromechanical Systems," presented at Solid State Sensor and Actuator Workshop, Hilton Head Island, South Carolina, USA, 2000.
- [4] S. Mir, *Dispositifs et physique des microsystèmes sur silicium*. Paris: Hermès Science Publications, 2002.
- [5] P. Tabeling, *Introduction à la microfluidique*. Paris: Belin, 2003.
- [6] M. Frénéa, "Micromanipulation de particules par diélectrophorèse : application au rangement matriciel et au tri de cellules sur puce." Rennes: Ecole Normale Supérieure de Cachan, 2003.
- [7] V. Kaajakari, T. Mattila, A. Oja, and H. Seppa, "Nonlinear limits for single-crystal silicon microresonators," *IEEE Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 13, pp. 715-724, 2004.
- [8] H. A. C. Tilmans, "Equivalent circuit representation of electromechanical transducers: I. Lumped-parameter systems," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, pp. 157-176, 1996.

⁸ Georges Whitesides, « *The right size in nanobiotechnology* », *Nature Biotechnology*, **21**, 10, pp. 1161-1165, 2003.

- [9] H. A. C. Tilmans, "Equivalent circuit representation of electromechanical transducers: I. Lumped-parameter systems," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, pp. 359, 1996.
- [10] H. A. C. Tilmans, "Equivalent circuit representation of electromechanical transducers: II. Distributed-parameter systems," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, pp. 285-309, 1997.
- [11] S. P. Timoshenko, "Analysis of Bi-metal Thermostats," *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 11, pp. 233-255, 1925.
- [12] J. R. Barnes, R. J. Stephenson, M. E. Welland, C. Gerber, and J. K. Gimzewski, "Photothermal spectroscopy with femtojoule sensitivity using a micromechanical device," *Nature*, vol. 372, pp. 79-81, 1994.
- [13] H. Ibach, "The relation between the strain-dependence of the heat of adsorption and the coverage dependence of the adsorbate induced surface stress," *Surface Science*, vol. 556, pp. 71-77, 2004.
- [14] A. Subramanian, P. I. Oden, S. J. Kennel, K. B. Jacobson, R. J. Warmack, T. Thundat, and M. J. Doktycz, "Glucose biosensing using an enzyme-coated microcantilever," *Applied Physics Letters*, vol. 81, pp. 385-387, 2002.
- [15] R. Raiteri, M. Grattarola, H.-J. Butt, and P. Skladal, "Micromechanical cantilever-based biosensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 79, pp. 115-126, 2001.
- [16] H. Ibach, "The role of surface stress in reconstruction, epitaxial growth and stabilization of mesoscopic structures," *Surface Science Reports*, vol. 29, pp. 195-263, 1997.
- [17] R. Shuttleworth, "The Surface Tension of Solids," *Proceedings of the Physical Society. Section A*, pp. 444-457, 1950.
- [18] D. W. Dareing and T. Thundat, "Simulation of adsorption-induced stress of a microcantilever sensor," *Journal of Applied Physics*, vol. 97, pp. 43526-43530, 2005.
- [19] G. G. Stoney, "The tension of thin metallic films deposited by electrolysis," *Proceedings of the Royal Society*, vol. A82, pp. 172-173, 1909.
- [20] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*. New York: Academic Press, 1992.
- [21] K. Yano and I. Karube, "Molecularly imprinted polymers for biosensor applications," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 18, pp. 199-204, 1999.
- [22] K. Haupt and K. Mosbach, "Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors," *Chemical Reviews*, vol. 100, pp. 2495-2504, 2000.
- [23] C. A. Tipple, N. V. Lavrik, M. Culha, J. Headrick, P. Datskos, and M. J. Sepaniak, "Nanostructured microcantilevers with functionalized cyclodextrin receptor phases: Self-assembled monolayers and vapor-deposited films," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 3118-3126, 2002.
- [24] M. F. Hagan, A. Majumdar, and A. K. Chakraborty, "Nanomechanical forces generated by surface grafted DNA," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 106, pp. 10163-10173, 2002.
- [25] T. Thundat, R. J. Warmack, G. Y. Chen, and D. P. Allison, "Thermal and ambient-induced deflections of scanning force microscope cantilevers," *Applied Physics Letters*, vol. 64, pp. 2894-2896, 1994.
- [26] G. Y. Chen, T. Thundat, E. A. Wachter, and R. J. Warmack, "Adsorption-induced surface stress and its effects on resonance frequency of microcantilevers," *Journal of Applied Physics*, vol. 77, pp. 3618-3622, 1995.
- [27] S. Cherian and T. Thundat, "Determination of adsorption-induced variation in the spring constant of a microcantilever," *Applied Physics Letters*, vol. 80, pp. 2219-2221, 2002.

- [28] A. Husain, J. Hone, H. W. C. Postma, X. M. H. Huang, T. Drake, M. Barbic, A. Scherer, and M. L. Roukes, "Nanowire-based very-high-frequency electromechanical resonator," *Applied Physics Letters*, vol. 83, pp. 1240-1242, 2003.
- [29] T. R. Albrecht, P. Grutter, D. Horne, and D. Rugar, "Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity," *Journal of Applied Physics*, vol. 69, pp. 668-673, 1991.
- [30] N. V. Lavrik and P. G. Datskos, "Femtogram mass detection using photothermally actuated nanomechanical resonators," *Applied Physics Letters*, vol. 82, pp. 2697-2699, 2003.
- [31] J. R. Vig and Y. Kim, "Noise in MicroElectromechanical System Resonators," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 46, pp. 1558-1565, 1999.
- [32] A. N. Cleland and M. L. Roukes, "Noise processes in nanomechanical resonators," *Journal of Applied Physics*, vol. 92, pp. 2758-2769, 2002.
- [33] K. L. Ekinci, Y. T. Yang, and M. L. Roukes, "Ultimate limits to inertial mass sensing based upon nanoelectromechanical systems," *Journal of Applied Physics*, vol. 95, pp. 2682-2689, 2004.
- [34] Z. Djuric, O. Jaksic, and D. Randjelovic, "Adsorption-desorption noise in micromechanical resonant structures," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 96, pp. 244-251, 2002.
- [35] K. L. Ekinci, X. M. H. Huang, and M. L. Roukes, "Ultrasensitive nanoelectromechanical mass detection," *Applied Physics Letters*, vol. 84, pp. 4469-4471, 2004.
- [36] S. H. Crandall, "The Role of Damping in Vibration Theory," *Journal of Sound and Vibration*, vol. 11, pp. 3-18, 1970.
- [37] C. Zener, "Internal Friction in Solids. I. Theory of Internal Friction in Reeds," *Physical Review*, vol. 52, pp. 230-235, 1937.
- [38] R. Lifshitz and M. L. Roukes, "Thermoelastic damping in micro- and nanomechanical systems," *Physical Review B (Condensed Matter and Materials Physics)*, vol. 61, pp. 5600-5609, 2000.
- [39] K. Y. Yasumura, T. D. Stowe, E. M. Chow, T. Pfafman, T. W. Kenny, B. C. Stipe, and D. Rugar, "Quality factors in micron- and submicron-thick cantilevers," *IEEE Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 9, pp. 117-125, 2000.
- [40] E. H. Yang, S. S. Yang, and S. H. Yoo, "A technique for quantitative determination of the profile of the residual stress along the depth of p+ silicon films," *Applied Physics Letters*, vol. 67, pp. 912-914, 1995.
- [41] H. Hosaka, K. Itao, and S. Kuroda, "Damping characteristics of beam-shaped micro-oscillators," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 49, pp. 87-95, 1995.
- [42] U. Gysin, S. Rast, P. Ruff, E. Meyer, D. W. Lee, P. Vettiger, and C. Gerber, "Temperature dependence of the force sensitivity of silicon cantilevers," *Physical Review B (Condensed Matter and Materials Physics)*, vol. 69, pp. 45403-45408, 2004.
- [43] J. Yang, T. Ono, and M. Esashi, "Energy dissipation in submicrometer thick single-crystal silicon cantilevers," *IEEE Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 11, pp. 775-783, 2002.
- [44] D. F. Wang, T. Ono, and M. Esashi, "Crystallographic influence on nanomechanics of (100)-oriented silicon resonators," *Applied Physics Letters*, vol. 83, pp. 3189-3191, 2003.
- [45] T. Ono, D. F. Wang, and M. Esashi, "Time dependence of energy dissipation in resonating silicon cantilevers in ultrahigh vacuum," *Applied Physics Letters*, vol. 83, pp. 1950-1952, 2003.

- [46] Y. Wang, J. A. Henry, A. T. Zehnder, and M. A. Hines, "Surface Chemical Control of Mechanical Energy Losses in Micromachined Silicon Structures," *J. Phys. Chem. B.*, vol. 107, pp. 14270-14277, 2003.
- [47] J. A. Henry, Y. Wang, and M. A. Hines, "Controlling energy dissipation and stability of micromechanical silicon resonators with self-assembled monolayers," *Applied Physics Letters*, vol. 84, pp. 1765-1767, 2004.
- [48] Y. Wang, J. A. Henry, D. Sengupta, and M. A. Hines, "Methyl monolayers suppress mechanical energy dissipation in micromechanical silicon resonators," *Applied Physics Letters*, vol. 85, pp. 5736-5738, 2004.
- [49] A. O. Volkov, J. S. Burnell-Gray, and P. K. Datta, "Frequency response of atomic force microscope cantilever driven by fluid," *Applied Physics Letters*, vol. 85, pp. 5397-5399, 2004.
- [50] B. Rogers, T. Sulchek, K. Murray, D. York, M. Jones, L. Manning, S. Malekos, B. Beneschott, J. D. Adams, H. Cavazos, and S. C. Minne, "High speed tapping mode atomic force microscopy in liquid using an insulated piezoelectric cantilever," *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, pp. 4683-4686, 2003.
- [51] B. Rogers, D. York, N. Whisman, M. Jones, K. Murray, J. D. Adams, T. Sulchek, and S. C. Minne, "Tapping mode atomic force microscopy in liquid with an insulated piezoelectric microactuator," *Review of Scientific Instruments*, vol. 73, pp. 3242-3244, 2002.
- [52] B. Rogers, L. Manning, M. Jones, T. Sulchek, K. Murray, B. Beneschott, J. D. Adams, Z. Hu, T. Thundat, H. Cavazos, and S. C. Minne, "Mercury vapor detection with a self-sensing, resonating piezoelectric cantilever," *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, pp. 4899-4901, 2003.
- [53] J. H. Lee, T. S. Kim, and K. H. Yoon, "Effect of mass and stress on resonant frequency shift of functionalized $\text{Pb}(\text{Zr}_{0.52}\text{Ti}_{0.48})\text{O}_3$ thin film microcantilever for the detection of C-reactive protein," *Applied Physics Letters*, vol. 84, pp. 3187-3189, 2004.
- [54] J.-M. Nam, C. S. Thaxton, and C. A. Mirkin, "Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins," *Science*, vol. 301, pp. 1884-1886, 2003.
- [55] N. Umeda, S. Ishizaki, and H. Uwai, "Scanning attractive force microscope using photothermal vibration," presented at The Fifth International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy, Boston, Massachusetts (USA), 1991.
- [56] S. Petitgrand, B. e. r. Courbet, and A. Bosseboeuf, "Characterization of static and dynamic optical actuation of Al microbeams by microscopic interferometry techniques," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, pp. S113-S118, 2003.
- [57] G. M. Kim, S. Kawai, M. Nagashio, H. Kawakatsu, and J. Brugger, "Nanomechanical structures with 91 MHz resonance frequency fabricated by local deposition and dry etching," *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, vol. 22, pp. 1658-1661, 2004.
- [58] F. L. Degertekin, B. Hadimioglu, T. Sulchek, and C. F. Quate, "Actuation and characterization of atomic force microscope cantilevers in fluids by acoustic radiation pressure," *Applied Physics Letters*, vol. 78, pp. 1628-1630, 2001.
- [59] F. W. Beil, R. H. Blick, and A. Wixforth, "Standing acoustic waves imaged by a nanomechanical resonator," *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, vol. 21, pp. 1106-1110, 2004.
- [60] C. A. J. Putman, B. G. De Grooth, N. F. Van Hulst, and J. Greve, "A detailed analysis of the optical beam deflection technique for use in atomic force microscopy," *Journal of Applied Physics*, vol. 72, pp. 6-12, 1992.

- [61] S. Jeon and T. Thundat, "Instant curvature measurement for microcantilever sensors," *Applied Physics Letters*, vol. 85, pp. 1083-1084, 2004.
- [62] M. K. Baller, H. P. Lang, J. Fritz, C. Gerber, J. K. Gimzewski, U. Drechsler, H. Rothuizen, M. Despont, P. Vettiger, and F. M. Battiston, "A cantilever array-based artificial nose," *Ultramicroscopy*, vol. 82, pp. 1-9, 2000.
- [63] F. M. Battiston, J.-P. Ramseyer, H. P. Lang, M. K. Baller, C. Gerber, J. K. Gimzewski, E. Meyer, and H.-J. Guntherodt, "A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance-frequency and bending readout," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 77, pp. 122-131, 2001.
- [64] P. G. Datskos and I. Sauers, "Detection of 2-mercaptoethanol using gold-coated micromachined cantilevers," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 61, pp. 75-82, 1999.
- [65] M. Maute, S. Raible, F. E. Prins, D. P. Kern, H. Ulmer, U. Weimar, and W. Gopel, "Detection of volatile organic compounds (VOCs) with polymer-coated cantilevers," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 58, pp. 505-511, 1999.
- [66] J. W. Yi, W. Y. Shih, and W.-H. Shih, "Effect of length, width, and mode on the mass detection sensitivity of piezoelectric unimorph cantilevers," *Journal of Applied Physics*, vol. 91, pp. 1680-1686, 2002.
- [67] M. Tortonese, H. Yamada, R. C. Barrett, and C. F. Quate, "Atomic force microscopy using a piezoresistive cantilever," presented at Transducers 91, IEEE International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, 1991.
- [68] M. Tortonese, R. C. Barrett, and C. F. Quate, "Atomic resolution with an atomic force microscope using piezoresistive detection," *Applied Physics Letters*, vol. 62, pp. 834-836, 1993.
- [69] A. Boisen, J. Thaysen, H. Jensenius, and O. Hansen, "Environmental sensors based on micromachined cantilevers with integrated read-out," *Ultramicroscopy*, vol. 82, pp. 11-16, 2000.
- [70] R. L. Gunter, W. G. Delinger, K. Manygoats, A. Kooser, and T. L. Porter, "Viral detection using an embedded piezoresistive microcantilever sensor," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 107, pp. 219-224, 2003.
- [71] P. A. Rasmussen, J. Thaysen, O. Hansen, S. C. Eriksen, and A. Boisen, "Optimised cantilever biosensor with piezoresistive read-out," *Ultramicroscopy*, vol. 97, pp. 371-376, 2003.
- [72] A. Hierlemann, D. Lange, C. Hagleitner, N. Kerness, A. Koll, O. Brand, and H. Baltes, "Application-specific sensor systems based on CMOS chemical microsensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 70, pp. 2-11, 2000.
- [73] D. Lange, C. Hagleitner, A. Hierlemann, O. Brand, and H. Baltes, "Complementary Metal Oxide Semiconductor Cantilever Arrays on a Single Chip: Mass-Sensitive Detection of Volatile Organic Compounds," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 3084-3095, 2002.
- [74] M. Alvarez, A. Calle, J. Tamayo, L. M. Lechuga, A. Abad, and A. Montoya, "Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18, pp. 649-653, 2003.
- [75] J. Tamayo, A. D. L. Humphris, and M. J. Miles, "Piconewton regime dynamic force microscopy in liquid," *Applied Physics Letters*, vol. 77, pp. 582-584, 2000.
- [76] A. Mehta, S. Cherian, D. Hedden, and T. Thundat, "Manipulation and controlled amplification of Brownian motion of microcantilever sensors," *Applied Physics Letters*, vol. 78, pp. 1637-1639, 2001.

- [77] G. Muralidharan, A. Mehta, S. Cherian, and T. Thundat, "Analysis of amplification of thermal vibrations of a microcantilever," *Journal of Applied Physics*, vol. 89, pp. 4587-4591, 2001.
- [78] A. Passian, G. Muralidharan, S. Kouchekian, A. Mehta, S. Cherian, T. L. Ferrell, and T. Thundat, "Dynamics of self-driven microcantilevers," *Journal of Applied Physics*, vol. 91, pp. 4693-4700, 2002.
- [79] A. D. L. Humphris, A. N. Round, and M. J. Miles, "Enhanced imaging of DNA via active quality factor control," *Surface Science*, vol. 491, pp. 468-472, 2001.
- [80] J. Tamayo, A. D. L. Humphris, A. M. Malloy, and M. J. Miles, "Chemical sensors and biosensors in liquid environment based on microcantilevers with amplified quality factor," *Ultramicroscopy*, vol. 86, pp. 167-173, 2001.
- [81] V. Sazonova, Y. Yaish, H. Ustunel, D. Roundy, T. A. Arias, and P. L. McEuen, "A tunable carbon nanotube electromechanical oscillator," *Nature*, vol. 431, pp. 284-287, 2004.
- [82] G. H. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote, and A. Majumdar, "Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers," *Nature Biotechnology*, vol. 19, pp. 856-860, 2001.
- [83] J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H. J. Guntherodt, C. Gerber, and J. K. Gimzewski, "Translating biomolecular recognition into nanomechanics," *Science*, vol. 288, pp. 316-318, 2000.
- [84] C. Grogan, R. Raiteri, G. M. O'Connor, T. J. Glynn, V. Cunningham, M. Kane, M. Charlton, and D. Leech, "Characterisation of an antibody coated microcantilever as a potential immuno-based biosensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 17, pp. 201-207, 2002.
- [85] A. M. Moulin, S. J. O'Shea, and M. E. Welland, "Microcantilever-based biosensors," *Ultramicroscopy*, vol. 82, pp. 23-31, 2000.
- [86] S. Cherian, R. K. Gupta, B. C. Mullin, and T. Thundat, "Detection of heavy metal ions using protein-functionalized microcantilever sensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, pp. 411-416, 2003.
- [87] J. J. Headrick, M. J. Sepaniak, N. V. Lavrik, and P. G. Datskos, "Enhancing chemi-mechanical transduction in microcantilever chemical sensing by surface modification," *Ultramicroscopy*, vol. 97, pp. 417-424, 2003.
- [88] C. Amatore, F. Grün, and E. Maisonhaute, "Electrochemistry within a Limited Number of Molecules: Delineating the Fringe Between Stochastic and Statistical Behavior," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 42, pp. 4944 - 4947, 2003.
- [89] K. Cammann, "Sensors and analytical chemistry: Sensitivity versus quality," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 5, pp. 5159 - 5168, 2003.
- [90] R. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D. Ingber, and G. Whitesides, "Patterning proteins and cells using soft lithography," *Biomaterials*, vol. 20, pp. 2363-2376, 1999.
- [91] G. Whitesides and J. Love, "The art of building small," *Scientific American*, pp. 39-47, 2001.
- [92] Y. Xia and G. M. Whitesides, "Soft Lithography," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 37, pp. 550 - 575, 1998.
- [93] J. Tan, J. Tien, and C. Chen, "Microcontact Printing of Proteins on Mixed Self-Assembled Monolayers," *Langmuir*, vol. 18, pp. 519-523, 2002.
- [94] A. Papra, A. Bernard, D. Juncker, N. B. Larsen, B. Michel, and E. Delamarche, "Microfluidic Networks Made of Poly(dimethylsiloxane), Si, and Au Coated with Polyethylene Glycol for Patterning Proteins onto Surfaces," *Langmuir*, vol. 17, pp. 4090-4095, 2001.

- [95] M. Jaschke and H.-J. Butt, "Deposition of Organic Material by the Tip of a Scanning Force Microscope," *Langmuir*, vol. 11, pp. 1061-1064, 1995.
- [96] R. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, and C. Mirkin, "'Dip-Pen' Nanolithography," *Science*, vol. 283, pp. 661-663, 1999.
- [97] L. M. Demers, D. S. Ginger, S. J. Park, Z. Li, S. W. Chung, and C. A. Mirkin, "Direct patterning of modified oligonucleotides on metals and insulators by dip-pen nanolithography," *Science*, vol. 296, pp. 1836-1838, 2002.
- [98] S. H. Hang and C. A. Mirkin, "A nanoplotter with both parallel and serial writing capabilities," *Science*, vol. 288, pp. 1808-1811, 2000.
- [99] S. H. Hong, J. Zhu, and C. A. Mirkin, "Multiple ink nanolithography: Toward a multiple-pen nano-plotter," *Science*, vol. 286, pp. 523-525, 1999.
- [100] D. S. Ginger, H. Zhang, and C. A. Mirkin, "The evolution of dip-pen nanolithography," *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 43, pp. 30-45, 2004.
- [101] S. Kramer, R. R. Fuieler, and C. B. Gorman, "Scanning probe lithography using self-assembled monolayers," *Chemical Reviews*, vol. 103, pp. 4367-4418, 2003.
- [102] K. B. Lee, E. Y. Kim, C. A. Mirkin, and S. M. Wolinsky, "The use of nanoarrays for highly sensitive and selective detection of human immunodeficiency virus type 1 in plasma," *Nano Letters*, vol. 4, pp. 1869-1872, 2004.
- [103] J. Lee, H. Moon, J. Fowler, T. Schoellhammer, and C.-J. Kim, "Electrowetting and electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 95, pp. 259-268, 2002.
- [104] T. B. Jones, "Liquid dielectrophoresis on the microscale," *Journal of Electrostatics*, vol. 51-52, pp. 290-299, 2001.
- [105] T. B. Jones, "On the Relationship of Dielectrophoresis and Electrowetting," *Langmuir*, vol. 18, pp. 4437-4443, 2002.
- [106] T. B. Jones, K.-L. Wang, and D.-J. Yao, "Frequency-Dependent Electromechanics of Aqueous Liquids: Electrowetting and Dielectrophoresis," *Langmuir*, vol. 20, pp. 2813-2818, 2004.
- [107] M. R. King, O. A. Lomakin, R. Ahmed, and T. B. Jones, "Size-selective deposition of particles combining liquid and particulate dielectrophoresis," *Journal of Applied Physics*, vol. 97, pp. 54902-54908, 2005.
- [108] T. B. Jones, M. Gunji, M. Washizu, and M. J. Feldman, "Dielectrophoretic liquid actuation and nanodroplet formation," *Journal of Applied Physics*, vol. 89, pp. 1441-1448, 2001.
- [109] K.-L. Wang and T. B. Jones, "Saturation effects in dynamic electrowetting," *Applied Physics Letters*, vol. 86, pp. 054104-3, 2005.
- [110] H. Moon, S. K. Cho, R. L. Garrell, and C.-J. C. Kim, "Low voltage electrowetting-on-dielectric," *Journal of Applied Physics*, vol. 92, pp. 4080-4087, 2002.
- [111] A. R. Wheeler, H. Moon, C. J. Kim, J. A. Loo, and R. L. Garrell, "Electrowetting-Based Microfluidics for Analysis of Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry," *Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 4833 - 4838, 2004.
- [112] P. E. Sheehan and L. J. Whitman, "Detection Limits for Nanoscale Biosensors," *Nano Lett.*, vol. 5, pp. 803 -807, 2005.
- [113] C. Calonder and P. R. Van Tassel, "Kinetic Regimes of Protein Adsorption," *Langmuir*, vol. 17, pp. 4392 -4395, 2001.
- [114] Z. Adamczyk, B. Siwek, and E. Musial, "Kinetics of Colloid Particle Adsorption at Heterogeneous Surfaces," *Langmuir*, vol. 17, pp. 4529-4533, 2001.

- [115] C. M. Niemeyer and C. A. Mirkin, *Nanobiotechnology : Concepts, Applications and Perspectives*, vol. 1: John Wiley & Sons, 2004.
- [116] P. G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quéré, *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Paris: Belin, 2002.
- [117] M. Laguës and A. Lesne, *Invariances d'échelle: des changements d'états à la turbulence*. Paris: Belin, 2003.
- [118] J. M. di Meglio, "La matière molle," *Techniques de l'Ingénieur*.
- [119] S. Hénon and B. Cabane, *Liquides: solutions, dispersions, émulsions, gels*. Paris: Belin, 2003.

PARTIE II

TRAVAUX ET RESULTATS

1997-2005

Introduction

Nos études ont porté sur la conception, la réalisation et la caractérisation de microsystèmes mécaniques piézorésistifs ou piézoélectriques et s'inscrivent dans le sous-thème « Micro et nanotechnologies, matériaux fonctionnels, instrumentation » de la section 8 du comité national. Les applications visées ont concerné dans un premier temps la caractérisation physique (mécanique, optique et électrique) de nanostructures à l'aide de micro-instruments dédiés. Nous avons ensuite élargi nos applications aux domaines de la chimie et de la biologie en particulier en nous consacrant à l'étude de biopuces de nouvelles générations. Les activités de recherche développées dans le cadre de ces applications s'inscrivent dans le sous-thème « Capteurs et actionneurs, micro et nanosystèmes, microrobotique, biopuces et systèmes « on chip » de la section 8 du comité national.

Nos travaux se déclinent selon les trois aspects suivants : (a) la technologie ; (b) la caractérisation et la modélisation ; (c) enfin les applications en prenant en compte l'aspect système dans sa globalité.

- Les technologies de fabrication :

- La maîtrise des techniques de fabrication de micropointes en silicium ou dérivés du silicium.
- L'optimisation des conditions d'obtention de structures mécaniques (poutres, ponts, membranes)
- Le développement de procédés de fabrication compatibles avec la technologie silicium permettant d'intégrer des fonctions d'actionnement piézoélectrique et de détection piézo-électrique ou piézorésistive sur des microstructures en silicium.

- La caractérisation et la modélisation :

- En statique : Modèle énergétique du flambement spécifique aux ponts micro-usinés, précontraints en compression
- En dynamique : Fréquences de résonance de ponts bicouches en flambement et facteur de qualité de poutres et ponts multicouches en milieux gazeux et liquide.
- Caractérisations électromécaniques de membranes piézo-électriques : extraction du coefficient piézoélectrique
- Mesures en bruit de microleviers piézorésistifs.

- Les applications :

- Caractérisation électrique de nanodispositifs à l'aide d'un testeur sous pointes microfabriqué.
- Connexion optique dans le champ proche avec des microleviers en nitrure de silicium
- Viscosimètre à microleviers
- Résonateurs mécaniques de type pont ou poutre : effet induit par l'adsorption de nanoparticules d'or sur les propriétés mécaniques en régime dynamique
- Résonateurs piézoélectriques en milieu liquide : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or à une interface liquide/solide
- Fabrication de biopuces à ADN et à protéines à l'aide de microleviers

- Electronique rapprochée pour microleviers piézorésistifs : applications à la microscopie à force atomique et à la fabrication de biopuces

I. La technologie : de la fabrication de structures test à la conception de capteurs et actionneurs élaborés

Nos activités n'auraient pu voir le jour sans consacrer un effort particulier au développement de procédés technologiques dédiés à la fabrication de microsystèmes mécaniques. Ces procédés concernent tout d'abord la réalisation de structures simples (des pointes, des poutres, des ponts ou bien encore des membranes), passage obligé pour une maîtrise parfaite d'un procédé technologique — il s'agit de briques de base incontournables — mais surtout pour des études mécaniques rigoureuses avant d'aborder la conception de structures plus élaborées. En effet, l'élaboration parfaitement contrôlée de ce type de structures test revêt une importance toute particulière car elles permettent l'extraction de paramètres mécaniques comme le module d'Young, les contraintes résiduelles dans les couches, etc. en s'appuyant sur des approches analytiques ou semi-analytiques relativement simples. Dans ce cas, le contrôle de la qualité des états de surface et d'interface, de la rugosité, de l'idéalité des encastremements, etc. est primordial si l'on veut accéder de manière fiable à ce type de paramètres notamment lors de la réduction en taille de systèmes mécaniques. Cette approche s'avérera par ailleurs extrêmement pertinente lorsque nous aborderons les études concernant les résonateurs mécaniques de type poutre ou pont utilisés comme détecteur lors de l'adsorption de nanoparticules à une interface solide-liquide. En outre, des études systématiques concernant les propriétés mécaniques de ces structures nous ont permis de concevoir et de réaliser des microleviers parfaitement adaptés à l'adressage mécanique, électrique ou optique de nanostructures comme nous le verrons dans la partie « Applications ».

I.1. Structures test et micropointes

Nous avons donc développé dans un premier temps des structures cantilever simples de type pont ou poutre n'intégrant pas de fonctions d'actionnement et/ou de détection. Ces microstructures mono-couches ou multicouches sont à base de silicium ou de matériaux dérivés du silicium (SiO_2 , SiN_x) ou de couches métalliques (Ti, Au) déposées en film mince, ou d'une combinaison des deux.

Nous ne détaillerons pas ici les procédés de fabrication développés pour élaborer ce type de structures, ils sont décrits de manière exhaustive dans la thèse de Liviu Nicu⁹. Nous mettrons en exergue simplement deux points particuliers concernant d'une part les contraintes résiduelles (gradient et contrainte moyenne) dans les couches en film mince et d'autre part les opérations de rinçage et séchage des microstructures libérées. Ces deux aspects deviennent extrêmement critiques lors d'une réduction en taille de dispositifs à structure mécanique mobile et ont fait l'objet d'études particulières lors de la mise au point des différents procédés de fabrication. Nous avons retrouvé ces problématiques, en particulier celle liée aux contraintes dans les couches, de manière encore plus marquées lors de l'élaboration de microdispositifs piézoélectriques.

Pour certaines applications, nous pensons en particulier à la microscopie à force atomique et à ses techniques dérivées, nous avons dû développer une ou plusieurs étapes technologiques pour l'élaboration de micropointes (cf. **Fig.1**) qui permettent d'assurer une interface idéale entre la surface d'un échantillon à caractériser et le microlevier.

⁹ Liviu Nicu, « Etudes théoriques et expérimentales du comportement mécanique de microstructures de type levier ou pont. Applications à la mesure de la viscosité de liquides et à la caractérisation électrique de nanostructures », Université Paul Sabatier, Toulouse, 12 Octobre 2000.

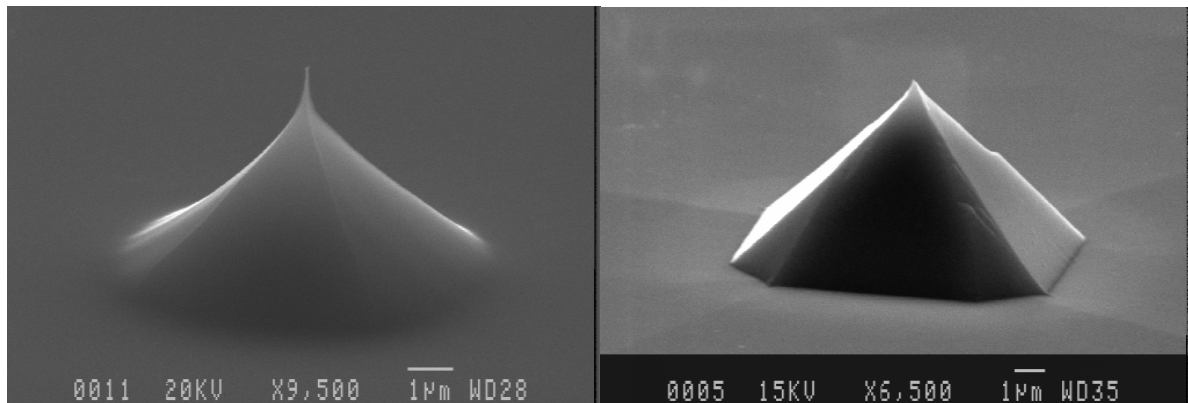


Fig.1 : Exemples de micropointes en silicium : attaque isotrope (à gauche) ; attaque anisotrope (à droite).

I.2. Capteurs et actionneurs

Les étapes préliminaires concernant l'élaboration de pointes en silicium et de structures passives de type pont et poutre étant maîtrisées, nous nous sommes consacrés à la conception et à la fabrication de deux types de dispositifs plus élaborés : les premiers intègrent un actionnement piézo-électrique, les seconds une détection piézorésistive. Ces dispositifs seront notamment utilisés pour des applications en milieu liquide et plus particulièrement pour la biologie.

I.2.1. Dispositifs piézoélectriques

Ces dispositifs sont le fruit d'une collaboration opiniâtre et efficace entre notre équipe au LAAS et l'équipe de Eric Cattan et Denis Rémiens à l'IEMN. Ce fut un travail de longue haleine initié en 1998 mais les résultats obtenus nous ont permis de nous positionner en bonne place sur la scène internationale dans le domaine des microsystèmes piézoélectriques et plus particulièrement pour leurs utilisations comme capteurs en chimie et en biologie.

Les différents procédés de fabrication de dispositifs piézoélectriques sont détaillés dans la thèse de Matthieu Guirardel¹⁰. Nous insisterons simplement sur quelques points particuliers. Tout d'abord, concernant le matériau piézoélectrique, notre choix s'est porté sur le Titanate de Plomb et de Zirconium (PZT : $\text{Pb}(\text{Zr}_x\text{Ti}_{1-x})\text{O}_3$) dans la mesure où il s'agit du matériau piézoélectrique qui possède la coefficient d'actionnement piézoélectrique le plus élevé, d'autres matériaux comme l'AlN ou le ZnO étant beaucoup moins intéressants de ce point de vue. Dans notre cas, ce choix se trouve également justifié par le fait que la couche de PZT est déposée par pulvérisation cathodique sous radio-fréquence magnétron ce qui donne des coefficients piézoélectriques plus élevés que lors d'un dépôt par technique sol-gel, par ablation laser ou encore par MOCVD. Les caractéristiques piézo-électriques de ces couches déposées sur microleviers et micro-membranes sont tout à fait comparables à celles obtenues lors de dépôts pleine plaque. Ces valeurs sont de plus similaires à celles publiées dans la littérature pour des structures équivalentes.

De manière plus générale, la mise au point de ces différents procédés est étroitement liée à la compatibilité technologique de fabrication des différentes couches élaborées à partir

¹⁰ Matthieu Guirardel « Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or ». Université Paul Sabatier, Toulouse, le 9 octobre 2003.

de matériaux de la filière silicium et de matériaux ferroélectriques et piézoélectriques. Ce point a été particulièrement critique pour la fabrication de nos dispositifs nous obligeant à avoir recours à des techniques de lift-off (pas moins de 3 étapes de lift-off pour le procédé complet) pour structurer les couches piézoélectriques sans dégrader leurs propriétés ferroélectriques et piézoélectriques. Nous avons abandonné au passage toutes les techniques de libération des dispositifs reposant sur l'utilisation d'attaques chimiques humides comme le TMAH ou le KOH ; c'est l'acquisition d'un bâti de gravure profonde (DRIE : Deep Reactive Ion Etching) dans la centrale de technologie du LAAS qui nous aura permis de finaliser un procédé de fabrication de dispositifs piézoélectriques extrêmement fiable (cf. **Fig.2**).

Une attention particulière a été également consacrée à la maîtrise de la sélectivité des attaques chimiques entre les différents matériaux lors de la structuration des couches, à la compatibilité thermique lors des recuits et à la réduction des contraintes résiduelles en utilisant des techniques de couches tampons. L'influence de ces couches sur les propriétés électriques a d'ailleurs été étudiée de manière très rigoureuse et systématique lorsque ces dispositifs ont été utilisés non plus seulement en tant qu'actionneur mais également en tant que capteur. En outre, la réduction des capacités parasites dans les lignes d'accès associée à une optimisation de la géométrie des électrodes a dû être envisagée pour que l'acquisition du signal utile s'effectue dans des conditions optimales. Ceci s'est traduit notamment par l'ajout d'une couche tampon en oxyde de zinc (ZnO) entre la couche piézoélectrique PZT et l'électrode métallique supérieure pour réduire les courants de fuite.

Différents types de dispositifs piézoélectriques (poutre, pont et membrane) intégrant des formes d'électrodes variées ont ainsi été fabriqués et caractérisés en vue de leur utilisation pour des applications de type capteur et actionneur (cf. **Fig 3**).

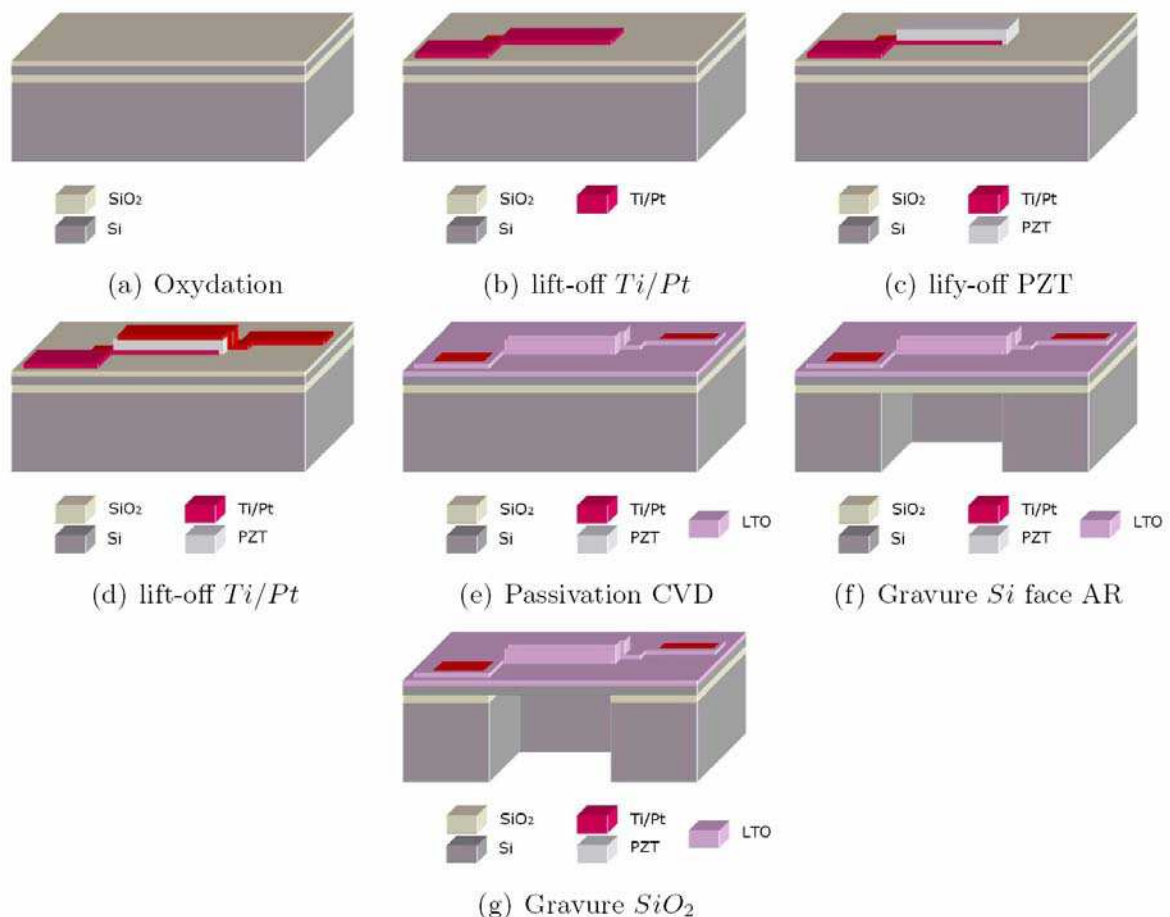


Fig.2 : Procédé de fabrication de microstructures piézoélectriques.

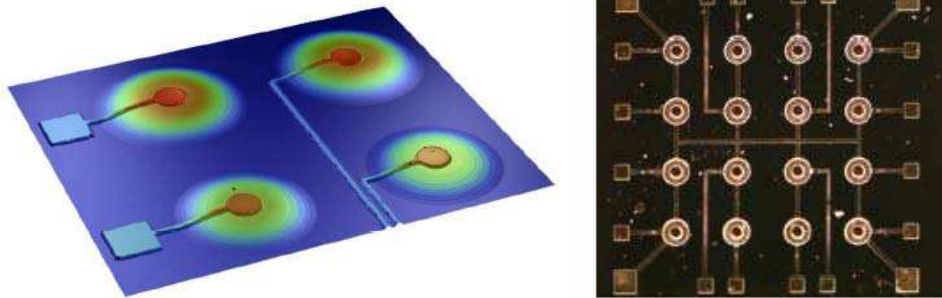


Fig. 3 : Exemples de micromembranes piézoélectriques : (à gauche) Profilométrie optique par interférométrie ; (à droite) Cliché optique d'une matrice de 4 x 4 membranes.

1.2.2. Dispositifs piézorésistifs

Cette étude a été initiée dans la perspective d'une réduction en taille des dispositifs piézorésistifs en vue de leur utilisation en tant que capteur ultra-sensible.

Le développement de procédé de fabrication de dispositifs piézorésistifs nous aura permis de mettre à profit l'expérience du LAAS dans le domaine de la technologie CMOS ultimes et en particulier les résultats issus de mes travaux de thèse qui portait sur l'élaboration et la caractérisation physique et électrique de jonctions p+/n ultra-minces. La technique consistant à implanter du BF₂ dans du silicium préalablement amorphisé par implantation de germanium associée à l'utilisation de recuits thermiques rapides s'est en effet avérée particulièrement efficace pour l'obtention de nanopiézorésistances extrêmement sensibles dont l'épaisseur est inférieure à 90 nm (cf. **Fig. 4**). C'est dans le recours à cette technique que repose l'originalité de notre approche car elle nous a permis de réduire en conséquence les dimensions des dispositifs piézorésistifs. Il s'agissait de trouver les conditions d'implantation et de recuit optimales pour obtenir des jonctions électriquement actives les plus fines possibles présentant d'excellentes propriétés électriques. Toute la problématique réside en fait dans la réduction voire la suppression des défauts étendus, des boucles de dislocations en l'occurrence, qui se forment sous l'ancienne interface amorphe-cristal après recristallisation de la couche amorphisée. Ces défauts sont à l'origine de deux phénomènes très critiques. Le premier a trait à la diffusion hors équilibre anormalement élevée qui apparaît lors du recuit thermique rapide et dont l'origine est liée à la présence de gradients de défauts ponctuels générés par les défauts étendus. La seconde concerne la dégradation des propriétés électriques lorsque ces défauts sont positionnés dans la zone de charge d'espace de la jonction. Des mesures de bruit ont d'ailleurs été effectuées pour caractériser très finement les propriétés électriques de ces piézorésistances.

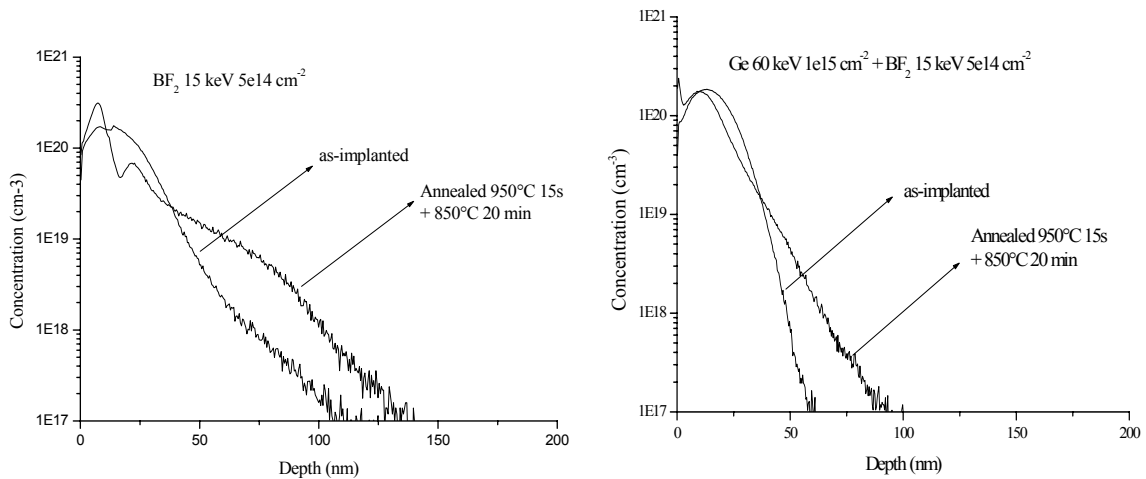


Fig. 4 : Optimisation des étapes d'implantation ionique et de recuit thermique pour l'obtention de couches piézorésistives ultra-minces : (à gauche) : Implantation de BF_2 dans du silicium monocristallin ; (à droite) : Implantation de BF_2 dans du silicium préamorphisé. A noter que les conditions de recuit sont les mêmes dans les deux cas.

Le procédé de fabrication de dispositifs piézorésistifs a été développé dans le cadre de la thèse d'Emeline CochetEAU¹¹. Ce procédé de fabrication a été repris et amélioré par Daisuke Saya lors de son séjour post-doctoral au LAAS (cf. **Fig.5**). Il est maintenant parfaitement maîtrisé et développé pour différents types d'applications comme nous le verrons dans la suite (cf. **Fig.6**).

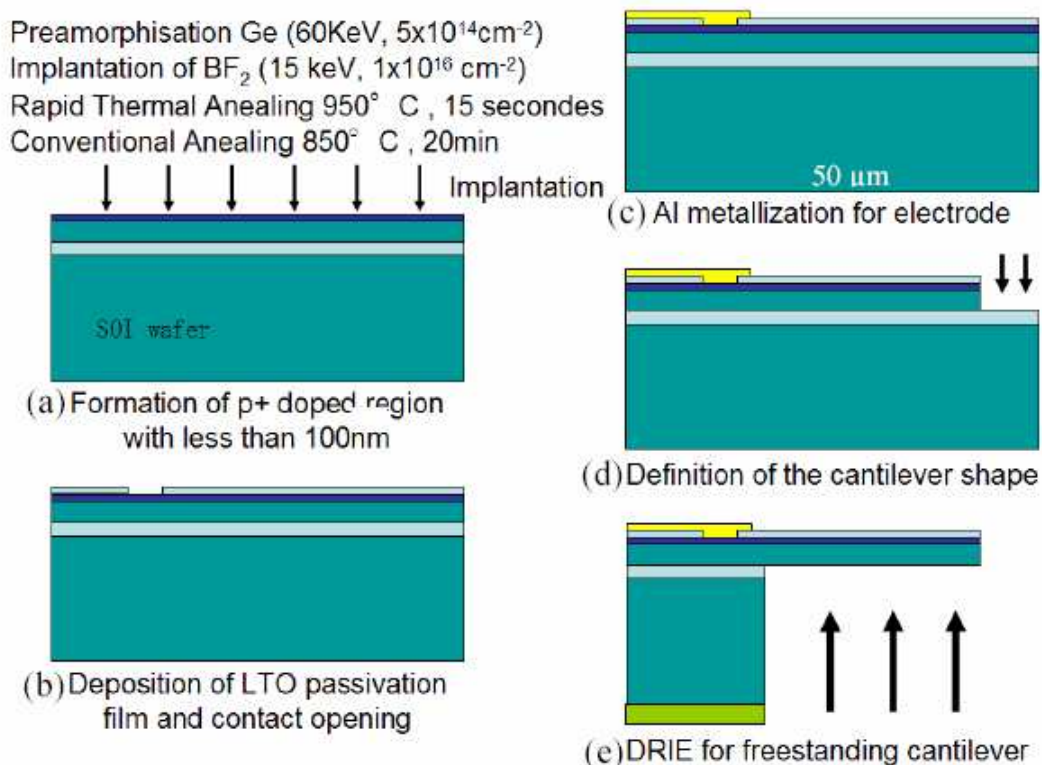


Fig. 5 : Procédé de fabrication de microleviers piézorésistifs à jonctions p+/n ultra-minces (< à 100 nm).

¹¹ Emeline CochetEAU « Conception, réalisation et caractérisation de piézorésistances ultraminces pour des applications microsystèmes », INSA de Toulouse, le 18 mars 2002.

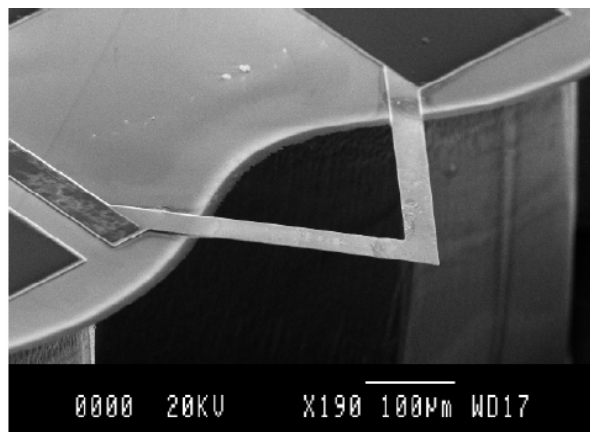
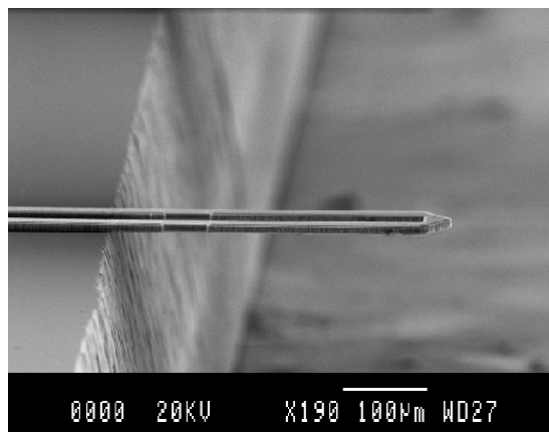


Fig. 6 : Images obtenues par microscopie électronique à balayage de microleviers piézorésistifs de forme différente.

I.3. Quelques publications marquantes concernant les aspects technologiques

E. Cattan, T. Haccart, G. Velu, D. Remiens, C. Bergaud, L. Nicu, « *Piezoelectric properties of PZT films for microcantilever* », Sensors and Actuators A Physical 74, pp. 60-64,1999.

E. Cocheteau, C. Bergaud, B. Belier, L. Bary, R. Plana, « *Formation of ultra-shallow p+/n junctions with BF₂ implantation for the fabrication of improved piezoresistive cantilevers* », Transducers'2001/Eurosensors XV, Munich, 10-14 juin 2001, pp. 1070-1073.

C. Bergaud, E. Cocheteau, L. Bary, R. Plana, B. Belier, « *Formation of implanted piezoresistors under 100-nm thick for NanoElectromechanical Systems* », 15th IEEE Micro-ElectroMechanical Systems (MEMS) Conference, Las Vegas, 20-24 Janvier 2002, pp 360-363.

Thèse de Liviu Nicu, « *Etudes théoriques et expérimentales du comportement mécanique de microstructures de type levier ou pont. Applications à la mesure de la viscosité de liquides et à la caractérisation électrique de nanostructures* », Université Paul Sabatier, Toulouse, 12 Octobre 2000.

Thèse de Emeline Cocheteau « *Conception, réalisation et caractérisation de piézorésistances ultraminces pour des applications microsystèmes* », INSA Toulouse, le 18 mars 2002.

Thèse BDI de Matthieu Guirardel « *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or* ». Université Paul Sabatier, Toulouse, le 9 octobre 2003.

C. Bergaud, B. Belier, A. Martinez, L. Nicu, E. Cocheteau, « *Matrice de biocapteurs et son procédé de fabrication* », Brevet européen, Extensions internationales WO 20040185592 – « *Biosensor matrix and method for making same* », août 2004.

II. Caractérisation et modélisation

Nous avons mis en évidence dans notre introduction le fait qu'une étude rigoureuse et systématique du comportement mécanique de microstructures était un passage obligé pour appréhender ultérieurement le comportement mécanique de microsystèmes plus complexes lorsqu'ils sont soumis à des perturbations externes. Cette étude sera d'autant plus pertinente que les moyens d'investigation mis en œuvre perturberont le moins possible la réponse spécifique du système étudié. C'est la raison pour laquelle notre choix s'est porté sur une méthode de caractérisation qui repose sur l'utilisation d'une excitation (piézo-électrique) et une détection (par déflexion optique) de vibration, toutes deux *externes aux microstructures*. Pour notre banc expérimental, nous avons utilisé une configuration très similaire à celle utilisée pour un microscope à force atomique avec une détection synchrone dont la bande passante est de l'ordre du MHz. En outre, l'acquisition d'un interféromètre optique à décalage de phase donnant accès à des topographies en mode statique et dynamique nous a permis de parfaire notre connaissance des propriétés mécaniques de microstructures multi-couches.

D'un point de vue modélisation, des méthodes énergétiques ou analytiques directes ont été utilisées. Dans certains cas, nous avons eu recours à MATLAB, MATHCAD et MATHEMATICA, logiciels de résolution d'équations mathématiques.

II.1. Mode statique : modèle énergétique du flambement spécifique aux ponts micro-usinés, précontraints en compression

Cette étude, dédiée à l'analyse théorique et expérimentale du régime statique de microponts soumis à une précontrainte compressive, a été développée en procédant tout d'abord à l'analyse théorique du flambement d'un pont microfabriqué, précontraint en compression. Une utilisation non conventionnelle d'un microscope à force atomique a ensuite été mise en œuvre pour la mesure de la déflexion statique de flambement des ponts en SiO₂ et en SiO₂-Au. Enfin, à partir des profils des déformées des ponts en régime de post-flambement, la contrainte interne compressive du SiO₂ à partir des déflexions maximales de flambement et à l'aide du modèle énergétique proposé a été déterminée.

Nous ne reprendrons pas ici ces différents points qui ont été abordés dans cette étude. Nous donnerons simplement les discussions et les conclusions qui en sont issues. Tout d'abord, la valeur moyenne de la contrainte interne compressive du SiO₂ obtenue avec le modèle énergétique proposé (cf. **Fig. 7**), est en très bon accord, malgré une légère surestimation, avec différentes valeurs théoriques et expérimentales rencontrées dans la littérature où le comportement statique *non-linéaire* de ponts précontraints en compression est modélisé en prenant en compte les effets des imperfections de fabrication (encastrement non-idéal, défauts induisant une répartition arbitraire de la contrainte, etc.).

On a pu noter également que la contrainte interne du SiO₂ calculée à l'aide de notre modèle énergétique se situe dans la gamme de valeurs rencontrées dans la littérature. Les sources d'erreur potentielles de la méthode proposée ici se situeraient au niveau de l'équation de la déformation du pont $z(x)$ et de la mesure de la déflexion maximale de flambement A_{max} .

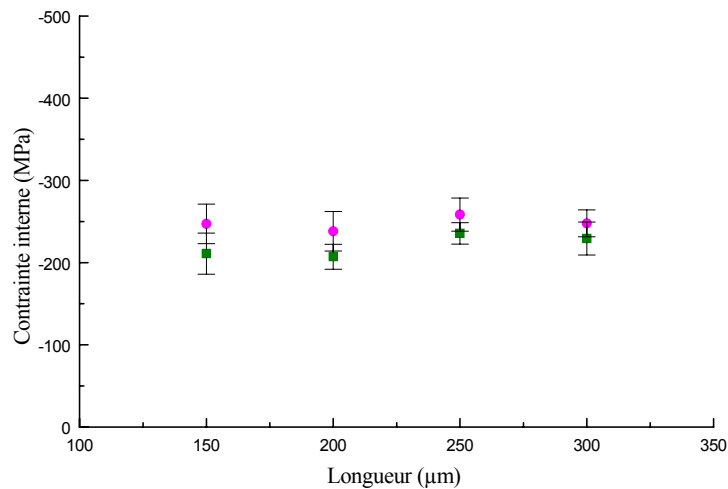


Fig. 7 : La contrainte interne σ du SiO_2 en fonction de la longueur des ponts pour une épaisseur de (■) $0,62 \mu\text{m}$ et (●) $0,45 \mu\text{m}$. Ainsi, la valeur moyenne mesurée de la contrainte interne du SiO_2 est respectivement égale à $\sigma_{h=0,45\mu\text{m}} = -247 \pm 8 \text{ MPa}$ et $\sigma_{h=0,62\mu\text{m}} = -220 \pm 13 \text{ MPa}$.

Mais plus vraisemblablement, c'est le fait de ne pas tenir compte des imperfections de fabrication des ponts dans notre modèle énergétique qui a pu conduire, finalement, à une légère surestimation de la contrainte interne compressive. D'autres sources potentielles d'erreur concernent :

- les procédés d'élaboration du SiO_2 ,
- les orientations des substrats utilisés,
- les techniques de mesure de la contrainte,
- les épaisseurs des couches de SiO_2 ,

Cependant, nous retiendrons la ressemblance des deux valeurs de contrainte calculées par deux moyens différents comme première preuve à l'appui du modèle énergétique proposé ici.

Ainsi, la méthode énergétique des ponts en régime de post flambement représente une alternative valable pour la détermination, à partir de la déflexion maximale de flambement, de la contrainte interne des films minces précontraints en compression. De plus, cette approche permet de calculer la contrainte interne autant de fois qu'il y a de ponts disponibles, pour le même film mince analysé. Ceci est, de point de vue statistique, l'avantage crucial de la méthode énergétique par rapport aux techniques classiques utilisées pour la mesure des contraintes dans les films minces. Nous pouvons ainsi associer la méthode énergétique en toute confiance à l'ensemble des méthodes de mesure de la contrainte à partir des déformations de microstructures fabriquées dans le film mince à analyser.

II.2. Mode dynamique

II.2.1. Fréquences de résonance de ponts bicouches SiO₂/Au en flambement

Le régime dynamique théorique des ponts précontraints en compression a été traité à l'aide de la méthode directe analytique proposée dans la littérature. L'application de cette méthode aux ponts bicouches en SiO₂-Au en régime de post-flambement et en vibration nous a permis de prédire l'inversion des modes propres 1 et 2, mais également des modes 3 et 4, en fonction des déflexions maximales de flambement. Nous avons mis en évidence expérimentalement, pour la première fois, l'inversion des deux premiers modes de vibration de ponts micro-usinés bicouches en SiO₂-Au, en régime de post-flambement.

La **Fig. 8** illustre la réponse dynamique typique d'un pont bicouches SiO₂-Au de longueur égale à 200 μm :

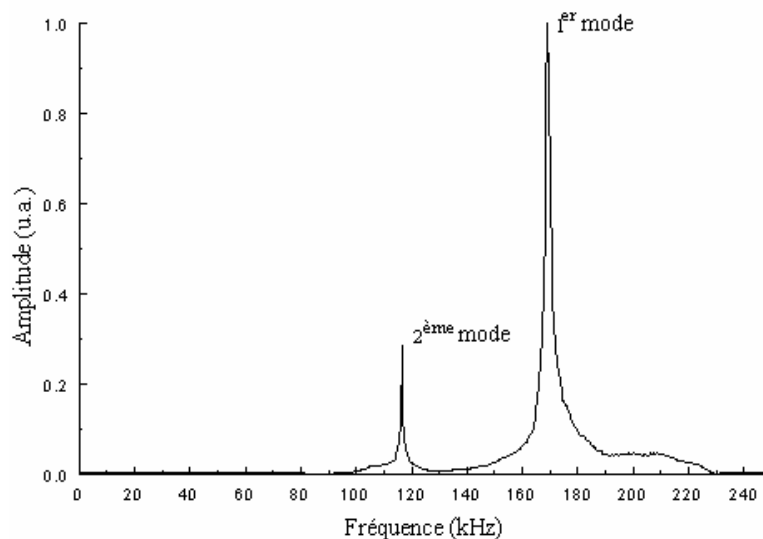


Fig. 8 : Spectre de résonance d'un pont bicouches SiO₂-Au en flambement.

D'un point de vue qualitatif, l'analyse des résultats expérimentaux obtenus montre que l'inversion des deux premiers modes de résonance (fondamental et premier harmonique) a lieu pour les ponts analysés dans notre étude.

Nous pouvons résumer cette étude en notant que :

- des déflexions maximales de flambement très élevées,
- des encastremements presque idéaux,
- l'écart faible entre les deux premiers modes de vibration (forte probabilité d'interaction modale),
- les défauts très localisés dans la structure des ponts,

constituent autant de facteurs perturbateurs dans la réponse dynamique de ponts micro-usinés, précontraints globalement en compression et en régime de flambement non-linéaire.

Cependant, nous retiendrons le bon accord entre les fréquences de résonance expérimentales associées aux deux premiers modes de vibration et celles calculées à l'aide du modèle analytique de Nayfeh *et al.*¹² appliqué ici pour la première fois à l'investigation de la réponse dynamique de microstructures.

II.2.2. Facteurs de qualité

Nous nous sommes intéressés par la suite à l'étude expérimentale de l'amortissement visqueux dû à l'air dans le cas de microleviers bicouches en mouvement de vibration. L'étude de l'amortissement visqueux dû à l'air repose sur l'analyse des facteurs de qualité Q_i des pics de résonance pour chaque mode i de vibration. Nous rappelons que le facteur de qualité est défini comme le rapport entre l'énergie totale emmagasinée dans la structure et l'énergie totale dissipée durant un cycle complet de vibration.

En premier lieu, une analyse qualitative rapide des données nous permet de remarquer que les microleviers plus courts présentent les facteurs de qualité les plus élevés. De plus, les valeurs des facteurs de qualité augmentent en même temps que l'ordre du mode de vibration. Cela laisse supposer que l'amortissement visqueux dû à l'air est dépendant de la fréquence, ou plus exactement que ses effets s'amplifient au fur et à mesure que la fréquence de vibration augmente.

Un examen approfondi de ces résultats en utilisant le modèle de la sphère équivalente (oscillateur harmonique amorti) et le modèle de Sader¹³ a été effectué. Nous avons ainsi pu valider expérimentalement ce modèle qui permet de prendre en compte la géométrie exacte du microlevier dans l'analyse de l'effet de l'amortissement visqueux dû à l'air sur la réponse dynamique de la structure. Cette confirmation a été réalisée en utilisant une approche bicouches (oxyde de silicium et or) pour le microlevier en vibration. Par ailleurs, les limites du modèle de la sphère équivalente ont été formellement établies par l'analyse de l'effet de cet amortissement.

Cette étude sur l'influence de l'amortissement visqueux sur la réponse dynamique de microleviers fabriqués nous a permis d'optimiser la géométrie de ces derniers non seulement pour des applications qui ont trait à la Microscopie à Force Atomique mais également pour tout ce qui concerne les microcapteurs et les microactionneurs résonants à partie mécanique principale de type microlevier.

En outre, toutes les études menées ici nous ont permis de considérer les effets de la précontrainte sur le comportement mécanique de ponts micro-usinés de deux points de vue radicalement opposés :

- soit en les exploitant, pour remonter à la valeur de la précontrainte à partir des déflexions maximales de flambement (régime statique) ;

¹² A. H. Nayfeh, W. Kreider and T. J. Anderson, AIAA J. **33**, 1121 (1995).

¹³ J. E. Sader, J. Appl. Phys. **84**, 64 (1998).

- soit en mettant en évidence de phénomènes vibratoires spécifiques à la dynamique de microstructures en régime de flambement non-linéaire, se manifestant à partir de très faibles niveaux de l'amplitude d'excitation (régime dynamique).

En conclusion, comme nous l'avons souligné dans notre introduction, ce type d'études sur des structures test de type poutre ou pont était un passage obligé pour une optimisation des outils de caractérisation et de simulation que nous avons mis en œuvre au sein du laboratoire. Toutes ces études et les conclusions qui en sont issues, et plus particulièrement celles concernant les domaines de validité de ces outils, nous ont permis d'aborder sereinement la caractérisation et la modélisation de structures mécaniques beaucoup plus complexes notamment celles des microstructures piézoélectriques.

II .3. Caractérisations électromécaniques de membranes piézo-électriques : extraction du coefficient piézoélectrique d_{31}

Le but de cette étude était de mettre à profit une caractérisation électromécanique rigoureuse de membranes piézoélectriques en vue de la conception et de la fabrication de biocapteurs résonants que nous décrirons dans la partie Applications de ce mémoire. En outre, cette étude nous a permis de déterminer le coefficient d_{31} de couches piézoélectriques déposées en films minces en fonction de la tension de polarisation continue appliquée à la couche piézoélectrique. Nous avons également évalué l'efficacité d'actionnement en fonction de plusieurs paramètres : positionnement et dimensions de la couche piézoélectrique par rapport à la membrane en silicium, tension de polarisation continue et alternative, non-linéarités dues aux imperfections d'encastrement de la membrane...

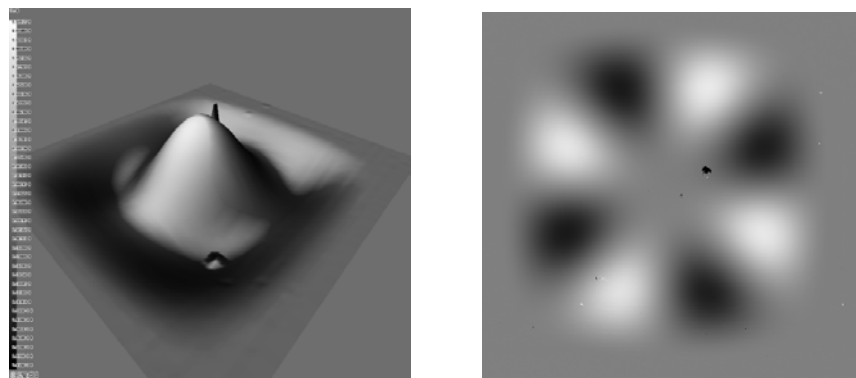


Fig.9 : Modes de résonance de membranes piézoélectriques obtenus par interférométrie laser (LAAS, IEF).

La caractérisation de micromembranes piézoélectriques a été effectuée en collaboration avec l'équipe de A. Bosseboeuf à l'Institut d'Electronique Fondamentale (IEF) à Orsay dans un premier temps à l'aide d'un interféromètre optique à décalage de phase donnant accès à des topographies en mode statique et dynamique (cf. **Fig. 9** et **Fig 10**). Ce système ayant été commercialisé par la société Fogale nous en avons fait l'acquisition ce qui nous a permis de finaliser cette étude au LAAS.

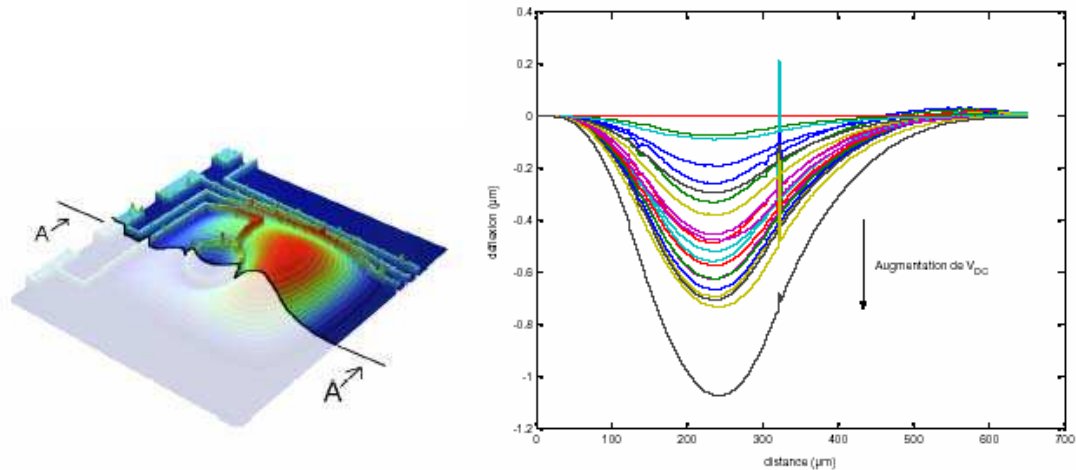


Fig. 10 : Topographies obtenues en mode statique par interférométrie laser en fonction de différentes tensions de polarisation.

Toute cette étude est décrite dans le mémoire de thèse de Matthieu Guirardel¹⁴. Les conclusions que nous pouvons en tirer sont les suivantes :

- la méthode utilisée pour déterminer le coefficient d_{31} est purement statique et les résultats obtenus sont vraisemblablement sous-estimés du fait de l'effet de l'encastrement à la circonférence de la membrane. En effet, la relation proposée par Steel¹⁵ est basée sur l'hypothèse de bords libres qui n'est pas vérifiée dans notre cas et qui conduit à des variations de contraintes internes lors de l'application d'une polarisation dans la structure non prises en compte dans le modèle. Les valeurs obtenues sont néanmoins comprises entre 50 et 150 pm/V ce qui est en bon accord avec les valeurs publiées dans la littérature.

- pour prendre en compte l'effet des contraintes, il serait intéressant d'effectuer des mesures en dynamique pour extraire la contrainte résiduelle dans la couche et la réinjecter dans la relation permettant la détermination en mode statique du coefficient piézoélectrique d_{31} . Cette approche est cependant très difficile à mettre en œuvre dans notre cas dans la mesure où nos sommes en présence de structures multicouches fortement contraintes (voire en flambement pour certaines) ce qui rend très délicat l'extraction d'une valeur de contrainte dans la structure avec une précision satisfaisante. Pour mettre en œuvre une telle approche, il conviendrait de concevoir des structures tests dédiées exclusivement à ce type d'études.

- des conditions optimales d'utilisation en terme d'efficacité d'actionnement ont été définies pour nos structures ($V_{DC} = 5 \text{ V}$; $V_{PP} = 500 \text{ mV}$). Ces conditions permettent de s'affranchir de phénomènes non-linéaires en particulier des effets de « hard spring » comme illustré **Fig. 11** :

- Les fréquences de résonance et leur mode de vibration associé ont été répertoriés en comparant les mesures obtenues par interférométrie laser 3D avec des résultats issus de la simulation.

¹⁴ Matthieu Guirardel « Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or ». Université Paul Sabatier, Toulouse, le 9 octobre 2003.

¹⁵ M.R. Steel, F. Harrison, P.G. Harper, "The piezoelectric bimorph: an experimental and theoretical study of its quasistatic response", J. Phys.D: Appl. Phys. 11, 979, (1978)

Il apparaît au vu de l'ensemble des résultats obtenus que la maîtrise technologique de notre procédé de fabrication n'est pas parfaite, tant d'un point de vue de l'élaboration des couches piézoélectriques (uniformité de l'épaisseur, présence de joints de grain, contraintes résiduelles...) que du point de vue de la conception et de la fabrication. En outre, une étude rigoureuse sur les phénomènes de vieillissement et de fatigue de ce type de structures devra être menée tant sur le plan de leurs propriétés électriques que mécaniques.

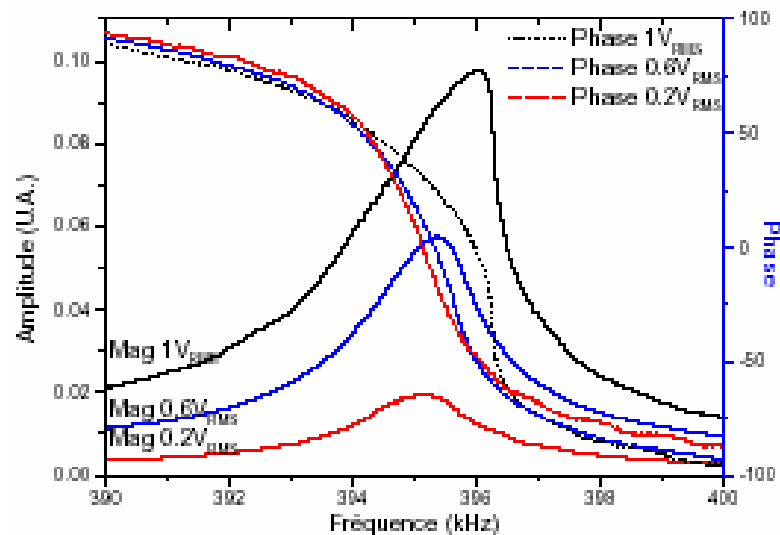


Fig. 11 : Visualisation de non-linéarités (effet de hard-spring) dues à une trop forte amplitude d'excitation, mode (1,2)+(2,1) sur membrane carrée de 600 μm de côté et d'épaisseur 5 μm .

Néanmoins, les résultats obtenus sont très concluants et nous verrons qu'ils ont été mis à profit pour concevoir et réaliser des biocapteurs résonants extrêmement sensibles.

II.4. Caractérisations en bruit de microleviers piézorésistifs

En ce qui concerne les microleviers piézorésistifs, des mesures en bruit ont été effectuées et nous ont permis de mettre en évidence l'influence des recuits thermiques (conventionnels et rapides) sur le bruit en 1/f, des états d'interfaces (passivation de la surface du microlevier), des défauts étendus liées à l'étape de préamorphisation, etc., sur les caractéristiques électriques bas niveau en particulier lors d'une réduction en taille, c'est-à-dire lorsque les effets de surface deviennent prépondérants. Cette étude a été développée dans le cadre de la thèse de Emeline Cochet¹⁶. Les résultats qui en sont issus nous ont permis d'obtenir des piézorésistances ultra-minces (<100 nm) présentant d'excellentes propriétés électriques et des niveaux de bruit extrêmement faibles tout à fait comparables à ceux obtenus dans la littérature. L'ensemble de ces travaux a été permis de débiter une étude très fructueuse concernant la conception et la réalisation de peignes de microleviers piézorésistifs pour des applications de type microscopie à force atomique et pour l'élaboration de biopuces que nous présenterons dans la partie « Applications ».

¹⁶ Emeline Cochet « Conception, réalisation et caractérisation de piézorésistances ultraminces pour des applications microsystèmes », INSA Toulouse, le 18 mars 2002

II.5. Quelques publications marquantes concernant les aspects caractérisation et modélisation

E. Cattan, T. Haccart, G. Velu, D. Remiens, C. Bergaud, L. Nicu, « *Piezoelectric properties of PZT films for microcantilever* », Sensors and Actuators A Physical 74, pp. 60-64, 1999.

C. Bergaud, L. Nicu, A. Martinez, "Multi-mode air damping analysis of composite cantilever beams", Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 38, Part 1, No.11, pp. 6521-6525, 1999.

L. Nicu, C. Bergaud, "Experimental and Theoretical Investigations on Non-Linear Resonances of Composite Buckled Microbridges", Journal of Applied Physics, vol. 86, 10, pp.5835-5840, 1999.

L. Nicu, P. Temple-Boyer, C. Bergaud, E. Scheid, A. Martinez, "Energy study of buckled micromachined beams for thin film stress measurement applied to SiO₂", Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 9, pp. 414-421, 1999.

M. Guirardel, C. Bergaud, E. Cattan, D. Remiens, B. Belier, S. Petitgrand, A. Bosseboeuf, "PZT polarization effects on off-centered PZT patch actuating silicon membrane", Sensors and Actuators A: Physical, Volume 110, Issues 1-3, pp 385-389, 2004.

M. Guirardel, L. Nicu, D. Saya, Y. Tauran, E. Cattan, D. Remiens, C. Bergaud, "Detection of gold colloid adsorption at a solid/liquid interface using micromachined piezoelectric resonators", Japanese Journal of Applied Physics, Part 2, Vol. 43, No. 1AB : L111 - L114, 2004.

L. Nicu, C. Bergaud, "Modelling of a tuning fork biosensor based on the excitation of one particular resonance mode", Journal of Micromechanics and Microengineering, Vol.14 (5), pp.727-736, 2004.

J.P. Roger, A.C. Boccara, C. Bergaud, M.C. Potier « *Appareil de détection en parallèle du comportement de micro-oscillateurs mécaniques* », Brevet européen, extension internationale PCT effectuée le 5 novembre 2001 WO/FR01/03409. Cession d'inventeurs concernant le Canada, déclaration et assignment concernant les Etats-Unis effectués le 3 juin 2003.

Thèse de Liviu Nicu, « *Etudes théoriques et expérimentales du comportement mécanique de microstructures de type levier ou pont. Applications à la mesure de la viscosité de liquides et à la caractérisation électrique de nanostructures* », Université Paul Sabatier, Toulouse, 12 Octobre 2000.

Thèse de Emeline Cocheteau « *Conception, réalisation et caractérisation de piézorésistances ultraminces pour des applications microsystèmes* », INSA Toulouse, le 18 mars 2002.

Thèse BDI de Matthieu Guirardel « *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or* », Université Paul Sabatier, Toulouse, le 9 octobre 2003.

III. Quelques applications

Nous allons aborder dans cette partie quelques applications que nous avons mises en oeuvre dans le cadre de nos travaux. Toutes ces applications ont été développées en exploitant au mieux les résultats issus de nos études théoriques et expérimentales menées au préalable sur des structures tests.

III.1. Connectique électrique, optique et mécanique

III.1.1. Caractérisation électrique de nanodispositifs à l'aide d'un microtesteur sous pointes

Nous sommes consacrés à la fabrication de deux générations de puces comprenant un réseau de microleviers métalliques de dimensions très faibles ainsi qu'à leur intégration dans un dispositif expérimental spécifique afin de mettre en oeuvre un nouveau concept de testeur dédié à la caractérisation électrique de nanocomposants.

Nous avons développé des procédés de fabrication de réseaux de microleviers en Au, de largeurs respectivement égales à 20 μm et 2 μm . La fabrication des microleviers de largeur égale à 20 μm a servi essentiellement à la validation de l'approche technologique choisie. Cette même approche a été utilisée pour la fabrication des microleviers « 2 μm » qui s'est avérée néanmoins très délicate étant donné la réduction importante de leurs dimensions et de l'espacement inter-microleviers, égal à 4 μm . L'assemblage des puces comprenant les microleviers « 2 μm » sur des circuits imprimés spécifiques et l'insertion de ces derniers dans un dispositif expérimental original obtenu à partir d'un AFM commercial reconfiguré (cf. **Fig 12** et **Fig. 13**).

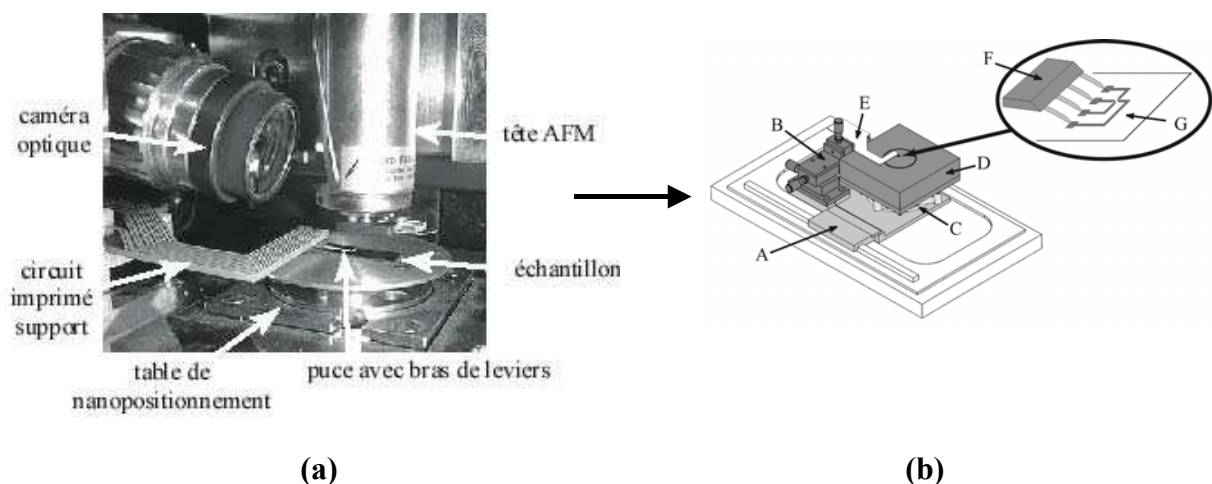


Fig. 12 : (a) Photographie du montage expérimental de caractérisation électrique de nanocomposants. La tête de l'AFM n'est pas engagée sur la surface pour une meilleure vue de l'ensemble ; (b) Schéma obtenu par CAO du porte-échantillon modifié et du support de la puce comprenant les microleviers : **A** - le dispositif de déplacement de l'ensemble en x, y par deux moteurs pas à pas ; **B** - un système d'approche grossière réalisé à partir de 3 platines Microcontrolle[®] ; **C** - un élément rotatif Microcontrolle[®] pour aligner les outils sur l'échantillon ; **D** - une table de nanositionnement Queensgate[®] permettant des déplacements en x, y et z de 100 μm , 100 μm et 15 μm respectivement, avec une précision sub-nanométrique ; **E** - le support des microleviers ; **F** - la puce supportant les microleviers métalliques ; **G** - l'échantillon sur lequel sont lithographiés les nanocomposants à contacter.

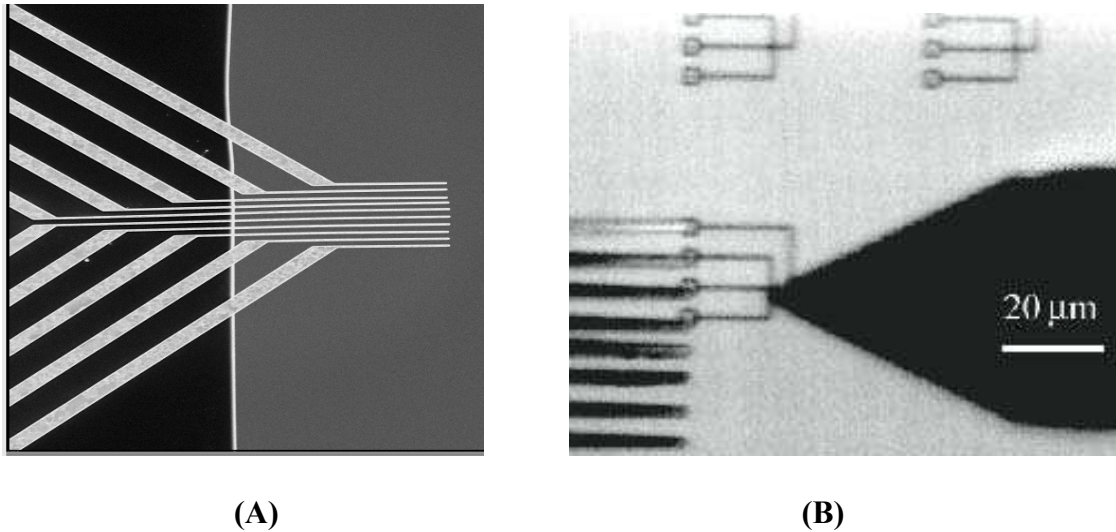


Fig. 13 : (A) Image d'un peigne de microleviers métalliques « 2 μm » obtenue par microscopie électronique à balayage; (B) Image en microscopie optique d'un nanocircuit contacté par quatre microleviers métalliques (à gauche) et imagé par le microlevier de l'AFM (à droite).

Nous retiendrons les avantages spécifiques à l'utilisation pour la caractérisation électrique de nanocomposants de ce type de microtesteur, dont la faisabilité et la fiabilité ont été prouvées ici :

- contrôle précis du positionnement et de la force d'appui des microleviers par rapport à la structure testée, grâce à la table de nanositionnement intégrée dans la nouvelle configuration de l'AFM ;
- possibilité d'imager la structure testée en même temps que la réalisation de sa caractérisation électrique ;
- très faibles dimensions des microleviers, ce qui permet d'envisager des niveaux d'intégration importants des nanostructures à caractériser.

Ce dernier avantage a permis, par exemple, la caractérisation individuelle de 100 nanojonctions fabriquées sur une surface de 1 mm^2 . Cette capacité d'intégration sera suffisante pour la caractérisation statistique future d'un dépôt de molécules. En particulier, cette approche a été utilisée avec succès pour la caractérisation électrique de nanotubes de carbone (cf. Fig.14).

Une amélioration cruciale du micro-testeur que nous avons proposé ici pour réduire les courants de fuite, consiste à passiver la surface de la puce comprenant le réseau de microleviers. D'autre part, la réalisation des mesures électriques sous atmosphère contrôlée devrait permettre de réduire de façon importante le bruit provenant d'agents contaminants ambiants dont l'influence peut être sensiblement significative par rapport à l'échelle et la nature des nano-composants sous test.

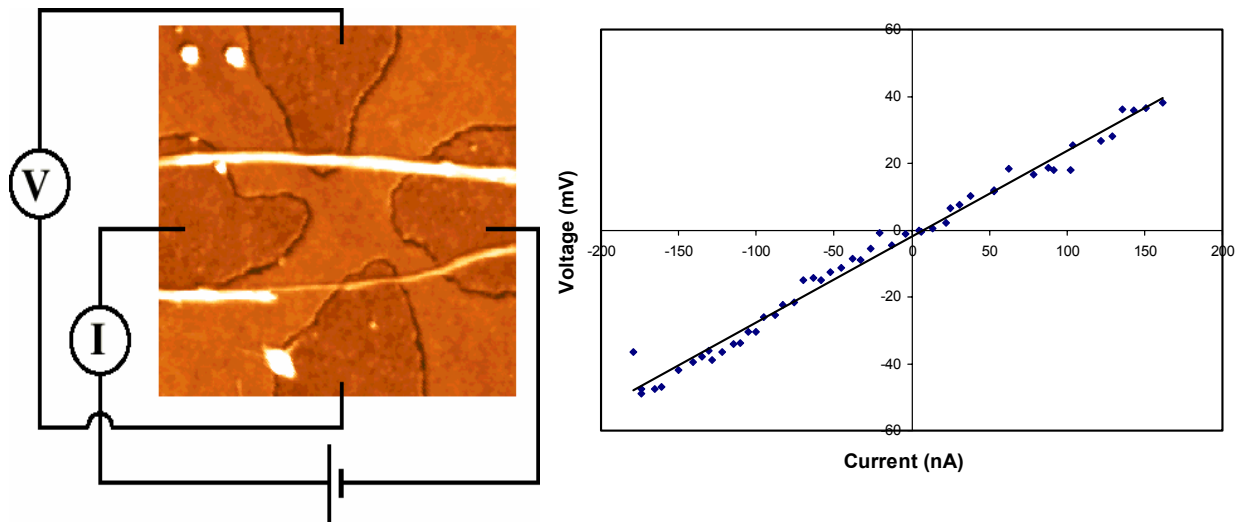


Fig. 14 : Image obtenue par microscopie à force atomique de nanotubes de carbone positionnés sur des nanoélectrodes (à gauche) ; Mesures électriques obtenues avec le micro-testeur sous pointe constitué d'un peigne de microleviers métalliques de 2 μm .

III.1.2. Connexion optique dans le champ proche avec des microleviers en nitrure de silicium

Dans le même esprit que pour le microtesteur sous pointe, une étude concernant la connexion optique dans le champ proche en utilisant des microleviers en nitrure de silicium a été développée en collaboration avec le Centre d'Electronique et de Micro-optoélectronique de Montpellier. Cette étude très prometteuse a fait l'objet d'une partie de la thèse de Benoit Belier¹⁷ et a été publiée dans Applied Physics Letters et le Journal of Microscopy (cf. § III.3). Elle ouvre des voies très intéressantes pour des mesures de fluorescence avec des résolutions submicroniques notamment pour des applications dans le domaine des biopuces. Cette étude n'a malheureusement pas été poursuivie après la fin de la thèse de Benoit Belier mais elle reste d'actualité de par sa pertinence pour les nombreux domaines où se posent les problématiques de connectique optique à des échelles sub-longueur d'onde.

III.1.3. Microviscosimètre

Comme nous avons pu le constater en effectuant un état de l'art dans le domaine de la viscosimétrie, l'ensemble des viscosimètres rencontrés dans la littérature nécessite des volumes de liquide supérieurs au millilitre. Par conséquent, ces appareils sont inadaptés au domaine de la micro-fluidique où les volumes de liquide en écoulement dans des réseaux de canaux de dimensions micrométriques ne dépassent pas le micro-litre, voire le nano-litre, d'où la nécessité du développement d'outils d'investigation réduits à cette échelle.

C'est la raison pour laquelle nous avons développé un micro-viscosimètre à partie mécanique active de type microlevier parfaitement adapté à la mesure de viscosité dans des volumes de l'ordre du microlitre. A partir du décalage entre les valeurs des fréquences de résonance des microleviers dans un liquide et les fréquences de résonance des mêmes microleviers dans l'air, on remonte à la valeur de la viscosité du liquide analysé par l'intermédiaire de modèles théoriques issus de la littérature.

¹⁷ Benoît Béliet "Développement de micro-leviers à fonctions optiques intégrées pour la microscopie à effet tunnel photonique et la microconnexion optique", Université de Montpellier, 3 décembre 1999.

Le dispositif expérimental utilisé pour l'investigation de la réponse dynamique des microleviers en vibration dans différents liquides n'est autre que celui que nous avons développé pour la caractérisation mécanique de microstructures. Le principe de la procédure expérimentale mise en œuvre est illustré **Fig. 15**.

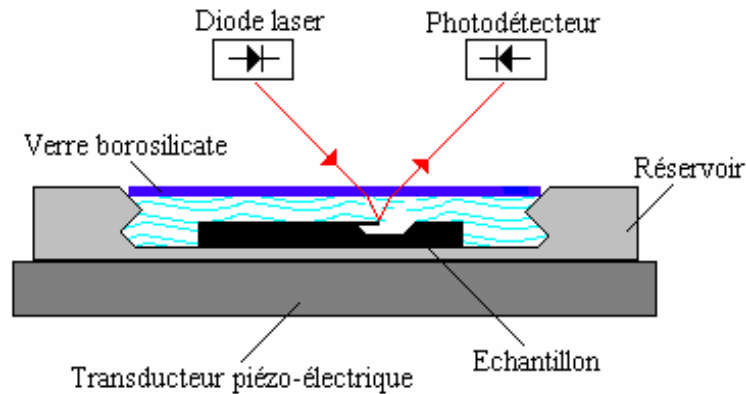


Fig. 15 : Principe de fonctionnement du micro-viscosimètre : le réservoir en Si est posé sur le transducteur piézo-électrique externe. Une polarisation alternative de ce dernier provoquera la vibration de l'ensemble réservoir - réseau de microleviers.

Au cours des mesures, des micro-viscosimètres remplis respectivement avec de l'eau désionisée, de l'éthanol ultrapur (Merck, 983) et de l'huile silicone (Rhodorsil, 47V50) se succéderont sur le transducteur piézo-électrique. Le verre borosilicate ultra-mince ($0,1 \mu\text{m}$) est placé sur la surface du liquide pour éviter la formation d'ondes de surface qui peuvent perturber la réflexion du faisceau laser utilisé pour la mesure de la réponse dynamique des microleviers.

Nous avons ainsi pu étudier expérimentalement la réponse dynamique des microleviers en vibration dans différents fluides. Dans un premier temps, les fréquences de résonance des microleviers dans l'eau désionisée ont été mesurées et sont en bon accord avec les valeurs théoriques obtenues en utilisant le modèle développé par l'équipe de J. Sader.¹⁸

Par la suite, les valeurs mesurées des fréquences de résonance pour des microleviers en vibration dans l'éthanol ont permis, par l'intermédiaire du modèle théorique cité ci-dessus, de déduire la valeur de la viscosité dynamique de ce liquide. Cette dernière s'est avérée être en bon accord avec la valeur spécifiée par le fabricant (cf. **Fig 16**). Ainsi, il a été montré que le modèle de Sader, associé au micro-viscosimètre développé, peut être utilisé en tant que méthode de mesure de la viscosité de liquides de très faible volume.

¹⁸ J. E. Sader, "Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope", J. Appl. Phys. **84**, 64 (1998) et J. W. M. Chon, P. Mulvaney, and J. E. Sader, "Experimental validation of theoretical models for the frequency response of atomic force microscope cantilever beams immersed in fluids", J. Appl. Phys. **87**, 3978 (2000).

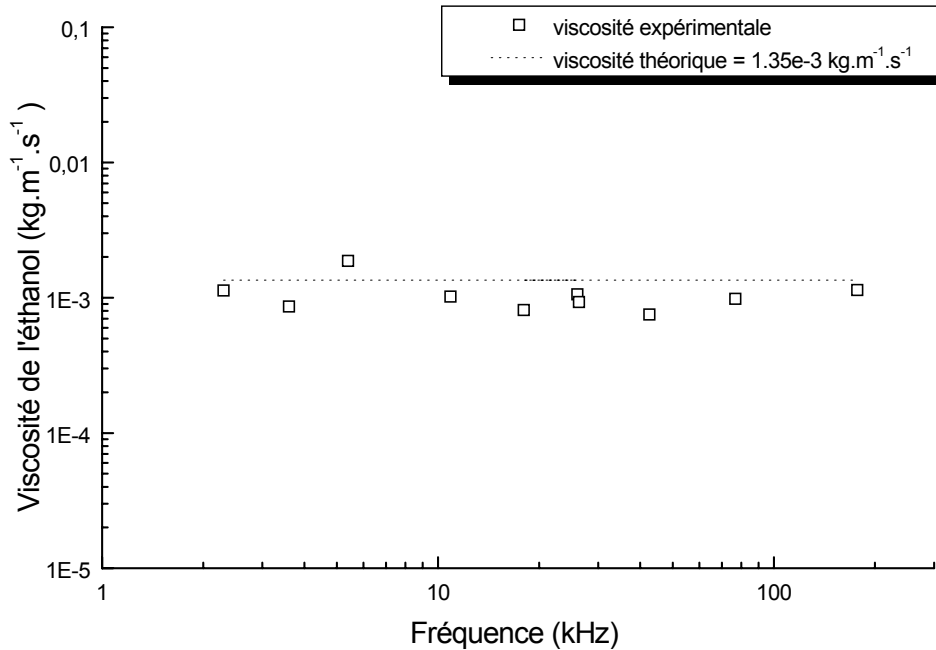


Fig. 16 : Viscosité expérimentale de l'éthanol obtenue en utilisant le modèle de Sader en fonction de la fréquence de résonance pour les deux premiers modes de résonance des microleviers bicouches en $\text{SiO}_2\text{-Au}$. La superposition des valeurs observée au voisinage de 25kHz est due à l'équivalence entre la fréquence fondamentale mesurée pour le microlevier de 100 μm de long ($f_{1,100\mu\text{m}} = 26\text{kHz}$) et la fréquence de résonance du deuxième mode mesurée pour le microlevier de 250 μm de long ($f_{2,250\mu\text{m}} = 26,3\text{kHz}$).

Enfin, les limites de l'application du modèle théorique ont été discutées à partir de l'analyse de la réponse dynamique des microleviers composites en vibration dans l'huile silicone. Il est apparu en effet que dans le cas de liquides à viscosité dynamique importante, les microleviers en $\text{SiO}_2\text{-Au}$ fabriqués ne présentent pas une réponse dynamique aisément exploitable. Par conséquent, afin de minimiser les effets dissipatifs, d'autres dimensions et/ou géométries de microleviers devront être envisagées.

Ces limitations sont également en partie liées au fait que nous avons utilisé une excitation piézoélectrique externe. Le recours à une mesure à partir de bruit thermomécanique sans excitation externe peut s'avérer plus intéressant. Cette approche a également permis d'obtenir des spectres de résonance de microleviers immergés dans des solutions contenant des produits de PCR (Polymerase Chain Reaction) plus précisément des oligonucléotides de longueurs variables.

Cette application est très intéressante pour le domaine de la micro-fluidique, d'autant plus que le volume de liquide mesuré peut être facilement réduit par un, voire deux ordres de grandeur, en diminuant les dimensions du réservoir et de la puce-hôte du réseau de microleviers. De plus, comme nous le verrons dans la partie suivante consacrée aux biopuces et aux biocapteurs, les mesures peuvent être effectuées dans des liquides opaques en intégrant les fonctions d'excitation (en utilisant des couches minces piézo-électriques) et de détection (en utilisant des couches minces piézorésistives).

L'intégration de l'excitation permettrait en outre de s'affranchir de la génération d'ondes acoustiques de fortes amplitudes qui parasitent le signal utile. Comme nous l'avons vu dans la partie dédiée à la caractérisation de membranes piézoélectriques, l'efficacité d'actionnement serait également très sensiblement augmentée en ayant recours à cette technique. De plus, en travaillant hors résonance, la mesure de l'amplitude de vibration en fonction de l'amplitude et de la fréquence de la polarisation appliquée permettrait d'étudier de manière rigoureuse les phénomènes dissipatifs.

III.2. Biopuces et biocapteurs

III.2.1. Résonateurs mécaniques de type pont ou poutre : effet induit par l'adsorption de nanoparticules d'or sur les propriétés mécaniques en régime dynamique

Avant d'aborder véritablement le domaine des biopuces et des biocapteurs, nous allons présenter succinctement plusieurs études menées par Daisuke Saya, chercheur associé au LAAS depuis Avril 2002, qui a effectué un travail remarquable sur plusieurs thématiques développées au sein de notre équipe. En particulier, il a consacré une étude à l'utilisation de microrésonateurs de type poutre ou pont en nitrure de silicium pour la détection de nanoparticules d'or après adsorption sur la surface (cf. **Fig. 17**). Il s'agissait de déterminer via la variation de la fréquence de résonance de ces microstructures la sensibilité en masse de ces résonateurs pour des applications potentielles en tant que capteurs chimiques ou biochimiques. L'utilisation de nanoparticules métalliques présente plusieurs avantages. D'une part, le phénomène d'adsorption est ici très prononcé du fait la masse ajoutée par les nanoparticules ce qui génère des variations de propriétés mécaniques plus marquées et donc plus facilement mesurables. D'autre part, il est relativement aisé, en comptant le nombre de nanoparticules adsorbées sur la surface à l'aide d'un microscope électronique à balayage par exemple, de déterminer avec une faible marge d'erreur, la masse réelle ajoutée sur la surface du nanorésonateur (cf. **Fig. 18**). Ceci est en effet possible dans la mesure où le phénomène d'adsorption est irréversible (ce qui est notre cas puisque des traitements de surface spécifiques permettent d'obtenir des interactions électrostatiques fortes entre les nanoparticules d'or et la surface du résonateur). Ainsi, il est devient envisageable d'effectuer des corrélations directes entre la masse ajoutée et la variation de la fréquence de résonance du résonateur avant et après adsorption des nanoparticules.

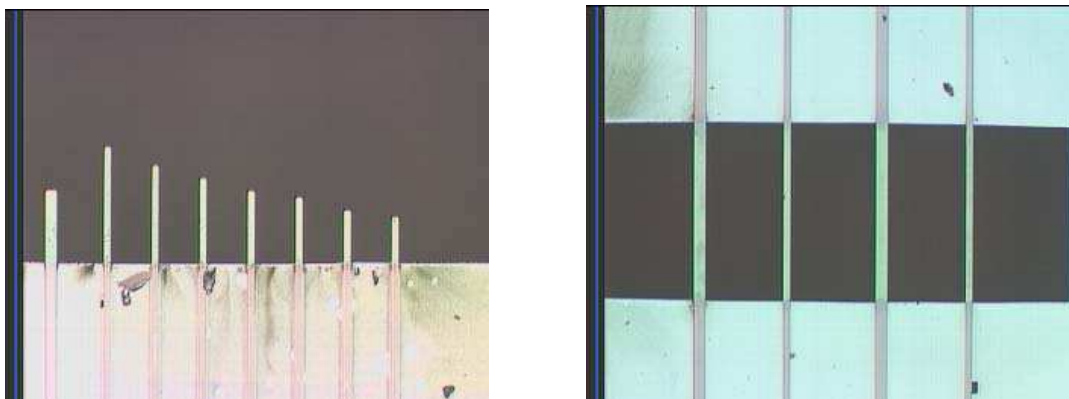


Fig. 17 : Résonateurs mécaniques de type poutre et pont dédiés à l'étude de l'effet induit par l'adsorption de nanoparticules d'or sur les propriétés mécaniques en régime dynamique.

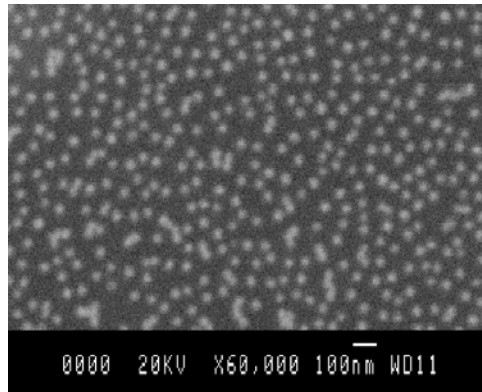


Fig. 18 : Nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre adsorbées sur la surface d'un résonateur.

En comparant les mesures expérimentales avec les résultats obtenus à partir de modèles analytiques simples (oscillateur harmonique), cette étude nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

- Dans les conditions expérimentales dans lesquelles ont été effectuées les mesures, il apparaît que seul l'effet de masse ajoutée à une influence significative sur les fréquences de résonance de poutres et des ponts. Les effets de changement raideur ou de contrainte, en particulier pour les ponts, peuvent être considérés comme négligeable par rapport à l'effet de masse ajoutée.

- Les modes supérieurs de résonance doivent être privilégiés pour la détection car ils permettent d'augmenter fortement la sensibilité du résonateur du fait de l'augmentation de la fréquence de résonance (cf. **Fig. 19**). Il est en outre plus judicieux d'utiliser des ponts contraints en tension dont les fréquences de résonance sont plus élevées que pour un pont non contraint.

- Comme le prévoit la théorie, une réduction en taille s'avère particulièrement pertinente pour augmenter la sensibilité du résonateur.

Des sensibilités de l'ordre de 20 Hz/pg ont été ainsi obtenues avec une densité minimale détectable de 2.6×10^{-2} nanoparticules/ μm^2 pour le second mode de résonance de ponts en nitrure contraints en tension.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont extrêmement encourageants. En particulier, l'utilisation de nanoparticules s'est avérée tout à fait pertinente pour mener à bien notre étude et elle est en outre parfaitement compatible avec des protocoles développés en biochimie et en biologie dans la mesure où de telles nanoparticules sont couramment utilisées comme marqueurs, leur surface ayant été préalablement fonctionnalisée avec des biomolécules (oligonucléotides, peptides, protéines...). Il est ainsi envisageable de concevoir une véritable biopuce pour des tests de type diagnostique dans la mesure où la surface d'un ensemble de leviers aura été fonctionnalisée avec différentes biomolécules.

Pour obtenir des résultats plus pertinents d'un point de vue biochimique et biologique, il est primordial de pouvoir accéder à des constantes d'association et de dissociation et d'estimer des cinétiques de réaction. De cette façon, il est possible de s'affranchir des artefacts de mesure en ayant accès à des signatures caractéristiques correspondant à des interactions biospécifiques connues. Il est possible d'obtenir de telles cinétiques en effectuant un ensemble de tests à des concentrations et des temps d'incubation différents, les mesures s'effectuant toujours à sec. Cette approche demeure assez lourde à mettre en œuvre et il est donc plus direct de faire des mesures in situ (en milieu liquide) en temps réel mais cela suppose que l'on puisse mettre le résonateur en oscillation en milieu liquide. C'est la raison pour laquelle nous avons

poursuivi cette étude en utilisant des résonateurs mécaniques de type membrane à actionnement piézoélectrique intégré.

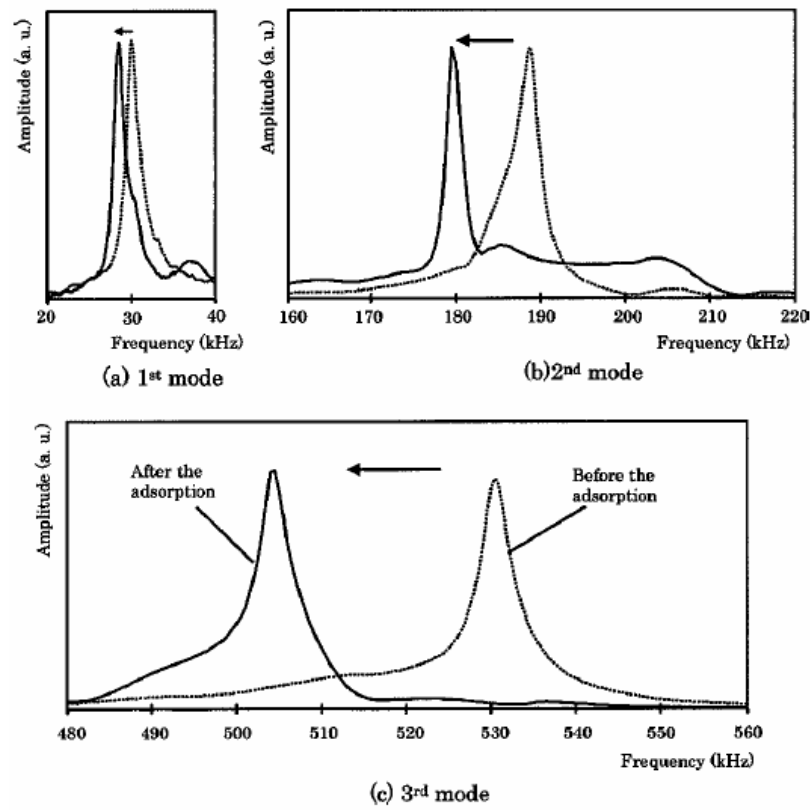


Fig. 19 : Glissement de la fréquence de résonance pour les trois premiers modes de vibration de microleviers en nitrure de silicium induit par l'adsorption de nanoparticules d'or.

III.2.2. Utilisation de résonateurs piézoélectriques en milieu liquide : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or à une interface liquide/solide

Dans le cadre de cette étude, nous avons tout d'abord mis au point un protocole de fonctionnalisation de surface sur oxyde de silicium. Nous avons également conçu un système complet comprenant : la puce avec les membranes, une cellule fluïdique et un contrôle de température. Sur la base d'une étude concernant l'adsorption de nanoparticules d'or sur des membranes résonantes, nous avons ensuite déterminé la sensibilité de notre système que nous avons comparée à des résultats expérimentaux. Enfin, pour véritablement aborder le domaine des biopuces, nous devons associer à notre biocapteur un système de dépôt dédié permettant de fonctionnaliser individuellement chaque membrane de notre puce. Ce système, en cours de développement, sera décrit dans la dernière partie de ce paragraphe.

a. Fonctionnalisation de surface

Les colloïdes d'or en solution que nous avons utilisés sont des sphères dont la surface est chargée négativement. La suspension de ces colloïdes dans le liquide est assurée par les répulsions électrostatiques via des radicaux citrates. Si nous voulons que ces colloïdes s'adsorbent à la surface des membranes, il est nécessaire qu'elle soit chargée positivement.

Pour cela, nous avons utilisé des amino-silanes dont la fonction silane va se fixer sur l'oxyde de silicium et la fonction amine va se protoner sous l'effet d'un pH acide. Cependant, nous verrons qu'il faudra trouver un compromis dans le pH pour éviter qu'à pH trop faible, par l'écrantage des charges des colloïdes par les ions H_3O^+ , les colloïdes ne s'agrègent entre eux. Un silane a pour formulation $R-Si(OMe)_3$ où R est le groupement qui va donner la fonctionnalisation à la puce. Dans notre cas R sera un groupement à terminaison amine NH_2 (cf. Fig. 20).

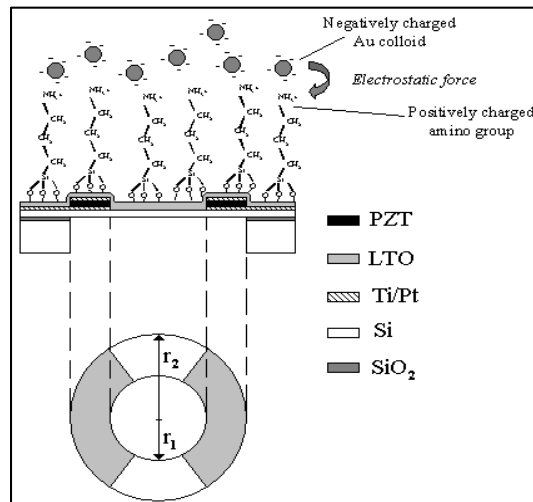


Fig. 20 : Principe de détection de l'adsorption de nanoparticules d'or chargées négativement sur membranes piézoélectriques dont la surface a subi un traitement de surface amino-silane dont la charge est positive à pH inférieure à 7.

b. Préparation de la puce

Une fois que la puce est fonctionnalisée par une couche amine, on passe à l'étape du microcâblage. Cette étape consiste à relier par soudure de fils les électrodes qui serviront à polariser les membranes piézoélectriques via les broches du support TO8. Après cette étape, il faut terminer cette préparation par une enduction de gel de silicone biocompatible. Cette dernière étape va permettre d'isoler toutes les électrodes entre elles, en enrobant de silicone à la fois les fils de câblage et les plots de contact de la puce et du boîtier. Ceci est impératif car en milieu liquide, sans cette isolation électrique assurée par le gel de silicone, il pourrait y avoir apparition de phénomènes d'électrolyse sous certaines conditions de polarisation.

La mesure de cinétiques de réactions chimiques ou biologiques impose de pouvoir travailler en milieu liquide et surtout de parfaitement contrôler les flux avec lesquels les solutions sont injectées dans la cellule liquide. Les boîtiers standard utilisés pour les composants électroniques ne permettent pas d'assurer cette fonction. Une cellule a été conçue spécialement pour permettre d'immerger les structures dans un liquide. Grâce à cette cellule, il est possible de faire circuler un liquide par l'intermédiaire des deux canules métalliques sur lesquels on peut glisser des tuyaux flexibles (cf. Fig. 21). Une régulation de la température est également assurée par un module Peltier associé à un système électronique de contre-réaction. Ce contrôle de la température est extrêmement important car la moindre variation de température peut induire des variations de fréquence de résonance non négligeables qui viendraient perturber la mesure. Il est toutefois possible de s'affranchir de ce genre de variation en effectuant des mesures en différentiel avec une membrane témoin servant de référence sans être en contact avec la solution contenant les nanoparticules.

Dans un premier temps, lors des procédures expérimentales préliminaires, nous n'avons pas utilisé ce circuit fluide, la cellule jouant plutôt le rôle de réservoir hermétiquement fermé. Ce n'est que dans le cadre d'études ultérieures qu'un système microfluidique sera associé à cette cellule fluide pour des études relatives à la détermination de constantes d'association et de dissociation.

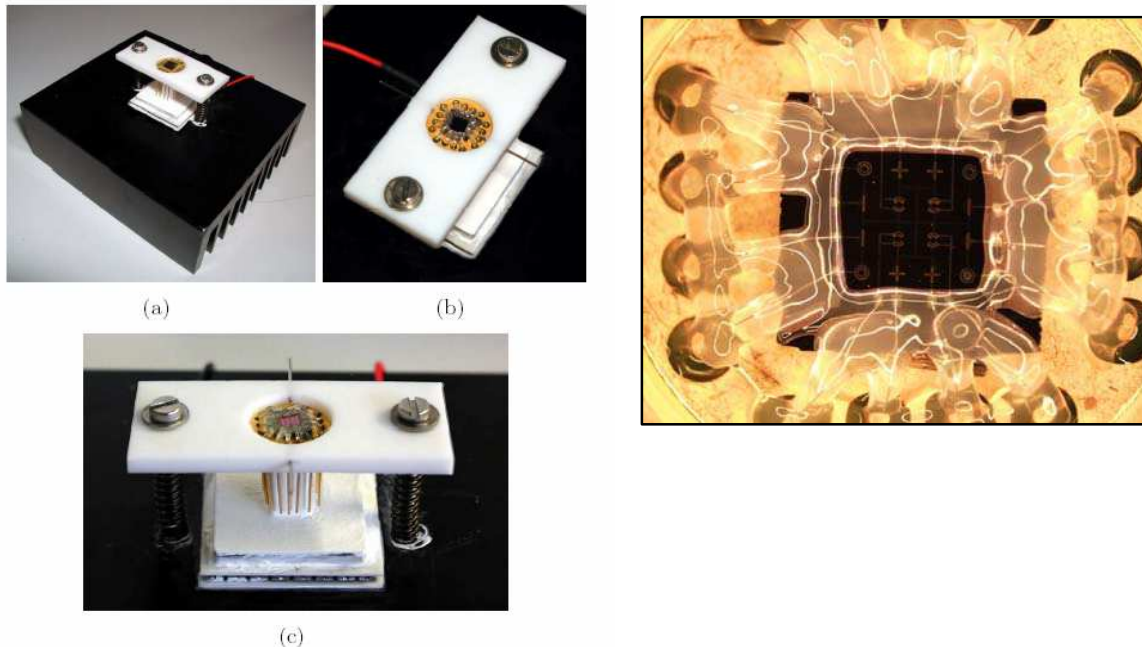


Fig.21 : Membranes piézoélectriques montées sur support TO8, les fils de connexions électriques ont été passivés par un gel silicone. Cellule fluide dans laquelle sont positionnées les membranes piézoélectriques pour la mesure en milieu liquide avec régulation de température par effet Peltier intégrant un boîtier TO8.

c. Résultats expérimentaux et théoriques : cinétiques d'adsorption et sensibilité

Les fréquences de résonance des membranes à actionnement piézoélectrique sont mesurées en utilisant un banc optique externe de déflexion de faisceau laser et la détection synchrone dans une configuration comparable à celle d'un microscope à force atomique. Le glissement de la fréquence de résonance des membranes piézoélectriques a été corrélé avec la densité de colloïdes d'or adsorbés sur la surface en fonction du temps d'incubation obtenue par comptage grâce au microscope à balayage (cf. **Fig. 22**).

Une sensibilité expérimentale de 2,01 Hz/pg a été obtenue, elle est comparable à la sensibilité théorique de 1,24 Hz/pg.

Les dernières améliorations de ce système ont consisté à utiliser la couche piézoélectrique non seulement pour l'actionnement mais également pour la détection. Ceci nous a permis de nous affranchir de la détection optique externe en déflexion très contraignante pour des applications de type biocapteur. Des études sont en cours pour optimiser cette approche.

De manière plus générale, quel que soit le type de résonateur utilisé (poutre, pont ou membrane) intégrant ou non des fonctions d'actionnement et de détection, l'utilisation d'une électronique de contre-réaction positive pour augmenter le facteur de qualité est actuellement à

l'étude notamment dans le cadre d'une étude avec l'équipe de Jérôme Juillard du Département Traitement du Signal et Systèmes Électroniques de Supélec.

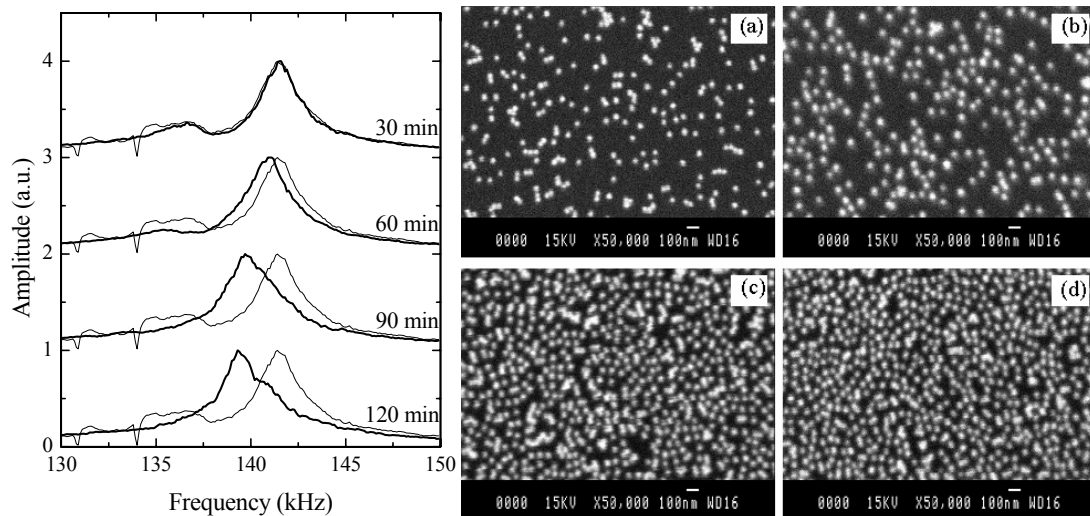


Fig. 22 : *Variation de la fréquence de résonance de membranes piézoélectriques immergées dans une solution contenant des nanoparticules d'or en suspension en fonction du temps d'incubation (image de gauche) ; Nanoparticules d'or observées par MEB sur la surface de la membrane après différents temps d'incubation (image de droite).*

Toutes ces études ont fait l'objet de nombreuses publications internationales et du dépôt de brevet avec extensions internationales (cf. § III.3)

III.2.3. Fabrication de biopuces en utilisant des microleviers : étapes préliminaires en vue de la conception de nanobiopuces [Thèse Pascal Belaubre]

Dans cette partie « Biopuces, Biocapteurs », nous n'avons présenté jusqu'à présent que l'aspect détection. Si nous voulons véritablement parler de biopuces, il est primordial de pouvoir structurer la surface d'un échantillon avec des biomolécules présentant des propriétés différentes. Cette structuration en zones régulièrement espacées et bien définies est obtenue dans notre cas grâce à l'utilisation de microleviers en silicium qui permettent de déposer des produits biologiques par contact direct entre la pointe du microlevier et la surface.

Il s'agit d'une approche originale même si à première vue elle peut s'apparenter à la technique « Dip-pen » que nous avons présentée dans la première partie de ce mémoire. L'originalité de notre approche consiste à accroître les propriétés de mouillabilité de la surface des microleviers grâce à l'utilisation d'un champ électrique qui génère des phénomènes d'électromouillage ou de diélectrophorèse. En effet, devant les difficultés rencontrées pour remplir les canaux et réservoirs de ces leviers à des échelles fortement réduites, et plus particulièrement dans des géométries confinées, nous avons rajouté des électrodes le long du canal qui nous permettent de contrôler activement la mouillabilité, la tension de surface de nos leviers, et donc le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface.

a. Technologie de fabrication et plateforme expérimentale

Des technologies de fabrication conventionnelles ont été utilisées pour fabriquer les microleviers. Le procédé de fabrication est schématisé sur la **Fig. 23**, il est en tout point

comparable à ceux que nous avons développés dans le cadre d'autres études décrites précédemment.

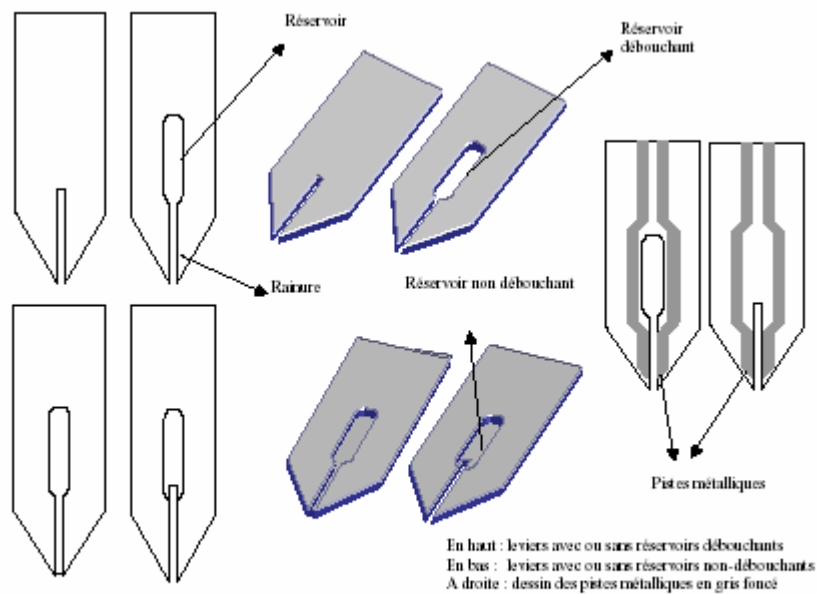


Fig. 2.3 : Description des différentes configurations concernant les microleviers contenant les réservoirs

Fig. 23 : Description des différentes configurations pour les microleviers utilisés pour le dépôt.

La plate-forme expérimentale inclut non seulement les éléments nécessaires à la réalisation des dépôts de sondes — une table de positionnement XYZ, un système de contrôle visuel par caméra et les microleviers — mais également les dispositifs qui nous permettent de vérifier la cohérence et le bon fonctionnement de ces expérimentations, c'est-à-dire un système de visualisation a posteriori. Dans notre cas, il s'agira de mesure en fluorescence (microscope optique et scanner), d'autres techniques de visualisation seront envisagées par la suite lorsque des dépôts de nanoparticules seront effectués (microscopie à balayage, microscopie à force atomique). Trois principales caractéristiques ont guidé nos recherches et nos choix relatifs à cette plateforme expérimentale afin de réaliser ces travaux — précision, vitesse, degré de liberté du système.

b. Résultats expérimentaux

Ce système complet nous a permis de déposer de manière automatisée (sous forme de matrice le plus souvent) des solutions plus ou moins visqueuses contenant des biomolécules (brins d'ADN, produits de PCR, protéines. . .) ou encore des nanoparticules sur des surfaces telles que du verre, du silicium, de l'or... (cf. **Fig 24**). Une procédure de nettoyage des microleviers a été optimisée ce qui permet de déposer des solutions différentes de biomolécules en utilisant les mêmes microleviers en s'affranchissant des problèmes de contamination croisée (cf. **Fig. 25**). Nous avons également étudié l'influence de la capillarité et de la diffusion lors de la formation des gouttes sur des surfaces hydrophiles ou hydrophobes.

Cette approche a été également utilisée avec succès pour le dépôt de nanoparticules en latex dont la surface a été fonctionnalisée à l'aide de polymères (cf. **Fig 26**).

Ce même système peut être également utilisé pour effectuer des dépôts sans contact par effet de champ (Technique type Electrospray). Toutes ces études ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (cf. § III.3).

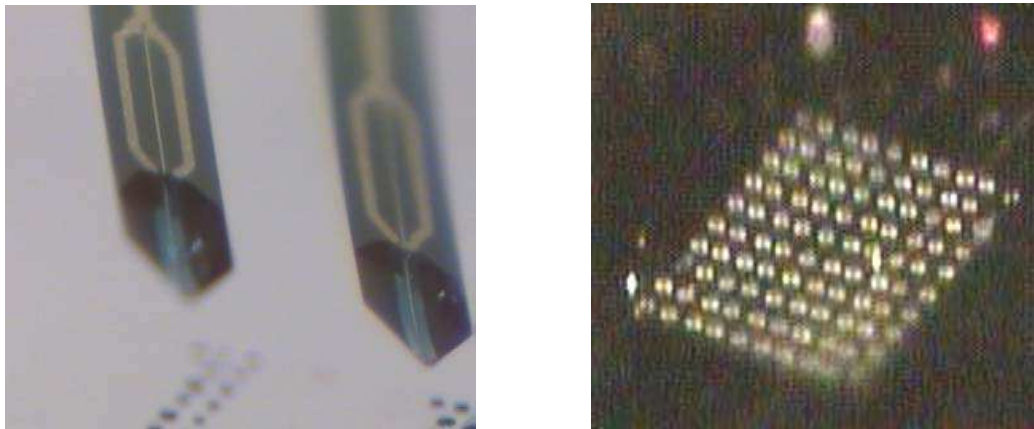


Fig.24 : Système de dépôt à base de microleviers en silicium pour la fabrication de biopuces (image de gauche). Matrice de spots de 10 μm de diamètre obtenue avec ces microleviers (image de droite).

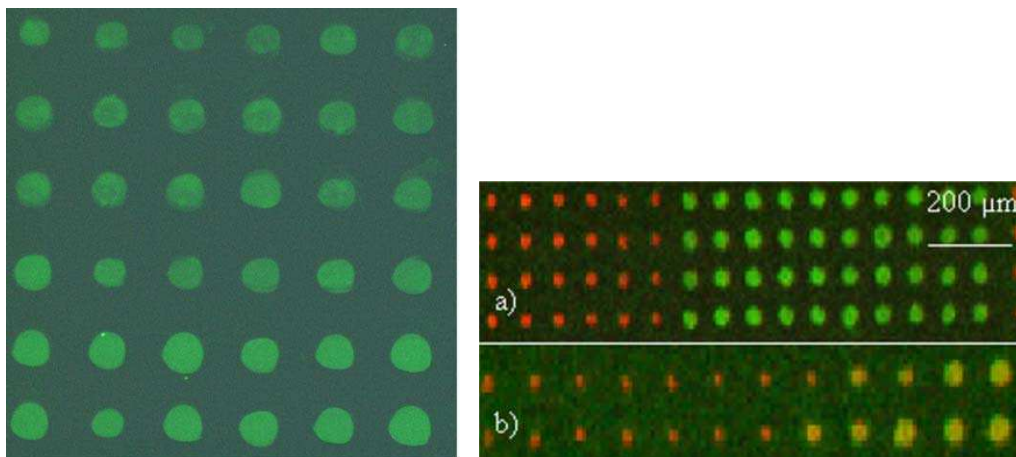


Fig. 25 : Spots de protéines fluorescentes obtenus avec un système de dépôt par contact à base de microleviers en silicium (image de gauche). Etude de la contamination croisée (image de droite) a) Procédure de nettoyage optimisée ; b) sans procédure de nettoyage.

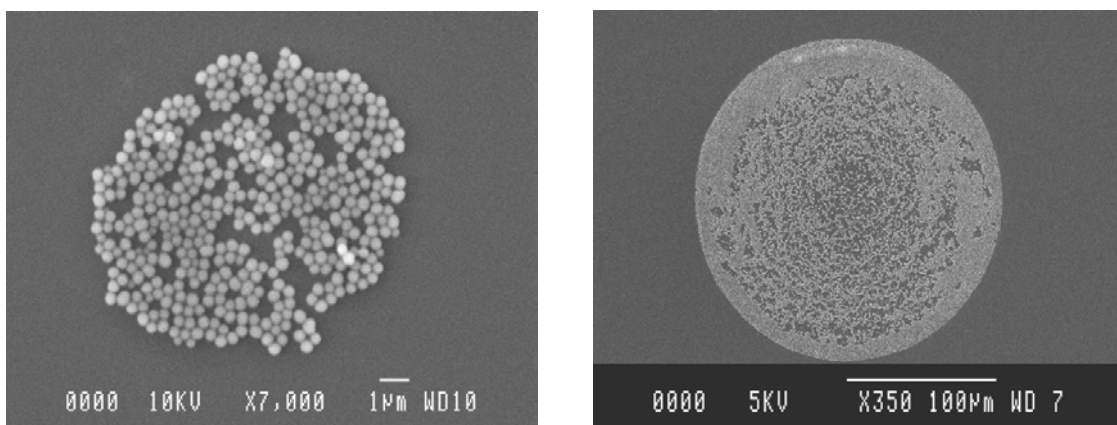


Fig. 26 : Dépôt de nanoparticules à l'aide de microleviers

Les travaux menés dans le cadre de cette étude ont permis de montrer l'importance du contrôle de la force d'appui et du temps de contact entre le microlevier et la surface sur laquelle s'effectue le dépôt. L'utilisation de microleviers piézorésistifs apparaît donc comme étant une solution envisageable pour contrôler très finement ces deux paramètres. L'optimisation de la géométrie des électrodes est également à l'étude actuellement pour réduire les tensions appliquées et accroître l'efficacité de chargement en géométrie confinée.

c. Vers un système complet : électronique rapprochée et problématiques d'interfaçage

Dans le but d'optimiser le système de dépôt, une électronique de mesure rapprochée pour microleviers piézorésistifs a été conçue et implémentée dans le cadre de la thèse CNAM de Fabrice Matthieu du service Instrumentation et Informatique du LAAS (cf. **Fig. 27** et **28**). Elle permet une lecture multiplexée de peigne de microleviers avec une bande passante supérieure au MHz et une résolution de quelques nanomètres. Le système complet (plateforme, microleviers piézorésistifs, et électronique rapprochée) est actuellement en cours de développement pour réduire les dimensions des spots vers des tailles submicroniques (volume déposé de l'ordre du femtolitre) notamment pour le contrôle de l'assiette et de la force et du temps de contact lors du dépôt (cf. **Fig.29**). Toute cette étude est développée dans le cadre du projet intégré européen NAPA.



Fig. 27 : Peigne de microleviers piézorésistifs

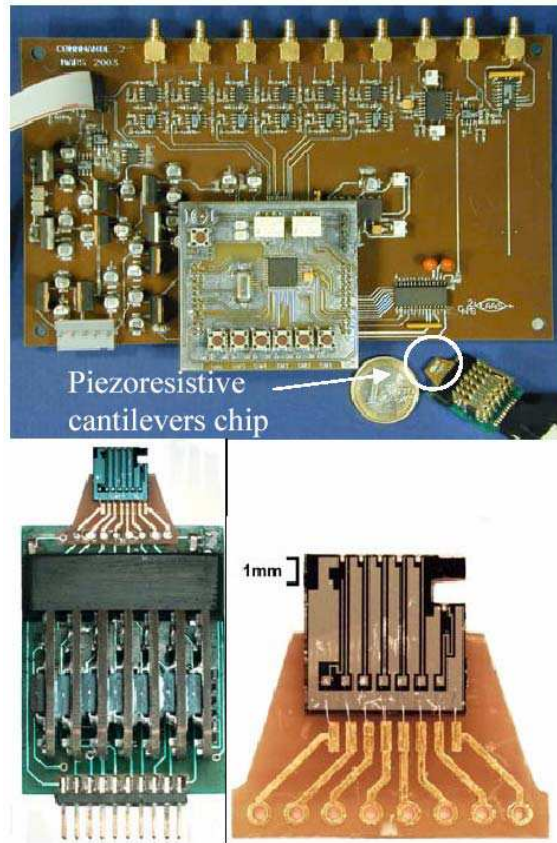


Fig. 28 : Electronique de mesure rapprochée pour microleviers piézorésistifs.

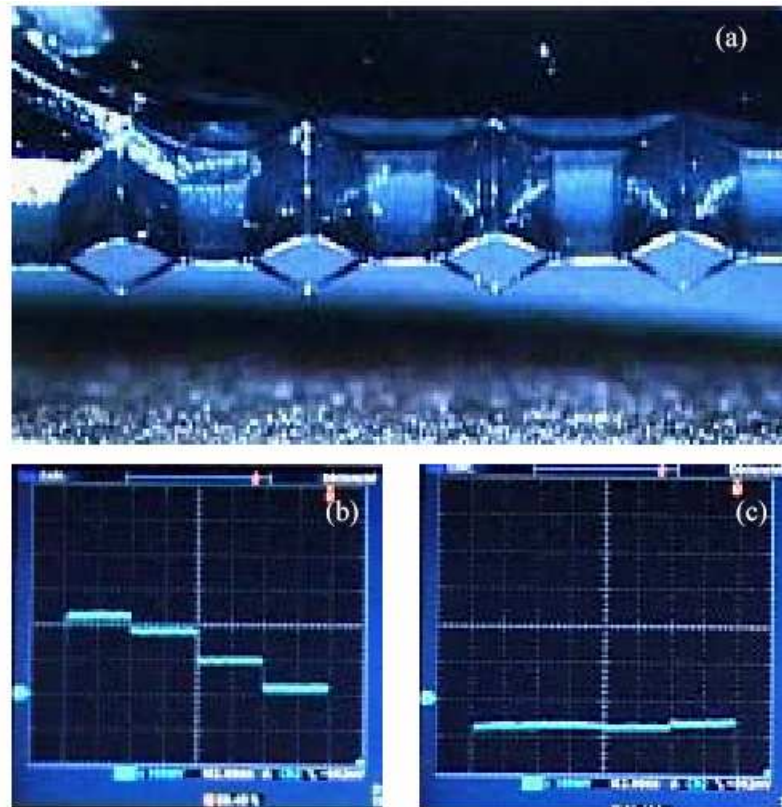


Fig. 29 : Contrôle de l'assiette et du temps de contact à l'aide de microleviers piézorésistifs

III.2.4. Vers une véritable biopuce : dépôt et détection

Tous les éléments sont maintenant réunis pour concevoir de véritables biopuces de nouvelles générations dont le principe de fonctionnement repose exclusivement sur l'utilisation de micro et nanosystèmes mécaniques. Nous développons actuellement un système complet permettant de fonctionnaliser avec une résolution submicronique la surface d'une puce comprenant des micro et nanorésonateurs mécaniques (cf. **Fig. 30**). Ces résonateurs seront ensuite intégrés dans un circuit microfluidique dédié pour une lecture multiplexée de la réponse de chacun d'eux.

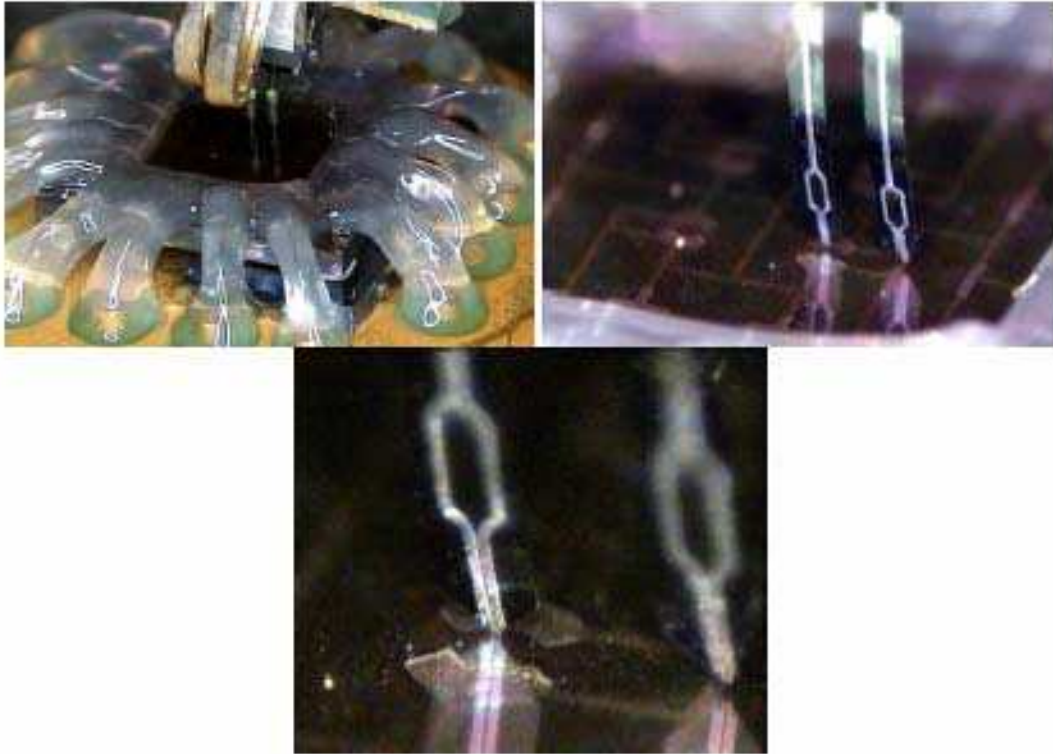


Fig. 30 : Fonctionnalisation de la surface de micromembranes piézoélectriques à l'aide de microleviers de dépôt.

III.3. Publications marquantes concernant les aspects applications

- T. Ondarçuhu, L. Nicu, S. Cholet, C. Bergaud, S. Gerder, C. Joachim, "A metallic microcantilever probes array incorporated in an atomic force microscope", *Review of Scientific Instruments* 71 (5), pp. 2087-2093, 2000.
- C. Bergaud, L. Nicu, «Viscosity measurements based on experimental investigations of composite cantilever beam eigenfrequencies in viscous media», *Review of Scientific Instruments*, 71 (6), pp. 2487-2791, 2000.

- B. Belier, A. Santoso, J. Bonnafe, L. Nicu, P. Temple-Boyer, C. Bergaud, “*Micro-optomechanical sensor for optical connection in the near field*”, Applied Physics Letters, vol. 77, 12, pp.1768-1770, 2000.
- P. Gall-Borrut, B. Belier, P. Falgayrettes, M. Castagne, C. Bergaud, P. Temple-Boyer “*Silicon technology-based micro-systems for atomic force microscopy/photon scanning tunneling microscopy*”, Journal of Microscopy, volume 202 (1), pp. 34-38, 2001.
- P. Belaubre, M. Guirardel, G. Garcia, V. Leberre, A. Dagkessamanskaia, E. Trévisiol, J.M. François, J.B. Pourciel, C. Bergaud, “*Silicon-based microcantilevers for multiple biological sample deposition*”, 12th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, TRANSDUCERS 2003, Boston, 8-12 June 2003, Vol.2, pp.1816-1819. Oral.
- P. Belaubre, M. Guirardel, G. Garcia, V. Leberre, A. Dagkessamanskaia, E. Trévisiol, J.M. François, J.B. Pourciel, C. Bergaud, “*Fabrication of biological microarrays using microcantilevers*”, Applied Physics Letters, vol. 82(18), 3122-3124 (2003). Cité dans le Virtual Journal of Biological Physics Research, 1 May, 2003.
- P. Belaubre, M. Guirardel, V. Leberre, J.B. Pourciel, C. Bergaud, “*Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples*”, Sensors and Actuators A: Physical, Volume 110, Issues 1-3, pp 130-135, 2004.
- M. Guirardel, L. Nicu, D. Saya, S. Hinh, J. Sicard, D. Lagrange, F. Mathieu, E. Cattan, D. Remiens, C. Bergaud, “*On-chip self-sensing function of 4x4 matrix micromachined resonating piezoelectric membranes for mass detection applications*”, 2004 IEEE International Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control 50th Anniversary Joint Conference, Montréal, Canada, 24-27 août 2004. Oral.
- D. Saya, L. Nicu, M. Guirardel, C. Bergaud, “*Mechanical effect of gold nanoparticles labeling used for biochemical sensor applications: A multimode analysis by means of SiNx micromechanical cantilever and bridge mass detectors*”, Review Scientific Instruments, Vol. 75(9), 3010-3015, 2004. Cité dans le « Virtual Journal of Biological Physics Research » et dans le « Virtual Journal of Nanoscale Science & Technology ».
- L. Nicu, M. Guirardel, F. Chambosse, P. Rougerie, S. Hinh, E. Trévisiol, E. Cattan, C. Bergaud, “*First steps towards a fully integrated electromechanically-based bioassay: detection of streptavidin-gold nanoparticles interaction with biotinylated DNA by using micromachined piezoelectric membranes*”, Sensors and Actuators B : Chemical , accepté, 2004.
- C. Bergaud, P. Belaubre, M. Guirardel, B. Belier, J-B. Pourciel, « Système de dépôt de solutions biologiques avec ou sans contact pour la fabrication de biopuces », Brevet français, demande d’extensions internationales en cours.
- Thèse de Liviu Nicu, « *Etudes théoriques et expérimentales du comportement mécanique de microstructures de type levier ou pont. Applications à la mesure de la viscosité de liquides et à la caractérisation électrique de nanostructures* », Université Paul Sabatier, Toulouse, 12 Octobre 2000.
- Thèse BDI de Matthieu Guirardel « *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : application*

à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or». Université Paul Sabatier, Toulouse, le 9 octobre 2003.

- Thèse de Pascal Belaubre « Développement d'un système de dépôt à base de microleviers pour la fabrication de biopuces de nouvelles générations », INSA Toulouse, 19 décembre 2003. 1^{er} prix INSA Transfert 2003. LAUREAT DU CONCOURS « LE MONDE », PRIX DE LA RECHERCHE UNIVERSITAIRE, COLLECTION PARTAGE DU SAVOIR, MARS 2005.

Conclusion

Parmi l'ensemble des travaux qui sont synthétisés ici, **les résultats les plus marquants** sont sans aucun doute ceux relatifs à mes travaux sur **la conception de biopuces à ADN et protéines de nouvelles générations** qui constituent en quelque sorte l'aboutissement de l'ensemble de mes travaux antérieurs. A elles seules, ces deux dernières années, les études ayant trait à cette thématique ont donné lieu à la publication de 7 articles dans des revues internationales, 6 congrès internationaux à comité de lecture et le dépôt de deux brevets avec extensions internationales.

Ces résultats reflètent assez bien l'évolution de mes activités de recherche au cours de ces dernières années. Ils mettent en avant un renforcement des activités « Microtechnologies et Microsystèmes » pour la chimie et la biologie avec une tendance forte qui apparaît dorénavant : elle concerne, pour une grande partie de mes activités, la réduction en taille des systèmes étudiés en ayant recours aux derniers développements des nanotechnologies.

L'ensemble de tous mes travaux a donné lieu entre autres à **29 publications dans des journaux à comité de lecture** (Applied Physics Letters, Journal of Applied Physics, Review of Scientific Instruments, Sensors and Actuators...), **39 publications dans des conférences à comité de lecture** (Eurosensors, Transducers, MEMS...), **7 publications dans des ouvrages** (Techniques de l'Ingénieur, OFTA Editions Tec&Doc, Collection Hermès, Editions Grasset...) et au dépôt de **3 brevets avec extensions internationales**.

Ces études sont (ou ont été) développées dans **le cadre de 12 projets nationaux** (régions, CNRS, Ministère,...) dont le Génopole Toulouse Midi-Pyrénées et de **deux projets européens du 6^{ième} PCRD** (NAPA : projet intégré et NANO2LIFE : réseau d'excellence).

PARTIE III

PROSPECTIVE DE RECHERCHE

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

I. PROSPECTIVE DE RECHERCHE

Ma prospective de recherche concerne la conception, la fabrication et la caractérisation de micro et nanosystèmes mécaniques en considérant plus particulièrement les problématiques afférentes à la réduction en taille et aux interfaces en vue de leur utilisation dans le domaine de la chimie et de la biologie.

Toutes les études qui ont été menées jusqu'à présent et qui sont résumées dans la partie « Travaux et Résultats » constituent une base solide pour aborder dans une certaine continuité cette nouvelle prospective de recherche qui concerne les nanosystèmes mécaniques en les associant au domaine des nanobiotechnologies. Cependant, nous n'abandonnons pas l'aspect « Micro » qui reste particulièrement pertinent en biologie cellulaire si on veut étudier des phénomènes à l'échelle de la cellule et que nous pourrions privilégier pour des études de phénomènes de mécano-transduction cellulaire par exemple. L'échelle micro peut s'avérer également incontournable ou du moins plus pertinente lorsque des volumes minimum sont requis (c'est le cas de certains tests de diagnostic médical) ou encore lorsqu'on voudra travailler à l'équilibre thermodynamique pour la détermination de constantes d'association et dissociation.

Ces activités de recherche s'articuleront donc autour de trois thématiques intimement liées les unes aux autres :

1. **les actionneurs et capteurs pour la chimie et la biologie** qui constituera la thématique la plus en phase avec mes activités précédentes et la plus applicative dans ses retombées ; il s'agira d'optimiser un système complet comprenant une partie fluïdique, la connectique électrique et les différents étages électroniques hybrides de commande et d'acquisition des signaux.
2. **les nanosystèmes électromécaniques** pour des études théoriques et expérimentales plus amont concernant les effets de réduction en taille sur les propriétés physiques en particulier sur les pertes énergétiques à caractère extrinsèque ou intrinsèque ; d'un point de vue technologique, un aspect « nanofabrication » sera fortement privilégié.
3. et enfin les **nanobiotechnologies** où matières organique (biomolécules) et inorganique (nanoparticules) sont intimement associées ; le recours à ces technologies est particulièrement pertinent pour nos activités car la dimension des objets concernés est en parfaite adéquation avec celle des nanosystèmes mécaniques que nous étudierons. Les différentes approches développées dans ce cadre seront extrêmement pertinentes pour valider les protocoles mis en œuvre dans la thématique 1.

L'ensemble de ces 3 thématiques converge vers un but ultime à long terme qui est la compréhension des phénomènes physiques à l'échelle de la molécule unique en particulier pour le développement de capteurs pour la chimie et la biologie avec une résolution et une sensibilité extrêmes.

I.1. Thématique I : actionneurs et capteurs pour la chimie et la biologie

Il y a deux volets dans cette thématique. Le premier concerne les actionneurs pour la fabrication de biopuces (ADN, protéines et cellules). Le second a trait aux capteurs pour la détection d'interactions biomoléculaires spécifiques.

A) En ce qui concerne les actionneurs, nous poursuivons notre étude concernant les réseaux de microleviers qui ont été utilisés pour effectuer des dépôts de solution d'ADN par contact en réduisant les volumes déposés (qui sont actuellement de l'ordre du picolitre) vers le femtolitre. Les techniques d'électromouillage pour le remplissage des canaux intégrés sur les microleviers doivent être optimisées notamment le choix de la couche de passivation, la géométrie et le positionnement des électrodes métalliques. D'autres approches sont également à l'étude concernant la diélectrophorèse positive et négative pour la capture de nano-objets polarisables cellules par effet de champ. Des études ont été initiées dans ce sens et seront développées avec le projet « Nanomatrices à peptides pour le diagnostic du diabète » dans le cadre du programme de l'AC « **Protéomique et génie des protéines** » en collaboration avec le Centre de Pharmacologie et Biotechnologie pour la Santé à Montpellier et le Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires et réseau Biosims, Faculté des Sciences de Rouen.

Il est important de souligner que cette étude fait également partie intégrante **d'un projet intégré européen, le projet NAPA** retenu dans le cadre du 6^{ième} PCRD. Il correspond au Workpackage « MEMS-based nanopatterning methods » et sera donc poursuivie avec de nombreux partenaires européens (CSEM Neuchatel, EPFL Lausanne, CNM Barcelone, IBM Zurich).

Le dépôt par effet de champ doit être également optimisé. Un séjour de 2 mois début 2003 **au RIKEN et à l'Université de Tokyo** nous a permis d'optimiser une technique de dépôt par électrospray pour déposer des couches de protéines sur des microstructures en silicium. Une étroite collaboration sur un projet similaire avec l'équipe de **T. Livache Laboratoire chimie de la reconnaissance et d'étude des assemblages biologiques du CEA à Grenoble** est également en cours pour l'optimisation d'une technique d'électropolymérisation qui devrait nous permettre de proposer un nouveau principe de conception de biopuces. Grâce à la combinaison de cette approche avec une nanostructuration préalable de la surface de dépôt par nano-impression, il est envisageable de développer des nanobiopuces avec des spots de quelques dizaines de nanomètres de diamètre.

B) La deuxième application concerne le développement de capteurs pour la détection d'interactions biomoléculaires spécifiques (ADN-ADN, ADN-protéines, récepteurs-ligands). Les études sur les technologies mises en œuvre seront poursuivies (optimisation des procédés de fabrication notamment) en mettant l'accent sur l'étude des phénomènes de fatigue et de vieillissement de nos structures, l'aspect système sera également privilégié (système microfluidique associé, électronique hybride...) et les problématiques associées (boucle de contre-réaction, bande-passante, dynamique de mesure, adaptation d'impédance...) pour des applications de type biopuces et biocapteurs. L'aspect électronique sera développé en collaboration avec l'équipe **de Jérôme Juillard du Département Traitement du Signal et Systèmes Électroniques de Supélec**.

Les collaborations avec les équipes de C. Amatore à l'ENS Paris, de MC Hennion à l'ESPCI et de T. Coleman à Lyon dans le cadre de l'ACI « **Capteur et nouvelles méthodologies analytiques** » et également de l'AC « **Protéomique et génie des protéines** »

déjà mentionnée dans la partie « actionneur » de ce paragraphe nous permettra d'optimiser les réponses de nos capteurs en repoussant leurs limites de résolution et de sensibilité grâce à des études sur des cas réels. Il s'agira en particulier de développer un système parfaitement fiable pour accéder à des cinétiques d'interactions et à la détermination de constantes d'association et de dissociation. Ces résultats seront systématiquement comparés avec les résultats obtenus avec le système « Biacore » (résonance de plasmons de surface) et avec le système Qsense (microbalance à quartz).

Ajoutons qu'une étude très prometteuse est en cours sur l'utilisation de biomembranes pour la détection de cations (ions Calcium, Potassium, Magnésium...) via la mesure du glissement de la fréquence de résonance induit par les interactions des cations avec des sites de reconnaissance dans la membrane en vibration. Cette étude pourra très certainement nous permettre de débiter une activité sur les mesures de type « Patch Clamp » en collaboration avec des équipes travaillant dans ce domaine, nous pensons en particulier **au laboratoire Biopuces du CEA dirigé par F. Chatelain ou au laboratoire Biomis à l'ENS Cachan – Antenne de Bretagne dirigé par B. Le Pioufle.**

Soulignons que le transfert systématique de nos procédés de fabrication complet vers le service technique de la salle blanche du LAAS déjà initié dans le cadre de nos activités sera poursuivi, ces procédés de fabrication pourront être développés dans le cadre de la plate-forme technologique du LAAS en particulier par le biais du **Réseau des grandes centrales technologiques pour la Recherche Technologique de Base (RTB)** lors de collaborations scientifiques et techniques ou pour des transferts technologiques avec l'extérieur par exemple dans le cadre de la création de l'ITAV (**Institut des Technologies Avancées des Sciences du Vivant**) ou dans le cadre de **la création d'une start-up pour une valorisation.**

I.2. Thématique II : nanosystèmes électromécaniques

La première thématique concerne la conception de nanostructures 1D intégrant des fonctions d'actionnement et de détection (piézorésistif et piézoélectrique). D'un point de vue technologique, ce projet se situe à la frontière entre les micro et nanotechnologies. Il s'agira d'associer des techniques et technologies conventionnelles (lithographie par faisceau d'ions ou d'électrons) et émergentes (nano-impression, technique Dip-pen, croissance VLS, électrodéposition) pour mener à bien ce projet.

Nous engagerons en particulier une étude de fond sur l'élaboration et la caractérisation physique (mécanique, électrique, optique) de nanofils obtenus par différents procédés de fabrication : croissance VLS, électrodéposition sur membrane poreuse (alumine par exemple). L'auto-organisation de ces nanofils par rapport à des structures d'accueil prédéfinies sur le substrat hôte (électrodes métalliques par exemple) par diffusion simple ou diffusion-convection sous flux hydrodynamique en milieu confiné sera également étudiée (canaux microfluidiques), l'interaction nanofils-substrat étant assurée via des couches auto-assemblées (interaction chimique et biochimique).

Une étude mécanique sera effectuée sur des nanostructures résonantes 1D n'intégrant pas les fonctions d'actionnement et de détection, afin d'optimiser les conditions d'élaboration. Le comportement mécanique de ces nanostructures sera étudié dans une enceinte à vide. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur la minimisation des pertes énergétiques (amortissements interne et externe) pour obtenir des facteurs de qualité aussi élevés que possible. Nous étudierons notamment les effets de traitements de surface (recuit thermique, hydrogénation, rugosité, couches auto-assemblées...). Des études en milieu liquide seront également envisagées dans le cadre d'applications biocapteurs.

En ce qui concerne l'intégration des fonctions d'actionnement et de détection, des problématiques connues de la technologie CMOS ultime sont clairement identifiées pour cette thématique : obtention de zones actives de dimensions nanométriques par exemple pour les piézorésistances mais également en termes d'architecture. De manière plus générale, nous nous attacherons à étudier l'influence de la réduction en taille sur les propriétés physiques de nanostructures 1D piézorésistifs et piézoélectriques (effets de surface en particulier).

Différentes techniques d'excitation devront être envisagées (piézoélectriques, électrostatiques, photo-acoustiques). Enfin, une étude en milieu liquide sera également développée pour des applications de type biocapteurs en tirant profit des résultats obtenus avec les capteurs étudiés dans la thématique 1 notamment sur les cinétiques de réaction. D'autre part, de tels nanosystèmes pourront être mis à profit sous couvert de quelques modifications dans la conception, pour la structuration de surface à une échelle submicronique en phase la partie correspondante de la thématique 1.

Les collaborations dans le cadre de cette thématique seront poursuivies avec **l'équipe de A. Bosseboeuf (IEF Paris) pour l'aspect caractérisation mécanique**. Des collaborations avec les équipes travaillant dans le domaine des RF MEMS seront envisagées pour les problèmes associés au résonateurs hautes-fréquences, nous pensons en particulier à **l'équipe de L. Buchailot à l'IEMN à Lille**.

Pour l'aspect nanofabrication, une collaboration initiée dans le cadre de mes activités **au LIMMS avec le KIMM Institute en Corée du Sud** (nano-impression, technique Step and Flash) sera poursuivie.

I.3. Thématiques III : nanobiotechnologies

L'utilisation de nanoparticules est extrêmement avantageuse pour caractériser très finement la réponse d'un système mécanique (elle l'est également pour d'autres types de systèmes) et pour contrôler *a posteriori* la qualité du dépôt effectué dans le cadre de nanostructuration de surface. Dans le cadre de cette thématique différents protocoles seront optimisés pour des traitements de surface de capteurs et de nanoparticules que l'on pourra utiliser avantageusement dans le cadre des thématiques 1 et 2. La caractérisation rigoureuse des édifices biochimiques décrits précédemment est une étape clé car elle conditionne l'optimisation des protocoles chimiques et biochimiques qui seront utilisés ultérieurement pour la conception de biopuces (ADN, protéines, etc.). Pour ce faire, ces résultats seront systématiquement comparés avec les résultats obtenus avec le système « Biacore » (résonance de plasmons de surface) disponible sur **la plate-forme Transcriptome Biopuces du Génomole Toulouse Midi Pyrénées** ou dans le **laboratoire de Pharmacologie de Claude Granier à Montpellier dans le cadre de l'AC « Protéomique et génie des protéines »** et avec le système Qsense (microbalance à quartz) du LAAS. La spectrophotométrie UV-visible sera, quant à elle, utilisée afin d'optimiser les conditions de fonctionnalisation des surfaces de colloïdes pour leur utilisation ultérieure.

Dans un autre registre, il sera intéressant de développer les techniques de nanostructuration de surface (lithographie et croissance localisée) en utilisant des nanoparticules. Dans ce cadre, une collaboration en cours avec l'équipe de F. Rossi à Ispra en Italie dans le cadre du réseau d'excellence Nano2life sera poursuivie.

Je tirerai également profit de **mon séjour de 2 ans au LIMMS/CNRS-IIS à l'Université de Tokyo dans le laboratoire de Biophysique et de Biochimie du Professeur Noji** pour enrichir cette thématique avec de nouvelles approches qui concernent notamment

l'utilisation de nanoparticules fluorescentes (molécules organiques ou inorganiques), de quantum dots pour la caractérisation en température de nanofils résistifs en silicium monocristallin ou encore l'utilisation de ces nanofils pour des mesures de variations de conductance induites par des interactions biospécifiques. Ces approches sont totalement cohérentes avec les activités développées dans le groupe « Nano-adressage et Nanobiotechnologies » du LAAS.

Plus généralement, les projets européens, NAPA et NANO2LIFE, retenus dans le cadre du 6^{ième} PCRD, sont parfaitement en phase avec l'ensemble des thématiques que nous proposons et ils permettront de les enrichir sans aucun doute sur de nombreux points par le biais de collaborations déjà en cours ou à venir.

ANNEXE I

Techniques et technologies de fabrication de nanodispositifs

La technologie silicium a toujours trouvé par le passé des solutions innovantes pour poursuivre son développement en production de biens manufacturés. Pour dépasser la limite prévisible en micro-électronique de 10^{10} composants/cm² pour une DRAM silicium, il importe aujourd'hui de poursuivre l'exploration en fabrication et en production de nouvelles pistes technologiques en particulier pour les nanosystèmes. Des procédés de fabrication doivent être développés pour garantir une largeur de trait inférieure à 100 nm. Il est également important de développer des technologies permettant d'atteindre ces densités d'intégration à faible coût comparativement aux technologies conventionnelles même si cet aspect revêt une importance relative lorsqu'on aborde le domaine de la chimie et de la biologie.

Parallèlement à cette approche héritée de la micro-électronique qui consiste à améliorer les techniques et technologies actuelles pour fabriquer et produire des dispositifs de tailles submicrométriques avec une architecture traditionnelle comparables à celle des CMOS, des techniques et technologies alternatives ont vu le jour. Les développements les concernant ont souvent été initiés par des chimistes ce qui est révélateur de l'importance de la chimie et en particulier de la chimie de surface dans des domaines où elle a longtemps été ignorée ; on pense en particulier à Georges Whitesides de l'Université Harvard¹⁹ pour la lithographie douce et à Chad Mirkin de l'Université NorthWestern²⁰ pour la « Dip-pen Nanolithography », deux techniques que nous allons présenter. Nous pourrions également citer un autre chimiste Christof Niemeyer²¹ de l'Université de Dortmund qui a développé de nombreuses études dans le domaine des nanobiotechnologies et en particulier en utilisant des nanoparticules [1].

Ces approches sont cependant encore loin de satisfaire aux critères de rendement et de fiabilité de l'industrie et beaucoup de problèmes se posent encore en termes de surfaces traitées, de vitesse d'écriture, d'alignement entre niveaux successifs, etc. alors que les limites de résolution n'apparaissent pas véritablement comme des verrous technologiques. En revanche, leur utilisation dans le domaine de la chimie et de la biologie pour nanostructurer des surfaces avec des biomolécules peut s'avérer extrêmement pertinente dans bien des cas ; leurs développements récents et à venir devraient les rendre rapidement incontournables en chimie et en biologie.

Qu'en est-il des techniques de fabrication actuellement ? Pour répondre à cette question, nous présentons **Fig. 1** différents domaines, chacun d'eux étant associé à une technique particulière, reliant la taille des structures à la cadence pour les fabriquer. Deux grands domaines se dégagent : l'un concerne l'écriture séquentielle, l'autre l'écriture parallèle.

L'écriture séquentielle englobe les techniques de microscopies de champ proche (STM, AFM), les techniques de lithographie par faisceau d'ions ou faisceau d'électrons... L'écriture parallèle comprend la lithographie UV extrême (EUV), la lithographie par rayons

¹⁹ <http://gmwgroup.harvard.edu/domino/html/webpage/homepage2.nsf>

²⁰ <http://www.chem.northwestern.edu/~mkngrp/>

²¹ <http://www.chemie.uni-dortmund.de/groups/niemeyer/index.html>

X et plus récemment les techniques de nano-impression et de lithographie douce et les techniques de lithographie en parallèle dérivées de la microscopie à force atomique. Ce sont des approches de type « top-down ». Parallèlement, une autre tendance forte se dégage, de type « bottom-up », elle concerne principalement la chimie, la biochimie et les techniques d'auto-assemblage.

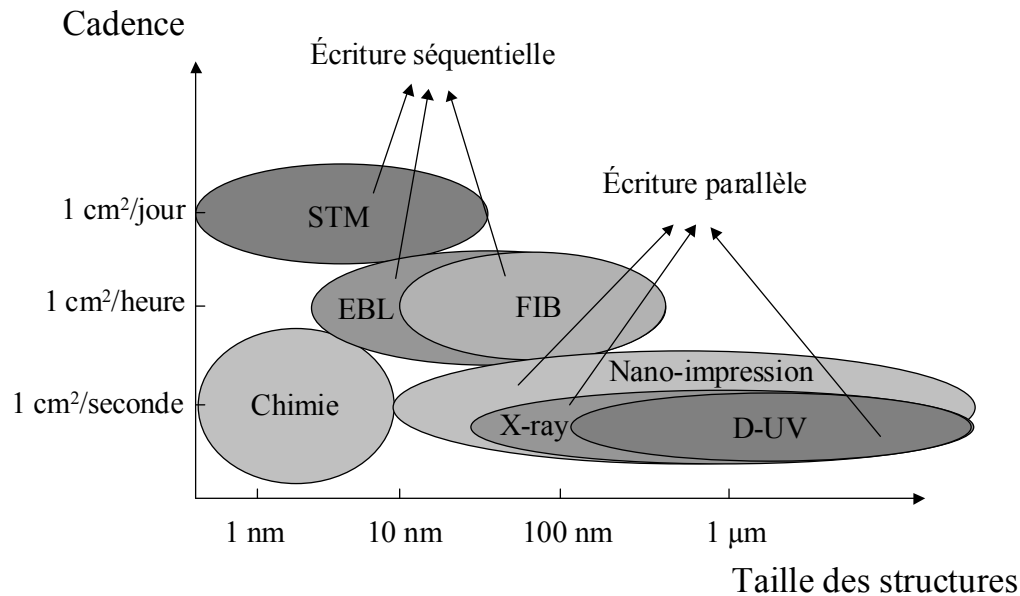


Fig. 1: Les différentes techniques de nanofabrication

I. L'approche descendante (Top-Down)

Si les techniques de lithographie par faisceau d'électrons ou faisceau d'ions ont l'avantage de permettre de s'affranchir de la limite de résolution optique qui impose une dimension minimale de l'ordre de 100 nm, elle ne permettent pas actuellement de fabriquer collectivement un ensemble de motifs. C'est la raison pour laquelle de nouvelles approches ont été développées : les techniques de nano-impression et de lithographie douce et les techniques de lithographies en parallèle dérivées de la microscopie à force atomique. Les deux premières constituent une voie assez prometteuse même si une limite ultime de l'ordre de 10 nm semble difficilement franchissable [2]. La seconde doit permettre d'obtenir des résolutions de l'ordre du nanomètre mais les vitesses d'écriture sont encore loin de rivaliser avec les techniques de lithographies actuelles ce qui pour l'instant ne permet pas d'envisager de production de masse. Ceci paraît réhibitoire pour la production (fabrication en masse) de nanocomposants, en revanche nous verrons plus loin que ces techniques sont extrêmement bien adaptées à la fabrication (et la production vraisemblablement dans un avenir proche) de biopuces.

I.1. Nano-impression et lithographie douce

Les techniques de nano-impression et de lithographie douce sont bon marché et simples à mettre en œuvre. Elles présentent un intérêt pour les laboratoires de recherche ou les centres de recherche et développement industriels car elles permettent de fabriquer des nanostructures sans avoir à utiliser de matériels lourds dans la mesure où on possède le

masque mère. Il est également possible grâce aux techniques de lithographie douce de réaliser des structures 3D et de générer des motifs et des structures sur des surfaces non planes [2].

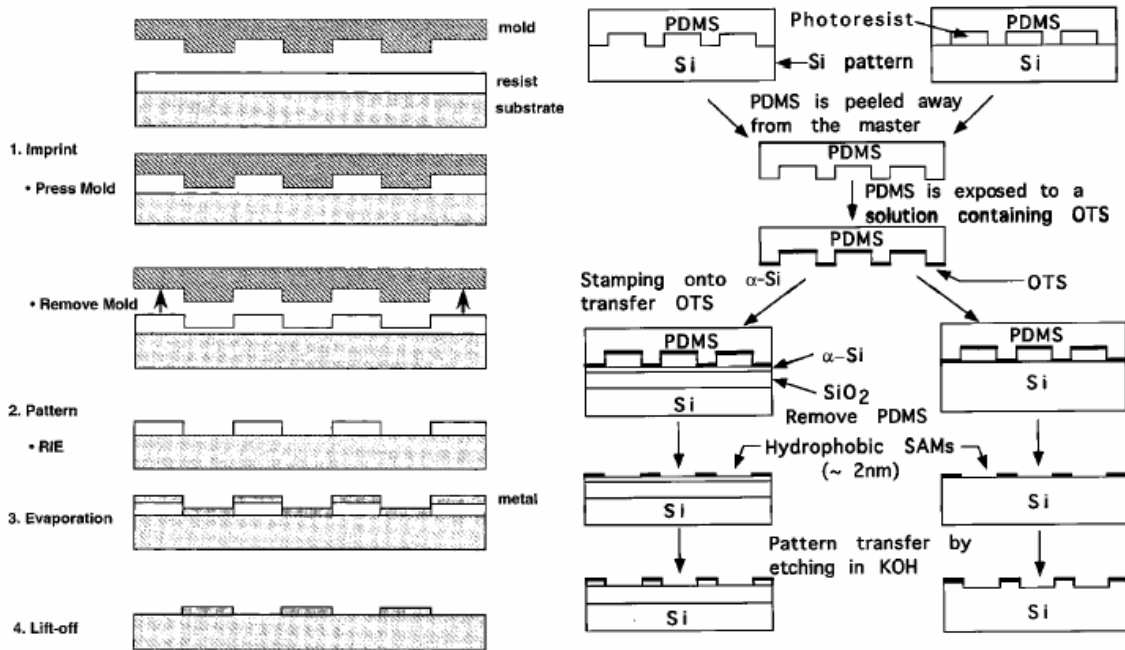


Fig. 2 : A gauche Technique de lithographie par nano-impression [3]; A droite Technique de lithographie par contact [4]

La **nano-impression** (nano-imprint ou nano-embossing en anglais) consiste à transférer, via un moule sur lequel est exercée une pression, un ensemble de motifs dans une fine couche de polymère déposée sur un substrat. Ce polymère peut être une résine de type polyméthyl méthacrylate (PMMA) ou une résine SU8. L'ensemble substrat-couche de polymère est préalablement mis en température (autour de 175°C pour être bien au dessus de la température de transition vitreuse du PMMA qui est de 105°C) pour la mise en forme du polymère lorsque la pression est exercée. Les motifs ainsi obtenus sont transférés jusqu'au substrat grâce à une étape de gravure supplémentaire. Les étapes suivantes sont plus conventionnelles (**Fig. 2**).

La lithographie douce consiste à utiliser un tampon en élastomère imprégné de la solution contenant les molécules à déposer. Lors du contact avec la surface, il y a transfert de la couche de molécules sur la surface. Cette couche jouera le rôle de couche de masquage lors d'une étape de gravure ou d'une réaction chimique de surface ultérieure (cf. Fig. 2). Il s'agit d'une technique d'**impression par contact** («micro-contact printing» en anglais). Le PDMS est le polymère le plus utilisé pour l'élaboration des tampons (polydiméthysiloxane). Il présente l'avantage d'avoir une température de transition vitreuse très basse ce qui fait qu'il est à l'état liquide à température ambiante. Il peut être solidifié par simple réticulation. Il présente également d'autres propriétés qui sont essentielles pour l'obtention de motifs sub-micrométriques. L'énergie libre de surface du PDMS est très faible et il est très stable chimiquement ce qui permet de l'utiliser avec une grande variété de molécules en s'affranchissant des phénomènes d'adhésion ou de réactions chimiques à la surface du tampon. Le PDMS est hydrophobe ce qui limite les effets d'humidité (pas de gonflement de l'élastomère), il est stable thermiquement jusqu'à une température de 186°C à l'air et optiquement transparent jusqu'à 300 nm. En ce qui concerne la solution, il s'agit en général

de thiols dans de l'éthanol pour les surfaces d'or ou d'octadecyltrichlorosilane (OTS) dans du toluène pour les substrats de silicium.

Quelle que soit la technique utilisée, il faut d'abord réaliser le masque mère. Suivant les résolutions recherchées, il sera fabriqué grâce à des techniques de lithographie optique (fabrication collective de motifs) et/ou des techniques de lithographie par faisceau d'électrons (fabrication non collective) et de gravure sèche et/ou humide. Dans le cas d'une fabrication non collective, on pallie le temps de fabrication du masque mère par une réutilisation de ce même masque des dizaines de fois.

Ce masque étant réalisé, il sera en général traité chimiquement pour limiter les problèmes d'adhésion. Il est ensuite utilisé tel quel pour la nano-impression. Dans le cas de la lithographie douce, une couche de polymère sera déposée sur ce masque qui joue le rôle d'un moule pour former le tampon.

Que l'on privilégie la nano-impression ou la lithographie douce, les problèmes rencontrés sont similaires : difficulté d'alignement entre différents niveaux de masquage, taille du tampon encore limitée, phénomènes d'adhésion lors du contact, taille des motifs et densité d'intégration encore faible due au fait que la taille des motifs et la distance inter-motif est dépendante des effets de reflux du polymère (dans le cas de la nano-impression) et de la diffusion des molécules (dans le cas de la lithographie douce) lors du contact entre le tampon et la surface, durée du procédé de fabrication encore longue ce qui limite fortement le rendement, durée de vie du tampon encore limitée... [5]

Des solutions sont proposées pour augmenter le rendement de fabrication de ces techniques (utilisation de différents types de résines ou de molécules en solution, optimisation des règles de dessin des moules pour réduire la taille des motifs et augmenter la densité d'intégration, suppression de la couche anti-adhésion...). Des machines permettant d'effectuer des étapes de lithographie par « Hot embossing » ou « UV-Nanoimprint » sont d'ores et déjà commercialisées par les sociétés Hitachi²², EVG²³... La technique « Step and Flash » très prometteuse est également proposée par la société privée Molecular Imprints²⁴.

Comme le montre la **Fig. 3**, d'autres techniques sont également envisageables, elles ont trait à l'utilisation de masques perforés qui permettent de localiser le dépôt (Stencil mask, shadow mask) mais elles sont encore très perfectibles d'un point de vue de la reproductibilité et de la résolution.

²² <http://www.hitachi.com>

²³ <http://www.evgroup.com>

²⁴ <http://www.molecularimprints.com>

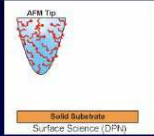

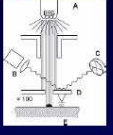

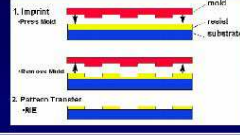
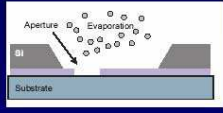
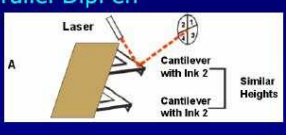


Emerging Nanopatterning Methods			
	Molecule Delivery (wet, soft-contact) 10-100 nm scale	Thermo-mechanical (Nano-imprint, embossing, hard contact) 10-100 nm scale	Local Deposition Stencil, vacuum, no contact 10-100 nm scale
Single & Scanning <i>de novo</i> Fast prototyping	DipPen 	AFM storage (IBM) 	AFM nanostencil 
Parallel & Static <i>Replication</i> Mass production	Soft-litho/uCP 	Nano Imprint Litho 	Membrane nanostencil 
Parallel & Scanning <i>de novo</i> Adaptive mass- production	Parallel DipPen 	Millipede (IBM) 	EU project ATOMS 

Fig. 3 : Les différentes techniques émergentes pour la nanostructuration de surface. D'après J. Brugger [Projet Européen NAPA].

I.2. Techniques de lithographie en parallèle, dérivées des techniques de microscopie de champ proche

Les techniques de lithographie dérivées des techniques de microscopie de champ proche qui englobent la microscopie à effet tunnel, la microscopie de champ proche optique et la microscopie à force atomique constituent également des approches alternatives. Nous ne parlerons pas des deux premières qui, à l'heure actuelle, n'offre aucune possibilité de fabrication collective.

Nous allons détailler la troisième voie beaucoup plus intéressante d'un point de vue fabrication en parallèle. Cette approche permet de fabriquer un ensemble de structures à l'échelle du nanomètre et repose sur l'utilisation en parallèle de microleviers comparables à ceux employés en microscopie à force atomique. Ces microleviers, avec une pointe à l'extrémité dont le rayon de courbure à l'apex peut être inférieur à 20 nm, sont fabriqués collectivement grâce des techniques de micro-usinages de surface et de volume qui sont aujourd'hui bien maîtrisées. Chaque microlevier est adressable individuellement d'un point de vue de l'actionnement (thermomécanique ou piézoélectrique) et de la détection (piézorésistive en général). Ces techniques sont les plus prometteuses d'un point de vue de la résolution qui pourrait être inférieure au nanomètre dans les années à venir et également d'un point de vue de la densité d'intégration mais il reste à démontrer qu'elles permettront de rivaliser d'un point de vue rendement et fiabilité avec les techniques de fabrication collective actuelles.

Cette approche développée par plusieurs équipes dans le monde (Université de Stanford, IBM Zurich, Université de Tokyo...) est utilisée pour la lecture et l'écriture à haute densité pour les mémoires mais également pour la nanolithographie où des résolutions inférieures à 100 nm ont été démontrées sur une surface de l'ordre du centimètre carré [6].

Concernant les applications développées par IBM Zurich pour la lecture et l'écriture à hautes densités pour le stockage de données [7], un système comprenant une matrice de 32 x 32 microleviers utilisés en parallèle a été mis au point (cf. **Fig. 4**). Ce système repose sur un principe de lecture et d'écriture thermiques et permet d'obtenir des densités d'écriture de 100 Gbit/in², valeur 2 fois supérieure à celle que l'on peut atteindre avec les techniques d'écriture avec des matériaux magnétiques. En revanche, la vitesse de lecture est de l'ordre de quelques Mb/s et la vitesse d'écriture de 100 kBit/s. D'autre part, le problème de l'accès à une telle densité d'information n'est pas encore résolu. Il ne suffit pas d'obtenir une telle densité de stockage, encore faut-il pouvoir y accéder en des temps raisonnables.

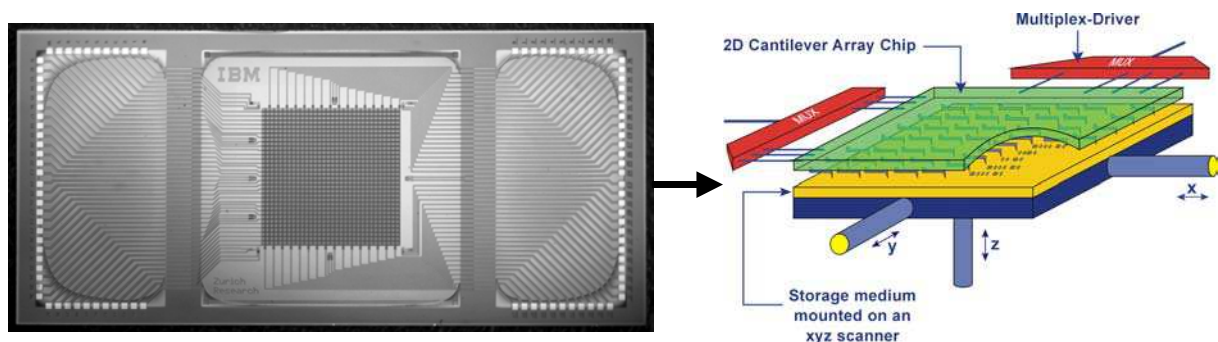


Fig. 4: Système « Millipede » développé par IBM Zurich pour l'écriture et la lecture thermiques à haute densité. Le principe de fonctionnement repose sur l'utilisation d'une matrice de 1024 microleviers adressables indépendamment en lecture et en écriture [7].

La **Fig. 5** décrit les principales étapes de fabrication d'une grille de MOSFET en utilisant des techniques de nanolithographie basées sur une oxydation localisée d'une couche de silicium amorphe grâce à la pointe d'un microlevier (la configuration utilisée pour l'expérience est celle d'un microscope à force atomique classique). Grâce à cette technique, des largeurs de grille de 50 nm ont été obtenues [8].

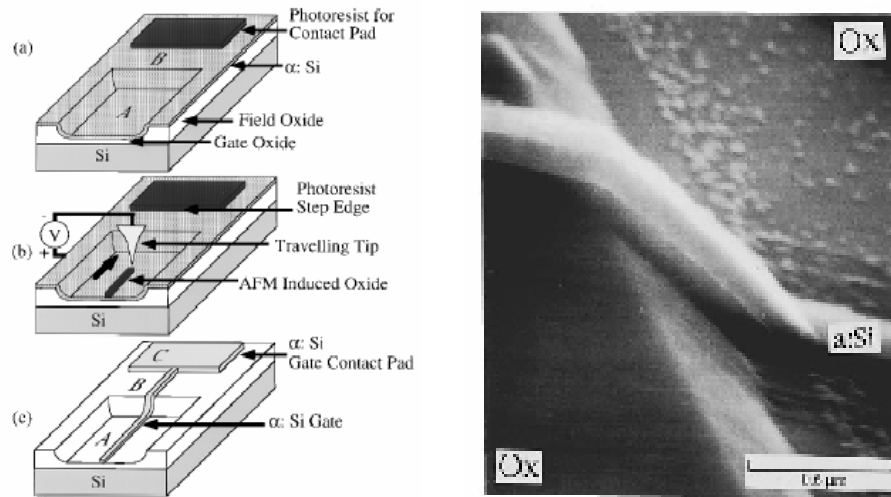


Fig. 5 : Réalisation d'une grille de MOSFET par oxydation locale du silicium à l'aide d'une pointe de microscope à force atomique [8].

En pratique, de manière générale, plusieurs types de problèmes apparaissent avec l'utilisation de ce type de structures :

- Le problème de l'uniformité des pointes : il est en effet très difficile de contrôler le rayon à l'apex de manière uniforme sur des surfaces de plusieurs dizaines de centimètres carrées surtout lorsqu'on recherche des précisions inférieures au nanomètre. Ce problème peut être exacerbé lorsque les structures de type microlevier sont désolidarisées du substrat. En effet, des gradients de contraintes dans les couches peuvent engendrer une courbure du microlevier et donc une variation de la hauteur effective des pointes. A ce problème s'ajoute celui de l'usure des pointes, phénomène qui pourrait limiter très fortement la durée de vie de ces structures. Une solution envisageable consiste à utiliser des nanotubes de carbone comme pointes, leurs propriétés mécaniques assurant d'une part une diminution très conséquente des phénomènes d'usure et d'autre part, une augmentation très sensible de la résolution [9]. Les effets de contraintes peuvent être également minimisés voire supprimés en contrôlant très finement les conditions d'élaboration des films minces constituant les microleviers.

- Un autre problème concerne la vitesse d'écriture de ce type de système qui est encore très faible. D'après C. Quate²⁵, il faudrait un ensemble de 10^5 microleviers en parallèle pour que les rendements de production soient comparables à ceux de la micro-électronique actuelle. On imagine aisément le type de problèmes que peut poser l'utilisation d'un tel nombre de microleviers : problème de connectiques (comparables à ceux qui existent en micro-électronique avec la réduction des dimensions), de positionnement très précis de l'ensemble des pointes par rapport à la surface, de bandes passantes ce qui suppose d'optimiser le traitement du signal. Des solutions peuvent être envisagées en s'appuyant sur les développements récents de la microélectronique: multiplexage de l'information, intégration d'un maximum de fonctions d'interface sur la puce au plus près de la partie active...

- Une autre limitation concerne la réduction en taille et l'augmentation de l'intégration des réseaux de microleviers. En effet, les approches utilisées pour les fabriquer

²⁵ http://www.stanford.edu/group/quate_group

sont des techniques de fabrication collective. Si on veut réduire leur dimension, il faudra utiliser d'autres techniques (faisceau d'ions focalisés, faisceau d'électrons...), mais on perd alors tout l'intérêt de la fabrication en masse à moins d'avoir recours aux techniques de nano-impression. A ceci s'ajoute le problème de l'interfaçage et plus particulièrement des connexions qui sera encore plus important. Plus la taille du microlevier sera faible et plus leur nombre sera important, plus le problème des connexions électriques sera complexe.

I.3. Caractérisation physique et adressage à l'échelle du nanomètre

Quoi qu'il en soit, quand bien même une telle approche s'avèrerait difficilement exploitable pour la production de nanodispositifs, elle reste très intéressante en tant que technique de caractérisation physique à l'échelle du nanomètre. Comparable dans le principe de fonctionnement à la microscopie à force atomique, elle permettrait de pallier la lenteur inhérente à l'utilisation d'un seul levier grâce à l'utilisation en parallèle d'une multitude de microleviers pour des surfaces balayées beaucoup plus importantes de l'ordre de plusieurs centimètres carrés comme l'illustre la **Fig. 6** [6].

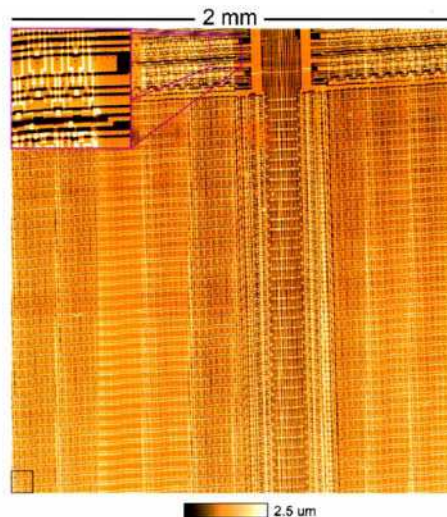


Fig. 6 : Image d'un circuit intégré obtenue en microscopie à force atomique avec un réseau de 10 microleviers. La vitesse de lecture est de 1 mm/s et la taille minimale du pixel de 0,4 µm [6].

Il est important d'insister sur le fait que ces nouvelles techniques de caractérisation sont d'une importance capitale pour le développement des techniques et technologies de fabrication de nanocomposants. Nous ne nous attarderons pas sur les applications classiques de la microscopie à force atomique et ses techniques dérivées (EFM, SCM, SMM : électrostatique, capacitive, magnétique...) mais d'ores et déjà des techniques de caractérisation électrique à l'échelle du nanomètre en parallèle voient le jour [10].

L'optique de champ proche a été évoquée dans le chapitre « Résultats » puisque des microleviers de microscopie à force atomique en nitrure peuvent être utilisés pour collecter une onde évanescente à la surface d'un échantillon [11].

D'autre part, l'émergence récente du mode non contact en microscopie à force atomique sous Ultra-Vide a permis d'atteindre des résolutions atomiques [12]. Si ces avancées devaient se confirmer, la microscopie à force atomique pourrait s'imposer

rapidement comme une technique de choix pour la caractérisation à l'échelle atomique et supplanter la microscopie à effet tunnel beaucoup plus lourde à mettre en œuvre.

II. L'approche Ascendante « Bottom-up »

Nous allons décrire différentes techniques permettant de structurer une surface avec des édifices nanométriques. Ces approches sont en général privilégiées dans le domaine de l'électronique moléculaire en s'appuyant sur la synthèse de molécules complexes mais elles sont incontournables dans le domaine de la chimie et de la biologie.

II.1. Chimie de synthèse et chimie supramoléculaire aux interfaces

L'utilisation d'assemblages organisés de molécules organiques fonctionnelles est également une voie possible. Cette stratégie utilise les potentialités d'auto-organisation de molécules organiques entre elles ou de molécules sur une surface de métal ou de semi-conducteur. Un grand nombre de briques élémentaires de taille inférieure à 10 nm devraient ainsi pouvoir être assemblées en une architecture 2D et 3D réalisant une fonction complexe. Pour réaliser de telles architectures, les recherches au cours de ces dernières années ont permis d'établir clairement les verrous scientifiques et/ou techniques à lever à court terme:

- i) synthèse de molécules fonctionnelles
- ii) mise au point des techniques de dépôt contrôlé et sélectif de molécules fonctionnelles sur des surfaces homogènes ou sur des structures hôtes nanostructurées;
- iii) démonstration de composants moléculaires
- iv) compréhension de l'influence de la structure moléculaire sur le transport
- v) mise au point des techniques d'interconnexion des molécules entre elles
- vi) compréhension du transport à l'interface molécule-métal (semi-conducteur) et entre molécules interconnectées.

Les 4 derniers points concernent plus particulièrement le domaine de l'électronique moléculaire. Dans le domaine des biopuces et des biocapteurs, ces derniers points concerneront plus spécifiquement la détection, c'est-à-dire la transduction d'un phénomène physique (mécanique, optique, chimique...) engendré sur la surface lors d'une reconnaissance biospécifique en un signal électrique exploitable.

Ajoutons qu'actuellement de nouvelles techniques de chimie sous pointes se développent. Elles permettent de contrôler et de diriger beaucoup plus finement la réaction chimique. Citons à titre d'exemple la microscopie à force atomique et ses techniques dérivées pour la reconnaissance moléculaire [13] ou l'électrochimie sous pointe [14].

II.2. Structuration de surface avec des molécules, des nanoparticules organiques et inorganiques, etc., par auto-assemblage, peignage, mouillage et séchage

La technique du peignage moléculaire est particulièrement intéressante [15]. Elle permet de travailler sur un ensemble de dispositifs et non plus sur un seul. On utilise le front d'un liquide en mouvement pour aligner les molécules contenues dans ce liquide. En

effectuant des traitements chimiques de surface, on peut arriver non seulement à aligner des molécules en plongeant un échantillon dans une solution contenant les molécules à déposer (cette technique a été initialement mise au point avec des brins d'ADN), mais on peut également fixer ces molécules sur des régions particulières de la surface. Cette technique a été utilisée avec succès pour positionner des nanotubes de carbone sur des nanoélectrodes en or. Un traitement de surface spécifique a permis d'obtenir un compromis entre force d'interaction sur la surface et force due au front du liquide qui se déplace [10].

Le mouillage est l'étude de l'étalement d'un liquide déposé sur un substrat solide (ou liquide). C'est également un phénomène qui joue un rôle prépondérant pour la préparation et la structuration de surfaces ; il peut être total ou partiel. Il peut être contrôlé grâce à des traitements de surface adéquats et dépend très fortement de la rugosité de la surface ; des défauts de surface peuvent également influencer les propriétés de mouillage d'un échantillon [16]. Ce phénomène est d'ailleurs utilisé à profit pour modifier localement la mouillabilité d'une surface et la structurer lors du contact avec un liquide contenant des molécules d'intérêt chimique ou biologique.

Des techniques de séchage sous atmosphère et température contrôlées présentent également un intérêt dans la mesure où elles permettent de structurer une surface avec un auto-assemblage contrôlable obtenu à partir de molécules en solution. Nous pensons en particulier à des mélanges protéines-sels qui conduisent lors du séchage à des arrangements dendritiques fortement dépendant du type de sels utilisé, de la température de séchage ou de la concentration de protéines [3, 17]. Signalons que le séchage d'une goutte contenant des molécules ou des particules conduit généralement à la formation de dépôts en forme d'anneau ou « doughnuts ». L'origine de ce phénomène a été identifié récemment [18, 19] et utilisé notamment pour localiser le dépôt de nanoparticules sur une surface [20]. On peut également citer les techniques de structuration de surface basées sur l'instabilité de Marangoni [16].

L'auto-assemblage de nanoparticules fonctionnalisées en jouant sur les propriétés d'interactions spécifiques de molécules chimiques ou biologiques peut conduire à une nanostructuration 3D à partir d'une surface plane [1, 21-27]. Soulignons également que des nanoparticules adsorbées sur une surface peuvent être utilisées pour effectuer de la nanolithographie. Suivant leurs propriétés elles peuvent en effet jouer soit le rôle de masques lors d'étapes de gravure sèches ou humides soit servir de germes de croissance et permettre ainsi la fabrication de nanopiliers comme illustré sur la **Fig. 7** [28, 29, 30, 31, 32].

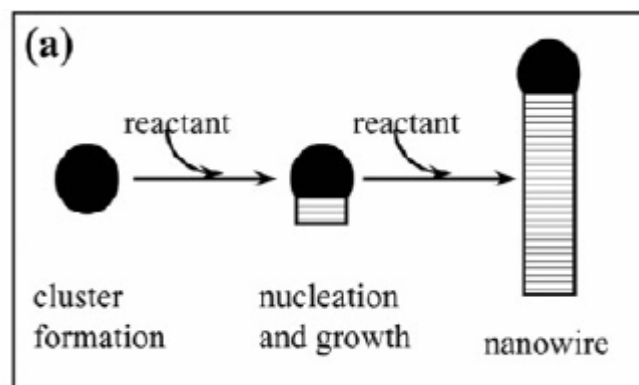


Fig. 7 : Schéma illustrant le principe de croissance par croissance Vapeur-Liquide-Solide (VLS growth). D'après [32].

Une autre solution très élégante consiste à utiliser à des membranes poreuses (en alumine par exemple) dans lesquels on fait croître des nanofils [33, 34]. Pour une synthèse

exhaustive concernant la fabrication et la caractérisation de nanostructures à une dimension (nanofils, nanopiliers...), nous conseillons la lecture de l'article de Xia et al. [35].

Dans le même esprit, les techniques pour déplacer un liquide contenant des nanostructures vers des régions particulières d'une surface en utilisant un champ électrique (électromouillage, diélectrophorèse...) ou magnétique sont très efficaces. Ces techniques s'avèrent extrêmement pertinentes pour la fabrication de biopuces en particulier pour positionner des nano-objets sur des emplacements prédéfinis (nano-électrodes par exemple).

Greffage chimique, biochimique et traitements de surface : quelques stratégies²⁶

I. Le greffage : réaction chimique et interaction affine

I.1. La chimie du greffage

I.1.1. La stratégie mise en œuvre

Les réactions chimiques mises en jeu lors de l'étape de greffage dépendent du type de matériau utilisé (métal ou silicium et matériaux dérivés) et du mode de greffage considéré (covalent ou affiné). Plusieurs cas peuvent être envisagés en fonction du mode de détection utilisé, l'objectif étant de mettre au point un mode de fonctionnalisation des supports solides adapté à une grande variété de protéines, sans qu'il y ait perte de leurs propriétés biologiques. La durée de vie des structures obtenues doit, par ailleurs, être suffisante et leur coût assez faible afin d'envisager des applications ultérieures.

Une surface qu'elle soit recouverte d'or ou d'oxyde de silicium²⁷ est très rarement utilisée sans traitement de surface. En général, une couche d'interface est utilisée avant l'interaction biospécifique. Il s'agit dans la plupart des cas d'une monocouche obtenue par auto-assemblage (SAM : Self Assembled Monolayer) de molécules organiques ou inorganiques. Cette couche joue trois rôles essentiels :

1. Elle permet de modifier directement les propriétés physico-chimiques et biochimiques d'une surface grâce à la structure moléculaire des chaînes polymères organiques ou inorganiques constituant la couche et des groupements fonctionnels à leur extrémité (hydrophobe, hydrophile,...). En particulier, les propriétés de mouillabilité d'une surface ou encore les propriétés d'une interface à interagir spécifiquement avec certaines protéines peuvent être modulées pour des applications très ciblées.

2. Elle joue également le rôle d'espaceur entre la surface et la biomolécule. Ceci permet de s'affranchir d'effets ou d'interactions parasites de la surface en plaçant le site actif de la biomolécule où s'effectuera la reconnaissance biospécifique à une distance suffisamment importante (de l'ordre de plusieurs nanomètres) de la couche d'accroche (or ou oxyde de silicium). En particulier, certaines couches sont utilisées pour leur faculté à inhiber l'adsorption de protéines.

3. Elle permet, le cas échéant, de démultiplier le nombre de sites de greffage et ainsi d'augmenter la sensibilité de la détection.

²⁶ D'après le projet CNRS proposé Marie ERARD en section 18 au LAAS en 2003

²⁷ du fait de la présence quasi-systématique, sauf en utilisant des traitements chimiques très particuliers, d'un oxyde natif de 1 à 2 nm à la surface du silicium à l'état naturel, c'est-à-dire à l'air libre, le cas d'une surface de silicium se ramène en général au cas d'une surface d'oxyde de silicium

I.1.2. Interaction biospécifique : greffage de type affin

L'adsorption spécifique et l'interaction affine sont deux modes d'immobilisation de molécules sur SAM souvent envisagés. La première méthode, dont le grand avantage est la simplicité et la rapidité d'exécution (le nombre d'étapes est limité), présente l'inconvénient potentiel d'induire une perte des propriétés biologiques des protéines greffées. Il s'agira, dans un premier temps, de privilégier l'utilisation d'une interaction affine de type avidine - biotine ($K_d = 10^{-15}$ M) qui préservera au mieux les propriétés des biomolécules. De plus, il existe une grande variété de protéines biotinilées qui interviennent dans des processus de reconnaissance antigène - anticorps.²⁸ Elles pourront être greffées *via* une interaction avec l'avidine et mises à profit afin de valider la méthode proposée. Ultérieurement, l'utilisation de protéines plus spécifiques nécessitera la collaboration avec des chimistes et des biochimistes capables de les modifier; l'orientation maîtrisée de la biomolécule par rapport à la surface permettra de gagner en sensibilité.

I.1.3. Formation par greffage covalent sur surface d'or ou d'oxyde de silicium de couches auto-assemblées possédant un site affin (biotine)

- **Le greffage sur or.** L'utilisation de thiols permet de réaliser des monocouches sur les surfaces d'or (SAM) dont les propriétés physico-chimiques peuvent être adaptées à leur utilisation ultérieure en faisant varier la nature du groupe fonctionnel qui termine la chaîne alkyle. Par ailleurs, des monocouches mixtes ont été réalisées avec succès par plusieurs équipes. Deux cas sont particulièrement intéressants et seront envisagés dans le cadre de ce projet.

1. *Un mélange de résidus hydrophiles (-COOH, -OH) et hydrophobes (alkyles)*[36]. Ce type de mélange autorise un meilleur contrôle de la mouillabilité de la surface. Cet aspect est important dans le cas des méthodes de dépôt envisagées. Pour la mise en oeuvre de la lithographie douce, la mouillabilité de la surface par rapport à celle du tampon sera optimisée afin que le transfert de biomolécules ait effectivement lieu. L'immobilisation par « dip-pen » lithographie n'est, quant à elle, possible que si la surface de l'échantillon est plus hydrophile que celle du levier.

2. *Un mélange de résidus alcools et des résidus acides* [37]. Cette SAM mixte offre comme avantage, la possibilité de lier de manière covalente une biotine (**Fig. 1**). Les résidus acides sont tous d'abord transformés en ester en utilisant le pentafluorophénol, puis en amide après réaction avec les résidus amine de la chaîne latérale de biotines modifiées. Les résidus alcools restent inchangés. Le nombre de sites biotinilés sera maîtrisé en ajustant les proportions utilisées de chaque type de chaîne.

²⁸ Un certain nombre de protéines biotinilées sont commerciales et dans le cas contraire des modes opératoires variés sont décrits dans la littérature.

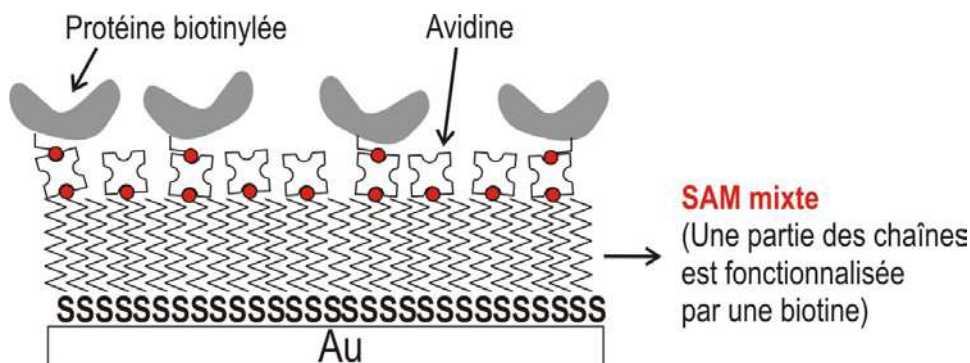


Fig. 1 : Illustration de la réalisation de SAM mixte sur une surface d'or en utilisant des thiols [37]. Une partie des chaînes est fonctionnalisée avec une biotine permettant, via une interaction avec l'avidine, la fonctionnalisation ultérieure par greffage affiné par des protéines. Le nombre de sites biotinilés sera maîtrisé en ajustant les proportions utilisées de chaque type de chaîne. (Ce schéma n'est pas « à l'échelle » afin de valoriser les points importants.)

- **Le greffage sur oxyde de silicium.** Il est envisagé dans le cas de l'oxyde de silicium d'utiliser les propriétés particulières d'un polymère, le polyéthylène glycol ou PEG, qui, en outre, autorise une forte structuration des surfaces (**Fig. 2**). Il a effectivement été montré que les films de PEG inhibent l'adsorption non spécifique de protéines [38]. Plusieurs modes opératoires concernant le greffage covalent sur SiO₂ sont envisageables notamment en utilisant des molécules PEG-silane. Ils conduisent à la formation de films très fins (< nm) [38] [39]. Il est notamment possible de réaliser des films à base de PEG modifié par une biotine qui ouvrent des perspectives intéressantes de greffage affiné *via* des interactions avec l'avidine [40]. Ces surfaces de PEG biotinilé, pouvant être régénérées et stockées à sec sans perte de leur activité, représentent un avantage économique certain si l'on envisage la réalisation « à grande échelle » de puces à protéines.

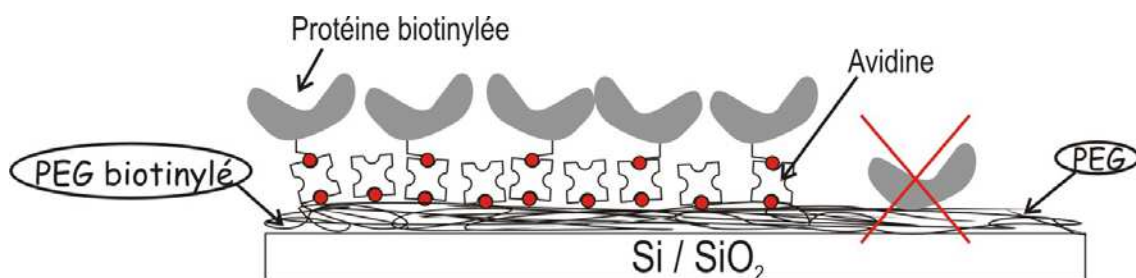


Fig. 2 : Illustration de la fonctionnalisation d'une surface d'oxyde de silicium en utilisant le polyéthylène glycol (PEG) substitué par des résidus biotine. Des protéines biotinilées sont immobilisées via l'utilisation d'interaction avec l'avidine. La partie droite du schéma rappelle que les films de PEG inhibent l'adsorption non spécifique de protéines.

I.2. Nanoparticules, colloïdes, quantum dots

De nombreuses études ont montré que la présence de nanoparticules métalliques améliorerait nettement la sensibilité de la détection [1, 41, 42, 43, 44, 45].

La littérature décrit un certain nombre de méthodes de couplage de nanoparticules (colloïdes) et de biomolécules [46]. Dans notre cas, les biomolécules utilisées doivent être des

protéines capables de reconnaître la dernière entité immobilisée sur le support (**Fig. 3.A**) [1]. Les nanoparticules sont habituellement préparées en présence d'agents stabilisants (citrate, phosphate, acide lipoïc ou thiols) qui, en se liant aux atomes exposés à l'extérieur, préviennent leur croissance incontrôlée ou leur agrégation. Dans le cas des citrates, trois possibilités de fonctionnalisation ultérieure sont envisageables. La solution choisie dépendra de la nature de la protéine utilisée.

1. *La biomolécule possède un résidu cystéine accessible (HS-Cys).* Dans ce cas, l'interaction or – citrate peut être déplacée par l'interaction plus forte or – thiol. Ceci est envisageable pour certaines sérum albumines et immunoglobulines impliquées dans des réactions de reconnaissance antigène - anticorps.

2. *La biomolécule possède un résidu lysine accessible (NH₂-Lys).* Le contrôle du pH permet de se placer dans des conditions où le citrate est sous forme anionique et où la lysine est protonée, favorisant ainsi une interaction électrostatique entre les deux entités.

Dans ces deux cas, la quantité de protéines ajoutée doit être contrôlée afin d'obtenir une monocouche. Pour atteindre cet objectif, nous réaliserons des expériences en présence de proportions variables d'un électrolyte. Il sera ajouté à la solution de colloïdes modifiés par les protéines. Leur présence a pour but d'écranter les charges portées par les nanoparticules d'or et ainsi de provoquer le phénomène d'agrégation, dans le cas où la couverture par les protéines resterait insuffisante. En effet, une couverture protéique suffisante rend ce phénomène inopérant, puisque les protéines elles-mêmes stabilisent le métal et les répulsions stériques empêchent la floculation. Ces expériences seront suivies ou bien par un test colorimétrique visuel, ou bien en UV-visible en observant le déplacement de la bande d'absorption des plasmons de surface des colloïdes.

3. *La biomolécule est fonctionnalisée par une biotine.* Dans ce dernier cas, les nanoparticules d'or stabilisées peuvent être recouvertes d'une monocouche d'alcanes thiol (de manière analogue au cas 1). En mettant à profit une interaction hydrophobe, il est alors possible d'intercaler dans la structure des chaînes alkyles modifiées par une biotine (**Fig. 3.B**). Les colloïdes biotinilés ainsi obtenus seront alors bio-fonctionnalisés ultérieurement par l'intermédiaire d'un pont avidine [47].

II. La caractérisation des édifices obtenus

La caractérisation rigoureuse des édifices biochimiques décrits précédemment est une étape clé car elle conditionne l'optimisation des protocoles chimiques et biochimiques qui seront utilisés ultérieurement pour la conception de puces à protéines.

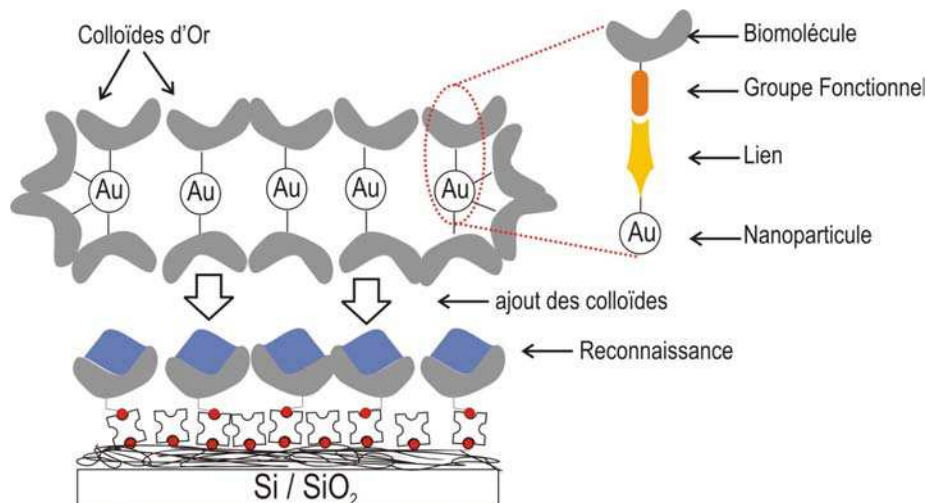
Pour ce faire, plusieurs méthodes de caractérisation sont envisageables et disponibles, aussi bien au LAAS que dans d'autres laboratoires partenaires à Toulouse.

Structuration des surfaces. La microscopie à force atomique ou AFM sera utilisée pour l'étude de la structuration de la surface. Deux appareils sont disponibles au LAAS pour mener à bien cette étude (Topometrix Explorer et Nanoscope IV). L'optimisation des propriétés de mouillabilité des couches auto-assemblées sera effectuée en ayant recours à la mesure d'angle de contact.

Optimisation du greffage. Des mesures de fluorescence permettent d'optimiser les protocoles de greffage en utilisant des protéines marquées. Il sera aussi possible d'utiliser des nanoparticules ou des colloïdes modifiés par la présence d'un anticorps de la protéine immobilisée.[48] Cette approche constitue une alternative simple pour l'étude de la structure du greffage protéine - substrat obtenu par résonance des plasmons de surface. En outre, l'utilisation du Biacore peut s'avérer très judicieuse pour accéder aux constantes de vitesse des réactions mises en jeu : cette information pourra être mise à profit pour l'élaboration des protocoles lors de l'utilisation des deux autres méthodes de détection.

Ces résultats seront systématiquement comparés avec les résultats obtenus avec le système « Biacore X » (résonance de plasmons de surface) disponible sur la plate-forme Transcriptome Biopuces du Génomipole Toulouse Midi Pyrénées et avec le système Qsense (microbalance à quartz). La spectrophotométrie UV-visible sera, quant à elle, utilisée afin d'optimiser les conditions de fonctionnalisation des surfaces de colloïdes pour leur utilisation ultérieure.

A.



B.

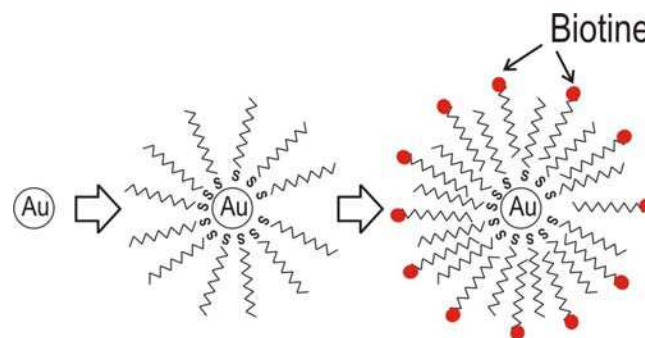


Figure 3 : (A) Illustration schématique de l'utilisation de colloïdes. A la suite du phénomène de reconnaissance, il est possible d'exacerber les variations des signaux détectés en utilisant des colloïdes fonctionnalisés capables d'interagir (réaction affine) avec la dernière couche immobilisée. Le schéma général utilisé afin de modifier les nanoparticules d'or est représenté à droite. (Ce schéma n'est pas « à l'échelle » afin de valoriser les points importants.) (B) Séquence de la synthèse de colloïdes d'or modifiés par la présence d'une biotine [47]. L'interaction or – citrate peut être déplacée par l'interaction plus forte or – thiol. Puis en mettant à profit une interaction hydrophobe, il est alors possible d'intercaler dans la structure des chaînes alkyles modifiées par une biotine.

Références

- [1] C. M. Niemeyer, "Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science," *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 40, pp. 4128-4158, 2001.
- [2] Y. Xia and G. M. Whitesides, "Soft Lithography," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 37, pp. 550 - 575, 1998.
- [3] C. Annarelli, L. Reyes, J. Fornazero, J. Bert, R. Cohen, and A. W. Coleman, "Ion and Molecular Recognition Effects on the Crystallisation of Bovine Serum Albumin-Salt Mixtures," *Cryst.Eng.*, vol. 3, pp. 173-194, 2000.
- [4] D. Wang, S. G. Thomas, K. L. Wang, Y. Xia, and G. M. Whitesides, "Nanometer scale patterning and pattern transfer on amorphous Si, crystalline Si, and SiO₂ surfaces using self-assembled monolayers," *Applied Physics Letters*, vol. 70, pp. 1593-1595, 1997.
- [5] I. S. T. European Commission, *Technology Roadmap for Nanoelectronics : Future and Emerging Technologies*, 2000.
- [6] S. C. Minne, J. D. Adams, G. Yaralioglu, S. R. Manalis, A. Atalar, and C. F. Quate, "Centimeter scale atomic force microscope imaging and lithography," *Applied Physics Letters*, vol. 73, pp. 1742-1744, 1998.
- [7] M. Despont, J. Brugger, U. Drechsler, U. Dürig, W. Häberle, M. Lutwyche, H. Rothuizen, R. Stutz, R. Widmer, G. Binnig, H. Rohrer, and P. Vettiger, "VLSI-NEMS chip for parallel AFM data storage," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 100, pp. 123-130, 2000.
- [8] S. C. Minne, H. T. Soh, P. Flueckiger, and C. F. Quate, "Fabrication of 0.1 μm metal oxide semiconductor field-effect transistors with the atomic force microscope," *Applied Physics Letters*, vol. 66, pp. 703-705, 1995.
- [9] C. L. Cheung, J. H. Hafner, T. W. Odom, K. Kim, and C. M. Lieber, "Growth and fabrication with single-walled carbon nanotube probe microscopy tips," *Applied Physics Letters*, vol. 76, pp. 3136-3138, 2000.
- [10] T. Ondarçuhu, L. Nicu, S. Cholet, C. Bergaud, S. Gerdes, and C. Joachim, "A metallic microcantilever electric contact probe array incorporated in an atomic force microscope," *Review of Scientific Instruments*, vol. 71, pp. 2087-2093, 2000.
- [11] B. Belier, A. Santoso, J. Bonnafe, L. Nicu, P. Temple-Boyer, and C. Bergaud, "Micro-optomechanical sensor for optical connection in the near field," *Applied Physics Letters*, vol. 77, pp. 1768-1770, 2000.
- [12] S. Morita and Y. Sugawara, "Atomically Resolved Imaging of Si(100)2 x 1, 2 x 1:H and 1 x 1:2H Surfaces with Noncontact Atomic Force Microscopy," *Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers, Short Notes & Review Papers*, vol. 41, pp. 4857-4862, 2002.
- [13] J. Zlatanova, S. M. Lindsay, and S. H. Leuba, "Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 74, pp. 37-61, 2000.
- [14] C. Kranz, G. Friedbacher, and B. Mizaikoff, "Integrating an Ultramicroelectrode in an AFM Cantilever: Combined Technology for Enhanced Information," *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 2491 -2500, 2001.
- [15] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, and D. Bensimon, "Alignment and sensitive detection of DNA by moving interface," *Science*, vol. 265, pp. 2096-2098, 1994.
- [16] P. G. d. Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quéré, *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Paris: Belin, 2002.

- [17] C. Annarelli, L. Reyes, J. Fornazero, J. Bert, R. Cohen, and A. W. Coleman, "On the Control of Crystal Growth in Bovine Serum Albumin-Sodium Chloride Thin Film Gels," *Cryst. Eng.*, vol. 2, pp. 79-89, 1999.
- [18] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, and T. A. Witten, "Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops," *Nature*, vol. 389, pp. 827 - 829, 1997.
- [19] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, and T. A. Witten, "Contact line deposits in an evaporating drop," *Physical Review E*, vol. 62, pp. 756-765, 2000.
- [20] A. P. Sommer, M. Ben-Moshe, and S. Magdassi, "Size-Discriminative Self-Assembly of Nanospheres in Evaporating Drops," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, pp. 8-10, 2004.
- [21] E. Katz and I. Willner, "Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications," *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 43, pp. 6042-6108, 2004.
- [22] G. M. Whitesides and B. Grzybowski, "Self-Assembly at All Scales," *Science*, vol. 295, pp. 2418-2421, 2002.
- [23] Y. Huang, X. Duan, Q. Wei, and C. M. Lieber, "Directed Assembly of One-Dimensional Nanostructures into Functional Networks," *Science*, vol. 291, pp. 630-633, 2001.
- [24] H. Fan, K. Yang, D. M. Boye, T. Sigmon, K. J. Malloy, H. Xu, G. P. Lopez, and C. J. Brinker, "Self-Assembly of Ordered, Robust, Three-Dimensional Gold Nanocrystal/Silica Arrays," *Science*, vol. 304, pp. 567-571, 2004.
- [25] Y. Lin, A. Boker, J. He, K. Sill, H. Xiang, C. Abetz, X. Li, J. Wang, T. Emrick, S. Long, Q. Wang, A. Balazs, and T. P. Russell, "Self-directed self-assembly of nanoparticle/copolymer mixtures," *Nature*, vol. 434, pp. 55-59, 2005.
- [26] Y. Lin, H. Skaff, T. Emrick, A. D. Dinsmore, and T. P. Russell, "Nanoparticle Assembly and Transport at Liquid-Liquid Interfaces," *Science*, vol. 299, pp. 226-229, 2003.
- [27] B. Nikoobakht, Z. L. Wang, and M. A. El-Sayed, "Self-assembly of gold nanorods," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, pp. 8635-8640, 2000.
- [28] Y. Cui and C. M. Lieber, "Functional nanoscale electronic devices assembled using silicon nanowire building blocks," *Science*, vol. 291, pp. 851-853, 2001.
- [29] Y. Cui, Q. Q. Wei, H. K. Park, and C. M. Lieber, "Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species," *Science*, vol. 293, pp. 1289-1292, 2001.
- [30] M. S. Gudiksen and C. M. Lieber, "Diameter-selective synthesis of semiconductor nanowires," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 122, pp. 8801-8802, 2000.
- [31] Y. Cui, X. F. Duan, J. T. Hu, and C. M. Lieber, "Doping and electrical transport in silicon nanowires," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, pp. 5213-5216, 2000.
- [32] Y. Huang and C. M. Lieber, "Integrated nanoscale electronics and optoelectronics: Exploring nanoscale science and technology through semiconductor nanowires," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 76, pp. 2051-2068, 2004.
- [33] B. R. Martin, D. J. Dermody, B. D. Reiss, M. Fang, L. A. Lyon, M. J. Natan, and T. E. Mallouk, "Orthogonal Self-Assembly on Colloidal Gold-Platinum Nanorods," *Advanced Materials*, vol. 11, pp. 1021 - 1025, 1999.
- [34] T. E. Bogart, S. Dey, K.-K. Lew, S. E. Mohny, and J. M. Redwing, "Diameter-Controlled Synthesis of Silicon Nanowires Using Nanoporous Alumina Membranes," *Advanced Materials*, vol. 17, pp. 114 - 117, 2005.

- [35] Y. Xia, P. Yang, Y. Sun, Y. Wu, B. Mayers, B. Gates, Y. Yin, F. Kim, and H. Yan, "One-Dimensional Nanostructures: Synthesis, Characterization, and Applications," *Advanced Materials*, vol. 15, pp. 353 - 389, 2003.
- [36] J. L. Tan, J. Tien, and C. S. Chen, "Microcontact printing of proteins on mixed self-assembled monolayers," *Langmuir*, vol. 18, pp. 519-523, 2002.
- [37] J. Lahiri, E. Ostuni, and G. M. Whitesides, "Patterning ligands on reactive SAMs by microcontact printing," *Langmuir*, vol. 15, pp. 2055-2060, 1999.
- [38] M. Q. Zhang, T. Desai, and M. Ferrari, "Proteins and cells on PEG immobilized silicon surfaces," *Biomaterials*, vol. 19, pp. 953-960, 1998.
- [39] A. Papra, N. Gadegaard, and N. B. Larsen, "Characterization of ultrathin poly(ethylene glycol) monolayers on silicon substrates," *Langmuir*, vol. 17, pp. 1457-1460, 2001.
- [40] S. W. Metzger, M. Natesan, C. Yanavich, J. Schneider, and G. U. Lee, "Development and characterization of surface chemistries for microfabricated biosensors," *Journal of Vacuum Science & Technology A*, vol. 17, pp. 2623-2628, 1999.
- [41] P. Alivisatos, "The use of nanocrystals in biological detection," vol. 22, pp. 47-52, 2004.
- [42] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos, "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels," *Science*, vol. 281, pp. 2013-2016, 1998.
- [43] M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, and S. Nie, "Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules," *Nature Biotechnology*, vol. 19, pp. 631-635, 2001.
- [44] L. A. Lyon, M. D. Musick, and M. J. Natan, "Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 5177-5183, 1998.
- [45] A. J. Haes and R. P. Van Duyne, "A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 124, pp. 10596-10604, 2002.
- [46] C. M. Niemeyer and C. A. Mirkin, *Nanobiotechnology : Concepts, Applications and Perspectives*, vol. 1: John Wiley & Sons, 2004.
- [47] N. Lala, A. G. Chittiboyina, S. P. Chavan, and M. Sastry, "Biotinylation of colloidal gold particles using interdigitated bilayers: a UV-visible spectroscopy and TEM study of the biotin-avidin molecular recognition process," *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 205, pp. 15-20, 2002.
- [48] F. G. Pikus and K. K. Likharev, "Nanoscale field-effect transistors: An ultimate size analysis," *Applied Physics Letters*, vol. 71, pp. 3661-3663, 1997.

PARTIE IV

CV DETAILLE

CURRICULUM VITAE

Christian BERGAUD

Né le 2 mai 1968 à Domont (Val d'Oise)

Marié, 2 enfants

Adresse professionnelle : LIMMS/CNRS-IIS (UMI 2820), Institute of Industrial Science, University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505, JAPAN

Tel : 81-3-5452-6036

Fax : 81-3-5452-6088

Email : bergaud@iis.u-tokyo.ac.jp; bergaud@laas.fr

<http://toshi.fujita3.iis.u-tokyo.ac.jp/limms/>

Directeur du LIMMS/CNRS-IIS, UMI 2820, Université de Tokyo

Chargé de recherche de 1^{ière} classe depuis le 1^{ier} octobre 2000.

Date d'affectation au CNRS : **Janvier 1997**

Janvier 1997-Mars 2004 : Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes, LAAS/CNRS, Toulouse

Avril 2004–Avril 2006: Directeur du LIMMS/CNRS-IIS, Unité Mixte Internationale (UMI 2820), Université de Tokyo.

Section du Comité national n° 08

Intitulé : Micro et Nanotechnologies, Electronique, Semi-conducteurs, Photonique, Génie électrique

DIPLOMES ET TITRES

Juin 1986 : Baccalauréat E. Mention AB.

Juin 1991 : Ingénieur de l'INSA de Lyon. Département : Génie Physique et Matériaux.

Juin 1991 : Diplôme d'Etudes Approfondies « Dispositifs de l'électronique Intégrée ». INSA de Lyon, Ecole Centrale de Lyon. Mention AB.

Novembre 1994 : Titre de doctorat de l'INSA de Toulouse. Spécialité : Electronique. Mention très honorable avec félicitations du jury.

SEJOURS A L'ETRANGER

Mars 1995-Décembre 1996 : Séjour post-doctoral de 2 ans au LIMMS (Laboratory for Integrated MicroMechatronic Systems du CNRS) à l'Université de Tokyo.

Décembre 2002-Janvier 2003 : Séjour de deux mois au RIKEN à Tokyo.

Avril 2004-Avril 2006 : Séjour de 2 ans au LIMMS/CNRS-IIS, Unité Mixte Internationale de Recherche (UMI 2820), Université de Tokyo.

[R.30] H. Arata, P. Low, **C. Bergaud**, B.J. Kim, H. Noji, and H. Fujita, "*Measurement of Temperature Distribution on Microfabricated Thermodevices for Single Molecular Observation Using Rhodamine B*", Sensors and Actuators B-Chemical, accepté (2005).

[R.29] D. Saya, A. W. Coleman, A. N. Lazar, **C. Bergaud** and L. Nicu, "*Free-standing protein films for dynamic mode detection of cations binding*", Applied Physics Letters, 87 (10), 103901-103903, 2005.

[R.28] J. Juillard, E. Colinet, L. Nicu, **C. Bergaud**, "*Digital self-calibration method for MEMS sensors*", IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, 54(4), 1438-1443, 2005.

[R.27] D. Saya, P. Belaubre, F. Mathieu, D. Lagrange, J. B. Pourciel, **C. Bergaud**, "*Si-Piezoresistive Microcantilevers for Highly Integrated Parallel Force Detection Applications*" Sensors and Actuators A-Physical, Volumes 123-124, 23-29, 2005.

[R.26] T. Leïchlé, M. Manso Silvan, P. Belaubre, A. Valsesia, G. Ceccone, F. Rossi, J.B. Pourciel, L. Nicu, and **C. Bergaud**, "*Local Deposition of nanometer scale Silica colloids using Silicon-based Microcantilevers*", Nanotechnology, 16 (4): 525-531, 2005.

[R.25] L. Nicu, M. Guirardel, F. Chambosse, P. Rougerie, S. Hinh, E. Trévisiol, J.M. François, A.M. Caminade, J.P. Majoral, E. Cattan, **C. Bergaud**, "*First steps towards a fully integrated electromechanically-based bioassay: detection of streptavidin-gold nanoparticles interaction with biotinylated DNA by using micromachined piezoelectric membranes*", Sensors and Actuators B- Chemical, Volume 110, Issue 1, pp. 125-136, 2005.

[R.24] D. Saya, L. Nicu, M. Guirardel, **C. Bergaud**, "*Mechanical effect of gold nanoparticles labeling used for biochemical sensor applications: A multimode analysis by means of SiNx micromechanical cantilever and bridge mass detectors*", Review Scientific Instruments, Vol. 75(9), 3010-3015, 2004. Cité dans le « Virtual Journal of Biological Physics Research » et dans le « Virtual Journal of Nanoscale Science & Technology ».

[R.23] L. Nicu, **C. Bergaud**, "*Modelling of a tuning fork biosensor based on the excitation of one particular resonance mode*", Journal of Micromechanics and Microengineering, Vol.14 (5), 727-736, 2004.

[R.22] M. Guirardel, L. Nicu, D. Saya, Y. Tauran, E. Cattan, D. Remiens, **C. Bergaud**, "*Detection of gold colloid adsorption at a solid/liquid interface using micromachined piezoelectric resonators*", Japanese Journal of Applied Physics, Part 2, Vol. 43, No. 1AB : L111 - L114, 2004.

[R.21] P. Belaubre, M. Guirardel, V. Leberre, J.B. Pourciel, **C. Bergaud**, "*Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples*", Sensors and Actuators A: Physical, Volume 110, Issues 1-3, 130-135, 2004.

[R.20] M. Guirardel, **C. Bergaud**, E. Cattan, D. Remiens, B. Belier, S. Petitgrand, A. Bosseboeuf, “*PZT polarization effects on off-centered PZT patch actuating silicon membrane*”, Sensors and Actuators A: Physical, Volume 110, Issues 1-3, 385-389, 2004.

[R.19] P. Belaubre, M. Guirardel, G. Garcia, V. Leberre, A. Dagkessamanskaia, E. Trévisiol, J.M. François, J.B. Pourciel, **C. Bergaud**, “*Fabrication of biological microarrays using microcantilevers*”, Applied Physics Letters, vol. 82(18), 3122-3124 (2003). Cité dans le Virtual Journal of Biological Physics Research, 1 May, 2003.

[R.18] P. Gall-Borrut, B. Belier, P. Falgayrettes, M. Castagne, **C. Bergaud**, P. Temple-Boyer “*Silicon technology-based micro-systems for atomic force microscopy/photon scanning tunneling microscopy*”, Journal of Microscopy, volume 202 (1), 34-38, 2001.

[R.17] B. Belier, A. Santoso, J. Bonnafé, L. Nicu, P. Temple-Boyer, **C. Bergaud** “*Micro-optomechanical sensor for optical connection in the near field*”, Applied Physics Letters, vol. 77, 12, 1768-1770, 2000.

[R.16] **C. Bergaud**, L. Nicu, «*Viscosity measurements based on experimental investigations of composite cantilever beam eigenfrequencies in viscous media*”, Review of Scientific Instruments, 71 (6), 2487-2791, 2000.

[R.15] T. Ondarçuhu, L. Nicu, S. Cholet, **C. Bergaud**, S. Gerder, C. Joachim, “*A metallic microcantilever probes array incorporated in an atomic force microscope*”, Review of Scientific Instruments 71 (5), 2087-2093, 2000.

[R.14] L. Nicu, P. Temple-Boyer, **C. Bergaud**, E. Scheid, A. Martinez, “*Energy study of buckled micromachined beams for thin film stress measurement applied to SiO₂*”, Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 9, 414-421, 1999.

[R.13] L. Nicu, **C. Bergaud**, “*Experimental and Theoretical Investigations on Non-Linear Resonances of Composite Buckled Microbridges*”, Journal of Applied Physics, vol. 86, 10, 5835-5840, 1999.

[R.12] **C. Bergaud**, L. Nicu, A. Martinez, “*Multi-mode air damping analysis of composite cantilever beams*”, Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 38, Part 1, No.11, 6521-6525, 1999.

[R.11] E. Cattan, T. Haccart, G. Velu, D. Remiens, **C. Bergaud**, L. Nicu, «*Piezoelectric properties of PZT films for microcantilever*», Sensors and Actuators A Physical 74, 60-64, 1999.

[R.10] C. Joachim, **C. Bergaud**, H. Pinna, H. Tang, J.K. Gimzewski, «*Is there a minimum size and a maximum speed for a nanoscale amplifier?*», Annals of the New York Academy of Sciences, volume 852, Eds. A. Aviram, M. Ratner, ISBN N°1-57331-156-1, 243-256, 1998.

[R.9] D. Alquier, B. Van Haaren, **C. Bergaud**, R. Plana, J. Graffeuil, A. Martinez, “*Influence of depth position of end of range defects on current-voltage and noise characteristics of shallow (p+/n) junctions*”, Japanese Journal of Applied Physics, Part I, Vol.36, N°4A, 1999-2003, 1997.

[R.8] C.Bonafos, A.Claverie, D.Alquier, **C.Bergaud**, A.Martinez, L.Laânab, D.Mathiot, « *The effect of the boron doping level on the thermal behavior of End-Of-Range defects in silicon* », Applied Physics Letters, Vol.71, N°3, 365-367, 1997.

[R.7] T. Masuzawa, B.J. Kim, **C. Bergaud**, M. Fujino, « *Twin-probe vibroscanning method for dimensional measurement of microholes* », Annals of the CIRP, Session on Precision Engineering and Metrology, Vol.46, N°1, 437-440, 1997.

[R.6] B.J. Kim, **C. Bergaud**, S. Konishi, T. Masuzawa, H. Fujita, "*Fabrication of micro twin probes for dimensional measurement of microhole*", Journal of the Institute of the Electrical Engineers of Japan (JIEE 96), 161-162, 1996.

[R.5] C. Bonafos, A. Martinez, M.M. Faye, **C. Bergaud**, D. Mathiot, A. Claverie, "*Transient enhanced diffusion of dopant in preamorphised Si: the role of EOR defects*", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Vol.B.106, 222-226, 1995.

[R.4] L. Laânab, **C. Bergaud**, C. Bonafos, A. Martinez, A. Claverie, "*Variation of end of range density with ion beam energy and the predictions of the "excess interstitials model"*", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Vol.B.96, 236-240, 1995.

[R.3] A. Claverie, L. Laânab, C. Bonafos, **C. Bergaud**, A. Martinez, D. Mathiot, "*On the relation between dopant anomalous diffusion in Si and end-of-range defects*", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Vol.B.96, 202-209, 1995.

[R.2] B. De Mauduit, L. Laânab, **C. Bergaud**, M.M. Faye, A. Martinez, A. Claverie, "*Identification of EOR defects due to the regrowth of amorphous layers created by ion bombardment*", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Vol.B.84, 190-194, 1994.

[R.1] C.Gontrand, A.Merabet, B.Semmache, S.Krieger Kaddour, **C. Bergaud**, M. Lemiti, D.Barbier, A.Laugier, "*Co-diffusion of As and B in and from polysilicon during rapid thermal annealing*", Semiconductor Science and Technology, N°8, 155-162, 1993.

COMMUNICATIONS ET AFFICHES AVEC COMITE DE LECTURE

[C.41] C. Ayela, E. Cattan, C. Soyer, **C. Bergaud**, M. Pugnère and L. Nicu, "*Determination of the d31 piezoelectric coefficient of PZT thin films using dedicated microelectromechanical systems*", MRS 2005, Boston (Nov.28 - Dec. 2), USA. Poster.

[C.40] F. Mathieu, D. Saya, **C. Bergaud**, L. Nicu, "*Piezoresistive Signal Downmixing for Parallel Detection of Si-Based Microcantilevers Resonant Frequencies*", IEEE Sensor 2005, The 4th IEEE conference on Sensors, Irvin, USA, October 2005. Oral.

[C.39] D. Saya, L. Nicu, A.W. Coleman, **C. Bergaud**, "*Dynamic mode analysis of cation binding induced mechano-chemical stress on free standing protein films*", Euroensors XIX, Septembre 2005, Barcelone. Oral.

[C.38] K. Ishizuka, H. Arata, S. Sakakihara, **C. Bergaud**, K.V. Tabata, Y. Rondelez, S. Takeuchi, H. Fujita, H. Noji, "*Imaging of heat denaturation of single DNA molecules in femtoliter chambers on a micro-heating device: Toward a single molecule detection of PCR*",

Ninth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS), USA, Boston, 9–13 October, 2005. Poster.

[C.37] T. Leïchlé, D. Saya, P. Belaubre, J.B. Pourciel, F. Mathieu, J.P. Laur, L. Nicu, **C. Bergaud**, “*Liquid Loading of Silicon-based Cantilevers using Electrowetting Actuation for Microspotting Applications*”, The 13th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems, TRANSDUCERS 05, Seoul, Korea, 5-9 June, 2005. Oral.

[C.36] H. Arata, **C. Bergaud**, H. Noji, S. Takeuchi, H. Fujita, “*Temperature Distribution Measurement on Micro-Thermo Device for Single Biomolecular Observation using Fluorescent Dye*”, The 13th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems, TRANSDUCERS 05, Seoul, Korea, 5-9 June, 2005. Poster.

[C.35] P. Belaubre, J.B. Pourciel, D. Saya, T. Leïchlé, F. Mathieu, L. Nicu, **C. Bergaud**, “*First Step Towards A Fully Automated Trim Control For Liquid Deposition Device At The Microscale Using Piezoresistive Cantilevers Array*”, , The 13th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems, TRANSDUCERS 05, Seoul, Korea, 5-9 June, 2005. Poster.

[C.34] D. Saya, P. Belaubre, F. Mathieu, D. Lagrange, **C. Bergaud**, “*Si-piezoresistive microcantilevers for highly integrated parallel force detection applications*”, Eurosensors XVIII Edition, Rome, Italie, 13-15 septembre 2004. Oral.

[C.33] M. Guirardel, L. Nicu, D. Saya, S. Hinh, J. Sicard, D. Lagrange, F. Mathieu, E. Cattan, D. Remiens, **C. Bergaud**, “*On-chip self-sensing function of 4x4 matrix micromachined resonating piezoelectric membranes for mass detection applications*”, 2004 IEEE International Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control 50th Anniversary Joint Conference, Montréal, Canada, 24-27 août 2004. Oral.

[C.32] M. Guirardel, L. Nicu, D. Saya, Y. Tauran, E. Cattan, D. Remiens, **C. Bergaud**, “*Detection of gold colloid adsorption at a solid/liquid interface using micromachined piezoelectric resonators*”, 10th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS), Tsukuba (Japan), 11-14 juillet 2004. Poster.

[C.31] L. Nicu, **C. Bergaud**, « *Micro et Nanosystèmes à structures mécaniques mobiles pour le dépôt et la détection de biomolécules* », Journées Nationales Microélectronique et Optoélectronique, Xième JNMO, La Grande Motte, 8-11 Juin 2004. Conférence invitée.

[C.30] L. Nicu, D. Saya, M. Guirardel, **C. Bergaud**, Journées Ferroélectriques, Bordeaux, Oral.

[C.29] D. Saya, M. Guirardel, **C. Bergaud**, “*Detection of gold colloid monolayers using microcantilevers as mass detectors*”, 2nd Congrès Nanobiotechnologies, 22-24 Avril 2003, Grenoble. Poster.

[C.28] P. Belaubre, M. Guirardel, G. Garcia, V. Leberre, A. Dagkessamanskaia, E. Trévisiol, J.M. François, J.B. Pourciel, **C. Bergaud**, “*Silicon-based micropins for multiple biological sample deposition*”, 2nd Congrès Nanobiotechnologies, 22-24 Avril 2003, Grenoble. Poster.

[C.27] P. Belaubre, M. Guirardel, G. Garcia, V. Leberre, A. Dagkessamanskaia, E. Trévisiol, J.M. François, J.B. Pourciel, **C. Bergaud**, “*Silicon-based microcantilevers for multiple biological sample deposition*”, 12th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, TRANSDUCERS 2003, Boston, 8-12 June 2003, Vol.2, pp.1816-1819. Oral.

[C.26] A.W.Coleman, A. Lazar, P.Shahgaldiat, K. Aissa, **C. Bergaud** “*Active materials based on meso-composite protein/salt systems*”, XIIth International symposium on supramolecular chemistry, Eliat, Israël, 6-11 Octobre 2002. Oral.

[C.25] P. Belaubre, M. Guirardel, V. Leberre, J.B. Pourciel, **C. Bergaud** “*Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples*”, XVIth European Conference on Solid-State Transducers (EUROSENSORS XVI), Prague (République Tchèque), 15-18 Septembre 2002, pp.541-544. Oral.

[C.24] M. Guirardel , **C. Bergaud** , E. Cattan , D. Remiens , B. Belier , S. Petitgrand, A. Bosseboeuf, “*PZT polarization effects on off-centered PZT patch actuating silicon membrane*”, XVIth European Conference on Solid-State Transducers (EUROSENSORS XVI), Prague (République Tchèque), 15-18 Septembre 2002, pp.697-700. Poster.

[C.23] **C. Bergaud**, E. Cocheteau, L. Bary, R. Plana, B. Belier, «*Formation of implanted piezoresistors under 100-nm thick for NanoElectromechanical Systems*», 15th IEEE Micro-ElectroMechanical Systems (MEMS) Conference, Las Vegas, 20-24 Janvier 2002, pp 360-363. Poster.

[C.22] **C. Bergaud**, E. Cocheteau, M. Guirardel, L. Nicu, B. Belier, “*Design and fabrication of nanoelectromechanical resonators for parallel detection of biomolecular interactions*”, 8th IEEE International Conference on Emerging Technologies and Factory Automation, 15-18 octobre 2001, Antibes Juan-Les-Pins, vol.2, pp. 305-308. Oral.

[C.21] **C. Bergaud**, L. Nicu, B. Belier “*Microfabricated tools for nanometer-scale applications*”, 8th International Conference Mixed Design of Integrated Circuits and Systems, Mixdes 2001, Conférence invitée, 20-23 juin, Zakopane, Pologne, pp. 15-21. Oral.

[C.20] J.-P. Roger, A.-C. Boccara, M.C. Potier, M. Guirardel and **C. Bergaud**, “*Parallel optical reading of micromechanical sensor arrays for biology and environmental studies*”, Hybrid and Novel Imaging and New Optical Instrumentation for Biomedical Applications, Newton Massachusetts, 28 oct- 2 nov 2001, Proceedings of the SPIE, vol. 4434, pp138-141. Oral.

[C.19] J.P. Roger, A.C. Boccara, M.C. Potier, M. Guirardel, **C. Bergaud** “*Parallel optical reading of micromechanical sensors arrays*”, European Conferences on Biomedical Optics ECBO 2001, 17-21 juin 2001, Munich. Oral.

[C.18] E. Cocheteau, **C. Bergaud**, B. Belier, L. Bary, R. Plana, «*Formation of ultra-shallow p+/n junctions with BF₂ implantation for the fabrication of improved piezoresistive cantilevers*», Transducers’2001/Euroensors XV, Munich, 10-14 juin 2001, pp. 1070-1073. Poster.

[C.17] J.P. Roger, M. Guirardel, A.C. Boccara, M. C. Potier, **C. Bergaud** « *Lecture optique en parallèle de la résonance mécanique de microleviers en matrice pour la détection différenciée de variation de masse* », Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation, Conservatoire National des Arts et Métiers, CNAM Paris, 31 Janvier-1 février 2001, pp. 147-154. Oral.

[C.16] P. Gall-Borrut, B. Belier, P. Falgayrettes, M. Castagne, **C. Bergaud**, P. Temple-Boyer "Silicon technology-based micro-systems for atomic force microscopy/photon scanning tunneling microscopy", NFO6 Near Field Optics, Twente, Netherlands, 27-31 août 2000. Oral.

[C.15] L. Nicu, **C. Bergaud**, A. Martinez, P. Temple-Boyer, "Static and dynamic characterization of buckled SiO₂-Au microbridges", Material Research Society Fall Meeting, MRS Boston, 1999. Poster.

[C.14] F. Oms-Elisabelar, **C. Bergaud**, L. Nicu and A. Martinez, « *Modeling a piezoelectric actuator using a transformer equivalent circuit* », 2nd IEEE International Conference on Modeling and Simulation of Microsystems, Puerto Rico, 19-21, April 1999, pp. 249-253. Poster.

[C.13] **C. Bergaud**, L. Nicu, A. Martinez, P. Gérard, M. Benzohra, « *Multi-mode frequency analysis for the dynamic characterization of Microstructures* », Proceedings of the SPIE on Design, Test and Microfabrication of MEMS/MOEMS, 30 March-1 April 1999, Paris, pp. 757-764. Poster.

[C.12] F. Oms-Elisabelar, **C. Bergaud**, L. Nicu, « *From Circuit to Microsystem : Using a Transformer equivalent circuit to study a piezo-electric actuator* », Proceedings of the SPIE on Design, Test and Microfabrication of MEMS/MOEMS, 30 March-1 April 1999, Paris, pp.415-423. Poster.

[C.11] E. Cattan , T. Haccart , G. Velu , D. Remiens , **C. Bergaud** , L. Nicu, « *Piezoelectric properties of PZT films for microcantilever* », European Materials Research Society (EMRS'98) Spring Meeting, Strasbourg (France), 16-19 Juin 1998. Oral.

[C.10] L. Laânab, A. Essaid, **C. Bergaud**, C. Bonafos, A. Martinez, A. Claverie, "Optimisation de l'élaboration de jonctions ultra-minces dans le silicium", 2^{ème} Rencontre Nationale des Jeunes Chercheurs en Physique, Casablanca (Maroc), 22-23 Décembre 1997, pp.66-68. Oral.

[C.9] C.Joachim, **C. Bergaud**, H.Pinna, H.Tang, J.K.Gimzewski, « *Is there a minimum size and a maximum speed for a nanoscale amplifier?* » Molecular Electronic Science and Technology Conference, Puerto Rico (USA), pp. 243-256, 15-17 Décembre 1997. Oral.

[C.8] **C. Bergaud**, B.J. Kim, T. Masuzawa, "Realization of silicon-based twin microstylus for 3 dimensional characterization of deep micro-holes", Proceedings of the 3rd France-Japan and 1st Europe-Asia Congress on Mechatronics, pp. 640-643, Besançon, 1-3 Octobre 1996. Oral.

[C.7] B.J. Kim, **C. Bergaud**, S. Konishi, T. Masuzawa, H. Fujita, "Fabrication of micro twin probes for dimensional measurement of microhole" , IEEJ 96 , Tokyo, March 26-28, 1996. Oral.

[C.6] M. de Labachellerie, D. Collard, M. Hoummady, D. Chauvel, **C. Bergaud**, F. Chollet, H. Fujita, H. Kawakatsu and T. Masuzawa, "*Mechatronic Systems for Optics, Microwaves and Precision Metrology Applications*", *Proceedings Europe-Asia Workshop on Mechatronics*, Stuttgart, 29 Sept. 95, 1995. Oral.

[C.5] A. Claverie, C. Bonafos, A. Martinez, M.M. Faye, **C. Bergaud**, D. Mathiot, "*Transient enhanced diffusion of dopant in preamorphised Si: the role of EOR defects*", Ion Beam Modification and Material 95 (IBMM'95), Canberra (Australie), 5-10 Février 1995, 13p. Oral. Communication invitée.

[C.4] D. Alquier, **C. Bergaud**, A. Martinez, M. Minondo, C. Jaussaud, L. Laânab, C. Bonafos, A. Claverie, "*Correlation between end-of-range defect densities and electrical properties of p+/n junctions formed by boron implantation into Ge-preamorphized si substrates*", Ion Beam Modification and Material 95 (IBMM'95), Canberra (Australie), 5-10 Février 1995, pp. 793-796. Oral.

[C.3] A. Martinez, **C. Bergaud**, M. Minondo, C. Jaussaud, L. Laanab, A. Claverie, "*Influence of End-Of-Range Defects Density on the Electrical Properties of P+/N Junctions Formed by Boron Implantation into Ge-Preamorphized Si Substrate*", 2nd International Rapid Thermal Processing Conference, RTP'94, 1994, pp 48-51, Monterey (USA). Oral.

[C.2] **C. Bergaud**, D. Mathiot, L. Laânab, A. Claverie, A. Martinez, "*End-Of-Range defects driven redistribution in uniformly boron doped silicon during annealing*", Ion Implantation Technology 1994, pp. 756-758, Catane (Italie). Poster.

[C.1] L. Laânab, **C. Bergaud**, M.M. Faye, J. Faure, A. Martinez, A. Claverie, "*A model to explain the variations of "end-of-range" defect densities with ion implantation parameters*", Materials Research Society Full Meeting, Boston (USA), 30 Novembre - 4 Décembre 1992, Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol.279, 1993, Materials Research Society, pp.381-386 Poster.

CONTRIBUTION A LA REDACTION D'OUVRAGES

1) **C. Bergaud**, D. Vuillaume, C. Joachim, "*Du nanocomposant à la nanomachine : fabrication, architecture et production*", ARAGO 26 Nanocomposants et Nanomachines, OFTA, N°ISBN 2-906028-12-6, 2001, Editions Tec&Doc, Chapitre V, pp.117-142.

2) **C. Bergaud**, "*Revolutionary applications of Nanotechnology in Life Sciences*", An International Prospective Meeting of French Senate on Nanotechnology, pp 25-26, Thursday 20th June 2002 Palais du Luxembourg.

3) J.P. Roger, M. Guirardel, A.C. Boccara, M.C. Potier, **C. Bergaud**, "*Lecture optique en parallèle de la résonance mécanique de microleviers en matrice pour la détection différenciée de variations de masse*", Nano et Microtechnologies, Editions Hermès, Volume 1 – n°3-4, pp 287-303, 2001.

4) P. Belaubre, G. Garcia, **C. Bergaud**, Collection Partage du savoir « Le Monde », Prix de le Recherche Universitaire, Edition Grasset, à paraître 2005, 20 pages.

5) P. Belaubre, M. Guirardel, **C. Bergaud**, « *Conception et réalisation d'un microsysteme de dépôts de solutions biologiques pour l'élaboration de biopuces* », Techniques de l'Ingénieur, à paraître en 2005. 8 pages.

6) Contribution à la rédaction d'un fascicule CNRS sur les Nanosciences dans la collection « CNRS Focus ».

7) **C. Bergaud**, F. Chatelain, M. Hoummady, C. Vauchier, Rapport de l'Ambassade de France à Tokyo, Mission « *BioMEMS-Nanobiotechnologies* », Mai 2004. 25 pages.

AUTRES ACTIVITES LIEES AU METIER DE CHERCHEUR

VALORISATION

- Thèse de Emeline Cocheteau « *Conception, réalisation et caractérisation de piézorésistances ultraminces pour des applications microsystemes* », Université Paul Sabatier, Toulouse le 18 mars 2002. **1^{er} PRIX INSA-TRANSFERT 2002.**

- Thèse BDI de Matthieu Guirardel « *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or* ». Université Paul Sabatier, Toulouse, le 9 octobre 2003. **LAUREAT DU PRIX DE L'ECOLE DOCTORALE GEET TOULOUSE 2003.**

- Thèse de Pascal Belaubre « *Développement d'un système de dépôt pour la fabrication de biopuces de nouvelles générations* ». **1^{er} PRIX INSA-TRANSFERT 2003.**
LAUREAT DU CONCOURS « LE MONDE », PRIX DE LA RECHERCHE UNIVERSITAIRE, COLLECTION PARTAGE DU SAVOIR, OUVRAGE A PARAITRE EN MARS 2005.

- **ANVAR 2002 Prix Emergence** avec la Société « Delta Proteomics » en association avec Anne-Marie Gué (LAAS), l'IBCP à Lyon (T. Coleman), l'ESPCI à Paris (M.C. Hennion) et l'ENS Chimie Paris (C. Amatore).

- **ANVAR 2003 Lauréat Création d'entreprise** avec la Société « Delta Proteomics » en association avec Anne-Marie Gué (LAAS), l'IBCP à Lyon (T. Coleman), l'ESPCI à Paris (M.C. Hennion) et l'ENS Chimie Paris (C. Amatore).

BREVETS

1. J.P. Roger, A.C. Boccara, **C. Bergaud**, M.C. Potier « *Appareil de détection en parallèle du comportement de micro-oscillateurs mécaniques* », Brevet européen, Extensions internationales WO2002037090, 10 mai 2002.

2. **C. Bergaud**, B. Belier, A. Martinez, L. Nicu, E. Cocheteau, « *Matrice de biocapteurs et son procédé de fabrication* », Brevet européen, Extensions internationales WO 20040185592, 25 avril 2002.

3. **C. Bergaud**, P. Belaubre, M. Guirardel, B. Belier, J-B. Pourciel, « *Système de dépôt de solutions biologiques avec ou sans contact pour la fabrication de biopuces* », Brevet européen, Extensions internationales WO03097238, 15 mai 2003.

- Conférence invitée Aussois, Phytobactériologie, « *Techniques et technologies émergentes pour la conception et la fabrication de puces à ADN* », Janvier 1999.
- « *Détection par variation de propriétés mécaniques de microstructures* », Observatoire des Micro et Nanotechnologies, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, 14 mars 2001.
- 4^{ème} Workshop Franco-Japonais « *Biocapteurs et Bioélectronique* », Tokyo, Japon, 24-26 octobre 2001.
- Intervention au Sénat dans le cadre des rencontres internationales de prospective du Sénat sur « *Les nanotechnologies, vivier du futur : pour une prise de conscience des enjeux stratégiques* », le 20 Juin 2002 au Palais du Luxembourg.
- Invité de l'émission « I comme Icare » sur i-télévision (Chaîne info de Canal+) pour parler des nanotechnologies le 19 juin 2002. Durée 20 minutes.
- Exposé au SITEF à Toulouse « *Biopuces de nouvelles générations* », 24 octobre 2002.
- Exposé dans le cadre du workshop Europe-Japan on Chem Micro Mechatronics Systems and Biochips, ENS Cachan, Paris, Février 2003, Conférence Invitée.
- Exposé dans le cadre du workshop « Microfluidique » dans le cadre des 20^{ème} journées « Spectrométrie de masse et Analyse protéomique » Toulouse 16-19 septembre 2003.
- Séminaire invité « Micro et Nanosystèmes à structure mécanique mobile pour le dépôt et la détection de biomolécules », CEA Grenoble, 29 Janvier 2004, 1 heure.
- Divers articles dans des journaux (La Dépêche du Midi, l'Usine Nouvelle, Electronique Hebdo...) et communications à la radio (France Inter, Radio France Internationale, Europe 1...)
- Participation aux congrès Nanotech 2004 et Nanotech 2005 pour la représentation de la région Midi-Pyrénées (Clusters, Pôles de compétitivité...).
- Rapport d'ambassade pour une mission « BioMEMS-Nanobiotechnologies », Mai 2004.
- Conférence invitée aux Journées Scientifiques Francophones à Tokyo organisées par l'ambassade de France à Tokyo, Novembre 2004.
- Participation à une table ronde sur le thème de la recherche en France et au Japon avec le ministre délégué au commerce extérieur, François Loos, à Tokyo le 22 février 2005.
- Invité de l'émission « Osmose » sur France Inter sur le thème des Nanobiotechnologies le 9 mars 2005, Durée 1 heure.

PARTICIPATION A DES PROGRAMMES DE RECHERCHE

- 1.** Programme "Microsystèmes" du ministère CNRS (CEMES Toulouse) «Microsystèmes multipointes pour la caractérisation de nanodispositifs» 1998-2000.

- 2.** Programme "Post-génomique" du ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie (INSA Biologie Toulouse, LSPCMIB Chimie Toulouse, ENVY-INRA Toulouse, Laboratoire de Bactériologie CHU Purpan Toulouse, Société ISOPRIM Toulouse) « *Conception et production de filtres et bio-puces à ADN de nouvelle génération* » 1999-2002.

- 3.** Programme HMR Hoechst Marion Roussel (INSA Biologie Toulouse, LBME Biologie Toulouse, IPBS Pharmacologie et Biologie Toulouse, LBMRPM Biologie Toulouse, LMM Microbiologie, LSPCMIB Chimie Toulouse) « *Plate-forme de fabrication de filtres et puces à ADN destinée à la Microbiologie et à la Pathogénicité* » 1999-2001.

- 4.** Génopole de Toulouse Midi-Pyrénées. Responsable de l'activité « *Développement de bio-puces de nouvelles générations*» dans le cadre des programmes thématiques, 1999-2002.

- 5.** Programme RMNT (CEMES/CNRS Toulouse, Matra Marconi Space Toulouse, Omicron France) « *Banc de nanomanipulation sous ultra vide* ». 2000-2003.

- 6.** Programme « Puces à ADN » du CNRS 2001-2002 avec l'ESPCI (Laboratoire d'Optique Physique de Claude Boccara et laboratoire de Neurobiologie de Jean Rossier).

- 7.** Projets Régions en collaboration avec le département de Biologie de l'INSA Toulouse et des industriels de la région Midi-Pyrénées en 2001 et 2002.

- 8.** ACI « Protéomique et génie des protéines » avec l'INSA Biologie Toulouse et le LCC à Toulouse 2002-2004.

- 9.** ACI « Nanosciences et nanotechnologies » avec l'INSA Biologie Toulouse et le LCC à Toulouse 2001-2003.

- 10.** ACI « Capteur et nouvelles méthodologies analytiques » avec l'IBCP Lyon, l'ESPCI Paris, l'ENS Paris 2002-2004.

- 11.** AC « Protéomique et génie des protéines » avec le Centre de Pharmacologie et Biotechnologie pour la Santé à Montpellier et le Laboratoire des Processus Intégratifs Cellulaires et réseau Biosims, Faculté des Sciences de Rouen 2003-2005.

- 12.** Collaboration avec la société Delta-Proteomics : prix émergence ANVAR 2002 et prix création d'entreprise ANVAR 2003.

- 13.** Programme de recherche européen dans le cadre du 6^{ième} PCRD : NAPA (Projet Intégré).

14. Programme de recherche européen dans le cadre du 6^{ième} PCRD : NANO2LIFE (Réseau d'Excellence)

ENCADREMENTS

1. 1997-2000 : Co-direction avec Augustin Martinez de la thèse de Liviu Nicu, « Etudes théoriques et expérimentales du comportement mécanique de microstructures de type levier ou pont. Applications à la mesure de la viscosité de liquides et à la caractérisation électrique de nanostructures », Université Paul Sabatier, Toulouse, 12 Octobre 2000.
2. 1998-2002 : Co-direction avec Augustin Martinez de la thèse de Emeline Cocheteau « *Conception, réalisation et caractérisation de piézorésistances ultraminces pour des applications microsystèmes* », INSA Toulouse, le 18 mars 2002. **1^{er} prix INSA Transfert 2002.**
3. 2000-2003 : Direction de la thèse BDI de Matthieu Guirardel « *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or* ». Université Paul Sabatier, Toulouse, le 9 octobre 2003. **LAUREAT DU PRIX DE L'ECOLE DOCTORALE GEET TOULOUSE 2003.**
4. 2000-2003 : Co-Direction avec Germain Garcia de la thèse de Pascal Belaubre « *Développement d'un système de dépôt à base de microleviers pour la fabrication de biopuces de nouvelles générations* », INSA Toulouse, 19 décembre 2003. **1^{er} prix INSA Transfert 2003. LAUREAT DU CONCOURS « LE MONDE », PRIX DE LA RECHERCHE UNIVERSITAIRE, COLLECTION PARTAGE DU SAVOIR, MARS 2005.**
5. 2002-2004 : Responsable scientifique de la thèse CNAM de Fabrice Mathieu « *Electronique de mesure rapprochée pour matrices de micro-levier piézorésistifs* ». Mention Très bien, 9 Décembre 2003.
6. 2002-2004 : Responsable scientifique du séjour en tant que chercheur associé de Daisuke Saya de l'Université de Tokyo « *Nanorésonateurs piézoélectriques et piézorésistifs pour la biologie* », Mars 2002-Mars 2004.
7. Mars 2003 - Septembre 2003 : Responsable scientifique du stage de DESS de Yannick Tauran « *Caractérisation mécanique en milieu liquide de micromembranes à actionnement piézoélectrique: application à la détection de biomolécules* », Septembre 2003.
8. Mai 2003 - Septembre 2003 : Responsable scientifique du stage DEA dans le cadre du programme d'échange ERASMUS de Peter Low (Suède) « *Optimization of electrode structures for dielectrophoresis microfluidic actuation : application to cantilever-based biological sample depositions* », Septembre 2003.
9. Novembre 2003-Novembre 2006 : Co-Direction avec Liviu Nicu de la thèse de Thierry Leichlé dans le cadre du Projet Intégré Européen NAPA.
10. Février 2005-Février 2008 : Direction de la thèse BDI de Peter Löw dans le cadre d'une collaboration entre le LIMMS à l'Université de Tokyo et le LAAS à Toulouse.

PARTICIPATION A DES JURYS DE THESE

1. Thèse de Gabriel Velu "*Croissance par pulvérisation cathodique et caractérisations électriques de couches minces ferroélectriques de PZT*", Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis, 19 novembre 1998.
2. Thèse de Stéphane Cholet "*Fabrication et étude de nanostructures planaires métal-isolant-métal. Adressage électrique d'un nanotube de carbone*", Université Paul Sabatier, de Toulouse le 23 Novembre 1999.
3. Thèse de Benoît Bélier "*Développement de micro-leviers à fonctions optiques intégrées pour la microscopie à effet tunnel photonique et la microconnexion optique*", Université de Montpellier, 3 décembre 1999.
4. Thèse de Liviu Nicu, « *Etudes théoriques et expérimentales du comportement mécanique de microstructures de type levier ou pont : applications à la mesure de viscosité de liquides et à la caractérisation électrique de nanostructures* », Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 12 octobre 2000.
5. Thèse de Emeline Cocheteau « *Conception, réalisation et caractérisation de piézorésistances ultraminces pour des applications microsystèmes*», Université Paul Sabatier, Toulouse le 18 mars 2002.
6. Thèse de Réda Yahiaoui "*Etude par microvibrrométrie de films minces et de dispositifs micromécaniques*", Université Paris XI, 19 mars 2002.
7. Thèse BDI de Matthieu Guirardel « *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : application à la détection de l'adsorption de nanoparticules d'or*», Université Paul Sabatier, Toulouse, le 9 octobre 2003.
8. Thèse Marie Frénéa « *Application de la diélectrophorèse au rangement matriciel et au tri de cellules sur puce*», Ecole Normale Supérieure de Cachan, Antenne de Bretagne, Rennes, le 17 décembre 2003.
9. Thèse de Pascal Belaubre « *Développement d'un système de dépôt à base de microleviers pour la fabrication de biopuces de nouvelles générations*», Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, le 19 décembre 2003.
10. Thèse CNAM de Fabrice Mathieu « *Electronique de mesure rapprochée pour matrices de micro-levier piézorésistifs* », Toulouse, le 10 décembre 2003.

ENSEIGNEMENTS DISPENSES

Cours « *Piézorésistivité et capteurs piézorésistifs* », 4 heures, INSA de Toulouse, 4^{ème} année, département Génie Physique et Génie Electrique.

Cours « *Physico-chimie pour la micro-électronique* » 8 heures, INSA de Toulouse, 4^{ème} année, département Génie Physique.

Cours « *Micro et nanotechnologies pour la biologie* », 6 heures, INSA de Toulouse, 5^{ème} année, Département de Biologie.

Cours de DEA 3N « *Nanophysique, Nanomesures, Nanocomposants* », Option « Ouverture vers les sciences du vivant » 12 heures, Université Paul Sabatier et INSA de Toulouse.

FORMATIONS SUIVIES

Cours : notions de Biologie moléculaire (24 heures). Formation suivie dans le cadre d'un plan de formation du CNRS, Octobre 2000.

Stage pratique : étude de l'interaction ADN-protéine par électrophorèse sur gel d'agarose (8 heures), Mars 2001.

SEJOURS A L'ETRANGER

- *Séjour de deux semaines* (10 au 25 février 2001) à l'Université de Tokyo dans le cadre du projet de collaboration entre le LAAS et l'Université de Tokyo sur la mise au point d'un système de dépôt pour la fabrication de biopuces.

- *Séjour de deux mois* (Décembre 2002-Janvier 2003) au RIKEN à Tokyo dans le cadre d'un financement de la JSPS (Japan Society for the Promotion of Science) au sein du laboratoire du Professeur Yamagata. Le projet concernait l'optimisation des techniques de dépôt de protéines par électrospray sur microstructures en silicium pour la fabrication de puces à protéines. Une partie de ce projet a été développée en collaboration avec l'Université de Tokyo, le professeur Fujii (Microfluidique) et le professeur Kawakatsu (Nanomécanique).

- *Séjour de deux ans* (mars 2004-2006) : LIMMS/CNRS-IIS (UMI 2820), Université de Tokyo dans le laboratoire de biophysique et de biochimie du professeur Noji pour développer un projet sur les nanobiotechnologies.

DIVERS

- Expert externe pour le programme « Établissement de nouveaux chercheurs au Fonds québécois de recherche sur la nature et les technologies à Québec », 2004-2005.

- Responsable de l'activité « Développement de bio-puces de nouvelles générations » dans le cadre des programmes thématiques du Génopole de Toulouse Midi-Pyrénées, 1999-2004.

- Rapporteur du groupe "Conception et production de nanocomposants" de l'Observatoire Français des Techniques Avancées (OFTA) 1999-2001. Membre du comité de rédaction Arago 26 « Nanocomposants et nanomachines », ISBN 2-906028-12-6, Editions Tec&Doc, Juin 2001.

- Expert pour programme ACI Nanosciences, Nano-Objet Individuel, Programme CNRS « Puces à ADN », Observatoire Micro et Nanotechnologies du CNRS et du CEA.

- Délégué régional Midi-Pyrénées du club Nanotechnologie 1998-2002.
- Membre du bureau du GDR « Couches minces Ferroélectriques ».
- Membre du conseil du laboratoire du LAAS Janvier 2003-Mars 2004.
- Membre de la mission « BioMEMS-Nanobiotechnologies » au Japon organisée par l'ambassade de France, Mai 2004.

PUBLICATIONS SIGNIFICATIVES

Piezoelectric properties of PZT films for microcantilever

E. Cattan^{a,*}, T. Haccart^a, G. Vélú^a, D. Rémiens^a, C. Bergaud^b, L. Nicu^b

^a *Laboratoire des Matériaux Avancés Céramiques, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis, ZI Champ de l'Abbesse 59600 Maubeuge, France*

^b *Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du Centre National de la Recherche Scientifique, 7 avenue du Colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex 4, France*

Abstract

The investigation of piezoelectric properties of materials in the thin layer form has become an important task because of the increased range of their applications as actuators and sensors. The sensor magnitude, is a direct function of the e_{31} piezoelectric constant. $\text{Pb}(\text{Zr,Ti})\text{O}_3$ thin films and the modified compositions have attracted great attention in recent years as promising for use in microelectromechanical systems. To determine this constant we use an unusual experimental method. A remanent piezoelectric constant of -4.7 C/m^2 was obtained. The parameters as, coercive field, saturation field, curve of first polarization, and self polarization of the remanent piezoelectric hysteresis loop are presented for $1.6 \mu\text{m}$ thick PZT thin film. We will associate also dielectric results. To show the possible integration of the piezoelectric films in microelectromechanical systems, we have deposited PZT thin film on a $100 \mu\text{m}$ long, $20 \mu\text{m}$ wide, $1 \mu\text{m}$ thick silicon oxide beam to control the z actuation. © 1999 Elsevier Science S.A. All rights reserved.

Keywords: Sputtering; PZT thin films; Piezoelectric constant; Cantilever

1. Introduction

Recently, there has been a growing interest in ferroelectric metal oxide thin film capacitors because of their potential use in a variety of microelectronics devices, including nonvolatile memory devices and micromechanical systems (MEMS). To this point, most devices developments have been centered on silicon micromachined structures which can facilitate integration of piezoelectric materials most traditionally studied on silicon. Combining micromachined silicon with piezoelectric films has resulted in novel microdevices that include sensors [1], accelerometers [2] and micromotors [3]. $\text{Pb}(\text{Zr,Ti})\text{O}_3$ (PZT) with a composition near the morphotropic phase boundary is well-known material for its excellent piezoelectric properties, even in thin film form. To date there is no reliable data on the magnitude of e_{31} for thin $\text{Pb}(\text{Zr,Ti})\text{O}_3$ films. In this study, we use an unusual method [4] to determine the piezoelectric constant e_{31} of PZT (54/46) thin film. For cantilever, it is important on a practical way to determine especially the charge amplitude (e_{31}) of the sensor param-

eters and the output voltage produced by the sensitive piezoelectric material when it is strained. Furthermore, we show how the PZT thin film has been deposited on microcantilevers to be used to actuate the beam. Some applications of this type of sensors or actuators are to be found in both scanning force microscopes and in nanolithography for parallel operations.

2. Experimental details

2.1. Materials and sample preparation

The PZT (54/46) thin films are deposited onto silicon beam, measuring $40 \times 10 \times 0.35 \text{ mm}$, by RF magnetron sputtering. See Table 1 for a summary of the deposition conditions.

The sputtering is done in pure argon atmosphere using stoichiometric PZT target. No heating of the substrate, other than that caused by the sputtering process (around 150°C), is measured during the PZT film deposition, and no bias voltage is applied to the substrate. After the argon pressure is stabilized at 30 mTorr, a pre-sputtering is started to stabilize the plasma and only after an amorphous thin film is deposited. A post-deposition annealing is re-

* Corresponding author. Tel.: +33-03-27-53-16-60; Fax: +33-03-27-64-66-54; E-mail: eric.cattan@univ-valenciennes.fr

Table 1
Sputtering and post-annealing conditions for PZT thin films

Target diameter (mm)	75
Target–substrate distance (mm)	60
RF power density (W/cm ²)	2.36
Sputtering gas	Ar
Gas pressure (mT)	30
Substrate temperature	Ambient–150°C (bombardment effect)
Annealing temperature–duration	625°C–30 min
Annealing atmosphere	Air

quired to achieve a crystalline perovskite structure. The crystalline structure of the prepared PZT films is examined by X-ray diffraction (XRD), with θ – 2θ diffractometer. Fig. 1 shows the XRD pattern of thin PZT film annealed at 625°C for 30 min where the polycrystalline film has a (110)-preferred orientation.

The PZT is deposited on two distinguishable types of beam, one macroscopic for measuring piezoelectric constant and an other one microscopic to demonstrate the compatibility of the PZT process with the cantilever micro-fabrication process.

2.2. Piezoelectric and electrical characterizations

We measured the direct piezoelectric effect with a cantilever [4]. For a direct piezoelectric effect, an uniaxial strain S_1 (following the length) applied to the sample induces an electric charge per unit area D_3 (in a direction perpendicular to the beam).

The equation of state related to the electric and elastic variables of a piezoelectric body for PZT polycrystalline film [5] is:

$$D_3 = \varepsilon_{33f} E_3 + e_{31f} S_1$$

where E_3 and ε_{33f} are the electric field and the effective permittivity (at constant strain), respectively. We will as-

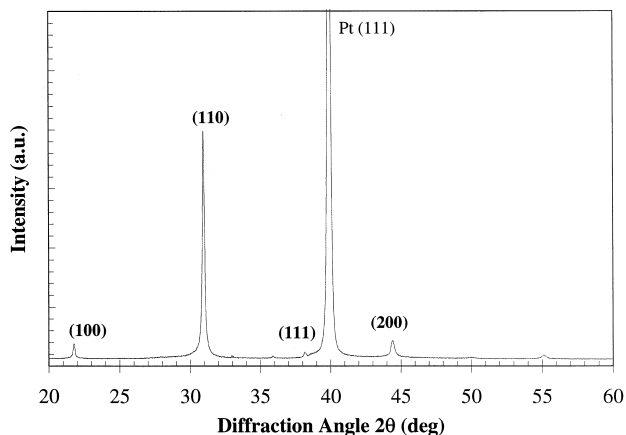


Fig. 1. Typical XRD pattern of a PZT thin film.

sume that the elongation S_2 is negligible in comparison with the elongation S_1 . The silicon wafers were cut into small beams that were fixed at one extremity. The length (l), the width, and the thickness (h) of the silicon beam are 40, 10, and 0.35 mm, respectively. The whole surface of the substrate Si/SiO₂/Ti is covered with a lower platinum electrode. The PZT film was formed on the entire beam top surface.

The difference in voltage between the two electrodes, was registered on an oscilloscope when the beams were statically strained in the perpendicular direction to the film plane and suddenly released. The measured signal corresponded to a damped-out voltage oscillation at the natural frequency ($\omega/2\pi$) of the beam (Fig. 2).

The value of the first maximum voltage (V_{\max}) is used to estimate transverse piezoelectric constant e_{31f} [6].

$$e_{31f} = -\frac{V_{\max}}{a} \frac{C_f}{S} \frac{2l^3}{3h} \frac{1}{l - \frac{x_1 + x_2}{2}} \frac{1 + \tau^2 \omega^2}{\tau^2 \omega^2} \times \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{\pi}{\tau \omega}\right)}$$

where a , x_1 , x_2 are the beam pole amplitude and the abscissa of the electrode extremity, respectively, and R , C_f , are the input resistance of the oscilloscope and the capacitance of the tested sample ($\tau = RC_f$), respectively. All electrical and piezoelectric measurements were carried out on a same platinum top electrode covering an area S of 1 or 1.5 mm². Capacitance, $\tan \delta$ and conductance are conducted using a Hewlett Packard 4192 A multi-frequency LCR Meter at frequency of 1 kHz and a rms voltage of 100 mV. Capacitance and $\tan \delta$ are measured for each poling voltage applied to the film, and to avoid a modification of the polarization state of the film when we measure the capacitance, we have used only low ac voltage. Electrical poling treatment is achieved with the same apparatus. All polarization–voltage (P – V) loops are obtained using a

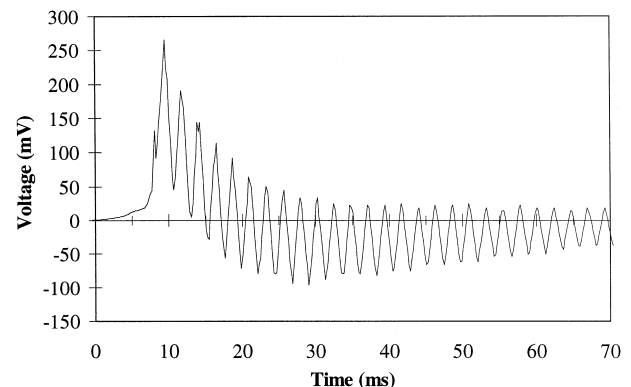


Fig. 2. Typical observed signal for PZT, with a damped out oscillation of the voltage at the natural frequency of the beam.

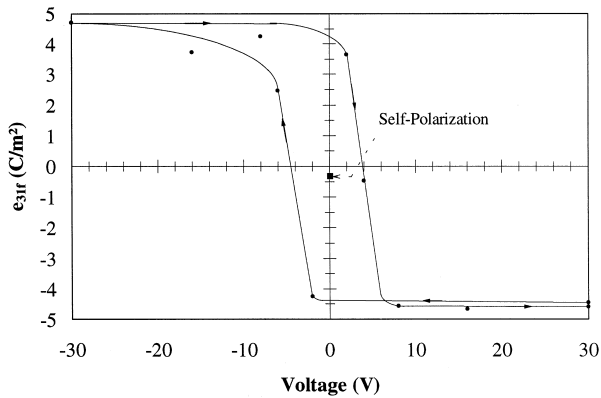


Fig. 3. Remanent piezoelectric hysteresis loop and self-polarization of 1.6 μm thick PZT.

Radiant Technologies RT6000 tester in manual mode at 300 K.

3. Results and discussion

Fig. 3 shows a set of consecutive piezoelectric hysteresis loop obtained with increasing applied electric field, and measured just after the end of the poling treatment. The e_{31f} remanent piezoelectric constant is shown with its phase, i.e., the change of the sign of e_{31f} corresponds to a 180° phase change of the piezoelectric response. Voltages applied for poling depend on the thickness of the film, producing a maximum electric field of 150 kV/cm. The value of e_{31f} is an indirect information of the remanent polarization Pr state of the film, and this degree of remanent polarization is poling time dependent. We have shown in previous work [7] that a poling time of 20 min is necessary to obtain a maximum Pr for each poling voltage applied and to describe a square piezoelectric hysteresis. The coercive electric fields found for piezoelectric hysteresis are quite similar to those obtained, with the same electrode, on the ferroelectric hysteresis. The value of the

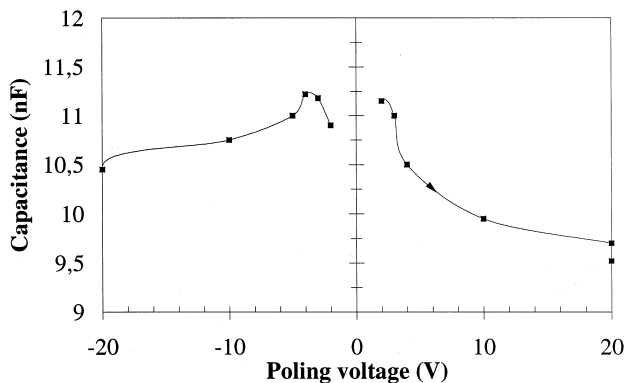


Fig. 4. This plot illustrates the remanent capacitance and the dielectric response of a PZT film after a dc poling electric field and measured at 100 mV ac voltage.

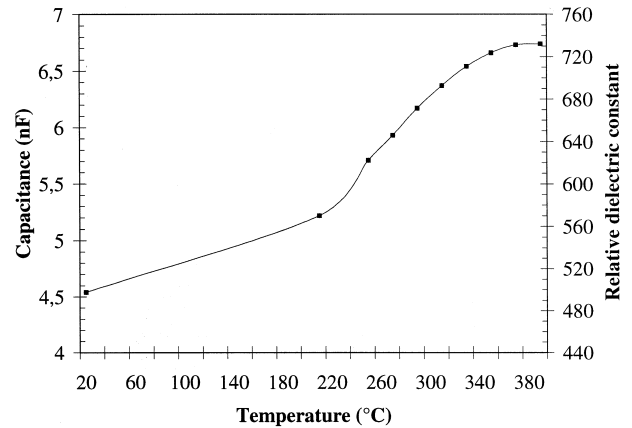


Fig. 5. Evolution of the capacitance with depolarization temperature.

remnant e_{31f} just after a saturate poling electric field is about -4.7 C/m^2 . This value cannot be compared directly with the ones of the corresponding bulk material. The film is part of the composite structure film/substrate. For the direct effect, the corresponding, piezoelectric coefficient directly measurable is the effective e_{31f} , which depends from the bulk tensor properties as follows:

$$e_{31f} = e_{31} - \frac{c_{13}^E}{c_{33}^E} e_{33} \quad \text{and} \quad |e_{31f}| > |e_{31}|$$

where the elongation S_2 is negligible in comparison with the elongation S_1 and the strain T_3 is equal to zero. In Fig. 3 the maximum e_{31f} measured is -4.7 C/m^2 corresponding to a V_{max}/a equal to 300 V/m. The bulk ceramic data of e_{31} PZT is -5.2 C/m^2 [5] and the e_{31f} calculated value is larger and equal to -14.7 C/m^2 . We reported also, that the virgin films (before any electric poling treatment) exhibited a weak piezoelectric activity, called self-polarization. The e_{31f} intensity corresponding to the self-polarization varied from -0.2 to -0.6 C/m^2 with thickness ranging from 0.4 to 3.8 μm . The self-polarization, in the material, is systematically oriented in the same way, from the top electrode to the bottom electrode. From the self-polarization and when the poling dc electric voltage is increased, the random orientation of dipole is modified and a curve of first polarization is obtained. The piezoelectric hysteresis loops are quite symmetrical but the presence of the initial self-polarization shifts upwards the

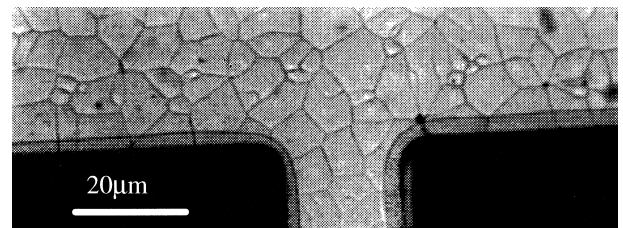


Fig. 6. Optical microscopy photograph ($\times 1000$) of PZT sputtered on microcantilever.

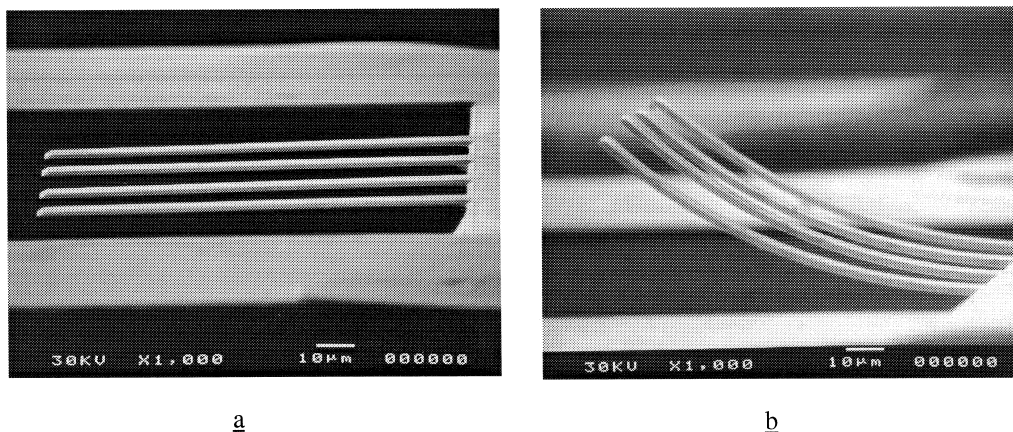


Fig. 7. SEM photographs of cantilevers before (a) and after (b) PZT deposition.

hysteresis in e_{31f} axis, the positive coercive electric field is decreased in favor of the negative coercive electric field. In the range of 0.4 to 3.8 μm , the e_{31f} at saturate poling electric field varied from -3.5 to -6.5 C/m^2 without visible correlation with the thickness. It seems that the electrical quality of MIM structures: top electrode contact, interfaces, etc. are factors that influence the measured voltage at the film boundaries.

Fig. 4 shows the variation of the PZT thin film capacitance measured at a low ac voltage of 100 mV, to avoid any change of the remanent polarization state obtained, after each dc poling treatment of 20 min.

Therefore, the minimum values are higher in comparison with capacitance resulting from a ferroelectric $C(V)$. In contrast the maximum capacitance in piezoelectric and ferroelectric $C(V)$ are similar because they correspond to the same remanent polarization state of the film. Depolarization of the film at elevated temperatures was also attempted. The film is gradually heated and the capacitance is measured when the film is cooled down to room temperature. We found a complete depolarization for a temperature around $370 \pm 10^\circ\text{C}$ as shown in Fig. 5. At this temperature only the self-polarization did not disappear but the corresponding e_{31f} decreased.

To overcome the slowness of some systems like atomic force microscopy, which use only one cantilever, it is interesting to use parallel network cantilevers. In that case each beam must be independent for detection and positioning can be obtained with a piezoelectric actuation. A polycrystalline PZT film is deposited on 100 μm long, 20 μm wide, 1 μm thick silicon oxide microcantilever with a surface morphology shown in Fig. 6. This optical microscopy photography is taken just at the beam embedding and at this point ferroelectric characteristics are measured and are in agreement with values comes from an other point of the film surface.

The scanning electron microscope images (SEM) of the cantilevers, before and after deposition and annealing 0.7 μm thick PZT films are shown in Fig. 7(a) and Fig. 7(b),

respectively. We have directly observed the expansion of the cantilever beams after the annealing of PZT. After PZT deposition cantilevers exhibit an upward curvature that could be the result of an internal stress within PZT thin film due to thermal expansion mismatch between the layers. This stress can be reduced, if not suppressed, by using a buffer material with an opposite stress. This optimization and piezoelectric actuation are the subject of further work.

4. Conclusions

In conclusion, we have characterized piezoelectric properties of polycrystalline PZT films with a composition near the morphotropic phase boundary by means of macrocantilevers. Piezoelectric constant e_{31f} is measured for different remanent polarization state. PZT thin films provided a large piezoelectric constant e_{31f} of -4.7 C/m^2 . The films can be efficiently depolarized under a temperature of 370°C , but the self-polarization does not disappear. We have demonstrated that the PZT thin film process is compatible with the cantilever microfabrication process and does not deteriorate the piezoelectric properties of the PZT thin film. Since the PZT thin film has been successfully deposited on silicon oxide beam, further works will be devoted to the cantilever actuation.

References

- [1] D.L. Polla, C. Ye, P.J. Schiller, T. Tamagawa, W.P. Robbins, D. Glumac, C.C. Hseuh, Linear motion microactuators using piezoelectric thin films, *Proc. Mat. Res. Soc.* 243 (1992) 55.
- [2] D.L. Polla, P.J. Schiller, Integrated ferroelectric microelectromechanical systems (MEMS), *Int. Ferroelectrics* 7 (1995) 359.
- [3] K.R. Udayakumar, J. Chen, A.M. Flynn, S.F. Bart, L.S. Tavrow, D.J. Ehrlich, L.E. Cross, R.A. Brooks, Ferroelectric thin film ultrasonic micromotors, *IEEE Ultrasonic Symposium Proceedings*, 1991, 58.
- [4] J.L. Deschavres, P. Rey, G. Delabouglise, M. Labeau, J.C. Joubert,

- J.C. Peuzin, Characterization of piezoelectric properties of zinc oxide thin films deposited on silicon for sensors applications, *Sensors and Actuators A* 33 (1992) 43.
- [5] B. Jaffe, W.R. Cook, H. Jaffe, in *Piezoelectric ceramics*, Academic Press, London, 1971, pp. 18–19.
- [6] B. Jaber, D. Remiens, E. Cattan, P. Tronc, B. Thierry, Characterization of ferroelectric and piezoelectric properties of lead titanate thin films deposited on Si by sputtering, *Sensors and Actuators A* 63 (1997) 91.
- [7] E. Cattan, G. Velu, P. Tronc, D. Remiens, B. Thierry, Evaluation de la constante piezo-electrique e_{31} du PZT en films minces, *Ann. Chim. Sci. Mat.* 22 (1997) 669.

Micro-optomechanical sensor for optical connection in the near field

B. Belier, A. Santoso, and J. Bonnafe

*Centre d'Electronique et de Microoptoelectronique de Montpellier, Université Montpellier II,
34095 Montpellier Cedex 5, France*

L. Nicu, P. Temple-Boyer, and C. Bergaud^{a)}

LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex 4, France

(Received 28 September 1999; accepted for publication 24 July 2000)

A micro-optomechanical sensor has been used to collect and carry optical information at the nanometer scale. This simple device consists of a SiN_x microfabricated cantilever used simultaneously as an atomic-force microscope (AFM) probe and optical waveguide. When approaching the micro-optical cantilever close to the surface, the tip converts evanescent waves into radiative waves that propagate within the cantilever over long distances. Since the device is also employed as an AFM probe, mechanical contact is fully controlled as the tip approaches the surface, thus avoiding any crash. This sensor has been used to collect optical information from an optical fiber in the near field. © 2000 American Institute of Physics. [S0003-6951(00)03838-9]

Over the last 20 years, scanning near-field optical microscopy (SNOM) has attracted a great deal of attention because it allows optical resolution beyond the diffraction limit.^{1,2} It has been extensively used mainly as an optical metrology tool to obtain subwavelength information about various types of samples. Several configurations such as illumination, transmission, and reflection modes can be used in this technique. An alternative approach known as the tunneling-photon mode has also been developed over the past few years.^{3,4} Whatever the configuration, significant improvements in near-field optical instrumentation have been registered over the past few years due mainly to the particular care taken to fully master the fabrication process of the probe. In this context, one of the most promising approaches is the use of microfabricated probes such as those employed in atomic-force microscopy (AFM). The most important feature of this approach is the fact that these probes can be batch fabricated using standard micromachining techniques, thereby avoiding cumbersome fabrication processes such as those developed for elaborating optical fibers designed for near-field microscopy. By way of example, pioneering works have shown that commercially available probes with a pyramidal tip can advantageously replace traditional optical fibers in near-field optical microscopy in combination with AFM measurements.⁴⁻⁶ More sophisticated devices have also been proposed with a photodiode integrated at the end of the cantilever.⁷ Special attention has been also paid to the fabrication of the tip itself to obtain micromachined coaxial aperture probe tips that could minimize the influence of the cutoff effect on the optical transmission efficiency.⁸ As also shown theoretically by Leinhos *et al.*, another important feature of these coaxial probe configurations is that the gain in transmission could be strongly increased compared to the one obtained using conventional aperture probes.⁹

Nevertheless, even though recent theoretical studies along with experimental results have demonstrated the great potential of near-field optics dedicated to photonic

applications,¹⁰⁻¹² little has been done to take advantage of near-field optical techniques to enhance the optical coupling efficiency in optical readout at the nanometer scale.¹²⁻¹⁵

In this letter, a simple micro-optomechanical cantilever made up of low-stress silicon nitride is used as an optical connector designed to fulfill two functions: (i) It is used as an AFM probe to accurately control the tip-surface distance, thus avoiding a possible crash of the tip; and (ii) simultaneously, as the tip of the cantilever approaches the surface, the branch of the cantilever plays the role of an optical waveguide that collects the optical signal and carries it to an external photodiode. This guiding effect, theoretically demonstrated by Bouju *et al.*, has been implemented for optical connections in the near field.¹⁶

Arrays of low-stress silicon nitride (SiN_x) cantilevers have been batch fabricated using standard micromachining techniques. The starting material is a double-side polished (100) *p*-type silicon wafer of 1-5 Ω cm resistivity. The first step consists of the thermal growth of a 400-nm-thick SiO_2 layer used as the masking layer for fabrication of the tip. Using the fabrication process proposed by Ravi, Marcus, and Liu,¹⁷ sharp tips have been obtained with a radius of curvature of 50 nm at the apex. Following tip formation, the SiO_2 layer is removed on both sides with a buffered HF solution. A second thermal oxidation leads to a 1- μm -thick SiO_2 layer, which will be used as the etch-stop layer in the last step. It should be pointed out as well that this oxidation also sharpens the tip.¹⁷ A 0.95- μm -thick low-stress SiN_x layer is then deposited by low-pressure chemical-vapor deposition from silane SiH_4 and ammonia NH_3 . Stress in SiN_x thin films deposited by this technique needs to be controlled as it can result in large bending of the released microstructure. This can be achieved by accurately controlling the deposition parameters: temperature T , total pressure P , and NH_3/SiH_4 gaseous ratio R .¹⁸ Moreover, by fully controlling the deposition conditions, the stoichiometry of the deposited film can also be monitored, leading to a precise refractive index. Here, a high refractive index ($n=2.3$) has been measured by ellipsometry at a 830 nm wavelength. It should be pointed

^{a)}Electronic mail: bergaud@laas.fr

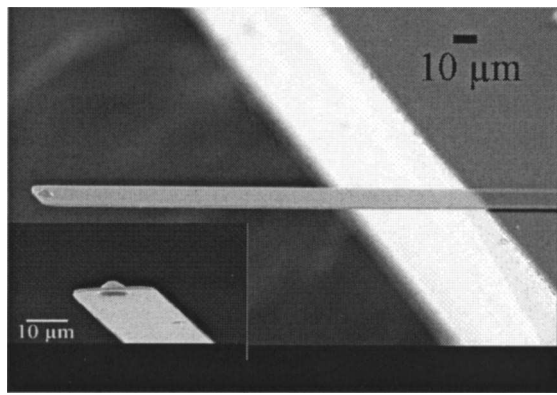


FIG. 1. Scanning electron micrograph of a 0.95- μm -thick, 20- μm -wide, 200- μm -long SiN_x cantilever. The index of refraction n is 2.3. Bottom left: close up of the tip. The radius of curvature at the apex is about 50 nm.

out that the low refractive index of the thermal silicon dioxide underneath ($n = 1.45$) ensures an efficient guiding of the light within the SiN_x waveguide, thereby reducing optical losses during transmission. This guiding efficiency is greatly enhanced relative to a configuration in which the SiN_x thin film would have been directly deposited onto the silicon substrate.

SiN_x cantilevers are then patterned using CF_4 plasma etching. On the backside, rectangular areas are defined by selectively removing the 1- μm -thick silicon dioxide. During the final step, exposed areas are etched in a 20% TMAH solution at 90 °C while the frontside is mechanically protected against etching with a dedicated Teflon. Free-standing SiN_x cantilevers are obtained by etching the SiO_2 etch-stop layer in a buffered-HF solution. A scanning electron micrograph of a micro-optical cantilever is shown in Fig. 1. Cantilevers are 20 μm wide and 200 μm long (spring constant 0.10 N/m).

The experimental setup selected to characterize the fabricated micro-optomechanical cantilever is schematically depicted in Fig. 2. The configuration substantially differs from conventional approaches used for near-field optical microscopy, even those involving microfabricated probes.^{4,6} It corresponds to a photon scanning-tunneling microscopy (PSTM) configuration where the sample is illuminated under total internal reflection. This configuration is similar to the one used by Niwa *et al.* where a SiO_2 cantilever coated with aluminum was used as a channel waveguide to propagate the

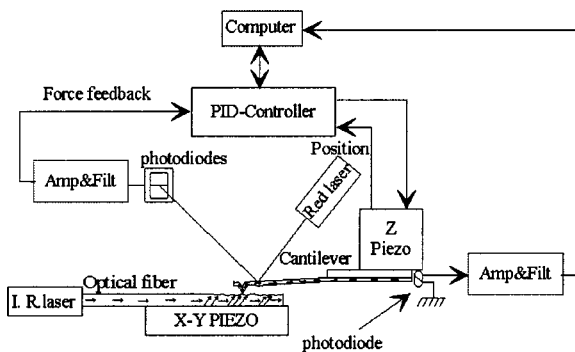


FIG. 2. Schematic diagram of the AFM/PSTM using a SiN_x optical cantilever. The test sample is an optical fiber in which a laser beam is injected ($\lambda = 1.06 \mu\text{m}$).

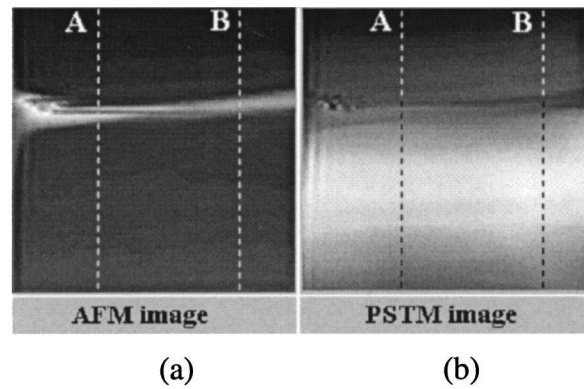


FIG. 3. A $10 \times 10 \mu\text{m}$ synchronous AFM/PSTM image of an optical fiber used as a test sample: (a) AFM image and (b) optical image obtained simultaneously using the SiN_x cantilever as an AFM probe and optical waveguide. Interpretation of the optical image is quite complicated since the coupling of optical and topographical information impact the optical signal. Nevertheless, it demonstrates the guiding effect of the branch of the cantilever when used as an optomechanical sensor.

light towards the sample but not to collect evanescent waves from the sample.¹⁹

Optical deflection is used to measure the forces acting at the end of the micro-optical cantilever. Tip-sample separation is monitored with a proportional-integral-derivative controller ensuring the feedback control thanks to a z piezo-actuator. Simultaneous topographic and optical measurements were performed in contact and constant-force AFM mode. Using such a mode, the tip of the micro-optical cantilever, when approaching the surface, frustrates the evanescent waves that are converted into radiative ones and propagate along the cantilever, which plays the role of an optical waveguide. A photodiode is located at the very end of the optical cantilever to collect the optical signal.

From a mechanical point of view, the SiN_x cantilevers were characterized using a standard-patterned sample composed of $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ square holes with a depth of 0.1 μm . These cantilevers permit obtaining reproducible measurements in both lateral and horizontal directions with a precision of about 50 nm. This is high enough to ensure good control of the position and the force acting on the tip when the cantilever is used as a mechanical sensor.

Concerning the optical characterization of the SiN_x cantilever and its guiding properties, an optical fiber that has been molded into epoxy resin, thinned down to its core, and then polished with alumina powder, has been used as a test sample.

This test sample has been chosen as it offers an optimized configuration which is ideal for the study of optical connection in the near field. Indeed, the aim was not to determine the optical resolution of such a system because this could have been done by means of dedicated gratings. During the experiment, when injecting a laser beam ($\lambda = 1.06 \mu\text{m}$) into the fiber, evanescent waves due to total internal reflection are created on the polished surface of the fiber. While scanning the sample with an x - y piezoactuator, the micro-optomechanical cantilever is in contact with the polished core of the fiber and records simultaneous force (AFM) and optical (PSTM) measurements. Figure 3(a) shows the AFM image of the core and Fig. 3(b) the corresponding optical image obtained simultaneously on the same

scan area ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$). As expected, a guiding effect can be noticed within the branch of the cantilever. This experimentally confirms the theoretical work of Bouju *et al.* who have shown, by calculating the time-averaged Poynting vectors distributions within a similar structure, that the energy flow is quite important not only in the z direction, where it is usually collected in classical experimental setups, but also at the end of the branch of the cantilever.¹⁶

Moreover, it can be noticed that the AFM image reveals a protrusion due to nonuniform polishing which is also clearly visible on the three-dimensional PSTM image. As can be seen, this protrusion affects the optical signal in the corresponding zone. The correspondence between these images indicates that the optical contrast is mainly correlated with the topography. Nevertheless, the presence of protrusions on the surface of the test sample makes the interpretation of the optical image rather difficult since both evanescent waves and the contribution of propagating ones will impact the collected optical signal.

A theoretical analysis is under progress to quantify these different contributions and to determine the amount of energy flow exiting the branch of the cantilever in such a configuration. It should be also emphasized that the optical transmission efficiency could have been enhanced by using micromachined coaxial probes.²⁰ Nevertheless, this implies the development of a more sophisticated fabrication process.

In summary, a method has been presented which allows optical connection in the near-field range. This method advantageously uses a SiN_x probe as an AFM probe and optical waveguide. One advantage of the fabrication process presented lies in its simplicity, thereby allowing good reproducibility and a high fabrication yield. Arrays of such cantilevers could be used in both emitting-receiving modes, thereby opening up ways for optical addressing of nanostructures such as photonic crystals in the subwavelength optical range. In addition, it should be recalled that these devices could be powerful tools for combining AFM with SNOM or

PSTM provided the cantilever tip is sharp enough to enhance lateral resolution.

The authors kindly acknowledge all the cleanroom staff members of the LAAS for their efficient technical support.

- ¹D. W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* **44**, 651 (1984).
- ²A. Harootunian, E. Betzig, M. Isaacson, and A. Lewis, *Appl. Phys. Lett.* **49**, 674 (1986).
- ³D. Courjon, J. M. Vigoureux, M. Spajer, K. Sarayedine, and S. Leblanc, *Appl. Opt.* **29**, 3734 (1990).
- ⁴M. H. P. Moers, R. G. Tack, N. F. van Hulst, and B. Bölger, *J. Appl. Phys.* **75**, 1254 (1994).
- ⁵A. G. Ruiter, M. H. P. Moers, N. F. van Hulst, and M. de Boer, *J. Vac. Sci. Technol. B* **14**, 597 (1996).
- ⁶F. Baida, D. Courjon, and G. Tribillon, *NATO ASI Ser., Ser. E* **242**, 71 (1993).
- ⁷Y. Tanaka, K. Fukuzawa, and H. Kuwano, *J. Appl. Phys.* **83**, 3547 (1998).
- ⁸W. Noell, M. Abraham, K. Mayr, R. Ruf, J. Barenz, O. Hollricher, O. Marti, and P. Gütthner, *Appl. Phys. Lett.* **70**, 1236 (1997).
- ⁹T. Leinhos, O. Rudow, M. Stopka, A. Vollkopf, and E. Oesterschulze, *J. Microsc.* **194**, 349 (1999).
- ¹⁰J. D. Joannopoulos, P. R. Villeneuve, and S. Fan, *Nature (London)* **386**, 143 (1997).
- ¹¹C. Girard, A. Dereux, and C. Joachim, *Phys. Rev. E* **59**, 6097 (1999).
- ¹²E. Betzig, J. K. Trautman, R. Wolfe, E. M. Gyorgy, P. L. Finn, M. H. Kryder, and C. H. Chang, *Appl. Phys. Lett.* **61**, 142 (1992).
- ¹³B. D. Terris, H. J. Mamin, and D. Rugar, *Appl. Phys. Lett.* **68**, 141 (1996).
- ¹⁴H. Yoshikawa, T. Ohkubo, K. Fukuzawa, L. Bouet, and M. Yamamoto, *Appl. Opt.* **38**, 863 (1999).
- ¹⁵S. Hosaka, T. Shintani, M. Miyamoto, A. Hirotsune, M. Terao, M. Yoshida, K. Fujita, and S. Kämmer, *Jpn. J. Appl. Phys., Part 1* **35**, 443 (1996).
- ¹⁶X. Bouju, A. Dereux, J. P. Vigneron, and C. Girard, *J. Vac. Sci. Technol. B* **14**, 816 (1996).
- ¹⁷T. Ravi, R. B. Marcus, and D. Liu, *J. Vac. Sci. Technol. B* **9**, 2733 (1991).
- ¹⁸P. Temple-Boyer, C. Rossi, E. Saint-Etienne, and E. Scheid, *J. Vac. Sci. Technol. A* **16**, 2003 (1998).
- ¹⁹T. Niwa, K. Kato, S. Ichihara, N. Chiba, Y. Mitsuoka, M. Oumi, M. Shinogi, K. Nakajima, H. Muramatsu, T. Sakuhara, M. Shikida, and K. Sato, *Proceedings of the IEEE Workshop on Micro Electro Mechanical Systems, Orlando, FL (IEEE, Piscataway, NJ, 1999)*, p. 355.
- ²⁰A. Vollkopf, O. Rudow, T. Leinhos, C. Mihalcea, and E. Oesterschulze, *J. Microsc.* **194**, 344 (1999).

A metallic microcantilever electric contact probe array incorporated in an atomic force microscope

T. Ondarçuhu^{a)}

Centre d'Elaboration des Matériaux et d'Études Structurales-Centre National de la Recherche Scientifique, 31055 Toulouse Cedex 4, France

L. Nicu

Laboratoire d'Automatique et d'Architecture des Systèmes-Centre National de la Recherche Scientifique, 31077 Toulouse Cedex, France

S. Cholet

Centre d'Elaboration des Matériaux et d'Études Structurales-Centre National de la Recherche Scientifique, 31055 Toulouse Cedex 4, France

C. Bergaud

Laboratoire d'Automatique et d'Architecture des Systèmes-Centre National de la Recherche Scientifique, 31077 Toulouse Cedex, France

S. Gerdes and C. Joachim

Centre d'Elaboration des Matériaux et d'Études Structurales-Centre National de la Recherche Scientifique, 31055 Toulouse Cedex 4, France

(Received 6 August 1999; accepted for publication 12 January 2000)

We present the realization and performance of a multiprobe microcontactor made of an array of metallic microcantilevers inserted in an atomic force microscope (AFM). This instrument permits simultaneous AFM imaging and electrical characterization of nanoscale devices. It is therefore well adapted for future generations of molecular devices. The probes are 2- μm -wide metallic cantilevers that are brought in contact with 3 μm \times 3 μm metallic pads of a nanocircuit using a nanopositioning table. The performance of the instrument, tested on mesoscopic metallic wires and carbon nanotubes, shows that the reproducibility of the electrical contact between the probes and the circuit is better than 99.2%. © 2000 American Institute of Physics. [S0034-6748(00)00305-1]

I. INTRODUCTION

Planar electrical connections with a nanoscale device like a nanotube¹ or a molecular gate² actually require four levels of interconnections: (i) a planar nanojunction where the molecular device is adsorbed with both ends to the junction electrodes,^{3,4} (ii) mesoscopic metallic leads which are generally a direct continuation of the nanojunction electrodes, (iii) large metallic pads connecting these leads to facilitate the bonding of a 20- μm -diam metallic wire, and (iv) the bonding between the pads and metallic wires bonded usually by thermosoldering or conducting paste on the pads. Consequently, the number of interconnected nanojunctions per wafer is relatively small, generally less than one nanojunction per 0.01 mm² because of the large surface area required for bonding the pads. Furthermore, these pads are generally fabricated using a photolithography process which introduces difficulties in terms of cleanness and alignment of the pads compared to the e-beam fabricated mesoscopic leads. The large pads also result in an heterogeneous surface which put constraints on the molecular deposition⁵ and the manipulation techniques used to position the molecular device on the nanojunction.⁶

To reduce the number of interconnection levels, to increase the number of nanojunctions that can be tested per wafer, and to suppress the photolithography and the wire bonding steps, we have designed, realized and tested a metallic microcantilever array of electrical probes integrated with a commercial atomic force microscope (AFM) head. This technology enables the systematic electrical characterization of nanodevices mass fabricated on a single wafer without need for the standard free-wiring technique.

The principle of this multiple electrical contact probe is presented in Fig. 1. It is a generalization of the use of a single metallic tip cantilever for local electrical testing⁷ and of the standard multiprobe heads used in microelectronics. A dual imaging procedure is required for the coarse alignment of the multiprobe array on the metallic structures with an optical microscope and for imaging the nanojunction and the molecular device with the AFM during its electrical characterization.

In the first part, the extension of a commercial AFM to incorporate the nanojunction testing unit, under the AFM head, is described. Second, we describe the fabrication process of the metallic microcantilever array. Finally, the performance of our microprobe array are presented for two and four point resistance measurements of mesoscopic wires and single wall carbon nanotubes.

^{a)}Electronic mail: ondar@cemes.fr

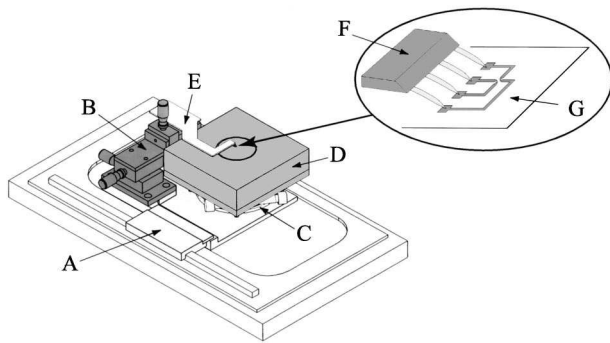


FIG. 1. Schematic of the AFM metallic microprobe array system. (A) is the original Dimension 3000 AFM step motor, (B) is the three-dimensional coarse approach, (C) is the rotation stage, (D) is the nanopositioning table, (E) is the printed board circuit holding the microprobe array chip, (F) is the end of the microprobe chip, and (G) the wafer with the e-beam nanofabricated circuits.

II. AFM MODIFICATION

Our multiprobe electrical contact array is inserted under the head of a Dimension 3000 AFM (Digital Instruments). Being a moving probe—stationary sample based scanning instrument, the new multifunctional sample holder can be used without perturbing the image acquisition. The AFM head is also equipped with an optical microscope for prepositioning of the tip apex on the surface. Furthermore, the geometry of the instrument is such that new tools are easily introduced laterally under the scanning head, like the microcantilever probe array proposed in Fig. 1.

First, the sample holder was modified to incorporate a low noise nanopositioning table NPS3330 (Queensgate Instruments). This “nanotable” was mounted on a D80MM rotation stage (Micro-Controle) to correct for possible angular orientation mismatches of the microcantilever array in the x and y directions relative to the sample surface. The rotation stage precision is $1/60^\circ$ which is sufficient to correct for a possible misalignment. This new sample holder has four degrees of freedom, with software controlled x , y , and z positions. Its close-loop controller allows reliable displacements of $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$ in the x , y , and z directions, respectively. Nanometer level reproducibility was demonstrated by the manipulation of a nanofiber of 1 nm in diameter⁸ with the AFM tip apex. Instead of using the x and y scans’ ability of the AFM head to perform this manipulation, we activate the x and y degrees of freedom of the nanotable and define the target position of the manipulation with the computer controlled program. The nanotable z degree of freedom was used to bring the tip apex in close contact with the nanofiber, the fiber was then successfully manipulated by moving the nanotable along the x and y axis. No deterioration of the AFM imaging performances was measured with this new sample holder. Notice that we have kept the resident step-by-step motorization stage of the original Dimension 3000 AFM for easy positioning of the nanotable under the AFM head (Fig. 1).

To support and position the microcantilever array under the AFM head, a lateral holder has been designed and fabricated. In addition to hold the silicon chip integrating the metallic microcantilever array [see Fig. 2(a)] it is also used

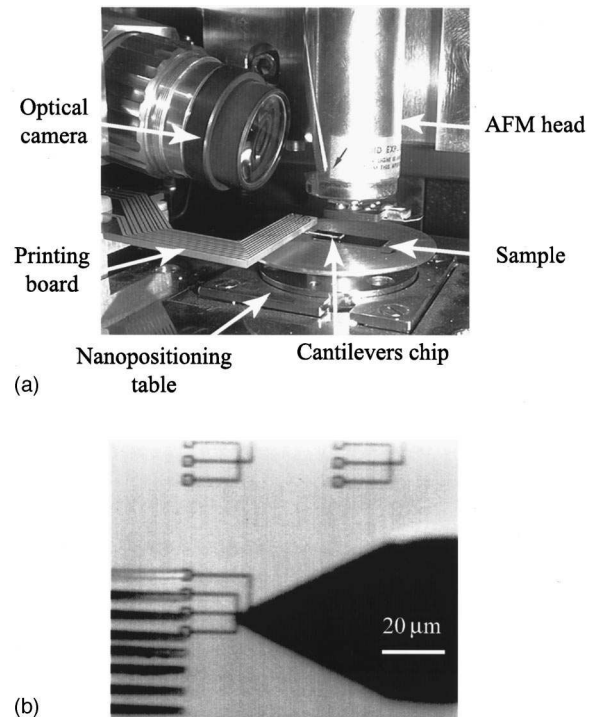


FIG. 2. Realization of the AFM metallic microprobe array system. (a) Photograph of the system. The AFM head was not engaged for better view of the cantilevers; (b) optical microscope image of the wafer, the AFM cantilever (in black) and the ten metallic levers array. The top four of these levers are positioned to contact four micropads.

to connect each of these cantilevers to the external measurement units (Keithley 617 electrometer and Keithley 192 multimeter). Part of the microcantilever electric wiring is integrated on the cantilever silicon chip and the other part on a standard printing board. The position of the holder is controlled by three M-UMR3.5 translation stages (Micro-Controle). Note that the holder is fixed on the translation stage with a small vertical tilt (a few degrees) to facilitate the contact of the cantilevers with the surface. The array is positioned within $5\ \mu\text{m}$ of the microcircuits on the wafer [Fig. 2(a)], and the nanotable sample holder is then used to contact the microcantilevers with the microcircuits contact pads. The microcantilever array chip holder fits under the cantilever holder of the AFM head [Fig. 2(b)], enabling imaging of the nanojunction when the metallic cantilever array is in contact with the microcircuit.

An image of the modified AFM is shown in Fig. 2(a). Notice that, to install the nanotable under the AFM head, the AFM stage had to be raised by 3 cm. The influence of this modification was tested on the AFM resolution. With the Queensgate table turned off, no difference in resolution could be detected between the modified and nonmodified AFM (a noise of $0.3\ \text{\AA}$ was measured in both cases). With the nanotable on, we optimized the parameters of the feedback loop to minimize noise. In this configuration, the noise increases ($0.6\ \text{\AA}$) but with no noticeable influence on image quality. This configuration gives a slower response when moving the nanotable (42 ms for a $0.5\ \mu\text{m}$ displacement to be compared to 2 ms for the fast response configuration) but

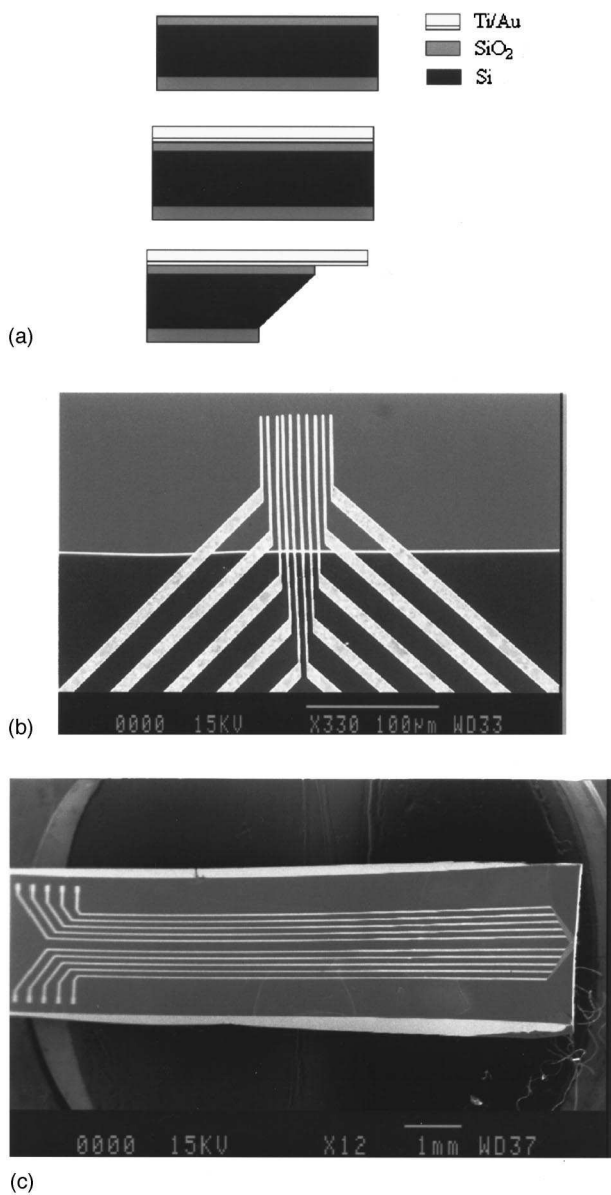


FIG. 3. Details of the fabrication and design of the microprobe array chip. (a) Schematic of the process with (a) the first layering, (b) the metallization to define the lever, and (c) the back side etching; (b) electronic microscope image of the end of a chip showing the array of the ten microlevers with their respective integrated wiring; (c) electron microscope image of the full chip where the complete interconnection circuit and its bonding pads are clearly visible.

this is not a crucial point in our experiment as we are not dependent on a fast response time.

III. FABRICATION OF THE METALLIC MICROCANTILEVER ARRAY

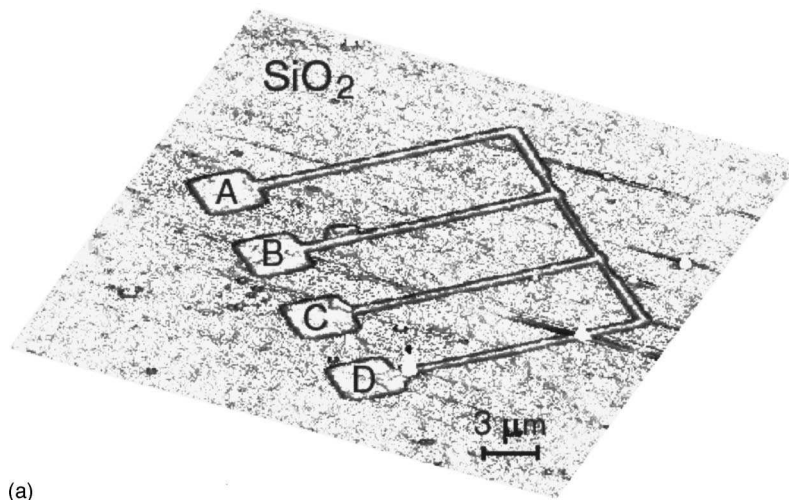
The use of an atomic force microscope with a conducting cantilever is the most common way to perform electrical characterizations of nanostructures especially for measuring capacitance. These conducting cantilevers are usually fabricated by coating commercially available cantilevers with thin metal films.⁹ Nevertheless, this method suffers from wear of the metallic thin film that drastically impacts the quality of the electrical contact after repeated scans. A promising alter-

native is to use metallic cantilevers that can provide reproducible electrical contacts.⁷⁻¹⁰ The metallic cantilevers used in our experiment differ from those presented in these works by the fact that they are used in an array with reduced size and used solely for electrical characterization since imaging is performed independently with the AFM.

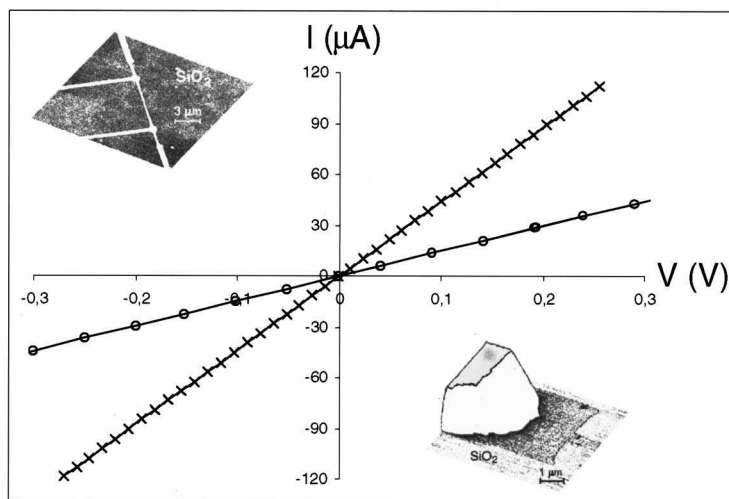
The metallic microcantilever array chips are fabricated in three steps, as presented schematically in Fig. 3(a). The process starts with a 4 in. double-side polished (100) *p*-type silicon wafer of 1–5 Ω cm resistivity. The first step consists in thermal growth of a 1- μ m-thick silicon dioxide layer at 950 °C. This layer is selectively etched in buffered HF on the front side and left on the back side to be used as a masking layer. A second oxidation at 1150 °C is then performed to obtain a thinner oxide (0.1 μ m) with improved electrical properties. The purpose of this layer is twofold, it acts as an interfacial insulating layer between the substrate and the metallic cantilevers and as an etch stop layer during the final etching. The shape of the cantilevers, as well as the connecting wires and pads, are defined on the front side through a 2.8- μ m-thick reversible photoresist pattern (AZ5214E). A 0.1- μ m-thick Ti layer and a 1- μ m-thick Au layer are then deposited by evaporation. Titanium was selected as a plating layer over several candidates considered, including chromium and nickel. Chromium was not chosen in order to avoid the formation of a highly stressed layer that can drastically affect the mechanical properties of the released structures. Nickel was also avoided even though it leads to a reduction of the residual stress within the layer since the adhesion of nickel on silicon dioxide is poor. Titanium is a good compromise to obtain a good adhesion layer between silicon dioxide and gold while ensuring the formation of a low stressed interfacial layer. A lift-off process which consists in selectively removing the Ti/Au film on the photoresist layer is then performed leaving the cantilevers with the connecting wires and pads.

Since slightly upwardly bent cantilevers are desirable to produce a prominent tip for electrical contact under the AFM, special attention has been paid to the control of the beam stress by tailoring the residual stress within the Ti/Au bilayer before releasing the cantilevers. This has been achieved by carefully choosing the thickness of the Ti layer and by adding an annealing step in the fabrication process. Annealing has been performed at 450 °C for 30 min under an N₂/H₂ environment.

On the opposite side of the substrate, rectangular areas are defined by selectively removing the 1- μ m-thick silicon dioxide. During the final step, these exposed areas are etched in a 20% TMAH solution at 90 °C while the front side is mechanically protected against etching with a dedicated chuck made of Teflon. TMAH etching was preferred to KOH etching since the etch rate of silicon dioxide in TMAH is very low¹¹ at this temperature: The silicon etch rate is about 0.9 μ m/min and the silicon dioxide etch rate is 0.02 μ m/min. The 0.1- μ m-thick SiO₂ layer can therefore be used as an etch stop layer while the 1- μ m-thick SiO₂ layer serves as a masking layer. During the last step, the 0.1- μ m-thick silicon dioxide layer is etched in buffered HF leaving arrays of free standing metallic microcantilevers as shown in Fig. 3(b).



(a)



(b)

The cantilevers are $1.1 \mu\text{m}$ thick, $2 \mu\text{m}$ wide, and $60 \mu\text{m}$ long with a spacing of $4 \mu\text{m}$. The intercantilever separation is compatible with the micron scale pads fabricated by e-beam lithography together with the connection pads and the nanojunctions (see below). A complete microcantilever-array chip with cantilevers, integrated wiring networks, and contacting pads is presented in Fig. 3(c).

IV. ELECTRICAL CONTACT PERFORMANCES

To study the performances of our electric microprobe array, a series of mesoscopic metallic wires $0.2 \mu\text{m}$ in width were fabricated. Now a classic in transport physics,¹² such structures are very useful to test the ability of each microcantilever in the array by contacting the wires in a two or four probes geometry. For these two types of measurements, the micropads on the wafer are only $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ in size and are e-beam fabricated at the same time as the mesoscopic wires [Fig. 4(a)].

The outcome of a 4-point resistance measurement is shown in Fig. 4(b). AFM images can be taken in parallel with the recording of the current–voltage (I – V) characteristics [Fig. 4(b)]. The four metallic microcantilevers are first prealigned on the four microscopic pads using the four de-

FIG. 4. An example of a 4-points measurement performed on a $0.2 \mu\text{m}$ wide metallic wire. (a) AFM image of the complete microcircuit with the four interconnection micropads for the metallic lever of the array. Notice that the nanolithography performed is such that the metal of the circuit is almost at the same altitude as the wafer surface (within 0.5 nm); (b) details of the 2-point and 4-point current–voltage (I – V) measurements performed on the (a) mesoscopic wire. The two insets are top left, a detail AFM image of the wire with its four interconnections and bottom right, an AFM image of a microcantilever connecting a micropad during the I – V measurement. For this 5-nm -thick gold-palladium wire supported by a 5 nm adhesion layer of titanium on SiO_2 , the A – B , B – C , and C – D 2-point measurements give resistances of 5.5 , 6.7 , and $5.5 \text{ k}\Omega$, respectively. The A – B – C – D 4-point measurement gives a resistance of $2.28 \text{ k}\Omega$.

grees of freedom coarse displacements of the microcantilever holder under the AFM head optical microscope. Thereafter, the nanotable is used to fine align the lever and establish the electrical contact using the z axis displacement to gently rise the sample wafer until electrical contact is achieved. Notice that the micropads metal thickness is only 10 nm . However, no net change of the corrugation of the pads surface could be recorded by AFM after contact with the microcantilevers. The I – V measurements are performed as in any 4-point measurement, using a current source through levers A – D and a voltmeter contacted on levers B – C [Fig. 4(a)]. The room temperature conductivity of our mesoscopic wire is found to be $0.76 \mu\Omega \text{ m}$. The probe–nanocircuit contact resistances of about 800Ω were deduced from the measurement of the 2-point and 4-point resistances on the BC nanowire segment between electrodes B and C [Fig. 4(b)].

2-point resistance measurement structures were used to test the stability and reproducibility of the microprobe technique described above. To evaluate the stability of the electric contact, we have first recorded the fluctuation during 12 h of the 2-point resistance measured on a single mesoscopic wire [Fig. 5(a)]. The maximum residual resistance variation is only 0.2% after an initial stabilization time. The reproduc-

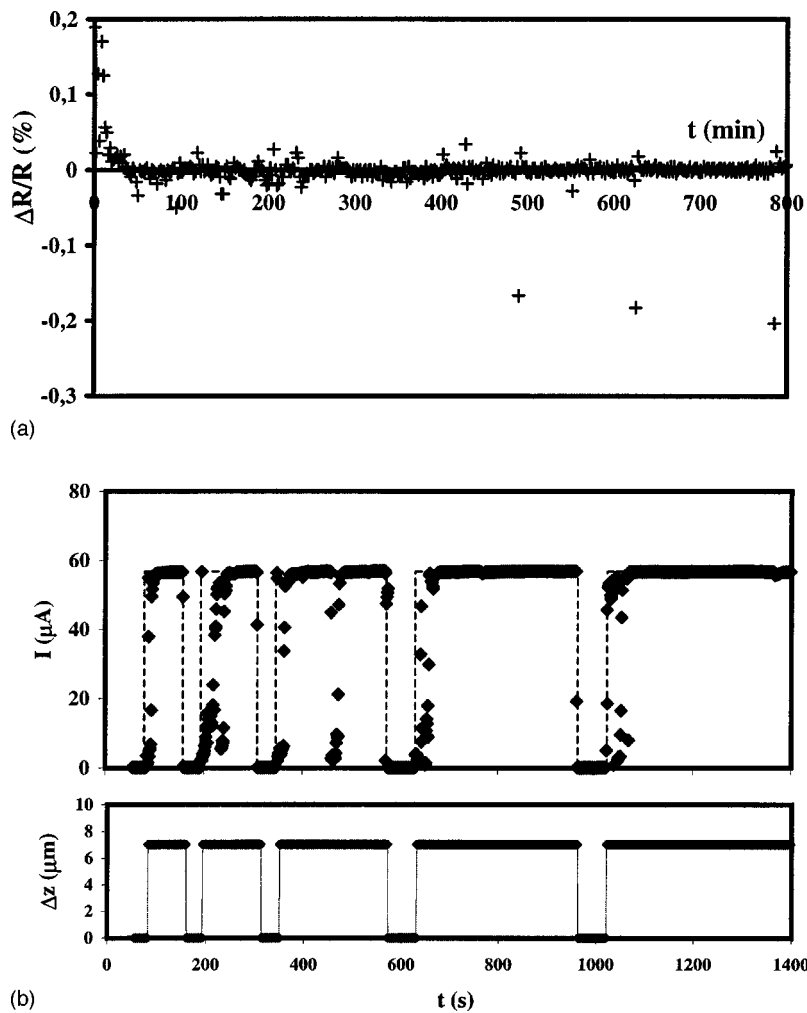


FIG. 5. (a) Stability test: Relative value of the 2-point resistance measured on a single mesoscopic wire during more than 12 h; (b) reproducibility test: Intensity measured on a single mesoscopic wire contacted and decontacted five times by applying to the cantilevers a Δz of $7 \mu\text{m}$. The equilibrium value is reached after a stabilization time of about 20 s. The values for the five contact procedures presented on the figure are 56.45, 56.73, 56.58, 56.84, and 56.73 μA .

ibility of the contact was evaluated by inputting a regular vertical z shift of the nanotable in order to establish and then suppress the contact between the levers and the micropads [Fig. 5(b)]. This experiment also gives an indication of the short time fluctuations, i.e., the time constant of the equilibration of the resistance. We find that after a stabilization time of about 20 s, an equilibrium value is reached. The variation of this value from one contact to the next is less than 0.8%. This shows that the electrical probe-circuit contact is reproducible. Notice that the vertical procedure to suppress the contact is difficult to perform due to adhesive forces which constrain the microlever on the surface. Therefore, a z shift as high as $7 \mu\text{m}$ was necessary to reach the noncontact regime. We have also noticed that a current intensity larger than $1 \mu\text{A}$ is more effective in providing a fast contact stabilization than current intensity in the nanoampere region.

To evaluate the ability of our instrument to rapidly test different circuits on the same wafer, we selected two nearest-neighbor microcantilevers and, without changing the selected microcantilevers, we successively recorded the $I-V$ characteristics of six mesoscopic wires, $0.4 \mu\text{m}$ in width selected each in a family of eight identical structures (Fig. 6). The 3% variation of the resistances measured can be attributed to small fluctuations from wire to wire in their granular structures. Measuring such a series takes less than 10 min with a

manual procedure. In this case, the positioning of the microcantilever array is fine tuned by using the computer controlled displacements of the nanotable sample holder, following the displacements with the optical microscope in the AFM head. A fully automated version of this procedure is easy to implement and will reduce the measurement time.

A limitation of our microcontacting procedure is the leaking current observed at large voltage, due to surface states on the surface of the silicon chip where the microlevers are fabricated. Currents as high as 10 pA for a 1 V bias are recorded between the microlevers when the array is not in contact with a metallic structure. The setup is therefore adapted for the measurement of currents in the nanoampere regime or higher. For lower currents, a compensation method can be implemented taking into account the static leaking current. Bias voltage up to a few volts can be applied between the microlever without perturbing the AFM imaging. However, higher voltages may create electrostatic effects that perturb the imaging of nonconducting samples as we observed in a study of the breakdown limit of nanojunctions.

Finally, to prove the advantage of our microprobes array in nanoelectronics, we have fabricated molecular nano-Wheatstone bridges using two carbon nanotubes on four electrodes geometry. First, 1000 nanojunctions with four electrodes were fabricated on a single wafer. Then, nanotubes were combed in parallel on these junctions⁵ to form the

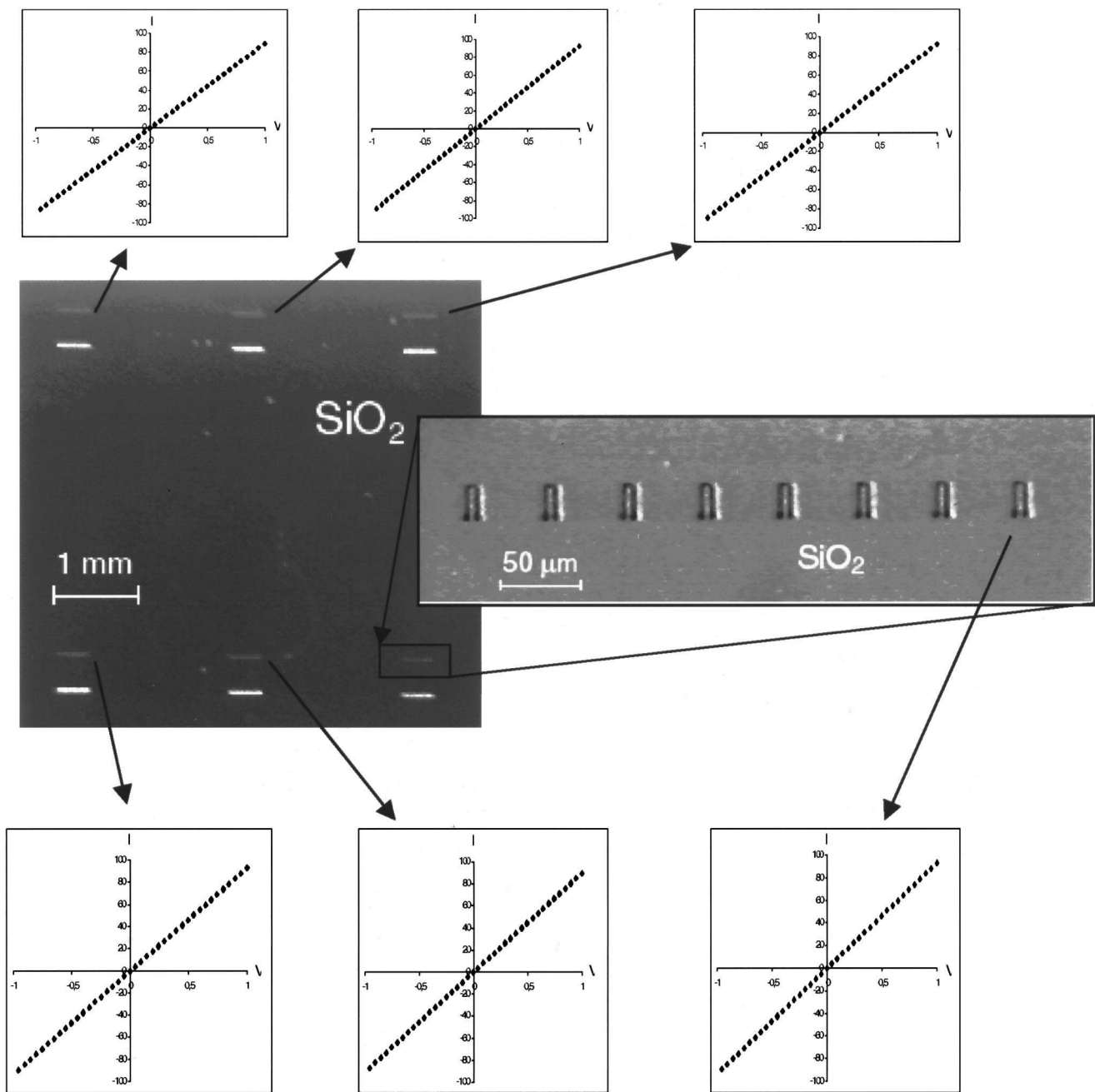


FIG. 6. Optical micrograph of a wafer with rows of mesoscopic wires $0.4 \mu\text{m}$ wide. Each of the 12 horizontal segments appearing in the image consists of eight wires with their $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ contact pads as shown in the inset. The $I(V)$ curves correspond to characteristics measured on one wire in every row. The values of the resistances are 11, 10.7, 10.8, 10.7, 10.8, and 11 $\text{k}\Omega$.

four resistances of a nano-Wheatstone bridge. The one presented on Fig. 7(a) is made of two nanotubes of different diameters (7 nm and 1.4 nm), the larger diameter one being a bundle of 1.4 nm single wall nanotubes.¹ This nanocircuit realizes a detuned Wheatstone bridge. Due to our ability to contact simultaneously at least four micropads, measurements can be performed on any of the nano-Wheatstone bridges found on the wafer using the AFM images. Furthermore, an advantage of our AFM microprobe array is that a given bridge can be imaged permanently during the electrical measurements. As reported in Ref. 1, the electrical resistance of a carbon nanotube can be changed by deforming the tube by AFM manipulations.¹³ Deformation of one branch of the

bridge thus opens the possibility to fulfill the bridge equilibrium conditions. While detuned, the potential difference V in the center of the bridge as a function of the driving current I is presented in Fig. 7(b) together with the corresponding circuit diagram.

In conclusion, we have assembled an AFM based electric microtester which is very well adapted for molecular devices. It combines the full nanoscale image capability of an AFM with an optical coarse approach, both well adapted to the nanotable which supports the wafer and to the metallic multiprobe array which fits under the AFM tip holder. It permits simultaneous imaging and electrical characterization of the large number of nanoscale devices that can be fabri-

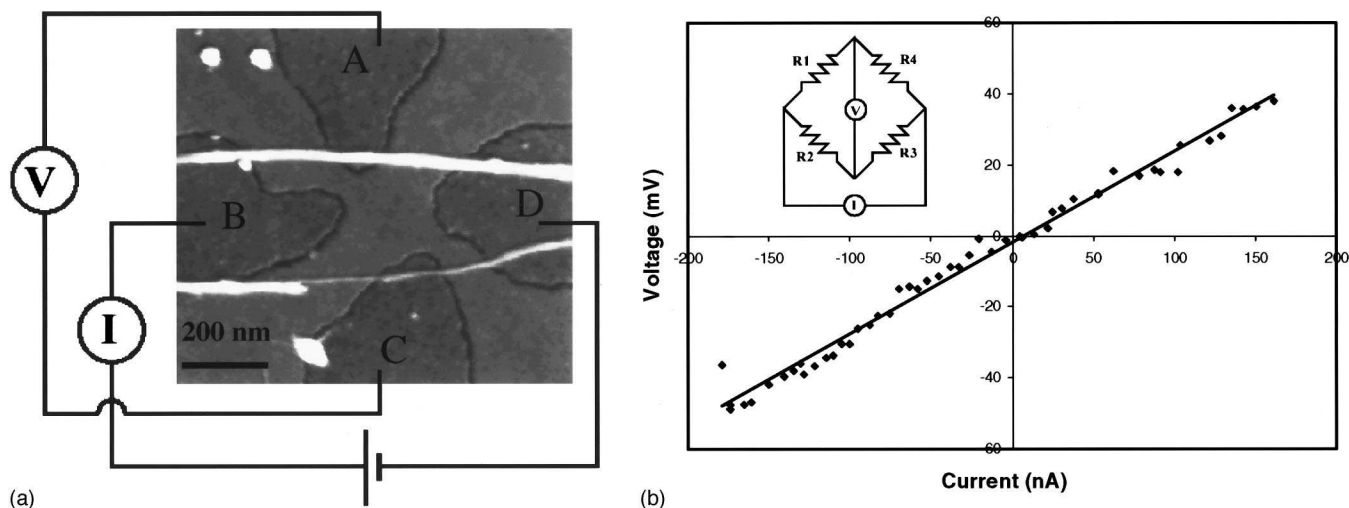


FIG. 7. (a) AFM image of a nano-Wheatstone bridge and schematic representation of the electrical circuit. The four electrodes ABCD are bridged by two nanotubes with diameters 7 nm and 1.4 nm for the upper and lower tubes, respectively. The current I is applied between electrodes B and D and the tension V is measured between electrodes A and C. (b) $I(V)$ characteristics measured on the nano-Wheatstone bridge following the electrical diagram schematized in the inset. The values of the resistances determined by 2-point measurements are $R_1 = 670 \text{ k}\Omega$, $R_2 = 16 \text{ M}\Omega$, $R_3 = 20 \text{ M}\Omega$, and $R_4 = 1.1 \text{ M}\Omega$. This gives a detuned bridge. Note that the $I(V)$ characteristics gives a resistance of $280 \text{ k}\Omega$ comparable with the value of $340 \text{ k}\Omega$ which is expected for a circuit with the 2-point measured resistances reported above.

cated per wafer. Further improvement of the system described in this article includes the fabrication of piezoelectric cantilevers arrays.¹⁴ Such cantilevers require no external detection sensor and will be used as individual active electrodes for intermittent electrical contact.

ACKNOWLEDGMENTS

This study is in part funded by the ‘‘Program Microsystèmes’’ of the CNRS. The authors also wish to thank the Mechanics and Electronics services of the CEMES for help in the conception and realization of the instrument. The carbon nanotubes were provided by A. Zahab (Groupe de Dynamique des Phases Condensées, University of Montpellier, France). The authors also thank Françoise Rossel and Véronique Conédéra and the entire staff of the clean room at the LAAS for helping us during the fabrication process.

¹C. Dekker, *Phys. Today* **52**, 22 (1999).

²C. Joachim, J. K. Gimzewski, and H. Tang, *Phys. Rev. B* **58**, 16 407 (1998).

³V. Rousset, C. Joachim, T. Ondarçuhu, and B. Rousset, *Eur. Phys. J. AP* **3**, 21 (1998).

⁴M. A. Reed, C. Zhou, C. J. Muller, T. P. Burgin, and J. M. Tour, *Science* **278**, 252 (1997).

⁵S. Gerdes, T. Ondarçuhu, S. Cholet, and C. Joachim, *Europhys. Lett.* **48**, 292 (1999).

⁶T. Ondarçuhu and C. Joachim, *Nanotechnology* **10**, 39 (1999).

⁷K. Birkelund, E. V. Thomsen, J. P. Rasmussen, O. Hansen, P. T. Tang, P. Moller, and F. F. Grey, *J. Vac. Sci. Technol. B* **15**, 2912 (1997).

⁸T. Ondarçuhu and C. Joachim, *Europhys. Lett.* **42**, 215 (1998).

⁹T. Yasue, H. Koyama, T. Kato, and T. Nishioka, *J. Vac. Sci. Technol. B* **15**, 614 (1997).

¹⁰C. A. Peterson, R. K. Workman, X. Yao, J. P. Hunt, and D. Sarid, *Nanotechnology* **9**, 331 (1998).

¹¹O. Tabata, R. Asahi, H. Funabashi, K. Shimaoka, and S. Sugiyama, *Sens. Actuators A* **34**, 51 (1992).

¹²*Nanostructure Physics and Fabrication*, edited by M. A. Reed and W. P. Kirk (Academic, London, 1989).

¹³T. Hertel, R. Martel, and Ph. Avouris, *J. Phys. Chem.* **102**, 910 (1998).

¹⁴E. Cattán, T. Haccart, G. Velu, D. Remiens, C. Bergaud, and L. Nicu, *Sens. Actuators A* **74**, 60 (1999).

Viscosity measurements based on experimental investigations of composite cantilever beam eigenfrequencies in viscous media

Christian Bergaud^{a)} and Liviu Nicu

LAAS/CNRS, 7 avenue du Colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex, France

(Received 15 November 1999; accepted for publication 4 February 2000)

Experimental investigations have been conducted to study the multimode dynamic response of composite cantilever beams in various viscous media and to determine their viscosity. Theoretical eigenfrequencies are computed using the analytical model proposed by Sader [J. Appl. Phys. **84**, 64 (1998)] based on the analysis of the hydrodynamic function of cantilever beams. A good agreement is found between theory and experiment for the first two resonant frequencies of composite beams operated in air and in water. The same experimental approach is used to determine the viscosity of ultrapure ethanol. Thus, it is established that Sader's model represents an accurate alternative for the determination of liquid viscosity in small volumes (about 50 μl) which might be of great importance for microfluidics applications. Finally, the limits of the method are underlined by monitoring the dynamic response of cantilever beams in silicon oil. © 2000 American Institute of Physics. [S0034-6748(00)00906-0]

I. INTRODUCTION

Since its invention by Binnig *et al.*,¹ the atomic force microscope (AFM) has become an essential tool for investigating samples in their native medium, especially for studies of biological matter.²⁻⁴ Operating this microscope with the cantilever and sample in liquid allows more realistic environment and nondestructive imaging of soft samples such as plasmid DNA on mica in water.^{3,5} Moreover, when the cantilever is fully immersed in liquid, capillary forces are dramatically reduced or even suppressed, thus enhancing image resolution.⁶ Nevertheless, submersion in a liquid environment considerably affects the mechanical response of cantilevers.⁷⁻¹² Because the sensitivity of the AFM directly depends upon the oscillatory behavior of the cantilever beam, an in-depth understanding of the main phenomena that govern vibrations in confined viscous fluids is essential.

When a structural component vibrates in a viscous fluid, the fluid significantly increases its effective mass and puts a damping contribution to its dynamic behavior. Hence, the eigenfrequencies of a structural component in a dense medium are considerably reduced compared to those in vacuum, while the oscillation amplitude is significantly damped. The study of added mass and fluid viscosity at the macroscale has attracted considerable attention since the early work of Stokes¹³ on fluid motion. Many configurations have been proposed (e.g., a sphere oscillating in a fluid,^{14,15} a rod surrounded by a fluid annulus¹⁶ or vibrating in confined viscous fluids,¹⁷ or a cylinder oscillating transversally in a fluid¹⁵) but all the theoretical approaches required solving the Navier–Stokes and continuity equations coupled with the motion equation specific to the structural component vibrating in the fluid.

More recently, knowledge and understanding of the os-

illatory motion of structural components in a viscous medium at the microscale have become fundamental from a practical point of view, particularly in application to the AFM.^{6,18} Several groups have published results on the frequency spectra of cantilever beams immersed in a fluid. To do so, they have relied on two different theoretical approaches: the equivalent spring-mass-damper system^{8,9,11,19} and the “hydrodynamic” functions methods.^{10,20,21} With the former approach, the cantilever beam is modeled as a moving sphere or a string of spheres of radius R .²² This model is valid for the first mode of resonance only, its extension to superior modes involving a complex analysis of the physical parameters that govern the dynamic phenomena.²³ With the hydrodynamic function approach, the real geometry of the cantilever vibrating into a viscous fluid is taken into account.²¹ Moreover, this method allows multimode analysis in the limit of small dissipative effects.

The aim of this article is to experimentally investigate the multimode dynamic response of composite cantilever beams in various viscous media. The shift between cantilever eigenfrequencies in liquids and in vacuum is then implemented in the hydrodynamic model developed by Sader²¹ to determine the liquid viscosity. Other workers proposed experimental methods to determine the viscosity of fluids using different theoretical models: the Ito and Nakazawa²⁴ model used by Inaba *et al.*⁷ in their photothermal vibration method or Chen *et al.*¹⁹ model implemented by Oden *et al.*⁸ to measure liquid viscosities using standard AFM cantilevers. Here, the experimental results presented are in good agreement with those derived from the analytical model proposed by Sader for composite cantilever beams vibrating in viscous fluids.²¹

The article is structured as follows. In Sec. II we describe the experimental setup and the sample preparation. Section III is devoted to theoretical considerations based on Sader's model.²¹ Then, the resonance spectrum of five dif-

^{a)}Electronic mail: bergaud@laas.fr

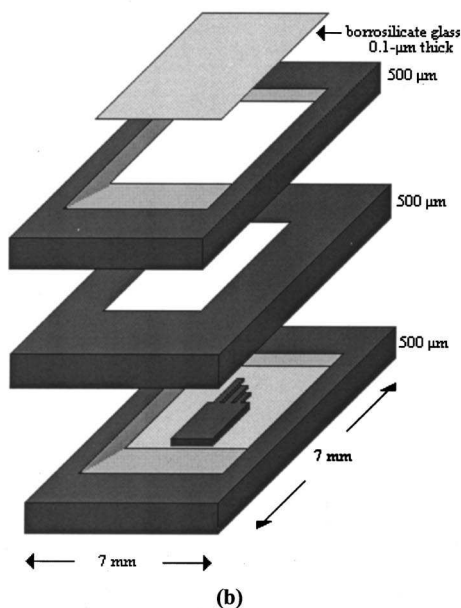
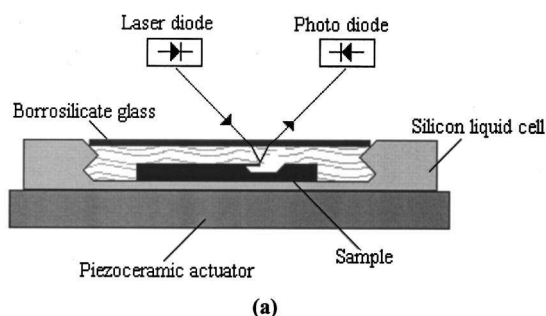


FIG. 1. (a) Schematic diagram of the homemade experimental setup used for the investigations of cantilever dynamic responses in viscous media. (b) Assembly diagram of the component parts of the silicon liquid cell.

ferent cantilevers in three different media (air, water, and ethanol) is presented along with discussions based on comparisons between theory and experiment. Finally, on the basis of measurements performed with silicon oil, the limit of the analytical model is emphasized in the case of major dissipative effects.

II. EXPERIMENTAL PROCEDURE

A. Samples and liquid cell preparation

Arrays of SiO_2 cantilever beams $40\ \mu\text{m}$ wide and 150 to $300\ \mu\text{m}$ long with a $50\ \mu\text{m}$ step were batch fabricated using surface and bulk micromachining techniques. The fabrication process has been described elsewhere.²⁵ In addition, all beams were coated with a $0.1\text{-}\mu\text{m}$ -thick gold layer by means of the evaporation technique.

To investigate the dynamic response of cantilevers in liquids, a cell that fits on the piezoceramic actuator of the experimental setup has been fabricated, as shown in Fig. 1(a). The cell is made of silicon. Its fabrication relies on 4 in. double-side polished (100) *p*-type silicon wafers $500\ \mu\text{m}$ thick. A $1\text{-}\mu\text{m}$ -thick silicon dioxide layer is thermally grown at $950\ ^\circ\text{C}$. On the front side of each wafer, square areas are defined by selectively removing the $1\text{-}\mu\text{m}$ -thick silicon dioxide. During the final step, these exposed areas are etched in a

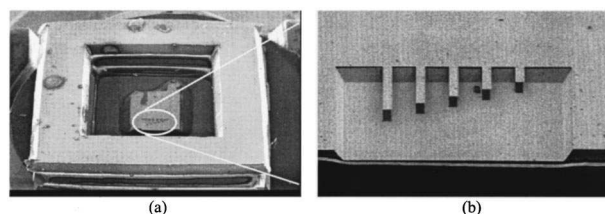


FIG. 2. SEM photograph of (a) an array of released composite $\text{SiO}_2\text{-Au}$ cantilever beams glued to the bottom of the silicon cell and (b) magnified image of the cantilever beam array.

22% TMAH solution at $90\ ^\circ\text{C}$ while the wafer back side is mechanically protected against etching by dedicated chucks made of teflon. Some wafers are etched through while for others the etching process is stopped before ending. The former ones are glued using an epoxy glue (Epotecny E505) in such a way as to obtain small reservoirs when assembled with the latter ones used as bottom parts as shown in Fig. 1(b).

Figure 2 shows a scanning electron microscope (SEM) photograph of an array of released composite $\text{SiO}_2\text{-Au}$ cantilever beams glued to the bottom of the silicon cell.

To record the frequency spectra of cantilever beams in liquids, a sample containing one array of five beams of different length is glued to the cell bottom and fully immersed into the liquid [Fig. 1(a)]. An ultrathin borrosilicate glass is placed onto the cell to avoid wave formation on the liquid surface that could affect the laser beam deflection.

B. Experimental setup

Resonant frequencies of the $\text{SiO}_2\text{-Au}$ composite cantilever beams were measured using the optical beam deflection (OBD) technique. For mechanical excitation, the silicon cell containing the cantilever beam array immersed into the liquid is carefully glued onto a 2-mm-thick 10-mm-diam circular piezoelectric actuator. Light from a diode laser (Melles Griot, 631.8 nm, 5 mW) is focused onto the sample via a microscope lens (Leitz, UMK 50/0.6) and reflected on a position-sensing quadrant photodetector (Hamamatsu, SGD-444A-4). The signal is amplified differentially and measured by a lockin amplifier (EG&G, 7260 DSP lockin amplifier) with a 250 kHz bandwidth. Resonant frequency measurements were carried out at ambient temperature in four different media: air, deionized water, ultrapure ethanol (Merck, 983), and silicone oil (Rhodorsil, 47V50).

III. THEORETICAL CONSIDERATIONS

As mentioned before, most studies on the dynamic motion of cantilever beams in viscous media are based on the spring-mass-damper approach. This model relies on the determination of the radius of the equivalent sphere from the experimental value of the quality factor for the first resonant mode in order to extend the study to higher harmonics. The limitations of this approach have been thoroughly discussed elsewhere.^{9,25}

In contrast, the hydrodynamic function approach relies on the exact geometry of the cantilever beam and there is no need for an experimental parameter to investigate higher har-

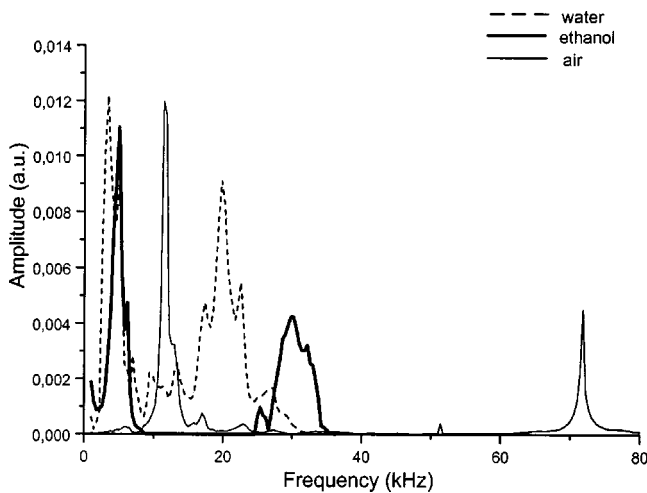


FIG. 3. Typical frequency response of a 250- μm -long composite SiO_2 -Au cantilever beam obtained by optical beam deflection technique showing the first two modes in air (—), ethanol (---), and water (· · ·).

monics. The study of the dynamic behavior of composite cantilever beams in air using Sader's model has already shown a good agreement between experiment and theory.²⁵ As a result, experimental investigations extended to the dynamic motion of microstructures in liquids through Sader's model, are presented in this article.

Sader has shown that for small dissipative effects, the resonant frequency of mode n in fluid $\omega_{f,n}$ is given by²¹

$$\omega_{f,n} = \omega_{v,n} \left(1 + \frac{\pi \rho_0 b^2}{4 \rho A} \text{real}[\Gamma(\omega_{f,n})] \right)^{-1/2}, \quad (1)$$

where $\omega_{v,n}$ is the resonant frequency of mode n in vacuum and $\text{real}[\Gamma(\omega_{f,n})]$ the real component of the hydrodynamic function $\Gamma(\omega)$ when ω stands for $\omega_{f,n}$.

From Eq. (1) it appears that the resonant frequency of mode n in fluid $\omega_{f,n}$ may be computed by knowing the resonant frequency of mode n in vacuum $\omega_{v,n}$, the density of the fluid ρ_0 , and the real component of the hydrodynamic function $\text{real}[\Gamma(\omega)]$.

It should be noted that Eq. (1) might be a valuable method for measuring the viscous properties of liquids by determining the shift between resonant frequencies of small cantilever beams in fluid and in vacuum. Nevertheless, one should be reminded of the limits of this model, particularly when the dissipative effects in the fluid become significant, as will be shown in the next section.

IV. RESULTS AND DISCUSSION

To experimentally investigate the model proposed by Sader for the vibration of rectangular cantilever beams in fluids, resonance spectra have been monitored for five different samples in four media. Figure 3 shows typical responses of a composite SiO_2 -Au cantilever beam. Measurements in air are performed with a piezoceramic actuator excitation of 0.5 V. As expected, when the cantilever beams are fully immersed in a liquid medium, resonant peaks tend to broaden reducing their amplitude and shifting toward lower frequencies. This is why the signal-to-noise ratio is dramatically reduced. In order to counter this, the excitation of the

piezoceramic actuator is increased to 4 V when operating the cantilever beams in fluids. Hence, the same order of resonance amplitudes is found in air, water, and ethanol, respectively. Nonetheless, increasing the excitation amplitude often causes nonlinear resonance phenomena that may disturb the detection of the cantilever beam eigenfrequencies. Therefore, experimental values of resonant frequencies were obtained from the phase transfers (i.e., 0° and -180° phase shift), rather than amplitude variations, as the former seemed less sensitive to nonlinear phenomena.

Also, when operating in liquid media, a very high amplitude "resonance plateau" occurs in the vicinity of the upper limit of the lockin amplifier bandwidth (250 kHz). Since in this frequency range, the sound wavelength (for example, about 6 mm in water at 250 kHz) is of the same order of magnitude as the silicon cell dimensions (surface equal to 5 mm \times 5 mm), acoustic waves must be excited in the liquids. This has already been observed by Kirstein *et al.*¹⁰ This is why frequency measurements have been restricted to the fundamental mode and first harmonic.

A. Air and water

A MATLAB²⁶ algorithm derived from the aforementioned theoretical study enables us to predict the position of the resonant peaks of the SiO_2 -Au composite cantilevers. For a composite beam made up of two materials, EI and ρA must be replaced by $EI_{\text{composite}}$ ²⁷ and $\rho_{\text{SiO}_2} A_{\text{SiO}_2} + \rho_{\text{Au}} A_{\text{Au}}$, respectively, when theoretical resonant frequencies are computed. Computation relied on a density $\rho_{\text{SiO}_2} = 2795 \text{ kg/m}^3$ and Young's modulus $E_{\text{SiO}_2} = 79 \text{ GPa}$ for the SiO_2 layer and a density $\rho_{\text{Au}} = 19\,300 \text{ kg/m}^3$ and Young's modulus $E_{\text{Au}} = 80 \text{ GPa}$ for the Au layer. Physical properties of the media have been assumed as follows: for air, $\rho_{\text{air}} = 1.2 \text{ kg/m}^3$ and $\eta_{\text{air}} = 1.8 \times 10^{-5} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and for water, $\rho_{\text{water}} = 1000 \text{ kg/m}^3$ and $\eta_{\text{water}} = 1.13 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at 20°C .

In addition to the theoretical results shown in Fig. 4, experimental data for the cantilever beam resonant frequencies in air and in water are displayed as well. A very good agreement is found between experiment and theory when taking into account the effect of the gold layer on the resonant frequencies while the discrepancy between theory and experiment can be quite significant (in excess of 20% for the first mode) when disregarding this effect.²⁸

In the event of vibrations in air, the resonant frequencies of the cantilever beams are almost identical to those encountered in vacuum (with an error of 2% or less) as pointed out by other workers.^{9,29} This is justified by the almost complete absence of added mass or viscosity effects when the beams are operated in air.

In water, Sader's model seems more relevant for longer cantilever beams since the relative error between experiment and theory never exceeds 8% (except for the second resonant mode in water for the 200- μm -long cantilever beam where the error is about 13%). In this medium, the added mass becomes a significant fraction of the total mass in dynamic motion because the fluid density is comparable to the effective density of the structure.³⁰ Moreover, viscous dissipative effects should be limited in the vicinity of the resonant

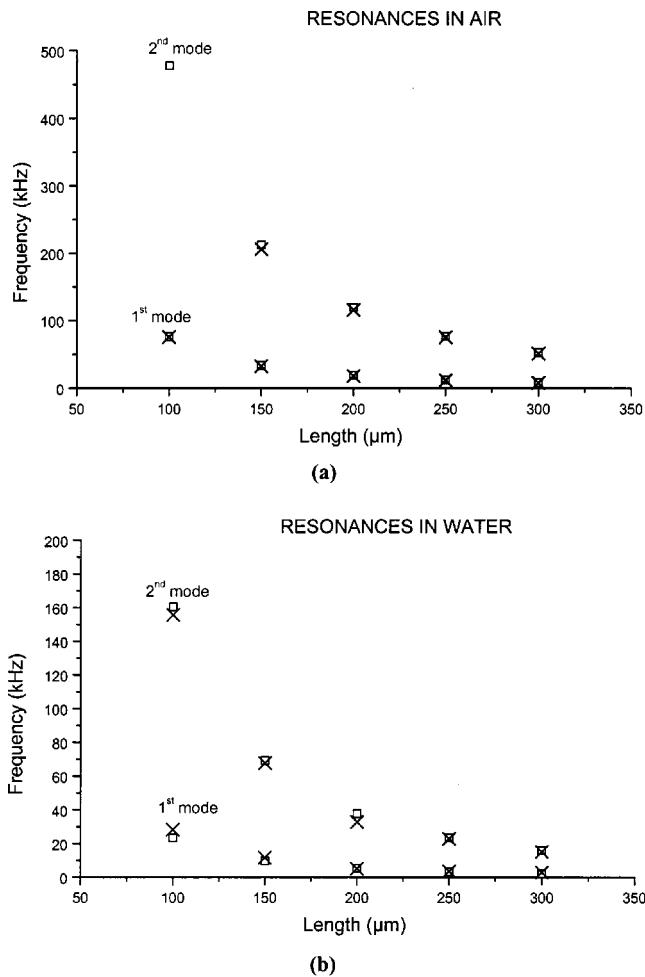


FIG. 4. Experimental and theoretical peak resonance vs cantilever length for the first two modes (a) in air and (b) in water. Each experimental point corresponds to an average of 10 experimental values (□—theoretical values, ×—experimental values).

peaks. This can be assumed after confirming that the imaginary component of the term

$$X = \left[1 + \frac{\pi \rho_{\text{water}} b^2}{4 \rho A} \Gamma(\omega_{n, \text{fluid}}) \right]^{1/4} \quad (2)$$

is far smaller than its real component—in our case, $\text{Re}(X)/\text{Im}(X) \approx O(10^2)$ for any beam length and resonant mode—knowing that the former highlights the viscous dissipative effects while the latter expresses the added mass effects.²¹ However, for smaller cantilevers, the viscous dissipative effects become increasingly important as the ratio l/b significantly decreases. This accounts for the discrepancy between theory and experiment for the 100- and 150-μm-long cantilever beams where the relative error is about 18% and 22%, respectively. Similar behaviors have been reported by Hirai *et al.*¹¹ even though the models used for calculating the theoretical resonant frequencies were the string of beads model²² and Ito and Nakazawa's model.²⁴ It is worth pointing out that the relative errors between experiment and theory when using Sader's model for cantilever beams vibrating in liquids are either much lower than those due to the application of other models^{9,11} or comparable with those computed by Kirstein *et al.*¹⁰

TABLE I. Experimental resonant frequencies for the first two modes in ethanol for composite SiO₂-Au cantilever beams with various lengths.

Length (μm)	$f_{1, \text{ethanol}}$ (kHz)	$f_{2, \text{ethanol}}$ (kHz)
100	26.0	177.1
150	10.9	76.8
200	5.4	42.6
250	3.6	26.3
300	2.3	18.0

As an intermediate conclusion, it can be assumed that Sader's model accurately predicts the position of the resonant peak frequency of a rectangular cantilever beam performing dynamic motion in a viscous medium.

B. Ethanol

To confirm this theory, cantilever beams have been operated in ultrapure ethanol the density of which is about $\rho_{\text{ethanol}} = 790 \text{ kg/m}^3$. Owing to the extreme volatility of ethanol, resonant spectra were acquired in a minimum amount of time. Thus, the silicon cell have been filled with liquid whenever a new cantilever resonant response has been monitored. It should be recalled that Fig. 3 shows a typical response of a composite SiO₂-Au 250-μm-long cantilever beam in ethanol. Table I lists the experimental resonant frequencies for the first two modes of composite SiO₂-Au cantilever beams.

In this case, the experimental approach was different, i.e., the experimental resonant frequencies values were entered in Eq. (1) to determine the ethanol viscosity. Figure 5 shows the value of the ethanol viscosity as a beam length function for the first two resonant frequencies. An average ethanol viscosity of $1.05 \pm 0.31 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ is obtained by Sader's model²¹ applied to the vibration of rectangular composite SiO₂-Au cantilever beam into a liquid medium.

Based on these results, several remarks can be made. First, there is a good agreement between the experimental average viscosity and the one specified by the ethanol sup-

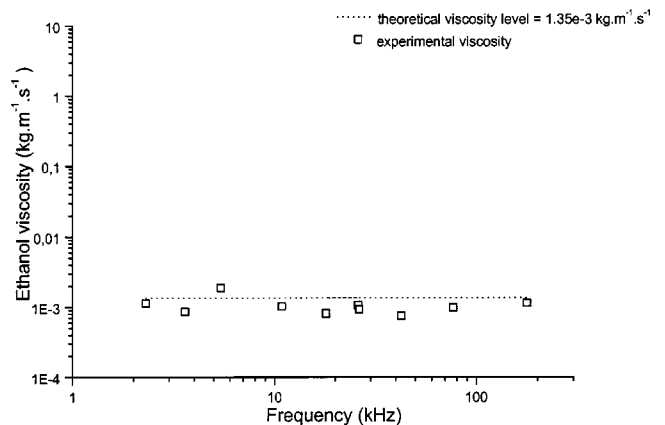


FIG. 5. Experimental ethanol viscosity vs peak resonance for the first two modes. The overlapping viscosity values in the vicinity of 25 kHz are due to the similarity between the fundamental measured resonant frequency of the 100-μm-long cantilever beam ($f_{1,100 \mu\text{m}} = 26 \text{ kHz}$) and the first harmonic measured resonant frequency of the 250-μm-long cantilever beam ($f_{2,250 \mu\text{m}} = 26.3 \text{ kHz}$).

plier (about $1.35 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$). This means that Sader's theoretical model²¹ might represent an accurate alternative for the determination of liquid viscosity. Nevertheless, it should also be noted that a relative error of $n\%$ on the measurement of the cantilever beam resonant frequency systematically leads to a relative error of $10n\%$ for the experimental viscosity. Thus, the experimental determination of the viscosity by means of this method requires a rigorous calibration of the experimental configuration (optical beam deflection setup, cantilever beams, and liquid cell). Moreover, Sader's model, as applied here, features a major limit, i.e., the magnitude of dissipative effects in viscous media under study must be small enough, as explained in the following section.

C. Silicon oil

To gain insights into the role played by the dissipative effects, the cantilever beams have been immersed in silicon oil (Rhodorsil) of density $\rho_{\text{oil}} = 959 \text{ kg/m}^3$ and viscosity $\eta_{\text{oil}} = 5 \times 10^{-2} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$. For all cantilever beams vibrating in silicon oil, a resonance plateau domain of very high amplitude appears between 110 and 220 kHz while there are no resonant phenomena below 110 kHz even though the drive voltage of the piezoceramic actuator is set to 5 V. The lack of resonant phenomena between 0 and 110 kHz might be due to the increase in dissipative effects when operating the cantilever beams in oil. In addition, the theoretical ratio $\text{Re}(X)/\text{Im}(X)$ (see Sec. IV A) computed in the vicinity of the theoretical resonant peaks was found to be about $O(1)$ which confirms the increase in dissipative effects in the silicon oil used. Hence, the added mass effects are enforced by the dissipative ones and the eigenfrequencies of cantilever beams become undetectable. To overcome this limitation, other dimensions or geometry of cantilever beams must be aimed at in order to reduce dissipative effects. However, care must be taken to gather together all hypotheses (particularly, the condition of small dissipative effects) that allow the Sader's model²¹ to be used for the experimental purposes presented here.

Finally, the main qualitative limitation of this viscosity measurement method is that the experimental setup based on optical monitoring requires transparent liquids. To overcome this drawback, work is being conducted with piezoelectric and piezoresistive detection cantilever beams in order to perform an *in situ* dynamic analysis regardless of the liquid transparency.

- ¹G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930 (1986).
- ²D. Anselmetti, M. Dreier, R. Lüthi, T. Richmond, E. Meyer, J. Frommer, and H. J. Güntherrodt, *J. Vac. Sci. Technol. B* **12**, 1500 (1994).
- ³M. Q. Li, H. G. Hansma, G. F. Hong, X. W. Yao, and P. K. Hansma, *J. Vac. Sci. Technol. B* **12**, 1465 (1994).
- ⁴P. C. Hallett, G. W. Offer, L. Tschovrebova, J. Trinick, and M. J. Miles, *J. Vac. Sci. Technol. B* **14**, 1472 (1996).
- ⁵P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Curley, and V. Elings, *Appl. Phys. Lett.* **64**, 1738 (1994).
- ⁶B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. C. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma, and P. K. Hansma, *Science* **243**, 1586 (1989).
- ⁷S. Inaba, K. Akaishi, T. Mori, and K. Hane, *J. Appl. Phys.* **73**, 2654 (1993).
- ⁸P. I. Oden, G. Y. Chen, R. A. Steele, R. J. Warmack, and T. Thundat, *Appl. Phys. Lett.* **68**, 3814 (1996).
- ⁹D. A. Walters, J. P. Cleveland, N. H. Thomson, P. K. Hansma, M. A. Wendman, G. Gurley, and V. Elings, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 3583 (1996).
- ¹⁰S. Kirstein M. Mertesdorf, and M. Schönhoff, *J. Appl. Phys.* **84**, 1782 (1998).
- ¹¹Y. Hirai, R. Mori, H. Kikuta, N. Kato, K. Inoue, and Y. Tanaka, *Jpn. J. Appl. Phys., Part 1* **37**, 7064 (1998).
- ¹²R. Patois, P. Vairac, and B. Cretin, *Appl. Phys. Lett.* **75**, 295 (1999).
- ¹³G. G. Stokes, *Proc. Cambridge Philos. Soc.* **8**, 105 (1843).
- ¹⁴N. L. Ackermann and A. Arbhahirama, *J. Eng. Mech. Div.* **90**, 123 (1964).
- ¹⁵L. D. Landau and E. M. Lifshitz, *Fluid Mechanics* (Pergamon, Oxford, 1975).
- ¹⁶R. J. Fritz, *J. Basic Eng.* **92**, 923 (1970).
- ¹⁷S. S. Chen, M. W. Wambsganss, and J. A. Jendrzejczyk, *J. Appl. Mech.* **315** (1976).
- ¹⁸C. A. J. Putman, K. O. Van der Werf, B. G. de Groth, N. F. van Hulst, and J. Greve, *Appl. Phys. Lett.* **64**, 2454 (1994).
- ¹⁹G. Y. Chen, R. J. Warmack, T. Thundat, D. P. Allison, and A. Huang, *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 2531 (1994).
- ²⁰F. J. Elmer and M. Dreier, *J. Appl. Phys.* **81**, 7709 (1997).
- ²¹J. E. Sader, *J. Appl. Phys.* **84**, 64 (1998).
- ²²K. Kokubun, M. Hirata, H. Murakami, Y. Toda, and M. Ono, *Vacuum* **34**, 731 (1984).
- ²³H. Hosaka, K. Itao, and S. Kuroda, *Sens. Actuators A* **49**, 87 (1995).
- ²⁴H. Ito and M. Nakazawa, *Trans. Inst. Electron. Commun. Eng. Jpn., Part A* **J71-A**, 1069 (1988).
- ²⁵C. Bergaud, L. Nicu, and A. Martinez, *Jpn. J. Appl. Phys., Part 1* **38**, 6521 (1999).
- ²⁶MATLAB Software 1998 version 5.2.0, The MathWorks, Inc. (unpublished).
- ²⁷R. J. Roark and W. C. Young, *Formulas for Stress and Strain*, 6th ed. (McGraw-Hill, New York, 1989).
- ²⁸J. E. Sader, I. Larson, P. Mulvaney, and L. R. White, *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 3789 (1995).
- ²⁹H. J. Butt, P. Siedle, K. Seifert, K. Fendler, T. Seeger, E. Bamberg, A. L. Weisenhorn, K. Goldie, and A. Engel, *J. Microsc.* **169**, 75 (1993).
- ³⁰C. M. Harris, *Shock and Vibration Handbook*, 4th ed. (McGraw-Hill, New York, 1996), p. 29.1.

Fabrication of biological microarrays using microcantilevers

P. Belaubre, M. Guirardel, and G. Garcia

LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex 4, France

J. B. Pourciel

LIMMS-CNRS/IIS, Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, 4-6-4 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505, Japan

V. Leberre, A. Dagkessamanskaia, E. Trévisiol, and J. M. François

Plateforme Transcriptome, Genopole de Toulouse, INSA/DGBA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4, France

C. Bergaud^{a)}

LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex 4, France

(Received 9 December 2002; accepted 11 February 2003)

Arrays of silicon-based microcantilevers with properly designed passivated aluminum electrodes have been used to generate microarrays by depositing microspots of biological samples using a direct contact deposition technique. The approach proposed here can be compared to the dip-pen technique but with the noticeable difference that electrostatic fields are generated onto the cantilevers to increase the height of liquid rise on the cantilever surface when dipping them into the liquid to be deposited. Both electrowetting through the reduction of the contact angle and dielectrophoresis through electrostatic forces can be used to favor the loading efficiency. These phenomena are particularly pronounced on the microscale due to the fact that physical scaling laws favor electrostatic forces. Moreover, at this scale, conductive heat dissipation is enhanced and therefore joule heating can be minimized. Using this approach, with a single loading, arrays of more than a hundred spots, from the femtoliter to the picoliter range, containing fluorescent-labeled oligonucleotides and proteins were directly patterned on a glass slide. © 2003 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.1565685]

Microarray assays are a major breakthrough which has revolutionized the biomedical industry. Indeed, they made possible the fusion between genome research and drug discovery which in turn has provided highly accurate detection methods, faster analytic processes, and rapid gene expression monitoring.

All technologies used to manufacture microarrays include photolithography,¹ ink-jetting,² mechanical microspotting,^{3,4} and derivatives thereof. Photolithographic DNA synthesis allows production of high-density oligonucleotides microarrays in terms of the number of spots deposited per square centimeter. To produce microarrays with low and medium densities, two main alternatives based on delivering presynthesized oligonucleotides have been developed: mechanical microspotting using a direct contact between the deposition tool and the surface and a noncontact method such as ink-jetting.

Recently, the demand for massive production, lower costs, and improved performance in terms of speed and sensitivity, has led to the development of promising approaches based mainly on micro- and nanotechnologies.^{5,6}

State-of-the-art ink-jet printing techniques allows minimum feature sizes in the micrometer scale and examples in the literature have demonstrated the compatibility of such an approach with silicon-based micro- and nanotechnologies for the manufacture of high-quality microarrays.⁷ To reach the subfemtoliter scale in terms of the volume delivered on a flat surface, that is, to deliver spots with submicrometer sizes,

the contact method seems to be the most adequate. In this respect, it has recently been demonstrated that oligonucleotide and protein nanoarrays with submicrometer features could be generated using the dip-pen nanolithography (DPN).^{8,9}

In this letter, a microcantilever-based dispensing technique is presented to deposit picoliter biological samples using a contact method.

The approach relies on an improved dip-pen lithography not in terms of spot size (our microarrays were fabricated with micrometer features whereas with the DPN one could reach the submicrometer scale),⁹ though it could easily be decreased using similar cantilevers with a sharp tip, but in terms of liquid loading efficiency. Indeed, passivated aluminum electrodes properly designed and located along the channels and reservoirs on the cantilevers permit an active control of the height of the liquid rise on the cantilevers that improves the loading efficiency when they are immersed into the biological solutions to be deposited. This approach is also particularly interesting since these cantilevers can easily be cleaned and therefore dipped into different solutions without significant cross contamination. This also circumvents the need for replacing the cantilevers for depositing various solutions as is the case with the dip-pen nanolithography¹⁰ and makes this technique really efficient for generating high-density biological microarrays. Another salient feature is that microcantilever arrays are used in parallel, thereby enhancing throughput and speed.

The technological process developed for fabricating the microcantilevers is based on conventional microfabrication techniques.

^{a)}Electronic mail: bergaud@laas.fr

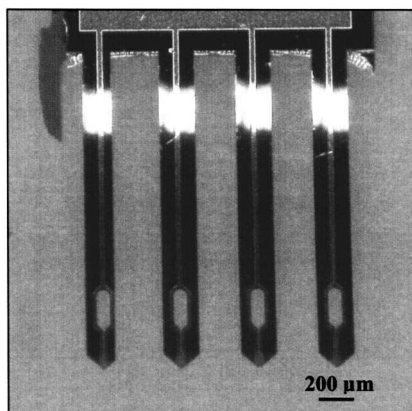


FIG. 1. Array of four cantilevers with passivated aluminum electrodes properly designed for electrowetting. The cantilevers are 2 mm long, 210 μm wide, 5 μm thick with a 450 μm spacing.

Arrays of cantilevers (2 mm long, 210 μm wide, 5 μm thick) with a 450 μm spacing were fabricated. Figure 1 shows an array of four cantilevers with passivated or non passivated aluminum electrodes located along 5 μm wide channels and reservoirs. These arrays are then used within the framework of a computer-controlled three-axis translation stage supplied by Sigma Koki that allows precise positioning of the cantilevers relative to the surface.

During the experimental procedure, an electrostatic field is used to improve the loading efficiency of the microchannels. Both electrowetting through the reduction of the contact angle¹¹ and dielectrophoresis through electrostatic forces¹² can be used to increase the height of liquid rise on the cantilever surface. This approach was retained because as the size of the microstructures becomes smaller their surface wettability can be rather poor even when using hydrophilic surfaces especially with high-aspect ratio narrow features such as microchannels. Moreover, at the microscale, due to the fact that physical scaling laws favor electrostatic forces, effects of electrostatic phenomena on liquid behavior are more pronounced. In addition, associated crippling features

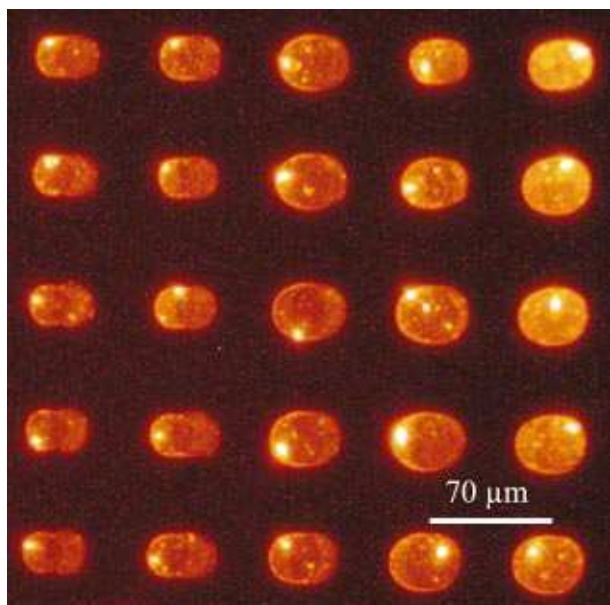


FIG. 2. (Color) Fluorescence image of spots obtained with a solution containing Cyanine3-labeled oligonucleotides (15 mers) deposited on a glass slide.

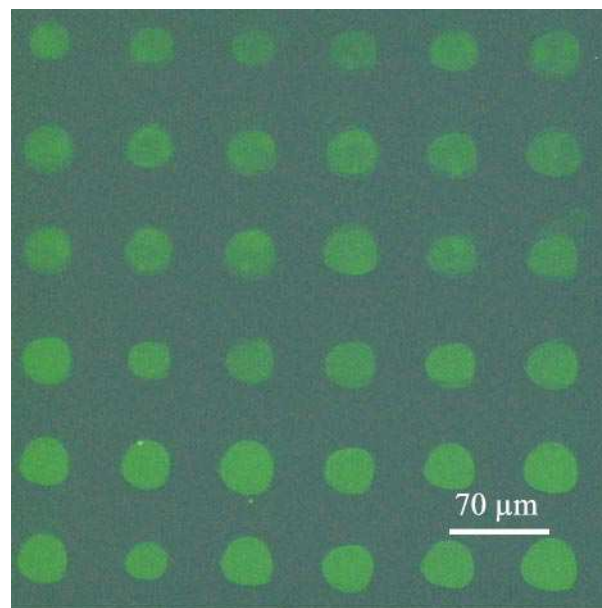


FIG. 3. (Color) Resulting protein microarray after interaction between anti-goat IgG (rabbit) and fluorescein conjugated purified antirabbit IgG.

such as joule heating and electrolysis can be drastically reduced on the micrometer scale.

Experimentally, a micropipette is used to deposit a droplet containing the biological sample on a conductive surface. When the end of the microcantilevers is dipped into the droplet, an electric field is applied (10 V during 10 s) between the passivated aluminum electrodes on the cantilevers and the conductive surface on which the droplet has been deposited. The aim was to apply the low voltage just long enough to have the liquid spread up on the cantilever surface. Thus, both electrolysis and joule heating were minimized. When applying the voltage between the liquid and the passivated electrodes on the cantilevers, electrowetting occurs because the electric field changes the charge distribution on the surface causing the liquid to spread and wet the surface of the passivated layer thereby filling the microchannels and microreservoirs.

To improve loading efficiency, an ac voltage (10 V during 10 s at 20 kHz) can be also applied between the two electrodes on the cantilevers immersed in the liquid which is not grounded. In this case, an electromechanical height-of-rise due to electrostatic forces is the main phenomenon.¹³

Whatever the configuration used, these prewetted cantilevers are then moved onto the surface where the spots are to

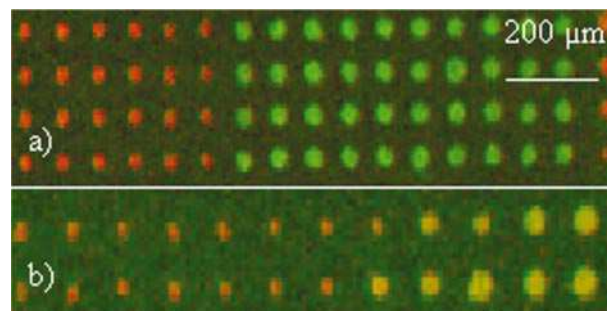


FIG. 4. (Color) Deposition of two different solutions with the same cantilevers: (a) Oligonucleotides (15 mers) spots labeled with Cyanine3 (green) and Cyanine5 (red) using the cleaning procedure: no crosscontamination can be observed. (b) Same experiment without the cleaning procedure: crosscontamination is clearly visible.

be deposited with the three-axis stage with a maximum translation of 200 mm and a positioning precision of 50 nm. All experiments were performed under an ambient condition with a relative humidity of $\sim 30\%$ and a temperature of $\sim 23^\circ\text{C}$ using a charge coupled device (CCD) camera to supervise the whole experiment.

In a preliminary experiment, prewetted silicon-based microcantilevers have been used to deposit picoliter volumes of a solution containing cyanine3-labeled oligonucleotides (15 mers) on a glass slide. Figure 2 shows a fluorescence image of spots deposited on a glass slide. Spots $30\ \mu\text{m}$ in diameter with a $70\ \mu\text{m}$ center-to-center spacing have been obtained by bringing the cantilevers into very gentle contact with the glass surface. It takes approximately 5 min to generate a hundred spot matrix with a single load. During spotting, oligonucleotides are covalently attached to the glass surface by optimized crosslinkers (dendrimer molecules) that react with the amino group on the surface and the fluorescent-labeled oligonucleotide probes. Images were acquired with the Olympus IX70 inverted microscope equipped with a numeric camera. As can be seen in Fig. 2, the shape of the resulting spots is more or less oval due to the fact that they have been obtained without accurately controlling the contact force. Indeed, the deflection of the cantilevers in contact with the surface was controlled optically with the CCD camera. Thus, the deflection could be monitored within the micrometer range leading to an applied force of about 100 nN. Indeed, with a spring constant of about 0.1 N/m, under increasing the contact force, cantilevers tend to bend or buckle and sometimes slip with excessive applied force.

In a second experiment, using the same procedure, protein microarrays have also been generated on a glass slide coated with dendrimer molecules as crosslinkers. The printed protein is the purified antgoat IgG (rabbit) from Rockland (Ref. 605-4102) used in phosphate-buffered saline (PBS) buffer with 40% glycerol. Glycerol was added to prevent evaporation and keep the protein hydrated and activated. The slide was left at room temperature during 3 h and later immersed in a PBS buffer containing 1% bovine serum albumin during 1 h. This reduces the nonspecific binding of other proteins in subsequent steps on unpatterned glass surface. After a brief wash in PBS buffer, the slide was incubated with the second protein, fluorescein conjugated purified anti-rabbit IgG from Rockland (Ref. 611-7202). The interaction between the two proteins was then observed with the inverted microscope. Figure 3 shows the resulting protein microarray where $30\ \mu\text{m}$ diameter spots were obtained with a contact time of 1 s.

To fabricate biological microarrays, a crucial feature required for our system is its ability to deposit various biological samples with the same cantilevers without the need to replace them for each sample as it is the case for the dip-pen nanolithography. Here, the strategy was to adapt the conventional cleaning and drying procedures used with a commercial DNA or protein microspotter. As a consequence, positioning the cantilevers with respect to previously deposited spots on the surface is straightforward since no alignment marks are needed. Moreover, the positioning resolution of the XYZ stage is about 50 nm along the three axis after a mechanical motion to load biological materials for

deposition.¹⁴

Two different biological samples, one containing CY3 fluorescent labels, the other containing CY5 fluorescent labels, have been deposited with the same cantilevers through the optimization of a cleaning, rinsing, and drying procedure. The different steps involved in this procedure consist in dipping the cantilevers into pure distilled water and agitating them. These cantilevers were then positioned onto a Peltier dryer at a temperature of 70°C . These steps were repeated two times before loading the second biological sample. 40 spots of each sample were deposited with a single load before cleaning the cantilevers and loading the next biological sample.

As shown in Fig. 4 where the cleaning procedure has been used three times successively, reproducible experiments show no cross contamination between CY3 and CY5 solutions. It takes about 10 min to deposit in parallel the two matrixes of 4×40 spots, including drying and loading procedures. On the other hand, when the same deposition procedure is performed without properly cleaning the cantilevers, crosscontamination of samples could not be avoided.

In conclusion, the results demonstrate that our system could be used to produce high-density DNA and protein chips. Improvements are still needed, however, with respect to contact force control and cantilever design to reach the submicrometer level and, therefore, the femtoliter range in terms of amount of liquid deposited on the surface. Accurate control within the nanonewton range could be achieved using arrays of these cantilevers with an integrated piezoresistive detection.

It should be added that this approach is fully compatible with a noncontact deposition technique if an electric field is applied between nonpassivated electrodes along the microchannels on the microcantilevers and a conductive layer. This noncontact method could be improved further to meet the requirements of use as an electrospray technique¹⁵ provided operating conditions allow disintegration of the jet into charged droplets (ionization). Experiments with optimized microcantilevers are underway.

¹S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. Tsai Lu, and D. Solas, *Science* **251**, 767 (1991).

²A. Blanchard, R. J. Kaiser, and L. E. Hood, *Biosens. Bioelectron.* **11**, 687 (1996).

³M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, *Science* **270**, 467 (1995).

⁴M. Schena, R. A. Heller, T. P. Theriault, K. Konrad, E. Lachenmeier, and R. W. Davis, *Trends Biotechnol.* **16**, 301 (1998).

⁵T. Laurell, L. Wallman, and J. Nilson, *J. Micromech. Microeng.* **9**, 369 (1999).

⁶I. Papautsky, J. Brazzle, H. Swerdlow, and A. Frazier, *IEEE J. Electromechanical Systems* **7**, 267 (1998).

⁷T. Okamoto, T. Suzuki, and N. Yamamoto, *Nature Biotechnology* **18**, 438 (2000).

⁸L. M. Demers, D. S. Ginger, S. J. Park, Z. Li, S. W. Chung, and C. A. Mirkin, *Science* **296**, 1836 (2002).

⁹K. I. Lee, S. J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, and M. Mrksich, *Science* **295**, 1702 (2002).

¹⁰S. Hong, J. Zhu, and C. A. Mirkin, *Science* **286**, 523 (1999).

¹¹J. Fowler, T. Schoellhammer, J. Lee, H. Moon, and C. Kim, *Sens. Actuators A* **95**, 256 (2002).

¹²T. D. Jones, M. Gunji, M. Washizu, and M. J. Feldman, *J. Appl. Phys.* **89**, 1441 (2001).

¹³T. D. Jones, *Langmuir* **18**, 4437 (2002).

¹⁴SIGMA KOKI CO. Ltd. <http://www.sigma-koki.com/english/>.

¹⁵V. N. Morozov and T. Y. Morozova, *Anal. Chem.* **71**, 15 (1999).

Mechanical effect of gold nanoparticles labeling used for biochemical sensor applications: A multimode analysis by means of SiNx micromechanical cantilever and bridge mass detectors

D. Saya,^{a)} L. Nicu, M. Guirardel, Y. Tauran, and C. Bergaud
LAAS-CNRS, 7 avenue du Colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex 4, France

(Received 16 December 2004; accepted 21 June 2004; published 14 September 2004)

The effect on mechanical properties of monolithic SiNx micromechanical cantilever and bridge by the adsorption of gold colloids is reported by measuring their resonance frequency shifts. It is experimentally demonstrated that higher resonance modes are more sensitive to the added mass than the fundamental resonance mode leading to increased sensitivity. This is even more significant with monolithic SiNx bridge resonators due to the tensile stress within the SiNx layer. Indeed, resonance frequencies are about ten times higher than calculation without taking into account the tensile stress which was estimated at 500 MPa. Another important result is that the adsorbed colloids do not produce significant change in the stiffness of the SiNx micromechanical resonators. Hence, it is pointed out that only the added mass of Au colloid contributes to the change in the mechanical characteristics of the resonators. Sensitivities up to 20 Hz/pg can be obtained with a minimum detectable density of gold colloids about 2.6×10^{-2} nanoparticles/ μm^2 . © 2004 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.1785849]

I. INTRODUCTION

A number of recent experiments have been conducted to detect specific biomolecular interactions using microcantilevers in both static and dynamic modes.¹⁻⁶ In practice, the cantilever surface is functionalized with receptor molecules. The binding of target molecules with receptor molecules induces a surface stress or a mass loading that causes a static bending of the microcantilever or a frequency shift in dynamic mode. By detecting the nanomechanical motion of the cantilever, specific biomolecular interactions can be recognized with an extremely high sensitivity. Interestingly, it supports parallel detection with enhanced sensitivity resulting from the miniaturization of the mechanical part. Detection of biomolecular interaction using a microcantilever does not require a fluorescent label, which is often used in state-of-the-art biosensors. Fluorescent labeling is expensive and suffers from photobleaching. In addition, its detection is performed only by a sophisticated optical reader system. These disadvantages make it difficult to address high sensitivity and miniaturization.

Colloidal gold labeling is becoming an alternative to fluorescent labeling with the advantages of highly stable conjugation and the possibility of several detection methods.^{7,8} It has been demonstrated that the conjugation of biomolecules such as DNA, antibody, proteins onto Au colloids greatly enhances the sensitivity of several types of biosensors thanks to their optical and electrical properties.⁷⁻¹¹ This approach also proves particularly useful with quartz crystal microbalance¹² or microcantilever¹³ to increase mass loading through the added mass induced by the presence of Au colloids with the target biomolecules.

Resolutions in the femtogram range can readily be achieved using microcantilevers as resonant mass sensors.^{6,14,15} The mass sensitivity can be further increased by reducing the cantilever size since smaller cantilevers have a higher resonance frequency.¹⁶ However, miniaturization of the cantilever is a challenge because it calls for the development of dedicated nanofabrication techniques. Moreover, the measuring vibration of small structures can be highly cumbersome. To overcome this problem, Kim and co-workers have developed silicon bridge resonators as mass sensors to secure a higher sensitivity since a bridge exhibits higher resonance frequencies than the same size cantilever.¹⁷ This approach was also used by Kakushima and co-workers who also employed silicon bridge resonators operating at an increased resonance frequency by inducing a tensile stress through boron doping.¹⁸

In this article, we investigate how gold colloid adsorption impacts the dynamic mode properties of micromechanical structures when colloids are used to enhance mass loading during biomolecular interactions. We already investigated the detection of Au colloid in liquid using micromachined micromembranes with a piezoelectric actuator.¹⁹ Here, instead of piezoelectric membranes, monolithic SiNx cantilevers and bridges were employed as resonators. We investigate not only the fundamental resonance frequency but also the second and third resonance frequency in order to determine the resonance frequency shift caused by the adsorption of Au colloids at higher modes.

II. THEORETICAL ANALYSIS

A. Mass sensitivity

The n th mode resonance frequency of the cantilever and bridge is generally expressed as follows:

^{a)}Electronic mail: saya@laas.fr

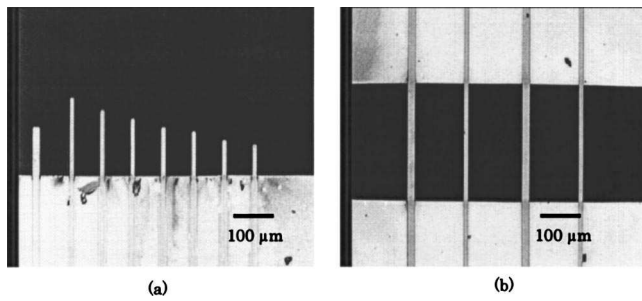


FIG. 1. Optical microscope images of SiNx: (a) cantilevers and (b) bridges.

$$f_n = \frac{\nu_n^2 t}{2\pi L^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}}, \quad (1)$$

where t is thickness, L is length, E is Young's modulus, and ρ is density.

The eigenvalues ν_n of the first, second, and third mode are 1.875, 4.694, and 7.855, respectively, for the cantilever. For a bridge resonator, we get 4.730, 7.853, and 11.00, respectively.

The sensitivity of the mass detection is given by the following equation:²⁰

$$\frac{\Delta f_n}{\Delta m} \cong -\frac{1}{2} \frac{f_n}{M_{\text{effective}}}, \quad (2)$$

where Δf_n is resonance frequency shift, Δm is added mass, and $M_{\text{effective}}$ is effective mass of resonator.

Thus, for a more sensitive mass detection, a higher resonance frequency of the resonator is required. This can be achieved by observing higher resonance modes or by means of the bridge resonator which has a higher resonance frequency than the cantilever with the same geometrical size. The resonance frequency shift Δf_n , due to an added mass Δm , is proportional to the original value of the resonance frequency f_n .

Yi *et al.*²⁰ have shown, by considering a point mass Δm on the top of the cantilever, that the mass sensitivity $\Delta f_n/\Delta m$ is inversely proportional to the width w of the cantilever as depicted in Eq. (3)

$$\Delta f \propto \frac{\nu_n^2}{L^3 w} \Delta m. \quad (3)$$

If the density of the distributed added mass on the cantilever surface is considered, as is often the case in biological analysis, Eq. (3) can be rewritten as

$$\Delta f \propto \frac{\nu_n^2}{L^2 n} \quad (4)$$

where $n = \Delta m/Lw$, n is density of the distributed mass, and Δm is total mass on the surface.

Thus, the resonance frequency shift Δf_n depends on the length of the resonator only and is proportional to $1/L^2$ by considering the density of the distributed mass. In both cases, the resonance frequency shift is independent of the resonator thickness.

With respect to the distributed mass on the resonator, cantilever, and bridge, the effect of the spring constant

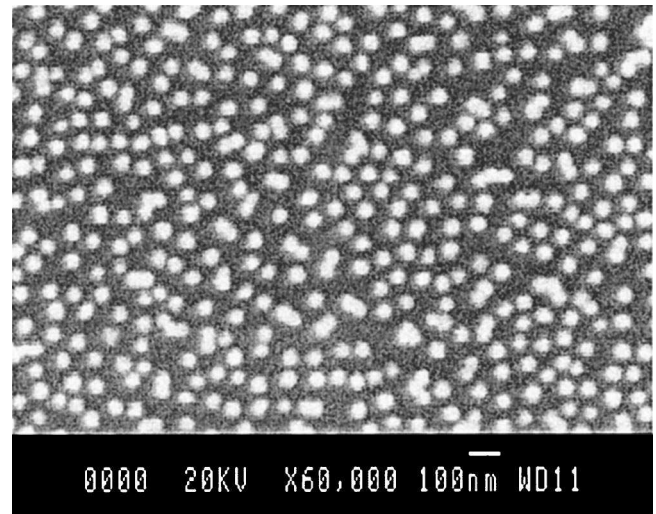


FIG. 2. SEM image of Au colloids adsorbed on the surface. Density of the adsorbed Au colloid is 150 particles/ μm^2 .

change Δk that can be induced by the adsorbed layer can affect the resonance frequency shift. In this case, this can be described by means of the following equation:²¹

$$\Delta f_n \cong \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{M_{\text{effective}}} \right) f_n. \quad (5)$$

Thus, the spring constant change induced by the adsorption of distributed Au colloid can be calculated.

B. Effect of stress in SiNx bridge resonator

Calculations of the resonance frequencies for a bridge resonator with and without tensile stress are effected using the Rayleigh–Ritz method.²² The effective spring constant of bridge without stress can be written as

$$k_{\text{bridge}} = \frac{EI}{L^3} \int_0^1 \left(\frac{d^2}{dx^2} \phi(x) \right)^2 dx, \quad (6)$$

where $\phi(x)$ is modal transverse displacement, and I is moment of inertia.

Whereas the effective spring constant of the bridge with stress can be written as

$$k_{\text{bridge stress}} = \frac{EI}{L^3} \int_0^1 \left(\frac{d^2}{dx^2} \phi(x) \right)^2 dx + \frac{F}{L} \int_0^1 \left(\frac{d}{dx} \phi(x) \right)^2 dx, \quad (7)$$

where F is axial force, $F = \sigma(1-\nu)tw$, σ is residual stress, and the effective mass of the bridge is

$$M_{\text{eff-bridge}} = \rho wtL \int_0^1 [\phi(x)]^2 dx. \quad (8)$$

Then the resonance frequencies of the bridges are calculated using the following equations:
resonance frequency without stress:

TABLE I. Resonance frequencies, resonance frequency shifts after the adsorption of Au colloids, the mass sensitivity, minimum detectable density of Au colloid and quality factors of SiNx cantilevers. Experimental results and (calculation results).

Cantilever length		280 μm	230 μm	180 μm	140 μm	32 μm
1st mode	Resonance frequency (kHz)	12.0 (12.1)	18.2 (17.7)	30.0 (29.3)	52.9 (51.0)	904.0 (908)
	Shift (kHz)	-0.65(-0.62)	-1.2(-0.90)	-1.50(-1.5)	-2.25(-2.59)	-38.8(-46.2)
	Mass sensitivity (Hz/pg)	0.529	0.936	1.99	4.57	343
	Minimum detectable density of Au colloid (particles/ μm^2)	2.3	1.5	0.93	0.53	0.030
	Q factor	14	19	25	35	202
2nd mode	Resonance frequency (kHz)	77.7 (75.9)	114.3 (111.1)	188.7 (183.9)	332.2 (319.7)	...
	Shift (kHz)	-4.4(-3.86)	-6.3(-5.65)	-9.2(-9.36)	-12.7(-16.3)	...
	Mass sensitivity (Hz/pg)	3.31	5.86	12.5	28.6	...
	Minimum detectable density of Au colloid (particles/ μm^2)	0.36	0.25	0.15	0.085	...
	Q factor	57	69	77	131	...
3rd mode	Resonance frequency (kHz)	216.7 (212.7)	321.0 (311.1)	530.5 (515.0)	932.7 (895.3)	...
	Shift (kHz)	-12.2(-10.8)	18.0(-15.8)	-26.2(-26.2)	-36.7(-45.5)	...
	Mass sensitivity (Hz/pg)	9.28	16.4	35.0	80.1	...
	Minimum detectable density of Au colloid (particles/ μm^2)	0.13	0.088	0.053	0.030	...
	Q factor	93	120	170	249	...

$$f_n = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\frac{EI}{L^3} \int_0^1 \left(\frac{d^2}{dx^2} \phi(x) \right)^2 dx}{\rho w t L \int_0^1 [\phi(x)]^2 dx}} \quad (9)$$

resonance frequency with stress:

$$f_{\text{stress}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\frac{EI}{L^3} \int_0^1 \left(\frac{d^2}{dx^2} \phi(x) \right)^2 dx + \frac{F}{L} \int_0^1 \left(\frac{d}{dx} \phi(x) \right)^2 dx}{\rho w t L \int_0^1 [\phi(x)]^2 dx}}, \quad (10)$$

which reduces to

$$f_{\text{stress}} = f_n \sqrt{1 + \gamma_n \frac{FL^2}{12EI}}, \quad (11)$$

$$\gamma_n = \frac{12 \int_0^1 \left(\frac{d}{dx} \phi(x) \right)^2 dx}{\nu_n^4 \int_0^1 [\phi(x)]^2 dx},$$

where ν is Poisson ratio, and ρ is material density.

To facilitate computation, the following material constants of SiNx, $E=290$ GPa, $\nu=0.24$, and $\rho=3187$ kg/m³, were used.

Another important point to investigate is how the stress of a bridge might be changed through the adsorption of gold colloids. In this case, the effective spring constant could be altered by a supplementary axial force ΔF as shown in the following equation:

$$f_{\text{stress}} = f_n \sqrt{1 + \gamma_n \frac{(F + \Delta F)L^2}{12EI}}, \quad (12)$$

$$\Delta F = \Delta\sigma(1 - \nu)tw.$$

III. EXPERIMENTAL PROCEDURE

SiNx cantilevers and bridges with a thickness of 600 nm as shown in Fig. 1 were used in the experiment. Fabrication was performed using conventional micromachining techniques. First, 600-nm-thick SiNx film was deposited by low pressure chemical vapor deposition on a Si (100) wafer. Then, SiNx cantilever and bridge shapes were patterned using reactive ion etching. The front side is covered by a SiO₂ film deposited by plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD). This layer acts as a protection layer during subsequent etching of silicon with tetramethylammonium

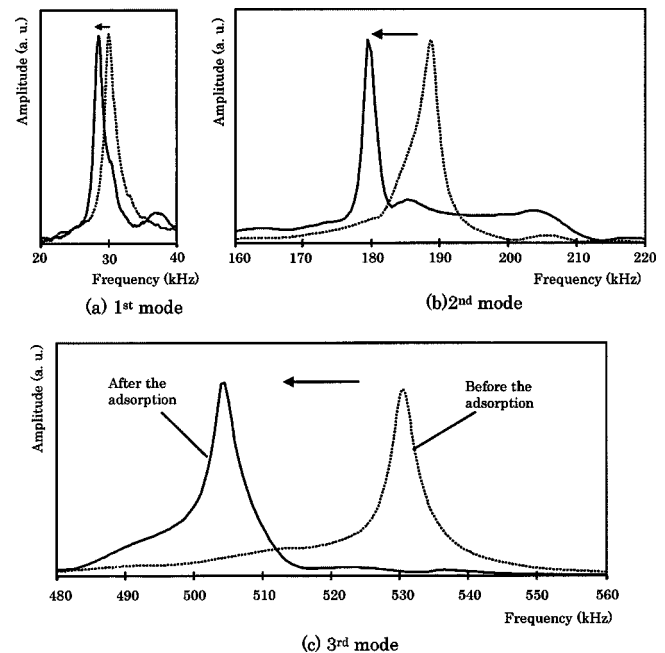


FIG. 3. The shift of resonance frequency spectrum of the SiNx cantilever with length of 180 μm before and after the deposition of distributed mass of the Au colloids: (a) first mode, (b) second mode, and (c) third mode.

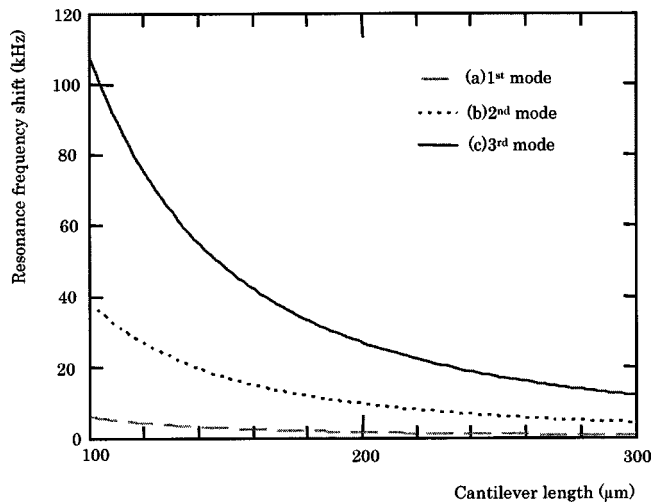


FIG. 4. The shift of resonance frequency of the SiNx cantilever by the adsorption of distributed mass of the Au colloids with function of length: (a) first mode, (b) second mode, and (c) third mode. Density of adsorbed Au colloid is $150 \text{ particles}/\mu\text{m}^2$.

hydroxide (TMAH). Then, backside photolithography was conducted and Si substrate was etched from backside by TMAH at a temperature of 85°C to obtain freestanding cantilevers and bridges. Finally, the PECVD SiO_2 film was removed with buffered HF. The advantage of using monolithic SiNx microstructures lies in the fact that the implementation of theoretical models is simplified since it avoids a multilayer model. Moreover, there is no stress gradient due to the coating of an additional metallic layer.

Controlling the positioning of an added mass is a key issue for the mechanical properties of resonant microsensors especially for calibration.²³ In this work, an alternative approach using a chemical protocol to form a uniform gold colloid layer on the surface was chosen as it is a simple and efficient method to obtain a uniform distributed mass on a

surface compared to the well-known technique, which consists of manually adding with a micromanipulator a particle of known mass on the resonator surface. Here, the approach proposed is more relevant in terms of direct comparison with a colloidal arrangement obtained on a surface through chemical or biological interactions. This should be pointed out since the results presented here can be directly transposed to chemical or biological mass sensors, especially with respect to sensitivity.

Adsorption of gold colloids on the surface of the cantilever and bridge functionalized with a aminosilane self-assembled monolayer (SAM) was performed using a well-known chemical protocol.^{24,25} Commercially available gold nanoparticles from British Biocell were used in this experiment. The mean diameter of the Au nanoparticle is 41.1 nm . Amino-terminated SAM is protonated and positively charged in acid conditions. Since the Au colloid is negatively charged, Au colloids are adsorbed on the surface because of the electrostatic force. First, the cantilever and bridge surface was functionalized by aminosilane SAM. The chip was dipped in a solution of aminosilane (3-aminopropyltri-methoxysilane from Sigma Aldrich) with ethanol for 5 min. It was rinsed with ethanol and baked at 130°C for 20 min. Then, the cantilever surface with a monolayer of adsorbed Au colloids was achieved. A $100 \mu\text{l}$ droplet of the Au colloid solution with colloidal Au concentration of $9.0 \times 10^{11} \text{ particles/ml}$ was deposited on the cantilever chip for 1 h. The pH of the colloidal solution was about 4 by adding acetic acid. Finally, the cantilever chip was rinsed with water and dried. The density of the colloid adsorbed on the aminosilane SAM depends on the concentration of Au colloids in the solution, pH , and incubation time.²⁵ In Fig. 2, Au colloids adsorbed on the SiNx cantilever surface are shown.

Resonance frequencies of the cantilevers and bridges were measured in air before and after the adsorption of the Au colloids. Detection was conducted by the laser optical

TABLE II. Resonance frequencies, resonance frequency shifts after the adsorption of Au colloids, the sensitivity, minimum detectable density of Au colloid, and quality factors of SiNx bridges: (a) experimental results and (calculation considering tensile stress of 500 MPa) and (b) calculation results without consideration of the tensile stress.

Bridge length		380 μm	500 μm	560 μm
(a) 1st mode	Resonance frequency (kHz)	513.8 (508.9)	387.0 (386.2)	341.3 (344.7)
	Shift (kHz)	-25.8(-25.9)	-20.5(-19.6)	-14.2(-17.5)
	Sensitivity (Hz/pg)	12.1	7.31	4.52
	Minimum detectable density of Au colloid ($\text{particles}/\mu\text{m}^2$)	0.053	0.070	0.080
	Q factor	130	120	110
2nd mode	Resonance frequency (kHz)	1030.3 (987.8)	775.0 (748.7)	685.7 (668.0)
	Shift (kHz)	-50.3(-56.7)	-40.2(-42.7)	-31.7(-37.7)
	Sensitivity (Hz/pg)	23.6	14.3	10.1
	Minimum detectable density of Au colloid ($\text{particles}/\mu\text{m}^2$)	0.026	0.035	0.040
(b) 1st mode	Resonance frequency (kHz)	40.9	23.6	18.8
	Shift (kHz)	-2.08	-1.30	-0.96
	Sensitivity (Hz/pg)	1.27	0.56	0.40
	Minimum detectable density of Au colloid ($\text{particles}/\mu\text{m}^2$)	0.67	1.15	1.45
	Q factor	210	190	180
2nd mode	Resonance frequency (kHz)	112.8	65.2	52.0
	Shift (kHz)	-5.74	-3.31	-2.64
	Sensitivity (Hz/pg)	3.50	1.54	1.09
	Minimum detectable density of Au colloid ($\text{particles}/\mu\text{m}^2$)	0.24	0.42	0.52

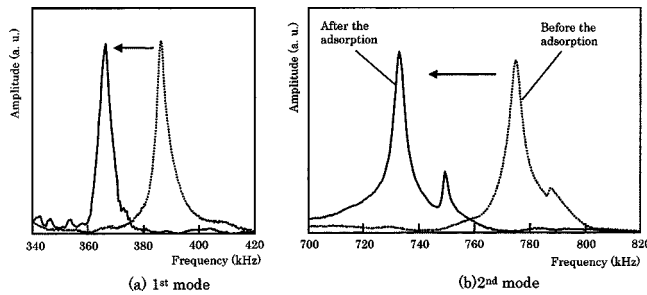


FIG. 5. The shift of first mode (a) and second mode (b) resonance frequency spectrum of the SiNx bridge with length of 500 μm before and after the deposition of distributed mass of the Au colloids.

deflection method. Light from a diode laser (Melles Griot, 631.8 nm, 5 mW) is focused onto the sample via a microscope lens (Leitz, UMK 50/0.6) and reflected on a position-sensing quadrant photodetector (Hamamatsu, SGD-444A-4). The signal is amplified differentially and measured by a lock-in amplifier (EG&G, 7280 DSP lock-in amplifier with a 2 MHz bandwidth). For mechanical excitation, the chip with microcantilevers or microbridges was fixed on a piezoelectric actuator. Reflectivity of SiNx was high enough to avoid the use of a metallic coating to obtain an acceptable signal-to-noise ratio.

IV. RESULTS AND DISCUSSION

Table I shows measured resonance frequencies, resonance frequency shifts after the deposition of Au colloid, as well as the minimum detectable density of Au colloids and the quality factors obtained for SiNx cantilevers. As expected, shorter cantilevers are more sensitive to the added mass because the resonance frequency is proportional to $1/L^2$ (where L is length) as described by Eq. (4). Quality factors of the shorter cantilevers are also higher because air damping is lower as discussed in a previous article.²⁶

Resonance frequency shifts for each mode are proportional to the original values of their resonance frequencies as described in Eq. (2) and quality factors are also higher for higher modes as already reported.²⁷ Figure 3 shows the first, second, and third mode of frequency spectrum of the SiNx cantilever. The spectrum in Fig. 3 shows that the use of higher modes is more relevant to detect the resonance frequency shift. Figure 4 shows the calculation of the resonance frequency shift of each mode by the adsorbed Au colloid as a function of length of the cantilever.

These results demonstrate that with shorter cantilevers and by observing higher resonance modes, a lower minimum detectable mass can be obtained not only because of an increased sensitivity but also thanks to a higher quality factor.

With respect to SiNx bridges, resonance frequencies are about ten times higher than calculation results without considering the tensile stress. Calculation of tensile stress was conducted using Eq. (11). Table II lists the results of measurement of SiNx bridges with the corresponding tensile stress. A calculated tensile stress of 500 MPa was obtained, which is consistent with values previously obtained for SiNx thin films.²⁸ The resonance frequency shifts for each mode are proportional to the original values of their resonance fre-

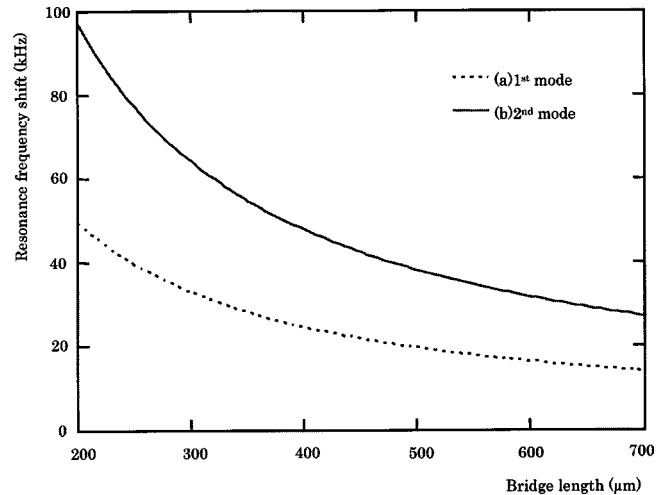


FIG. 6. The shift of resonance frequency of the SiNx bridge by the adsorption of distributed mass of the Au colloids with function of length: (a) first mode and (b) second mode. Density of adsorbed Au colloid is 150 particles/ μm^2 .

quencies. Figure 5 shows the frequency spectrum of the fundamental and second mode of the SiNx bridge. It is confirmed that the SiNx bridge resonator with tensile stress enhances the sensitivity. Figure 6 shows the calculation of the resonance frequency shift of each mode by the adsorbed Au colloids as a function of the length of the bridge. As expected, for SiNx bridges, the sensitivity is about ten times higher than the one obtained for a stress free bridge. This is due to the increase in resonance frequency induced by the tensile stress.

The density of gold colloids deposited on the cantilever and bridge surface was estimated using scanning electron microscope (SEM) image presented in Fig. 2 and was about 150 particles/ μm^2 . The resonance frequency shifts were in good agreement with the calculation using the density of Au colloid 150 particles/ μm^2 as added mass as indicated in Table I. In other words, no spring constant change caused by the adsorption of Au colloid could be detected for the SiNx cantilever and bridge. In the bridge resonator, no stress change could be detected. Only the added mass of Au colloid contributes to the change in mechanical characteristics in the resonators. We also experimentally confirmed that resonance frequency shift does not depend on the width of the resonators.

The minimum detectable density of Au colloids N_{\min} for both cantilever and bridge is calculated and listed in Tables I and Table II. Calculation was effected by assuming a minimum detectable resonance frequency shift Δf_{\min} of about 10 Hz in this experiment as assessed by the peak width of the frequency curve of each spectrum of cantilever and bridge. The minimum detectable added mass Δm_{\min} is described in the following equation by modifying Eq. (1):

$$\Delta m_{\min} \cong - \frac{2M_{\text{effective}}}{f_n} \Delta f_{\min}. \quad (13)$$

Then the minimum detectable density of Au colloid N_{\min} is by the formula

$$N_{\min} = \frac{\Delta m_{\min}}{LwM_{\text{Colloid}}}, \quad (14)$$

where M_{Colloid} is mass of one Au colloid.

As can be seen in Tables I and II, using SiNx cantilevers and bridges, less than one Au colloid adsorbed on the surface of $10 \mu\text{m}^2$ can be detected. Thus, precise quantitative detection of Au colloids density can be obtained by measuring the resonance frequency shift. By observing the higher mode of resonance, the minimum detectable Au colloid is decreased and inversely proportional to the original value of the resonance frequency. Indeed, using a SiNx bridge with a length of $380 \mu\text{m}$, a minimum detectable density of Au colloids of $0.026 \text{ particles}/\mu\text{m}^2$ can be obtained with the second mode.

In the future, using resonators with submicrometer sizes will further enhance sensitivity. Moreover, measurement of the resonance frequencies of resonators in vacuum can also further reduce the minimum detectable mass thanks to an increase of the Q factor.

Using such resonators, DNA or protein biochips with unprecedented sensitivities can be envisioned provided that gold colloids have been functionalized with biomolecules for specific biorecognition. Optimization of functionalization protocols is underway for both the surface of resonators and colloids.

¹R. Raiteri, M. Grattarola, H. J. Butt, and P. Skladal, *Sens. Actuators B* **79**, 115 (2001).

²G. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote, and A. Majumdar, *Nat. Biotechnol.* **19**, 856 (2001).

³J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.-J. Guntherodt, C. Gerber, and J. K. Gimzewski, *Science* **288**, 316 (2000).

⁴Y. Arntz, J. D. Seelig, H. P. Lang, J. Zhang, P. Hunziker, J. P. Ramseyer, E. Meyer, M. Hegner, and C. Gerber, *Nanotechnology* **14**, 86 (2003).

⁵J. Thaysen, R. Marie, and A. Boisen, *Technical Digest of MEMS 2001, The 14th Annual International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, Interlaken, 2001, p. 401.

⁶B. Ilic, D. Czaplewski, M. Zalalutdinov, H. G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo, and C. Batt, *J. Vac. Sci. Technol. B* **19**, 2825 (2001).

⁷C. M. Niemeyer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 4128 (2001).

⁸W. Fritzsche and T. A. Taton, *Nanotechnology* **14**, R63 (2003).

⁹L. He, M. D. Musick, S. R. Nicewarner, F. G. Salinas, S. J. Benkovic, M. J. Natan, and C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9071 (2000).

¹⁰L. A. Lyon, M. D. Musick, and M. J. Natan, *Anal. Chem.* **70**, 5177 (1998).

¹¹O. D. Velev and E. W. Kaler, *Langmuir* **15**, 3693 (1999).

¹²L. Lin, H. Zhao, J. Li, J. Tang, M. Duan, and L. Jiang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 817 (2000).

¹³M. Su, S. Li, and V. P. Dravid, *Appl. Phys. Lett.* **82**, 3562 (2003).

¹⁴N. V. Lavrik and P. G. Datskos, *Appl. Phys. Lett.* **82**, 2697 (2003).

¹⁵G. Abadal, *et al.*, *Nanotechnology* **12**, 100 (2001).

¹⁶J. A. Harley and T. W. Kenny, *Appl. Phys. Lett.* **75**, 289 (1999).

¹⁷B. H. Kim, D. P. Kern, S. Raible, and U. Weimar, *Microelectron. Eng.* **61–62**, 947 (2002).

¹⁸K. Kakushima *et al.*, *Technical Digest of Transducers'03, The 12th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems*, Boston (IEEE, New York, 2003), p. 328.

¹⁹M. Guirardel, L. Nicu, D. Saya, Y. Tauran, E. Cattani, D. Remiens, and C. Bergaud, *Jpn. J. Appl. Phys., Part 1* **43**, 111 (2004).

²⁰J. W. Yi, W. Y. Shih, and W.-H. Shih, *J. Appl. Phys.* **91**, 1680 (2002).

²¹G. Y. Chen, T. Thundat, E. A. Wachter, and R. J. Warmack, *J. Appl. Phys.* **77**, 3618 (1995).

²²C. M. Harris, *Shock and Vibration Handbook* (McGraw-Hill, New York, 1996).

²³J. P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, and P. K. Hansma, *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 403 (1993).

²⁴A. Doron, E. Joselevich, A. Schlittner, and I. Willner, *Thin Solid Films* **340**, 183 (1999).

²⁵T. Zhu, X. Fu, T. Mu, J. Wang, and Z. Liu, *Langmuir* **15**, 5197 (1999).

²⁶C. Bergaud, L. Nicu, and A. Martinez, *Jpn. J. Appl. Phys., Part 1* **38**, 6521 (1999).

²⁷J. W. M. Chon, P. Mulvaney, and J. E. Sader, *J. Appl. Phys.* **87**, 3978 (2000).

²⁸P. Temple-Boyer, E. Scheid, G. Faugère, and B. Rousset, *Thin Solid Films* **310**, 234 (1997).

Resonating piezoelectric membranes for microelectromechanically based bioassay: detection of streptavidin–gold nanoparticles interaction with biotinylated DNA

Liviu Nicu^{a,*}, Matthieu Guirardel^a, Frédéric Chambosse^a, Pierre Rougerie^a, Sary Hinh^a, Emmanuelle Trevisiol^b, Jean-Marie Francois^b, Jean-Pierre Majoral^c, Anne-Marie Caminade^c, Eric Cattan^d, Christian Bergaud^e

^a LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex 4, France

^b Plateforme Transcriptome, Genopole de Toulouse, INSA/DGBA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4, France

^c LCC-CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 4, France

^d IEMN-CNRS/DOAE, Cité Scientifique, Batiment P3, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

^e LIMMS/CNRS-IIS, UMI 2820, University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505, Japan

Received 15 November 2004; received in revised form 6 January 2005; accepted 13 January 2005

Available online 16 February 2005

Abstract

In this article a new device based on 4×4 matrix micromachined resonating piezoelectric membranes used as DNA–DNA hybridization biosensor is proposed. This biosensor is operated in two fundamental different ways, namely integrated in a flow injection analysis (FIA) system and providing measurements by the “dip-and-dry” technique.

After the fabrication and characterization phase of the micromachined resonating piezoelectric membranes, an appropriate FIA system for biosensing tests had to be developed. The biosensor functionality was validated in two ways: on the one hand the piezoelectric membranes have been used to measure the real-time kinetics of gold colloid adsorption, the whole matrix being integrated in the FIA system. The mass sensitivity of the device has been estimated to -3.6 Hz/pg which is by a factor of several hundreds better than of state-of-art values for piezoelectric mass-sensing devices. On the other hand, dip-and-dry technique has been used to measure the mass loading induced by the binding of streptavidin–conjugated gold nanoparticles to biotinylated target cDNA fixed onto the surface of the piezoelectric membranes. Measurement of resonant frequency of one piezoelectric membrane has been performed before and after adsorption of the streptavidin–conjugated gold nanoparticles and a 3.9 kHz shift of the resonant frequency has been recorded.

These results indicate that micromachined piezoelectric membranes have real potential as micromechanical biosensors.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Microelectromechanically based bioassay; Piezoelectric membrane; DNA–DNA hybridization biosensor; Flow injection analysis system

1. Introduction

The area of biomolecular sensors, in which biology and the physical sciences come together, is now just beginning to materialize as a force to be reckoned as an aid to understanding the underlying biophysical principles of molecular recog-

niton. In general, a biomolecular sensor (called biosensor) consists of two parts, i.e. a transducer and an affinity-based interface which leads to the variation of a physical quantity when the analyte of interest binds to the sensor system. Over the last years, promising results on biosensors have been reported using micro and nanomechanical systems to detect the presence of specific compounds with a high selectivity and sensitivity [1–4]. So far, micromachined cantilevers are mainly applied as a *microbalance* (to detect changes in the

* Corresponding author. Tel.: +33 561337838; fax: +33 561336208.

E-mail address: nicu@laas.fr (L. Nicu).

cantilever mass by measuring the resonant frequency shift) or as a *surface stress sensor* (to measure the deflection due to stress caused by the binding of the target molecules onto the specific functionalized sensor surface). Even though microcantilever sensors offer the advantage of a high sensitivity with small active area ($\sim 100 \mu\text{m}^2$), extensive use of this kind of device could be limited by its brittleness under real (extralab) operating conditions. As an alternative to this critical point, the quartz-crystal microbalance (QCM) systems employing quartz crystals with typical resonance frequencies of 5–20 MHz have staged a come-back over the last decade. Although quartzes have been successfully applied for more than thirty years in gases as well as in liquids providing highest sensitivity, it is only recently that this kind of system have been proofed to be suitable for detection of DNA [5] as well as for proteins [6]. Nevertheless, quartzes are expensive and their application for biosensor arrays suffers from a lack of integration.

As a trade-off between all those considerations we propose a new device based on 4×4 matrix micromachined resonating piezoelectric membranes [7,8]. This device simultaneously addresses the sensitivity to mechanical damage of the silicon-based microcantilever sensors and the lack of integration potential of the QCM biosensors while offering high sensitivity and stability performances when used in real biosensor applications.

In this paper we focus on micromachined resonating piezoelectric membrane-based biosensors operated in two fundamental different ways, namely integrated into a flow injection analysis (FIA) system [9] and providing measurements by the “dip-and-dry” technique [10].

The strategy for the biosensor validation is outlined as follows:

Firstly have been developed and characterized the micromachined resonating piezoelectric membranes. Secondly an adequate FIA system which allows real-time reaction kinetics track was also developed. Finally, the biosensor functionality of our devices was validated in two ways: on the one hand the piezoelectric membranes have been used to measure the real-time kinetics of gold colloid adsorption, the whole matrix being integrated into the FIA system. Indeed, mass loading caused by adsorption of gold colloids on a silicon dioxide surface leads to a frequency shift of the microresonator. On the other hand, the dip-and-dry technique (succession of repetitive steps consisting in the dipping of the sensor into the analyte solution, drying it and performing the measures) has been used to measure the mass loading induced by the binding of streptavidin–conjugated gold nanoparticles to biotinylated target cDNA fixed onto the surface of the piezoelectric membranes.

2. Fabrication of micromachined PZT membranes

4×4 matrixes of piezoelectric membranes were fabricated by standard micromachining techniques starting with a

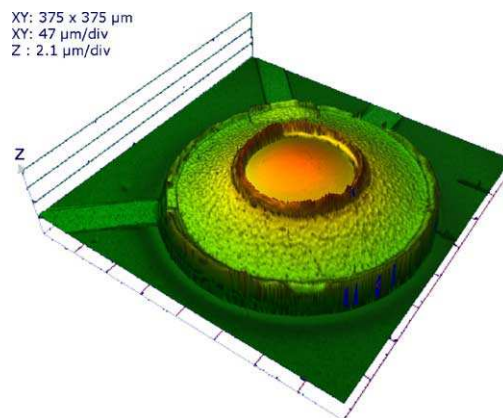


Fig. 1. 3D static profile (obtained by optical interferometry) of a single piezoelectric membrane.

silicon-on-insulator wafer (SOI 1.3/1/525 μm). Each membrane (circular shaped, 150 μm radius) can be individually actuated through a $\text{PbZr}_x\text{Ti}_{1-x}\text{O}_3$ (PZT) film. The PZT film as well as the metal top and bottom electrodes (used to polarize the piezoelectric film) are annulus-patterned onto the membrane, with an inner radius equal to 85 μm and an outer radius equal to the radius of the membrane. Fig. 1 shows the topography of a circular membrane.

The fabrication process is depicted in Fig. 2. The first step consisted in the growth of a 450 nm thick thermal silicon dioxide film on the SOI wafer and a sputtered Pt/TiO_x electrode (120/10 nm). This film was lifted-off with a Shipley 1818 photoresist to pattern the bottom electrodes. A lead zirconate titanate 46/54 $\text{PbZr}_x\text{Ti}_{1-x}\text{O}_3$ film (~ 800 nm) was then deposited by rf magnetron sputtering. In the literature, PZT films are deposited at 650 °C [11]. Instead, our PZT film [12] was deposited without intentional substrate heating to allow patterning by lift-off of the PZT film with the Shipley 1818 photoresist. Deposited films were therefore amorphous since temperature rise during deposition did not exceed 150 °C. After resist stripping, a 30 min crystallization annealing at 625 °C was performed. Then, another deposit followed by a lift-off was processed with ZnO to avoid electrical shortcuts in areas where upper electrodes are under non-crystallized PZT (cf. Fig. 2). Finally upper electrodes (Ti/Pt) were sputtered, lifted-off and annealed. A passivation silicon oxide film (250 nm) was then deposited by plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD). Contact pads were opened in a buffered HF solution. Finally, the circular membranes (with an active area of 0.07 mm²) were defined by etching vertical sidewalls cavity on the backside of the wafer with an inductively coupled plasma (ICP) etch machine. The 1 μm -thick SiO₂ layer of the SOI substrate acts as an etch stop layer for the ICP process. This layer was then removed using a reactive ion etching process.

A single membrane is shown in Fig. 1. This topography clearly shows the annular geometry of the PZT actuator and its electrodes. Fig. 3 shows a 5 mm \times 5 mm die including a chip with 16 piezoelectric membranes that has been glued

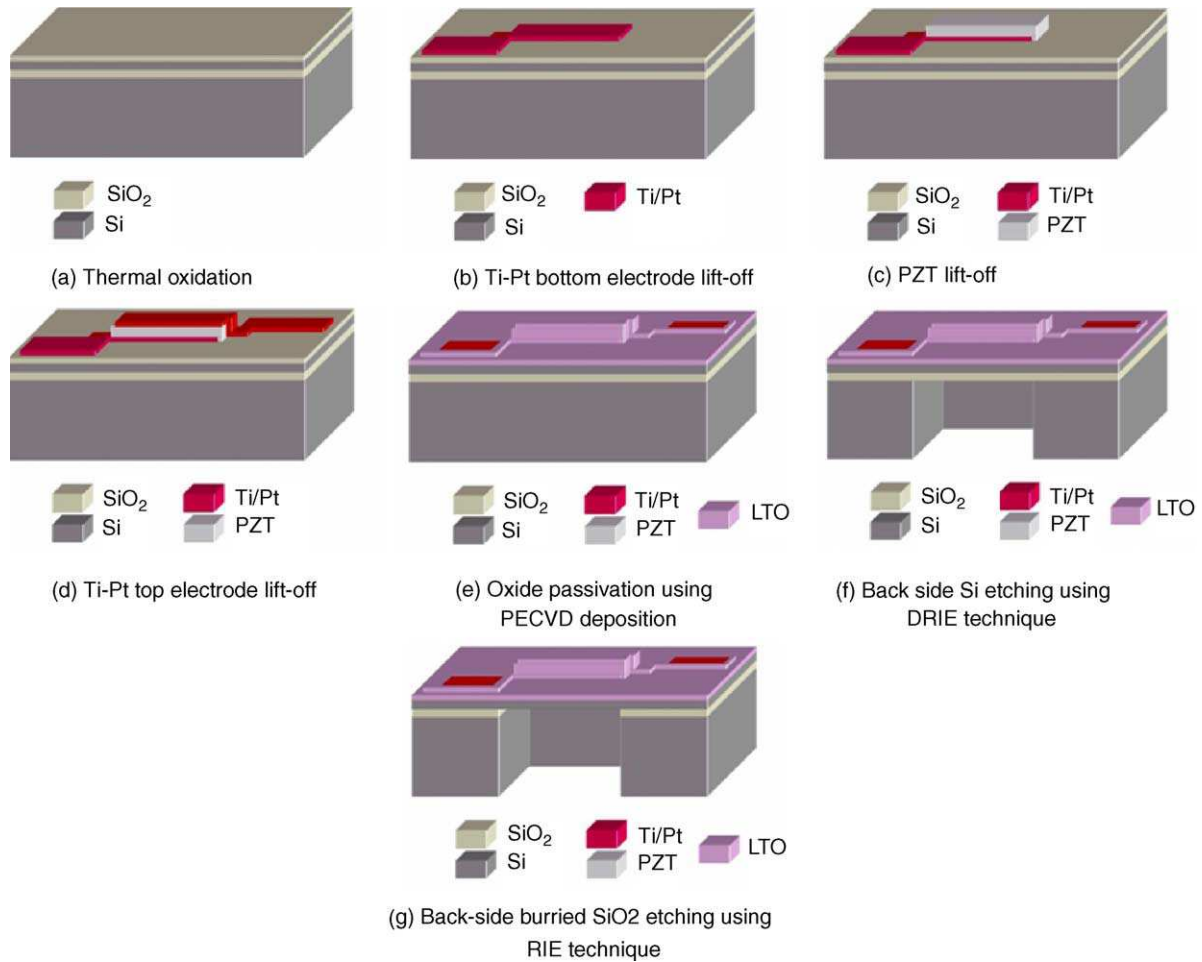


Fig. 2. Fabrication flow-chart for the micromachined LTO membranes.

on a TO8 package with each membrane bonded to the TO8 pins. All membranes are connected with a common ground electrode. To protect the electrical signals from short circuiting through the fluid, each bonding wire was coated with

a biocompatible silicon sealant (not shown on this photograph).

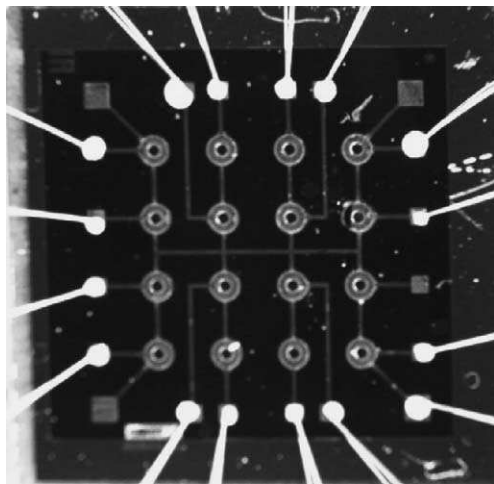


Fig. 3. Optical microscope photograph of 5 mm × 5 mm chip of 4 × 4 membranes matrix with wire connections.

3. Theory

For an amount of mass uniformly deposited onto the micromachined membrane surface, the resonant frequency shift is proportional to the mass of the deposited layer:

$$\Delta f = \text{function}(\Delta m) \tag{1}$$

where Δf denotes the observed frequency shift and Δm stands for the amount of mass added on the device.

The sensitivity is defined as the ratio of the variation of the resonant frequency to that of the mass that induced the resonant frequency shift (for an invariant constant spring of the structure):

$$S_m = \frac{df}{dM} \tag{2}$$

The resonant of an oscillating membrane can be written as:

$$f_n = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K_{\text{eff},n}}{M_{\text{eff},n}}} \quad (3)$$

where $K_{\text{eff},n}$ and $M_{\text{eff},n}$ respectively stand for the effective spring constant and mass of the membrane and the subscript n denotes the n th eigenmode.

By taking the derivative of Eq. (3) for a constant $K_{\text{eff},n}$ it is found that:

$$\frac{df_n}{dM_{\text{eff},n}} = -\frac{1}{2} \frac{f_n}{M_{\text{eff},n}} \quad (4)$$

Introducing (4) in (2) leads to:

$$S_m = -\frac{1}{2} \frac{f_n}{M_{\text{eff},n}} \quad (5)$$

The modal mass of the membrane can be expressed as follows:

$$M_{\text{eff},n} = \int \int_{r,\theta} (\rho h)_{\text{global}} \phi_{ij}^2(r, \theta) r dr d\theta \quad (6)$$

where $(\rho h)_{\text{global}} = \int_z \rho_{\text{layer},i} dz$ ($\rho_{\text{layer},i}$ is the density of the i th layer of the membrane) and

$$\phi_{ij}(r, \theta) = \cos(i\theta) \left[J_n \left(i, \lambda_{ij} \frac{r}{r_2} \right) - \frac{J_n(i, \lambda_{ij})}{I_n(i, \lambda_{ij})} I_n \left(i, \lambda_{ij} \frac{r}{r_2} \right) \right] \quad (7)$$

with J_n and I_n are respectively Bessel function and modified Bessel function of first kind, λ_{ij} the dimensionless ij -mode eigenvalue and r_2 stands for the global radius of the membrane. For example, for (0,0) and (0,1) vibration modes of the membrane, λ_{ij} eigenvalues are equal to 3.197 and 4.611 [13].

Table 1

Parameters of silicon (Si), silicon dioxide (SiO₂) and lead zirconate titanate (PZT) used for analytical calculations

	Density, ρ ($\times 10^3$) (kg/m ³)	Thickness, h ($\times 10^{-6}$) (m)
Si	2.5	1.3
SiO ₂	2.15	0.7
PZT	7.8	0.8

The physical parameters of the different structural layers (Si/PZT/SiO₂) of the composite membranes used for theoretical calculations are listed in Table 1 [14] (the values of the Ti/Pt parameters have been intentionally disregarded in our calculi due to the insignificant thickness of those layers).

From Eqs. (6) and (7) and using the parameters given in Table 1, one can calculate the effective masses of one membrane for the (0,0) and (0,1) vibration modes that are respectively equal to $M_{\text{eff}(0,0)} = 79$ ng and $M_{\text{eff}(0,1)} = 47$ ng. These values will be used to calculate the mass sensitivities of the membranes used as biosensors.

4. FIA measurement set-up and dip-and-dry technique

The FIA system scheme is given in Fig. 4(a). It consists of a low-pressure injection valve, a flow-through cell, a peristaltic pump and a fluidic circuitry (capillary tubes, adaptive ports, etc.). Flow-through cell is detailed in Fig. 4(b). This cell is made of Teflon[®]. It exhibits a 2 mm high chamber and a capacity of 200 mL blanked by a 0.1 μm thick borosilicate glass. Two capillary tubes (255/510 μm , Capillary Peek Tubing, Upchurch Scivex) are connected through Nanoport[®] assemblies (Upchurch Scivex) to the flow-through cell. The piezoelectric membrane TO8 pack-

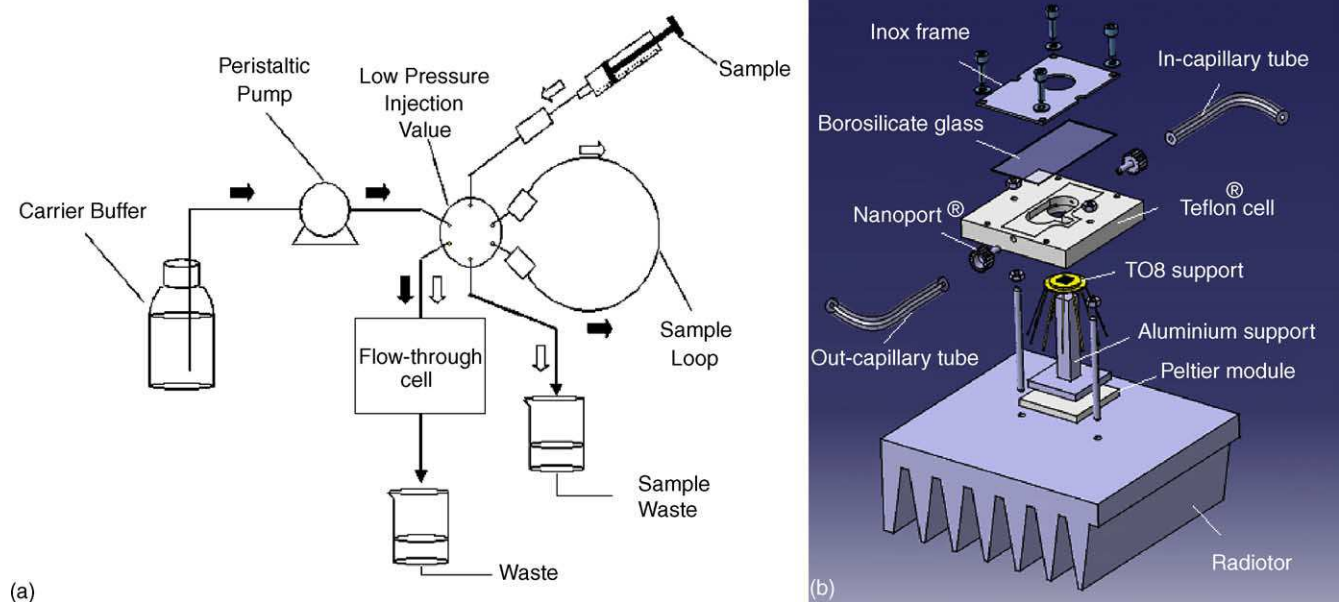


Fig. 4. (a) Schematic of the flow injection analysis system; (b) detail of the flow-through cell.

age is clipped between the liquid cell and an aluminum support.

This set-up allows to the carrier buffer to continuously stream across the piezoelectric membranes with a constant velocity fixed by the peristaltic pump (Masterflex, 1–4 mL/h velocity flow). An elastic silicon tubing (Tube Tygon®, 0.51/2.31 mm) is used as fluidic connection between the carrier buffer vial and the injection valve, passing through the peristaltic pump head.

The low-pressure liquid injection valve (Upchurch Scivex) with a 1 mL sample loop allows the analyte to be injected into the liquid circuit and to flow it onto the piezoelectric membranes chip.

The dip-and-dry technique consists of a repetitive succession of the following steps: dipping of the sensor into the analyte solution, rinsing and drying it then carrying out the measurement of the resonant frequency of the sensor. This technique has been used to measure the mass loading induced by the binding of streptavidin–conjugated gold nanoparticles to biotinylated target cDNA fixed onto the surface of the piezoelectric membranes.

For both measuring techniques (continuous stream of analyte or dip-and-dry technique), resonant frequencies of the piezoelectric membranes were measured using the optical beam deflection technique. Each membrane was actuated by applying a 1 V ac voltage directly to the piezoelectric layer. It should be noticed that a -2 V dc voltage was also applied to optimize the electromechanical response of the piezoelectric layer. Light from a diode laser (Melles Griot, 631.8 nm, 5 mW) is focused onto the vibrating membrane into the liquid via a microscope lens (Leitz, UMK 50/0.6) and reflected on a position-sensing quadrant photodetector (Hamamatsu, SGD-444A-4). The signal is amplified and measured by a lock-in amplifier (EG&G, 7280 DSP) with a 1 MHz bandwidth.

5. Chemical and biological protocols

Two different protocols have been carried out on the surfaces of the piezoelectric micromachined membranes to validate them as biosensors. These protocols are described below.

5.1. Gold colloids adsorption protocol

The procedure for gold colloids detection experiment is as follows: to clean the piezoelectric membranes surfaces, the chip is rinsed with ultrapure ethanol and deionized water. A drying step using nitrogen is then performed. The membranes are then coated with an amino-silane layer by dispensing an amino-propyltrimethoxysilane (APTS, Aldrich) solution, followed by a bake step at 140 °C for 10 min. Suspensions containing 40-nm gold colloids (Tebu-Bio) with a concentration of 9×10^{12} particles/mL at different pH (in a sodium acetate buffer) are prepared. As shown in Fig. 5, negatively charge gold colloids (synthesized by citrate reduction of HAuCl_4 solutions and having a negative surface charge as

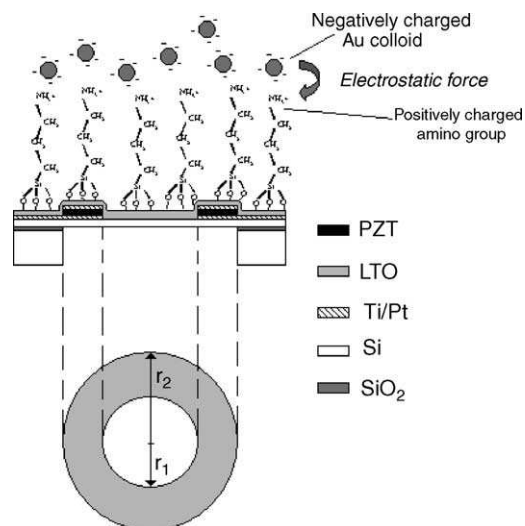


Fig. 5. Schematic diagram of negatively charged gold colloids adsorption on the surface of a piezoelectric membrane.

a consequence of bond citrate required for colloidal surface saturation) adsorb on the previously functionalized surface by the amino-silane layer. Indeed, under acidic conditions, the amino group is protonated and the resulting positively charged monolayer shows strong affinity with the negatively charged gold colloids.

The same protocol has been used with silicon dioxide (SiO_2) test samples in order to observe and evaluate experimentally the number of gold colloids adsorbed after different incubation times, as will be explained in Section 6.

5.2. Biotinylated DNA hybridization and biomolecular recognition by streptavidin–conjugated gold nanoparticles

Cleaning of samples (control samples and piezoelectric membranes) and self-assembly of the amino-silane monolayer onto the SiO_2 surfaces were carried out in the same way as in the gold colloids adsorption experiment (Fig. 6(a)). Phosphorus dendrimers with CHO end groups, generation 4 (G4), were synthesized according to a method published earlier [15]. Dendrimers were used to avoid interactions of DNA with the surface and to facilitate hybridization. The samples were incubated in a solution containing phosphorous dendrimers (0.1%, w/v) in tetrahydrofuran (THF) for 7 h at room temperature under gentle agitation (Fig. 6(b)). Then, several rinsing steps were performed with THF, 95% ethanol and finally, absolute ethanol. Drying has been done under a nitrogen stream [16].

Aminated oligonucleotide (NH_2 -5'-AAG ATT ACT CCG ATA CCA TT-3') was diluted to the appropriate concentration in 300 mM sodium phosphate buffer (Na_2HPO_4 , pH 9.0) and deposited onto the samples (Fig. 6(c)).

After incubation overnight, samples were incubated for 1 h with a sodium borohydride solution (3.5 mg/mL in deionized

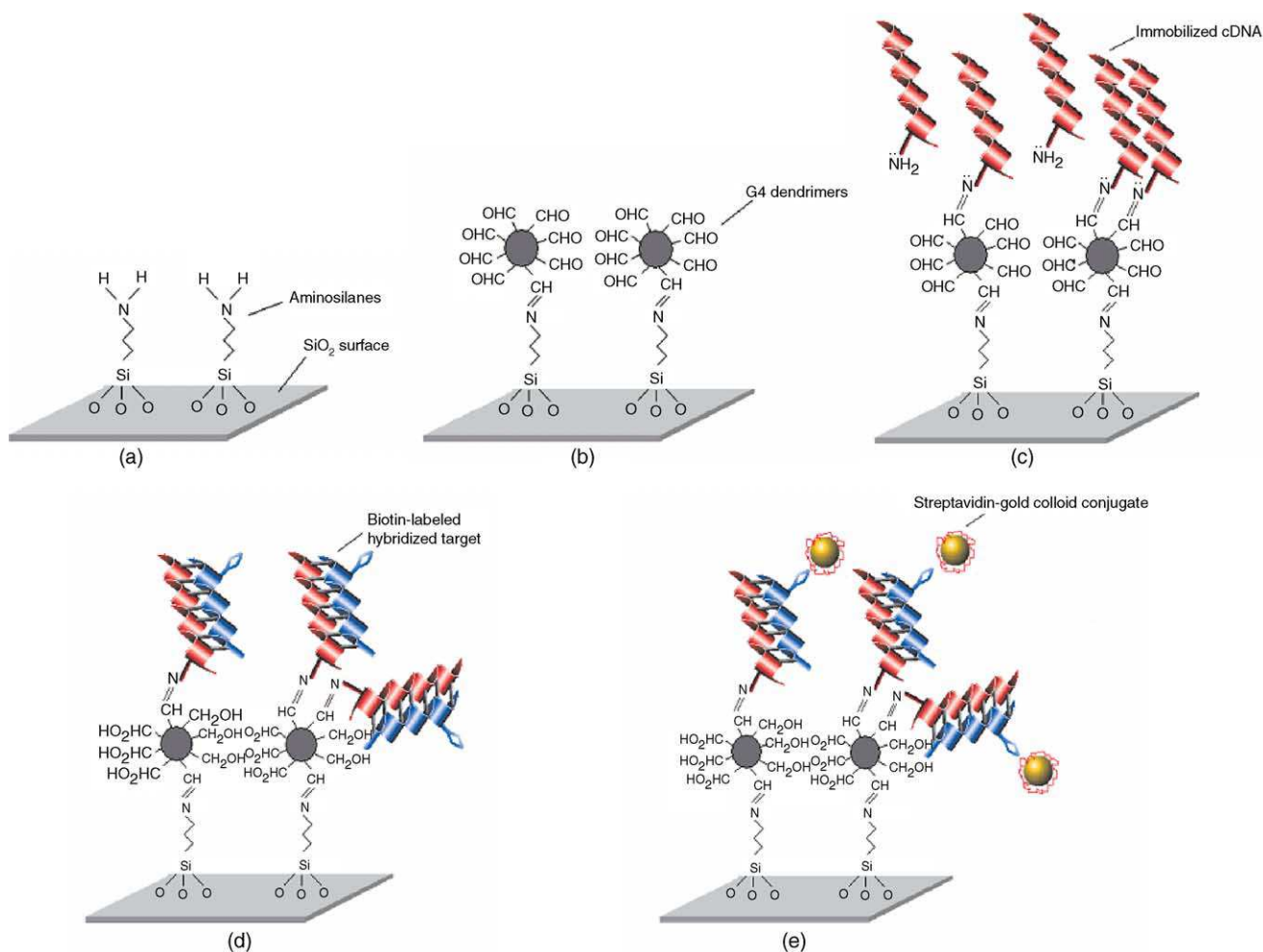


Fig. 6. Schematic representation of the biotinylated DNA hybridisation protocol on SiO₂ surface and the biomolecular recognition by streptavidin–conjugated gold nanoparticles: (a) formation of the self-assembled amino-silane monolayer; (b) grafting of dendrimers of generation 4; (c) immobilization of aminated oligonucleotides; (d) hybridization of complementary biotinylated oligonucleotides; (e) biomolecular recognition by streptavidin–conjugated gold nanoparticles.

water). They were rinsed three times with deionized water and finally dried under nitrogen stream.

Hybridizations (Fig. 6(d)) were carried out by adding a solution containing the complementary target biotinylated oligonucleotide (3'-TTC TAA TGA GGC TAT GGT AAT *TTT T*-biotin) in saline-sodium-phosphate-EDTA (SSPE: 20 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 2 mM EDTA) buffer, containing sodium dodecyl sulfate (SDS, 0.1%, w/v), pH 7.4, for 30 min at room temperature. The five additional thymines (italicized in the previous target sequence) allow to take away the biotin from the hybrids. The samples were then washed twice for 10 min with the washing buffer (20 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS), then with diluted buffer (2 mM NaH₂PO₄, 0.03 M NaCl, 0.2 mM EDTA).

After hybridization and washing, 20 mL of gold colloids functionalized with streptavidin (*Streptomyces Avidinii* S0677, Sigma–Aldrich) were deposited onto the samples (Fig. 6(e)). The streptavidin–conjugated gold nanoparticles will be used as “nano-weights” during the “dip-and-dry” test performed with the piezoelectric membrane. Indeed, the

biotin group of immobilized oligonucleotides fixed on the samples can create a strong complex with streptavidin. The conjugates streptavidin–gold colloids are home-made starting with the centrifugation of a 1 mL suspension of 40 nm in diameter gold colloids at 5000 rpm. After eliminating the supernatant, the centrifugation pellet is mixed with a 100 mL glycine buffer (2 mM). An amount of 5 mL of colloidal suspension can then be retrieved and replaced by 5 mL of streptavidin solution (1 mg mL⁻¹). After 15 min of incubation, the solution is centrifuged at 5000 rpm during 5 min, the supernatant is removed again and the centrifugation pellet is mixed with a 100 mL glycine buffer (2 mM). A test of flocculation of the gold colloids is finally carried out by adding 10 mL of NaCl into an Eppendorf tube prepared for control: if there is flocculation, it means that the gold colloids are not functionalized with streptavidin and the procedure must be repeated. The suspension is then centrifuged (5000 rpm, 5 min) again, the supernatant is removed and 100 μL of glycine buffer (2 mM) are added to the pellet. This operation is repeated twice and allows to remove the free-

streptavidin from the streptavidin–conjugated gold nanoparticles.

6. Results and discussion

In a first experiment, the capability of the new biosensor for detection of added mass should be proofed. To do this, the piezoelectric membranes have been used to measure the real-time kinetics of gold colloid adsorption, the whole matrix being integrated in the FIA system, as explained in the next section.

6.1. Kinetics of gold colloids adsorption

Silicon dioxide samples of $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ were coated by an amino-silane layer as explained before and then respectively incubated in suspensions containing 40 nm gold colloids with a concentration of 9×10^{12} particles/ m^2 at three different pH values (3.7, 5.3 and 8.5). These experiments allowed us to select the optimal pH for a maximum density of adsorption of gold nanoparticles on the silicon dioxide amino-silanized surfaces. Different times of incubation (from 60 to 180 min) have been explored. Scanning electron microscopy (SEM) has been used to estimate the number of colloidal gold particles deposited onto the surfaces of the control samples (Fig. 7). The obtained results are shown in Fig. 8. It should be noticed that the colloidal suspension with the pH value of 3.7 seems to give a better gold colloids adsorption yield than other suspensions. This confirms the results reported by Giesbers et al. [17] according to which the pH value providing an optimal ionization state of the amine

surface groups (synthesized on SiO_2 surfaces) is between 3 and 5.

An amount of 1 mL of gold colloids suspension with a pH of 3.7 was thus injected into the sample loop of the FIA system (flow velocity equal to 1 mL/h) in order to dispense it onto the surface of a piezoelectric membranes chip mounted in the chamber reaction. First, a buffer solution (sodium acetate 0.03 M at pH 3.7) was injected into the reaction chamber until the resonant frequency of the piezoelectric membrane was stabilized. For the experiment discussed here, the piezoelectric membrane was excited on its (0,1) resonant mode (at 341.7 kHz), since the amplitude of the oscillation at the (0,1) resonant frequency was higher than that at the (0,0) resonant frequency. The stabilization step was around 90 min. Then, the colloidal solution was injected into the reaction chamber and the resonant frequency value started to gradually decrease (as shown in Fig. 9). The decrease of the resonant frequency is continuous during 120 min before flattening out at 339.4 kHz .

This resonant frequency shift can be directly related to the number of gold colloids adsorbed *in fine* at the surface of the piezoelectric membrane by calculating the mass sensitivity of the sensor as indicated in Eq. (5). Replacing f_n by the (0,1) experimental resonant frequency of the membrane yields a mass sensitivity S_m equal to -3.6 Hz/pg . By dividing this value by the resonant frequency of the device and by taking into account its active area, mass sensitivity becomes $-7.4\text{ Hz/MHz}(\text{ng/cm}^2)^{-1}$ which is by a factor of several hundreds better than state-of-art values for piezoelectric mass-sensing devices [18]. The ratio between the resonant frequency shift and the mass sensitivity value allows to calculate the amount of mass added on the surface of the piezoelectric membrane that can be directly converted into a density (num-

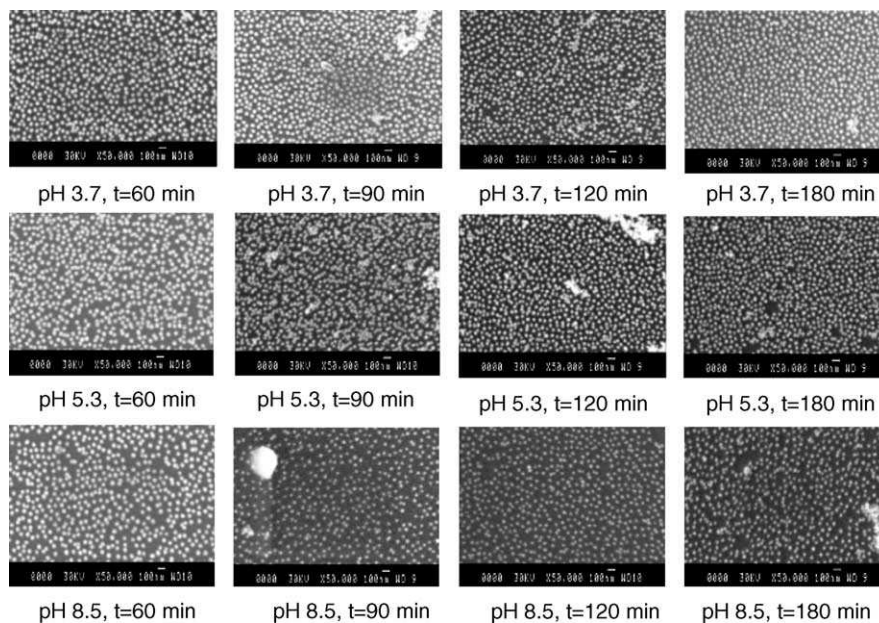


Fig. 7. Scanning electron microscopy (SEM) photographs of gold nanoparticles adsorbed onto amino-silanized SiO_2 control samples surfaces for different times of incubation into the colloidal solution at three different pH values.

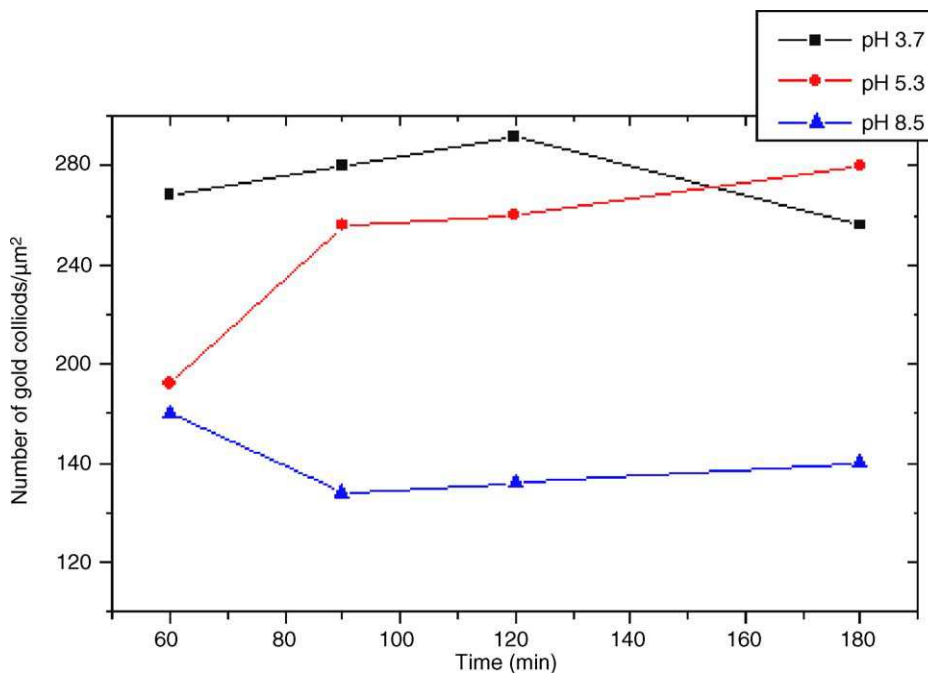


Fig. 8. Estimated number of gold nanoparticles adsorbed per μm^2 of amino-silanized SiO_2 control samples surfaces vs. time of incubation for different pH colloidal solutions.

ber of particles/ μm^2) of gold colloids adsorbed onto the active area of the device. Thus, the 2.4 kHz resonant frequency shift yields a density of gold colloids adsorbed onto the surface of the device that equals 130 nanoparticles/ μm^2 . This is two times lower than the density of nanoparticles adsorbed on the surface of a SiO_2 control sample (260 nanoparticles/ μm^2) incubated during 120 min into a colloidal suspension at the same pH (3.7), as shown in Fig. 8.

This discrepancy could be accounted for by the fact that both experiments are conducted under different conditions:

whereas the adsorption experiment onto control samples was realized under *static* conditions, the real test using a piezoelectric device was performed under a *continuous* stream of gold colloids suspension that could dramatically affect the yield of adsorption of gold colloids on the active area of the sensor. Moreover, the dimensions of the reaction chamber and the velocity of the flow of the colloidal suspension injected in were not really optimized. Further optimization could reduce the thickness of the Nernst diffusion layer [19] thus accelerating the diffusion process of the gold nanoparticles towards

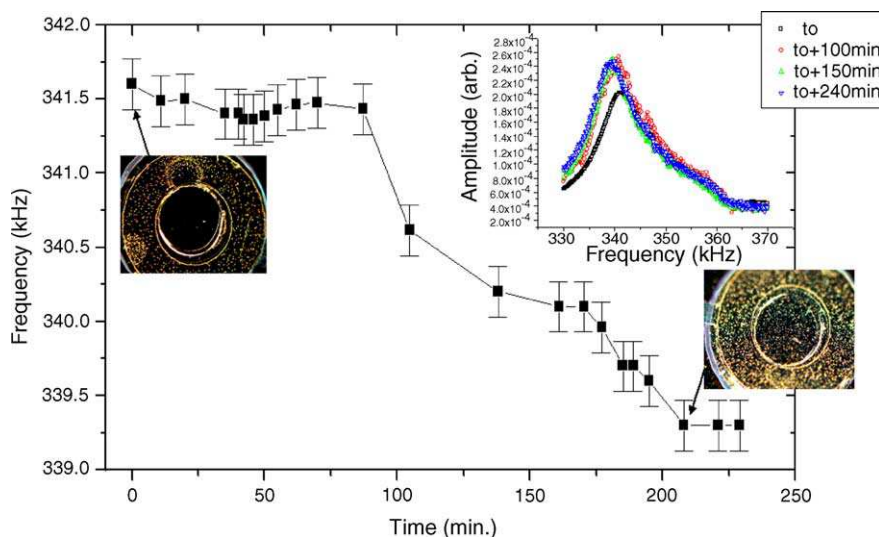


Fig. 9. Evolution of the (0,1) resonant frequency of the piezoelectric membrane vs. time during the injection of a colloidal solution (at pH 5.3) into the reaction chamber of the FIA system. The two optical microscope photographs show the piezoelectric membrane before and after adsorption of gold colloids on its surface. Error bars represent the standard deviation of the measured resonant frequency for five experiments.

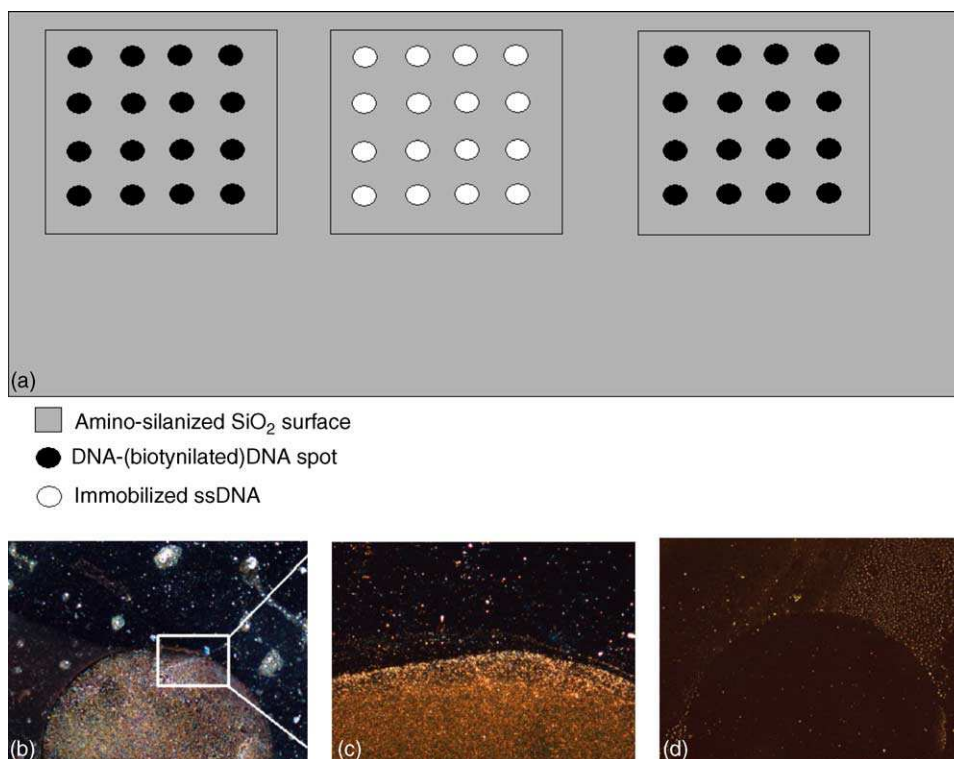


Fig. 10. (a) Schematic view (real scale is not respected) of the active areas delimited on a SiO_2 control sample used for the validation of the biotinylated DNA hybridization and biomolecular recognition by streptavidin–conjugated gold nanoparticles protocol. Examples of (b) one DNA–(biotinylated)DNA–(streptavidin/gold colloids) conjugates spot (50 \times), (c) detail of (b) (200 \times) and (d) one (single-strand)DNA–(streptavidin/gold colloids) conjugates spot (50 \times). The spots were observed under dark field mode (optical microscopy).

the active area of the device and consequently increasing the yield of the number of nanoparticles adsorbed per μm^2 of amino-silanized surface.

6.2. Dip-and-dry test for DNA hybridization detection

Again, 2 cm \times 2 cm silicon dioxide samples were coated by an amino-silane layer. The entire protocol of biotinylated DNA hybridization and biomolecular recognition using streptavidin–conjugated gold nanoparticles were carried out (as shown in Fig. 10). “Control spots” refer to zones where hybridization was not conducted to check the specificity of the interaction between the streptavidin–conjugated gold nanoparticles and biotinylated oligonucleotides. After deposition of 20 mL of gold colloids functionalized with streptavidin onto each one of the “active areas” (as depicted in Fig. 10(a)), control samples were incubated for 15 min, then washed with the hybridization washing buffer (SSPE: 20 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS) followed by rinsing steps under deionized water and pure ethanol and finally dried under nitrogen stream. The control samples were observed under an Olympus BX51M optical microscope (dark field observations) and the corresponding images are shown in Fig. 10(b–d). Notice that the biomolecular recognition of biotinylated DNA hybridization by streptavidin–conjugated gold nanoparticles (Fig. 10(b) and (c)) is highly specific compared to spots where DNA

hybridization was not performed (Fig. 10(d)). In the latter case, no interaction exists between the streptavidin that recovers the gold nanoparticles and aminated oligonucleotides first deposited onto the dendrimerized SiO_2 samples.

These validation protocols on control samples allowed the transfer of the entire protocol of biotinylated DNA hybridization on piezoelectric membranes that were formerly coated by a passivation silicon oxide film. Taking into account the complexity of this protocol, decision has been taken to perform dip-and-dry tests by using the piezoelectric membranes. This implies not using the FIA system but measuring of the resonant frequencies of the piezoelectric membranes before and after adsorption of the streptavidin–gold colloids conjugates.

In a first experimental step, the biochemical protocol starting to the amino-silanization of the SiO_2 surface, followed by the deposition of dendrimers, the aminated oligonucleotides depositing and biotinylated complementary oligonucleotides hybridization is conducted on a piezoelectric membrane chip already bonded and sealed to a TO8 package. The resonant spectrum of one piezoelectric membrane is traced by using the optical beam deflection technique. The resonant frequency corresponding to the fundamental resonant mode (0,0) is measured at 476 kHz. Then, 20 mL of gold colloids functionalized with streptavidin are deposited on the membranes chip. After 15 min of incubation time followed by immersion in washing buffer (SSPE: 20 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M

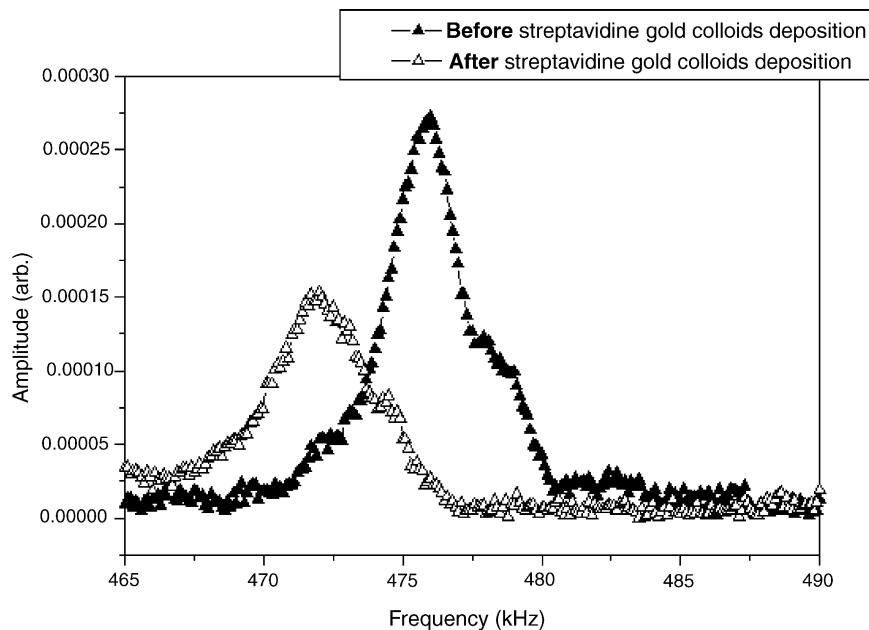


Fig. 11. (0,0) resonant frequencies measured before and after the deposition of streptavidin–conjugated gold colloids on the surface of a piezoelectric membrane where biotinylated DNA oligonucleotides were previously hybridized with complementary oligonucleotides sequences.

NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS) and by several rinsing steps under deionized water and pure ethanol, the chip was dried under nitrogen stream. The resonant spectrum is traced and the resonant frequency corresponding to the fundamental resonant mode (0,0) is again measured, its value being equal to 472.1 kHz.

As shown in Fig. 11, a resonant frequency shift equal to 3.9 kHz is recorded, indicating that the streptavidin–conjugated gold colloids are fixed by the biotinylated DNA oligonucleotides initially grafted on the surface of the piezoelectric membrane. Nevertheless, photographs of the membranes chip after completion of the entire protocol have shown that the biocompatible silicon sealant (that protects each bonding wire) was severely damaged by the succession of biochemical baths. Consequently, work is now in progress to complete the biological protocols before bonding the devices to the TO8 package. Further investigations are needed to estimate the global added mass brought by streptavidin–conjugated gold colloids in order to directly rely the shift of the resonant frequency to the grafting density of nanoparticles to the surface of the piezoelectric membrane.

7. Conclusion

In this paper, the behavior of micromachined resonating piezoelectric membrane-based biosensors operating in two fundamental different ways, namely integrated in a flow injection analysis (FIA) system and providing measurements by the “dip-and-dry” technique, has been investigated.

First, the micromachined resonating piezoelectric membranes have been developed and characterized. Secondly a suitable FIA system allowing real-time reaction kinetics track has been developed. Finally, the biosensor functionality of our devices has been validated in two ways: on the one hand, the piezoelectric membranes have been used to measure the real-time kinetics of gold colloid adsorption, the whole matrix being integrated into the FIA system. Here, mass sensitivity of the device has been estimated at -3.6 Hz/pg (i.e. several hundreds better than of state-of-art values for piezoelectric mass-sensing devices).

On the other hand, the dip-and-dry technique has been used to measure mass loading induced by the binding of streptavidin–conjugated gold nanoparticles to biotinylated target cDNA fixed onto the surface of the piezoelectric membranes. Measurements of resonant frequency of one piezoelectric membrane have been carried before and after adsorption of the streptavidin–gold colloids conjugates and a shift of the resonant frequency has been recorded meaning that the streptavidin–gold colloids are fixed by the biotinylated DNA oligonucleotides initially grafted on the surface of the piezoelectric membrane.

These results indicate that micromachined piezoelectric membranes have a real potential as micromechanical biosensors and could represent a real alternative to the quartz crystal microbalance-based biosensors. Further experimental work is in progress to avoid the optical detection technique by exploiting the self-sensing capabilities of the piezoelectric layer integrated into the device structure [7] and to use the FIA system to track the kinetics of the interaction of streptavidin–conjugated gold colloids with the biotinylated

DNA fixed on the piezoelectric membrane surface in real time.

References

- [1] R. Berger, E. Delamarche, H.P. Lang, C. Gerber, J.K. Gimzewski, E. Meyer, H.J. Güntherodt, Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold, *Science* 276 (1997) 2021–2023.
- [2] J. Fritz, M.K. Baller, H.P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.J. Güntherodt, C. Gerber, J.K. Gimzewski, Translating biomolecular recognition into nanomechanics, *Science* 288 (2000) 316–318.
- [3] H.-F. Ji, T. Thundat, In situ detection of calcium ions with chemically modified microcantilevers, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 337–343.
- [4] R. Raiteri, M. Grattarola, H.-J. Butt, P. Skladal, Micromechanical cantilever-based biosensors, *Sens. Actuat. B* 79 (2001) 115–126.
- [5] F. Caruso, E. Rodda, D.N. Furlong, Quartz crystal micro-balance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development, *Anal. Chem.* 69 (11) (1997) 2043–2049.
- [6] C. Köblinger, S. Drost, F. Alberl, H. Wolf, S. Koch, P. Woias, A quartz crystal biosensor for measurements in liquids, *Biosens. Bioelectron.* 7 (1992) 397–404.
- [7] M. Guirardel, L. Nicu, D. Saya, S. Hinh, J. Sicard, D. Lagrange, F. Mathieu, E. Cattan, D. Remiens, C. Bergaud, On-chip self-sensing function of 4×4 matrix micromachined resonating piezoelectric membranes for mass detection applications, in: *Proceedings of the 2004 IEEE International Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control 50th Anniversary Joint Conference*, Montreal, Canada, in press.
- [8] M. Guirardel, L. Nicu, D. Saya, Y. Tauran, E. Cattan, D. Remiens, C. Bergaud, Detection of gold colloid adsorption at a solid/liquid interface using micromachined piezoelectric resonators, *Jpn. J. Appl. Phys. Lett.* 43 (2004) L111–L114.
- [9] E. Uttenhaller, C. Köblinger, S. Drost, Quartz crystal biosensor for detection of the African Swine Fever disease, *Anal. Chim. Acta* 362 (1998) 91–100.
- [10] K. Ito, K. Hashimoto, Y. Ishimori, Quantitative analysis for solid-phase hybridization reaction and binding reaction of DNA binder to hybrids using a quartz crystal microbalance, *Anal. Chim. Acta* 327 (1996) 29–35.
- [11] B. Jaber, D. Remiens, B. Thierry, Substrate temperature and target composition effects on PbTiO_3 thin films produced in-situ by sputtering, *J. Appl. Phys.* 79 (1996) 1182–1185.
- [12] B. Jaber, D. Remiens, E. Cattan, P. Tronc, B. Thierry, Characterization of ferroelectric and piezoelectric properties of lead titanate thin films deposited on Si by sputtering, *Sens. Actuat. A* 63 (1997) 91–96.
- [13] R.D. Blevins, *Formulas for Natural Frequency and Mode Shape*, Krieger Publishing Company, Krieger Drive, Malabar, 1995, p. 241.
- [14] N. Maluf, *An Introduction to Microelectromechanical Systems Engineering*, Artech House MEMS Library, Boston, 2000.
- [15] N. Launay, A.-M. Caminade, R. Lahana, J.-P. Majoral, A general synthetic strategy for neutral phosphorus containing dendrimers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33 (1994) 1589–1592.
- [16] E. Trévisiol, V. Le Berre-Anton, J. Leclaire, G. Pratviel, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, J.-M. François, B. Meunier, Dendriscides, dendrichips: a simple chemical functionalization of glass slides with phosphorus dendrimers as an effective means for the preparation of biochips, *New J. Chem.* 27 (2003) 1713–1719.
- [17] M. Giesbers, J.M. Kleijn, M.A. Cohen Stuart, Interactions between acid- and base-functionalized surfaces, *J. Colloid Interf. Sci.* 252 (2002) 138–148.
- [18] QCM-D technique, Q-Sense AB, Göteborg, Sweden.
- [19] K. Cammann, Sensors and analytical chemistry. Sensitivity versus quality, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5 (2003) 5159–5168.

Biographies

Liviu Nicu was born in 1973 in Bucharest (Romania). After completing his Master of Electrical Engineering at the Paul Sabatier University of Toulouse (France) in 1997, he joined the Integrated Microsystems Group at the LAAS (Laboratory for Analysis and Architecture of Systems) of Toulouse where he got his PhD in 2000 into the Micromechanical Structures field. Between 2000 and 2003, he was R&D Engineer at Thales Avionics, Valence (France). His activities focused onto the development of micromechanical sensors for the civil and military navigation applications. Since 2003 he joined the Nanoaddressing and Nanobiotechnology Group at LAAS (Toulouse) as a full time CNRS (National Center of Scientific Research) researcher where he currently works in two main research fields: the development of (1) new resonant bio(chemical)sensors using M(N)EMS technologies and of (2) cantilever-based microsystems for contact deposition of small amounts of biological samples for biochip applications.

Matthieu Guirardel was born in Sarlat-la-Caneda in 1977. He received the ENSEA (Graduate School in Electronic and Electrical Engineering at Cergy, France) engineering degree in electronics in 2000 and the same year, a fifth year diploma (DEA) in electronic and instrumentation from University Paris VI. Currently, he is preparing for the PhD degree in electronics at the Laboratory for Analysis and Architecture of Systems–CNRS, Toulouse, France. His research involves the development of microelectromechanical biosensors.

Frédéric Chambosse was born in 1981 in Abidjan (Ivory Coast). After a Master of Sciences & Techniques in Pollution Treatment at the University of Pau (France) obtained in 2003, he prepared a Master of Nanotechnology at the University of Burgundy (Dijon, France). In 2004, he joined the Nanoaddressing and Nanobiotechnology Group at LAAS (Toulouse), as a Master student, where he worked on the realization of a Flow Injection Analysis System. Since 2005, he works as Water Treatment Engineer in Lille (France) on membranes' technology.

Pierre Rougerie was born in 1978 in Paris (France). After completing his Master of Biochemistry at the Burgundy University of Dijon (France) in 2003, he has specialized for a final year in Nanobiotechnology at the physics department, Dijon, Burgundy. During his training course at the LAAS-CNRS (Toulouse), his activities focused onto the development of micromechanical sensors for biochemical applications.

Sary Hinh was born in 1980 in Sisophon (Cambodia). In 2001, he got the Bachelor of Electronics and Automatism at the Paris XIII University (France). Between 2001 and 2004, he studied at the ENSEA electrical graduate school (France). For the graduation project, he worked at the Nanoaddressing and Nanobiotechnology Group at LAAS (France) in 2004. He developed the electrical actuation and detection with an integrated piezoelectric film of resonant micromechanical biosensors. Since he completed his Master of Electrical Engineering in 2004, he has joined the Summit Profit Technology company (China) where he programs the software for the portable DVD players with LCD panel.

Emmanuelle Trevisiol received her M Sc degree in Biochemistry from the J. Fourier University (Grenoble, France) in 1996 and her PhD in Biorganic Chemistry (LEDSS, Grenoble, France) in 1999. She did research on the synthesis of modified triphosphates and the post-labelling of DNA for diagnostic purpose. She then took a postdoctoral fellowship at the Genopole of Toulouse (France) between 2000 and 2002. She joined the biochip platform group (Toulouse) as a full time researcher (CNRS). Her current scientific interests focus on the functionalization of glass and silicon slides for biochip applications (DNA, protein or carbohydrate chips).

Jean M Francois was born in 1959 in Mons (Belgium). He got his PhD in Agronomy and Biochemical Engineering at Catholic University of Louvain (Belgium) in 1988, and then spend 4 years of post-doctoral periods in North Carolina University of Raleigh (USA) and in CNRS (Bordeaux and Paris). He was appointed in 1993 full professor of Biochemistry and

Molecular Microbiology at the National Institute of Applied Sciences, Toulouse. He runs a group of 20 people working in the field of Industrial Microbiology and biotechnology, and as the leader of the Biochips platform of Toulouse Genopole, he is deeply involved in the development and validation of new DNA and proteins chips, in collaboration with the Nanoaddressing and Nanobiotechnology Group of LAAS and laboratory of Chemistry and Coordination of CNRS in Toulouse. He is author or co-author of more than 85 peer-reviewed papers and several patents.

Jean-Pierre Majoral received his PhD from the Université Paul Sabatier of Toulouse in 1972. In 1972–1973, he worked as a postdoctoral fellow with Prof. A. Katritzky (University of East Anglia, Norwich, U.K.). He became Directeur de Recherche at the Centre National de la Recherche Scientifique in Toulouse in 1978, where he is presently Directeur de Recherche Classe Exceptionnelle. His research interest is mainly focused on the use of main group elements, especially phosphorus, in different areas of chemistry. Presently, he and his research team are involved in the preparation, properties, and applications of macromolecules such as dendrimers and hyperbranched polymers. Emphasis is also laid on the studies of interactions between heavier main group elements and group 4 elements (titanium, zirconium, hafnium) with applications in organic and organometallic chemistry. He is a member of the Polish Academy of Sciences and of the Academia Europaea and has published more than 380 publications and patents.

Anne-Marie Caminade was born in Carmaux (France). She received two PhDs in Toulouse (France) in 1984 and 1988. She worked as a post-doc at the Institut Français du Pétrole (Paris, 1984) and in Pr. M. Veith's group (1988–1989, Saarbrücken, Germany). She is working since 1985 at the

French CNRS in Toulouse with Jean-Pierre Majoral, where she is “Director of Researches” since 1997. Her research interest is on Main group elements. She developed several aspects of the chemistry of phosphorus, including low coordinated compounds, coordination of transition metals, reactivity of metallic hydrides, synthesis of macrocycles. Her current research interest is on the synthesis, reactivity and study of properties of dendrimers. She is co-author of 200 publications and 20 patents.

Eric Cattan was born in 1964 in Bordeaux (France). He received his PhD degree in process engineering and optronics from Paris XI University, Orsay in 1993. He joined the Laboratory des Matériaux Avancés Céramiques in 1994 and l'Institut d'Electronique et de Microélectronique du Nord in 2002. His activities include ferroelectric thin-film growth, ferroelectric and piezoelectric measurement and, more recently, the defects induced by ion beam etching on ferroelectric thin films.

Christian Bergaud was born in Domont (France) in 1968. He received the engineer degree in physics from the National Institute of Applied Sciences in Lyon (France) in 1991 and the PhD degree in electronics from the National Institute of Applied Sciences in Toulouse (France) in 1994. Between 1995 and 1996, he was a postdoctoral fellow at the University of Tokyo where he studied the development of microsystems dedicated to metrological applications. From January 1997 to March 2004, he was a CNRS researcher at the Laboratory for Analysis and Architecture of Systems (LAAS) at Toulouse. In April 2004, he was appointed director of the LIMMS/CNRS-IIS (Laboratory for Integrated Micro Mechatronics Systems), a joint laboratory between the French CNRS and the University of Tokyo. His research involves physical characterization of micro and nanostructures and the development of novel approaches to design micro and nanosystems for biological applications.

Nanostructuring surfaces with conjugated silica colloids deposited using silicon-based microcantilevers

Thierry Leïchlé¹, Miguel Manso Silvan², Pascal Belaubre¹,
Andrea Valsesia², Giacomo Ceccone², François Rossi²,
Daisuke Saya¹, Jean-Bernard Pourciel¹, Liviu Nicu^{1,4}
and Christian Bergaud³

¹ LAAS-CNRS, 7, Avenue du Colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex 4, France

² European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection, 21020 Ispra (Va), Italy

³ LIMMS/CNRS-IIS, UMI 2820, University of Tokyo, 4-6-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505, Japan

E-mail: nicu@laas.fr

Received 20 October 2004, in final form 6 January 2005

Published 21 February 2005

Online at stacks.iop.org/Nano/16/525

Abstract

In this paper, the assembly and stability of locally spotted spherical nanoparticles onto various substrates are studied. Arrays of silicon-based microcantilevers, combined with an automated three-stage spotter, are used to deposit picolitre droplets containing 300 nm diameter polyethylene glycol and 150 nm diameter amino conjugated silica nanospheres onto silicon, allylamine and acrylic acid surfaces. Matrices of colloid spots ranging from 10 to 100 μm in diameter have been successfully patterned. SEM characterizations of the nanoparticles' geometry and spatial distribution within the spots were carried out, showing the colloid aggregation at the droplet's rim and the selective stability of the printed patterns. The expected substrate functionalization was assessed by XPS characterizations of the nanoparticles' surfaces. Finally, polyethylene glycol–SiO₂ nanoparticle conjugates were used as masks during a selective reactive ion etching of the silicon substrate, and silicon nanopillars have been obtained. This work opens up possibilities of high spatial resolution nanopatterning with nanoparticle conjugates.

1. Introduction

Biosensors are a rapidly progressing field in modern science, involving the integration of biomaterials such as enzymes, antigen–antibodies or DNA with electronic elements such as field-effect transistors or MEMS with the aim of transducing biological events occurring on these elements by 'easy-to-treat' physical signals [1]. In general, a biosensor consists of two parts, i.e. a transducer and an affinity-based interface which lead to the variation of a physical quantity when the analyte of interest binds to the sensor system. The sensitivity of these affinity-based biosensors depends on the amount of

receptor molecules immobilized on the sensor surface, as well as the amount of target molecules arriving on the sensor surface during the measuring process. Related to this, two ways of artificially increasing the intrinsic sensitivity of a biosensor have been recently addressed in the same manner, i.e. by using the conjugation of nanoparticles either with the receptor or target molecules [2]. If the former approach allows a higher immobilization degree of bioreceptor molecules per unit area [3], the latter allows for forming high molecular-weight units that make these conjugates ideal labels for microgravimetric analyses [4, 5].

Nevertheless, the continuous need for more and more miniature biosensors combined with the potential for parallel

⁴ Author to whom any correspondence should be addressed.

detection (e.g. in the screening for active compounds) requires new tools that should be able to bring the nanoparticle-based conjugates precisely on the transducer surface (biopatterning experiments). So far most biopatterning and nanopatterning experiments have been carried out using microcantilever-based atomic force microscopy (AFM) probes [6–10]. With an AFM probe, the sample forms a thin molecular layer on the tip surface and around its base area. When placed in contact with a surface, the species migrate from the tip onto the surface. This approach allows the local deposition of colloids into nanometre scale clusters without the possibility of printing several spots simultaneously. Besides, this tool is not well-suited for larger deposition areas. In contrast, matrices of micrometre size liquid drops can be obtained with commercial printing equipments [11]. However, these tools are usually very expensive and the droplet's diameter reaches at least 60 μm .

In this paper, a method for fabricating nanostructured well-defined spots with biospecific chemical functionalities is presented. This method has been carried out using arrays of silicon-based microcantilevers by depositing spots of nanoparticles using a direct contact deposition technique. The same approach has been used in the past, where arrays of more than a hundred spots, from the femtolitre to the picolitre range, containing fluorescent-labelled oligonucleotides and proteins, were directly patterned on a glass slide [12]. Here, functionalized amorphous silica nanospheres were deposited on coated silicon surfaces, and the resulting nanostructured spots were studied by SEM. The selection of the SiO_2 face to polymeric nanoparticles was based on the possibility to saturate the surfaces of the former with functional amino groups [13] or antifouling polyethylene glycol (PEG) derivatives. These aspects further support the idea of the use of the nanoparticles as active parts of biomedical devices, such as biosensors and tissue engineering supports.

2. Experimental setup

2.1. Sphere synthesis

PEG-600 and amino surface ended amorphous silica nanospheres were synthesized by modifying the standard method of precipitation of alkoxides described by Stöber [14]. We took advantage of the self-adsorption of the organic PEG to the hydrolysed alkoxide at basic pH to obtain silica nanospheres with PEG saturated surfaces. Amino functionalized nanoparticles were obtained by co-precipitation with an aminosilane. The PEG-600 batch was synthesized by adding into the reaction beaker an aqueous solution of NH_3 , PEG-600 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), absolute ethanol and tetraethoxysilane (TEOS) respecting the mentioned addition order (all from Fluka, Buchs, Switzerland if not otherwise mentioned). The final concentrations of the precursors were as follows: NH_3 0.2 M, PEG-600 0.02 M and TEOS 0.2 M. In the case of amino functionalized beads, we added 0.01 M aminopropyltriethoxysilane (APTS) replacing PEG-600. The reaction was carried out at 25 °C without stirring until precipitation and then left in the reaction medium for 24 h. In order to change to the ethanol storing medium, the nanospheres were centrifuged in 15 ml vials at 5000 rpm

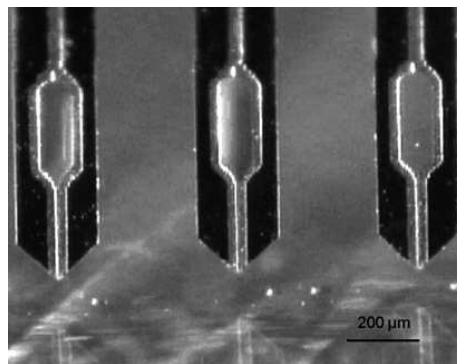


Figure 1. Optical photograph of microfabricated cantilevers.

and 20 °C. The remaining unreacted liquid was eliminated. Finally, the nanospheres were re-suspended after refilling with ethanol up to the original synthesis concentration of $1.5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$.

2.2. Colloid characterization

The nanoparticles' geometry was studied by SEM, while surface characterization was done by x-ray photoelectron spectroscopy. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was performed using an Ultra XPS from KRATOS Analytical equipped with a monochromatic $\text{Al K}\alpha$ source (150 W). Survey (0–1150 eV binding energy (BE) pass energy of 80 eV) and high resolution spectra (20 eV pass energy) were obtained at 90° take off angle (operating pressure 2×10^{-9} Torr). The surface charge was compensated by a flood gun referring all peak energies to the BE of the hydrocarbon peak at 285.0 eV. High resolution C 1s and O 1s spectra were peak fitted, after a linear background subtraction, with a G/L function by using the equipment software. Quantitative analysis was performed using element peak areas measured on survey spectra and software referenced relative sensitivity factors (RSF).

2.3. Substrate preparation

Three different kinds of substrate were used for the deposition of nanoparticle droplets. Silicon substrates (100, n-type, 1–3 $\Omega \text{ cm}$) were cleaned by subsequent ultrasonic baths of trichloroethylene, acetone and ethanol. In order to diversify the wettability and the chemical functionalities of the substrates, two wafers were covered with plasma polymerized allylamine (ppAL) and acrylic acid (ppAA), respectively. The deposition of both polymers was carried out in a capacitively coupled reactor as previously described [15]. Basically, optimized films were obtained at 35 mTorr, with a 20 W discharge (RF 13.56 MHz) of the precursor (AL or AA, Sigma-Aldrich) assisted by 6 sccm Ar flow.

2.4. Deposition tool and procedure

The deposition system consists of a silicon-based microcantilever array fixed on a three-stage automated spotter. The chip array, including four cantilevers, is fabricated using conventional microfabrication techniques [12, 16]. The cantilevers, shown in figure 1, are 2 mm long, 210 μm wide and 5 μm thick. A slit and a reservoir are incorporated in the cantilever

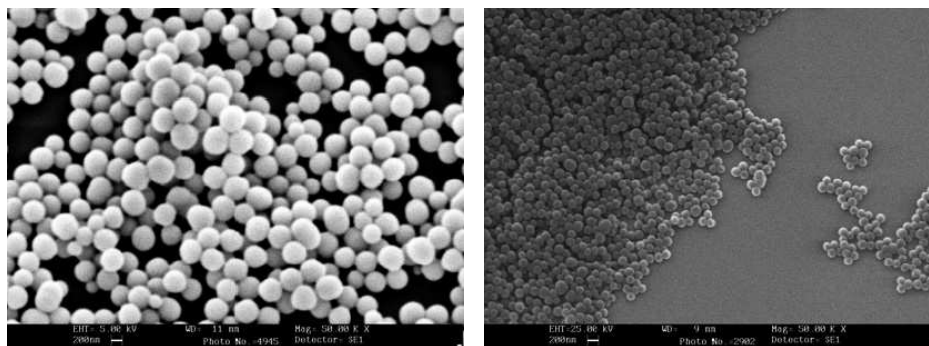


Figure 2. SEM detailed view of PEG-600 (left), and APTS (right) conjugated SiO₂ nanoparticles.

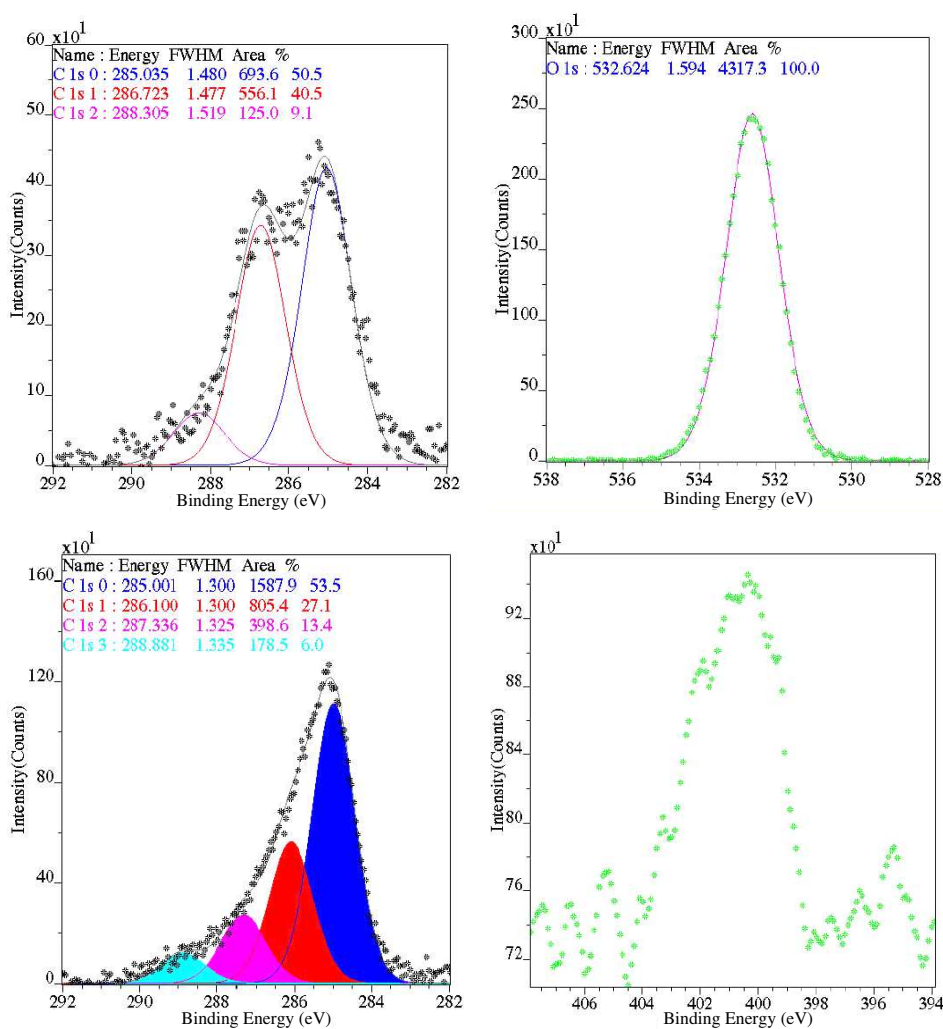


Figure 3. XPS spectra corresponding to PEG-600 nanoparticles (top, C 1s left, O 1s right) and APTS nanoparticles (bottom, C 1s left, N 1s right).

(This figure is in colour only in the electronic version)

for liquid loading and deposition. The loading is currently done by immersing the cantilevers in the liquid to be deposited, the slit being filled via capillary forces. Droplet formation occurs when the tip of the cantilever touches the depositing surface. The automated spotter is a home-made XYZ motion control system combined with a ceramic piezoactuator for precise positioning of the cantilevers with respect to the surface.

Displacement along each axis is done by a PC controlled step-by-step servo-motor enabling 0.5 μm steps.

The experimental protocol started with loading the cantilevers. The cantilever's tip was dipped into a reservoir containing the nanoparticle suspension for a few seconds. The cantilever array was then moved on top of the depositing surface using the XYZ motion control system. Liquid droplet

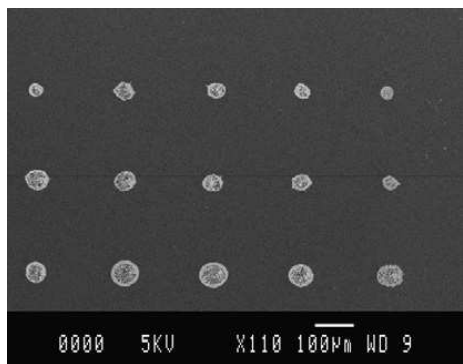


Figure 4. SEM image of a matrix of PEG-600 nanoparticle spots on a silicon substrate.

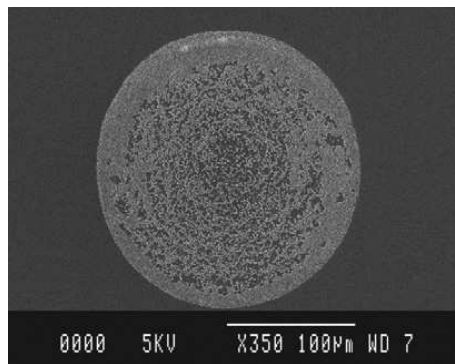


Figure 6. SEM picture of a spot of PEG-600 nanoparticles on a silicon substrate.

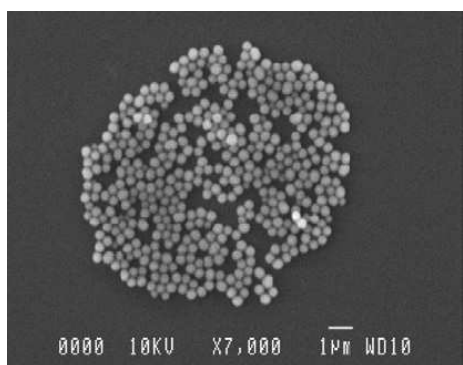


Figure 5. SEM picture of a spot of PEG-600 nanoparticles on a ppAL substrate.

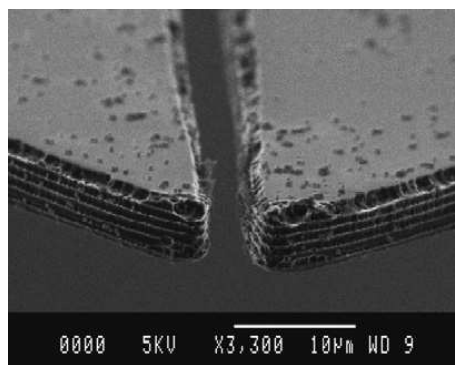


Figure 7. SEM view of the tip of a depositing cantilever.

Table 1. Surface composition of the PEG-600 and APTS conjugated SiO₂ nanoparticles as derived from XPS analysis.

Sample \ at. conc. (%)	C	O	Si	N
PEG-600	10	53	37	0
APTS	19	50	27	4

formation was finally achieved by putting the cantilever's tip in contact with the substrate surface. Because of the better time response, a ceramic piezoelectric actuator was used for this process step, enabling a better control of the contact time and thus the volume to be deposited. Matrices of up to a hundred spots were obtained by combining the deposition step with an *XY* translation, without the need for a refill.

3. Results and discussion

The synthesized nanoparticles were observed by SEM prior to their use in the microspotter in order to identify the mean particle size and geometry. Figure 2 presents the images corresponding to PEG-600 (left) and APTS (right) nanoparticles. Both showed well defined spherical shapes with mean sizes of 300 and 150 nm for PEG-600 and APTS, respectively.

In order to illustrate the surface properties of the nanoparticles, and thus the surface properties of the printed spots, a surface characterization was performed using x-ray photoelectron spectroscopy. An element analysis was extracted from widescan spectra. The results confirmed

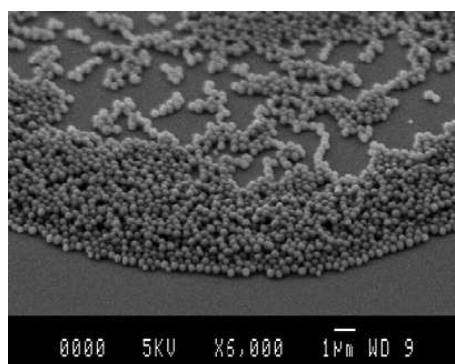


Figure 8. SEM close-up view of a spot of PEG-600 nanoparticles on silicon.

that the PEG-600 contained a higher oxygen surface content while the presence of nitrogen was confirmed onto the APTS nanoparticles (table 1). The chemical structure of the nanoparticle's surface was further investigated by performing high resolution spectra. The C 1s spectrum corresponding to the surfaces of PEG-600 beads is presented on the top of figure 3. The spectrum was satisfactory reproduced by using three components that stand for C–C–C (285.0 eV), C–C–O (286.7 eV) and O–C–O (288.3 eV) bonds, respectively. The relatively high intensity of the second component represents the surface presence of PEG-600 fragments at almost the same intensity corresponding to the ethoxy radicals remaining on the surface from the TEOS precursor. The monocomponent shape of the O 1s spectrum (532.7 eV) further confirms that oxygen is almost only present in a single bonded organic

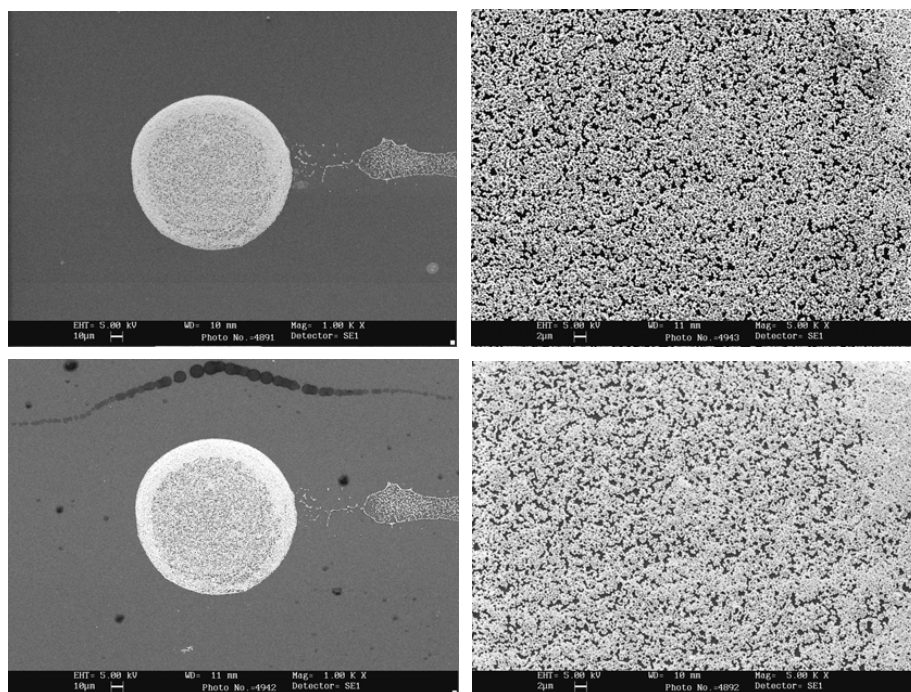


Figure 9. SEM images corresponding to PEG-600 nanoparticles on ppAL substrate before (top) and after rinsing (bottom).

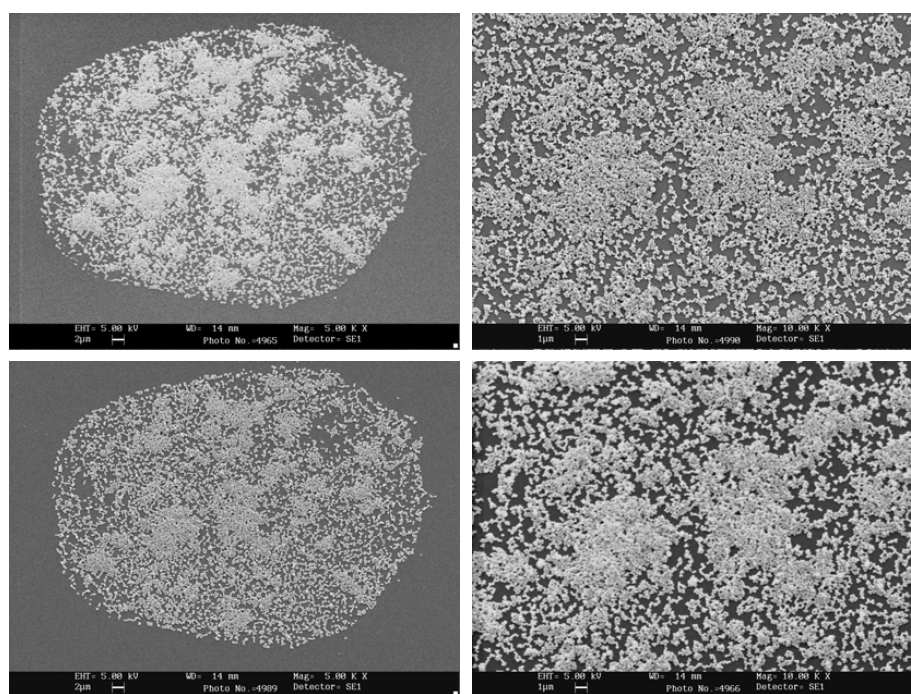


Figure 10. SEM images corresponding to APTS nanoparticles on ppAL substrate before (top) and after rinsing (bottom).

structure O–C. In the case of the APTS surfaces, the C 1s spectrum is deconvoluted with four contributions (figure 3, bottom). The assignment of the contribution at 286.1 eV to C–N bonds is confirmed by the N 1s spectrum presented on the right-hand side.

A CCD camera was used to observe droplet formation during the printing of the colloidal suspension on the different substrates. The deposition procedures were carried out under ambient conditions, i.e. temperature of 21 °C and humidity

level of about 50%. As expected, because of evaporation, droplet formation did not occur when the medium solvent consisted of only ethanol or water. To prevent evaporation, two agents were examined: dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol. DMSO was not compatible with the colloidal solution because the suspension flocculated after DMSO was added. This was probably due to a hydrolytic process induced on the silica beads by DMSO. However, the addition of at least 25% of glycerol led to a successful liquid deposition.

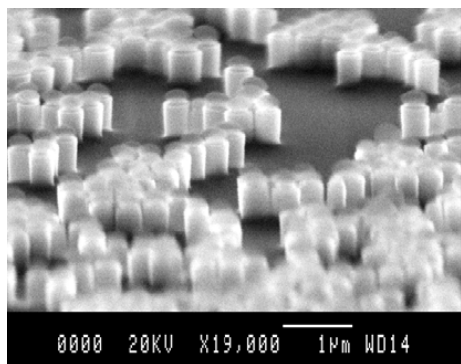


Figure 11. SEM picture of the silicon pillars obtained after a dry etch of a silicon substrate patterned with silica nanoparticles.

SEM observations were then carried out to characterize the droplets, check the presence of nanoparticles and study their spatial uniformity. The observations showed that PEG-600 functionalized silica nanoparticles were present on the three types of substrate (as shown for a silicon substrate in figure 4). By varying the contact time during deposition, droplets of various diameters, ranging from about $10\ \mu\text{m}$ (figure 5) to more than $100\ \mu\text{m}$ (figure 6), have been obtained. An SEM picture of the tip of a depositing cantilever proved that the absorption of colloidal nanoparticles onto the cantilever surface did not block the channel and its aperture (figure 7). Leaving the samples drying for a couple of days after printing seemed to result in spots of poor uniformity, the density of nanoparticles being higher on the edge of the droplet than in its centre (figure 8). This result was due to the solvent capillary flow that carried particles at the rim of the droplet during its slow drying [17]. Finally, the deposition of amino functionalized beads was not as successful because the nanoparticles tend to aggregate, thus lowering the spot uniformity. The aggregation of this kind of nanoparticle was of relevance even in previous steps as observed during the re-suspension of centrifuged products.

Even if the aggregation of colloids is inhibited in the case of PEG radicals (due to the self-repulsion of these chains in water), the self-organization through capillary forces did not lead to well defined areas of nanoparticle monolayers. In order to obtain homogeneous monolayer particle spots, a control of the colloid density, colloid surface properties and rate of evaporation is needed. The first parameter is critical as it dictates the importance of the capillary forces acting on the colloid arrangement after deposition. Too high concentrations initiate capillary forces before an initial settlement, while too low concentrations lead to a lack of surface coverage. The surface properties of the colloids determine the effectiveness of the capillary forces in the particle transport. In general, the rate of evaporation can be used to correct some trends. For instance, the organization of a highly concentrated solution can be improved by a reduced evaporation rate, allowing particle settlement to occur before capillary forces become dominant.

Regarding the spot stability in aqueous media, the formed colloidal structures were observed to be selectively stable. In fact, dipping samples into distilled water for 5 min did not induce changes in any of the surfaces, even when comparing 100 nm details. A comparison before and after rinsing with the PEG-600 nanoparticles is presented in figure 9. On the

other hand, the excitation in ultrasounds completely removed the colloidal pattern. This selectivity in stability is of essential interest for applications in which the nanoparticles are used as masks for creating patterns on substrates. The same kind of selective behaviour was observed in the case of the smaller APTS nanoparticles, as observed in figure 10. The physical and chemical stability of the particles was tested by a silicon dry etch. The PEG-600 SiO_2 nanoparticles were used as masks during a selective reactive ion etching (RIE) of the silicon substrate. The etching operation was carried out using C_4F_8 , SF_6 , and O_2 gas sources. As shown in figure 11, silicon pillars have been obtained, on which the masking silica nanospheres can still be seen. Further works on the optimization of the etching parameters are under way to create nanopillars with higher aspect ratio.

4. Conclusion

In summary, a method to pattern spots of nanoparticles has been developed. Silicon-based microcantilevers have been used to deposit picolitre droplets containing functionalized silica beads onto coated silicon surfaces. Loading of the cantilevers was achieved by immersing the cantilever's tip in the colloidal suspension, and droplet formation was done by a contact deposition technique via liquid transfer from the cantilever's tip to the substrate surface. By combining the microfabricated array of microcantilevers with an automated three-stage spotter, up to a hundred spots could be patterned without the need to reload the cantilevers. 300 nm polyethylene glycol and 150 nm amino surface ended amorphous silica nanospheres were synthesized and successfully printed onto silicon, allylamine and acrylic acid surfaces, resulting in $10\text{--}100\ \mu\text{m}$ diameter spots. Characterizations of the nanoparticle's surface, geometry and spatial distribution within the spots were carried out by using XPS and SEM. As expected, the deposited spots exhibited a higher density of nanoparticles along the triple contact line and has demonstrated to be selectively stable. These results are very promising for the development of miniaturized biosensors requiring precise and local deposition of nanoparticle-based conjugates on transducers surfaces.

Acknowledgments

The authors are deeply thankful to Dr F Carcenac (LAAS-CNRS) for carrying out the RIE process. The partial financial supports of the EC-funded project NaPa (Contract no. NMP4-CT-2003-500120) and the Nano2Life European Network of Excellence (Contract no. NMP4-CT-2003-500057) are gratefully acknowledged. The content of this work is the sole responsibility of the authors.

References

- [1] Gizeli E and Lowe C R (ed) 2002 *Biomolecular Sensors* (London: Taylor and Francis)
- [2] Katz E and Wilner I 2004 *Nanobiotechnology* ed C M Niemeyer and C A Mirkin (Weinheim: Wiley-VCH Verlag) chapter 14, pp 200–26
- [3] Lavrik N V, Tipple C A, Sepaniak M J and Datskos P G 2001 *Chem. Phys. Lett.* **336** 371–6

- [4] Zhou X C, O'Shea S J and Li S F Y 2000 *Chem. Commun.* 953–4
- [5] Patolsky F, Ranjit K T, Lichetnstein A and Wilner I 2000 *Chem. Commun.* 1025–6
- [6] Jaschke M and Butt H J 1995 *Langmuir* **11** 1061–4
- [7] Piner R D, Zhu J, Xu F, Hong S and Mirkin C A 1999 *Science* **283** 661–3
- [8] Ben Ali M, Ondarçuhu T, Brust M and Joachim C 2002 *Langmuir* **18** 872–6
- [9] Garno J C, Yang Y, Amro N A, Cruchon-Dupeyrat S, Chen S and Liu G 2003 *Nano Lett.* **3** 389–95
- [10] Meister A, Liley M, Brugger J, Pugin R and Heinzelmann H 2004 *Appl. Phys. Lett.* **85** 6260–2
- [11] TeleChem International, Inc. <http://arrayit.com>
- [12] Belaubre P, Guirardel M, Garcia G, Pourciel J B, Leberre V, Dagkessamanskaya A, Trevisiol E, François J M and Bergaud C 2003 *Appl. Phys. Lett.* **82** 3122–4
- [13] Vacassy R, Flatt R J, Hofmann H, Choi K S and Singh R K 2000 *J. Colloid Interface Sci.* **273** 302–15
- [14] Stober W, Fink A and Bohn E 1968 *J. Colloid Interface Sci.* **26** 62–9
- [15] Silvan M M, Valsesia A, Ceccone G, Colpo P and Rossi F 2004 *Appl. Nanosci.* **1** 47–50
- [16] Belaubre P, Guirardel M, Leberre V, Pourciel J B and Bergaud C 2003 *Sensors Actuators A* **110** 131–6
- [17] Deegan R D, Bakajin O, Dupont T F, Huber G, Nagel S R and Witten T A 1997 *Nature* **389** 827–9

Free-standing protein films for dynamic mode detection of cations binding

Daisuke Saya

Laboratory for Analysis and Architecture of Systems - CNRS, 31077 Toulouse, France

Anthony W. Coleman and Adina N. Lazar

Institute of Biology and Chemistry of Proteins - CNRS, 69 367 Lyon, France

Christian Bergaud

Laboratory for Integrated Micro-Mechatronic Systems - LIMMS/CNRS-IIS (UMi2820),
Institute of Industrial Science, University of Tokyo, Tokyo 153-8505 Japan

Liviu Nicu^{a)}

Laboratory for Analysis and Architecture of Systems - CNRS, 31077 Toulouse, France

(Received 21 January 2005; accepted 11 July 2005; published online 29 August 2005)

This letter reports on the investigation of the mechano-chemical effect of cross-linked dried free-standing alpha-lactalbumin (α -lactalbumin) thin films induced by different cation, calcium, magnesium, and potassium binding. The protein membranes were fabricated by drying droplets of an α -lactalbumin solution on top of silicon through-wafer holes obtained by deep reactive ion etching. Then the membranes were consecutively exposed to solutions of the cations in HEPES buffer solution while their resonant frequencies were measured by full-field surface stroboscopic white light interferometry. Tests on more than 30 free-standing protein films showed more significant conformational changes of the α -lactalbumin after immersion in a calcium solution than those observed after immersion in magnesium and potassium solutions. These results demonstrate, the real potential of free-standing protein films to be used as resonant biosensors for multiple cation detection. © 2005 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.2035872]

The increasing recent interest in proteins as sensing agents of their specific ligands has led to the development of various types of sensors having a sensitive layer based on a protein thin film. Besides the various methods of detection of the protein-ligands interaction that could be classified as “conventional” (e.g., optical detection of fluorescent-labelled ligands) one can cite the mechano-chemical transduction method that exploits the change of mechanical properties induced by the change of molecular structure when protein films chemically bind their ligands. The use of this effect for detecting interactions between bio-macromolecules was reported, for the first time, by Morozov and Morozova.¹ They tested a number of different proteins in the form of cross-linked film, pointing out that conformational changes caused by specific binding can be measured by a conventional force sensor. So far, most of applications using the mechano-chemical effect for detecting interactions between bio-macromolecules have used micromachined cantilevers.²⁻⁴ Despite the high sensitivity and the high-throughput potential of this method, care must be taken with regard to the physicochemical aspects of the adsorption of bio-macromolecules on the solid surface of the cantilevers in order to preserve the native conformation of the proteins. Recently, a different approach to use mechano-chemical effect for detecting bio-macromolecule interactions proposed the utilization of free-standing protein films⁵ thus avoiding the difficulties inherent in the protein-surface interactions. The authors prepared α -lactalbumin (α -LA) protein thin films by the electrospray deposition method⁶ and studied the mechano-chemical response of the free-standing protein film to calcium ions

showing that the biological activity of the protein was preserved. The measurement system used allowed detection of the isometric tension changes of the protein film in a quasi-static way, i.e., by pulling at low frequencies the protein film with a piezoelectric actuator and by measuring the tension induced in the film with a conventional force sensor.

This letter reports on the investigation of the mechano-chemical effect of cross-linked dried free-standing α -LA thin films induced by different cations (calcium- Ca^{2+} , magnesium- Mg^{2+} , and potassium- K^{+}) binding. Ca^{2+} , Mg^{2+} , and K^{+} are biologically important cations and their detection is important in clinical applications.⁷⁻⁹ Since only trace amounts of those cations exist in certain pathologies, ultra-sensitive sensors are always needed. The physicochemical properties of these cations differ significantly with Mg^{2+} having always an octahedral hydration sphere with slow exchange of aqueous ligands; K^{+} having, in general, an octa-

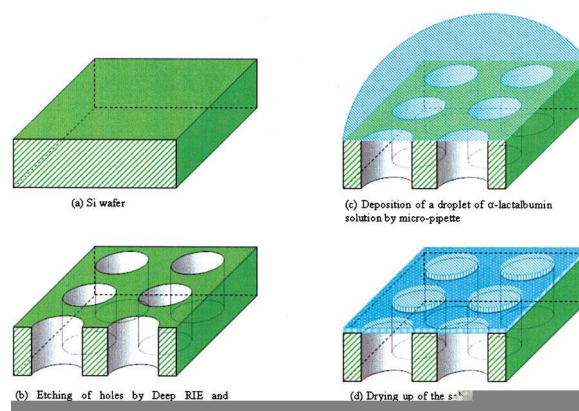


FIG. 1. (Color) Fabrication process of free-standing α -lactalbumin film.

^{a)} Author to whom correspondence should be addressed; electronic mail: nicu@laas.fr

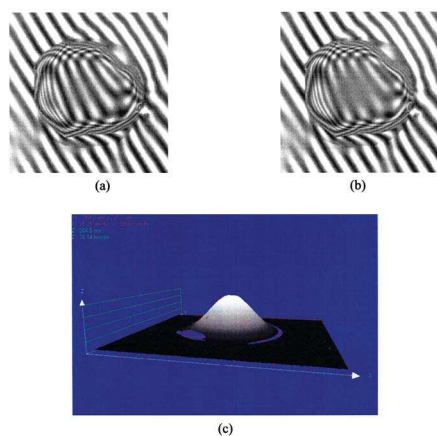


FIG. 2. (Color) Monochromatic homodyne interferometry image of free-standing α -lactalbumin film (a) excited at off-resonance frequency; (b) excited at the resonance frequency. (c) Topography of vibration shape at the resonance obtained by stroboscopic illumination.

hedral hydration sphere with fast exchange of water; and Ca^{2+} having a highly variation hydration geometry and rapid exchange of aqueous ligands. In biological systems there are also very considerable differences between the cations, with large differences between extra- and intracellular concentrations; in particular, the intracellular concentration of free Ca^{2+} cations is highly regulated.¹⁰ The detection method described here relies on the measurement of the resonance frequency shifts of the α -LA thin film due to the conformational changes of the protein when different cations are specifically binding on. The α -LA thin films described here are free-standing in the sense that they are not deposited on any other solid substrate.

α -LA is a small ($M_r=14\,200$), acidic ($pI=4-5$), Ca^{2+} binding milk protein which is very important from several points of view, as reported by Permyakov and Berliner.¹¹ One of these points is that α -LA possesses a single strong Ca^{2+} binding site^{12,13} and for this reason it is frequently used as a simple model Ca^{2+} binding protein. The other point is that it has been reported that some forms of α -LA can induce apoptosis in tumor cells,¹⁴ which suggests that this protein can fulfill many important biological functions. It should be pointed out that besides calcium, α -LA binds other physiologically significant cations such as Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , and K^+ , but more weakly, which can compete with Ca^{2+} for the same binding site¹⁵ inducing similar, albeit smaller, structural changes in α -LA.

Fabrication process of a α -LA free-standing film is depicted in Fig. 1. First, a 20- μl droplet of 2.5 mg/ml solution of α -LA (Type III, from bovine milk, product L6010, Sigma Aldrich) in pure water is deposited on the top of one through silicon (Si) wafer hole (obtained by deep reactive ion etching) with a diameter equal to 200 μm . The droplet is dried up during several hours at room temperature. Since the silicon substrate is hydrophobic as a consequence of previous functionalization step by methyl-terminated self-assembled monolayers (*n*-octyltrimethoxysilane, ABCR), the α -LA solution droplet does not spread inside the hole. Finally, the α -LA film is cross-linked as a result of its exposure to 25% glutaraldehyde vapours during 20 min at 20 $^\circ\text{C}$. As could be seen from the color of fringes, the thickness is not uniform all over the surface of the membrane, going from about 300 nm at the center of the free-standing film to 2 μm at the

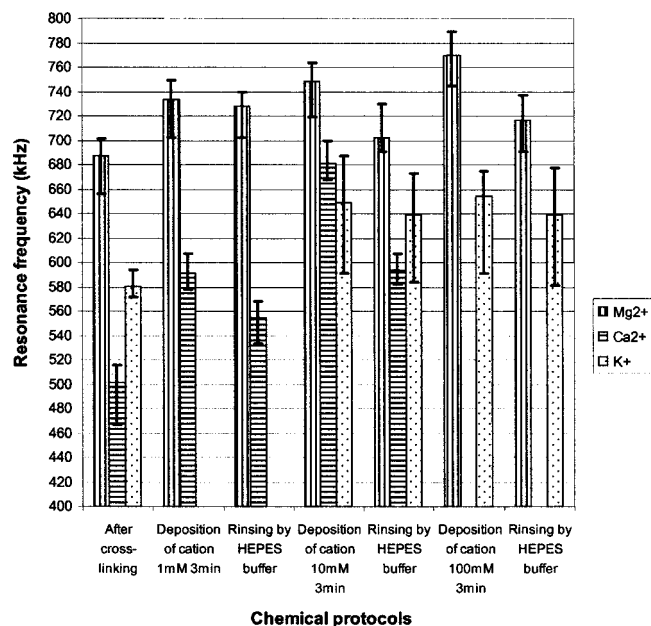


FIG. 3. Evolution of resonance frequencies of free-standing α -lactalbumin films depending on the binding of cations (Mg^{2+} , Ca^{2+} , and K^+). Error bars represent the standard deviation of the measured resonant frequency for five different experiments for each tested cation.

border. After the fabrication, the substrates with the free-standing α -LA films were stored in HEPES buffer solution (10 mM HEPES+NaCl 10 mM, pH 7.4) in freezer at 4 $^\circ\text{C}$ during two months before use, thus allowing the evaluation of stability in time of the protein films.

The resonant frequencies of the protein membranes, as well as their vibration mode shapes, have been measured by full-field surface stroboscopic white light interferometry.¹⁶ The excitation of the protein membranes was obtained by means of an external piezoelectric actuator onto which the sample was previously glued. All the measurements were performed in air as soon as each chemical protocol had been realized. When the film is vibrated at the resonance frequency, the optical fringe becomes distorted, as shown in Figs. 2(a) and 2(b). Figure 2(c) shows the shape of vibration of the film at the resonance of fundamental mode obtained by stroboscopic illumination. The resonance frequency of the fundamental mode is around 600 kHz and depends on the thickness of the protein film during the fabrication process. Actually it has been noted that the thickness is not uniform all over the surface of the membrane, varying from about 300 nm at the center of the free-standing film, to 2 μm at the border. The quality factor in air is generally around 22.

In a first experiment, α -LA free-standing membranes have been consecutively exposed to solutions of cations in HEPES buffer solution (10 mM HEPES+NaCl 10 mM, pH 7.4) having various concentrations, as follows: 1, 10, and 100 mM solution of Mg^{2+} in HEPES buffer; 10 and 100 mM solution of K^+ in HEPES buffer; 1 and 10 mM solution of Ca^{2+} in HEPES buffer. The α -LA free-standing membranes have been rinsed with HEPES buffer solution before each change of concentration of the solution of cations in order to evaluate the reversibility of the protein film response. Figure 3 shows the different cations dependence of the resonant frequencies of the α -LA free-standing membranes. It should be noted that the resonant frequencies of the protein membranes have significantly increased during the exposition to

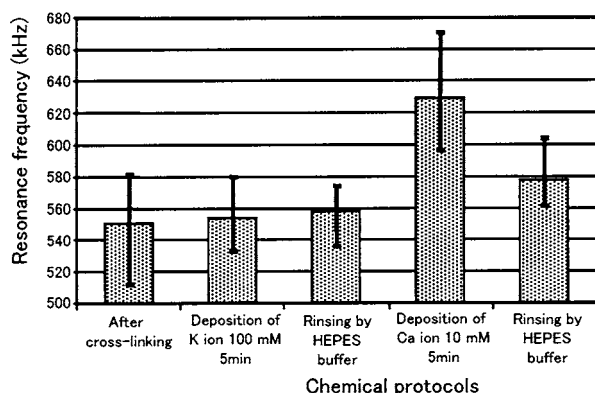


FIG. 4. Evolution of resonance frequencies of free-standing α -lactalbumin films depending on the successive binding of K^+ and Ca^{2+} cations. Error bars represent the standard deviation of the measured resonant frequency for 14 different experiments.

Ca^{2+} cation solution while their shifts have been noticeably lower during the exposition to K^+ and Mg^{2+} cations solutions. In terms of relative variation of the mean resonant frequency at a given cation concentration regarding to the mean resonant frequency directly after the cross-linking step, it has been noted that this variation is equal to 20% in case of the 1 mM Ca^{2+} solution and 36% in case of the 10 mM Ca^{2+} solution, while its value scans the range between 6% and 12% for Mg^{2+} concentrations going from 1 to 100 mM and between 8% to 10% for 10 and 100 mM K^+ concentrations. These trends confirm in a different way the differences between the apparent binding constants of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and K^+ cations ($3 \times 10^3 M^{-1}$ for Ca^{2+} , $2000 \pm 100 M^{-1}$ and $200 \pm 20 M^{-1}$ for Mg^{2+} —apparently a secondary binding site is present for this cation—and $8 \pm 3 M^{-1}$ for K^+ , respectively) for bovine α -LA protein as given by Permyakov and Berliner.¹¹ Another important point to emphasize is the resonant frequencies values after each HEPES buffer rinsing step that do not really reach the initial values measured immediately after the cross-linking step. Contrary to the results reported in other works,^{4,5} this is a general tendency observed for all species of cations tested and could be due to partial irreversible binding between the cations and the specific binding sites of the bovine α -LA or to irreversible change of conformation of the protein during the consecutive exposures to different cation solutions.

In order to confirm the differences between the apparent binding constants of Ca^{2+} and K^+ cations for bovine α -LA protein, a new series of tests has been realized. The same α -LA protein membranes have been consecutively exposed to two different cations solutions (respectively K^+ 100 mM in HEPES buffer solution and Ca^{2+} 10 mM in HEPES buffer solution) with a HEPES buffer rinsing step in between. The results are shown in Fig. 4. It can be clearly seen that the relative variation of the mean resonant frequency for K^+ 100

mM in HEPES buffer solution with regard to the mean resonant frequency measured after the cross-linking step is, in this case, equal to 1% while the same relative resonant frequency variation in case of Ca^{2+} is about 15%. Moreover, another interesting phenomenon observed is the stability of the resonant frequency even after the first HEPES buffer solution rinsing step. This could be due to the superposition of another influence factor on the sensitivity of the free-standing protein film, especially the room humidity rate that varied from 56% to 61% between the exposition of the protein films to K^+ 100 mM in HEPES buffer solution and the first HEPES buffer solution rinsing step. Nevertheless, after stabilization of the humidity and temperature conditions, the variation of the resonant frequencies due to the Ca^{2+} binding confirms the initial results discussed previously in this letter.

In conclusion, these results demonstrate the real potential of free-standing protein films to be used as resonant biosensors for multiple cations detection. New tests now have to be carried on enlarged range of concentrations of cations solutions in order to formally calculate association constants thus allowing the comparing to values reported in the literature. Nonetheless, as demonstrated by the very last current trends in this domain,¹⁷ free-standing protein films such as those discussed in this letter are in high demand for cutting edge applications where the conventional current technologies show severe limitations, in order to supply new, extremely sensitive, families of sensors.

- ¹V. N. Morozov and T. Y. Morozova, *Anal. Biochem.* **201**, 68 (1992).
- ²H. F. Ji and T. Thundat, *Biosens. Bioelectron.* **17**, 337 (2002).
- ³S. Cherian, A. Mehta, and T. Thundat, *Langmuir* **18**, 6935 (2002).
- ⁴J. W. Kim, Y. Yamagata, B. J. Kim, S. Takeuchi, and T. Higuchi, *7th Int. Conf. on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (μ TAS)*, Squaw Valley, California, 399 (5–9 October 2003).
- ⁵I. Uematsu, H. Matsumoto, K. Morota, M. Minagawa, A. Tanioka, Y. Yamagata, and K. Inoue, *J. Colloid Interface Sci.* **269**, 336 (2004).
- ⁶N. V. Avseenko, T. Y. Morozova, F. I. Ataulkhanov, and V. N. Morozov, *Anal. Chem.* **74**, 927 (2002).
- ⁷K. W. Lyles and M. K. Drezner, *Urol. Clin. North Am.* **8**, 209 (1981).
- ⁸G. R. Taylor and J. Deeble, *Genet. Anal.* **14**, 181 (1999).
- ⁹Y. He, J. Zhou, K. F. Dou, Y. Chen, Q. G. Yan, and H. M. Li, *World J. Gastroenterol.* **10**, 2827 (2004).
- ¹⁰J. J. R. F. Da Silva, and R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life* (1991).
- ¹¹E. A. Permyakov and L. J. Berliner, *FEBS Lett.* **473**, 269 (2000).
- ¹²Y. Hiraoka, T. Segawa, K. Kuwajima, S. Sugai, and N. Murai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1098 (1980).
- ¹³E. A. Permyakov, V. V. Yarmolenko, L. P. Kalinichenko, L. A. Morozova, and E. A. Burstein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 191 (1981).
- ¹⁴A. Hakansson, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, H. Sabharwal, and C. Svanborg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 8064 (1995).
- ¹⁵E. A. Permyakov, L. A. Morozova, and E. A. Burstein, *Biophys. Chem.* **21**, 21 (1985).
- ¹⁶S. Petitgrand, R. Yahiaoui, K. Danaie, A. Bosseboeuf, and J. P. Gilles, *Opt. Lasers Eng.* **36**, 77 (2001).
- ¹⁷C. Jiang, S. Markutsya, Y. Pikus, and V. T. Tsukruk, *Nat. Mater.* **3**, 721 (2004).