



Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel

Cédric Ayela

► To cite this version:

Cédric Ayela. Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel. Automatique / Robotique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2007. Français. NNT : . tel-00258395

HAL Id: tel-00258395

<https://theses.hal.science/tel-00258395>

Submitted on 22 Feb 2008

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.

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER
U.F.R PHYSIQUE - CHIMIE - AUTOMATIQUE

T H E S E

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE
délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Discipline : Conception des Circuits Microélectroniques et Microsystèmes

Par **Cédric AYELA**

Micromembranes résonantes à actionnement et détection
piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules
biologiques en temps réel

Soutenue le 20 décembre 2007 devant le jury :

Président	R. PLANA
Directeurs de thèse	L. NICU M. PUGNIERE
Rapporteurs	I. DUFOUR P. MAILLEY
Examineurs	D. ALQUIER R. RICHTER J.L. SANCHEZ
Invitée	C. SOYER

« La recherche est toujours en danger... »

Remerciements

Le projet de thèse présenté dans ce manuscrit est le fruit d'un travail d'équipe, équipe sans laquelle rien n'aurait pu aboutir. C'est ainsi que je ne peux que commencer par remercier Martine et Liviu pour leur encadrement scientifique et humain. L'opportunité que vous m'avez offerte au travers de cette thèse n'aurait pu se dérouler dans de meilleures conditions. Et ces relations humaines ont dépassé le cadre du laboratoire, et quelque soit les expériences futures, je sais que nous ne perdrons pas contact.

Cette aventure scientifique et humaine m'a enjoué au quotidien grâce aux diverses rencontres. Je pense à Françoise et Jean-Paul du CPBS à Montpellier, Fanny et Karsten de l'UTC à Compiègne, Denis au LAAS. Je remercie également l'ensemble des services II et TEAM du LAAS pour leur disponibilité et leur réactivité dans les coups durs.

Bien sûr, ces travaux ont pu être réalisés grâce au cadre épanouissant et aux excellentes conditions de travail du LAAS et plus particulièrement, au sein du groupe NanoBioSystèmes (petit groupe deviendra grand...). Je tiens donc à remercier son responsable, Christophe, de m'avoir accueilli et l'ensemble des personnes du groupe. Mais les liens créés au cours de ces trois années ont dépassé le cadre du laboratoire. Je souhaite exprimer toute ma gratitude et ma sympathie à Thierry, Laurent, Hélène et Sabrina. J'inclus bien évidemment Thomas dans ces personnes, mais j'élargirai mes pensées au-delà du groupe en ajoutant Baptiste pour les excellents moments passés au laboratoire et en-dehors, notamment les soirées musique (We'll be forever loving Reggae music...).

Enfin, mes dernières pensées se tournent vers ma famille, mes parents, que je remercie pour leur amour et pour m'avoir toujours soutenu pour m'offrir les meilleures conditions afin d'en être là aujourd'hui. Je remercie aussi ma sœur, Stéphanie, mon beau-frère et mon neveu (bout de chou fraîchement débarqué...).

Je ne peux terminer ces remerciements que par la personne avec qui je partage ma vie, Anne-Claire, qui a toujours été présente dans les bons et les mauvais moments. Merci pour ton amour et ta patience...

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
--------------------------	----------

CHAPITRE I: Des biocapteurs aux BioMEMS

I.1 Définition des biocapteurs et leur classification	5
I.2 La couche biologique sensible	7
I.2.1 Les biorécepteurs	8
I.2.1.1 Les biorécepteurs catalytiques	8
I.2.1.2 Les biorécepteurs d'affinité	9
I.2.1.3 Les polymères à empreinte moléculaire	10
I.2.2 techniques d'immobilisation de biorécepteurs sur substrat solide.....	12
I.2.2.1 Adsorption directe sur substrat solide	12
I.2.2.2 Accrochage covalent des biorécepteurs.....	14
I.2.2.3 Les techniques d'encapsulation.....	19
I.2.3 Conclusion : optimisation de la couche biologique sensible.....	19
I.3 Méthodes de transduction.....	20
I.3.1 Introduction	20
I.3.2 Méthodes de transduction optique	21
I.3.2.1 Introduction sur les méthodes de transduction optique	21
I.3.2.2 La résonance plasmonique de surface (SPR).....	22
I.3.3 Les méthodes de transduction électrochimique.....	26
I.3.3.1 Les transducteurs ampérométriques	27
I.3.3.2 Les transducteurs potentiométriques	28
I.3.3.3 Les transducteurs conductimétriques.....	29
I.3.4 Les méthodes de transduction mécanique.....	30
I.3.4.1 Introduction sur les méthodes de transduction mécanique	30
I.3.4.2 La microbalance à quartz avec suivi de la dissipation (QCM-D)	33
I.4 Les BioMEMS	36
I.4.1 Les bioMEMS : un problème de définition ?	36
I.4.2 BioMEMS statiques	38
I.4.3 Les BioMEMS résonants.....	41
I.5 Conclusion	45
Références.....	47

CHAPITRE II : Microfabrication de micromembranes piézoélectriques circulaires et caractérisation du comportement statique

II.1 Introduction	53
II.1.1 Présentation du contexte initial	53
II.1.2 Motivations.....	53
II.2 Microfabrication de membranes piézoélectriques	54
II.2.1 Fabrication d'un lot de génération 3	54
II.2.2 Commentaire sur les structures issues de la génération 3	57
II.2.3 Fabrication d'un lot de génération 4.....	59
II.2.4 Encapsulation des puces.....	61
II.3 Modèle analytique pour la déflexion statique de membranes circulaires soumises à des contraintes initiales.....	63

II.3.1 Approche mécanique pour le développement du modèle	64
II.3.2 Equations analytiques du déplacement statique et étude du flambement de membranes.....	66
II.3.3 Validation du modèle analytique.....	68
II.4 De la caractérisation statique des micromembranes à la détermination du coefficient piézoélectrique d_{31}	70
II.4.1 Comportement statique des micromembranes	70
II.4.2 Etude du coefficient piézoélectrique transverse d_{31} du PZT	73
II.5 Conclusion.....	74
Références.....	75

CHAPITRE III : Caractérisation dynamique de micromembranes dans l'air et en milieu liquide

III.1 Introduction	77
III.2 Considérations théoriques pour le comportement dynamique dans l'air et en milieu liquide	77
III.2.1 Modélisation analytique dans l'air	77
III.2.2 Modélisation analytique dans un fluide newtonien.....	79
III.3 Comportement dynamique des micromembranes dans l'air.....	81
III.3.1 Principe de mesure des fréquences de résonance.....	81
III.3.2 Influence de la tension de polarisation sur le comportement dynamique.....	83
III.3.3 Influence de la tension d'excitation sur le comportement dynamique	85
III.4 Comportement dynamique des micromembranes en milieu liquide	87
III.4.1 Passage de l'air au milieu liquide.....	87
III.4.2 Comportement en fréquence	90
III.4.3 Comportement du facteur de qualité	92
III.5 Carte électronique spécifique	96
III.5.1 Motivations	96
III.5.2 Considérations théoriques pour la conception de la carte électronique.....	97
III.5.3 Implémentation de la carte électronique.....	100
III.5.4 Validation de la carte électronique par la caractérisation dynamique de micromembranes.....	101
III.5.5 Calibration en masse de micromembranes caractérisée par la carte électronique	102
III.6 Conclusion.....	105
Références.....	107

CHAPITRE IV : Détection d'espèces biologiques par des biocapteurs sans marquage

IV.1 Introduction.....	109
IV.2 Reconnaissance temps-réel, sans marquage d'anticorps par une couche biologique optimisée	109
IV.2.1 SPR et QCM-D pour la détection d'anticorps dans un sérum	109
IV.2.1.1 Motivations.....	110
IV.2.1.2 Immobilisation de peptides sur surface d'or et étude de l'interaction avec les anticorps anti-peptide	110
IV.2.1.3 Optimisation du rapport signal-sur-bruit.....	115

IV.2.1.4 Vers une application diagnostic : reconnaissance d'anticorps dans un sérum humain	116
IV.2.2 Micromembranes piézoélectriques pour la détection sans marquage d'anticorps en milieu liquide	118
IV.2.2.1 Motivations.....	119
IV.2.2.2 Elaboration d'un protocole de reconnaissance d'anticorps par des antigènes immobilisés sur dioxyde de silicium.....	119
IV.2.2.3 Optimisation de l'environnement de micromembranes pour la détection temps-réel d'anticorps	121
IV.2.2.4 Potentiel de micromembranes en tant que biocapteur	123
IV.3 Combinaison de micromembranes piézoélectriques résonantes avec les polymères à empreintes moléculaires	125
IV.3.1 Motivations	125
IV.3.2 Fonctionnalisation individuelle de micromembranes par des MIP.....	126
IV.3.3 Polymérisation des MIP déposés	127
IV.3.4 Transduction du phénomène d'impression.....	128
IV.3.5 Spécificité de la reconnaissance.....	129
IV.4 Conclusion	131
Références.....	132
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	133

INTRODUCTION

De manière générale, la réponse à une question posée passe par la connaissance d'éléments suffisamment précis pour apporter des informations en adéquation avec la problématique. Ce cas de figure est valable aussi bien dans la vie quotidienne que dans des domaines aussi pointus que les mathématiques, la physique ou la biologie. Dans les problèmes nécessitant des données expérimentales pour apporter des éléments de réponse, une manière élégante d'obtenir les informations passe par l'utilisation de capteurs. Un capteur est composé d'un élément sensible assurant la traduction de l'information recherchée en un signal physiquement mesurable. Dans la vie courante, les capteurs sont de plus en plus présents, allant du capteur de température au détecteur de présence (pour une alarme, une lumière, etc...) en passant par les capteurs « invisibles » assurant la sécurité au quotidien par les capteurs de fumée par exemple. Quoiqu'il en soit, la manière la plus efficace d'obtenir une information est de la capter et de la transformer en une donnée significative pour l'homme. D'ailleurs, à l'heure actuelle, un domaine de prédilection des capteurs concerne la biologie et surtout le diagnostic. Les nouveaux moyens de détecter des molécules « marqueurs de pathologie » représentent un enjeu considérable. Parmi les techniques possibles, l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est une technique diagnostic de référence, couramment utilisée dans les laboratoires d'analyse médicale. Ce biocapteur permet, par empilement successif de biomolécules, de traduire indirectement la présence d'une molécule d'intérêt, par l'émission d'un signal coloré (ou fluoré) significatif de la présence de l'espèce recherchée. Mais cette technique, bien que très sensible et peu coûteuse, nécessite l'utilisation de plusieurs biomolécules (molécules de capture et de révélation). Afin de réduire le nombre d'étapes à la transduction d'une reconnaissance biologique, une solution possible est de traduire directement la présence de la molécule d'intérêt en un signal mesurable. Partant de ce constat, les biocapteurs sans marquage connaissent un essor important dans la biodétection, la transduction par résonance plasmonique de surface (SPR) et par microbalance à quartz (QCM) étant les plus abouties. Ces systèmes offrent la possibilité, soit par un moyen optique ou électromécanique, de convertir directement une reconnaissance biologique en une donnée physique.

Pour les biocapteurs, plusieurs critères caractérisent les systèmes. Tout d'abord, ils doivent être sensibles, c'est-à-dire qu'ils doivent être capables de détecter la plus petite quantité de molécules possible. Ensuite, ils doivent être spécifiques, c'est-à-dire que le signal mesuré doit correspondre à la seule détection de la molécule d'intérêt. Même si ces critères sont primordiaux, d'autres caractéristiques doivent être prises en compte. Par exemple, l'intégration du système devient un facteur de choix, pour des raisons de portabilité. Aussi, le multiplexage des expériences permet soit la détection de plusieurs molécules simultanément, soit de tester plusieurs solutions pour une même molécule, augmentant ainsi le débit d'analyse. C'est donc la combinaison de l'ensemble de ces caractéristiques qui définit le

mieux les biocapteurs, et pas seulement la sensibilité et la spécificité. En répertoriant ces caractéristiques, leur concordance avec celles offertes par les microsystèmes est alors clairement identifiée. En effet, la sensibilité d'un système est connue pour augmenter avec la diminution en taille des structures. Ensuite, les notions d'intégration et de multiplexage sont caractéristiques d'une microfabrication parallèle. Le potentiel des microsystèmes en fait donc un centre d'intérêt important pour le développement des biocapteurs sans marquage, de demain. Mais, malgré les performances atteintes par l'utilisation de microsystèmes, la fiabilité des systèmes actuels limite leur développement à grande échelle.

Dans ce contexte, les travaux de cette thèse ont porté sur l'élaboration de microsystèmes électromécaniques (MEMS) résonants pour la détection d'espèces biologiques. Partant de l'efficacité de transduction offerte par la microbalance à quartz, un principe de fonctionnement équivalent a été choisi pour le développement des structures. En définissant la fréquence de résonance comme paramètre de mesure, la proportionnalité entre la variation de fréquence et la variation de masse donne une information directe et générique sur la présence quantitative de biomolécules à la surface du transducteur. Ainsi, des matrices de micromembranes en silicium ont été développées en profitant des avantages offerts par les techniques de microfabrication. Le fonctionnement dynamique des structures traduit le besoin d'actionnement des membranes et de détection des fréquences de résonance. Pour être en accord avec le niveau d'intégration exigé par les biocapteurs, l'actionnement et la détection ont dû être intégrés aux structures. Cela passe par la structuration d'une couche piézoélectrique, permettant de profiter de la réversibilité de l'effet piézoélectrique et ainsi, intégrer l'actionnement des structures et la détection des fréquences de résonance dans la même couche. De plus, la réalisation de matrices de membranes sur la même puce permet le multiplexage pour une reconnaissance parallèle de biomolécules. La robustesse des structures de type membranes couplée aux caractéristiques précédemment décrites permet d'envisager leur utilisation en tant que biocapteur micrométrique fiable. La structuration du matériau piézoélectrique permet l'adressage individuel des membranes, donc chaque structure de la matrice fonctionne indépendamment pour une détection spécifique et individuelle de reconnaissance biologique. Ainsi, le respect des critères de choix des biocapteurs permet d'intégrer des microsystèmes résonants de type membrane comme un outil puissant de transduction sans marquage, sensible, intégré et parallèle de reconnaissance biologique.

Dans le premier chapitre, une brève introduction des biocapteurs et de leurs différents composants est donnée avant d'aborder les différentes méthodes pour la reconnaissance spécifique d'espèces biologiques. Par la suite est présentée une revue non-exhaustive des méthodes de transduction utilisées dans les biocapteurs, avec un intérêt particulier pour les microsystèmes. Une présentation générale des méthodes de transduction permet de placer les microsystèmes électromécaniques pour la reconnaissance biologique dans l'état de l'art des biocapteurs avant d'introduire les micromembranes développées ici. Les deuxième et troisième chapitres sont consacrés à la fabrication des micromembranes et à leur caractérisation statique et dynamique. En effet, pour appréhender des expériences de reconnaissance biologique avec les microstructures, seule une connaissance approfondie de leur comportement physique permet d'optimiser les conditions de fonctionnement en adéquation avec les performances requises. Les études se sont portées principalement sur le comportement dans l'air et en milieu liquide des membranes et leur caractérisation dans ces milieux a permis leur calibration en masse. Mais pour atteindre les performances requises, l'environnement des capteurs est primordial pour exploiter au mieux les capacités des transducteurs. Une carte électronique spécifique aux matrices de membranes a ainsi été développée pour obtenir un fonctionnement autonome et parallèle des structures en vue des

applications biologiques. C'est d'ailleurs dans le quatrième et dernier chapitre que seront abordées les expériences de reconnaissance biologique grâce aux micromembranes. Après la présentation de travaux sur l'optimisation par SPR et QCM de la couche biologique pour la reconnaissance spécifique d'anticorps, modèle de diagnostic du diabète de type I, le potentiel des micromembranes pour la détection d'anticorps en temps-réel et en milieu liquide sera étudié. Une comparaison de ces micromembranes avec la QCM permettra alors d'évaluer le comportement des structures en tant que biocapteur. Enfin, nous nous sommes intéressés aux problèmes liés à l'utilisation de récepteurs biologiques naturels, par combinaison de polymères à empreinte moléculaire (MIP) et de micromembranes résonantes. Les avantages offerts par les MIP couplés aux avantages des micromembranes (et leur environnement) ont permis ainsi de se rapprocher d'un biocapteur pour une analyse biologique idéale. Tous les points importants des travaux réalisés au cours de cette thèse seront repris en conclusion, accompagnés d'une discussion sur l'avenir des microsystèmes électromécaniques en biologie.

CHAPITRE I: Des biocapteurs aux BioMEMS

I.1 Définition des biocapteurs et leur classification

L'étymologie du terme biocapteur en permettrait une définition simple comme étant un capteur pour un système biologique. Dans la littérature, une définition plus précise peut être trouvée et un biocapteur est vu comme un système analytique qui exploite la capacité de détection biologique pour une molécule cible, en conjonction avec un transducteur physico-chimique qui transforme la reconnaissance biologique en un signal physiquement mesurable [1]. La figure 1.1 illustre le principe conceptuel d'un biocapteur. A partir de cette définition, plusieurs critères sont mis en évidence tels que la sensibilité et la sélectivité du biocapteur. La sensibilité traduit la capacité du transducteur à détecter une reconnaissance biologique alors que la sélectivité provient de la capacité de la couche biologique à ne reconnaître que l'espèce biologique ciblée (communément appelée analyte). La spécificité reste un point-clé dans le développement des biocapteurs ainsi que le maintien de cette spécificité en présence d'autres biomolécules.

La combinaison de ces critères avec la miniaturisation, le coût et les mesures temps-réel a favorisé l'expansion des recherches dans ce domaine. En effet, depuis l'invention des biocapteurs par Updike et Hicks [2] en 1967, le nombre de publications et de brevets ne cesse d'augmenter. Leur essor a même incité la création de journaux spécifiques, un exemple étant le journal *Biosensors and Bioelectronics*, édité par Elsevier. Mais, même si des applications commerciales existent (le biocapteur grand public le plus répandu étant le « glucose pen » [3]), la croissance du marché des biocapteurs est encore faible, comparée au nombre de leurs applications possibles [4]. Cependant, les investissements pour les biocapteurs devraient permettre, dans les prochaines années, leur forte expansion industrielle.

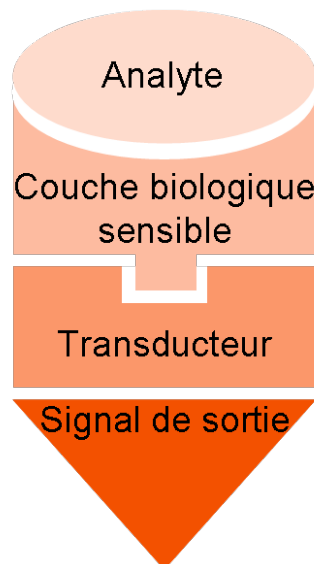


Figure 1.1 : Schéma conceptuel d'un biocapteur.

Comme illustré précédemment, trois principaux éléments composent un biocapteur : une couche biologique sensible, un transducteur et un signal de sortie. La couche biologique contient un biorécepteur, qui reconnaît l'espèce biologique souhaitée et qui est immobilisé sur

le transducteur. Ce dernier assure la conversion de la réponse biologique en un phénomène physique. Au plus haut niveau, le signal de sortie permet la mesure du phénomène physique élaboré par le transducteur. Ce niveau contient souvent des étapes d'amplification et d'affichage, de manière appropriée et interprétable par l'utilisateur.

La séparation en trois niveaux permet d'établir une classification des biocapteurs (cf figure 1.2). Le signal de sortie, du domaine de la technologie de l'information, consiste principalement en traitement de signal et en conception informatique, thématiques en dehors de celles abordées dans ce manuscrit.

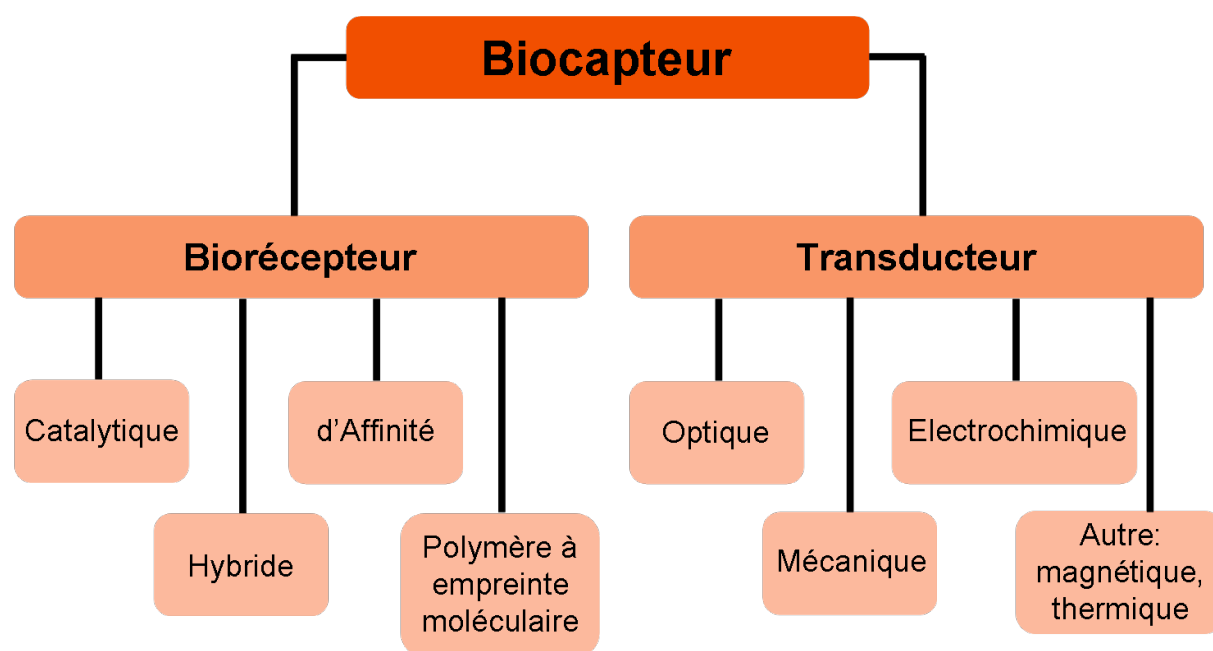


Figure 1.2 : Classification des biocapteurs

La **couche biologique** sensible est la clef de la spécificité de la reconnaissance biologique. Les biorécepteurs sont responsables de l'accrochage au capteur de l'analyte à détecter et la couche d'immobilisation permet non seulement la fixation favorable des récepteurs pour une spécificité optimale mais aussi, protège la surface du transducteur des adsorptions non-spécifiques.

La forme des biorécepteurs est très variée et il existe autant de biorécepteurs que d'analytes potentiellement détectables. Cependant, de manière classique, deux catégories permettent de recenser les biorécepteurs : 1) catalytiques, 2) d'affinité. Avec les progrès de la chimie et de la biochimie, une troisième catégorie peut maintenant être intégrée, les récepteurs biomimétiques (i.e. les polymères à empreinte moléculaire).

Le **transducteur** est l'élément permettant la conversion de la reconnaissance biologique en un signal physique. La transduction peut être faite selon de nombreux schémas. Cependant, trois grandes classes de transducteurs sont plus communément utilisées : 1) optiques, 2) électrochimiques, 3) mécaniques. D'autres catégories telles que la détection magnétique ou thermique sont possibles mais leur utilisation est moins commune.

Il est aussi important de noter que parmi les techniques de transduction, il est parfois nécessaire que les molécules biologiques soient marquées. Par marquage, nous entendons le

fait que l'analyte contienne une étiquette permettant de détecter sa présence. Les marqueurs les plus utilisés sont fluorescents et leur couplage avec les biomolécules permet une détection optique, via un microscope [5]. Cependant, le marquage des biomolécules modifie la molécule qui n'est plus la molécule native, ce qui peut affecter la qualité de la reconnaissance avec les biorécepteurs et ainsi, la spécificité qui, comme il a déjà été vu, est un point critique pour les biocapteurs. C'est pourquoi, les technologies ne nécessitant pas de marquage sont d'un grand intérêt et représentent une grande part des développements actuels dans ce domaine [6].

D'un point de vue applicatif, ce sont les applications médicales et cliniques qui connaissent les plus importants et lucratifs succès et c'est d'ailleurs dans ces domaines que les efforts en termes de recherche et développement sont les plus remarquables. Les applications grand public, comme le test de glucose pour les personnes atteintes de diabète, contribuent à l'expansion commerciale des biocapteurs [7]. Cependant, la plupart des biocapteurs commerciaux pour des applications médicales et cliniques concernent les laboratoires d'analyse médicale et les centres de recherche.

Les biocapteurs ont aussi trouvé des applications dans les domaines de l'analyse environnementale ou dans l'industrie alimentaire. En effet, les biocapteurs environnementaux donnent des informations importantes sur la qualité de l'eau, allant de la détection de détergents à l'analyse d'indices tels que la demande biochimique en oxygène (BOD) [8], traduisant la quantité d'oxygène dans le milieu (paramètre important pour la récupération des eaux usées) ou encore la concentration en ions phosphate [9]. Enfin, avec l'évolution des normes de l'industrie alimentaire, l'analyse des produits (essentiellement de grande consommation) est d'un intérêt primordial. Les biocapteurs permettent l'étude de la qualité de viandes, de poissons, de la composition de nourriture ou de la présence de poison, par exemple [10].

Les champs d'application des biocapteurs étant très vastes, seuls les domaines précédemment cités seront développés dans ce manuscrit, avec un intérêt tout particulier pour les applications biomédicales. Les principaux biorécepteurs seront décrits dans le prochain paragraphe ainsi que les procédures d'immobilisation. Par la suite, une revue non-exhaustive des transducteurs sans marquage sera développée avant la présentation de biocapteurs électromécaniques miniaturisés, les BioMEMS.

I.2 La couche biologique sensible

La couche biologique sensible est un point critique dans le développement des biocapteurs. Notamment, le biorécepteur est responsable de la reconnaissance biologique et par conséquent, de la spécificité. Deux classes de biorécepteurs « naturels » seront présentées. Parmi elles, l'accent sera mis sur les récepteurs d'affinité puisque ce sont les plus communément utilisés et qu'ils ont un côté générique en termes de reconnaissance. Une troisième classe de biorécepteurs synthétiques (les polymères à empreinte moléculaire) sera également étudiée car ils résolvent certains problèmes liés aux biorécepteurs naturels. Par la suite, les procédures d'immobilisation des biorécepteurs sur la surface de transducteurs seront présentées puisqu'une reconnaissance efficace, hautement spécifique et reproductible n'est possible que lorsque leur greffage est optimum.

1.2.1 Les biorécepteurs

1.2.1.1 Les biorécepteurs catalytiques

Les biorécepteurs catalytiques, pour la plupart correspondant à des enzymes, sont souvent choisis dans les biocapteurs pour leur capacité de reconnaissance autant que pour leur forte activité à de faibles concentrations. Ce sont d'ailleurs les enzymes qui ont été employées dans les premiers biocapteurs puisque la détection par réactions catalytiques en chaîne est amplifiée de manière sélective [11]. La plupart des enzymes sont des protéines structurées de façon à posséder un site actif qui leur confère la capacité de catalyse sur un substrat donné. L'activité catalytique dépend de la structure de la protéine native et sa dénaturation supprime toute activité.

La détection d'analytes par les biorécepteurs catalytiques relève de deux types de fonctionnement : soit l'analyte est directement reconnu par l'enzyme, soit un (ou plusieurs) produit(s) issu(s) de l'activité enzymatique est (sont) détecté(s). Par exemple, la détection de glucose peut être le résultat de transfert d'électrons (issus de la réaction catalytique) entre l'enzyme et une électrode de graphite qui détecte le transfert d'électrons [12].

La rapidité de la réaction enzymatique, permettant de produire plusieurs milliers de molécules par seconde est en accord avec la miniaturisation des biocapteurs [13]. Ainsi, un capteur de glucose a été développé en utilisant des fibres optiques à l'échelle du micron. Le biocapteur est basé sur la consommation d'oxygène lors de la réaction enzymatique entre le glucose et la glucose-oxydase (cf. figure 1.3), l'enzyme et l'oxygène étant intégrés dans un polymère fluorescent dont la fluorescence dépend la quantité d'oxygène. Ainsi, des temps de réponse rapide ($\approx 2s$) et une limite de détection de 10^{-15} mole font que les performances de ce biocapteur sont nettement meilleures que celles des capteurs de glucose commerciaux [14].

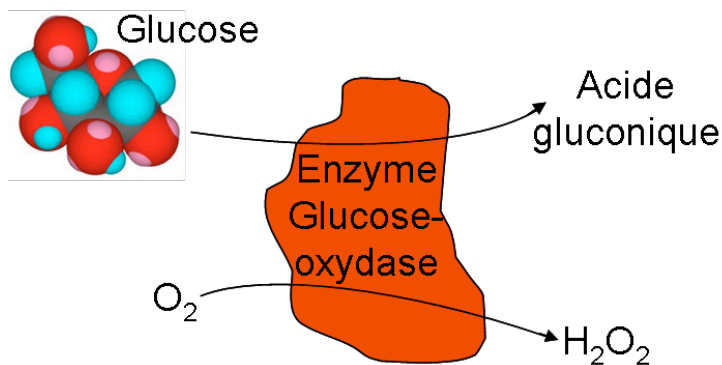


Figure 1.3 : Principe de la réaction catalytique du glucose.

Cependant, la structure des biorécepteurs catalytiques les rend instables thermiquement et sensibles aux milieux environnants comme les conditions de pH, par exemple. Aussi, la perte d'activité avec la dénaturation de la protéine limite les conditions et les temps de conservation, montrant les limites de cette catégorie de biorécepteurs [15,16].

I.2.1.2 Les biorécepteurs d'affinité

Les biorécepteurs d'affinité sont des molécules biologiques permettant une reconnaissance hautement spécifique, avec des constantes de liaison de l'ordre de 10^9 - 10^{12} M⁻¹. Les plus utilisés sont les immunoglobulines (e.g. anticorps) présentant des avantages tels que la sélectivité, l'affinité et la facilité de production. En effet, les anticorps sont des glycoprotéines produites par réponse immunitaire. L'injection d'un antigène étranger à un animal provoque une réponse immunitaire correspondant à la production d'anticorps [17]. Les anticorps de type polyclonaux sont obtenus par purification du sérum de l'animal sur l'antigène correspondant. Les anticorps de type monoclonaux (les plus spécifiques) sont obtenus in vitro par culture cellulaire à partir d'une cellule appelée hybridome provenant d'une fusion cellulaire entre 2 cellules (une productrice d'anticorps, le lymphocyte B, et une cellule de tumeur myélome qui lui confère les propriétés d'immortalité de la lignée). Ces systèmes de production permettent ainsi d'obtenir de grandes variétés d'anticorps, leur donnant un aspect générique comme biorécepteurs.

Les immunoglobulines sont des protéines composées de deux chaînes lourdes d'environ 440 acides aminés chacune et deux chaînes légères d'environ 220 acides aminés chacune. La structure, généralement présentée sous la forme d'un Y (cf. figure 1.4), peut se différencier en deux parties : le Fragment Antigen Binding (F_{ab}) et le Fragment Crystallisable (F_c). Chaque immunoglobuline est composée de deux F_{ab} qui sont les sites de reconnaissance de l'antigène et un F_c, commun à tous les anticorps d'un même mammifère. La structure des anticorps comporte de nombreuses fonctions carboxyles (-COOH) et amines (NH₂) qui permettent une immobilisation aisée sur la surface de transducteurs.

Pour approfondir la reconnaissance entre l'antigène et l'anticorps, il faut s'intéresser à la partie F_{ab} des immunoglobulines. La partie de l'anticorps qui interagit avec l'antigène est le paratope (soit deux paratopes identiques par anticorps, ces anticorps sont dits bivalents) et la partie de l'antigène qui réagit avec l'anticorps est l'épitope. Le paratope est composé de trois Complementary-Determining Regions (CDR) sur chaque chaîne légère et lourde du F_{ab} qui sont un assemblage de 4 à 6 acides aminés chacun et la liaison des CDR avec l'épitope des antigènes est responsable de la reconnaissance. Les liaisons entre l'antigène et l'anticorps sont non-covalentes (donc de faible énergie), ce qui les rend réversibles.

Il existe plusieurs types d'immunoglobulines. Les plus utilisées, non seulement pour leur fonction de reconnaissance mais aussi pour leur méthode de production, sont les immunoglobulines G (IgG). Cependant, les immunoglobulines A et E peuvent aussi être utilisées comme biorécepteurs.

Etant donné le principe de reconnaissance des biorécepteurs d'affinité, l'utilisation avec les biocapteurs est vaste, les applications cliniques étant un domaine de prédilection. Grâce à leur spécificité, de très faibles quantités d'analyte peuvent être détectées. Par exemple, la protéine Bovin Serum Albumin (BSA) a pu être récemment détectée spécifiquement grâce à des leviers piézoélectriques à une concentration de 1 fM [18].

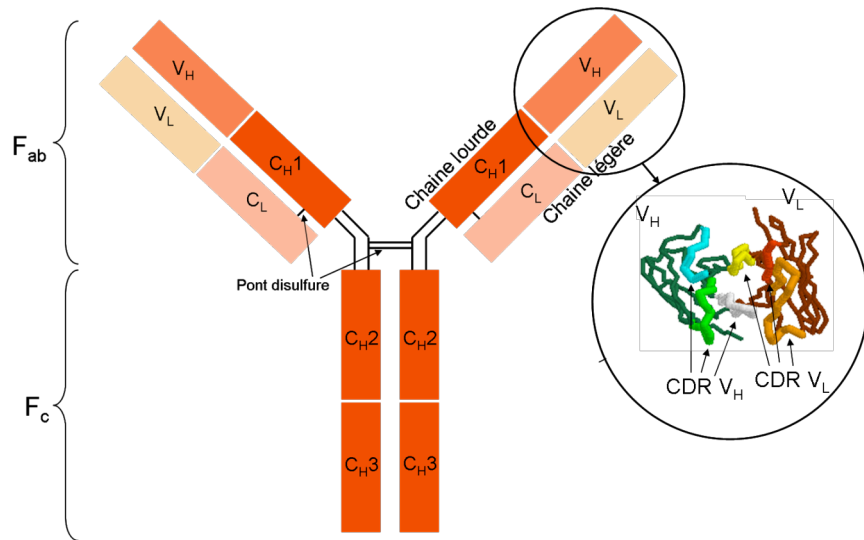


Figure 1.4 : Représentation schématique d'un anticorps et de la partie se liant à l'antigène, le paratope.

Le principe de reconnaissance des biorécepteurs d'affinité est favorable à une utilisation avec les capteurs de masse. La reconnaissance ne modifiant pas les récepteurs, une manière efficace de traduire la présence de l'analyte est de mesurer des variations de masse à la surface du transducteur. C'est pourquoi les biocapteurs basés sur les phénomènes de résonance plasmonique de surface (SPR) [19] et de microbalance à quartz (QCM) [20] sont un succès (leur étude sera approfondie plus tard). Ces capteurs sans marquage et temps-réel permettent de détecter spécifiquement la présence d'analyte grâce à des biorécepteurs d'affinité, avec une haute sensibilité. Les immunoglobulines couplées à la résonance plasmonique de surface ont montré un potentiel important dans les applications diagnostic, allant du diabète insulino-dépendant [21] aux biomarqueurs spécifiques du HIV [22], par exemple.

Cependant, l'utilisation de ces biocapteurs hautement technologiques (et donc coûteux) ne peut pas être vue dans une approche à usage unique. Or, malgré la réversibilité des interactions antigène-anticorps, les conditions nécessaires pour la régénération peuvent dénaturer lentement les anticorps, traduisant le besoin d'améliorer les technologies pour obtenir des biorecepteurs réutilisables [23].

I.2.1.3 Les polymères à empreinte moléculaire

Les polymères à empreinte moléculaire (MIP) représentent une forme de biorécepteurs synthétiques qui miment le comportement des biorécepteurs naturels avec les mêmes affinités et spécificités. Comme il a été vu dans les précédentes sections, les conditions d'utilisation et de conservation des biorécepteurs catalytiques et d'affinité limitent leur capacité. Les contraintes telles que la stabilité thermique, l'influence du pH sur le comportement ou la conservation dans le temps ont favorisé le développement de biorécepteurs synthétiques. L'utilisation de polymères à empreinte moléculaire peut résoudre les problèmes liés à ces point-clés. En effet, la structure polymérique offre des propriétés de stabilité, de robustesse et de reproductibilité dans des conditions sévères [24] qui ont incité le développement de cet axe de recherche.

Les polymères à empreinte moléculaires sont élaborés selon un cycle d'assemblage qui leur est propre. Comme le montre la figure 1.5, après l'auto-assemblage des molécules cibles et des monomères fonctionnels par des liaisons non-covalentes (l'assemblage par des liaisons covalentes est aussi possible, mais leur utilisation est de moins en moins fréquente), le complexe autoassemblé est polymérisé soit par irradiation sous UV, soit par des effets thermiques. La molécule cible peut ensuite être retirée par coupure des liaisons non-covalentes puis insérée à nouveau dans le polymère caractérisé par une mémoire de la forme et une sélectivité de liaisons. Les deux dernières étapes peuvent être répétées sans perte de réactivité.

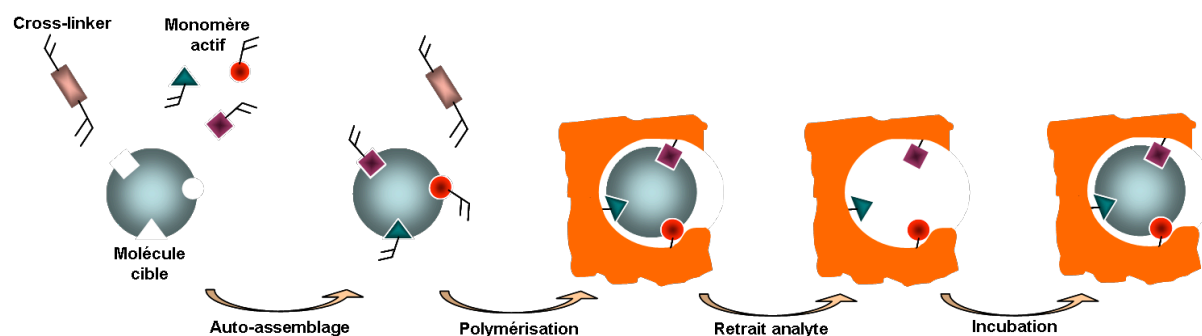


Figure 1.5 : Principe d'assemblage spécifique des polymères à empreinte moléculaire (MIP).

Un autre aspect de l'utilisation des MIP dans les biocapteurs vient de leur aptitude à être façonnables. En effet, les techniques de dépôt telles que le dépôt à la tournette (connu sous le nom de spin-coating) ou le dépôt localisé ont pu être achevés. Par exemple, l'utilisation du robot de dépôt Bioplume (cf thèse de T. Leïchlé (2006)) développé dans le groupe NanoBioSystèmes au LAAS-CNRS a permis la fonctionnalisation de surfaces par des MIP sous formes de spots de quelques dizaines de microns de diamètre et l'étude a montré la conservation du phénomène d'impression sur les gouttes déposées [25]. Les travaux pionniers de K. Haupt et al. sur la combinaison de polymères à empreinte moléculaire avec les microbalances à quartz [26] pour la détection du S-propranolol ont confirmé le potentiel de ces biorécepteurs avec les biocapteurs. Ces travaux représentent la possibilité de détection spécifique et sans marquage de la présence de l'analyte imprimé, puisque des réponses différentes ont été obtenues pour les deux énantiomères R et S du propranolol.

Des biocapteurs à base de MIP hautement sensibles ont aussi été réalisés. C'est le cas d'un système de type ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) avec injection de flux relié à un photomultiplicateur [27]. Le principe mis en œuvre a permis la détection d'herbicide 2,4-D jusqu'à une concentration de 2.25 nM, avec une calibration possible jusqu'à une concentration de 225 μ M, faisant de ce biocapteur MIP un des plus sensibles.

Malgré l'ensemble des avantages des polymères à empreinte moléculaire présentés dans cette section, la variété des molécules cibles limite les possibilités. En effet, la synthèse de MIP avec des espèces telles que des protéines ou des cellules mérite encore d'être développée et seuls quelques exemples peuvent être trouvés dans la littérature [28]. La taille et la complexité des structures des protéines induisent un frein dans l'avancement des recherches dans ce domaine. Cependant, le degré d'aboutissement des MIP pour les petites molécules permet d'élaborer des biocapteurs fiables dans de nombreux domaines, allant de l'analyse environnementale [29] aux applications thérapeutiques [30].

1.2.2 techniques d'immobilisation de biorécepteurs sur substrat solide

La technique d'immobilisation des biorécepteurs sur la surface du transducteur est un point crucial pour le comportement du biocapteur, nécessitant le développement de stratégies réalistes pour l'immobilisation des biorécepteurs pour une utilisation pratique du biocapteur. Afin de rendre la biorecognition favorable, plusieurs critères pour l'immobilisation des biorécepteurs sont nécessaires :

- les biorécepteurs doivent garder leur activité biologique une fois attachés sur la surface.
- le matériel biologique ne doit pas se décrocher, non seulement pendant l'activité de reconnaissance mais aussi doit résister aux changements de milieux (pH, température, etc...)
- le film biologique immobilisé doit avoir une stabilité et une durabilité dans le temps.
- les biorécepteurs doivent avoir un haut niveau de spécificité pour un analyte particulier.

Un manque de contrôle sur les conditions précédemment décrites limitera les capacités du biocapteur. Par exemple, l'orientation des biomolécules immobilisées pour une reconnaissance optimale est difficile à respecter. Le contrôle de la distribution et de la densité de biorécepteurs sur la surface font aussi partie des critères de choix pour une méthode d'immobilisation. Comme il sera vu dans les paragraphes suivants, un point-clé de l'accroche de biomolécules sur un substrat concerne les interactions non-spécifiques. En effet, les milieux biologiques complexes (telles que les sérums) sont composés d'une large variété d'espèces pouvant interférer avec la couche biologique sensible et la couche d'immobilisation pourra en grande partie limiter ces interactions non désirées.

C'est ainsi en pensant à l'ensemble de ces critères que des méthodes d'immobilisation de biorécepteurs prometteuses sont développées non seulement en fonction du type de biorécepteur et de son fonctionnement mais aussi pour la construction de biocapteurs en adéquation avec les besoins, comme nous le verrons par la suite.

1.2.2.1 Adsorption directe sur substrat solide

L'adsorption directe sur la surface de transducteurs est la manière la plus simple et la moins coûteuse d'immobiliser des biorécepteurs. C'est par l'intermédiaire d'interactions chimiques ou physiques que des liaisons de faible énergie peuvent se former entre les biomolécules et la surface. L'adsorption physique est possible grâce aux forces ioniques, de Van Der Waals ou des interactions de type hydrophobe-hydrophobe alors que l'adsorption chimique inclut le partage ou le transfert d'électrons pour former des ponts chimiques. Les liaisons décrites étant de faible énergie, la réversibilité de l'immobilisation doit être prise en compte. Cependant, cette technique d'immobilisation, en plus d'être simple, peut être appliquée dans une large gamme de conditions sur différents types de surface, comme l'avait déjà montré Catt en 1970 [31]. Cette faisabilité d'adsorption de protéines avait été faite sur du verre, du plastique ou du caoutchouc. De plus, les possibilités d'immobilisation directe sur les métaux nobles comme l'or ont été étudiées, ce matériau est en effet très fréquent dans les transducteurs [32].

La reconnaissance d'analyte après adsorption de biorécepteurs n'est pas sans risque et est difficilement rendue optimum. Cela vient du manque de contrôle sur la qualité et la quantité des biorécepteurs immobilisés. En effet, des distributions irrégulières de récepteurs orientés au hasard ont pu être observées par AFM [32], réduisant nettement la capacité de reconnaissance (comme le montre la figure 1.6). Cela se traduit par la formation d'agrégats sur la surface ou de multicouches [33], laissant apparaître des trous et montrant l'impossibilité de maîtriser la densité de biorécepteurs immobilisés.

Le manque d'uniformité de la couche biologique induit des interactions non-spécifiques. Ces interactions peuvent être de deux types : soit les forces d'interactions entre la surface et les analytes provoquent leur accrochage non spécifique, agissant ainsi sur la sensibilité du biocapteur par des artéfacts de mesure, soit les analytes interagissent avec des biorécepteurs différents de ceux reconnaissant la molécule cible, influant ainsi sur la spécificité de la reconnaissance. De plus, les forces mises en jeu lors de l'adsorption directe des biomolécules ne permettent pas une orientation privilégiée favorable à la reconnaissance et peuvent induire une déformation des récepteurs provoquant une perte de réactivité. [34].

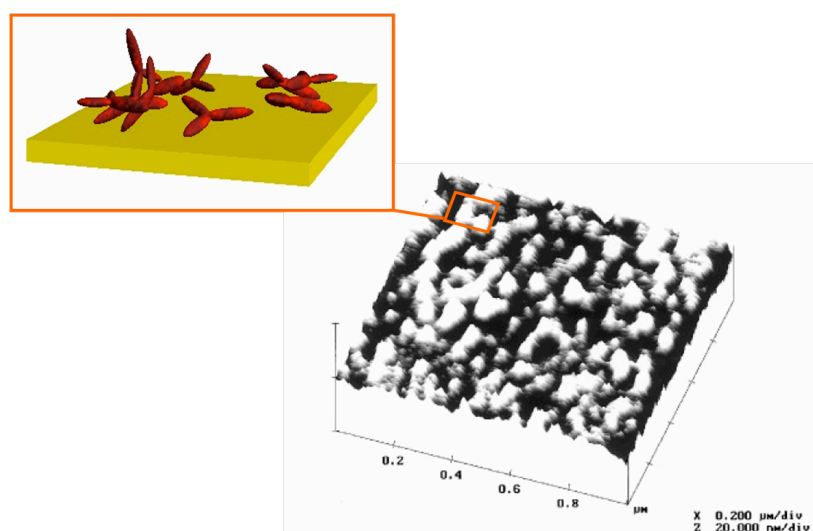


Figure 1.6 : Image AFM de la distribution irrégulière de biorécepteurs immobilisés par adsorption directe. L'insert représente une schématisation de l'empilement (d'après la référence [32]).

L'adsorption directe de protéines reste cependant couramment utilisée dans les tests biologiques puisque la méthode ELISA est une technique de référence de reconnaissance biologique basée sur l'immobilisation directe de protéines sur des puits en polystyrène [35]. La simplicité et le faible coût de cette technique, associés aux performances de reconnaissance, en font un des systèmes encore les plus utilisés pour les tests cliniques.

C'est pour les mêmes avantages que l'adsorption directe de biorécepteurs est utilisée pour la comparaison de comportement de biocapteurs, notamment les capteurs de masse. Par exemple, l'étude de trois types de transducteurs, la spectroscopie optique par guide d'onde (OWLS), l'ellipsométrie (ELM) et la microbalance à quartz avec mesure de la dissipation (QCM-D), a été faite en terme de comportement lors de l'adsorption de trois protéines, la sérulalbumine humaine (HSA), l'hémoglobine et les fibrinogènes, et lors des interactions avec des anticorps spécifiques ou non [36]. Les trois transducteurs sont des capteurs de masse même si leur principe de fonctionnement est différent. Hormis les différences en terme de

densité adsorbée, basée sur la mesure d'une masse « sèche » ou « humide » selon le type de transducteur, une partie de l'étude s'est portée sur le rapport entre les interactions non-spécifiques et les interactions spécifiques. Les résultats obtenus, allant de 4% environ dans le cas de l'interaction anticorps anti-fibrinogène sur antigène fibrinogène immobilisé jusqu'à 40% dans le cas du couple anti-HSA/HSA montrent la disparité de spécificité en fonction du biorécepteur, mettant en évidence l'absence de contrôle sur l'adsorption des récepteurs. En effet, la taille et la forme des fibrinogènes et de la sérumalbumine diffèrent (les fibrinogènes sont près de 6 fois plus grandes que les molécules de HSA), donc le recouvrement lors de l'adsorption directe sur la surface n'est pas similaire, diminuant ainsi les interactions non-spécifiques dans le cas des fibrinogènes, étant donnée leur grande taille par rapport à la sérumalbumine humaine.

Ce sont ainsi des études de ce type qui ont mis en évidence les limites de l'adsorption directe de biorécepteurs sur substrat solide et ont favorisé le développement des procédures d'immobilisation par liaisons covalentes.

I.2.2.2 Accrochage covalent des biorécepteurs

Une approche alternative à l'adsorption directe des biorécepteurs sur la surface de transducteurs passe par leur accrochage covalent, où des biomolécules sont immobilisées par la formation de liaisons spécifiques [37]. Contrairement aux protocoles d'adsorption directe, l'accrochage covalent est une méthode favorable à l'immobilisation de biorécepteurs sans perte d'activité de reconnaissance [38]. De plus, la majorité des protocoles pour la fixation covalente nécessitent la fonctionnalisation de la surface du transducteur par des molécules chimiques (linéaires ou polymères), permettant ainsi un contrôle efficace de l'uniformité, la densité et la distribution des biorécepteurs sur la surface. La reproductibilité est aussi améliorée puisque la force des liaisons covalentes leur confère une résistance permettant l'utilisation de conditions sévères sans leur décrochage de la surface, telles que des changements brutaux de pH ou de température, par exemple [39].

Les protocoles d'immobilisation covalente se prêtent aux biorécepteurs protéiques, tels que les enzymes et les anticorps. En effet, ces biomolécules présentent des groupes fonctionnels utilisables pour leur immobilisation et n'interférant pas avec les parties nécessaires à la reconnaissance. Comme il a été vu, de nombreux groupes amine et carboxyle sont présents dans la plupart des protéines, mais aussi d'autres fonctions telles que sulfhydryle, thiol et imidazole. La variété des groupes fonctionnalisables permet de choisir la chimie la plus adaptée à l'immobilisation de la protéine et à la nature de la surface du transducteur. Même si ces fonctions peuvent permettre la fixation covalente directe de protéines sur le substrat, il est préférable de modifier la surface afin d'introduire des fonctionnalités pouvant être couplées aux biorécepteurs.

Le choix des modifications chimiques est déterminé par la surface solide et le type de biorécepteurs à immobiliser. Les substrats les plus fréquemment utilisés dans les biocapteurs sont le verre, les oxydes métalliques et l'or [40,41]. Les propriétés de ces matériaux leur confèrent des affinités particulières pour leur modification par des molécules chimiques présentant des fonctionnalités nécessaires à l'immobilisation des protéines.

Immobilisation covalente sur or :

L'immobilisation de biorécepteurs sur surfaces d'or est commune dans les biocapteurs car la facilité et la qualité de la couche formée est en adéquation avec les sensibilités et spécificités nécessaires à une reconnaissance biologique performante [42]. Les protocoles mis en œuvre passent dans l'ensemble par la modification de la surface par des molécules thiol, sulfide ou disulfide fonctionnelles. Ces molécules sont composées d'une base thiol (sulfide ou disulfide), d'un bras espaceur et d'un groupe terminal fonctionnel. Cette modification permet l'obtention de monocouches auto-assemblées (SAM, Self Assembled Monolayers) et l'utilisation d'une chimie de greffage permet le contrôle de la densité et de la distribution des biorécepteurs sur la surface (cf. figure 1.7). Même si la cinétique de fixation des thiols sur l'or n'est pas complètement caractérisée [43], l'adsorption est régie par la formation d'un pont or-thiol et est donnée par l'équation suivante :



Ainsi, cette chimie rapide (< 1 jour), en phase liquide dans des solvants polaires (comme l'éthanol) permet la fonctionnalisation de surface or pour une immobilisation efficace de biorécepteurs par greffage covalent. En effet, l'interaction or-thiol s'arrête à la formation d'une monocouche, favorisant l'uniformité lors de l'immobilisation des biomolécules, contrairement aux multicouches [44]. De plus, l'auto-assemblage de la couche formée assure la répartition des groupes fonctionnels.

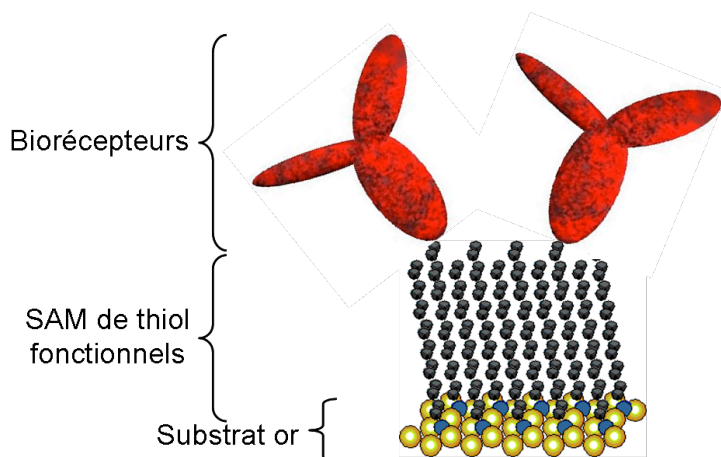


Figure 1.7 : Immobilisation covalente de biorécepteurs sur surface d'or par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée de thiol.

Le choix des fonctions terminales dépend de la chimie d'activation en fonction des groupes utilisables sur les biorécepteurs. Les fonctions terminales les plus courantes sont de type carboxyle (-COOH), hydroxyle (-OH), méthyle (-CH₃), amine (-NH₂). Parmi elles, les fonctions carboxyles et amines sont utilisées pour l'immobilisation de biorécepteurs alors que les groupes hydroxyles et méthyles limitent les adsorptions non-spécifiques (surtout les fonctions hydroxyles). C'est ainsi que la mixité des fonctions lors de la formation de SAM favorise leur répartition afin de gérer la densité de biomolécules immobilisées.

Concernant la reconnaissance biologique, même si celle-ci est améliorée par l'accrochage covalent des biorécepteurs, les interactions non-spécifiques subsistent. Elles proviennent essentiellement de la couche formée à cause du caractère hydrophobe des SAM,

sollicitant les interactions de type hydrophobe-hydrophobe. Dans la forme la plus simple, le bras espaceur est une chaîne de groupe alkyl ($-\text{CH}_2$) dont la longueur peut varier de C11 à C16 [45] comprenant la partie fonctionnelle en bout de chaîne. Une étude par SPR montre que les interactions non-spécifiques dépendent de la nature du groupe fonctionnel [46]. Les niveaux obtenus lors de l'adsorption d'immunoglobulines humaines diffèrent d'une couche à l'autre, les fonctions méthyles donnant les niveaux les plus élevés et les groupes hydroxyles les plus faibles. La caractérisation des interactions non-spécifiques dans les couches d'immobilisation a montré qu'elles ne peuvent pas être négligées et a incité l'introduction de chaînes polyéthylène-glycol (PEG) dont le caractère hydrophile limite ce type d'interactions non-désirées. Ainsi, il a été démontré que pour une même interaction spécifique, les adsorptions non-spécifiques ont été réduites d'un facteur dix par introduction de chaînes polyéthylène glycol en sus des chaînes alkyl [47]. Cependant, malgré les améliorations apportées par l'utilisation de chaînes PEG, les fluides complexes comme les sérums et les plasmas provoquent encore de faibles interactions non-spécifiques [48].

Le choix des fonctions disponibles couplé à la simplicité des protocoles mis en œuvre et à la reproductibilité incitent à l'utilisation de l'immobilisation covalente de biorécepteurs sur surface d'or préalablement recouverte d'une monocouche autoassemblée, pour une reconnaissance biologique sensible et spécifique.

Immobilisation covalente sur verre et assimilés :

L'immobilisation covalente de biorécepteurs par l'intermédiaire de monocouches auto-assemblées est une méthode favorable à une reconnaissance biologique efficace. Sur des surfaces de type verre ou assimilés (tels que le dioxyde de silicium), la modification par des silanes offre cette caractéristique. Souvent composés d'une base alcoxysilane ou chlorosilane (cf figure 1.8), l'adsorption sur un substrat verre se fait grâce aux fonctions hydroxyles de la surface.

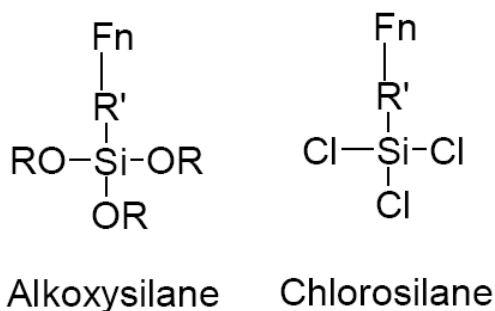


Figure 1.8 : Structure de silanes couramment utilisés pour l'immobilisation sur verre. R et R' correspondent à des radicaux libres et Fn représente le groupe fonctionnel.

Contrairement aux SAM thiol sur or, l'obtention d'une monocouche auto-assemblée par les silanes s'avère plus complexe. En effet, l'adsorption en phase liquide se traduit par la formation de couches désordonnées [49], généralement dues à une auto-polymérisation des molécules silane. Leur sensibilité à l'eau provoque une hydrolyse qui change en continu leur état [50]. C'est pourquoi la silanisation de surfaces pour la formation de SAM est communément accomplie en phase vapeur, sous vide.

Cependant, il n'existe pas de protocole générique pour la formation de SAM silane, d'où un travail permanent d'optimisation des couches. La difficulté est en partie causée par le

bras espaceur et le groupe terminal fonctionnel. Les fonctions terminales les plus utilisées (car réactives pour une immobilisation covalente de récepteurs) sont les fonctions hydroxyles (silanes n-octadecyltrichlorosilane (OTS)) et les fonctions amines (silanes 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)) et les conditions d'adsorption en phase vapeur diffèrent. Par exemple, des ponts hydrogène peuvent se former entre les fonctions amines lors de l'adsorption d'APTES [51]. Comme dans le cas des molécules fonctionnelles à base de thiol, le bras espaceur de silanes fonctionnels est composé de chaînes alkyles. Mais la longueur de ce bras est faible (typiquement C3). La raison provient de l'assemblage des fonctions silanes sur la surface. Comme le montre la figure 1.9, l'adsorption sur substrat verre induit la formation de liaisons entre les atomes d'oxygène. Or, pour une liaison type Si-O, la longueur est de 1.6 Å, ce qui implique une distance entre les molécules d'oxygène de 3.2 Å ou moins, ce qui ne laisserait pas assez d'espace pour des chaînes alkyles parallèles et raides. Cependant, la formation de SAM silanes avec des bras espaceurs longs (l'OTS par exemple avec C17) a été démontrée et est largement utilisée [52]. Donc les couches résultantes ne sont peut-être pas intégralement recouvertes de groupes fonctionnels, ou la couche complètement couverte ne peut pas être intégralement liée à la surface. Cela montre que le mécanisme de formation de SAM silanes n'est pas entièrement élucidé [53].

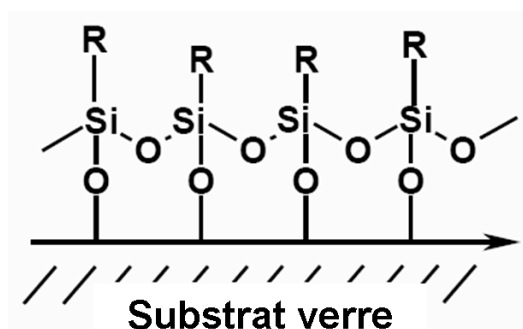


Figure 1.9 : Représentation de l'assemblage de silanes sur surface de verre ou assimilé.

L'immobilisation covalente de biorécepteurs sur verre, sans perte d'activité de reconnaissance, est largement utilisée dans les biocapteurs [54,55]. Cependant, la surface silanisée devient fortement hydrophobe, la rendant sensible aux interactions non-spécifiques. Par exemple, un biocapteur basé sur le phénomène de spectroscopie par réflectométrie interférentielle a été utilisé pour caractériser une interaction de type antigène-anticorps (dérivé de la triazine / anticorps anti-triazine) où l'antigène a été immobilisé sur du verre modifié par des silanes [56]. L'étude approfondie des interactions non-spécifiques a montré que l'injection d'ovalbumine sur la surface silanisée a donné des niveaux d'adsorption jusqu'à 1.5 ng/mm². Comme pour la chimie thiol, l'introduction de PEG permet de réduire les interactions non-spécifiques, grâce à leur caractère hydrophile. C'est d'ailleurs ce qui a été démontré dans l'étude précédemment décrite puisque l'ajout de chaîne PEG à la surface silanisée a réduit les adsorptions non-spécifiques jusqu'à des niveaux inférieurs à 10 pg/mm². La surface optimisée a ainsi pu être utilisée pour une détection sélective et reproductible d'anticorps anti-triazine ; le niveau obtenu après 50 expériences a été 2% plus faible que celui initialement obtenu.

Le succès de la chimie silane pour les biocapteurs provient des puces ADN largement utilisées et du faible coût de substrats verre ou assimilés. Cependant, les mécanismes de la « chimie silane » sont complexes et sollicitent de nombreux travaux de recherche.

Immobilisation covalente par des polymères

L'intérêt pour les polymères dans le développement des biocapteurs provient de leur adéquation avec les caractéristiques requises d'un biocapteur. En effet, les polymères naturels et synthétiques présentent les avantages d'être faible coût, résistants ou encore façonnables. De plus, la variété des polymères leur offre des propriétés optiques, électriques ou de mouillage particulières, permettant un choix en fonction du type de transduction principalement. Pour simplifier, deux exemples de polymères les plus utilisés seront décrits dans ce manuscrit à défaut d'une revue exhaustive.

Les polysaccharides activés présentent des caractéristiques intéressantes pour l'immobilisation covalente de biorécepteurs. Non seulement leur structure permet une accroche covalente sur des substrats solides, mais aussi l'ajout de groupes fonctionnels permet l'immobilisation covalente de récepteurs. De plus, les propriétés hydrophiles des polysaccharides limitent les interactions non-spécifiques. L'utilisation de polysaccharides dextran est maintenant populaire, notamment depuis leur intégration dans les biocapteurs développés par la société Biacore (Uppsala, Suède) basés sur la résonance plasmonique de surface (SPR). En effet, les puces versatiles de ce système comprennent une couche de dextran carboxylé sur surface d'or, permettant l'immobilisation de diverses biomolécules telles que des protéines (anticorps, enzymes ...) ou des petites molécules, par exemple [57, 58]. La capacité d'immobilisation est largement augmentée par la structure de la couche de polymère de type trois dimensions (alors que les SAM sont de type deux dimensions). L'efficacité de ce type de couche a été largement démontrée et même des milieux biologiques complexes, tels les sérums, ne montrent que peu d'adsorption non-spécifique [59].

D'autres polymères, basés sur des chaînes de lysine, sont de plus en plus utilisés. Dans l'histoire des biocapteurs, les poly-L-lysines (PLL) ont été largement étudiées pour leur capacité d'adsorption sur des surfaces [60], mais leur caractère hydrophobe provoquait de nombreuses interactions non-spécifiques [61]. Plus récemment, l'équipe de N. D. Spencer à l'ETH Zurich a développé des poly-L-lysine-g-PEG présentant des propriétés intéressantes. Profitant de la facilité d'adsorption des poly-lysines sur une large gamme de surfaces (comme la plupart des oxydes métalliques et le verre), l'intégration de chaînes PEG hydrophiles réduit les interactions non-spécifiques. Des études comparatives par spectroscopie par guide d'onde optique (OWLS) sur l'adsorption non-spécifique de sérum humain et de fibrinogène montrent que la modification de surface par les PLL-g-PEG réduit ces interactions d'un facteur 200 pour le sérum et d'un facteur 25 pour les fibrinogènes par rapport à une surface brute d'oxyde de titane (TiO_2) [62]. D'ailleurs, une étude basée sur la microbalance à quartz de PLL-g-PEG pour la détection d'anticorps sera présentée dans le dernier chapitre de ce manuscrit. Enfin, l'adsorption électrostatique des PLL sur des surfaces conductrices permet leur décrochage par réaction électrochimique, leur offrant une possibilité de désorption localisée [63].

Pour conclure, il est clair que les possibilités d'immobilisation covalente de biorécepteurs sur des substrats solides sont nombreuses, dépendant essentiellement du type de surface, du type de transduction et de la nature des biorécepteurs. Cependant, malgré les optimisations possibles des couches pour la réduction des interactions non-spécifiques (augmentant la sensibilité de la reconnaissance), le contrôle de l'orientation des récepteurs reste un problème à résoudre pour augmenter la capacité de la biorecognition. Cela montre les efforts à fournir pour le développement de couches où tous les biorécepteurs restent actifs.

I.2.2.3 Les techniques d'encapsulation

L'encapsulation de biorécepteurs au travers de gels de polymères, de membranes ou de matrices de surfactant a largement été utilisée dans le passé (c'est d'ailleurs une technique d'encapsulation qui a été utilisée dans les travaux pionniers de Updike et Hicks en 1967 [2]), et reste une méthode communément employée [64,65]. Une large variété de polymères permet l'encapsulation d'enzymes ou de cellules. Ce sont principalement des dérivés polyvinyliques ou des polycarbonates, de la polyacrylamide et de la cellulose acétate. L'encapsulation des biomolécules peut être induite par l'irradiation (par des photons ou thermiquement par exemple) d'une solution contenant les monomères et les biorécepteurs à immobiliser, formant ainsi un film stable polymérisé. Mais les techniques d'encapsulation souffrent du décrochage des biorécepteurs, se traduisant par une perte d'activité de bioreconnaissance.

Plusieurs possibilités existent pour le dépôt et l'encapsulation de biomolécules, les méthodes par sol-gel et Langmuir-Blodgett étant parmi les plus populaires. Basé sur l'utilisation de matrices poreuses, la technique de sol-gel est induite par l'encapsulation des biomolécules dans un microenvironnement aqueux au travers de gels poreux humides formés par l'hydrolyse et la condensation (traduisant une polymérisation) de matériaux tels des polymères ou de l'oxyde de silicium (SiO_2) [66]. Les avantages de cette méthode proviennent de leur compatibilité avec les biomolécules, comme le travail à température ambiante et la faible dénaturation des biorécepteurs pendant l'encapsulation [67]. De plus, les films formés sont chimiquement, thermiquement et structurellement stables. Cependant, le manque de contrôle de la formation des matrices de pores, que ce soit en taille, en forme ou en densité, influant sur la diffusion des biomolécules ou la reproductibilité de la bioreconnaissance, limite le potentiel de cette méthode dans le développement de biocapteurs.

La technique de dépôt par Langmuir-Blodgett pour l'encapsulation de biomolécules consiste en un transfert de molécules amphiphiles résidant à l'interface air-eau sur un substrat solide [68]. Ainsi, une monocouche peut être formée à chaque dépôt, permettant l'ajout contrôlé de plusieurs couches si le format pour la bioreconnaissance l'exige. Aussi, comme pour les monocouches auto-assemblées, l'assemblage des films déposés par Langmuir-Blodgett offre un contrôle de la densité de biorécepteurs. Les travaux sur les films déposés par cette méthode ont permis la formation de monocouches de biomolécules orientées d'où résulte une activité biologique améliorée par rapport aux techniques traditionnelles d'immobilisation. Il a été démontré que des films Langmuir-Blodgett d'immunoglobulines G déposés sur une couche de protéines A aussi formée par Langmuir-Blodgett ont une activité 40% supérieure à ces mêmes films déposés sur des protéines A immobilisées chimiquement [69]. Néanmoins, les protocoles mis en œuvre pour le dépôt et l'encapsulation de biorécepteurs par Langmuir-Blodgett empêchent une utilisation générique de ces films.

I.2.3 Conclusion : optimisation de la couche biologique sensible

Avec les avancées des techniques de modification génétique, les biorécepteurs protéiques peuvent être chimiquement modifiés pour les rendre plus stables et plus spécifiques. Des travaux ont montré, par exemple, que l'immobilisation d'anticorps par la partie F_c augmente leur capacité de reconnaissance, comparée à des anticorps immobilisés au hasard [70]. Cette amélioration provient d'une meilleure orientation du paratope favorisant l'accessibilité pour l'analyte. Il a aussi été démontré que le clivage des anticorps afin de ne garder que les parties F_{ab} favorise la reconnaissance [71]. C'est dans un esprit similaire que

l'utilisation de peptides en tant que biorécepteurs d'affinité devient courante. Comme il a été vu, les CDR des anticorps ne représentent qu'un enchaînement de quelques acides aminés, facilement synthétisables sous formes de peptides. Ainsi, leur structure linéaire les rend facilement accessibles par les analytes pour une biorecognition améliorée [21]. Il reste néanmoins important de noter qu'à l'heure actuelle, il semble ne pas exister de biorécepteurs naturels (catalytiques ou d'affinités) pouvant être conservés à l'air et à température ambiante, sans perte d'activité. Au contraire, les polymères à empreinte moléculaire, outre d'autres caractéristiques favorables, résolvent ces problèmes de conservation, ce qui en fait des biorécepteurs synthétiques avec un important potentiel [72].

Quoiqu'il en soit, malgré les efforts de recherche sur les couches biologiques sensibles, tant au niveau des biorécepteurs que des couches d'immobilisation, il n'existe pas de méthode générique. Cela se traduit par un choix des biorécepteurs et de la couche d'immobilisation en fonction non seulement de l'analyte à reconnaître mais aussi, comme il sera approfondi dans la section suivante, en fonction du type de transduction.

I.3 Méthodes de transduction

I.3.1 Introduction

Même si la capacité de reconnaissance spécifique d'analytes est assurée par la couche biologique, un biocapteur doit être capable de traduire la biorecognition en un signal physiquement mesurable. C'est le rôle assuré par le transducteur. Une méthode de transduction doit donner des informations non seulement sur la qualité de la reconnaissance mais aussi sur la quantité d'analytes reconnus. Cela permet d'introduire la notion de sensibilité, capitale pour un transducteur. Comme pour la couche biologique, il y a aussi une notion de spécificité de la transduction qui doit être prise en compte. L'information donnée par le transducteur ne doit correspondre qu'à la reconnaissance biologique et non pas à des mesures parasites provenant du milieu environnant ou des effets de température, par exemple.

Parmi la variété des méthodes de transduction, les méthodes classiques utilisent des marqueurs pour traduire la reconnaissance. Les types de marqueurs les plus communs sont fluorescents, radioactifs ou encore enzymatiques. Le marquage des analytes présente l'avantage d'une transduction hautement sensible. Des systèmes permettent même d'atteindre, ou du moins d'approcher, la détection de la molécule unique, dans le cas de transduction par fluorescence, notamment grâce aux progrès de l'optique [73]. Néanmoins, au-delà du coût d'expérience augmenté par le besoin de marquage, la modification des analytes peut influencer sur la qualité et la dynamique de la reconnaissance. Aussi, il est évident que les méthodes de transduction ne nécessitant pas de marquage sont plus universelles et plus rapidement applicables dans une large gamme d'applications. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à des méthodes de transduction sans marquage. Les transducteurs optiques seront d'abord présentés, et l'accent sera mis sur la résonance plasmonique de surface (SPR). Les transducteurs électrochimiques seront ensuite décrits avant l'introduction des transducteurs mécaniques, avec un intérêt particulier pour la microbalance à quartz (QCM-D).

1.3.2 Méthodes de transduction optique

1.3.2.1 Introduction sur les méthodes de transduction optique

La connaissance avancée de l'optique et des outils associés a favorisé l'utilisation de cette transduction pour les biocapteurs. Depuis la première réalisation en 1975 de capteurs chimiques pour la mesure de la concentration de dioxyde de carbone et de dioxygène par des variations de spectre d'absorption [74], une large variété de méthodes de transduction optiques a été utilisée pour les capteurs chimiques mais aussi les biocapteurs. Les techniques de transduction sans marquage concernent essentiellement l'ellipsométrie, l'interférométrie, la spectroscopie par diffraction ou par des miroirs résonants ou la résonance plasmonique de surface, par exemple. Grâce à ces méthodes de transduction, une reconnaissance biologique est déterminée par variation d'indice de réfraction, par des propriétés d'absorbance des analytes ou par des changements opto-chimiques de la zone de transduction. Le tableau 1.1 présente différentes possibilités de principes optiques utilisés dans ces méthodes de transduction. Ce tableau montre la variété des phénomènes mis en jeu et le besoin de leur combinaison pour une transduction efficace. Il reste néanmoins à noter que les techniques basées sur un champ évanescent et sur la réflexion de la lumière incidente sont prépondérantes. Le principe de la réflexion induit l'utilisation d'outils d'imagerie pour recueillir les informations contenues dans l'onde réfléchie. Enfin, la plupart des transducteurs sont intrinsèquement basés sur des effets de polarisation de la lumière et/ou des changements de phase du signal.

Effets optiques	Diffraction	Miroirs résonants	Interférométrie optique	Ellipsométrie	Spectroscopie par interférence	Résonance plasmonique
	GCP	RM	intégrée IOI	EII	réflectométrique RIFS	de surface SPR
Réflexion	X	O	X	O	O	O
Interférence	X	X	O	X	O	X
Champ évanescent	O	O	O	X	X	O
Couplage de modes	X	O	O	X	X	X
Paramètres						
Lumière polarisée	X	O	O	O	X	O
Variation de phase	X	O	O	O	O	X
Méthode par résonance	O	O	X	X	X	O

Tableau 1.1 : Phénomènes physiques utilisés par les méthodes de transduction optique.

La résonance plasmonique de surface étant la plus utilisée et la plus appropriée aux biocapteurs, cette technique sera approfondie dans le paragraphe suivant. En effet, la plupart des méthodes présentées dans le tableau ont été initialement développées dans une perspective de caractérisation physique de couches et ont été modifiées pour les utiliser comme transducteurs pour les biocapteurs. C'est ainsi que l'ellipsométrie dont la fonction principale concerne la mesure d'épaisseur de couches telles que des métaux, des oxydes, etc a été dérivée pour l'étude de l'épaisseur d'une couche de lipides lors de la fusion de vésicules lipidique aussi bien que l'épaisseur de la couche d'eau entre cette couche et la surface [75]. Cette couche d'eau est cruciale car d'elle dépend l'intégrité de la couche lipidique. L'ellipsométrie spatiale a aussi été utilisée pour la caractérisation qualitative d'une reconnaissance immunologique de type antigène-anticorps [75]. La discrimination des changements d'épaisseur et des variations de l'indice de réfraction montrent des différences nettes lors de l'adsorption de l'antigène sur la surface et lors de l'interaction avec les anticorps. Les mesures d'épaisseur ont montré une augmentation de 5.2 nm lors de l'adsorption directe des antigènes (immunoglobulines de lapin) et une épaisseur totale de 13.5 nm lors de la reconnaissance avec des anticorps anti-lapin.

L'interférométrie optique a pu être utilisée pour l'étude de l'interaction entre la biotine et la streptavidine [76]. La physisorption de la streptavidine a révélé une variation de phase au niveau de la surface, mesurée en temps-réel. D'autres mouvements de phase ont aussi été observés lors de l'incubation de biotine. Les changements de phase lors des différentes étapes du protocole ont pu être corrélés à des changements d'épaisseur et de densité à la surface du transducteur, par l'intermédiaire d'un modèle (cf. figure 1.10). Les mesures d'épaisseur et de densité ont été utilisées pour le calcul de la masse absorbée sur la surface. Les résultats montrent une masse de streptavidine absorbée de 2.1 ng/mm^2 , soit $3.82 \times 10^{-14} \text{ moles/mm}^2$ et une masse de biotine de 0.02 ng/mm^2 , soit $8.2 \times 10^{-14} \text{ moles/mm}^2$. Le rapport du nombre de moles de biotine liées à la streptavidine donne 2.1 :1, qui est proche du rapport stoechiométrique 2 :1, correspondant à deux sites disponibles de streptavidine (le maximum de sites disponibles est de quatre).

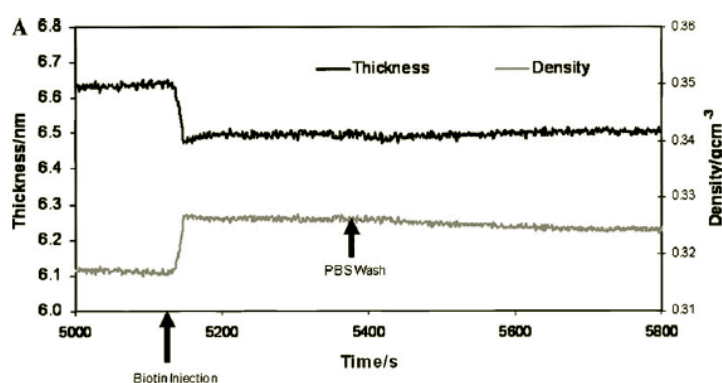


Figure 1.10 : Variation de densité et d'épaisseur lors de l'adsorption de biotine obtenue par ellipsométrie [76].

Les exemples d'application précédemment décrits montrent clairement la possibilité d'utilisation de transducteurs optiques pour la caractérisation sans marquage d'une reconnaissance biologique. Cependant, les critères tels que la haute sensibilité ou la détection parallèle restent difficiles à obtenir. C'est pourquoi, les efforts sur la méthode de résonance plasmonique de surface ont abouti sur des systèmes dont les performances sont plus avancées que les autres techniques de transduction optique pour la détection de biomolécules. Cette technique, devenue référence pour la détection quantitative en temps réel sans marquage d'espèces biologiques, mérite une attention particulière, tant au niveau des principes physiques qu'au niveau applicatif.

1.3.2.2 La résonance plasmonique de surface (SPR)

Le potentiel de la résonance plasmonique de surface (SPR) pour la caractérisation de couches minces et le suivi d'événements à l'interface de métaux a été reconnu à la fin des années 70. Depuis que l'utilisation de la SPR pour la détection de gaz et de biomolécules a été démontrée par Nylander et Liedberg en 1982 [77], l'intérêt pour cette méthode de transduction n'a cessé de croître, l'accent étant mis sur la détection de biomolécules. C'est grâce aux progrès réalisés que la SPR a montré un intérêt comme méthode de transduction notamment lors du couplage avec les biorécepteurs d'affinité, permettant une analyse quantitative, parallèle, temps-réel et sans marquage de l'interaction biologique.

La physique de la résonance plasmonique a longtemps été étudiée, essentiellement depuis la fin des années 60 [78,79]. Ce phénomène correspond à l'oscillation d'une densité de charges qui peut exister à l'interface entre deux milieux présentant des constantes diélectriques de signes opposés, comme un métal et un diélectrique par exemple. L'onde de densité de charges est associée à une onde électromagnétique, dont le vecteur d'onde atteint son maximum à l'interface et décroît dans les deux milieux de manière évanescence.

La résonance plasmonique de surface n'est possible que dans le cas de la réflexion totale de l'onde lumineuse incidente (TIR). En effet, d'après la loi de Descartes, il existe un angle critique θ au-delà duquel la lumière incidente est totalement réfléchie. L'association du phénomène de réflexion totale avec des milieux de constantes diélectriques différentes provoque la création d'une onde évanescence [80], dont la longueur d'onde est égale à celle de la lumière incidente et de profondeur de champ égale à la longueur d'onde. La pénétration de l'onde évanescence dans le milieu conducteur (principalement de l'or ou de l'argent) incite la génération d'ondes électromagnétiques sur la face opposée du métal, parallèles à la surface. L'onde générée, basée sur la génération de plasmons de surface, se propage selon un vecteur d'onde (k_{sp}) dépendant de l'indice de réfraction du milieu, de l'épaisseur et des propriétés de l'onde évanescence (cf. figure 1.11). Le vecteur d'onde (k_x) issu des photons de la lumière incidente est caractérisé par la longueur d'onde et l'angle de la lumière incidente. L'égalité de ces deux vecteurs provoque l'activation de plasmons dont la propagation crée un champ évanescence intensifié principalement dans le milieu d'indice inférieur. Ce phénomène résultant d'un transfert résonant d'énergie, la résonance plasmonique de surface se manifeste par l'absorption résonante de l'énergie de l'onde incidente. Ainsi, l'occurrence de la SPR, pour un angle θ , se traduit par une onde lumineuse réfléchie très nettement atténuée.

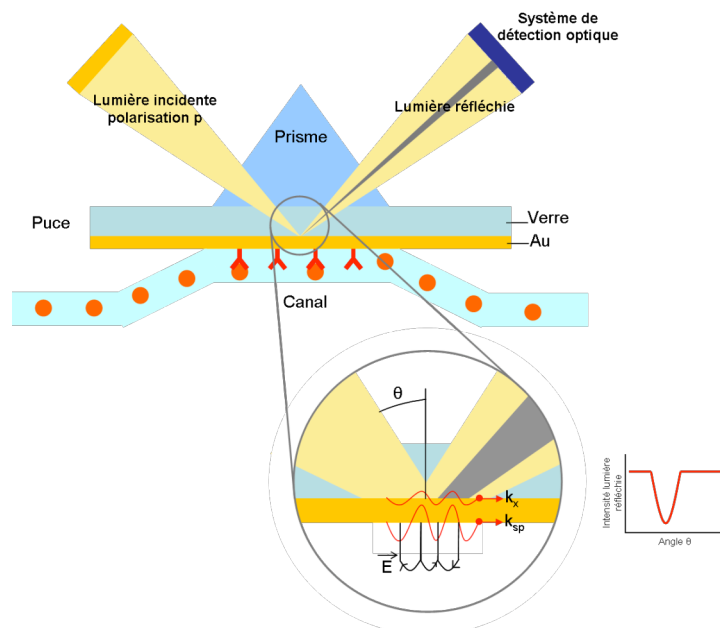


Figure 1.11 : Principe de la résonance plasmonique de surface (SPR).

La mesure d'interactions biologiques par SPR provient d'un changement local de l'indice de réfraction, à la surface du transducteur. En effet, à cause de la modification de la concentration à la surface, l'indice de réfraction varie, changeant aussi les propriétés du vecteur d'onde k_{sp} . Comme il a été vu, le vecteur d'onde issu des photons de la lumière incidente dépend de la longueur d'onde et l'angle d'incidence. La longueur d'onde étant fixe, la conservation de l'égalité des deux vecteurs d'onde (et donc du phénomène SPR) provient

du changement de l'angle θ incident. C'est ainsi par la mesure des variations de l'angle de l'onde réfléchie sombre que la transduction de reconnaissance biologique peut être mise en évidence. Les progrès des photodétecteurs permettent la mesure de variations d'angle de l'ordre du millidegré. La forte sensibilité de variations des propriétés optiques à la surface du transducteur pour obtenir la résonance plasmonique de surface fait de cette méthode un outil sensible pour la reconnaissance d'espèces biologiques.

Le succès de la détection de biomolécules par SPR est largement porté par la réussite de la société Biacore AB récemment rachetée par General Electric. Cette entreprise suédoise, leader sur le marché des biocapteurs par SPR, propose une gamme d'appareils destinés à la reconnaissance quantitative d'espèces biologiques en temps-réel, sans marquage, en mode parallèle et hautement sensible. En effet, un changement d'angle de l'onde réfléchie sombre de 1 millidegré correspond à une variation de masse de 1 pg/mm² sur la surface du transducteur et donc 1 unité de résonance (RU), unité arbitraire choisie par le constructeur. Les champs d'application sont vastes, allant de l'analyse alimentaire [81], à l'immunogénicité [82], en passant par la protéomique [83] et la recherche de drogues [84]. En plus de la reconnaissance biologique, cette méthode de transduction permet la recherche d'informations quantitatives sur la reconnaissance, que ce soit l'identification d'une molécule, la spécificité d'une interaction ou la cartographie d'une banque de biomolécules, par exemple. La figure 1.12 présente le nombre d'articles publiés sur la période 1994-2003 en fonction du type d'informations recherchées lors de l'étude par SPR d'une interaction biologique. De ce graphique en ressortent trois domaines prédominants : la spécificité, la cinétique d'interaction et l'affinité entre deux partenaires.

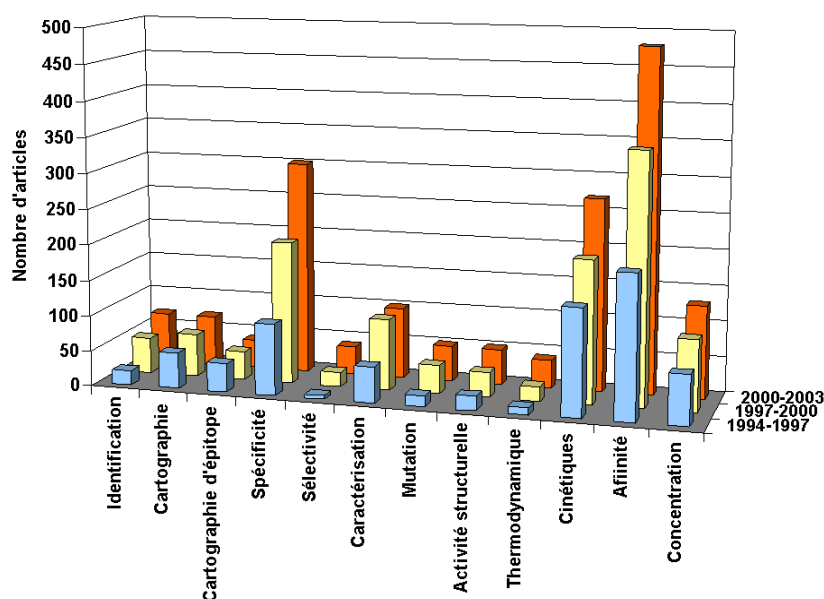


Figure 1.12 : Nombre d'articles publiés sur la période 1994-2003 pour différentes thèmes applicatifs de la SPR.

Ces domaines de prédilection proviennent d'une caractéristique principale de la transduction par SPR d'interactions biologiques. En effet, la mesure temps-réel et quantitative permet le suivi de l'évolution de l'interaction en mode dynamique, appelée cinétique de l'interaction. Comme le montre la figure 1.13, la reconnaissance entre biomolécules est caractérisée par un cycle débutant par une phase d'association. Cette phase correspond à la

quantité d'analyte se liant aux biorécepteurs (appelés ligands). Elle est caractérisée par la constante de vitesse d'association k_a et se poursuit jusqu'à un état d'équilibre où il se forme autant de complexes analyte-ligand qu'il s'en défait. Lors de l'arrêt de l'injection de l'analyte, les molécules précédemment fixées se dissocient des biorécepteurs, la plupart des reconnaissances biologiques étant réversibles. Cette étape de dissociation est définie par une constante k_d . Le rapport entre les constantes de vitesse d'association et de dissociation correspond à une constante d'affinité, soit par rapport à l'association à l'équilibre ($K_A = k_a/k_d$), soit par rapport à la dissociation à l'équilibre ($K_D = k_d/k_a$). Enfin, afin d'accélérer le processus de dissociation, une phase de régénération permet la coupure des liaisons entre l'analyte et le ligand (puisque ce sont des liaisons faible énergie), pour un retour au niveau initial. Ainsi, l'analyse cinétique donne des informations complémentaires sur la qualité de la reconnaissance biologique. Par exemple, la possibilité de différencier des anticorps selon leur affinité (élevée ou faible) avec les biorécepteurs peut se révéler d'une de grande importance, notamment pour évaluer des anticorps à usage clinique, dans leur capacité à neutraliser une drogue ou non [85]. De plus, une même affinité peut cacher des cinétiques totalement différentes, aussi l'analyse cinétique dans la mesure d'interactions biologiques est devenue une caractéristique essentielle dans de nombreux domaines (cf figure 1.12).

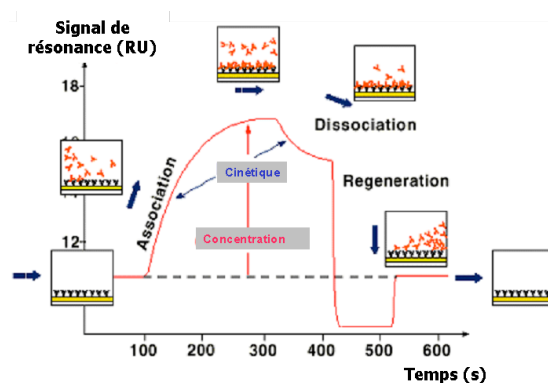


Figure 1.13 : Principe cinétique d'une reconnaissance biologique mesurée en temps-réel (Courtoisie de Biacore AB).

Une des plus récentes applications de la SPR concerne la cartographie de reconnaissance entre une petite molécule et un récepteur fixé. Une revue annuelle sur les avancées des recherches par SPR de l'équipe de David Myszka met d'ailleurs en relief cet aspect [86]. En effet, la sensibilité des appareils tels que ceux développés par BIACORE permet l'élaboration de tels protocoles. Aussi, les expériences étant sans marquage, elles permettent de connaître directement l'accroche de molécules de faible poids moléculaire sur des cibles immobilisées et ont le potentiel de fournir des données cinétiques sur l'interaction entre la drogue et l'analyte.

Par exemple, l'interaction entre une drogue et les protéines du plasma affectent l'efficacité de la drogue. Si l'accroche sur les protéines est trop forte, l'action de la drogue peut ne pas avoir lieu puisque la drogue n'atteint pas la molécule cible. D'ailleurs, dans la plupart des cas, l'utilisation d'une protéine intermédiaire est favorisée. Cela peut réduire les fluctuations dans la concentration de drogue libre, prolonger l'effet de la drogue et la protéger. Dans une série d'expériences, dix inhibiteurs potentiels de l'enzyme anhydrase carbonique, enzyme transformant le dioxyde de carbone (CO_2) en bicarbonate et protons, ont été testés [87]. Leur association avec l'albumine humaine (HSA) et la glycoprotéine alpha-1-acide (AGP), deux protéines du plasma, a été étudiée. Dans ce cas d'étude, le propranolol et la

warfarine sont utilisés comme référence, puisque leurs associations avec la HSA et l'AGP sont connues. Les résultats obtenus, présentés sur la figure 1.14, montrent la forte accroche de la sulfachinoxaline sur la HSA et l'accroche négligeable de la CBSA et le sulpiride. Ainsi, cette cartographie permet de sélectionner des molécules potentiellement utilisables comme drogues. La suite de l'étude a montré l'affinité de ces dix inhibiteurs avec l'anhydrase carbonique, afin de choisir le meilleur compromis entre l'association avec les protéines du plasma et l'affinité avec la cible.

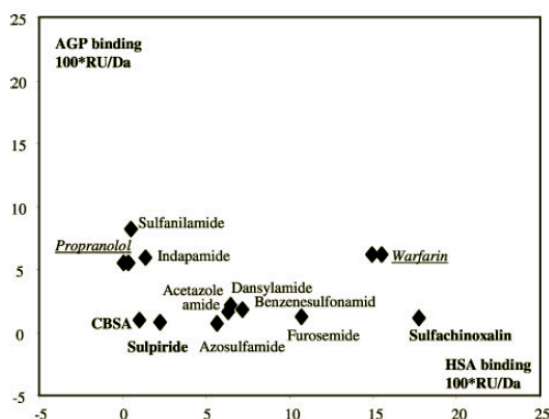


Figure 1.14 : Niveaux d'association de dix inhibiteurs de l'anhydrase carbonique sur l'albumine humaine (HSA) et la glycoprotéine alpha-1-acide (AGP) obtenus par SPR [87].

Il est néanmoins important de noter que malgré les nombreux avantages de la transduction par SPR présentés dans ce paragraphe, quelques limitations doivent être prises en compte. La surface du transducteur ne peut qu'être un métal noble, de façon traditionnelle l'or, ce qui limite le choix des procédures d'immobilisation. Aussi, la complexité de la physique de la résonance plasmonique de surface et le besoin d'éléments externes limitent le niveau d'intégration des appareils et donc leur portabilité, représentant un verrou technologique sur lequel des efforts considérables sont mis en œuvre par les industries, afin de prolonger le succès de cette méthode de transduction. Une deuxième limitation est la longueur de la distance optique utilisable pour les analyses qui est théoriquement une longueur d'onde mais en fait se limite à 300-500 nm pour une sensibilité du signal acceptable. Cette restriction due au principe optique lui-même, limite l'étude à des molécules ou à des entités inférieures à la taille d'une cellule eucaryote (environ 10-20µm), et donc ne permet pas d'aborder directement les interactions sur cellules (des virus et bactéries de taille plus réduite ont pu être étudiés).

1.3.3 Les méthodes de transduction électrochimique

Les méthodes de transduction électrochimique sont populaires dans le domaine des biocapteurs, non seulement pour des raisons historiques [2], mais aussi pour la simplicité des principes mis en jeu. Ces techniques sont plus en adéquation avec la miniaturisation que les méthodes de transduction optique, grâce à leur niveau d'intégration et leur compatibilité avec les techniques de fabrication dérivées de la microélectronique.

Les transducteurs électrochimiques sont classifiés selon trois catégories : ampérométriques, potentiométriques et conductimétriques. Contrairement aux méthodes de transduction génériques telles que la résonance plasmonique de surface ou la microbalance à

quartz, le résultat de la transduction par électrochimie provient d'un signal direct ou indirect généré par la reconnaissance des analytes, montrant leur couplage intéressant avec les biorécepteurs catalytiques. Hormis le principe général de chaque catégorie de transduction électrochimique, chaque application de ces biocapteurs est un cas particulier de fonctionnement du transducteur. Donc seuls des cas applicatifs parmi les plus significatifs seront présentés dans cette partie.

I.3.3.1 Les transducteurs ampérométriques

La transduction par ampérométrie représente une des méthodes de transduction électrochimique les plus couramment utilisées, de part sa sensibilité, sa rapidité et son faible coût. En effet, cette méthode est basée sur la détection du courant électrique associé aux électrons générés lors d'une réaction d'oxydoréduction. Comme le montre la figure 1.15, après l'immobilisation de biorécepteurs à la surface d'une électrode de travail, l'interaction avec l'analyte peut provoquer une réaction directe ou indirecte de type redox, modifiant l'accumulation de charges au niveau de l'électrode par rapport à une électrode de référence.

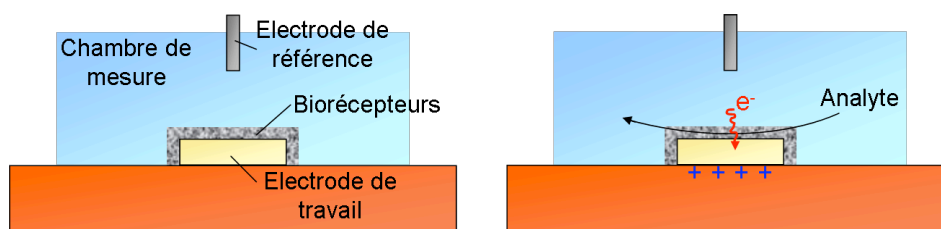


Figure 1.15 : Principe de la transduction par ampérométrie.

Les applications prépondérantes des transducteurs ampérométriques utilisent les biorécepteurs catalytiques, où le courant généré par les électrons issus directement ou indirectement de la réaction catalytique est mesuré par l'électrode. Les exemples les plus communs concernent la détection de glucose par l'intermédiaire de l'enzyme glucose-oxydase. Comme il a été vu dans la section I.2.1.1, la reconnaissance du glucose par la glucose-oxydase en présence d'oxygène et d'eau catalyse le glucose en acide gluconique et génère de l'eau oxygénée (H_2O_2) [88]. Ensuite, l'eau oxygénée peut être oxydée par une électrode de référence de type Ag/AgCl au potentiel de +600 mV. Les électrons générés lors de la réaction d'oxydation sont mesurés par l'électrode de travail sous la forme d'un courant. Cette méthode de transduction indirecte est fréquemment utilisée comme technique de référence pour la détection de glucose. Cependant, les potentiels mis en œuvre pour l'électro-oxydation de l'eau oxygénée peuvent causer des interférences avec le milieu biologique, étant donnée la présence de substances facilement oxydables, influençant la qualité de la détection. Ainsi, l'encapsulation des enzymes dans des polymères a été favorisée pour limiter ces effets [89,90].

La miniaturisation des transducteurs électrochimiques a permis le développement de micro-transducteurs ampérométriques afin d'améliorer la sensibilité et les temps de réponse. A l'échelle micrométrique, les capteurs développés doivent contenir l'électrode de travail et l'électrode de référence intégrées sur la même puce. Il a ainsi pu être réalisé un capteur de glucose implantable [91]. Le système est basé sur un fil de platine de 178 μm de diamètre dont différentes couches pour la transformation du glucose en eau oxygénée, la limitation des interférences et le contrôle de l'influx de glucose et d'oxygène sont enroulées autour de l'électrode. L'électrode de référence englobe l'ensemble précédemment décrit. Après la

calibration des capteurs *in vitro*, les résultats obtenus *in vivo* (sur des rats) montrent une bonne cohérence entre les niveaux de glucose mesurés dans le sang par les capteurs et par les techniques de dosage traditionnelles.

Les quelques exemples décrits ci-dessus montrent un degré d'aboutissement élevé de biocapteurs par transduction ampérométrique. Cependant, ce niveau de développement est lié au couplage intéressant avec les biorécepteurs catalytiques et notamment à la détection de glucose dont le marché potentiel est grand public.

1.3.3.2 Les transducteurs potentiométriques

Comme pour les transducteurs ampérométriques, la popularité des transducteurs potentiométriques provient de la connaissance avancée des phénomènes électrochimiques mis en jeu. La transduction potentiométrique traduit les variations de potentiels au niveau d'électrodes, causées par des ions, des réactions chimiques ou plus récemment par la charge électrique de faibles quantités de biomolécules. La figure 1.16 montre un exemple de transducteur potentiométrique largement utilisé, le transistor à effet de champ sensible aux ions (ISFET). Ces transducteurs sont disponibles dans le commerce (comme les ChemFET), principalement comme capteurs de pH.

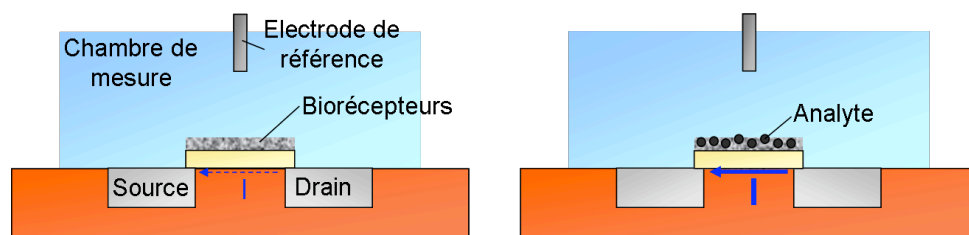


Figure 1.16 : Principe de fonctionnement d'un ISFET par transduction potentiométrique.

Hormis les applications classiques de ces transducteurs, les avancées les plus significatives dans ce domaine ont été réalisées au niveau des échelles micro et nanométriques. En effet, l'engouement pour les nanofils permet le développement de transducteurs hautement sensibles grâce à un rapport de forme largement favorable (la surface de contact est élevée comparée au volume global des fils). C'est ainsi que l'équipe de C. Lieber à Harvard a démontré l'utilisation de nanofils en silicium dopé P placés entre deux électrodes pour la réalisation de nanoFET (cf figure 1.17) [92].

Ces transducteurs potentiométriques ont tout d'abord été validés comme capteurs de pH avant d'être utilisés pour la reconnaissance spécifique d'anticorps (modèle antigène biotine / anticorps monoclonaux anti-biotine). Les résultats obtenus montrent que lors de l'injection d'anticorps anti-biotine sur la biotine immobilisée, une diminution de la conductance mesurée au niveau des électrodes est significative de l'accroche de molécules chargées positivement, ce qui est le cas des anticorps utilisés aux conditions de pH ($\text{pH} = 7$). Des expériences contrôles ont confirmé la spécificité de la reconnaissance. Aussi, comme le montre la figure 1.18, un effet dose a pu être observé puisque le changement de conductance varie avec la concentration en anticorps, jusqu'à la concentration de 10 nM à partir de laquelle une saturation a pu être observée. D'autres expériences sur l'interaction entre la biotine et la streptavidine ont permis d'atteindre des limites de détection aussi faibles que 10 pM.

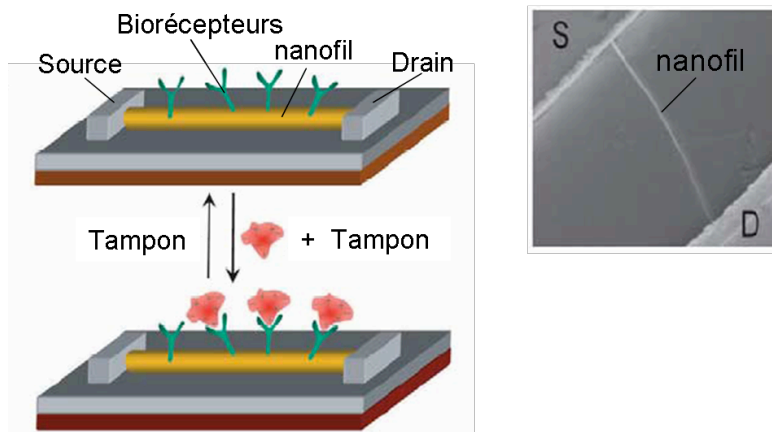


Figure 1.17 : Transduction de la reconnaissance biologique par un nanoFET (adapté de la référence [92]).

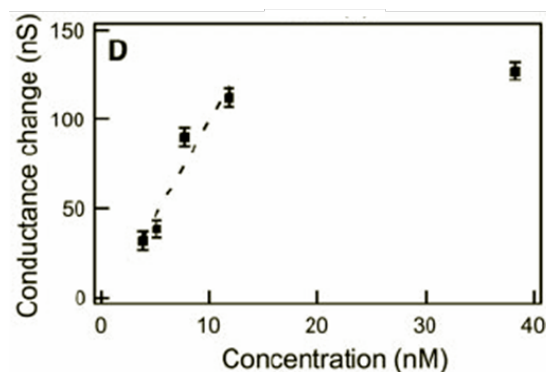


Figure 1.18 : Influence de la concentration en anticorps anti-biotine sur le changement de conductance d'un nanoFET (Courtoisie de C. Lieber [92]).

Dans un autre type de reconnaissance, les mêmes structures nanoFET ont repoussé les limites dans la détection de virus [93]. Dans ce cas, après l'immobilisation d'anticorps contre les virus d'intérêts, la détection parallèle d'un seul virus a pu être achevée, correspondant à une concentration de 80 aM (10^{-18} M). De plus, les expériences par variation de pH ont confirmé que les changements de conductance étaient dus à des effets de champ et pas à des changements de capacité, ce qui est le cas dans des expériences similaires faites avec des nanotubes de carbone [94].

L'achèvement de biocapteurs par transduction potentiométrique à base de nanofils correspond à des avancées technologiques considérables. Néanmoins, il est important de noter que l'alignement de nanofil entre deux électrodes n'est pas aisé, limitant encore le potentiel de ces structures en tant que transducteurs potentiométriques hautement sensibles.

1.3.3.3 Les transducteurs conductimétriques

Les méthodes de transduction par conductimétrie sont attractives grâce à leur simplicité de fabrication et leur facilité d'utilisation. Comme le montre la figure 1.19, les transducteurs conductimétriques mesurent les changements d'impédance électrique entre deux

électrodes, où les variations peuvent provenir à une interface ou dans la région comprise entre les électrodes. Contrairement aux transducteurs ampérométriques et potentiométriques, la simplicité de fabrication provient de l'absence d'électrode de référence. La mesure de deux types d'impédance peut être un avantage ou un inconvénient, selon la composition du milieu principalement. Par exemple, si les changements doivent être mesurés à l'interface des électrodes, la composition du milieu dans la région entre les électrodes (la force ionique entre autre) peut perturber les mesures. C'est pourquoi, malgré la simplicité du principe de détection, des optimisations sont nécessaires afin d'améliorer la sélectivité de la détection.

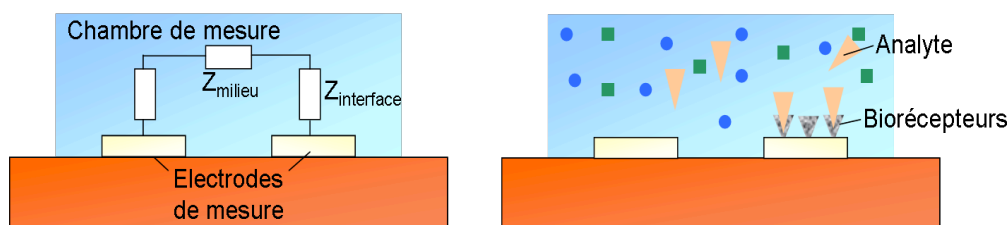


Figure 1.19 : Principe de la transduction par conductimétrie.

Comme pour les transducteurs ampérométriques, la transduction par conductimétrie est adéquate pour l'utilisation de membranes contenant les biorécepteurs [95, 96]. C'est ainsi que le couplage de ces transducteurs avec les polymères à empreinte moléculaire a généré des applications pertinentes. La détection d'herbicide, tels que le 2,4-D [97] ou l'atrazine a pu être achevée. Dans le cas de l'atrazine, la construction d'une membrane suspendue contenant le MIP atrazine entre deux électrodes de platine a pu être réalisée [98]. Une optimisation approfondie de la composition du polymère a été nécessaire, tant au niveau des monomères qu'au niveau du porogène. Ces améliorations se sont révélées être importantes non seulement pour l'obtention de membranes flexibles et stables, mais aussi car la réponse conductimétrique semblait être dépendante de la capacité du MIP à changer de conformation lors de l'accroche de l'analyte. L'efficacité des optimisations a permis d'atteindre des limites de détection de 5 nM pour la détection de l'atrazine avec une bonne spécificité par rapport à des herbicides structurellement proches de l'atrazine. Les détails des optimisations n'ont pas été présentés dans ce paragraphe, mais l'essentiel du travail effectué pour cette détection très sensible par conductimétrie a concerné l'obtention de la meilleure composition du MIP. Cela met en évidence que malgré la simplicité de la détection, la sélectivité intrinsèque de cette transduction est un facteur limitant.

1.3.4 Les méthodes de transduction mécanique

1.3.4.1 Introduction sur les méthodes de transduction mécanique

Les méthodes de transduction mécanique sont principalement basées sur la génération et la détection d'ondes mécaniques ou acoustiques. Comme une onde acoustique se propage au travers ou à la surface d'un matériau, un changement au niveau de la zone de passage de l'onde propagée affectera sa vitesse et/ou son amplitude. Les variations de la vitesse de l'onde, induites par une augmentation ou une diminution de masse typiquement, peuvent être suivies par la mesure de spectres en fréquence et corrélées à l'information correspondant à la reconnaissance biologique recherchée.

La plupart des transducteurs à ondes acoustiques utilisent un matériau piézoélectrique pour la génération et la propagation de l'onde. Depuis la découverte de la piézoélectricité par les frères Curie en 1880, l'intérêt pour ce phénomène physique n'a cessé de croître. Un des avantages principal de la piézoélectricité provient de la réversibilité du phénomène [99]. En effet, l'effet direct traduit la génération de charges électriques lors de l'application d'une contrainte au matériau alors que l'effet inverse concerne la déformation mécanique du matériau lorsqu'un champ électrique y est imposé. Ainsi, les transducteurs mécaniques piézoélectriques se réfèrent à la génération d'un champ électrique oscillant pour créer l'onde acoustique, déformant le matériau, et dont la propagation est mesurée par la conversion des charges générées, dues à la déformation, en un champ électrique. Plusieurs types de matériaux piézoélectriques peuvent être utilisés pour les transducteurs à onde acoustique. Parmi eux, les plus communs sont le quartz, le tantalate de lithium (LiTaO_3) et plus récemment, le zirconate titanate de plomb (PZT). Le choix du matériau dépend essentiellement du coût, de sa dépendance en température, de la direction de l'onde générée, son atténuation et sa vitesse de propagation [100].

Les transducteurs à onde acoustique sont classifiés selon le mode de propagation de l'onde au travers ou en surface du matériau piézoélectrique. Si les ondes se propagent dans le substrat, elles sont appelées ondes « bulk » (e.g. dans le volume). Les transducteurs les plus communs utilisant de principe de fonctionnement sont les résonateurs « thickness shear mode » (TSM) et les transducteurs « shear-horizontal acoustic plate mode » (SH-APM). Si au contraire, les ondes se propagent en surface du matériau, ce sont des ondes de surface. Les transducteurs couramment utilisés sont les résonateurs à onde acoustique de surface (SAW) et les ondes acoustiques de surface à cisaillement horizontal (SH-SAW). Le mode de propagation affecte de manière drastique les performances du transducteur et influe sur sa fabrication. Le tableau 1.2 présente la direction du mouvement des grains piézoélectriques selon le type de transduction acoustique ainsi que les gammes typiques de fréquence d'utilisation.

Transduction	Type d'onde acoustique	Déformation des grains (t/ à la direction de propagation de l'onde)	Fréquences d'utilisation (MHz)
TSM	Volume	Transverse	5-20
SH-APM	Volume	Transverse	25-200
SAW	Surface	Transverse et parallèle	30-500
SH-SAW	Surface	Transverse	200-500

Tableau 1.2 : Caractéristiques des ondes générées par différents transducteurs acoustiques.

Parmi les quatre catégories d'ondes acoustiques définies, les résonateurs TSM sont de loin les plus populaires dans les biocapteurs, et sont mieux connus sous le nom de microbalance à quartz (QCM). Ce capteur de masse, tant au niveau physique qu'applicatif, sera approfondi dans la section suivante (I.3.4.2). Sa popularité provient essentiellement de sa simplicité de fabrication, sa stabilité en température, sa sensibilité massique et sa compatibilité avec les mesures en milieu liquide. En effet, l'ensemble des transducteurs à onde acoustique fonctionnent en phase gazeuse ou sous vide, mais seule une sous-catégorie peut encore être utilisée en milieu liquide. Dans le cas des résonateurs TSM, mais aussi SH-APM et SH-SAW, les ondes générées se propagent principalement selon un mouvement de cisaillement horizontal, comme le montre la figure 1.20a pour les SH-SAW. Ainsi, les pertes d'énergie dues au mouvement lors du contact avec un fluide sont faibles, permettant leur

utilisation en milieu liquide sans un amortissement excessif. Au contraire, comme indiqué sur la figure 1.20b, les SAW induisent un déplacement normal à la surface, provoquant une compression des ondes dans un fluide, causant leur fort amortissement. Cependant, ce mode de propagation confine l'énergie de manière optimale, puisqu'il n'y a pas de pertes énergétiques dans le substrat, faisant des transducteurs SAW les plus sensibles aux variations de masse, par rapport aux autres transducteurs acoustiques présentés dans cette section.

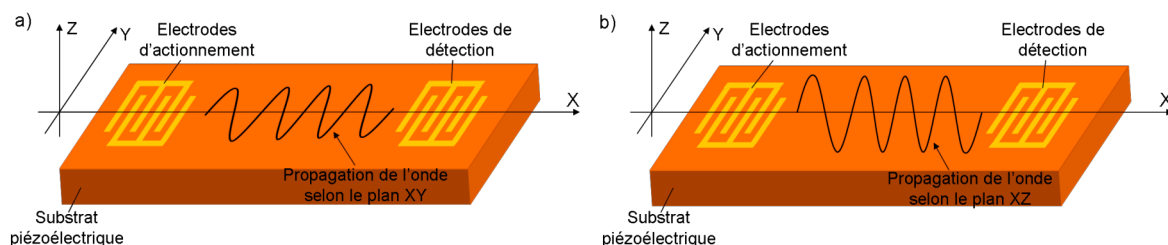


Figure 1.20 : Principe de la transduction acoustique pour : a) les SH-SAW et b) les SAW.

Les transducteurs à onde acoustique étant principalement des capteurs de masse, cela leur confère un aspect générique dans leur utilisation en tant que biocapteurs et ils sont adaptés au couplage avec les biorécepteurs d'affinités. Pour les raisons évoquées précédemment, les seules applications de transducteurs SAW se font en phase gazeuse, limitant les possibilités de transduction de reconnaissance biologique. Des études sur la reconnaissance spécifique de petites molécules telles que l'uranine (un dérivé du FITC) ont pu être achevées en phase gazeuse grâce à des biorécepteurs d'affinité anti-FITC [101]. Après l'immobilisation en phase liquide des anticorps dans la zone de propagation des ondes, une solution aqueuse d'analyte uranine est injectée en faisant barboter de l'azote dans la solution. Le suivi temps-réel de la fréquence de résonance a permis la détection d'analyte à une concentration de 1 nM, montrant la sensibilité du transducteur. La spécificité de la reconnaissance a été démontrée par injection de fluor alexa, où aucun changement de fréquence n'a pu être observé. L'utilisation d'un tel protocole, peu commun et peu stable en termes de dénaturation des biorécepteurs, correspond néanmoins à la démonstration de la possibilité de transduction sensible par des ondes acoustiques de surface d'une reconnaissance biologique. Un cas particulier de transduction par SH-SAW a servi à la détection d'immunoglobulines G en phase liquide [102]. L'ajout d'un guide d'onde aux structures a permis de générer des ondes Lowe [103]. Grâce au guide d'onde, les ondes Lowe générées présentent l'avantage de limiter les pertes d'énergie dans le substrat. La surface du guide d'ondes a été fonctionnalisée par un empilement composé d'une couche lipidique biotinylée supportée, de streptavidine et d'anticorps de mouton biotinylés comme biorécepteurs. Le biocapteur ainsi réalisé a détecté spécifiquement et en temps-réel l'analyte anticorps anti-mouton dans une gamme de concentration de 30 nM jusqu'à 3 μ M.

Malgré les possibilités d'utilisation des ondes acoustiques de surface comme transduction de la reconnaissance biologique, leur sensibilité aux perturbations extérieures limite leurs capacités. Au contraire, le succès de la transduction par TSM, grâce aux microbalances à quartz, en fait, comme la résonance plasmonique de surface, un outil de référence pour la détection sans marquage de biomolécules.

1.3.4.2 La microbalance à quartz avec suivi de la dissipation (QCM-D)

Les réflexions sur la transduction par TSM en tant que capteur de masse ont abouti lorsque Sauerbrey a démontré en 1959 une relation linéaire entre la variation de masse à la surface du transducteur et la variation de fréquence de résonance [104]. Cette équation, décrite ci-dessous, a été calculée pour un quartz comme matériau piézoélectrique (c'est pour cette raison que ces transducteurs sont appelés microbalance à quartz) :

$$\Delta m = \rho_f \delta_f = -\frac{t_q \rho_q}{n f} \Delta f = \frac{C_f}{n} \Delta f \quad (1.2)$$

avec ρ_f et δ_f la densité et l'épaisseur du film ajouté à la surface du transducteur. Par approximations successives, l'équation (1.2) montre une relation directe entre la variation de masse à la surface du transducteur et la variation de fréquence, via la sensibilité massique C_f et l'harmonique concernée n . Cette sensibilité C_f dépend de l'épaisseur t_q et de la densité ρ_q du quartz ainsi que sa fréquence de résonance, montrant que c'est un paramètre intrinsèque du transducteur, déterminé par le matériau. Dans le cas des microbalances à quartz, la sensibilité massique a été calculée à $C_f = -177 \text{ pg}/(\text{mm}^2.\text{Hz})$ pour le mode fondamental ($n=1$). Les harmoniques impaires supérieures peuvent aussi être excitées ($n = 3, 5, 7 \dots$), augmentant la sensibilité du facteur n . Cependant, comme le montre l'équation (1.2), les variations réelles de masse tiennent compte de l'harmonique, ne changeant pas la relation entre la variation de fréquence et la variation de masse. Seule la surface de détection change puisqu'elle diminue lorsque l'harmonique augmente.

D'un point de vue applicatif, comme il a été vu, les transducteurs par ondes acoustiques ont été initialement conçus pour un fonctionnement dans le vide et l'air. Grâce à leur sensibilité, les microbalances à quartz ont ainsi trouvé des applications dans la mesure d'épaisseur de films rigides, tels que des métaux [105]. Par contre, en milieu liquide, l'interface solide-liquide peut changer le comportement de la masse ajoutée, surtout dans le cadre de biocapteurs, et cette influence doit être prise en compte. La propagation des ondes diffère selon les propriétés viscoélastiques de la couche à la surface des électrodes du quartz. Comme le montre la figure 1.21, un modèle viscoélastique, introduit par Voinova et al. [106], traduit le fait que l'onde de cisaillement générée par le quartz se propage et se dissipe dans la couche absorbée.

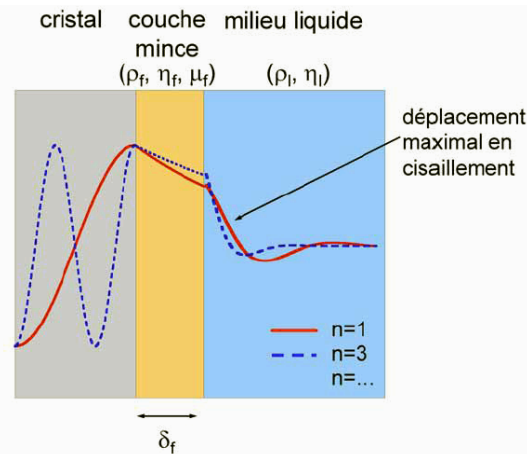


Figure 1.21 : Modèle viscoélastique proposé par Voinova et al. [106] sur la propagation des ondes générées par un quartz.

Cela permet d'introduire un paramètre complémentaire de la fréquence de résonance, appelé dissipation. L'information donnée par la dissipation est représentative des changements de propriétés telles que la conformation, la rugosité de surface, les charges surfaciques ou encore la contenance en eau de couches adsorbées. L'explication physique vient de l'atténuation du signal généré par le quartz. La figure 1.22 présente deux cas de figures représentatifs. En effet, dans le cas d'un quartz excité à sa fréquence de résonance, la coupure du circuit d'excitation provoque une décroissance des oscillations du cristal. Les charges générées pendant la mesure des oscillations (grâce à l'effet direct piézoélectrique) sont mesurées et la décroissance peut être calculée. Le changement temporel du mouvement du quartz est régi par l'équation (1.3) :

$$A(t) = A_0 e^{-\pi f D t} \sin(2\pi f t + \phi) \quad (1.3)$$

A partir de cette équation, issu de l'extrapolation des mesures, peuvent être déterminées la fréquence de résonance et la dissipation. Ainsi, dans le cas d'un film rigide adsorbé, la décroissance sera lente, se traduisant par une faible dissipation (cas a) de la figure 1.22), alors que dans le cas d'un film « mou », donc fortement dissipatif, la décroissance sera rapide (cas b)). C'est à partir de la mesure des paramètres tels que la fréquence de résonance et le facteur de dissipation que la société Q-Sense a développé un système de microbalance à quartz tout d'abord monocapteur (QCM-D 300) et maintenant multicapteurs (QCM-D E4 avec quatre quartz en parallèle). Le succès de ces appareils provient de la combinaison des deux paramètres donnant des informations d'importance dans la caractérisation de biomolécules en milieu liquide.

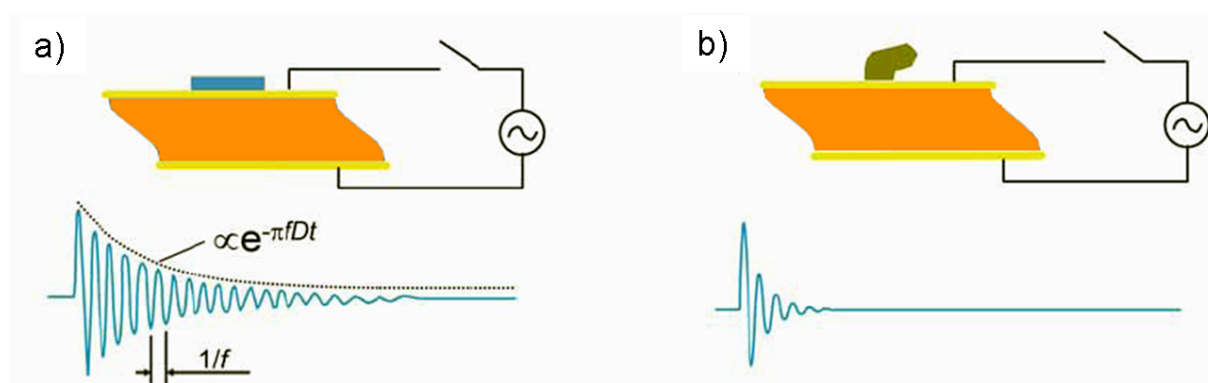


Figure 1.22 : Principe de fonctionnement d'une microbalance à quartz avec suivi de la dissipation. a) Cas où le film immobilisé sur le quartz est rigide b) Cas où le film immobilisé sur le quartz est « mou » (courtoisie de Q-sense).

De part la transduction sans marquage et la mesure de masse sur diverses surfaces, la microbalance à quartz offre des possibilités de détection universelles. Les champs d'application sont donc vastes, allant de la caractérisation de la biorecognition d'un analyte à la découverte de drogues, l'effet de surfactants, la formation de biofilms ou encore la fonctionnalisation de surfaces. Les premières applications de la QCM-D ont concerné la détection d'anticorps par des antigènes adsorbés sur une surface d'or [107] ou d'oxyde de titane (TiO_2) [108]. Comme le montre la figure 1.23a), l'adsorption d'albumine sur une surface de TiO_2 se traduit par une diminution de la fréquence de résonance et une faible augmentation de la dissipation. La fréquence diminue puisque la variation de masse est inversement proportionnelle au changement de fréquence. Lors de l'injection des anticorps anti-albumine, une drastique diminution de la fréquence peut être observée. Or, d'après le

rapport de poids moléculaires entre l'albumine et les anticorps, qui est de 2.27, la variation de fréquence lors de la reconnaissance de l'anticorps ne pourrait être au maximum que 2.27 fois plus élevée que celle due à l'adsorption de l'albumine (en supposant une reconnaissance stoechiométrique anticorps - antigène, ce qui est peu probable étant donnée la bivalence de l'anticorps). Le rapport entre les niveaux de variation de fréquence est en fait de l'ordre de 8. L'explication de cette différence est contenue dans la variation de la dissipation. En effet, lors de l'injection des anticorps, une nette augmentation de la dissipation peut être observée. Cela traduit donc une couche souple formée par les anticorps. Une interprétation possible vient du fait que la couche formée par la reconnaissance contient beaucoup d'eau, la rendant fortement dissipative (comme représenté sur la figure 1.23b)). L'interprétation des résultats obtenus met en évidence le fait que la microbalance à quartz mesure une « masse humide », contrairement à la résonance plasmonique de surface qui mesure une « masse sèche ». L'information contenue dans la dissipation est ainsi capitale dans la validation des mesures de masse obtenues par la fréquence de résonance.

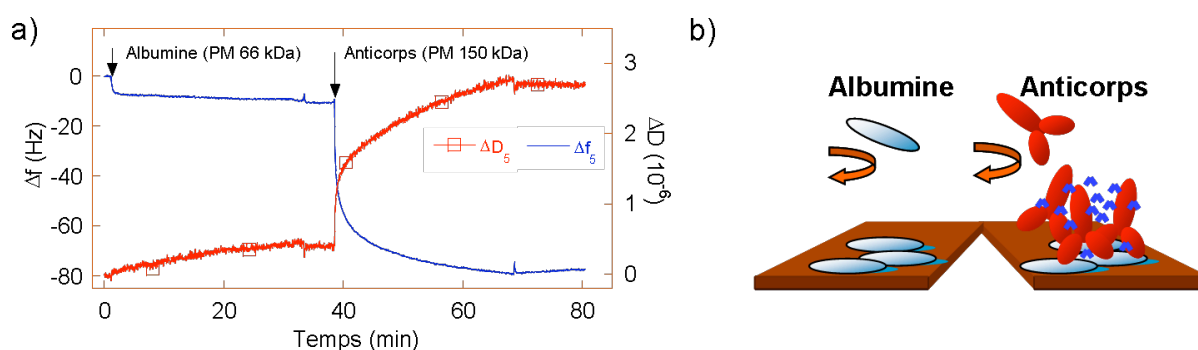


Figure 1.23 : Reconnaissance biologique d'anticorps anti-albumine par l'albumine mesurée à la QCM-D (adapté de [108]). a) Variation de la fréquence de résonance et de la dissipation lors de l'injection de l'albumine et des anticorps b) Représentation schématisée du comportement de l'antigène et des anticorps en termes d'eau absorbée lors de l'expérience.

La complémentarité de la mesure de fréquence de résonance et de dissipation permet aussi de mesurer des variations de propriétés de couches, comme le changement de conformation de protéines. Une application type concerne une protéine synthétisée par la moule (la Mefp-1) pour son accroche sur les rochers, par exemple. Dans les applications marines, la recherche de colles permettant une forte adhérence en milieu liquide et salin est un facteur important. C'est dans cette optique que la compréhension du comportement de cette colle protéique a suscité un intérêt. Des expériences à la QCM-D ont montré tout d'abord la capacité d'adsorption des protéines Mefp-1 sur un quartz Or fonctionnalisé par une SAM [109]. Comme le montre la figure 1.24a), l'accrochage organisé des protéines se traduit par une forte diminution de la fréquence de résonance et une forte augmentation de la dissipation. Comparativement, la variation de masse observée à la QCM-D est dix fois supérieure à celle obtenue par ellipsométrie ou par résonance plasmonique de surface (cf. figure 1.24b)). Comme il a été vu, la nette augmentation de dissipation traduit le fait que les protéines adsorbées contiennent de l'eau, expliquant la différence de niveaux entre la QCM et la SPR. Après rinçage, l'injection de NaIO_4 (assimilable au sel de mer) induit une augmentation de la fréquence de résonance et une diminution de la dissipation. L'interprétation de ces observations ne peut provenir de la désorption des protéines sur la surface, montrant ainsi que l'injection de sel change la conformation des protéines Mefp-1. La perte de la majorité de l'eau traduit leur rétraction, ce qui dans un cas pratique induit l'adhérence des moules et qui a été mis en évidence expérimentalement par les changements de fréquence et de dissipation

observés. Cette application montre le potentiel de la complémentarité des informations données par la mesure de fréquence et de dissipation puisque les expériences similaires effectuées par ellipsométrie et SPR (cf. figure 1.24b)) ne révèlent aucun changement lors de l'exposition de la couche au NaIO_4 .

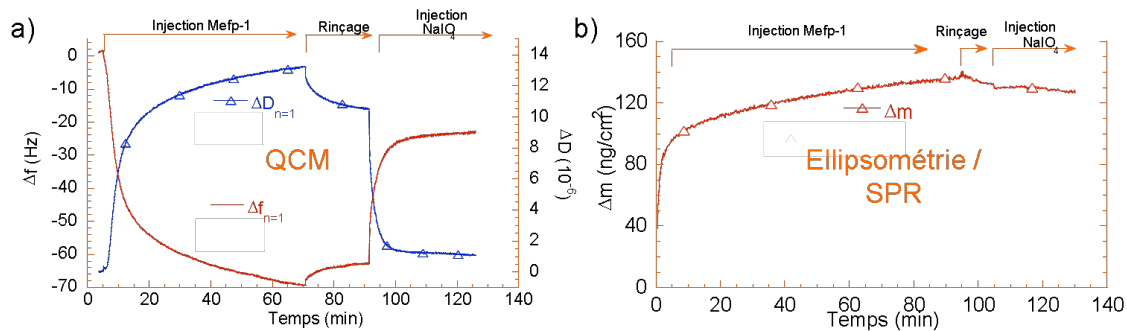


Figure 1.24 : adsorption de protéines Mefp-1 mesurée par QCM-D (cas a)), ellipsométrie et SPR (cas b)) et influence du NaIO_4 sur le comportement (adapté de [109]).

Les cas précédemment étudiés montrent la variété des champs d'application de la microbalance à quartz avec suivi de la dissipation et le potentiel de cette technique. Il est cependant important de noter que la QCM-D est une méthode de transduction de référence comme la résonance plasmonique de surface, mais ces deux techniques ne doivent pas être vues concurrentes mais plutôt complémentaires. Dans la littérature, les exemples d'études complémentaires prouvent le niveau approfondi des résultats obtenus dans la compréhension de phénomènes pour les biocapteurs. Cependant, même si la SPR offre une très haute sensibilité, le manque d'intégration de l'optique empêche la portabilité. Au contraire, même si l'intégration monocapteur de la QCM est meilleure, la sensibilité est faible pour la détection de faibles quantités de biomolécules. Aussi, la détection multiplexée n'a pu être achevée que par la mise en parallèle de plusieurs quartzs. La résolution des facteurs limitant peut venir de la miniaturisation et de l'intégration de structures sur une même puce pour la transduction mécanique sensible, parallèle et intégrée de reconnaissance biologique.

I.4 Les BioMEMS

I.4.1 Les bioMEMS : un problème de définition ?

Dérivés des techniques de la microélectronique pour leur fabrication, les microsystèmes électromécaniques (MEMS) combinent des capteurs, de la manipulation de données et des actionneurs dans une même structure. La qualité des réponses données par les MEMS en tant que transducteurs couplée aux spécifications imposées par les applications biologiques telles que le coût des molécules, le besoin de couches de contrôle de la spécificité, etc..., ont fait converger les MEMS vers les biocapteurs. Les structures résultantes, mieux connues sous le nom de BioMEMS, offrent des possibilités résolvant un ensemble de problèmes liés à la transduction d'une reconnaissance biologique, difficultés mises en avant dans les sections précédentes. Une définition exacte des BioMEMS est difficilement trouvable, mais un amalgame entre BioMEMS et Bio-microsystèmes est souvent répertorié dans la littérature, nécessitant un besoin de recentrer la classification des BioMEMS. Pour

cela, revenir à la définition des systèmes originels, les MEMS, faciliterait la compréhension des phénomènes physiques intervenant pour un BioMEMS. Plus qu'une définition, les MEMS sont vus comme composés d'éléments mécaniques et électriques dont la fabrication provient des techniques et matériaux de la microélectronique [110]. Les éléments mécaniques des MEMS, comme les transistors en microélectronique, ont des dimensions mesurées en microns et leur nombre se compte de quelques éléments à plusieurs centaines, par puce. Dans l'ensemble des définitions possibles, trois mot-clés reviennent systématiquement : éléments mécaniques et électriques, échelle micrométrique [111,112]. Les BioMEMS sont donc vus comme des transducteurs pour une reconnaissance biologique basés sur la combinaison d'éléments mécaniques et électriques pour la détection, aux dimensions micrométriques. Ils sont composés de parties mobiles permettant la détection de biomolécules, en plus de leurs fonctions électriques. C'est par rapport à cette définition, plus restrictive que celles parfois trouvées dans la littérature [113], mais déduite de la définition des MEMS, que des Bio-microsystèmes ne peuvent pas être vus comme des BioMEMS. C'est le cas des Bio-microsystèmes à transduction électrique ou électrochimique. Les phénomènes mis en jeu n'utilisent aucun élément mécanique, la transduction étant assurée uniquement par des phénomènes électriques. D'ailleurs, le premier microsystème considéré comme un MEMS est le « transistor à grille résonante » [114]. Comme le montre la figure 1.25, ce transistor est composé d'une grille dont la structure est un levier et dont les vibrations (générées électrostatiquement) changent la tension de grille. Ce système micrométrique montre que le transistor n'est pas considéré comme un MEMS puisqu'il n'utilise que des phénomènes électriques et qu'il a fallu attendre l'intégration d'un résonateur dans le transistor pour le considérer comme un MEMS. Une comparaison similaire peut être faite pour les BioMEMS et écarte les transducteurs électrochimiques de cette famille. Il en est de même pour la transduction optique qui, couplée aux MEMS, forme les MOEMS (microsystèmes électromécaniques optiques) et montre que les techniques communes de transduction optique (telles que la fluorescence ou la chemiluminescence) ne peuvent pas être considérées comme des MEMS, même si les échelles sont micrométriques.

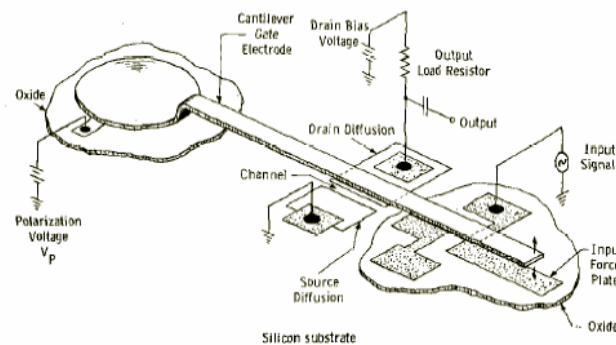


Figure 1.25 : Principe de fonctionnement du premier MEMS réalisé, le « transistor à grille résonante » [114].

Les champs d'application des BioMEMS dépendent de leur utilisation : soit les structures sont utilisées comme des capteurs, soit comme des actionneurs. L'utilisation comme actionneurs ouvre des possibilités dans des domaines tels que la délivrance de drogues. Les puces développées dans ce domaine se comportent comme des micro-réservoirs contenant une solution de drogues dont l'injection est contrôlée par l'ouverture de membranes agissant comme des valves [115]. La miniaturisation offre des capacités pour le développement de MEMS implantables, pour des utilisations in vivo, tant au niveau d'actionneurs que de capteurs. Des réflexions sur l'utilisation d'un capteur de pression basé

sur la déformation d'une membrane causant des changements de capacité entre deux électrodes ont montré le potentiel de ce type de capteur MEMS in vitro pour la mesure de la pression sanguine [116].

L'utilisation des BioMEMS en tant que biocapteurs permet la transduction hautement sensible, parallèle et sans marquage dans les domaines tels que l'analyse biomédicale, environnementale ou l'industrie alimentaire. Deux principes de fonctionnement sont envisagés : soit un fonctionnement statique, où la transduction de la reconnaissance biologique est révélée par une déformation mécanique due à une contrainte, soit un fonctionnement dynamique, comme la microbalance à quartz, où un ajout de masse dû à la biorecognition se traduit par un changement de la fréquence de résonance. Les deux comportements seront présentés dans les paragraphes suivants, des avantages et inconvénients caractérisant chacun de ces fonctionnements.

1.4.2 BioMEMS statiques

Le champ des BioMEMS en fonctionnement statique concerne essentiellement des microleviers. Ces leviers microfabriqués sont typiquement des barreaux de forme rectangulaire en silicium. Ces structures sont principalement utilisées comme des capteurs de force pour imager la topographie d'une surface par les techniques de microscopie à force atomique (AFM) [117]. Dans ces méthodes, un levier avec une pointe fine parcourt une surface conductrice ou non selon deux modes : soit la pointe est en contact direct avec la surface (mode contact), soit la pointe oscille pour interagir avec la surface sur une courte période pendant les cycles d'oscillation (mode dynamique, sans contact). Quelque soit le mode de fonctionnement, la déformation du levier est habituellement mesurée par une détection optique de la position d'un faisceau laser positionné au bout du levier. Dans le cas de BioMEMS à base de microleviers, la pointe et la surface ne sont pas nécessaires, comme dans le cas de l'AFM. En mode statique, une reconnaissance biologique sur une des deux faces du levier (typiquement, la face supérieure) se traduit par une réponse mécanique du levier. En effet, la contrainte de surface générée par la reconnaissance de l'analyte se traduit par une déformation statique du levier. Comme le montre la figure 1.26, la déformation d'un levier due à une contrainte en compression est régie par l'équation [118]:

$$\Delta z = 4 \left(\frac{l}{h} \right)^2 \frac{(1-\nu)}{E} (\Delta \sigma_1 - \Delta \sigma_2) \quad (1.4)$$

avec ν et E le coefficient de poisson et le module de Young du matériau, h l'épaisseur globale du levier, $\Delta \sigma_1$ la variation de contrainte sur la face supérieure du levier et $\Delta \sigma_2$ la variation de contrainte sur la face inférieure. Hormis l'influence d'une contrainte générée sur la déformation verticale du levier, cette équation met aussi en évidence le besoin de fonctionnaliser la face inférieure du levier afin d'éviter des adsorptions (spécifiques ou non) qui empêcheraient la déflexion du levier.

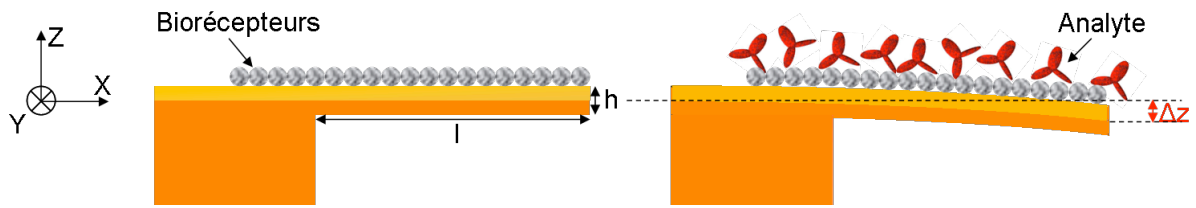


Figure 1.26 : Principe de la transduction mécanique pour un micro-levier lors d'une reconnaissance biologique.

Les méthodes de détection de la déformation du levier peuvent dériver directement de celles utilisées pour l'AFM. Comme il a été vu, l'utilisation d'un faisceau laser sur l'extrémité libre du levier permet la mesure de sa déflexion avec une grande précision (cf figure 1.27a)). Les déviations du rayon optique sont recueillies dans un photodétecteur par mesure du photocourant (cette technique est connue sous le nom d'Optical Beam Deflection (OBD)). C'est d'ailleurs principalement cette méthode qui est utilisée dans les BioMEMS statiques. De nombreuses applications, et pionnières dans le domaine, ont utilisé des réseaux de microleviers avec détection par OBD pour la détection de l'hybridation d'ADN [119].

Plus récemment, cette même technique a montré un fort potentiel pour la reconnaissance sans marquage d'analyte selon un modèle antigène-anticorps. L'analyte concerné est la Prostate Serum Albumin (PSA), marqueur sérique du cancer de la prostate. Le système utilisé, décrit sur la figure 1.27a), utilise des microleviers triangulaires en nitrure de silicium (avec une couche d'or sur la face supérieure) de 200 μm de long pour une épaisseur de 0.5 μm , immergés dans un système fluidique régulé en température et intégrant la détection optique [120]. Ainsi, la déformation du levier est mesurée en temps-réel. Après la fonctionnalisation des leviers avec des anticorps anti-PSA, une saturation du levier par la BSA est faite pour éviter les adsorptions non-spécifiques. Afin de se rapprocher d'un cas clinique, lors de l'injection de PSA, la solution comprend également des protéines du sérum telles que la HSA et la plasminogène humaine (HP) à une concentration de 1 mg/ml. Une concentration en PSA de 0.2 ng/ml a pu être détectée spécifiquement, ce qui montre la haute sensibilité de ce système et la gamme dynamique de concentration a atteint 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (figure 1.27b)). Néanmoins, la méthode de détection externe nécessite l'utilisation d'un ou plusieurs éléments physiques extérieurs au capteur, ce qui est en désaccord avec la miniaturisation et le niveau d'intégration qui va avec. Aussi, un autre inconvénient provient de la focalisation laborieuse du faisceau en milieu liquide due au phénomène de diffraction. C'est pourquoi les méthodes de détection intégrées ont connu un essor important pour la mesure de la déformation des microleviers.

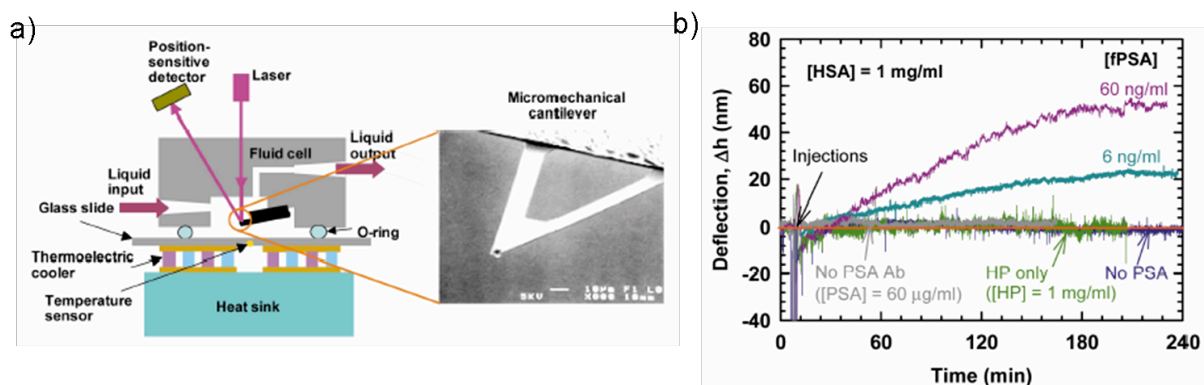


Figure 1.27 : a) Principe de la détection du mouvement de micro-leviers par Optical Beam Deflection (OBD). b) Mesure temps-réel de la déflexion d'un micro-levier lors de l'interaction anticorps anti-PSA / PSA (courtoisie de A. Majumdar) [120].

De part leur simplicité de fabrication et leur efficacité, les jauges piézorésistives ont montré des capacités intéressantes. La déformation de la microstructure engendre une contrainte (c'est à l'encastrement du levier que la contrainte est la plus forte) qui se traduit par une variation de la résistance. Souvent montées en pont de Wheatstone, deux piézorésistances dans le substrat servent de référence et deux autres sont sur des leviers permettant à l'ensemble du montage une mesure différentielle (cf. figure 1.28) [121].

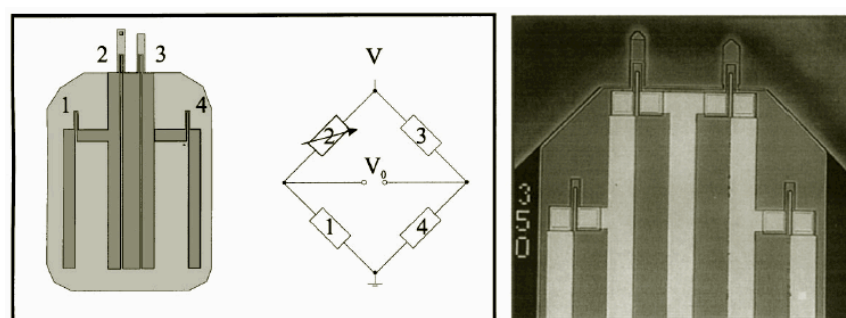


Figure 1.28 : Micro-leviers piézorésistifs montés en pont de Wheatstone (courtoisie de A. Boisen) [121].

Les changements au niveau des piézorésistances sont détectés ($\Delta R/R$) par une tension de sortie V_0 par le pont de Wheatstone soumis à une tension V . La tension de sortie est donnée par :

$$V_0 = \frac{1}{4} V \cdot \frac{\Delta R}{R} \quad (1.5)$$

C'est ainsi que des leviers intégrant une piézorésistance ont pu être utilisés en phase vapeur [122] ou liquide pour la détection de molécules [121]. Une autre approche pour la détection de la déformation de microleviers concerne l'intégration d'un transistor MOSFET à l'encastrement du levier [123]. Dans ce cas, le changement de contrainte dû à la déflexion du levier change les propriétés de la grille du transistor (cf. figure 1.29a)), se traduisant par une variation du courant de drain pour une tension de drain imposée, par rapport à un levier de référence. Ainsi, ce type de microlevier, comprenant une couche d'or supérieure, a permis la détection de biotine par la streptavidine immobilisée à une concentration minimale de 100 fg/ml (0.4 pM). Ce système, très sensible, a aussi permis la détection en temps-réel

d'immunoglobuline G de lapin par des anticorps anti-lapin à une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ (0.6 μM) (cf. figure 1.29b)). Non seulement cette application montre la corrélation étroite entre les BioMEMS et la microélectronique, mais aussi indique la variété des possibilités pour la détection sensible, sans marquage, intégrée et temps-réel d'une reconnaissance biologique.

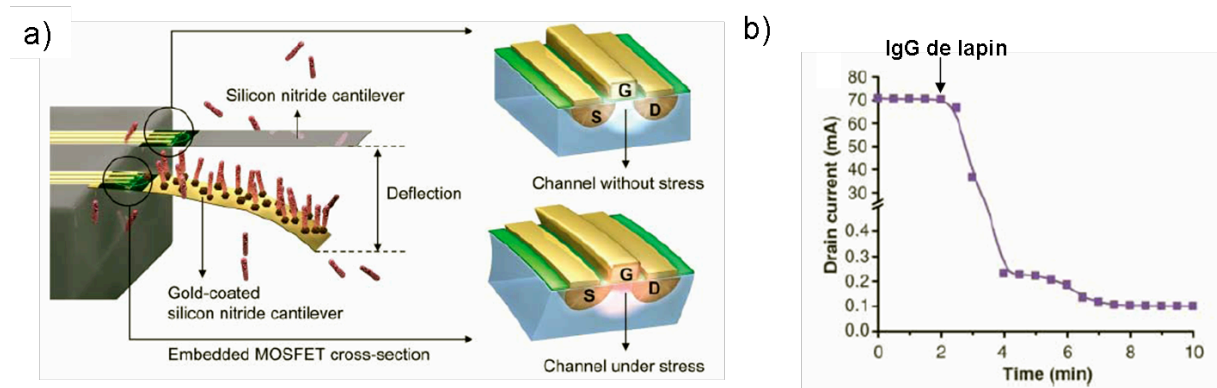


Figure 1.29 : a) Principe de fonctionnement du transistor MOSFET intégré à l'encastrement d'un micro-levier. b) Variation du courant de drain du transistor MOSFET lors de la reconnaissance par des anticorps anti-lapin d'immunoglobulines de lapin (courtoisie de V. Dravid) [123].

Malgré les avantages (notamment la sensibilité) de BioMEMS statiques, ces structures souffrent de la difficulté d'obtenir des données quantitatives sur la reconnaissance d'analyte. En effet, la déformation de microleviers étant due à des changements de contrainte, leur calibration pour obtenir des données sur la densité de greffage, par exemple, est difficile. Aussi, même si cette idée est implicite, il est clair que le changement de contrainte dû à l'interaction biologique part du principe que la couche formée est répartie de façon homogène sur la surface et que les biorécepteurs doivent être immobilisés de manière uniforme. Cette condition n'est pas remplie dans le cas d'analytes de grande taille tels que des cellules, lors de l'interaction sur des anticorps immobilisés ou dans le cas de la détection de très faibles quantités d'analyte, avec un objectif de la molécule unique. C'est pourquoi, l'utilisation de BioMEMS fonctionnant en mode dynamique a trouvé des intérêts puisque ce sont des capteurs de masse et comme il a été vu pour la microbalance à quartz, ce principe de détection reste universel.

1.4.3 Les BioMEMS résonants

De manière générale, le signal de sortie de BioMEMS résonants est la fréquence de résonance des structures. Un des avantages de ce fonctionnement provient du fait que la conversion de la résonance mécanique de la structure en un signal électrique n'altère pas la résolution. Le fonctionnement dynamique nécessite cependant une force active d'actionnement et un principe de détection pour la mesure des fréquences. Comme il a été vu, la réversibilité de l'effet piézoélectrique favorise l'utilisation de matériaux présentant cette propriété dans les BioMEMS [124]. Les matériaux piézoélectriques les plus communs sont le PZT et le ZnO. D'autres possibilités existent, telles que les effets magnétiques [125], thermiques [126] ou électrostatiques [127]. Néanmoins, notamment pour les effets électrostatiques, l'utilisation d'un espace entre la structure et l'électrode d'actionnement et/ou détection empêche le fonctionnement en milieu liquide.

Au-delà de la fréquence de résonance (f_n), qui est déterminante dans la sensibilité (S_n) de la transduction, un autre paramètre capital pour la viabilité d'un BioMEMS résonant est le facteur de qualité Q . Inverse de la dissipation présentée pour la microbalance à quartz, le facteur de qualité permet la détermination de la masse minimum détectable. En effet, la masse minimum détectable est décrite par l'équation :

$$\delta M_{\min} \propto \left| S_n^{-1} \right| \frac{f_n}{2Q} \quad (1.6)$$

Comme le montre l'équation (1.6), plus le facteur de qualité sera élevé, plus la masse minimum détectable sera faible. De manière plus représentative, la figure 1.30 montre le cas de figure d'un facteur de qualité élevé et faible. S'il est faible, même si la sensibilité du transducteur est élevée, une légère variation de la fréquence de résonance ne pourra être mesurée. De nombreuses études sont ainsi menées dans l'augmentation du facteur de qualité pour une utilisation optimale de BioMEMS résonants en milieu liquide.

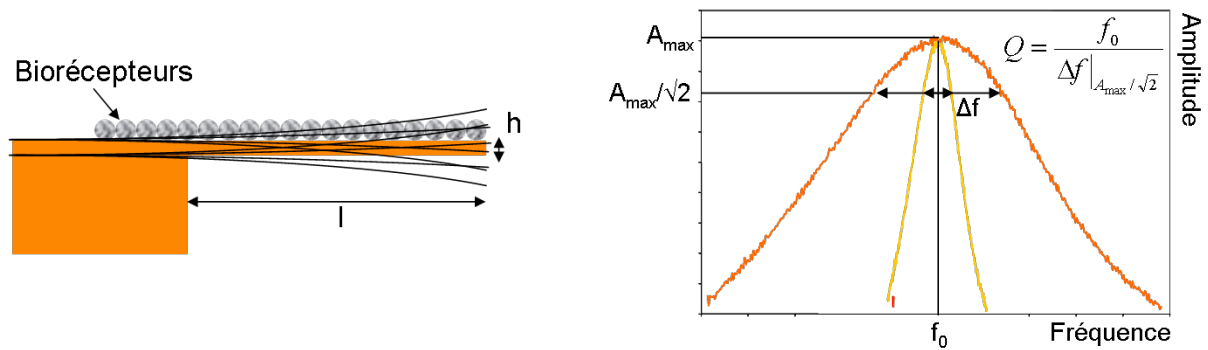


Figure 1.30 : Principe de fonctionnement dynamique d'un micro-levier. Le graphe montre la différence entre un facteur de qualité élevé (courbe jaune) et un facteur de qualité faible (courbe orange)

Comme pour les BioMEMS statiques, de nombreuses applications en mode dynamique concernent les microleviers. Malgré leur sensibilité massique élevée, la vibration hors plan est nettement amortie en milieu liquide et se traduit par un faible facteur de qualité. L'amortissement est en effet amplifié par l'immersion complète du levier, à cause du cisaillement du fluide engendré par l'oscillation des structures. C'est pour ces raisons que l'ensemble des applications de BioMEMS résonants à base de microleviers s'appuie sur des mesures dans l'air avant et après la reconnaissance biologique. Dans ce cas, la sensibilité massique élevée des microleviers a permis la détection d'espèces dans des gammes de masse allant de la dizaine de femto grammes pour la détection de virus unique [128] à quelques pico grammes pour la détection de bactéries [129]. Récemment, l'utilisation de leviers piézoélectriques pour la détection de bacilles a été démontrée en milieu liquide et en temps réel, par utilisation de modes plus élevés que le mode de résonance fondamental, augmentant aussi le facteur de qualité [130].

Une des manières les plus élégantes de profiter de la sensibilité de microleviers et contourner les faibles facteurs de qualité en milieu liquide a été proposée par l'équipe de S. Manalis au MIT en intégrant un canal microfluidique dans le levier [131]. Ainsi, la vibration des structures est suivie dans le vide mais la reconnaissance biologique a lieu en milieu liquide, en temps réel. Les structures, présentées sur la figure 1.31a), sont actionnées

électrostatiquement et la détection se fait par OBD et grâce à l'individualisation des canaux dans chaque levier, l'adressage pour l'immobilisation des biorécepteurs est intégré. Les microleviers ainsi fonctionnalisés par un empilement de PLL-g-PEG-biotin, neutravidine et anticorps anti-mouton biotinylés ont permis la reconnaissance spécifique d'anticorps de mouton en temps-réel avec une limite de détection de 0.7 nM et des gammes cinétiques jusqu'à une concentration de 0.7 μ M (cf. figure 1.31b)).

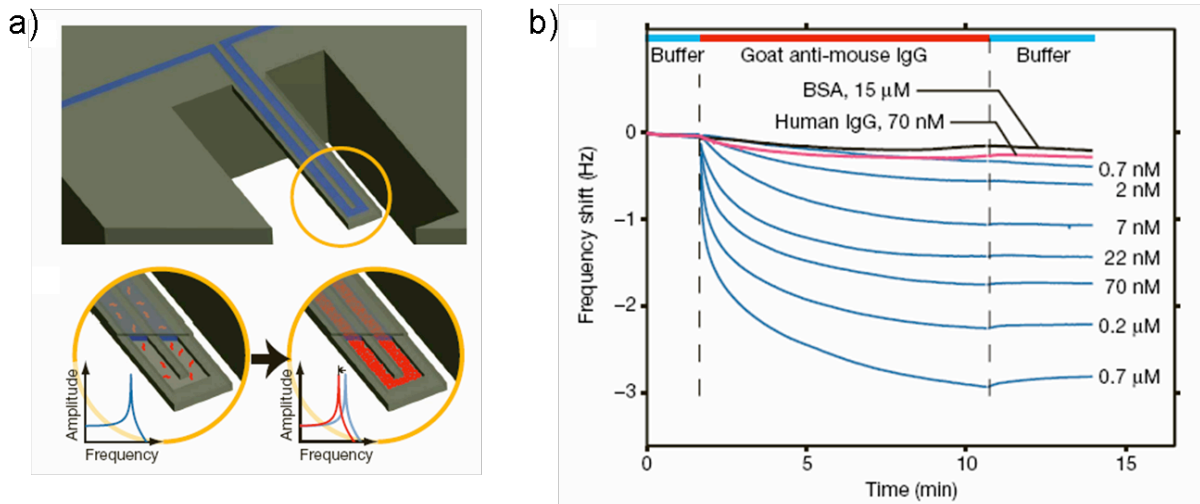


Figure 1.31 : a) Principe d'un micro-levier intégrant un canal microfluidique. Gamme cinétique lors de la détection d'anticorps par un micro-levier intégrant un canal microfluidique (courtoisie de S. Manalis) [131].

Une autre approche pour obtenir un facteur de qualité important dans un liquide est de s'affranchir de la vibration hors-plan. Pour cela, partant de l'efficacité de la microbalance à quartz, des matrices de résonateurs en quartz ont pu être fabriquées (cf. figure 1.32a)) [132]. La vibration des structures par TSM permet un mouvement plan des résonateurs et la miniaturisation permet l'intégration de plusieurs résonateurs sur la même puce. Malgré la réduction de taille, l'augmentation de fréquence de résonance, par rapport à la QCM, n'a pas amélioré la sensibilité des transducteurs. Le potentiel de ces structures n'a pour le moment pu être montré que pour leur utilisation en tant que capteurs chimiques et pas en tant que biocapteurs. Une autre alternative possible est celle développée par O. Brand à Georgia Tech sur l'utilisation de résonateurs sous forme de disque (cf. figure 1.32b)) [133]. Dans ce cas, la rotation des demi-disques (servant de masses sismiques) induit une torsion du bras central et offre un mode de vibration plan. Les structures fabriquées permettent d'atteindre un facteur de qualité de l'ordre de 100 dans un fluide, ce qui est deux décades supérieures, comparé aux microleviers classiques. C'est ainsi que ces structures ont récemment été utilisées pour la détection d'anticorps anti- β -galactosidase par l'enzyme β -galactosidase immobilisée au niveau des demi-disques. Les travaux préliminaires sur l'utilisation en tant que biocapteur ont permis la détection en temps-réel des anticorps à une concentration de 0.73 μ g/ml.

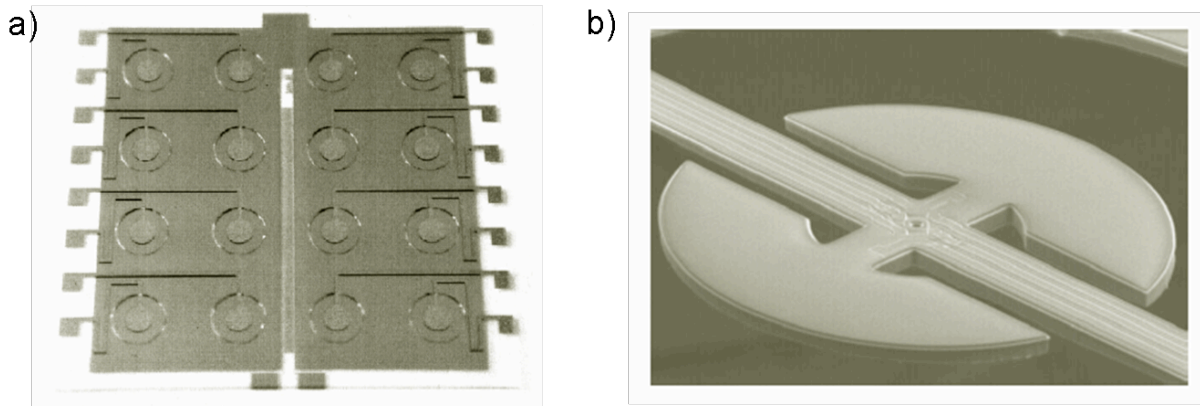


Figure 1.32 : BioMEMS résonants en mouvement plan. a) Matrices de micro-résonateurs à quartz. (Courtoisie de R. Lucklum) [132] b) Résonateurs plan sous forme de deux demi-disques en rotation. (Courtoisie de O. Brand [133])

Enfin, une dernière alternative concerne l'utilisation de diaphragmes. Ces structures, bien qu'ayant une vibration hors-plan, présentent l'avantage de n'être en contact avec le liquide que par une seule face. Il a été démontré que des membranes circulaires intégrant un matériau piézoélectrique ne connaissent qu'un faible amortissement lors du passage de l'air à l'eau [134]. Les travaux initiés par Christian Bergaud au LAAS-CNRS ont montré le potentiel de micromembranes en silicium intégrant une couche piézoélectrique pour la reconnaissance de biomolécules. La détection de l'hybridation d'ADN par l'utilisation de colloïdes d'or a pu être achevée [135]. Les matrices de micromembranes, de 150 μm de rayon, intègrent une couche piézoélectrique de forme annulaire (cf. figure 1.33a)) servant à l'actionnement des structures alors que la détection des fréquences de résonance est faite par ODB. Une sensibilité élevée, de l'ordre de $-3.9 \text{ pg}/(\text{mm}^2.\text{Hz})$ a été démontrée sur le deuxième mode de vibration, permettant la détection spécifique de l'hybridation d'ADN avant et après l'incubation avec les colloïdes d'or (cf. figure 1.33b)).

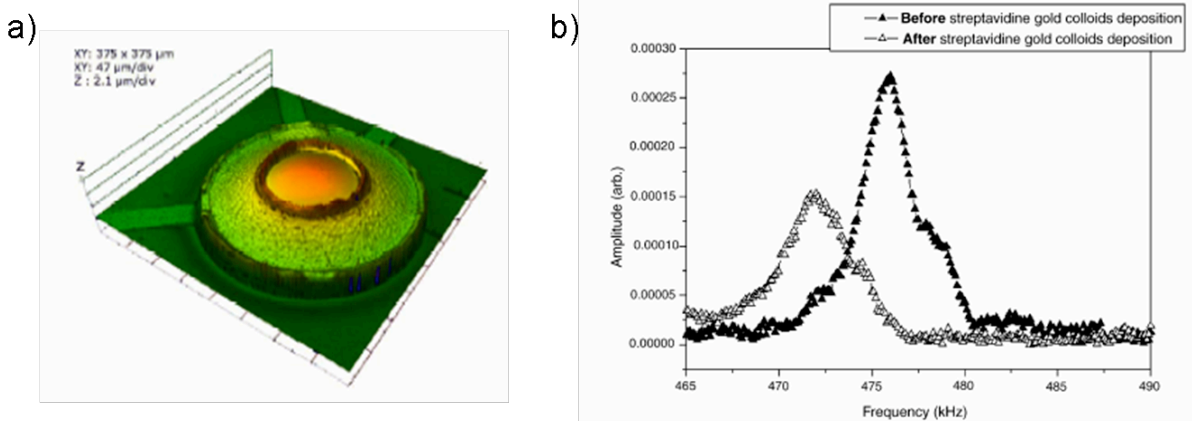


Figure 1.33 : a) Micromembranes circulaires intégrant une couche piézoélectrique annulaire. b) Influence de la reconnaissance de colloïdes d'or streptavidine par la biotine sur la fréquence de résonance de micromembranes circulaires [135].

Comme il a été vu, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de biocapteur présentant l'ensemble des performances requises. Un article publié dans Nature fait état des conditions requises pour l'utilisation de biocapteurs dans les pays en voie de développement [137]. Ainsi, pour un « test diagnostic idéal », sont requis la sensibilité, la spécificité, la rapidité, la portabilité, l'autonomie, la conservation, le coût. C'est dans un esprit similaire (l'article a été publié après que nos objectifs ne soient définis) que nous avons approfondi les recherches

initiées par les travaux prometteurs de Mathieu Guirardel [136] sur le développement de BioMEMS à actionnement et détection intégrées pour la reconnaissance d'espèces biologiques. En effet, avec le potentiel de structures de type membranes, l'intégration d'une couche piézoélectrique n'avait, jusqu'à présent, été utilisée que pour l'actionnement. Afin d'être en accord avec la miniaturisation, l'actionnement et la détection intégrées étaient nécessaires afin de répondre aux critères de portabilité et d'autonomie. De plus, la détection intégrée de fréquences de résonance en milieu liquide n'avait pas été démontrée. Ces étapes sont indispensables pour élaborer un biocapteur temps-réel, sans marquage (participant aux critères de rapidité) à détection parallèle de la reconnaissance biologique. Nous avons choisi de focaliser notre attention sur deux types d'application biocapteur :

- une première application vise à démontrer la capacité des micromembranes pour la détection d'anticorps par des antigènes immobilisés et d'évaluer les performances de la réponse obtenue, par comparaison aux techniques de référence.
- Une seconde application vise à combiner les polymères à empreinte moléculaire avec des BioMEMS. Les structures de type membranes sont là-aussi des candidats intéressants. L'objectif de cette combinaison est de répondre aux paramètres critiques des biocapteurs que sont la conservation et la stabilité, couplés à la sensibilité, la portabilité et la rapidité.

Au travers de caractérisations et optimisations physiques des structures de type micromembranes, nous avons pour objectif de montrer un degré d'aboutissement d'un BioMEMS résonant capable d'être comparé aux techniques de référence telles que la SPR et la QCM tout en profitant des avantages offerts par la miniaturisation. Les champs d'application abordés illustreront le caractère générique de la transduction. Nous tenterons de prouver que des structures de type micromembranes à actionnement et détection intégrés représentent une méthode de transduction multicapteur universelle.

I.5 Conclusion

Les avancées technologiques dérivées des techniques de la microélectronique profitent aux biocapteurs, tant au niveau de l'intégration qu'au niveau des performances. Les apports ne sont tout de même pas encore suffisamment représentés au niveau industriel, malgré le potentiel du marché. Cela provient peut-être de la focalisation sur certaines applications. Les exemples de la littérature, le plus souvent dédiés à une application, oublient l'aspect générique offert par certains biocapteurs, surtout ceux de masse. Un autre élément peut venir de l'interface entre les transducteurs et la couche biologique sensible. L'immobilisation de biorécepteurs à la surface du transducteur nécessite dans de nombreux cas, l'utilisation d'outils extérieurs (une revue des techniques de dépôts localisés a été faite dans le cadre de la thèse de Thierry Leïchlé [138]). La compatibilité de ces outils n'est pas toujours en adéquation avec le type de structures utilisées pour la transduction. Par exemple, le dépôt localisé de biorécepteurs peut être fait par contact entre la surface à fonctionnaliser et l'outil de dépôt. Or ce type d'outil ne peut convenir pour une immobilisation sur des microleviers, leur rigidité étant trop faible. C'est donc au-delà de performances remarquables qu'un biocapteur doit être vu. Les applications sont maintenant assez nombreuses pour réfléchir à la viabilité de BioMEMS par rapport à une réalité de marché.

C'est pourquoi nous proposons la mise en œuvre d'un biocapteur robuste basé sur un BioMEMS résonant. Les travaux concernent la fabrication parallèle de micromembranes et l'optimisation de la fabrication. Ce n'est qu'après une étude approfondie des comportements statiques et dynamiques des structures fabriquées, que peuvent aboutir des optimisations du comportement des puces et de leur environnement, pour leur utilisation en tant que biocapteur intégré. Cela a permis d'envisager des expériences de reconnaissance biologique variées, allant des biorécepteurs d'affinité aux polymères à empreinte moléculaire, sur diverses surfaces, soulignant ainsi le caractère générique de ce système.

Références

- [1] A.F Collings, F. Caruso, *Rep. Prog. Phys.*, 60 (1997), 1397.
- [2] S. J. Updike, G. P. Hicks, *Nature*, 214 (1967), 986.
- [3] D. Ross, L. Heinemann, E. A. Chantelau, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 10 (1990), 281.
- [4] Fuji-Keizai USA, Inc., *U.S. & Worldwide : Biosensors market, R&D, applications and commercial implication* (2004), New-York, USA.
- [5] J. E. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (1995), USA
- [6] M. A Cooper, *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003), 834.
- [7] R. S. Spivey, G. Davies, D. R. Matthews, *Practical Diabetes International*, 5(5) (2005), 204.
- [8] Y. Nomura, G. J. Chee, I. Karube, *Field Anal. Chem. Technol.*, 2 (1998), 333.
- [9] I. Karube, Y. Nomura, *J. Mol. Catal.*, 10 (2000), 177.
- [10] L. D. Mello, L. T. Kubota, *Food Chem*, 77 (2002), 237.
- [11] L. C. Clark Jr, C. Lyons, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 102 (1962), 29.
- [12] K. Camman, U. Lemke, A. Rohen, J. Sander, H. Wilken, B. Winter, *Angew. Chem. Int. Engl.*, 30 (1991), 516.
- [13] M. Madou, M. Tierney, *Appl. Biochem. Biotech.*, 41 (1993), 109.
- [14] S. L. R. Barker, R. Kopelman, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, *Anal. Chem.* 70 (1998), 971
- [15] K. R. Rogers, M. Mascini, *Field. Anal. Chem. Technol.*, 2 (1998), 317.
- [16] I. E. Tothill, *Comp. Elec. Agr.*, 30 (2001), 205.
- [17] K. James, T. Bell, *J. Immuno. Methods*, 1-2 (1987), 5.
- [18] G. A. Campbell, R. Mutharasan, *Anal. Chem.*, 79 (2007), 2762.
- [19] C. Campagnolo, K. J. Meyers, T. Ryan, R. C. Atkinson, Y-T. Chen, M. J. Scanlan, G. Ritter, L. J. Old, C. A Batt, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 61 (2004), 283.
- [20] T-Z. Wu, C-C. Su, L-K. Chen, H-H. Yang, D-F Tai, K-C Peng, *Biosens. Bioelectron.*, 5 (2005), 689.
- [21] C. Ayela, F. Roquet, L. Valera, C. Granier, L. Nicu, M. Pugnère, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007), 3113.
- [22] B. S. Parekh, C-H Pau, M. S. Kennedy, T. L. Dobbs, J. S. McDougal, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17 (2001), 137.
- [23] G. A. Ganziani, S. Klakamp, D. G. Myszk, *anal. Biochem.*, 325 (2004), 301.
- [24] D. Kriz, K. Mosbach, *Anal. Chim. Acta*, 300 (1995), 71.
- [25] F. Vandevelde, T. Leichle, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, K. Haupt, *Langmuir*, 23 (2007), 6490.
- [26] K. Haupt, K. Noworyta, W. Kutner, *Anal. Commun.*, 36 (1999), 391.
- [27] I. Surugiu, J. Svitel, L. Ye, K. Haupt, B. Danielsson, *Anal. Chem.*, 73 (2001), 4388.
- [28] H. Shi, W-B. Tsai, M. D. Garrison, S. Ferrari, B. D. Ratner, *Nature*, 398 (1999), 593.
- [29] L. M. Kindschy, E. C. Alocilja, *Transactions of the ASAE*, 47 (2004), 1375.
- [30] A. L. Hillberg, K. R. Brain, C. J. Allender, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57 (2005), 1875.
- [31] K. Catt, G. W. Tregear, H. G. Burger, G. Skermer, *Clin. Chim. Acta*, 27 (1970), 267.
- [32] F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, *J. Colloid Interface Sci.*, 178 (1996), 104.
- [33] J. E. Zull, J. Reed-Mundell, Y. W. Lee, D. Vezenov, N. P. Ziats, J. M. Anderson, C. N. Sukenik, *J. Ind. Microbiol.*, 13 (1994), 137.
- [34] A. Sadana, *Chem. Rev.*, 92 (1992), 1799.
- [35] D. S. Tawfik, B. S. Green, R. Chap, M. Sela, Z. Eshhar, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90 (1993), 373.
- [36] F. Höök, J. Vörös, M. Rodahl, R. Kurrat, P. Böni, J. J. Ramsden, M. Textor, N. D. Spencer, P. Tengvall, J. Gold, B. Kasemo, *Colloids and Surfaces B*, 24 (2002), 155.

- [37] J. H. Peterman, P. J. Tarcha, J. E. Butler, *J. immunol. Methods*, 111 (1988), 27.
- [38] G. J. Leggett, C. J. Roberts, P. M. Williams, M. C. Davies, D. E. Jackson, S. J. B. Tendler, *Langmuir*, 9 (1993), 2356.
- [39] J. Wang, L. M. Frostman, M. D. Ward, *J. Phys. Chem.*, 96 (1992), 5224.
- [40] R. Karlsson, *J. Mol. Recognit.*, 17 (2004), 151.
- [41] A. Walcarius, *Electroanalysis*, 10(18) (1998), 1217.
- [42] T. Wink, S. J. Van Zuilen, A. Bult, W. P. Van Bennekom, *Analyst*, 122 (1997), 43R.
- [43] M. M. Biener, J. Biener, C. M. Friend, *Langmuir*, 21 (2005), 1668.
- [44] Y-T. Kim, R. L. McCarley, A.J. Bard, *Langmuir*, 9 (1993), 1941.
- [45] L. Bertilsson, B. Liedberg, *Langmuir*, 9 (1993), 141.
- [46] V. V. Silin, H. Weetall, D. J. Vanderah, *J. Colloid Interface Sci.*, 185(1) (1997), 94.
- [47] C. Ayela, mémoire de stage Diplôme d'études approfondies Conception de Circuits microélectroniques et microsystèmes, Centre de Pharmacologie et Biotechnologie pour la Santé, Montpellier (2004).
- [48] J. Benesch, S. Svedhem, S. C. T. Svensson, R. Valiokas, B. Liedberg, P. Tengvall, *J. Biomaterials Science*, 12(6) (2001), 1568.
- [49] K. Bierbaum, M. Kinzler, C. Wöll, M. Grunze, G. Hähner, S. Heid, F. Effenberger, *Langmuir*, 11 (1995), 512.
- [50] C. R. Kessel, S. Granick, *Langmuir*, 7 (1991), 532.
- [51] T. J. Horr, P. S. Arora, *Colloids surf. A*, 162 (1999), 203.
- [52] S. Onclin, B. Jan Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44(39) (2005), 6282.
- [53] M. J. Stevens, *Langmuir*, 15 (1999), 2773.
- [54] Z-H Wang, G. Jin, *J. Immuno. Methods*, 285(2) (2004), 237.
- [55] M. T. Neves-Petersen, T. Snabe, S. Klitgaard, M. Duroux, S. B. Petersen, *Protein Science*, 15 (2006), 343.
- [56] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.*, 15(9-10) (2000), 473.
- [57] B. Johnsson, S. Löfas, G. Lindquist, A. Edström, R-M. Müller Hillgren, A. Hansson, *J. Molecular Recognition*, 8(1-2) (1994), 125.
- [58] D. G. Myszka, *Anal. Biochem.*, 329 (2004), 316.
- [59] B. G. M. Jongerius-Gortemaker, R. L. J. Goverde, F. Van Knapen, A. A. Bergwerff, *J. Immuno. Methods*, 266 (2002), 33.
- [60] H. Hermel, R. Miller, *Colloid & Polymer Science*, 273(4) (1995), 387.
- [61] L. Scopsi, B. L. Wang, L. I. Larsson, *J. Histochem. Cytochem.*, 34(11) (1986), 1469.
- [62] N-P. Huang, R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D. L. Elbert, J. A. Hubbell, N. D. Spencer, *Langmuir*, 17(2) (2001), 489.
- [63] C. S. Tang, M. Dusseiller, S. Makohliso, M. Heuschkel, S. Sharma, B. Keller, J. Vörös, *Anal. Chem.*, 78 (2006), 711.
- [64] G. L. G. Goring, J. D. Brennan, *J. Mater. Chem.*, 12 (2002), 3400.
- [65] J. Li, T. Peng, Y. Peng, *Electroanalysis*, 15(12) (2003), 1031.
- [66] J. Livage, T. Coradin, C. Roux, *J. Phys. : Condens. Matter*, 13 (2001), R673.
- [67] B. C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink, *Anal. Chem.*, 66 (1994), 1120A.
- [68] K. B. Blodgett, I. Langmuir, *Phys. Rev.*, 51 (1937), 964.
- [69] I. V. Turko, I. S. Yurkevich, V. L. Chashchin, *Thin Solid Films*, 210/211 (1992), 710.
- [70] Y. M. Bae, B-K. Oh, W. Lee, W. H. Lee, J-W. Choi, *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2005), 103.
- [71] I. Vikholm, W. M. Albers, *Langmuir*, 14(14) (1998), 3865.
- [72] K. Haupt, K. Mosbach, *Chem. Rev.*, 100 (2000), 2495.
- [73] S. Weiss, *Science*, 283 (1999), 1676.
- [74] D. W. Lubbers, N. Optiz, *Zeitschrift Für Naturforschung*, 30 (1975), 532.

- [75] C. Striebel, A. Brecht, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.*, 9 (1994), 139.
- [76] M. J. Swann, L. L. Peel, S. Carrington, N. Freeman, *Anal. Biochem.*, 329 (2004), 190.
- [77] C. Nylander, B. Liedberg, *Sensors and Actuators*, 3 (1982), 79-88.
- [78] E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch.*, 23A (1968), 2135-2136.
- [79] A. Otto, *Z. Physik*, 216 (1968), 398-410.
- [80] U. Jönsson, L. Fägerstam, B. Ivarsson, R. Karisson, K. Lundh, S. Löfas, B. Persson, H. Roos, I. Rönnerberg, S. Sjölander, E. Stenberg, R. Stahlberg, C. Urbaniczky, H. Östlin M. Malmqvist *BioTechniques*, 11 (1991), 620-626.
- [81] G. C. Bokken, R. J. Corbee, F. Van Knapen, A. A. Bergwerff, *FEMS Microbiol. Lett.*, 222(1) (2003), 75.
- [82] J. Carnahan, P. Wang, R. Kendall, C. Chen, S. Hu, T. Boone, T. Juan, J. Talvenheimo, S. Montestruque, J. Sun, G. Elliott, J. Thomas, J. Ferbas, B. Kern, R. Briddell, J. P. Leonard, A. Cesano, *Clin. Cancer Res.*, 9(10) (2003), 3982S.
- [83] F. Lopez, C. Pichereaux, O. Burlet-Schiltz, L. Pradayrol, B. Montsarrat, J. P. Esteve, *Proteomics*, 3(4) (2003), 402.
- [84] R. L. Thurmond, S. A. Wadsworth, P. H. Schafer, R. A. Zivin, J. J. Siekierka, *Eur. J. Biochem.*, 268(22) (2001), 5747.
- [85] M. Wadwha, C. Bierd, P. Dilger, R. Gaines-Das, R. Thorpe, *J. Immunol. Meth.*, 278 (1-2) (2003), 1-17.
- [86] R. L. Rich, D. G. Myszkka, *J. Mol. Recognit.*, 19 (2006), 478.
- [87] R. Karlsson, *J. Mol. Recognit.*, 17 (2004), 151.
- [88] S. Poyard, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, S. Cosnier, P. Labbe, *Anal. Chim. Acta*, 364 (1998), 165.
- [89] S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guissepi-Elie, *Biosens. Bioelectron.*, 17(1-2) (2002), 53.
- [90] S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guissepi-Elie, *Biosens. Bioelectron.*, 17 (11-12) (2002), 973.
- [91] W. K. Wrad, L. B. Jansen, E. Anderson, G. Reach, J-C. Klein, G. S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002), 181.
- [92] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, C. M. Lieber, *Science*, 293 (2001), 1289.
- [93] F. Patolsky, G. Zheng, O. Hayden, M. Lakadamyali, X. Zhuang, C. M. Lieber, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 101(39) (2004), 14017.
- [94] R. J. Cheng, H. C. Choi, S. Bangsarruntip, E. Yenilmez, X. W. Tang, Q. Wang, Y. L. Chang, H. J. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004), 1563.
- [95] C. Chouteau, S. Dzyadevych, J-M. Chovelon, C. Durrieu, *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2004), 1089.
- [96] X. Wang, S. V. Dzyadevych, J-M. Chovelon, N. J. Renault, L. Chen, S. Xia, J. Zhao, *Electrochem. Comm.*, 8 (2006), 201.
- [97] S. Kröger, A. P. F. Turner, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Chem.*, 71 (1999), 3698.
- [98] T. A. Sergeyeva, S. A. Piletsky, A. A. Brovko, E. A. Slinchenko, L. M. Sergeeva, T. L. Panasyuk, A. V. El'skaya, *Analyst*, 124 (1999), 331.
- [99] W. G. Cady, *Piezoelectricity. An introduction to the theory and applications of electromechanical phenomena in crystals* (1964), Dover, New York.
- [100] D. Morgan, *Surface-Wave Devices for Signal Processing* (1991), Elsevier, Amsterdam.
- [101] D. D. Stubbs, S-H. Lee, W. D. Hunt, *IEEE Sensors Journal*, 2(4) (2002), 294.
- [102] E. Gizeli, M. Liley, C. Lowe, H. Vogel, *Anal. Chem.*, 69 (1997), 4808.
- [103] G. Kovacs, M. Vellekoop, *Appl. Phys. Lett.*, 61(6) (1992), 639.
- [104] G. Sauerbrey, *Z. Physik*, 155 (1959), 206.
- [105] A. Ruocco, M. P. Donzello, F. Evangelista, G. Stefani, *Phys. Rv. B*, 67 (2003), 155408.
- [106] M. V. Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, B. Kasemo, *Phys. Scripta*, 59 (1999), 391.
- [107] F. Höök, M. Rodahl, B. Kasemo, P. Brzezinski, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 95 (1998), 12271.

- [108] F. Höök, M. Rodahl, P. Brzezinski, B. Kasemo, *Langmuir*, 14(4) (1998), 729.
- [109] F. Höök, B. Kasemo, T. Nylander, C. Fant, K. Sott, H. Elwing, *Anal. Chem.*, 73(24) (2001), 5796.
- [110] K. J. Gabriel, *Proceedings of IEEE International Test Conference* (1998), 432.
- [111] J. W. Gardner, O. O. Awadelkarim, *Microsensors, MEMS and Smart devices* (2001), Wiley.
- [112] G. Rinaldi, M. Packirisamy, I. G. Stiharu, *Proceedings of SPIE*, 5455 (2004), 66.
- [113] R. Bashir, *Adv. Drug. Del. Rev.*, 56(11) (2004), 1565.
- [114] H. C. Nathanson, W. E. Newell, R. A. Wickstrom, J. Ransford Davis Jr, *IEEE Trans. Elec. Dev.*, 14(3) (1967), 117.
- [115] J. T. Santini Jr, A. C. Richards, R. A. Scheidt, M. J. Cima, R. Langer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39 (2000), 2396.
- [116] B. Ziaie, K. Najafi, *Biomed. Microdev.*, 3 (2001), 285.
- [117] G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber, *Phys. Rev. Lett.*, 56(9) (1986), 933.
- [118] G. G. Stoney, *Proc. R. Soc. London. Ser. A*; 82 (1909), 172.
- [119] J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H-J. Güthert, C. Gerber, J. K. Gimzewski, *Science*, 288 (2000), 316; R. McKendry, J. Zhang, Y. Arntz, T. Strunz, M. Hegner, H. P. Lang, M. K. Baller, U. Certa, E. Meyer, H-J. Güntherodt, C. Gerber, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 99 (2002), 9783.
- [120] G. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote, A. Majumdar, *Nat. Biotech.*, 19 (2001), 856.
- [121] A. Boisen, J. Thaysen, H. Jensenius, O. Hansen, *Ultramicroscopy*, 82 (2000), 11.
- [122] R. L. Gunter, W. G. Delinger, K. Manygoats, A. Kooser, T. L. Porter, *Sens. Actuators A*, 107 (2003), 219.
- [123] G. Shkhawat, S-H. Tark, V. P. Dravid, *Science*, 311 (2006), 1592.
- [124] J. H. Park, T. Y. Kwon, D. S. Yoon, H. Kim, T. S. Kim, *Adv. Funct. Mater.*, 15 (2005), 2021.
- [125] C. Vancura, M. Ruegg, Y. Li, C. Hagleitner, A. Hierlemann, *Anal. Chem.*, 77 (2005), 2690.
- [126] L. H. Han, S. Chen, *Sens. Actuators A*, 121 (2005), 35.
- [127] M. A. Rosa, D. De Bruyker, A. R. Völkel, E. Peeters, J. Dunec, *J. Micromech. Microeng.*, 14 (2004), 446.
- [128] A. Gupta, D. Akin, R. Bashir, *Appl. Phys. Lett.*, 84(11) (2004), 1976.
- [129] B. Ilic, D. Czaplewski, P. Neuzil, C. Campagnolo, C. Batt, H. G. Craighead, *Appl. Phys. Lett.*, 77(3) (2000), 450.
- [130] J-P. McGovern, W. Y. Shih, W-H. Shih, *Analyst*, 132 (2007), 777.
- [131] T. P. Burg, M. Godin, S. M. Knudsen, W. Shen, G. Carlson, J. S. Foster, K. Babcock, S. R. Manalis, *Nature*, 446 (2007), 1066.
- [132] J. Rabe, S. Büttgenbach, J. Schröder, P. Hauptmann, *IEEE Sensors J.*, 3(4) (2003), 361.
- [133] J. H. Seo, L. Betancor, K. S. Demirci, A. Byum, J. Spain, O. Brand, *Proceedings of 14th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems conference (Transducers 07)* (2007), 1737.
- [134] Y. Xin, Z. Li, L. Odum, Z-Y. Cheng, Z. Xu, *Appl. Phys. Lett.*, 89 (2006), 223508.
- [135] L. Nicu, M. Guirardel, F. Chambosse, P. Rougerie, S. Hinh, E. Trevisiol, J-M. Francois, J-P. Majoral, A-M. Caminade, E. Cattani, C. Bergaud, *Sens. Actuators B*, 110(1) (2005), 125.
- [136] M. Guirardel, *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré: détection de l'adsorption de nanoparticules d'or*, thèse, spécialité Conception de Circuits Microélectroniques et Microsystèmes, Toulouse (2003).

- [137] M. Urdea, L. A. Penny, S. S. Olmsted, M. Y. Giovanni, P. Kaspar, A. Shepherd, P. Wilson, C. A Dahl, S. Buchsbaum, G. Moeller, D. C. Hay Burgess, *Nature*, S1 (**2006**), 74.
- [138] T. Leïchlé, *Bioplume: a MEMS-based picoliter droplet dispenser with electrosputting means for patterning surfaces et the micro- and the nanometer scales*, thèse, spécialité Matériaux, Technologie et Composants de l'Electronique, Toulouse (**2006**).

CHAPITRE II : Microfabrication de micromembranes piézoélectriques circulaires et caractérisation du comportement statique

II.1 Introduction

II.1.1 Présentation du contexte initial

Les travaux initiés par Christian Bergaud et son équipe au LAAS-CNRS en 1999-2000 ont porté sur l'étude de structures de type membranes, après avoir mis en œuvre l'utilisation de microleviers. Le choix de membranes est dû à leur fabrication plus aisée que des leviers et à l'obtention d'une surface plane et solide, favorable à une utilisation en tant que biocapteur. L'ensemble de travaux **sur deux générations** de micromembranes a concerné l'optimisation de la forme des structures et leur fabrication pour un comportement en adéquation avec les caractéristiques de BioMEMS. Ce sont essentiellement des membranes carrées et circulaires qui ont été réalisées, avec intégration d'une couche piézoélectrique prévue pour l'actionnement. Des études sur la position de la pastille piézoélectrique par rapport à la forme globale de la membrane ont été menées sur de deux lots fabriqués et les résultats obtenus, tant au niveau statique que dynamique, ont justifié le choix de poursuivre sur des membranes circulaires avec une couche piézoélectrique au centre [1]. Ce sont donc les optimisations faites sur la fabrication et la caractérisation de ces micromembranes circulaires qui ont servi de point de départ aux travaux réalisés dans cette thèse.

II.1.2 Motivations

La qualité des résultats sur les performances de BioMEMS résonants décrits dans le chapitre I a permis d'approfondir l'étude de micromembranes selon deux volets : le comportement statique puis dynamique. Tout d'abord, au niveau statique, la déformation initiale des structures doit être appréhendée. L'empilement successif des couches et les méthodes de fabrication induisent des contraintes dans les matériaux, se traduisant par une déflexion initiale non-nulle. La polarisation statique de la couche piézoélectrique (PZT) influe aussi sur la déformation des membranes, notamment par l'intermédiaire du (ou des) coefficient(s) de transduction piézoélectrique. Or, il n'existe pas de méthode générique pour la détermination de ce paramètre d'importance. Nous avons donc élaboré un modèle basé sur l'étude de l'influence de la tension de polarisation du film piézoélectrique sur la déflexion statique des membranes. Ce modèle a ainsi servi à la détermination du coefficient de transduction piézoélectrique et la validation de l'intégration de la couche. Dans ce cas, la couche piézoélectrique ne sert que pour l'actionnement des membranes. Vient ensuite l'étude du comportement dynamique des structures. Même si l'actionnement dynamique des membranes a été achevé par la couche piézoélectrique au cours des travaux antérieurs, la détection des fréquences de résonance n'a été faite que par la méthode de déflexion optique OBD [2]. Afin de concevoir un biocapteur capable de mesurer une biorecognition en parallèle et/ou en milieu liquide, la détection intégrée est primordiale et permet de profiter des deux effets piézoélectriques. C'est donc dans cette optique que nous avons fait des études de comportement par actionnement et détection piézoélectrique dans l'air et en milieu liquide,

pour la détermination des conditions optimales pour l'utilisation en tant que biocapteur. Ces études passent aussi par l'optimisation des rapports de forme. Il a été démontré que l'efficacité d'actionnement dépend, dans le cas de structures circulaires, du rapport entre le rayon de la pastille piézoélectrique et le rayon global de la membrane [3]. C'est pourquoi différentes tailles de pastille ont été étudiées pour différents rayons globaux, afin d'optimiser le comportement des structures. L'ensemble des améliorations a ainsi permis la détermination d'une sensibilité massique théorique, validée expérimentalement dans l'air et étendue au milieu liquide. Cela a aussi permis l'élaboration d'une électronique spécifique aux micromembranes fabriquées afin d'atteindre les objectifs initialement décrits. C'est au fil des deux prochains chapitres que seront abordés les différents enjeux dans la caractérisation et l'optimisation physique de micromembranes.

II.2 Microfabrication de membranes piézoélectriques

II.2.1 Fabrication d'un lot de génération 3

La mise au point du procédé de fabrication de deux générations de structures développées dans le cadre de la thèse de Mathieu Guirardel [1] a permis d'aborder la fabrication complexe des micromembranes, puisque huit niveaux de masque sont nécessaires aux dépôts des différentes couches et à leur micro-usinage, en vue de la fabrication d'une troisième génération de membranes. Comme il a été vu, plusieurs rapports de forme sont présents sur la même puce. Le rayon global (R_2) mesure 100 μm ou 150 μm et pour chaque valeur de R_2 , trois tailles (rayon R_1) pour la pastille piézoélectrique coexistent, de manière à avoir trois rapports R_1/R_2 : 0.3, 0.5 et 0.7, comme représenté sur la figure 2.1.

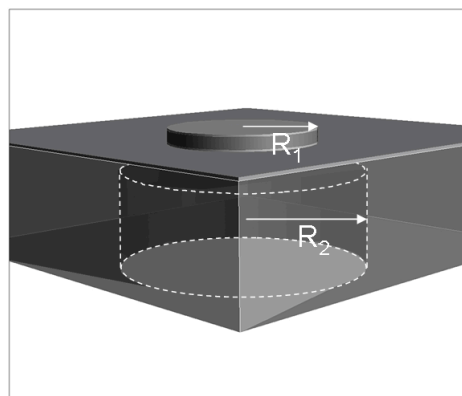


Figure 2.1 : représentation en 3 dimensions d'une membrane de rayon global R_2 contenant une couche piézoélectrique au centre, de rayon R_1 .

Le substrat de base est une plaque SOI (Silicon On Isulator). L'utilisation d'un tel support permet un meilleur contrôle de l'épaisseur de la membrane puisqu'il possède un oxyde enterré d'épaisseur 1 μm qui servira de couche d'arrêt lors de la gravure profonde du silicium pour la libération face arrière des membranes. Le silicium monocristallin supérieur a une épaisseur de 2 μm pour un substrat inférieur de 525 μm .

La première étape consiste en la définition de motifs d'alignement qui serviront à chaque étape de repère pour la superposition des différents niveaux. Après enduction de la

plaque par une résine AZ 1529 positive vient une étape de recuit de la résine pour une bonne tenue mécanique sur la plaque (cf. figure 2.2). L'insolation de la résine au travers d'un masque contenant la forme des motifs permet une retranscription dans la résine. En effet, les résines utilisées sont photosensibles, c'est-à-dire que leur irradiation par des UV modifie leurs propriétés de façon à ce que les parties irradiées restent ou sont dissoutes au moment du développement. C'est par rapport à la réactivité face aux UV qu'est définie la polarité de la résine. Si la résine irradiée est dissoute par les solvants au moment du développement, la résine est dite positive ; dans le cas contraire, elle est dite négative. Ainsi, dans notre cas, l'utilisation d'une résine positive enlève la résine dans les zones où sont définis les motifs, rendant l'accès possible au silicium supérieur. Les motifs d'alignement sont obtenus par gravure ionique réactive (RIE : Reactive Ion Etching) du silicium supérieur. Cette première étape se termine par retrait de la résine. La méthode décrite ci-dessus utilisant une résine photosensible structurée est appliquée à chaque étape nécessitant le dessin de formes sur la plaque.

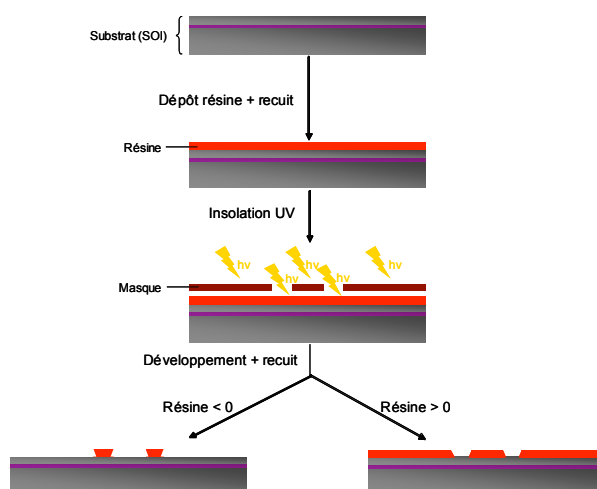


Figure 2.2 : représentation schématique des différentes étapes d'une photolithographie.

Les principales étapes du procédé de fabrication sont décrites dans la figure 2.3. L'étape suivant la définition des motifs d'alignement correspond à la croissance de dioxyde de silicium (SiO_2) (A) sur l'ensemble de la plaque afin d'éviter des fuites de courant dans le silicium lorsque les électrodes seront déposées. Cet oxyde, de 50 nm d'épaisseur, est obtenu par croissance thermique, sous atmosphère sèche. Ces deux premières étapes sont réalisées dans la salle blanche du LAAS. Les étapes suivantes, concernant la couche piézoélectrique et ses deux électrodes, sont réalisées par l'équipe de Denis Remiens à l'IEMN à Lille.

La réalisation de l'électrode inférieure est faite par lift-off de titane/platine en utilisant une résine (AZ 1818) positive (B). La méthode par lift-off consiste au dépôt de matériaux sur l'ensemble de la plaque enduite par la résine structurée selon les motifs, dont le retrait laisse la couche déposée aux endroits où la résine avait été dissoute lors du développement. Ainsi, la forme circulaire de l'électrode inférieure est obtenue par dépôt d'un oxyde de titane (10 nm d'épaisseur) permettant ensuite l'accroche du platine (150 nm d'épaisseur) sur l'oxyde. Le rayon de l'électrode est de 5 μm inférieur à celui de la couche piézoélectrique (rayon R_1). Cette étape est cruciale puisque d'elle dépendra l'orientation cristalline du PZT déposé ultérieurement. La structure de maille du platine, proche de celle du PZT, d'orientation $\langle 111 \rangle$ a été démontrée comme favorable à une bonne cristallisation du PZT. Cette orientation est naturellement adoptée par le platine dans les conditions de dépôt utilisées [4]. Après le retrait

de la résine pour faire le lift-off, cette étape se termine par un recuit à 650 °C pour stabiliser mécaniquement et surtout thermiquement l'électrode déposée.

L'étape suivante, qui concerne le dépôt de la pastille piézoélectrique (C), est innovante par rapport aux techniques habituellement utilisées pour les matériaux piézoélectriques puisqu'elle se déroule à température ambiante, afin de structurer la pastille par lift-off. Pour des raisons de compatibilité thermique avec la résine, la température lors du dépôt ne peut pas dépasser 180 °C. C'est pourquoi, le dépôt du PZT ($\text{PbZr}_x\text{Ti}_{(1-x)}\text{O}_3$ $x= 54$) par pulvérisation magnétron RF a été calibré pour qu'une température supérieure à 130 °C ne soit pas atteinte. La composition 54/46 du PZT a été choisie pour sa proximité avec la phase morphotrope ($x=53$) qui correspond à la phase où les coefficients piézoélectriques et les constantes diélectriques sont les plus élevés [5]. Après le lift-off de la résine, les formes circulaires de la pastille piézoélectrique sont obtenues avec un rayon R_1 . Un recuit de cristallisation est ensuite nécessaire puisqu'aux températures de dépôt, le film déposé est amorphe. Le recuit est fait à 625 °C pendant 30 minutes. L'épaisseur de la couche piézoélectrique ainsi déposée varie de 800 nm à 1.2 μm , le manque d'uniformité étant dû à la cible utilisée pour le dépôt puisque sa taille est de 75 mm de diamètre alors que la plaquette atteint 100 mm.

La dernière étape réalisée à l'IEMN concerne l'électrode supérieure (D). Un procédé similaire à celui mis en œuvre pour l'électrode inférieure a été utilisé, c'est-à-dire une structuration obtenue par lift-off pour des électrodes de rayon 5 μm inférieur par rapport au PZT.

Après retour des plaques de l'IEMN, le procédé de fabrication a été terminé au LAAS. Cela commence par le dépôt d'une couche de dioxyde de silicium (SiO_2) sur l'ensemble de la plaque (E) afin de protéger les parties électriques des risques de court-circuit lors de l'utilisation des puces en milieu liquide, cette dernière pouvant également servir de couche d'immobilisation de biorécepteurs. Cet oxyde de 250 nm a été déposé par PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition). Pour accéder aux points de contact des électrodes, il est nécessaire d'ouvrir localement l'oxyde précédemment déposé. Cette étape est achevée par gravure chimique de l'oxyde sur des zones définies par la résine. L'attaque par un tampon d'acide fluorhydrique grave l'oxyde jusqu'aux électrodes de platine, servant de couche d'arrêt.

L'épaisseur des électrodes de platine étant faible, un renforcement des plots de contact est obligatoire pour la soudure des fils lors de l'encapsulation des puces. Cette étape est achevée par lift-off d'une résine réversible (résine initialement positive mais dont la polarité est inversée par une seconde insolation) après le dépôt d'une couche de titane/or (100 nm/ 700 nm).

Avant de terminer la fabrication face avant des structures, une dernière couche est déposée. C'est à nouveau un niveau de titane/or (10 nm/ 100 nm) qui est réalisé, mais sa fonction est de permettre la fonctionnalisation thiol des membranes (par exemple). Cette couche est déposée sur certaines puces où des pastilles circulaires, de rayon R_2 , ont été obtenues par lift-off. Cette étape termine la structuration en sept niveaux de masque de la face avant des membranes.

La dernière étape du procédé de fabrication est cruciale puisqu'elle correspond à la libération des membranes de forme circulaire et de rayon R_2 . Cette étape de gravure est d'autant plus cruciale qu'elle est la moins standardisée. Tout d'abord au niveau de la résine

photosensible, la durée de la gravure des 525 μm du silicium inférieur requiert l'utilisation d'une résine épaisse. C'est pour cela qu'a été utilisée une résine AZ 4562 de 20 μm . L'épaisseur de la résine fait que sa bonne tenue mécanique est difficilement atteignable et cela peut se traduire par l'apparition de bulles lorsqu'elle est soumise au plasma utilisé pour la gravure. Une protection de la face avant de la plaquette est aussi nécessaire pour éviter le décollement des membranes à la fin de la gravure, à cause d'une différence de pression. La protection est faite par collage thermique d'une plaquette de silicium, en contact avec la face avant. La libération des membranes jusqu'à l'oxyde est obtenue grâce une gravure ionique réactive profonde (DRIE : Deep Reactive Ion Etching) (F). Dans ce cas, un plasma de SF_6 bombarde la face arrière pendant 3 h 15 min et grave le silicium jusqu'à l'oxyde enterré. Pour terminer le processus, la gravure de l'oxyde finit la libération des membranes et la découpe des puces (G). Cette ultime étape est réalisée par RIE CF_4 en alternant des cycles de gravure (15 min) et des cycles de plasma oxygène (2 min) afin de retirer les résidus issus de la gravure. La sélectivité de gravure n'étant pas idéale et les temps de gravure n'ayant pas été calibrés, une fine couche de silicium supérieur a été gravée, donnant une épaisseur variant de 1.75 μm à 1.85 μm pour le silicium supérieur.

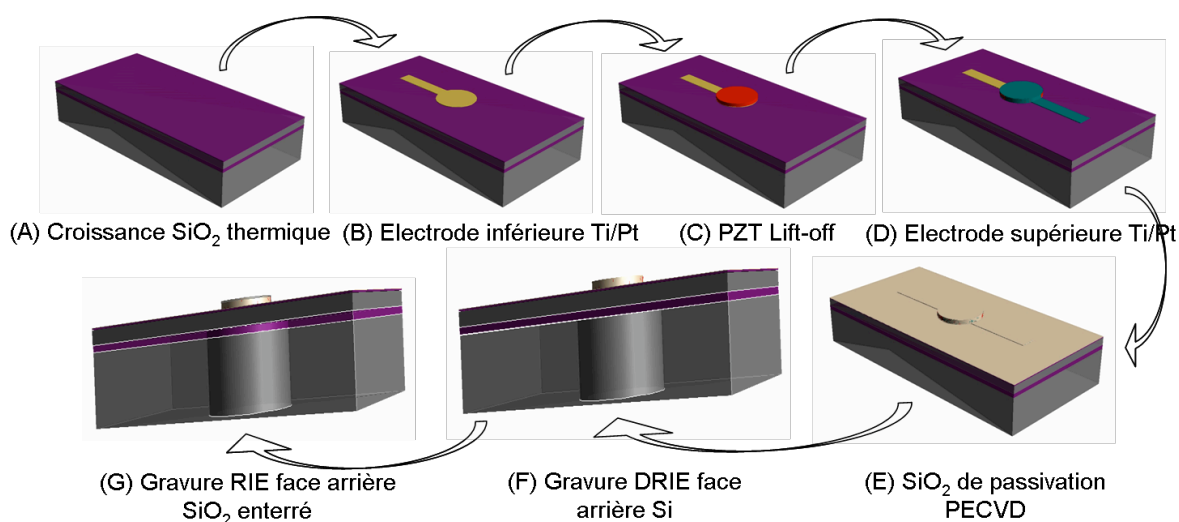


Figure 2.3 : Principales étapes du procédé de fabrication des micromembranes de génération 3.

II.2.2 Commentaire sur les structures issues de la génération 3

Bien que complexe, le procédé de fabrication de matrices de micromembranes a pu être achevé. Il reste néanmoins quelques étapes devant être améliorées. Tout d'abord, au niveau de l'accroche de la pastille piézoélectrique, il a été vu que l'électrode inférieure avait un rayon 5 μm inférieur par rapport au PZT. Or, sa cristallisation dépend de l'orientation du platine et l'électrode ne couvre pas l'ensemble de la couche piézoélectrique, induisant une cristallisation hasardeuse dans cette zone, lorsqu'elle a lieu. Cette étape nécessite donc un besoin d'être améliorée pour garantir une structuration correcte du PZT.

Une autre phase du procédé méritant une optimisation concerne le dépôt du dioxyde de silicium de passivation (E). Cette couche, déposée par PECVD, est poreuse par rapport à un SiO_2 issu d'une croissance thermique, induisant des fuites de courant lorsqu'une tension élevée est appliquée au niveau des électrodes. Cependant, la croissance thermique d'un

dioxyde de silicium est obtenue par réaction entre le silicium et l'oxygène injecté dans le four, à des températures comprises entre 800 °C et 1200 °C. Cette méthode ne peut donc pas être employée pour la protection des électrodes de platine. C'est donc dans la manière de déposer l'oxyde par PECVD que doivent être apportées des modifications afin de réduire la porosité.

Enfin, l'étape critique de la gravure profonde du silicium face arrière (F) n'a pas été optimum lors de la fabrication. En effet, comme le montre la figure 2.4, les structures, surtout celles de 150 µm, ont été surgravées. Cela provient de la gravure par plasma. Le dioxyde de silicium enterré servant de couche d'arrêt pour la gravure, la sélectivité chimique entre la silice et les ions du plasma fait qu'une fois les flancs du silicium inférieur gravés verticalement, l'accumulation des charges électriques au niveau de la couche d'arrêt se traduit par une attaque latérale du silicium par le faisceau d'ions. De plus, la présence de deux tailles de structures sur la même plaque rend difficile le paramétrage temporel de la gravure, puisque la taille des ouvertures influe sur la vitesse de gravure. Donc les résultats lors de la fabrication montrent que les structures de 100 µm de rayon ont effectivement ces côtes (voire même légèrement inférieures) alors que celles de 150 µm ont un rayon égal à 200 µm. La seule répercussion, hormis le besoin d'améliorer cette étape, est le changement des rapports R_1/R_2 qui deviennent 0.23, 0.38 et 0.53 au lieu de 0.3, 0.5 et 0.7.

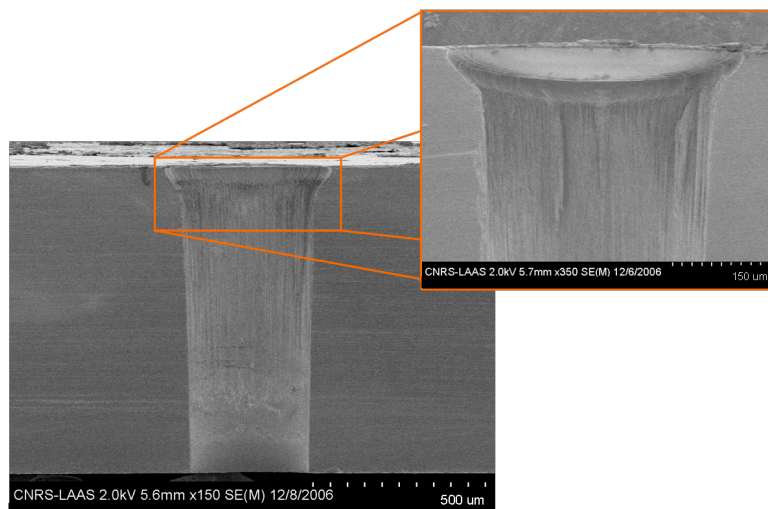


Figure 2.4 : coupe transversale d'une micromembrane issue du lot de génération 3 montrant les flancs issus de la gravure profonde par RIE du silicium inférieur.

Il est néanmoins important de noter que la qualité des structures fabriquées a permis l'élaboration des caractérisations physiques statiques et dynamiques avant la fabrication d'un nouveau lot tenant compte de ces observations. Les puces issues du lot de génération 3 correspondent à des matrices 4x4 de micromembranes comprenant les six tailles différentes sur chaque puce (cf. figure 2.5). Le lot suivant, de génération 4, servira à l'utilisation des structures en tant que biocapteur. Pour un fonctionnement parallèle, l'ensemble des membranes doivent avoir les mêmes caractéristiques, pour comparer les résultats, donc ce sont des structures de 100 µm de rayon qui ont été fabriquées avec un rapport R_1/R_2 de 0.5. Le choix de ces dimensions provient des résultats (présentés ultérieurement) concluants obtenus avec ces structures.

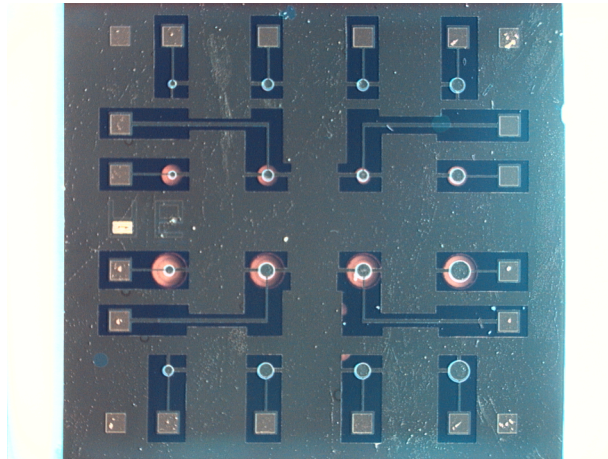


Figure 2.5 : Photographie d'une puce issue du lot de fabrication de génération 3.

II.2.3 Fabrication d'un lot de génération 4

Dans la fabrication de ce lot de génération 4, seules les étapes nécessitant un besoin d'amélioration ont été revues. Cela se traduit par l'ajout de deux niveaux de masque. Après la définition des motifs d'alignement et la croissance de l'oxyde thermique, une couche supplémentaire a été ajoutée avant l'électrode inférieure. Pour favoriser la cristallisation du PZT sur l'ensemble de la pastille, un anneau de dioxyde de zirconium (ZrO_2) a été implémenté. Façonné par lift-off sur une résine positive, cet oxyde organo-métallique présente une structure cristalline en accord avec le PZT. L'anneau a un rayon extérieur supérieur à celui de la couche piézoélectrique de façon à couvrir la surface de contact du PZT ($10\text{ }\mu\text{m}$ supérieur). Sont ensuite définis les niveaux (B) et (C) correspondant à l'électrode inférieure et la pastille piézoélectrique.

Une étape a aussi été ajoutée avant le dépôt de l'électrode supérieure. En effet, afin de limiter le rayonnement électrique de la couche piézoélectrique, le rayon de l'électrode supérieure a été augmenté (il est maintenant $5\text{ }\mu\text{m}$ supérieur à celui du PZT) pour que cette couche agisse comme un blindage. A cause des pistes électriques de l'électrode inférieure, la présence d'un oxyde est nécessaire pour empêcher un court-circuit entre l'électrode supérieure et la piste de l'électrode inférieure. Ceci a été réalisé en déposant un anneau supplémentaire de ZrO_2 ayant les mêmes caractéristiques que celui déjà fabriqué. Ainsi, l'électrode supérieure a pu être définie de manière à englober la pastille de PZT (D).

Comme il a été vu, le dioxyde de silicium de passivation doit être le moins poreux possible. Afin d'améliorer la qualité de ses propriétés isolantes, le dépôt a été fait par une succession de cycles au lieu d'être fait en une seule phase (E). Ainsi, l'alternance de trois cycles de dépôt avec trois cycles de stabilisation sous vide permet à chaque cycle de dépôt de combler les « trous » du précédent dépôt. Cela se traduira par une meilleure résistance électrique du SiO_2 , surtout en milieu liquide, grâce une porosité réduite.

Après le renforcement des plots de contact et le dépôt de la couche d'or pour la modification chimique des surfaces, c'est au niveau de la gravure sèche profonde du silicium (F) que les optimisations du procédé ont été le plus approfondies. Afin de résoudre le problème de surgravure latérale, une procédure particulière de gravure a été employée, par utilisation d'un « kit anti-notching ». Ce kit diminue la fréquence de polarisation entre le

substrat et le plasma, ralentissant la vitesse de gravure et empêchant l'accumulation de charges au niveau de la couche d'arrêt pour une gravure verticale uniquement. La vitesse de gravure étant plus faible avec cette procédure, une première phase sans le kit est effectuée avant de l'ajouter pour terminer la gravure. Il a fallu ainsi calibrer le temps de gravure pour chacune des deux phases. Les temps optimum ont été déterminés à 3h de gravure initiale et 35 min avec le kit. La figure 2.6 présente le résultat de la gravure profonde du silicium inférieur avec le nouveau protocole et des flancs droits peuvent être observés avec respect des dimensions, puisque le rayon R_2 est $109 \pm 5\mu\text{m}$, ce qui représente une erreur inférieure à 10 %. Le contrôle de l'uniformité de taille se traduira par la suite par une bonne reproductibilité du comportement dynamique des membranes, surtout au niveau des fréquences de résonance.

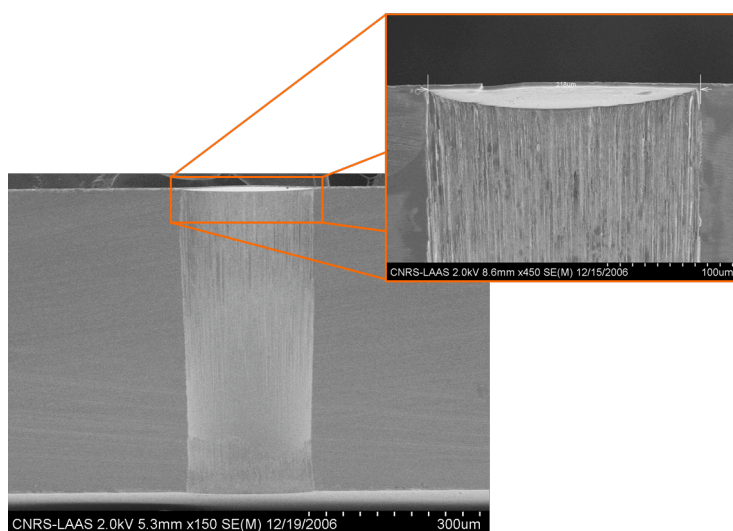


Figure 2.6 : coupe transversale d'une micromembrane issue du lot de génération 4 montrant les flancs issus de la gravure profonde optimisée du silicium inférieur.

Afin de terminer le procédé de fabrication, l'étape (G) de gravure de l'oxyde enterré a été modifiée en termes de méthode, par rapport à la génération 3. Les $525\mu\text{m}$ de silicium rendent parfois l'accès difficile au plasma utilisé pour l'attaque, réduisant l'uniformité du retrait de l'oxyde. Aussi, en plus des motifs circulaires pour la libération des membranes ont été insérées des lignes pour la définition des puces, qui ont été gravées. Cela permet d'éviter une étape supplémentaire de découpe des puces à la scie diamantée. Mais cela induit aussi une mauvaise tenue mécanique des puces sur la plaque à la fin de la gravure. Ainsi, la puissance du plasma, couplée au vide, provoque un arrachement fréquent des puces pendant la gravure par RIE de l'oxyde enterré. C'est pourquoi a été utilisée une méthode de gravure par vapeur de tampon d'acide fluorhydrique, développée par Laurent Jalabert, service TEAM au LAAS. Cette étape ne peut être faite qu'en phase gazeuse afin de ne pas abîmer la faible quantité de résine restant après la longue étape de gravure du silicium. L'attaque par le HF étant isotrope, un temps de gravure a dû être calibré afin de ne pas graver l'oxyde latéralement. Ainsi, les membranes ont pu être libérées avec un retrait uniforme de l'oxyde et respectant le rayon. Comme le montre la figure 2.7, l'oxyde enterré a été gravé sur toute la surface de la puce et l'arrêt de la gravure latéralement correspond au niveau du silicium inférieur ($\pm 1\%$).

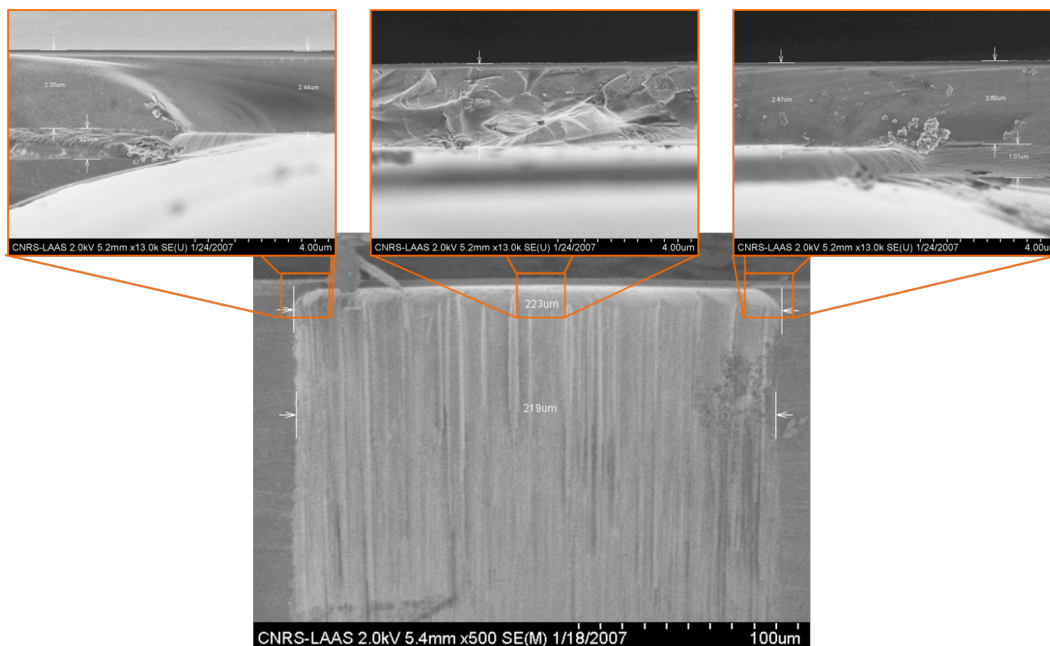


Figure 2.7 : coupe transversale d'une micromembrane issue du lot de génération 4 montrant la gravure optimisée par vapeur d'acide fluorhydrique de l'oxyde enterré.

La microfabrication des puces a pu être achevée avec des matrices 3x2 de micromembranes de rayon $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$, comprenant une membrane supplémentaire de rayon $R_1 = 70 \mu\text{m}$.

II.2.4 Encapsulation des puces

Après la microfabrication des puces, leur encapsulation est capitale car elle joue le rôle d'interface entre les membranes et le système d'actionnement et/ou détection électrique. Dans notre cas, des boîtiers de type TO8 16 broches ont été utilisés. Les plots de contact des différentes électrodes ont ainsi été positionnés de façon à établir aisément le lien entre le plot et le contact de la broche. Après collage de la puce par une colle diélectrique, des fils d'or sont soudés par microsoudure pour établir le contact (cf. figure 2.8). Cependant, l'utilisation de fils d'or impose un besoin de les recouvrir pour éviter les court-circuits lors de l'utilisation des puces en milieu liquide. Le choix de l'enrobage des fils dépend essentiellement de sa biocompatibilité avec les molécules et les solutions utilisées. Pour le lot de génération 3, un dérivé du silicone a été utilisé (cf. figure 2.8). Ce polymère présente l'avantage d'être translucide et sa structure molle limite l'arrachement des fils pendant sa réticulation. Malgré son comportement stable avec les solutions aqueuses, cet enrobage est facilement détérioré dans les solvants organiques, limitant ainsi les possibilités d'utilisation des puces en tant que biocapteur (A titre d'exemple, la réalisation d'une monocouche auto-assemblée de thiol sur l'or se fait dans l'éthanol absolu).

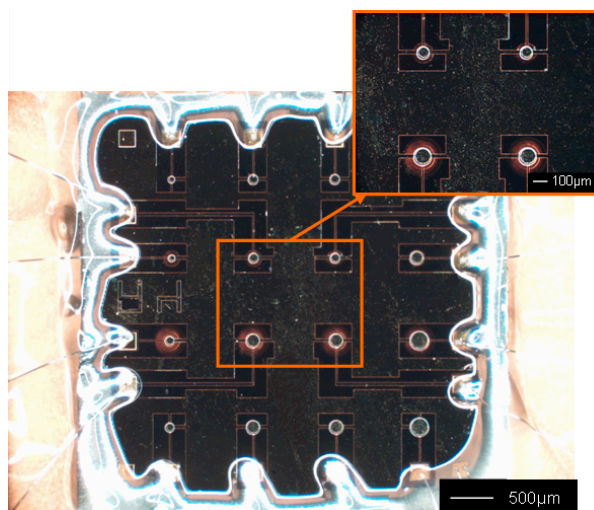


Figure 2.8 : photographie d'une puce encapsulée issue du lot de fabrication de génération 3.

C'est ainsi que d'autres types de polymères ont été testés pour l'enrobage des puces de génération 4 puisque ce sont les membranes issues de ce lot qui serviront aux applications biocapteur. L'ensemble des enrobages étudiés sont des dérivés de colles époxy isolantes. Ils ont été testés par immersion pendant 24h dans différentes solutions, les paramètres de variation étant le pH et la composition (solvant organique, force ionique, etc...). La caractérisation de la résistance de l'enrobage aux différentes solutions a été faite en utilisant des carrés de silicium recouverts d'or où des fils ont été microsoudés, eux-mêmes enrobés par les différents polymères. En mesurant la résistance entre deux broches avant et après l'immersion, une mauvaise tenue chimique du polymère se traduira par un arrachage des fils et donc la mesure d'une résistance électrique infinie.

Le tableau 2.1 présente la valeur des résistances mesurées pour différents polymères et différentes solutions. D'après ce tableau, la faible résistance chimique des enrobages T905 et H70 E-4 à l'éthanol et au tampon aqueux salin a fait que ces deux enrobages ont rapidement été écartés. Par contre, les enrobages H70 E et H70 E-2 présentent une bonne résistance chimique à l'ensemble des solutions, sauf le mélange acide acétique (25 %) / éthanol (75 %). Cela montre une gamme d'applications large, puisque ces enrobages résistent à des solutions fortement acides et basiques, mais aussi la plupart des tampons organiques utilisés en biologie. Ainsi, l'enrobage H70 E-2 a été choisi, sa structure visqueuse facilitant son façonnage sur les puces.

Enrobage	Ethanol		Tampon hepes 10 mM pH7.4, NaCl 100 mM, EDTA 3%, P20 0.01%		Acide acétique-éthanol		Tp citrate pH 2.78		Tp Heps 10mM pH 7.4, NaCl 100mM, NaOH 4M		DMSO	
	R avant (Ω)	R après (Ω)	R avant	R après	R avant	R après	R avant	R après	R avant	R après	R avant	R après
1 : T905	0,76	inf	0,75	inf	-	-	-	-	-	-	-	-
2: H70 E-4	0,74	inf	0,71	inf	-	-	-	-	-	-	-	-
3: H70 E-2	0,72	0,74	0,73	0,77	0,72	inf	0,69	0,7	0,7	0,71	0,75	0,72
4: H70 E	0,69	0,71	0,68	0,66	0,67	inf	0,66	0,65	0,64	0,6	0,71	0,71

Tableau 2.1 : Influence de solutions sur la tenue chimique d'enrobages potentiels pour l'encapsulation des puces issues du lot de génération 4.

Les puces, rendues fonctionnelles, issues de la génération 4 de fabrication, sont présentées sur la figure 2.9, où le boîtier TO8 avec la puce au centre, les fils soudés et recouverts par l'enrobage H70 E-2 peuvent être observés.

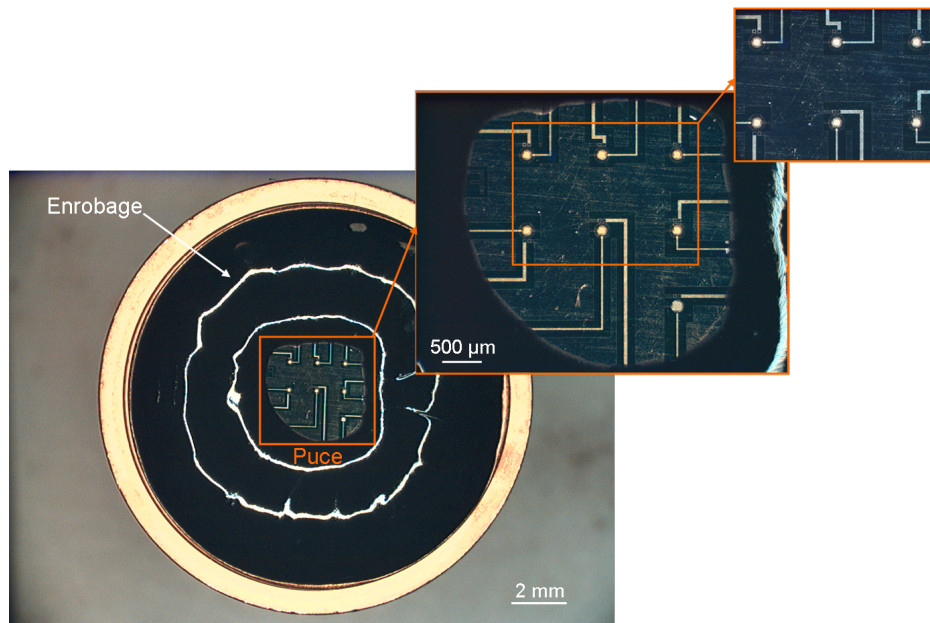


Figure 2.9 : photographie d'une puce encapsulée issue du lot de fabrication de génération 4.

II.3 Modèle analytique pour la déflexion statique de membranes circulaires soumises à des contraintes initiales

Les structures issues du lot de génération 3 présentent une déflexion statique non nulle. Comme le montre la figure 2.10, les contraintes générées lors de l'empilement multi-couche induisent une déformation verticale. De plus, la forte contrainte compressive du dioxyde de silicium provoque un état d'équilibre mécanique en flambement. Cet état correspond à une relaxation des contraintes lorsqu'elles sont trop élevées. Ainsi, les structures de 200 µm de rayon global présentant une forte déflexion (cf. figure 2.10), ce sont ces structures qui méritent une attention particulière au niveau théorique et expérimental.

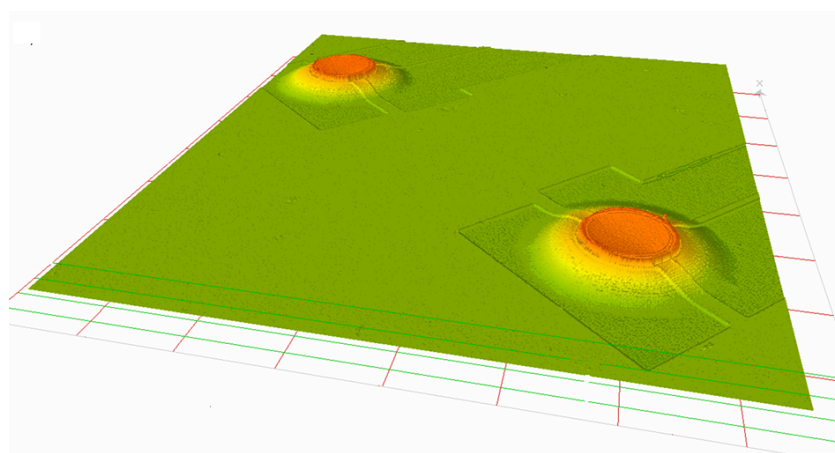


Figure 2.10 : image en 3 dimensions de deux micromembranes où $R_1 = 75 \mu\text{m}$ et $R_2 = 200 \mu\text{m}$ obtenue par interférométrie optique.

Les effets d'un tel comportement statique peuvent affecter les propriétés mécaniques (et donc électriques) de l'ensemble de la structure et plus particulièrement celles de la pastille

piézoélectrique. C'est pourquoi, il est d'intérêt d'analyser l'influence du flambement sur le comportement global des micromembranes et en particulier sur la couche piézoélectrique. La modélisation de MEMS est faite, de manière générale, par des logiciels de simulation par éléments finis. Bien que ce soit des outils puissants, la plupart des modélisations par éléments finis ne tiennent pas compte des comportements mécaniques complexes tels que le flambement. De plus, les temps de simulation longs (plusieurs heures jusqu'à plusieurs jours) incitent, lorsque c'est possible, le développement de modèles analytiques. Ils présentent l'intérêt qu'au-delà de l'intégration possible de phénomènes complexes, la modification d'un ou plusieurs paramètres peut être instantanément évaluée. Pour des structures de type membranes, la construction d'un modèle analytique robuste, tenant compte de l'aspect multicouche et des contraintes, a ainsi été approfondie pour non seulement appréhender l'origine mécanique du comportement statique initial, mais aussi pour une caractérisation fine, tant au niveau de la structure globale qu'au niveau d'une couche complexe à caractériser, la couche piézoélectrique.

II.3.1 Approche mécanique pour le développement du modèle

Le modèle proposé a été établi pour des structures circulaires multicouches, composées de deux parties : une zone centrale circulaire (de rayon égal à R_1) et une zone annulaire (de rayon compris entre R_1 et R_2), comme représenté sur la figure 2.11. Wang et al. ont développé un modèle similaire pour des structures bicouches, comprenant une pastille piézoélectrique [3]. Le premier objectif du modèle est d'étendre ce modèle à des structures multicouches avant de prendre en considération les effets de flambement. Pour l'élaboration du modèle, chaque couche est supposée isotrope transverse, linéaire élastique et d'épaisseur constante. Aussi, comme l'épaisseur des couches est faible par rapport au rayon, les contraintes sont supposées en propagation normale par rapport à l'axe verticale (i.e. contraintes planes).

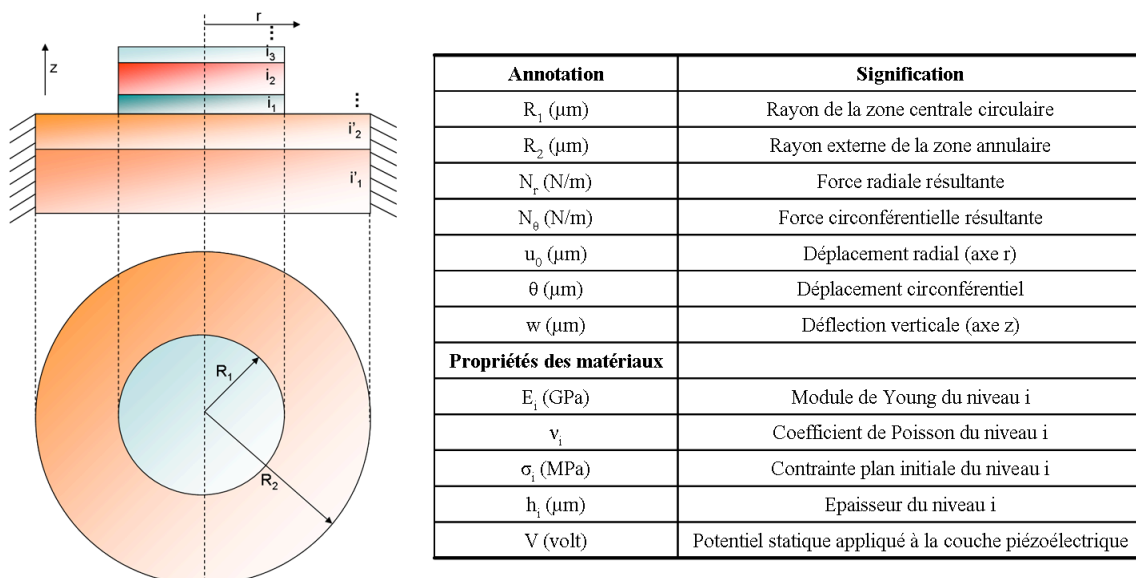


Figure 2.11 : représentation schématique d'une membrane circulaire multicouche telle que celle modélisée. Le tableau montre les différentes annotations utilisées dans le modèle développé.

• Le point de départ pour l'élaboration du modèle utilise les équations classiques de la mécanique. Les différentes annotations utilisées sont données dans le tableau de la figure 2.11. Les équations d'équilibre pour la déformation d'une plaque circulaire ou annulaire sont déterminées en considérant un élément de la plaque, conformément aux hypothèses de Timoshenko sur la modélisation mécanique de plaques circulaires encastées, soumises à une contrainte plane [6]. Ces équations sont données par :

$$\frac{dN_r}{dr} + \frac{N_r - N_\theta}{r} = 0 \quad (2.1)$$

$$\frac{dM_r}{dr} + \frac{M_r - M_\theta}{r} = -N_r \theta \quad (2.2)$$

où N_r et N_θ représentent les forces résultantes selon les axes radial et de rotation (en coordonnées cylindriques), respectivement, M_r et M_θ sont les moments correspondants et $-N_r \theta$ est la force de cisaillement résultante. Les forces et moments résultants peuvent être décomposés en : $N_r = \tilde{N}_r + N_0$, $N_\theta = \tilde{N}_\theta + N_0$, $M_r = \tilde{M}_r + M_0$ et $M_\theta = \tilde{M}_\theta + M_0$, où $\tilde{N}_r$, $\tilde{N}_\theta$, $\tilde{M}_r$ et $\tilde{M}_\theta$ représentent les forces et moments résultants différents de ceux induits par N_0 . N_0 représente la force moyenne due à la contrainte plan initiale (σ) des différents matériaux d'épaisseur h , définie par :

$$N_0 = \sum_{i=1}^n \sigma_i h_i \quad (2.3)$$

M_0 représente le moment de flexion exercé par N_0 à l'interface entre les différentes zones circulaires et annulaires.

Comme $\tilde{N}_r$ est faible par rapport à N_0 [7], il peut être négligé dans l'expression de la force de cisaillement résultante. Ainsi, les équations (2.1) et (2.2) deviennent :

$$\frac{d\tilde{N}_r}{dr} + \frac{\tilde{N}_r - \tilde{N}_\theta}{r} = 0 \quad (2.4)$$

$$\frac{d\tilde{M}_r}{dr} + \frac{\tilde{M}_r - \tilde{M}_\theta}{r} = -N_0 \theta \quad (2.5)$$

• Concernant les équations constitutives pour un déplacement radial et circonférentiel dû à une pression selon la théorie des plaques de Kirchhoff [8], elles ont été établies pour une plaque circulaire comprenant une couche piézoélectrique et donnent [9] :

$$\begin{bmatrix} \tilde{\sigma}_{rr} \\ \tilde{\sigma}_{\theta\theta} \end{bmatrix} = [Q_i] \left\{ \begin{bmatrix} \frac{du_0}{dr} \\ \frac{u_0}{r} \end{bmatrix} + z_i \begin{bmatrix} -\frac{d\theta}{dr} \\ -\frac{\theta}{r} \end{bmatrix} - \frac{V}{h_{PZT}} \begin{bmatrix} d_{31} \\ d_{31} \end{bmatrix} \right\} \quad (2.6) \quad \text{avec} \quad [Q_i] = \frac{E_i}{1-\nu_i^2} \begin{bmatrix} 1 & \nu_i \\ \nu_i & 1 \end{bmatrix} \quad (2.7)$$

où z_i représente la distance entre la position verticale d'un niveau sur l'empilement multicouche et le plan de référence h_0 défini par [10] :

$$h_0 = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{E_i}{1-\nu_i^2} h_i \left(2 \left(\sum_{j=1}^i h_j \right) - h_i \right) \right)}{2 \sum_{k=1}^n \frac{E_k}{1-\nu_k^2} h_k} \quad (2.8)$$

• Les forces et moments résultants sont calculés par intégration des équations constitutives (2.6) et (2.7) sur l'épaisseur de l'ensemble des couches, ce qui donne :

$$\begin{bmatrix} \tilde{N}_r \\ \tilde{N}_\theta \end{bmatrix} = [A] \begin{bmatrix} \frac{du_0}{dr} \\ \frac{u_0}{r} \end{bmatrix} + [B] \begin{bmatrix} -\frac{d\theta}{dr} \\ -\frac{\theta}{r} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} N_r^p \\ N_\theta^p \end{bmatrix} \quad (2.9) \quad \text{et} \quad \begin{bmatrix} \tilde{M}_r \\ \tilde{M}_\theta \end{bmatrix} = [B] \begin{bmatrix} \frac{du_0}{dr} \\ \frac{u_0}{r} \end{bmatrix} + [D] \begin{bmatrix} -\frac{d\theta}{dr} \\ -\frac{\theta}{r} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} M_r^p \\ M_\theta^p \end{bmatrix} \quad (2.10)$$

avec : $[A] = \sum_{i=1}^n \int_{z_i}^{z_{i+1}} [Q_i] dz$ la matrice équivalente de rigidité en extension plan

$[B] = \sum_{i=1}^n \int_{z_i}^{z_{i+1}} [Q_i] z dz$ la matrice équivalente de couplage flexion-extension

$[D] = \sum_{i=1}^n \int_{z_i}^{z_{i+1}} [Q_i] z^2 dz$ la matrice équivalente de rigidité en flexion

Quant à N_r^p et N_θ^p , ces forces représentent le couplage en flexion-extension de la couche piézoélectrique lorsque une tension constante V est appliquée à ses bornes. Ces forces, ainsi que les moments associés, sont décrites par les matrices :

$$\begin{bmatrix} N_r^p \\ N_\theta^p \end{bmatrix} = \int_{z_{PZT_inf}}^{z_{PZT_sup}} \frac{V}{h_{PZT}} [Q_{PZT}] \begin{bmatrix} d_{31} \\ d_{31} \end{bmatrix} dz \quad \text{et} \quad \begin{bmatrix} M_r^p \\ M_\theta^p \end{bmatrix} = \int_{z_{PZT_inf}}^{z_{PZT_sup}} \frac{V}{h_{PZT}} [Q_{PZT}] \begin{bmatrix} d_{31} \\ d_{31} \end{bmatrix} z dz$$

II.3.2 Equations analytiques du déplacement statique et étude du flambement de membranes

• L'expression des forces et moments résultants (équations (2.9) et (2.10)) en fonction du déplacement radial et circonférentiel permet, par substitution dans les équations d'équilibre (2.4) et (2.5), l'obtention de deux équations différentielles du second ordre dont la résolution aboutit sur l'expression du déplacement radial $u_0(r)$ et circonférentiel $\theta(r)$ [3]. L'équation régissant le déplacement vertical $w(r)$ est déterminée par intégration selon l'axe radial du déplacement circonférentiel ($w(r) = \int \theta(r) dr$) et donne :

$$w(r) = \begin{cases} \frac{R}{k_0} \left[c_1 I_0 \left(k_0 \frac{r}{R} \right) - c_2 K_0 \left(k_0 \frac{r}{R} \right) \right] + c_3 & N_0 > 0 \\ \frac{1}{4} c_1 r^2 + c_2 \ln r + c_3 & N_0 = 0 \\ -\frac{R}{k_0} \left[c_1 J_0 \left(k_0 \frac{r}{R} \right) + c_2 Y_0 \left(k_0 \frac{r}{R} \right) \right] + c_3 & N_0 < 0 \end{cases} \quad (2.11)$$

avec c_1 , c_2 et c_3 des constantes déterminées par les conditions aux limites des équations et les conditions à l'interface des deux zones [3].

Les équations établies sont valables pour la zone centrale circulaire et la zone annulaire mais leur expression dépend du type de contraintes. C'est pourquoi, il est intéressant

de voir le signe des contraintes pour les micromembranes fabriquées. Le tableau 2.2 présente les propriétés des matériaux utilisés pour la fabrication des structures. Il tient aussi compte de la contrainte du silicium monocristallin présent sur un SOI.

Matériau	Rayon (μm)	épaisseur h_i (μm)	Module de Young E_i (Gpa)	Coefficient de Poisson ν_i	Contrainte plan σ_i (MPa)
Platine [11] (électrode supérieure)	R_1	0.14	145	0.35	500
PZT 54/46 [12,13]	R_1	0.95	96	0.45	100-800
Platine [11] (électrode inférieure)	R_1	0.15	145	0.35	500
Oxyde thermique [14]	R_2	0.25	70	0.17	-260
Silicium (SOI) [15]	R_2	1.75-7.85	169	0.3	-15

Tableau 2.2 : propriétés des matériaux utilisés pour la fabrication des micromembranes et repris dans le modèle analytique développé.

L'utilisation des données du tableau permet le calcul de la contrainte initiale (équation (2.3)) pour la partie circulaire centrale composée de cinq couches (avec $R_1 = 75 \mu\text{m}$) et pour la partie annulaire bicouche (avec $R_2 = 200 \mu\text{m}$) :

$$N_{01} = 338.3 \text{ N/m} \quad \text{et} \quad N_{02} = -91.7 \text{ N/m}$$

Ainsi, ce calcul met en évidence que pour la partie centrale circulaire, la contrainte résultante de l'empilement des cinq couches est en tension alors que celle de la partie annulaire est en compression, permettant de déterminer l'équation pour le profil statique vertical des structures. Or, comme il a été vu, une contrainte en compression peut induire un comportement mécanique de flambement. Dans le cas des micromembranes fabriquées, le flambement des structures apparaît si la force radiale compressive résultante à l'encastrement $N_r(R_2)$ est supérieure à la force critique $N_r(R_2)_{cr}$. Comme les équations du modèle utilisent les mêmes équations que pour l'analyse linéaire du flambement, la force critique peut être calculée. Elle a été déterminée par Timoshenko pour une plaque circulaire monocouche encastree avec un trou au milieu [16]. Cette relation a été étendue dans le cas d'un empilement multicouche et donne :

$$N_r(R_2)_{cr} = k \frac{D_2}{R_2^2} \quad (2.12)$$

où k est un facteur numérique dépendant du rapport R_1/R_2 . La valeur de k a été déterminée pour différentes valeurs du rapport et un coefficient de Poisson de 0.3. D_2 est le coefficient équivalent de rigidité : $D_2 = D_{11} - B_{11}^2/A_{11}$, avec D_{11} , B_{11} et A_{11} les coefficients première ligne, première colonne, des matrices $[D]$, $[B]$ et $[A]$ respectivement.

Les équations du flambement étant établies, il est intéressant de connaître le point de flambement de micromembranes. D'après l'équation (2.12), deux paramètres, dans notre cas, influent principalement sur les effets de flambement : le rapport R_1/R_2 et l'épaisseur du silicium h_{Si} . Comme les travaux portent sur les structures avec un rayon R_2 de $200 \mu\text{m}$ et un rapport R_1/R_2 de 0.375, l'étude a été faite pour différentes valeurs de l'épaisseur de silicium. Après la détermination du facteur k [16], la force radiale résultante à l'encastrement de la micromembrane non-polarisée $N_r(R_2)$ (équation (2.9)) et la force critique (équation (2.12)) ont été calculées et les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2.12. D'après ce graphique, il a pu être déterminé que le point de flambement est obtenu pour une épaisseur de silicium de

1.82 μm et que les structures seront flambées si l'épaisseur est inférieure à ce point critique. Ce premier résultat est en accord avec les micromembranes fabriquées puisqu'il a été vu qu'à cause de l'étape de gravure, l'épaisseur réelle des structures varie de 1.75 μm à 1.85 μm . Cette étude permet ainsi de caractériser l'origine mécanique quantitative du flambement des micromembranes.

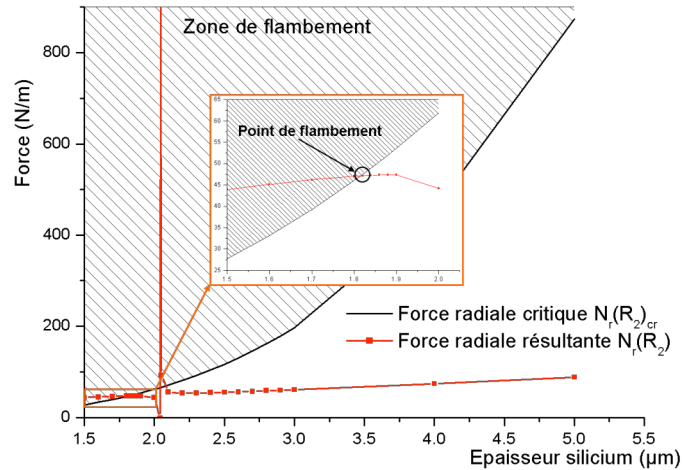


Figure 2.12 : Détermination du point de flambement d'une micromembrane où $R_1 = 75 \mu\text{m}$ et $R_2 = 200 \mu\text{m}$ en fonction de l'épaisseur de silicium.

II.3.3 Validation du modèle analytique

Afin de vérifier la validité du modèle analytique, une comparaison avec la modélisation par éléments finis a été effectuée. Les éléments finis ne tenant pas compte des effets mécaniques tels que le flambement, les cas d'étude se situent en-dehors de la zone de flambement. En accord avec la figure 2.12, une épaisseur de silicium de 4 μm a été choisie. Les structures simulées correspondent à celles fabriquées. Une membrane circulaire composée d'un empilement de silicium et de dioxyde de silicium de rayon R_2 ($R_2 = 200 \mu\text{m}$) et de trois couches supplémentaires (Platine – PZT – Platine) de rayon $R_1 = 75 \mu\text{m}$ a été simulée. Pour simplifier le modèle, le dioxyde de silicium de passivation est positionné au-dessus de l'oxyde thermique et les couches de titane ont été négligées, étant donnée leur faible épaisseur. Les propriétés de chacune des couches sont résumées dans le tableau 2.2.

La structure a été modélisée par éléments finis en utilisant le logiciel CoventorwareTM 2005. Afin de réduire les temps de calcul, la symétrie circulaire permet d'établir un modèle basé sur un quart de membrane. Environ 35000 éléments tétraédriques paraboliques ont été utilisés, leur nombre dépendant de la taille de la structure. Pour la validation du modèle analytique, deux cas d'études ont été pris en compte. Le premier concerne l'influence de la contrainte initiale du film piézoélectrique sur la déflexion verticale de la membrane (cas réel puisque la contrainte du PZT dépend de la technique de dépôt et de cristallisation) alors que le second permet l'étude du comportement de la structure pour différents rapports R_1/R_2 . Tout d'abord, comme le montre la figure 2.13a), l'effet de la contrainte en tension du PZT est présenté pour un rapport R_1/R_2 de 0.375 et 0.6. La déflexion verticale a été mesurée au centre $w(0)$ et les résultats obtenus montrent un comportement similaire entre les deux méthodes de simulation puisque l'erreur est inférieure à 2%. Des résultats comparables ont aussi été obtenus pour différents rapports R_1/R_2 , notamment pour $R_1/R_2 < 0.7$ (cf. figure 2.13b)). Les

mesures divergent au-delà de cette valeur à cause de la moyenne des contraintes calculées pour le modèle analytique, l'influence de l'empilement de cinq couches augmentant avec le rapport. Néanmoins, l'erreur inférieure à 5% pour $R_1/R_2 < 0.7$ confirme la cohérence des équations analytiques établies pour le comportement statique de membranes et valide le modèle pour des structures non-flambées.

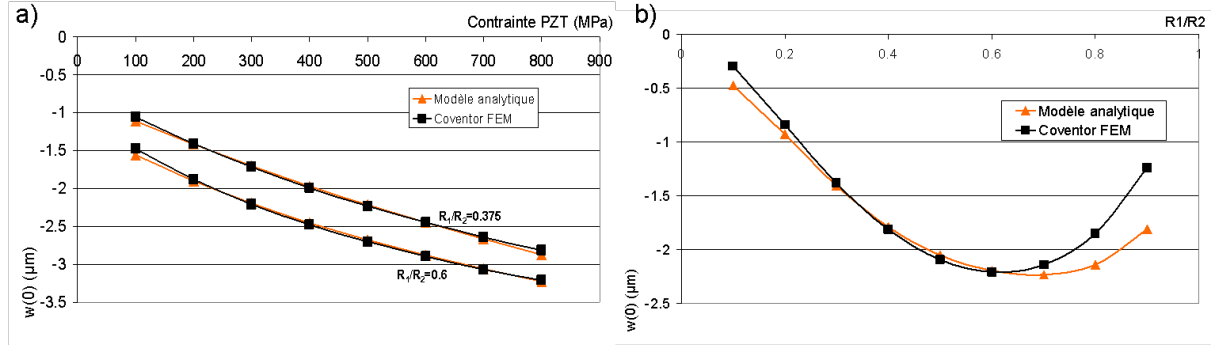


Figure 2.13 : Comparaison de simulations obtenues par le modèle analytique développé et par éléments finis (CoventorwareTM) pour une micromembrane où $R_2 = 200 \mu\text{m}$. a) Influence de la contrainte en tension du PZT sur la déflexion verticale au centre de deux micromembranes où $R_1/R_2 = 0.375$ et 0.6 . b) Influence du rapport R_1/R_2 sur la déflexion verticale au centre d'une micromembrane où $\sigma_{PZT} = 300 \text{ MPa}$.

C'est ainsi que le modèle analytique a permis l'étude du comportement des structures en flambement. Conformément au point de flambement, la déflexion verticale au centre a été calculée pour une épaisseur de silicium inférieure à $1.82 \mu\text{m}$ et pour une structure équivalente aux membranes fabriquées, c'est-à-dire un rapport R_1/R_2 de 0.375 avec $R_2 = 200 \mu\text{m}$. Les résultats, présentés sur la figure 2.14, sont en accord avec le point de flambement d'après la valeur de déflexion au centre $w(0)$ et comme le montre l'insert de cette figure, la structure est flambée. Ainsi, le modèle analytique établi permet la calibration initiale statique des membranes fabriquées avant d'étudier l'influence de la tension de polarisation sur le comportement.

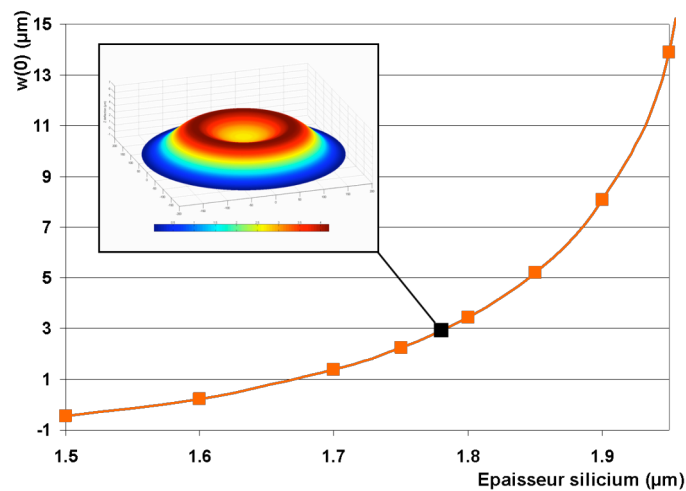


Figure 2.14 : Influence de l'épaisseur de silicium sur la déflexion au centre d'une micromembrane en état de flambement avec $R_1 = 75 \mu\text{m}$ et $R_2 = 200 \mu\text{m}$. L'insert montre un profil d'une membrane en 3 dimensions obtenu avec le modèle analytique.

II.4 De la caractérisation statique des micromembranes à la détermination du coefficient piézoélectrique d_{31}

II.4.1 Comportement statique des micromembranes

Comme il a été vu en introduction de cette section, les contraintes générées par l'ajout successif de couches induisent un état de flambement des micromembranes fabriquées. Afin d'étudier leur comportement statique ($R_1/R_2 = 0.375$ avec $R_2 = 200 \mu\text{m}$), il est intéressant de caractériser l'influence de la tension de polarisation statique de la couche piézoélectrique sur la déflexion verticale. En effet, même si la finalité du fonctionnement des structures est dynamique, une polarisation statique est imposée et l'oscillation intervient autour de cette tension. L'optimisation de ce paramètre pour un comportement statique performant des membranes est donc d'intérêt.

Les équations constitutives de la piézoélectricité liant l'élongation (ϵ) au champ électrique (E) (effet piézoélectrique inverse) sont données par :

$$\begin{bmatrix} \epsilon_{xx} \\ \epsilon_{yy} \\ \epsilon_{zz} \\ \epsilon_{yz} \\ \epsilon_{zx} \\ \epsilon_{xy} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{21} & d_{31} \\ d_{12} & d_{22} & d_{32} \\ d_{13} & d_{23} & d_{33} \\ d_{14} & d_{24} & d_{34} \\ d_{15} & d_{25} & d_{35} \\ d_{16} & d_{26} & d_{36} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad (2.13)$$

L'équation (2.13) montre que dans le cas d'un champ vertical E_z , seuls les paramètres piézoélectriques d_{3x} auront une influence sur la déformation du matériau. Dans le cas d'une couche piézoélectrique libre, l'effet des coefficients piézoélectriques se traduira par une déformation équivalente selon la direction indiquée. De manière générale, dans le cas du PZT, seuls les paramètres d_{31} ($= d_{32}$) et d_{33} sont suffisamment élevés pour déformer la couche, d'après la forme des structures. d_{31} traduit une déformation transverse au champ alors que d_{33} déforme le matériau parallèlement au champ E_z . Dans le cas de PZT dont une des faces n'est pas libre, l'effet d'un champ vertical se traduira par une déformation dans l'épaisseur du matériau (paramètre d_{33}) mais surtout par la création d'un moment de rotation, par l'intermédiaire du coefficient d_{31} , comme représenté sur la figure 2.15. Ainsi, une tension de polarisation de la couche piézoélectrique induit la déflexion de la membrane, permettant aussi son actionnement, si une tension alternative y est superposée. L'influence de la polarisation statique a donc été étudiée pour déterminer son optimum et obtenir un coefficient d_{31} maximum.

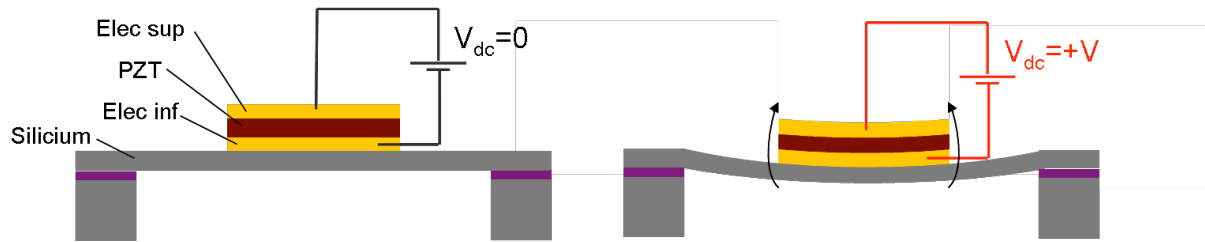


Figure 2.15 : Représentation de l'influence de la tension de polarisation de la couche piézoélectrique sur la déflexion statique d'une membrane.

La caractérisation statique des micromembranes a été faite grâce à un interféromètre optique double faisceau de la société Fogale. L'utilisation de cette technique permet la mesure quantitative de profils des structures avec une précision verticale de 0.1 nm [17]. Ainsi, l'influence de la tension de polarisation sur la déflexion a pu être étudiée. Après avoir polarisé le film piézoélectrique à +18 V pendant 15 minutes afin d'orienter les dipôles du PZT, la tension de polarisation a été modifiée par pas de 1 V de +18V à -18 V dans les deux sens. Les mesures ont été faites une minute après avoir changé la tension pour tenir compte de la stabilisation des structures pour la nouvelle valeur de tension, sous l'effet de la piézoélectricité rémanente. Après la mesure, la valeur de tension était maintenue jusqu'à ce qu'un état d'équilibre soit atteint. Comme le montre la figure 2.16, la déflexion de la membrane au centre change avec la tension V_{dc} . Les résultats présentés concernent la zone centrale d'une micromembrane comprise entre $-R_1$ et $+R_1$ (zone circulaire contenant la pastille piézoélectrique). De ces courbes résultent deux comportements : en partant de +18 V, la diminution de la tension provoque une diminution de la déformation, jusqu'à une tension de -4 V alors qu'au-delà de cette valeur, la déformation augmente avant d'atteindre, à -18 V, un profil proche de celui de +18 V.

Le tracé de la déflexion au centre (par rapport au substrat) pour les différents cycles est présenté sur la figure 2.17. Cette courbe montre une forte variation de la déflexion sous la forme d'un cycle d'hystérésis avec deux valeurs maximales atteintes pour -4 V et +5 V. Ces valeurs correspondent aux valeurs du champ coercitif pour le PZT 54/46 [18] qui correspond au point de non-polarisation du film piézoélectrique. Les mesures de déflexion sont ainsi proches, en ces points, de celles de la structure non-polarisée. La différence provient de la création d'une polarisation interne du film pendant la fabrication changeant légèrement la déflexion de la structure non-polarisée. Cependant, les valeurs proches indiquent qu'après une bonne orientation des domaines piézoélectriques pour les fortes valeurs de potentiel, les changements d'orientation dans les valeurs plus faibles induisent une relaxation du film de PZT. Cette relaxation se poursuit jusqu'à ce qu'une valeur maximum de déflexion soit atteinte, correspondant au même comportement que le film non-polarisé, qui est l'état de non-déplacement piézoélectrique. Cette étape de caractérisation, au-delà de la compréhension du comportement statique, a également servi de base à la détermination du coefficient piézoélectrique d_{31} .

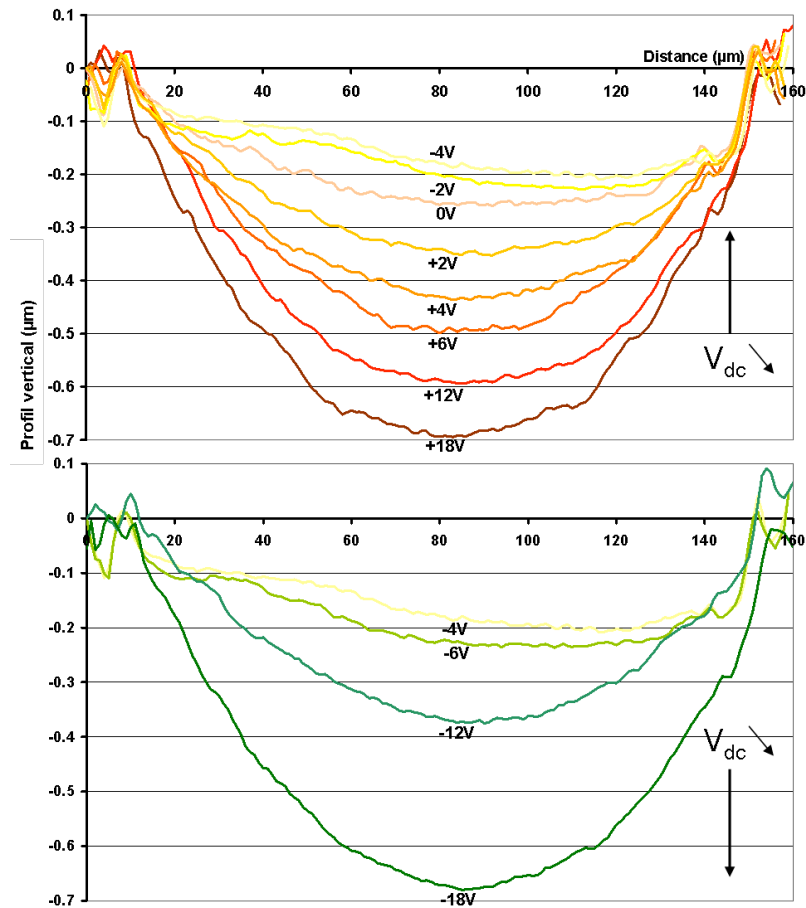


Figure 2.16 : Influence de la tension de polarisation de la couche de PZT sur la déflexion de la partie centrale d'une micromembrane (zone comprise entre $-R_1$ et $+R_1$) mesurée par interférométrie optique double faisceau.

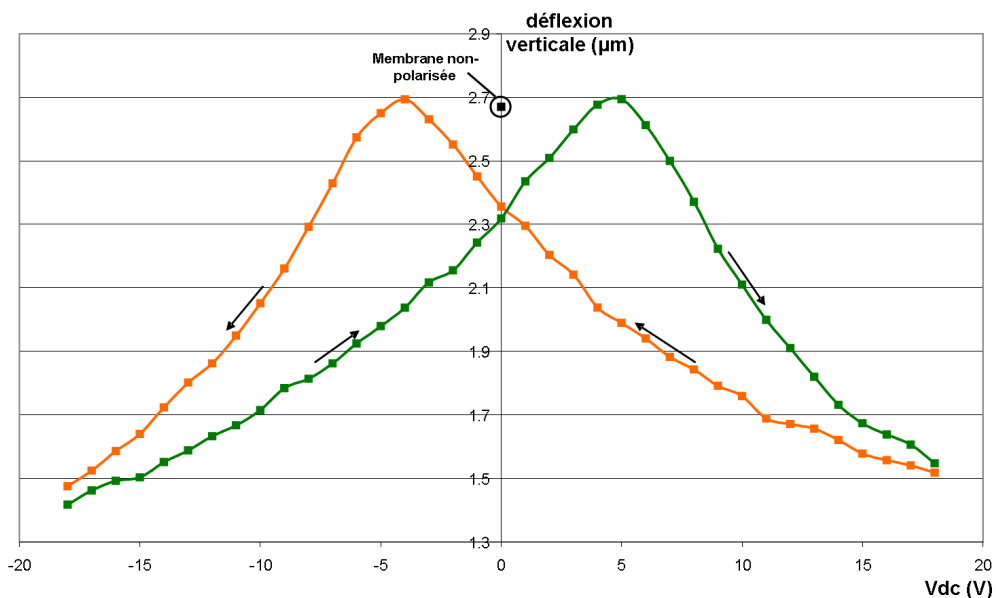


Figure 2.17 : Récapitulatif de l'influence de la tension de polarisation de la couche de PZT sur la déflexion au centre (par rapport au substrat) d'une micromembrane où $R_1 = 75 \mu\text{m}$ et $R_2 = 200 \mu\text{m}$ mesurée par interférométrie optique double faisceau.

II.4.2 Etude du coefficient piézoélectrique transverse d_{31} du PZT

Comme il a été vu, la connaissance du coefficient piézoélectrique transverse d_{31} est importante car c'est par l'intermédiaire de ce paramètre qu'est traduite l'efficacité de la mise en mouvement des micromembranes. Or, il n'existe pas de méthode générique pour sa détermination. Une technique, dite par flexion du substrat, a été utilisée pour la mesure des charges générées par la couche lorsque celui-ci est soumis à une pression. Mais cette technique ne tient pas compte de la structuration de la couche puisque le calcul du d_{31} est fait sur une couche entière déposée sur le substrat [19]. D'autres équipes ont utilisé des leviers millimétriques et la détermination du coefficient a été faite soit par l'intermédiaire de l'effet direct, par la mesure des charges générées lors d'un actionnement externe [8,18], soit par l'effet inverse, en mesurant la déflexion du levier lors de l'actionnement de la couche piézoélectrique [20]. Les deux dernières méthodes tiennent compte de l'usinage de la couche de PZT, influant sur le coefficient d_{31} . Il n'y a cependant pas d'étude des propriétés du matériau piézoélectrique à l'échelle micronique, le changement d'échelle du macro au micro pouvant les modifier. C'est pourquoi, l'obtention du coefficient piézoélectrique transverse sur un matériau structuré aux échelles micrométriques est intéressante.

L'aspect générique du modèle analytique développé offre la possibilité de déterminer un paramètre si les autres sont connus. Ainsi, la corrélation entre le modèle et les mesures expérimentales vont permettre de remonter à ce paramètre. En effet, les valeurs de déflexion initiales obtenues avec le modèle sont proches de celles mesurées sur les structures non-polarisées. Les valeurs du modèle varient entre 2.3 μm et 5 μm dans la zone d'épaisseur des membranes fabriquées (entre 1.75 μm et 1.85 μm) alors que la valeur de déflexion réelle des structures est de 2.68 μm . Ainsi, par ajustement des paramètres géométriques du modèle, la valeur de la déflexion initiale des membranes a pu être calibrée. La corrélation entre la théorie et l'expérience est satisfaisante puisqu'une modification de moins de 10 % des paramètres initiaux des matériaux a suffi à la concordance des valeurs de déflexion. Ce résultat indique que le modèle analytique est représentatif du comportement statique des micromembranes en flambement et valide sa modification pour le calcul du coefficient d_{31} à partir des mesures. Les mesures de la déflexion des membranes pour de faibles variations de la tension de polarisation, permettant la mesure de l'état piézoélectrique rémanent, servent ainsi de paramètres d'entrée pour le modèle. Cette méthode de détermination est possible puisque le modèle analytique tient compte des contraintes induites par la polarisation du film piézoélectrique.

A partir des profils de déflexion obtenus avec le modèle analytique, la modification de l'équation (2.11) pour une variation Δw de la déflexion statique au centre induite par une faible variation ΔV de la tension de polarisation donne un calcul direct du coefficient d_{31} :

$$d_{31} = \frac{\Delta w}{\Delta V} \frac{1}{K} \quad (2.14)$$

où K est une constante numérique déterminée par la déflexion statique de la structure non-polarisée, dont la détermination a été effectuée lors de la calibration du modèle.

Ce sont ensuite les mesures de déflexion effectuées par interférométrie, par pas de 1V, qui sont insérées dans l'équation (2.14) pour le calcul de d_{31} pour chaque valeur de polarisation. La figure 2.18 montre la courbe obtenue du coefficient piézoélectrique transverse d_{31} en fonction de la tension de polarisation du film PZT 54/46 structuré, dans la gamme comprise en -18 V et + 18 V. Les mesures ont été répétées sur trois membranes fabriquées de

rayon $R_2 = 200 \text{ } \mu\text{m}$ et $R_1/R_2 = 0.38$. D'après cette figure, une certaine forme de cycle d'hystérésis a pu être mise en évidence. Les valeurs de d_{31} montrent une forte dépendance avec la tension appliquée avec une large gamme, allant de 30 pm/V (en valeur absolue) pour les hautes valeurs de potentiel jusqu'à 75 pm/V autour de $\pm 8 \text{ V}$, en fonction du sens où le potentiel est appliqué. De telles variations du coefficient d_{31} sont certainement dues à une rotation non-axiale des domaines piézoélectriques tels qu'une réorientation des domaines perpendiculaires, s'ajoutant au mouvement des grains. Il est aussi important de noter que le d_{31} atteint une valeur de 0 pm/V quand la tension de polarisation est proche de -4 V et $+5 \text{ V}$, correspondant aux valeurs du champ coercitif. Ces résultats sont en accord avec la valeur de déflexion maximale qui a été démontrée comme étant le point de non-déplacement piézoélectrique. Les valeurs obtenues coïncident avec celles trouvées dans la littérature [7,17-19] et un tel cycle a déjà été mesuré pour le coefficient piézoélectrique d_{33} [4], validant le comportement d'un film de PZT usiné avec réduction de taille de l'échelle millimétrique à l'échelle micrométrique. L'influence importante de la tension de polarisation sur la valeur du coefficient d_{31} permet d'en déterminer une valeur pour une optimisation de l'efficacité d'actionnement, en vue d'une utilisation des micromembranes en mode dynamique.

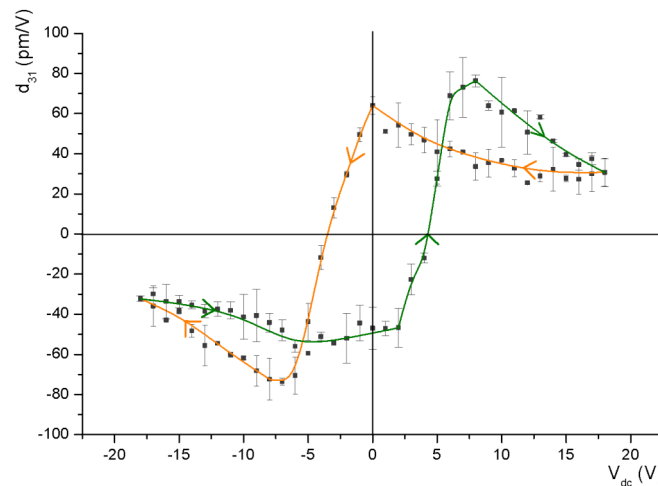


Figure 2.18 : Influence de la tension de polarisation de la couche piézoélectrique sur le coefficient piézoélectrique transverse d_{31} .

II.5 Conclusion

L'achèvement de la fabrication parallèle permet de réaliser 160 puces par plaque de 10 cm de diamètre où, même si les rendements sont encore faibles (environ 10%), les structures présentent l'avantage d'une fiabilité intéressante. Le développement d'un modèle robuste devient alors nécessaire pour une caractérisation fine, la plupart des modèles existants n'étant pas assez proches de la réalité. C'est ainsi que le modèle statique construit a permis la compréhension du comportement initial des micromembranes, mais servira aussi pour appréhender la fabrication de lots futurs. C'est aussi grâce à ce modèle que des propriétés de la couche piézoélectrique ont pu être déterminées, et ont permis de valider l'intégration du PZT aux échelles micrométriques. Enfin, la correspondance entre le niveau théorique et expérimental offre une caractérisation de l'influence du potentiel statique sur le comportement des membranes, l'importance de ce travail venant de la finalité d'utilisation des micromembranes, le comportement dynamique étant directement influencé par le comportement statique.

Références

- [1] M. Guirardel, *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré: détection de l'adsorption de nanoparticules d'or*, thèse, spécialité Conception de Circuits Microélectroniques et Microsystèmes, Toulouse (2003).
- [2] L. Nicu, M. Guirardel, F. Chambosse, P. Rougerie, S. Hinh, E. Trevisiol, J-M. Francois, J-P. Majoral, A-M. Caminade, E. Cattan, C. Bergaud, *Sens. Actuators B*, 110(1) (2005), 125.
- [3] G. Wang, B. V. Sankar, L. N. Cattafesta, M. Sheplak, *Proceedings of the ASME International Mechanical Engineering Congress* (2002).
- [4] R. Herdier, D. Jenkins, E. Dogheche, D. Remiens, M. Sulc, *Rev. Sci. Instrum.*, 77 (2006), 093905.
- [5] B. Jaffe, W. Cook, H. Jaffe, *Piezoelectric ceramics* (1971), Academic, New-York.
- [6] S. P. Timoshenko, S. W. Krieger, *Theory of plates and shells* (1959), McGraw-Hill, New-York.
- [7] M. Sheplak, J. Dugundji, *J. Applied Mch.*, 65 (1998), 107.
- [8] M-A. Dubois, P. Muralt, *Sens. Actuators A*, 77 (1999), 5810.
- [9] S. A. N. Prasad, B. V. Sankar, L. N. Cattafesta, S. Horowitz, Q. Gallas, M. Sheplak, *Proceedings of the AIAA Structures, Structural dynamics and Materials Conference* (2002).
- [10] L. Yao, L. Lu, Z. Wang, W. Zhu, Y. Dai, *IEEE T. Ultrason. Ferr.*, 50 (2003), 1262.
- [11] V. Branger, V. Pelosin, K. F. Badawi, P. Goudeau, *Thin solid films*, 275 (1996), 22.
- [12] E. Zakar, M. Dubey, R. Polcawich, B. Piekarski, R. Piekarz, J. Conrad, R. Widuta, *Proceedings of the MRS Fall Meeting* (1999).
- [13] P. Delobelle, O. Guillon, E. Fribourg-Blanc, C. Soyer, E. Cattan, D. Remiens, *Appl. Phys. Lett.*, 85 (2004), 5185.
- [14] M. T. Kim, *Thin solid films*, 283 (1996), 12.
- [15] J. Dolbow, M. Gosz, *Mech. Mater.*, 23 (1996), 311.
- [16] S. P. Timoshenko, J. M. Gere, *Theory of elastic stability* (1963), McGraw-Hill, New-York.
- [17] A. Bosseboeuf, J. P. Gilles, K. Danaie, R. Yahiaoui, M. Dupeux, J. P. Puissant, A. Chabrier, F. Fort, P. Cotes, *Proceedings of the SPIE Microsystems, Metrology and Inspection Congress* (1999).
- [18] E. Cattan, T. Haccart, D. Remiens, *J. Appl. Phys.*, 86 (1999), 7017.
- [19] J. F. Shepard, F. Chu, I. Kanno, S. Trolier-McKinstry, *J. Appl. Phys.*, 85 (1999), 6711.
- [20] I. Kanno, H. Kotera, K. Wasa, *Sens. Actuators A*, 107 (2003), 68.

CHAPITRE III : Caractérisation dynamique de micromembranes dans l'air et en milieu liquide

III.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, les résultats obtenus ont permis la caractérisation statique des micromembranes fabriquées comme une première phase d'optimisation de leur comportement. Or, la finalité des structures étant leur utilisation en tant que biocapteur de masse, c'est par le fonctionnement dynamique que seront obtenues les caractéristiques telles que la gamme de fréquence d'opération, la sensibilité massique et la masse minimum détectable. C'est pourquoi, après la caractérisation dynamique des membranes dans l'air, un intérêt particulier sera porté sur leur comportement en milieu liquide. En effet, l'amortissement provoqué par le fluide peut nettement réduire les performances des structures, notamment à cause d'un facteur de qualité atténué. Un des objectifs de ce chapitre est donc de montrer le potentiel des micromembranes pour la détection sensible en milieu liquide. Un autre objectif est de déterminer les caractéristiques des structures, à la fois de manière théorique mais aussi expérimentale. Les structures utilisées pour l'optimisation dynamique expérimentale sont celles issues du lot de génération 3 alors que la calibration est faite sur les micromembranes de génération 4, connectées à une électronique spécifique aux structures. Cependant, pour appréhender le comportement dynamique des structures dans l'air et en milieu liquide, un modèle analytique simple a d'abord été développé.

III.2 Considérations théoriques pour le comportement dynamique dans l'air et en milieu liquide

III.2.1 Modélisation analytique dans l'air

La modélisation analytique dans l'air de structures résonantes a été établie pour une membrane libre multicouche, non-contrainte, comprenant une zone centrale circulaire et une zone en périphérie annulaire. Dans ce cas, l'épaisseur est faible par rapport aux dimensions latérales de la structure et peut donc être négligée. Le comportement dynamique est régi par l'équation du mouvement qui, en coordonnées polaires, donne :

$$D_2 \left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} \right) \times \left(\frac{\partial^2 w}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial w}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 w}{\partial \theta^2} \right) + \rho_M h_M \frac{\partial^2 w}{\partial t^2} = 0 \quad (3.1)$$

où D_2 est le coefficient de rigidité défini dans le chapitre II (équation (2.12)), ρ et h correspondant à la densité et l'épaisseur moyennes de l'empilement multicouche, respectivement. La résolution de cette équation différentielle aboutit à l'expression littérale de la fréquence de résonance :

$$f_n = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_{eff,n}}{m_{eff,n}}} \quad (3.2)$$

où $k_{eff,n}$ représente la raideur effective de la structure et $m_{eff,n}$ sa masse effective pour le mode de vibration d'ordre n . Dans le cas d'une membrane circulaire multicouche, les expressions de la raideur et la masse effective ont été déterminées par la résolution de l'équation 3.1 et donnent :

$$k_{eff,n} = \sum_i D_{eq,i} \iint_{r_i} \left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} \phi_{mn}(r, \theta) \right)^2 r \partial r \partial \theta \quad (3.3)$$

$$m_{eff,n} = \sum_i \left(\sum_j \rho_j h_j \iint_{r_i} \phi_{mn}(r, \theta)^2 r \partial r \partial \theta \right) \quad (3.4)$$

Ces paramètres dépendent de la forme du mode $\phi_{mn}(r, \theta)$ qui a été établie par résolution de l'équation caractéristique et vaut, pour une structure circulaire de rayon global R_2 :

$$\phi_{mn}(r, \theta) = \left[J_m \left(\frac{\lambda_{mn}}{R_2} r \right) - \frac{J_m(\lambda_{mn})}{I_m(\lambda_{mn})} I_m \left(\frac{\lambda_{mn}}{R_2} r \right) \right] \cos(m\theta) \quad (3.5)$$

où J_m et I_m représentent la fonction de Bessel du premier type et d'ordre m et la fonction modifiée du second type et d'ordre m , respectivement. λ_{mn} correspond aux valeurs propres de l'équation caractéristique et leur résolution numérique donne, pour les trois premiers modes : $\lambda_{0I}^2 = 10.22$, $\lambda_{1I}^2 = 21.26$, $\lambda_{2I}^2 = 34.88$ [1].

Comme il a été vu en introduction, le modèle établi ne tient pas compte des contraintes initiales des matériaux et donc, de la déformée statique des structures. Or, les micromembranes issues du lot de génération 3 présentent une déflexion non-nulle, en état d'équilibre de flambement. Le modèle dynamique établi sera ainsi difficilement applicable à ces structures. Par contre, le respect des côtes géométriques des membranes fabriquées lors du lot de génération 4 induit une déflexion initiale quasi-nulle, rendant possible l'utilisation du modèle. C'est ainsi qu'au-delà de la validation du comportement fréquentiel des membranes, le modèle établi permet la détermination de la sensibilité massique et la masse minimum détectable, paramètres caractéristiques d'un biocapteur.

La sensibilité massique est définie par le rapport entre la variation de fréquence de résonance et la variation de masse induisant le changement de fréquence (dans le cas d'une constante de raideur maintenue constante) :

$$S_n = \frac{\partial f_n}{\partial m} \quad (3.6)$$

En dérivant l'équation (3.2), l'expression de la sensibilité (3.6) devient :

$$S_n = -\frac{1}{2} \frac{f_n}{m_{eff,n}} \quad (3.7)$$

Ainsi, la sensibilité massique d'un résonateur oscillant au mode de vibration d'ordre n est définie par le rapport entre sa fréquence de résonance du mode et sa masse effective.

En ce qui concerne la masse minimum détectable, l'équation décrite pour ce paramètre au chapitre I (équation (1.6)) a été établie en considérant que la masse ajoutée correspond à un changement de fréquence de résonance égal à la demi-largeur du pic à mi-hauteur (comme définie de manière empirique par M. Roukes [2]), soit :

$$f_n \rightarrow (f_n + \partial f_n) \text{ où } \partial f_n \propto \frac{f_n}{2Q} \quad (3.8)$$

La détermination de la masse minimum détectable dépend donc du facteur de qualité Q et est estimée par :

$$\partial M_{\min} \approx \left(\frac{\partial f_n}{\partial M_{\text{eff},n}} \right)^{-1} \partial f_n \propto |S_n|^{-1} \frac{f_n}{2Q} \quad (3.9)$$

où S_n correspond à la sensibilité massique précédemment établie. Le facteur de qualité Q , capital pour la masse minimum détectable, s'avère difficilement calculable théoriquement dans le cas de membranes circulaires. Dans la littérature, les travaux de J. Sader [3] ont permis d'établir une fonction régissant le facteur de qualité de microleviers résonants et l'expression établie peut difficilement être extrapolée dans le cas de structures circulaires, multicouches. Etant donnée la simplicité du modèle, ce qui en fait une force, le facteur de qualité sera pris par rapport aux valeurs mesurées sur les micromembranes fabriquées.

L'ensemble du modèle établi a permis de caractériser de manière théorique des micromembranes circulaires possédant les propriétés des structures fabriquées lors du lot de génération 4, c'est-à-dire un rayon R_1 de 50 μm pour un rayon global R_2 égal à 100 μm . Les résultats obtenus donnent une fréquence de résonance pour le mode fondamental (0,0) $f_0 = 502.7$ kHz, une sensibilité massique $S_0^{-1} = -15.7$ pg/(mm².Hz) (ramenée par unité de surface pour faciliter la comparaison avec d'autres techniques) et une masse minimum détectable $M_{\min} = 593.2$ pg. Le calcul de la masse minimum détectable a été fait pour un facteur de qualité de 209 (valeur déterminée expérimentalement dans l'air). Ce premier résultat, théorique, montre une sensibilité massique plutôt élevée des structures, dont la comparaison expérimentale sera présentée ultérieurement dans ce chapitre.

L'établissement d'un modèle analytique simple a permis d'appréhender le comportement dynamique dans l'air des micromembranes fabriquées. Cependant, même si l'expression de la sensibilité massique et la masse minimum détectable restent valables quelque soit le milieu environnant, le calcul de la fréquence de résonance diffère selon l'environnement dans lequel les structures oscillent. C'est pourquoi, nous avons établi un modèle permettant l'expression de la fréquence de résonance des membranes en milieu liquide.

III.2.2 Modélisation analytique dans un fluide newtonien

La présence d'un fluide sur une structure vibrante induit une déformation du liquide et impose ainsi une masse ajoutée et des forces d'amortissement sur la structure. L'effet de la masse ajoutée se traduira par une diminution de la fréquence de résonance par rapport à l'air avec un amortissement de la structure augmenté. H. Lamb a proposé en 1920 un modèle analytique pour estimer la variation de fréquence de résonance d'une membrane circulaire lors

du passage du vide à un fluide [4]. Ce modèle a été établi pour une structure monocouche dont une face est en contact avec le fluide, le volume de liquide étant considéré infini. Pour étendre ce modèle aux micromembranes fabriquées, considérons tout d'abord une expression simplifiée de la forme du premier mode de vibration, obtenue à partir de l'équation (3.5):

$$w(r,t) = C(t) \left(1 - \frac{r^2}{R_2^2} \right)^2 \quad (3.10)$$

où R_2 est le rayon global de la membrane et $C(t)$ est une fonction dépendante du temps uniquement.

Le modèle établi utilise une approche énergétique, nécessitant donc le calcul de l'énergie cinétique T et potentielle V dans le vide. L'expression de ces deux énergies donne :

$$T_{vide} = \frac{\pi \rho_M h_M R_2^2}{10} \left(\frac{\partial C}{\partial t} \right)^2 \quad (3.11)$$

$$V_{vide} = \frac{8\pi E h_M^3}{9(1-\nu) R_2^2} \quad (3.12)$$

où ρ_M est la densité globale de la membrane, h_M son épaisseur globale, E est le module de Young moyen de l'empilement et ν le coefficient de Poisson.

Pour l'établissement du modèle, l'énergie cinétique du fluide est aussi nécessaire et donnée par :

$$T_{liq} = 0.21 \rho_{liq} R_2^3 \left(\frac{\partial C}{\partial t} \right)^2 \quad (3.13)$$

où ρ_{liq} correspond à la densité du fluide avec lequel la membrane est en contact.

La fréquence de résonance est déterminée par une approche énergétique correspondant à la méthode de Rayleigh-Ritz [5]. Ce principe permet le calcul de la fréquence de résonance d'une structure ayant plusieurs degrés de liberté, en utilisant le rapport entre le maximum des énergies potentielles et cinétiques. Par application de cette méthode, l'expression de la fréquence de résonance d'une membrane circulaire oscillant au premier mode de vibration, en milieu liquide, est donnée par :

$$f_{0,liq} = \frac{f_{0,vide}}{\sqrt{1 + 0.67 \frac{\rho_{liq} R_2}{\rho_M h_M}}} \quad (3.14)$$

Le modèle établi par H. Lamb a été démontré dans le cas d'une structure monocouche isotrope, ce qui n'est pas le cas des membranes fabriquées. Afin de prendre en compte l'aspect multicouche des structures et la présence de deux zones ayant des propriétés différentes, le terme $\rho_M h_M$ a été calculé comme un produit moyen équivalent à l'ensemble de la membrane, telle une monocouche uniforme moyenne, plutôt que de considérer chaque terme séparément. Ainsi, le produit $(\rho h)_M$ a été démontré égal à :

$$(\rho h)_M = \frac{\sum_i \iint_{\theta} \sum_j (\rho_j h_j) r \partial r \partial \theta}{\int_0^{R_2} r \partial r \partial \theta} \quad (3.15)$$

Une fois le modèle établi, plusieurs remarques sur sa validité doivent être prises en compte. Tout d'abord, l'expression de la fréquence de résonance est indépendante de la viscosité du fluide. Or, ce paramètre peut devenir prépondérant dans le cas de valeurs élevées. Il est donc intéressant de montrer la validité du modèle, qui ne dépend que de la densité du liquide, par une comparaison expérimentale. Aussi, comme il a été vu pour le calcul du produit $(\rho h)_M$, il correspond à une valeur moyenne en ramenant le cas réel à un empilement uniforme équivalent. La précision de la comparaison des valeurs calculées par le modèle et expérimentales augmentera donc avec le rapport R_1/R_2 . Enfin, les valeurs de fréquence de résonance dans le vide et dans l'air sont considérées équivalentes [1].

Avant d'approfondir les mesures expérimentales faites sur les micromembranes fabriquées, intéressons nous à la caractérisation des propriétés théoriques des structures issues du lot de génération 4 en milieu liquide. En considérant la valeur de la fréquence de résonance dans l'air, la fréquence de résonance du mode fondamental dans l'eau (de densité $\rho_{\text{eau}} = 997.08 \text{ kg.m}^{-3}$) a été déterminée à : $f_{0,\text{eau}} = 183.9 \text{ kHz}$. La formule de la sensibilité restant valide quelque soit le milieu environnant, elle a été utilisée dans l'eau et équivaut à : $S_{0,\text{eau}}^{-1} = -42.9 \text{ pg}/(\text{mm}^2.\text{Hz})$. Enfin, pour le calcul de la masse minimum détectable, un facteur de qualité de 150 (valeur déterminée expérimentalement dans l'eau) a été choisi donnant une valeur égale à : $M_{\text{min,eau}} = 826.5 \text{ pg}$. D'après les résultats obtenus, nous pouvons remarquer une sensibilité diminuée d'un facteur 3 dans l'eau par rapport à l'air, à cause de la diminution de la fréquence de résonance, et une masse minimum détectable plus élevée, à cause d'un fort amortissement.

Les modèles analytiques établis, que ce soit dans l'air ou en milieu liquide, ont permis dans un premier temps d'appréhender le comportement dynamique des micromembranes fabriquées avant de servir de référence pour la calibration de la sensibilité massique dans l'air, dont la validation expérimentale permet l'estimation d'une sensibilité théorique en milieu liquide. L'étude dynamique expérimentale des micromembranes est ainsi nécessaire pour l'optimisation de leurs caractéristiques (fréquence de résonance, facteur de qualité, sensibilité, masse minimum détectable) dans l'air et dans un fluide.

III.3 Comportement dynamique des micromembranes dans l'air

III.3.1 Principe de mesure des fréquences de résonance

Dans une approche biocapteur de masse utilisant des structures résonantes, l'actionnement et la détection intégrés sont capitales. En effet, de part la bioreconnaissance parallèle et la résolution de la détection, l'utilisation d'actionneurs et de détecteurs externes permet difficilement d'aboutir aux spécifications exigées par le développement d'un biocapteur viable devant fonctionner en milieu liquide. La structuration d'un film piézoélectrique résout l'intégration de l'actionnement et la détection, grâce à la réversibilité de l'effet piézoélectrique. Or, dans les lots de fabrication de génération 1 et 2, seul l'actionnement par la couche de PZT a été achevé. Un premier objectif dans la caractérisation

dynamique des micromembranes du lot de génération 3 concerne donc la démonstration de la faisabilité d'actionnement des structures et de détection des spectres de résonance par la couche piézoélectrique.

Après diverses étapes intermédiaires, les spectres de résonance des structures fabriquées ont pu être caractérisés par l'utilisation d'un analyseur d'impédance HP 4294A. Ce type d'appareillage offre la possibilité d'imposer une tension sinusoïdale à différentes fréquences tout en mesurant le courant généré. Ainsi, les capacités de balayage sur une large gamme de fréquence permettent la mesure de spectre en fréquence qui, dans le cas d'un résonateur, établissent leur spectre de résonance. Les spectres obtenus, typiquement comme celui présenté sur la figure 3.1, correspondent au comportement dynamique de structures présentant un actionnement et une détection intégrés. Tout d'abord, une partie réelle et une partie imaginaire du signal sont mesurées. Cela provient du fait que le courant détecté n'est pas en phase avec la tension d'excitation, se répercutant au niveau de la détection synchrone par la discrimination du spectre selon une partie réelle et une partie imaginaire. Le choix de mesure de l'admittance au lieu de l'impédance provient du mécanisme électrique de l'analyseur d'impédance couplé aux structures, rendant l'admittance directement proportionnelle à la valeur du courant généré, pour une tension constante. Ainsi, la partie réelle de l'admittance Y_r (appelée conductance) correspond à la projection du signal selon l'axe de phase nulle, alors que la partie imaginaire Y_i (appelée susceptance) correspond à la projection selon l'axe de phase à 90° . Un autre élément caractéristique du spectre est la dépendance du signal avec la fréquence, hors de la fréquence de résonance. Ce comportement est dû à la détection piézoélectrique intégrée qui ajoute une capacité parallèle parasite, influant sur le courant généré de manière linéaire avec la fréquence ($I \propto Cf$). Ce premier résultat traduit néanmoins la faisabilité de l'actionnement des micromembranes par la pastille piézoélectrique (effet inverse), ainsi que la détection des fréquences de résonance par la même couche (effet direct).

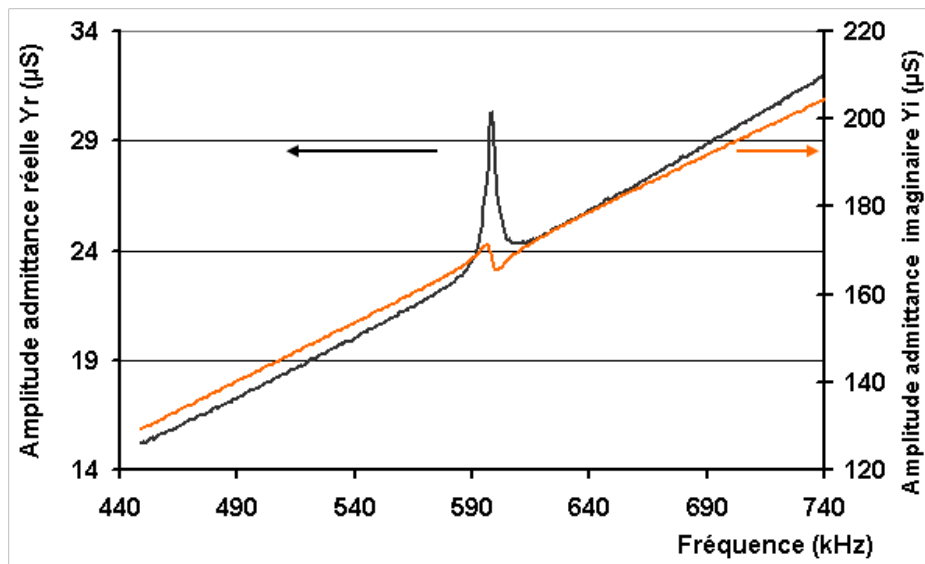


Figure 3.1 : Spectre de résonance typique mesuré par un analyseur d'impédance HP 4294A sur une micromembrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$, $V_{dc} = -4 \text{ V}$ et $V_{ac} = 100 \text{ mV}$. V_{dc} et V_{ac} représentent respectivement le potentiel statique et l'amplitude d'oscillation d'actionnement des membranes.

La caractérisation dynamique des micromembranes du lot de génération 3 offre une variété de fréquence de résonance et de facteur de qualité. Comme le montre le tableau 3.1,

selon le rayon de la pastille piézoélectrique R_1 et le rayon global de la membrane R_2 , les fréquences de résonance dans l'air s'échelonnent de 270 kHz à 750 kHz. De même, une gamme de facteur de qualité allant de 86 à 359 a pu être mesurée. Il est tout d'abord important de noter que les membranes de rayon global R_2 égal à 100 μm donnent des valeurs de fréquence de résonance et de facteur de qualité supérieures à celles de 200 μm . Un autre élément caractéristique du comportement dynamique concerne l'évolution de la fréquence avec le rayon R_1 de la pastille. En effet, pour les structures de 100 μm de rayon, la fréquence de résonance et le facteur de qualité augmentent avec le rayon de la couche piézoélectrique alors que dans le cas des membranes de 200 μm , la fréquence de résonance et le facteur de qualité diminuent. Cette différence de comportement dynamique peut être due à des effets prépondérants de la raideur effective sur la masse effective lorsque R_1 augmente dans le cas des membranes où $R_2 = 100 \mu\text{m}$ alors que l'effet opposé peut intervenir dans le cas des structures de 200 μm de rayon global. Ces résultats montrent néanmoins la possibilité du choix de la fréquence de résonance et du facteur de qualité en jouant sur les paramètres géométriques des structures.

R_1 (μm)	R_2 (μm)	Fréquence de résonance (kHz)	Facteur de qualité
30	100	580.89	208
50	100	625.65	258
70	100	751.97	359
75	200	295.51	97
75	200	337.28	94
105	200	270.57	86

Tableau 3.1 : Fréquence de résonance et facteur de qualité mesurés sur une puce du lot de fabrication de génération 3.

Ces expériences ont été faites pour une tension de polarisation de -4 V après la polarisation de la couche piézoélectrique à -18 V et une amplitude d'excitation de 100 mV. Or, comme il a été vu dans le chapitre II, la polarisation influe sur le comportement statique des structures. Il est donc intéressant d'étudier cette influence sur le fonctionnement dynamique. Aussi, la tension d'excitation peut induire des effets non-linéaires, traduisant le besoin de la mise en évidence de ces effets afin d'obtenir un comportement optimum des membranes.

III.3.2 Influence de la tension de polarisation sur le comportement dynamique

La répercussion de l'influence de la tension de polarisation sur la valeur du coefficient piézoélectrique d_{31} doit changer le comportement dynamique des micromembranes. C'est donc par l'étude de spectres de résonance pour différentes valeurs de la tension de polarisation V_{dc} qu'a pu être mise en évidence cette influence. Un exemple de mesures est représenté sur la figure 3.2. La micromembrane d'intérêt a un rayon R_1 de 50 μm et un rayon global R_2 de 100 μm . Pour pouvoir comparer les spectres obtenus, les données ont été traitées de manière à compenser numériquement l'effet de la capacité parasite (par une droite) et ramener les courbes au zéro d'amplitude. Ainsi, comme le montre la figure 3.2, deux effets de la polarisation peuvent être mis en évidence. Tout d'abord, le potentiel statique influe sur la fréquence de résonance puisqu'une plage de 20 kHz a été déterminée sur un cycle de polarisation entre +15 V et -12 V. Cet effet provient du fait que la polarisation change le profil

de déflexion statique de la membrane et donc son état d'équilibre mécanique, et qui modifie ainsi la raideur effective de la structure.

Un autre effet caractéristique concerne l'influence de la tension constante sur l'amplitude du pic de résonance. D'après la figure 3.2, il est clair que l'amplitude dépend de la polarisation statique. Pour caractériser cet effet, la figure 3.3 représente le maximum de l'amplitude du pic de résonance (partie réelle et partie imaginaire) pour différentes valeurs du potentiel V_{dc} . D'après ce graphique, l'amplitude varie de 0 μS à environ 70 μS , avec des valeurs de l'ordre de 50 μS dans les valeurs extrêmes du potentiel (± 15 V). C'est autour du champ coercitif que l'amplitude est nulle, alors que les maxima sont atteints pour un potentiel de ± 4 V, selon le sens dans lequel le potentiel est appliqué. Bien que présentant quelques différences, le comportement de l'amplitude du pic de résonance est comparable à celui obtenu pour le coefficient piézoélectrique d_{31} . La correspondance met donc en évidence l'influence de ce paramètre sur le comportement dynamique des micromembranes et montre une amplitude élevée pour de fortes valeurs de d_{31} . Ainsi, cette étude a permis de déterminer une tension de polarisation à -4 V, après avoir polarisé les structures à -15 V, pour obtenir une amplitude du pic de résonance maximale. Or, comme la résolution du capteur dépend du rapport signal-sur-bruit, une amplitude optimale favorise une mesure précise de la fréquence de résonance et du facteur de qualité.

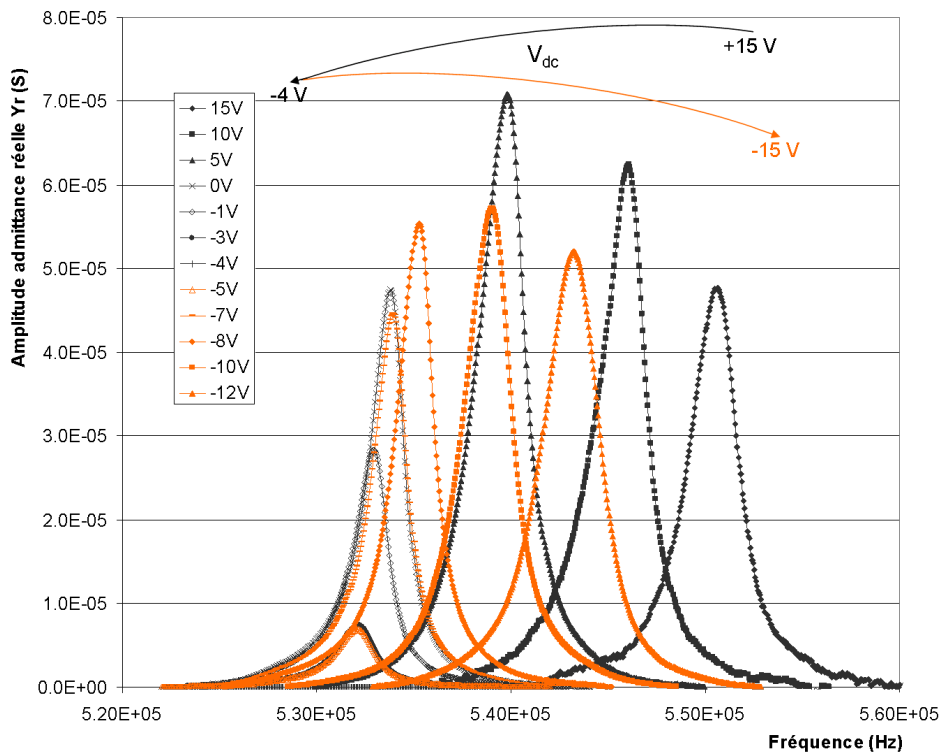


Figure 3.2 : Influence de la tension de polarisation (V_{dc}) sur le comportement dynamique d'une micromembrane où $R_1 = 50 \mu m$ et $R_2 = 100 \mu m$, $V_{ac} = 100 mV$.

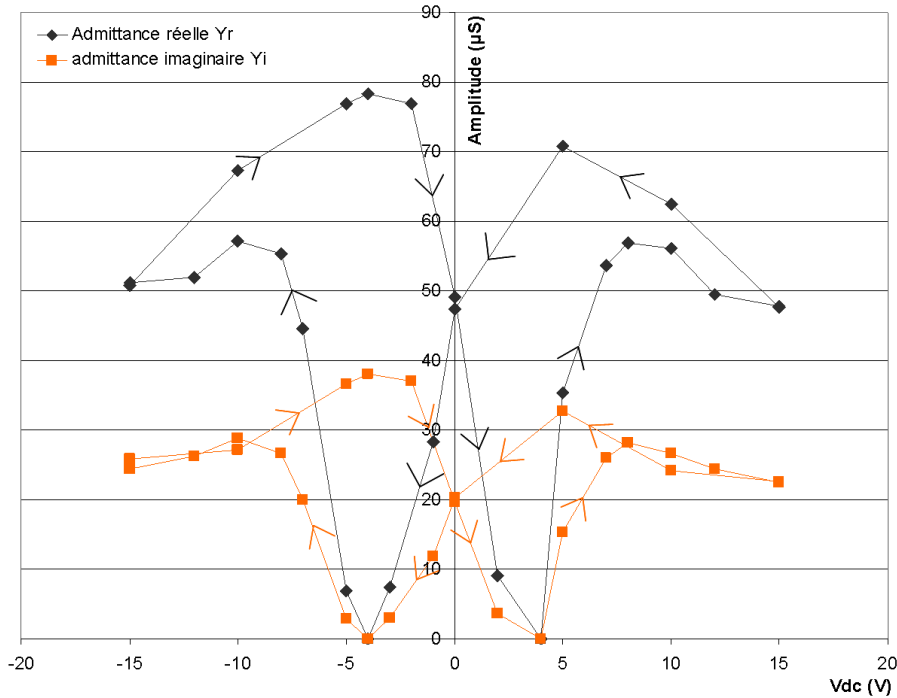


Figure 3.3 : Influence de la tension de polarisation (V_{dc}) sur l'amplitude de la partie réelle (Y_r) et imaginaire (Y_i) de l'admittance.

III.3.3 Influence de la tension d'excitation sur le comportement dynamique

L'influence de la tension de polarisation sur le comportement dynamique des micromembranes a permis d'en déterminer une valeur optimale pour obtenir une amplitude maximale. La tension d'excitation superposée modifie aussi le comportement des structures. La figure 3.4 montre l'effet de la tension sinusoïdale (V_{ac}) sur la partie réelle de l'admittance. Le cas présenté sur cette figure concerne une membrane où $R_1 = 70 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$ et une tension de polarisation de -4 V . Aussi, pour faciliter leur analyse, les courbes ont été normalisées. D'après ce graphique, il apparaît clairement que l'augmentation de la tension d'excitation induit l'apparition de non-linéarités se traduisant par une déformation du spectre de résonance. Ces non-linéarités sont connues sous le nom de « hard-spring effect ». Dans les plus hautes valeurs de tension, les mesures montrent une « rupture » du signal due à un comportement chaotique de la membrane. L'apparition de non-linéarités provient essentiellement d'une amplitude de vibration trop élevée pour conserver l'équilibre mécanique dynamique de la structure. Un comportement similaire a été observé pour les membranes où $R_2 = 200 \mu\text{m}$, mais l'amplitude d'excitation doit atteindre des valeurs plus élevées que pour les membranes où $R_1 = 100 \mu\text{m}$ (typiquement, de l'ordre de 2 V) et les non-linéarités provoquent une déformation du spectre vers la gauche, phénomène connu sous le nom de « soft-spring effect ». Ce résultat montre donc la dépendance géométrique des non-linéarités, dépendance mise en relief pour des structures simples (cylindre, cône) [6].

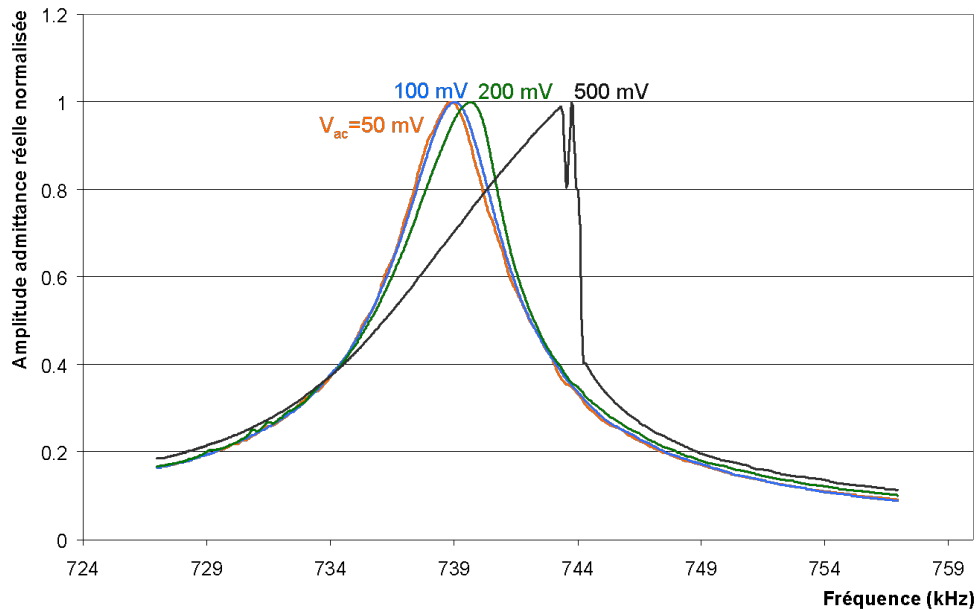


Figure 3.4 : Influence de la tension d'excitation sur le spectre de résonance (normalisé) d'une micromembrane où $R_1 = 70 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$, $V_{dc} = -4 \text{ V}$.

De nombreuses études ont été faites pour mettre en évidence les non-linéarités dynamiques de résonateurs, mais, à notre connaissance, il n'y a que peu d'explications de l'origine physique de ce régime. Ces phénomènes ont été étudiés sur des ponts principalement [7,8], mais aussi sur des résonateurs à quartz [9]. Des éléments d'explication sur l'origine des non-linéarités impliquent l'effet d'une contrainte en tension générée par les oscillations qui, lorsque l'amplitude de vibration est élevée, modifierait le mode de déformation classique de la structure.

Un autre élément important à considérer provient du fait que ce n'est pas seulement l'amplitude d'excitation qui est à l'origine des non-linéarités mais plutôt le couple tension d'excitation – tension de polarisation et le facteur de qualité. Même si nous avons caractérisé ce régime pour une seule valeur de tension de polarisation (valeur optimum), des modèles analytiques pour des structures de type pont (dont le comportement est proche à celui de membranes) ont établi une loi exponentielle décroissante reliant la tension d'excitation à la tension de polarisation dans le cas d'un actionnement électrostatique [8]. Cette fonction correspond au point critique du passage du régime linéaire au régime non-linéaire et montre que plus la tension de polarisation est faible (en valeur absolue), plus la tension d'oscillation devra être élevée pour qu'apparaissent les non-linéarités.

Cette nouvelle étape de caractérisation des micromembranes a permis de mettre en évidence des instabilités dans leur comportement dynamique. Or, par rapport aux applications visées, un état stable est nécessaire, déterminant ainsi une limite supérieure pour la tension d'excitation, à tension de polarisation fixe.

C'est ainsi tout d'abord, par l'étude du comportement dynamique des micromembranes dans l'air, qu'a été démontrée la capacité d'actionnement et de détection intégrées des structures. Ce sont ensuite des étapes d'optimisation qui ont permis de fixer les conditions pour obtenir des spectres de résonance rendant possible la détermination précise de la fréquence de résonance et du facteur de qualité avant d'appréhender le comportement dynamique en milieu liquide.

III.4 Comportement dynamique des micromembranes en milieu liquide

III.4.1 Passage de l'air au milieu liquide

Dans une approche biocapteur, la transduction sensible d'une reconnaissance biologique passe par un fonctionnement approprié des structures en milieu liquide. Principalement, deux principes permettent de mettre une surface en contact avec un liquide : soit de manière statique par le dépôt d'une goutte sur la surface, soit en flux par la circulation du fluide dans une cellule contenant la puce. Quelque soit le cas, les micromembranes ne pourront mesurer des variations à leur surface que si le volume de fluide peut être considéré infini pour la structure. Dans le cas contraire, la masse apparente du fluide ferait que les membranes mesureraient cette masse, ce qui empêcherait la transduction d'une biorecognition. Il a été démontré par H. Lamb que pour respecter cette condition, le volume du fluide en contact avec une membrane circulaire doit être supérieur à $4/\pi \cdot V$, où V est le volume de la demi-sphère décrite par une rotation de la membrane ($V = 2/3 \cdot \pi \cdot R_2^3$), ce qui donne [4]:

$$V_{liq} \geq \frac{8}{3} \cdot R_2^3 \quad (3.16)$$

L'application de cette formule pour les deux tailles de micromembranes fabriquées donne : $V_{liq} > 21.3$ nl pour les structures où $R_2 = 200 \mu\text{m}$ et $V_{liq} > 2.67$ nl pour les structures où $R_2 = 100 \mu\text{m}$. Ainsi, dans le cas où une goutte est déposée sur la surface, le volume choisi est de $5 \mu\text{l}$, non seulement pour respecter les conditions établies mais aussi pour des raisons de commodité de dépôt.

Pour l'étude en flux, c'est un système fluide complet qui a été utilisé (cf. figure 3.5). Il comprend une cellule fluide de première génération (une seconde génération sera présentée dans le chapitre IV), une pompe péristaltique et des capillaires. Comme le montre l'insert de la figure 3.5, la cellule fluide est composée de deux parties : une face supérieure en PlexiglasTM transparent et une face inférieure en aluminium. La partie supérieure de la cellule a été usinée sur une profondeur de 3 mm pour encapsuler le boîtier TO8 contenant la puce. La distance finale entre les micromembranes et la face inférieure du PlexiglasTM a été estimée à 2 mm. Aussi, quatre vis en plastique relient les deux parties de la cellule, de manière à bloquer le boîtier TO8 et éviter les risques de fuite. Ainsi, le système complet permet une circulation permanente du liquide sur la face supérieure des micromembranes, le débit contrôlé du fluide étant fixé par la pompe péristaltique (de $5 \mu\text{l/min}$ à $70 \mu\text{l/min}$). Par mesure du temps nécessaire pour remplir la cellule à un débit connu, son volume a été déterminé à $220 \mu\text{l}$. C'est par ces systèmes que l'étude du comportement dynamique des micromembranes est faite, les spectres de résonance étant mesurés pendant que les structures oscillent dans le fluide (comme le montre la figure 3.5).

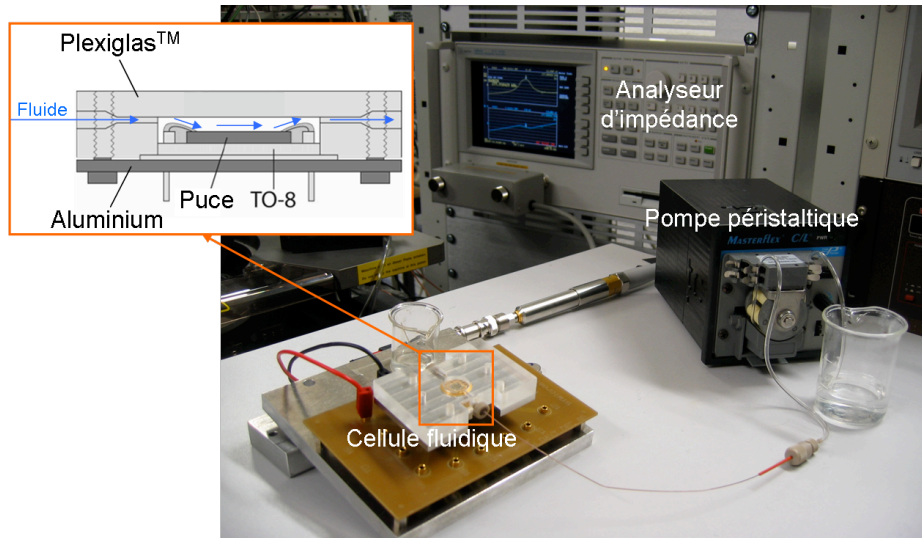


Figure 3.5 : Photographie du système complet pour l'étude du comportement dynamique des micromembranes en milieu liquide. L'insert représente une coupe de la cellule fluidique de 1^{ère} génération réalisée.

L'étude du comportement dynamique des micromembranes lors du passage de l'air au milieu liquide a été effectuée sur une puce contenant six membranes montée dans la cellule fluidique précédemment décrite. Le fluide circulant est de l'eau, dans un premier temps, et les mesures ont été limitées au mode fondamental de vibration. Un exemple de spectres de résonance dans l'air et dans l'eau est présenté sur la figure 3.6, pour une membrane où $R_1 = 70 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$, une tension de polarisation de -1 V et une tension d'excitation de 100 mV . La tension de polarisation a été fixée à -1 V pour des raisons de fuites électriques, à cause de la porosité de l'oxyde de passivation. Cependant, d'après ce graphique, la possibilité de mesure de spectres en milieu liquide est clairement mise en évidence, malgré l'atténuation de l'amplitude du signal due à la masse apparente du fluide.

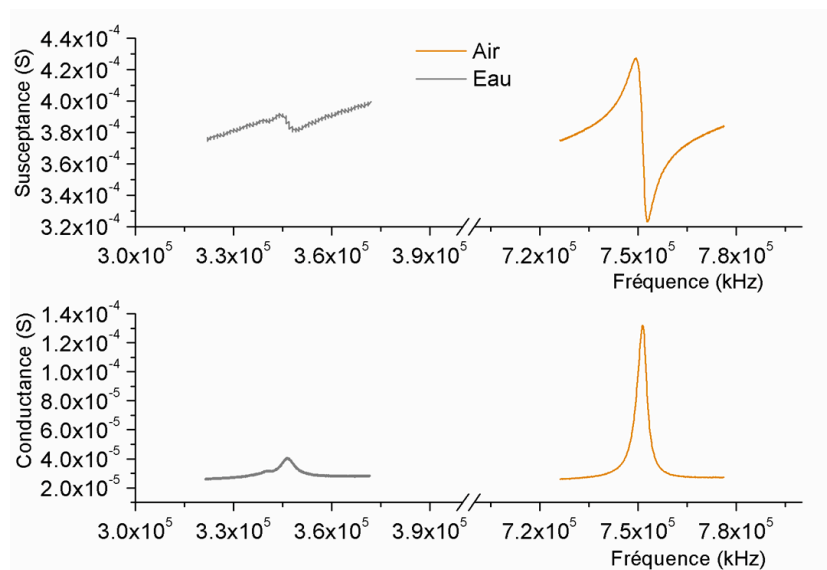


Figure 3.6 : Spectre de résonance électrique mesuré dans l'air et dans l'eau pour une micromembrane où $R_1 = 70 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$.

Cette figure montre aussi que le passage de l'air à l'eau induit une nette diminution de la fréquence de résonance. Les variations mesurées ont été comparées aux valeurs obtenues avec le modèle de Lamb, après l'avoir calibré avec les valeurs de fréquence mesurées dans l'air. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.2. Tout d'abord, pour l'ensemble des structures présentant des caractéristiques géométriques différentes, les valeurs obtenues avec le modèle décrivent correctement le comportement des membranes lors du passage de l'air à l'eau, comparativement avec les mesures expérimentales. Mais la différence entre les valeurs théoriques et expérimentales diminue lorsque le rapport R_1/R_2 s'approche de l'unité. Cela provient de l'hypothèse émise lors de l'élaboration du modèle, sur le calcul du produit $(\rho h)_M$ ramené à un empilement uniforme moyen pour la membrane, en contact avec le liquide. Ainsi, pour les structures où le rapport $R_1/R_2 = 0.7$, l'erreur entre la valeur théorique et expérimentale est quasiment nulle (0.02 %) alors que dans le cas où $R_1/R_2 = 0.3$, l'erreur dépasse 10 %, valeur restant correcte étant donnée la simplicité du modèle par rapport à la complexité géométrique des structures. Ce premier résultat valide donc la mesure de spectres de résonance par actionnement et détection intégrés dans l'eau, avec des valeurs cohérentes par rapport à la théorie.

R_1 (μm)	R_2 (μm)	Fréquence de résonance air (kHz)	Fréquence de résonance eau théorique (kHz)	Fréquence de résonance eau expérimentale (kHz)	Erreur
30	100	580.89	208.664	237.16	12.03%
50	100	625.65	262.41	286.78	8.50%
70	100	751.97	346.72	346.79	0.02%
75	200	295.51	85.14	94.42	9.83%
75	200	337.28	97.17	103.74	6.33%
105	200	270.57	89.2	89.62	0.47%

Tableau 3.2 : Fréquences de résonance expérimentales (air, eau) et théoriques (eau) avec calcul de l'erreur entre la valeur mesurée et celle obtenue avec le modèle de Lamb dans l'eau.

Pour approfondir l'étude, deux paramètres caractéristiques d'un fluide newtonien ont été changés pour connaître leur influence sur la fréquence de résonance et le facteur de qualité des micromembranes : la densité du fluide et sa viscosité. Ces deux propriétés sont d'intérêt puisqu'un changement de densité correspond à une masse apparente alors que la viscosité influe principalement sur l'amortissement. Ainsi, différents mélanges eau-glycérol et eau-éthanol ont été injectés sur la surface des membranes. Les mélanges eau-éthanol n'ont pas pu être étudiés lors du dépôt de gouttes, l'évaporation du liquide étant trop rapide. Les propriétés différentes de ces deux fluides ont dicté notre choix. En effet, comme le montre la figure 3.7, dans le cas des mélanges eau-glycérol, la densité et la viscosité augmentent avec la quantité de glycérol, avec des valeurs de viscosité atteignant 180 cP en suivant une augmentation abrupte au-delà de 60 % de glycérol. Au contraire, dans le cas de l'éthanol, la densité diminue quand la quantité d'éthanol augmente alors que la viscosité décrit une courbe en forme de cloche, avec des extrêmes compris entre 1 cP et 2.4 cP. La variété des propriétés des fluides nous a ainsi permis d'aborder différents aspects du comportement dynamique des micromembranes en milieu liquide. L'étude a d'abord porté sur la fréquence de résonance puis sur le facteur de qualité.

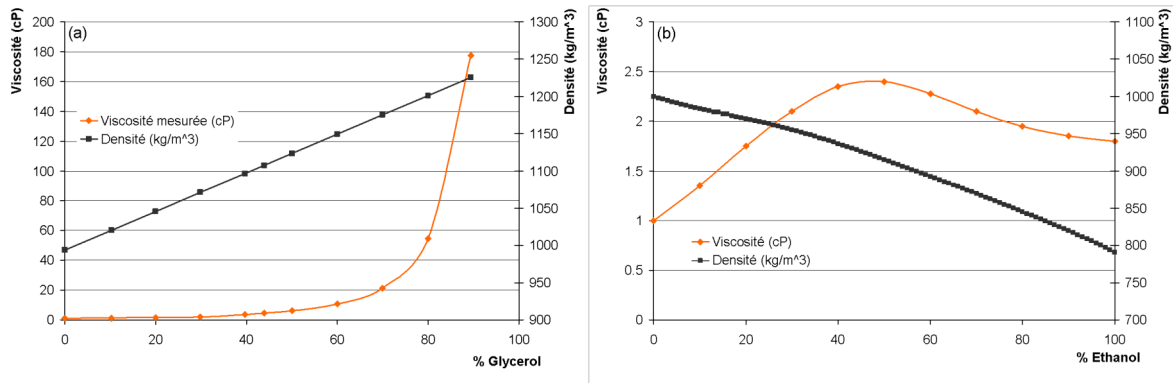


Figure 3.7 : densité et viscosité de fluides selon la proportion en masse de (a) glycérol et (b) éthanol en solution aqueuse.

III.4.2 Comportement en fréquence

Afin de valider complètement le comportement dynamique des micromembranes en milieu liquide, l'influence des propriétés de deux fluides injectés en flux a été étudiée. Tout d'abord, la variation de fréquence de résonance de deux micromembranes où le rapport R_1/R_2 vaut 0.7 et $R_2 = 100 \mu\text{m}$ ou $200 \mu\text{m}$ a été mesurée lors de l'injection de mélanges eau-glycérol, le point de départ étant l'eau pure. Les résultats, présentés sur la figure 3.8, montrent une diminution de la fréquence avec l'augmentation de la quantité de glycérol dans la solution. Ce premier résultat vient de l'augmentation de la densité avec la proportion en masse de glycérol et traduit la capacité des structures à détecter une variation de masse apparente. La différence de variation mesurée entre les deux membranes provient de leur sensibilité massique qui diffère selon la taille des structures, la sensibilité augmentant avec la diminution du rayon global. Aussi, un point remarquable vient de la concordance des valeurs entre les données mesurées et celles obtenues avec le modèle de Lamb pour une quantité de glycérol inférieure à 60 % en masse. En effet, comme il a été vu, le modèle analytique proposé ne tient pas compte de la viscosité du fluide en contact avec la surface de la membrane. Or, la viscosité dépasse 10 cP lorsque la quantité de glycérol est de 60 % (ce qui est déjà 10 fois supérieur à la viscosité de l'eau), ce qui montre la limite de validité du modèle. Néanmoins, pour un fluide ayant une viscosité inférieure à 10 cP, une bonne corrélation entre les valeurs théoriques et expérimentale a été obtenue, validant la cohérence des mesures électriques de fréquence de résonance des micromembranes.

La viscosité du fluide influe aussi sur l'amplitude du signal. Comme le montre la figure 3.9, l'amplitude du pic de résonance, bien que mesurable, est faible dans une solution contenant 80 % de glycérol, comparativement au spectre mesuré dans l'eau. Cette atténuation croît avec l'augmentation de la quantité de glycérol et un spectre de résonance a pu être mesuré pour une solution atteignant une viscosité de 175 cP. Au-delà, la disparition du pic empêche la détermination de la fréquence de résonance. Les structures fabriquées atteignent leur limite de détection par rapport aux caractéristiques du fluide, mais cette limite est suffisamment élevée par rapport à l'ensemble des solutions biologiques. Par exemple, la viscosité du sang est d'environ 3 cP alors que la viscosité du plasma est de 1.5 cP [10], montrant que la limite de détection des micromembranes n'empêche pas leur utilisation comme biocapteur.

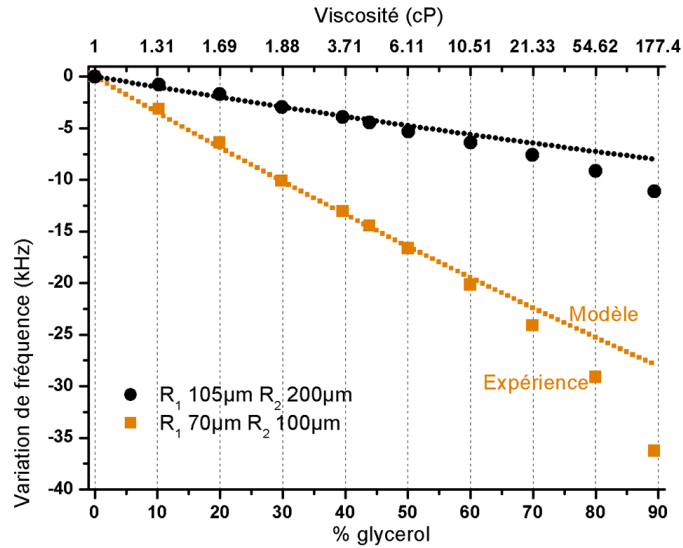


Figure 3.8 : Variation de la fréquence de résonance en fonction de la quantité en masse de glycérol dans la solution pour deux micromembranes où $R_1 = 70 \mu\text{m}$, $R_2 = 100 \mu\text{m}$ et $R_1 = 105 \mu\text{m}$, $R_2 = 200 \mu\text{m}$. Les symboles correspondent aux mesures expérimentales alors que les lignes correspondent aux valeurs théoriques.

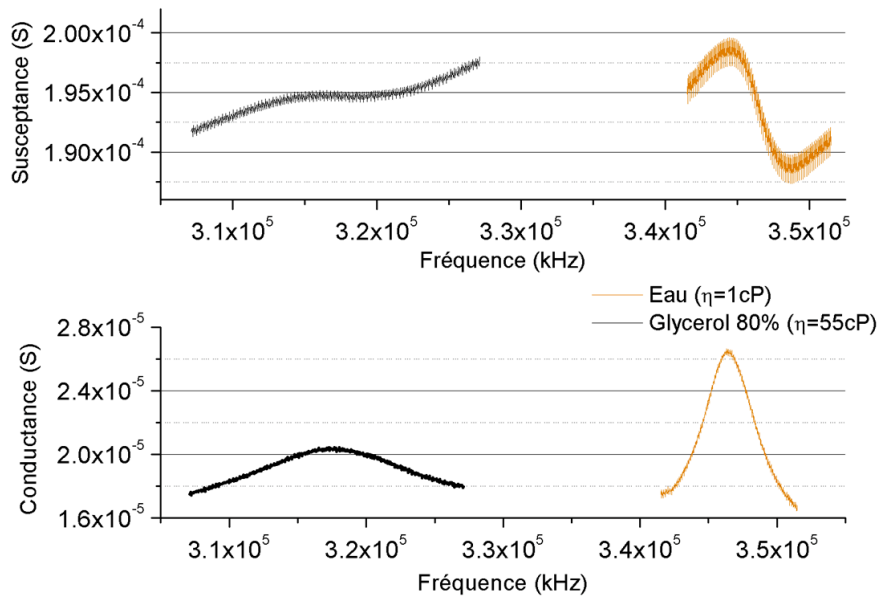


Figure 3.9 : Spectres de résonance mesurés dans l'eau et dans une solution avec 80 % de glycérol pour une micromembrane où $R_1 = 70 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$.

A partir des résultats obtenus, il devient évident que la viscosité du liquide influe sur la fréquence de résonance lorsque son effet ne peut plus être négligé. Pour confirmer cette hypothèse, des mesures en flux ont été faites lors de l'injection de différentes solutions de mélange eau-éthanol. Comme il a été vu sur la figure 3.7, la viscosité d'une solution eau-éthanol n'excède pas 2.4 cP, les valeurs sont donc faibles par rapport aux mélanges eau-glycérol. Les mesures ont été effectuées sur une membrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$ pour huit solutions allant de 0 % à 100 % d'éthanol. Les résultats, présentés sur la figure 3.10, confirment le comportement dynamique des micromembranes puisque le modèle de Lamb est vérifié pour chaque valeur de fréquence mesurée. Aussi, la densité de la solution diminuant

avec l'augmentation de la quantité d'éthanol, cet effet se traduit effectivement par une augmentation de la fréquence de résonance.

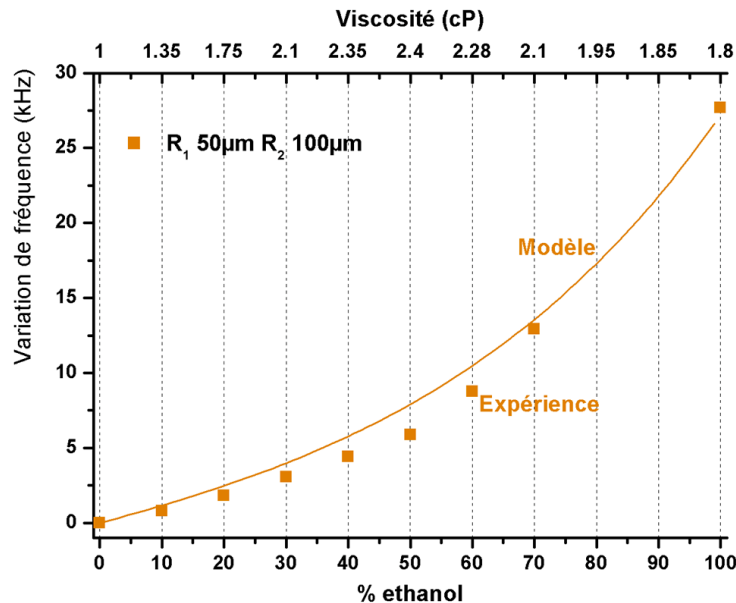


Figure 3.10 : Influence de la quantité en masse d'éthanol sur la fréquence de résonance d'une micromembrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que la faible divergence entre les données théoriques et expérimentales, en plus de confirmer le comportement fréquentiel des structures en milieu liquide, permet d'appréhender de manière théorique la fréquence de résonance de micromembranes en contact avec des solutions de faible viscosité, ce qui est le cas dans la plupart des applications biocapteur. Aussi, ces résultats montrent la seule dépendance de la fréquence avec la densité de la solution, tant que la viscosité reste négligeable. Cependant, la viscosité influe surtout sur le facteur de qualité, l'étude du comportement de ce dernier est donc d'intérêt dans la caractérisation des structures en milieu liquide.

III.4.3 Comportement du facteur de qualité

Jusqu'à présent, seule la fréquence de résonance a été considérée dans l'étude du comportement des micromembranes en milieu liquide. Cependant, le facteur de qualité est un paramètre important car il intervient dans la capacité et la précision de mesure de variations de fréquence. Il est donc intéressant de confirmer le comportement du facteur de qualité dans la configuration précédemment décrite (injection en flux), en tenant aussi compte du cas statique, par le dépôt d'une goutte.

Tout d'abord, une première série d'expériences concerne l'injection en flux de mélanges eau-éthanol pour étudier l'influence de solutions de faible viscosité sur le facteur de qualité. Les résultats sont présentés sur la figure 3.11 pour une membrane de rayon global R_2 de $100 \mu\text{m}$ et un rayon de pastille R_1 de $50 \mu\text{m}$. D'après ce graphique, nous pouvons noter que les valeurs du facteur de qualité ne varient pas de manière significative quelque soit la proportion d'éthanol dans la solution, confirmant le fait que l'effet de la viscosité peut être négligé lorsque celle-ci reste faible. Mais un autre élément remarquable de ce graphique correspond aux valeurs mesurées du facteur de qualité. En effet, ces valeurs atteignent 50, ce

qui est une décade supérieure par rapport à la plupart des microsystèmes électromécaniques résonants trouvés dans la littérature, fonctionnant en milieu liquide [11,12]. Ainsi, la précision pour la mesure de faibles variations de fréquence de résonance est accrue, par rapport aux structures de type microleviers par exemple.

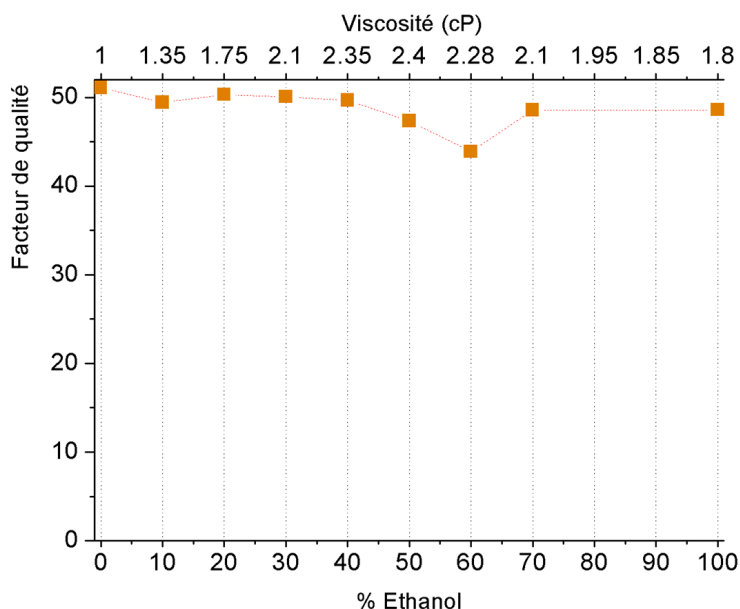


Figure 3.11 : Facteur de qualité mesuré sur une micromembrane ($R_1 = 50 \mu\text{m}$, $R_2 = 100 \mu\text{m}$) lors de l'injection de différentes solutions eau-éthanol.

Pour approfondir cette étude, une comparaison entre le comportement lors du dépôt d'une goutte de mélange eau-glycérol et lors de l'injection en flux a été faite. Le cas de dépôt d'une goutte est intéressant dans les applications biocapteurs sur des structures fonctionnant en parallèle puisque chaque membrane peut ainsi être en contact individuellement avec une solution d'analyte. Les solutions de mélanges eau-glycérol ont été choisies car au-delà de leurs propriétés de densité et viscosité, ce sont des agents anti-évaporant utilisés dans de nombreuses techniques de dépôts de solutions pour permettre d'effectuer des mesures sans tenir compte de l'évaporation des solvants. Les résultats sont présentés sur la figure 3.12 dans le cas d'une membrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$. Les valeurs obtenues sont surprenantes puisque le facteur de qualité lors du dépôt d'une goutte est plus de deux fois supérieur à celui mesuré en flux dans l'eau ($Q_{\text{goutte_eau}} = 140$ et $Q_{\text{flux_eau}} = 60$) et diminue de manière quasiment linéaire jusqu'à atteindre la valeur en flux pour une solution de 60 % de glycérol. Ensuite, le comportement du facteur de qualité dans les deux configurations est similaire, c'est-à-dire une diminution avec l'augmentation de la quantité de glycérol.

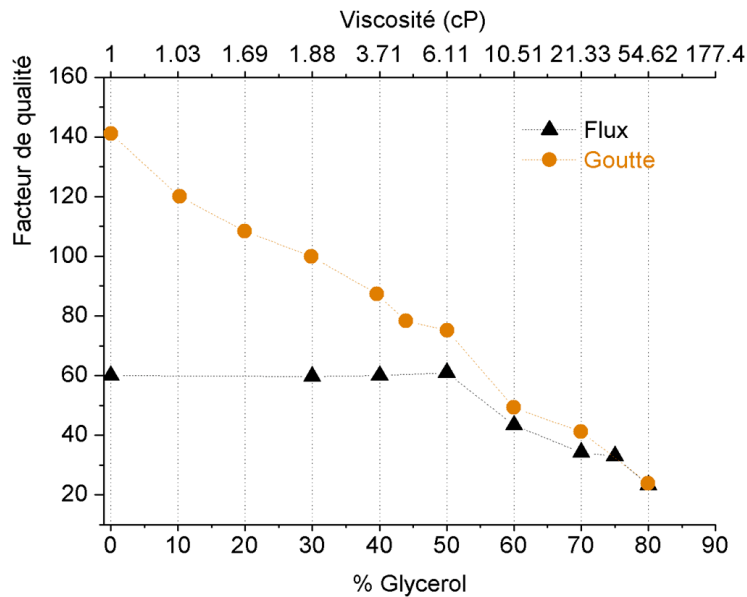


Figure 3.12 : Influence sur le facteur de qualité de la configuration de mise en contact d'une micromembrane ($R_1 = 50 \mu\text{m}$, $R_2 = 100 \mu\text{m}$) avec des mélanges eau-glycérol (dépôt d'une goutte, passage en flux).

Une première explication de cette différence pourrait venir du fait que dans le cas du dépôt en goutte, la masse apparente de la goutte est mesurée par la micromembrane. Pour contredire cette hypothèse, nous avons comparé le comportement en fréquence des structures dans les deux configurations. Les résultats, présentés sur la figure 3.13, montrent un comportement identique pour les deux cas d'étude, aussi bien en termes de variations de fréquence de résonance pour les différents mélanges eau-glycérol qu'en termes de fréquence de départ dans l'eau. Ainsi, malgré les précautions prises, par le calcul du volume minimum pour qu'il soit considéré infini par les structures, ce résultat expérimental supprime l'hypothèse émise.

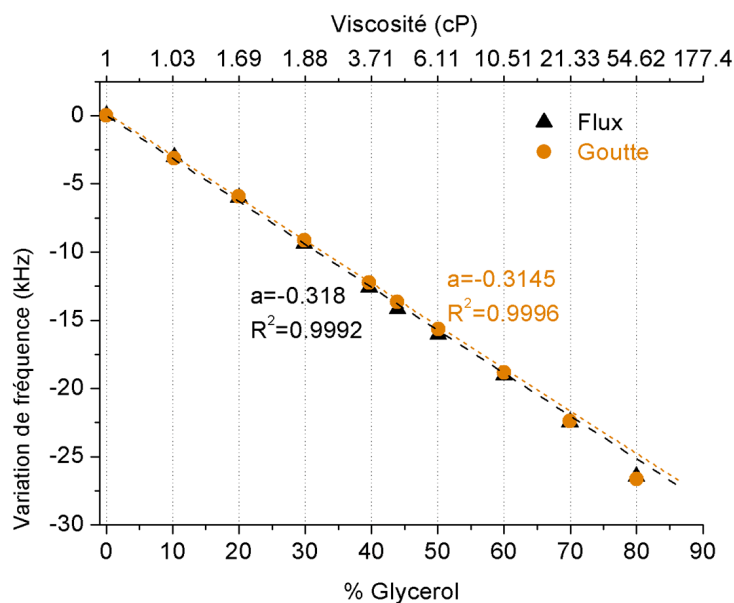


Figure 3.13 : Influence de la proportion de glycérol sur la fréquence de résonance lors de l'injection en flux et du dépôt d'une goutte (Micromembrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$).

Une autre tentative d'explication pourrait venir de la théorie des ondes acoustiques. En effet, la longueur d'onde du son dans le liquide est grande par rapport au diamètre de la membrane, ce qui veut dire que dans les différents cas d'études, le liquide est réactif, se traduisant principalement par un effet prédominant de la masse virtuelle ajoutée par rapport aux pertes d'énergie dues à l'amortissement visqueux. De plus, l'interface entre le liquide et l'air dans le cas du dépôt de goutte permet une compression du liquide, favorisant des oscillations « libres » des structures dans le liquide. Au contraire, dans le cas de l'injection en flux, l'interface rigide entre le liquide et la paroi en PlexiglasTM induit un amortissement initial des vibrations des membranes. Ainsi, même si ce point doit être approfondi, il pourrait expliquer des valeurs de facteur de qualité élevées dans le cas de dépôt d'une goutte par rapport à l'injection des solutions en flux, pour de faibles valeurs de viscosité. Une dernière remarque montre enfin que pour de fortes valeurs de viscosité, la configuration en goutte n'est plus suffisante pour obtenir des facteurs de qualité élevés, puisqu'il atteint 20 pour une viscosité de 55 cP.

Enfin, pour essayer d'obtenir les facteurs de qualité lors du dépôt d'une goutte dans la configuration d'injection en flux, des bulles d'air ont été intentionnellement ajoutées au liquide injecté par des inversions rapides du sens d'injection au niveau de la pompe péristaltique. Le comportement du facteur de qualité dans cette configuration, présenté sur la figure 3.14, est identique à celui mesuré lors du fonctionnement statique en goutte. Ainsi, ce résultat montre que des valeurs élevées de facteur de qualité peuvent être obtenues en flux si l'injection de bulles est maîtrisée. Aussi, ce cas correspond à une configuration quasiment idéale pour des applications biocapteurs. Dans ce cas, l'injection en flux est nécessaire pour réaliser des cinétiques de reconnaissance biologique en limitant des effets de transfert de masse et un facteur de qualité élevé augmentera la résolution de mesure des fréquences de résonance. Néanmoins, le contrôle et la reproductibilité de l'injection de bulles dans le liquide ne sont pas encore totalement maîtrisés, cette configuration ne sera donc pas utilisée dans les expériences de biorecognition.

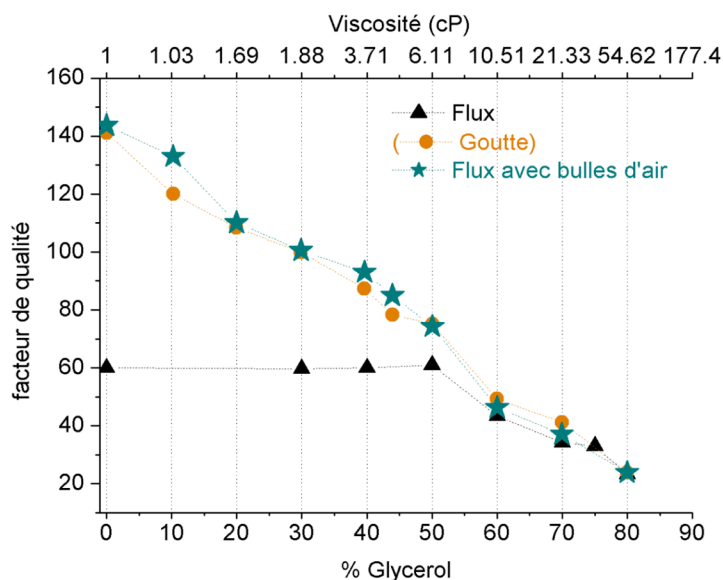


Figure 3.14 : facteurs de qualité mesurés sur une micromembrane ($R_1 = 50 \mu\text{m}$, $R_2 = 100 \mu\text{m}$) lors de l'injection de mélanges eau-glycérol selon trois configurations : dépôt d'une goutte, injection en flux, injection en flux avec des bulles d'air.

Pour terminer cette section sur la caractérisation dynamique de micromembranes fabriquées par analyse d'impédance, il est clair que la capacité de structures de type membranes résonantes à fonctionner en milieu liquide par actionnement et détection intégrés a été mise en évidence. Les niveaux de facteur de qualité permettent des mesures résolutive de fréquence. De plus, le suivi en temps réel lors de l'injection des solutions eau-glycérol a pu être effectué, par acquisition successive de spectres générés à l'analyseur d'impédance (cf. figure 3.15). Mais même si les puces de micromembranes sont le cœur du système réalisé, leur environnement est aussi primordial. En effet, les capacités des structures fabriquées permettent d'envisager d'utiliser les membranes en tant que biocapteur. Mais au-delà des propriétés intrinsèques des micromembranes, l'instrumentation qui permet d'exploiter ces propriétés caractéristiques est importante. Malgré les avancées qui ont été faites par l'utilisation d'un analyseur d'impédance, les limitations telles que l'analyse monocapteur, le manque de précision dû à une compensation numérique des effets parasites ou encore la portabilité difficile nous ont poussé à développer une carte électronique spécifique aux structures fabriquées. Aussi, en plus de la caractérisation et de l'optimisation du comportement dynamique des micromembranes, les études effectuées ont servi de point de départ dans l'élaboration du système électronique, comme développé dans la section suivante.

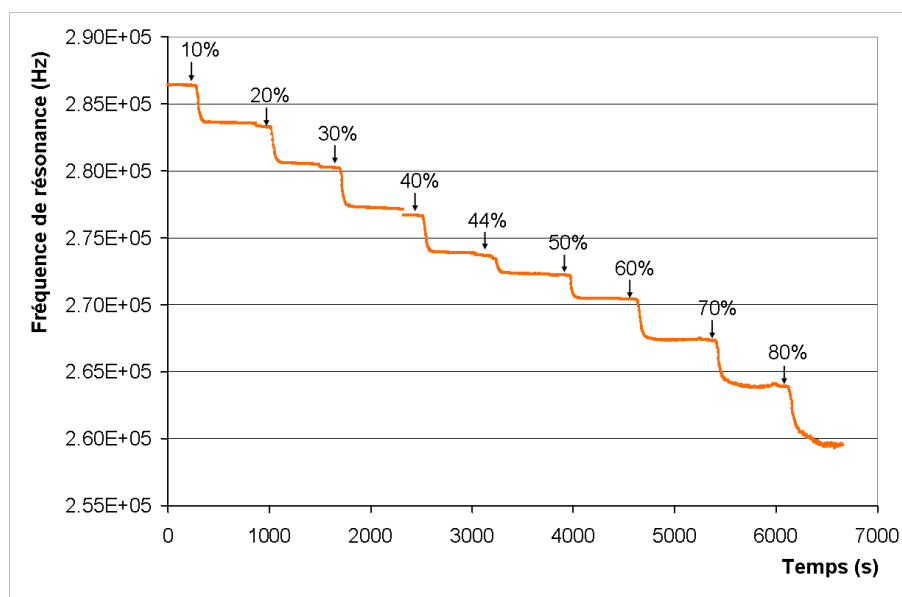


Figure 3.15 : mesure temps-réel de la fréquence de résonance par analyse d'impédance lors de l'injection en flux de différents mélanges eau-glycérol (le pourcentage représente la proportion en masse de glycérol) sur une micromembrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$.

III.5 Carte électronique spécifique

III.5.1 Motivations

Les limitations actuelles des appareils commerciaux ne permettent pas d'exploiter pleinement les propriétés des microstructures fabriquées, ces appareils n'étant pas spécifiquement dédiés aux applications visées. C'est pourquoi, un système électronique a été développé pour l'utilisation des matrices de micromembranes en tant que biocapteur. La carte spécifiquement dédiée aux structures a été établie par Denis Lagrange (Ingénieur de recherche, service Informatique et Instrumentation, LAAS-CNRS) à partir d'un cahier des

charges défini par les caractéristiques dynamiques précédemment décrites. Les spécifications requises concernent tout d'abord la capacité d'actionnement des micromembranes et la détection des fréquences de résonance par la couche piézoélectrique. Une particularité du système développé provient ensuite de la compensation dynamique des effets parasites. En effet, dans la littérature, les systèmes électroniques pour l'actionnement et la détection piézoélectrique intégrés de structures résonantes concernent principalement des microleviers pour la microscopie à force atomique et utilisent tous le même schéma de détection en compensant les éléments parasites par une référence. Cette référence peut être un levier proche de celui qui est actif [13] ou un circuit électronique passif servant de branche de référence [14]. Bien qu'efficace, ces approches pour la compensation de la capacité parasite de la couche piézoélectrique souffrent du manque de précision sur la compensation, ne permettant pas d'obtenir des spectres de résonance idéaux. Un des objectifs du système électronique concerne donc une compensation dynamique des éléments parasites pour résoudre les imperfections précédemment décrites. Enfin, le multiplexage du système est nécessaire pour l'adressage individuel des micromembranes et leur fonctionnement parallèle. C'est ainsi que, dans l'optique de remplir ces spécifications, nous avons d'abord modélisé électriquement les micromembranes pour déterminer les différents niveaux nécessaires de la carte électronique, avant son implémentation (matérielle et logicielle) et sa validation.

III.5.2 Considérations théoriques pour la conception de la carte électronique

La modélisation de spectres en fréquence issus de la caractérisation dynamique des micromembranes par analyse d'impédance a permis de définir le type optimum de compensation des éléments parasites. En effet, un spectre typique tel que celui présenté sur la figure 3.1 montre que l'amplitude du pic de résonance mesuré sur la partie réelle de l'admittance vaut 6 μS pour une admittance réelle globale de 24 μS . Mais le signal total généré par la structure avant la séparation entre partie réelle et partie imaginaire correspond à : $|Y| = (|Y_r|^2 + |Y_i|^2)^{1/2}$, ce qui donne 172 μS pour la micromembrane étudiée. Une rapide comparaison entre l'admittance totale et l'amplitude du pic de résonance montre que le pic ne représente que 1/30 du signal total dans l'air, ce rapport étant considérablement réduit lors de mesures en milieu liquide. Ces considérations préliminaires ont guidé notre choix de compenser les éléments parasites avant la chaîne de détection au lieu de les soustraire en aval, comme il est fréquemment trouvé dans la littérature [13,14].

Comme il a été vu, les effets parasites mesurés dans les spectres en fréquence sont principalement causés par une capacité parallèle. La compensation des perturbations induites par cet élément pourrait être faite par une capacité à gain variable, ce qui serait suffisant pour supprimer l'admittance globale de la partie imaginaire du signal à la résonance mais pas la partie réelle. Un circuit plus complexe pourrait compenser globalement les effets parasites pour une fréquence donnée, mais cela induirait aussi des difficultés dans la génération des spectres ou le suivi de la fréquence. C'est donc par une autre approche, basée sur la modélisation des spectres de résonance, qu'a été déterminé le circuit de compensation.

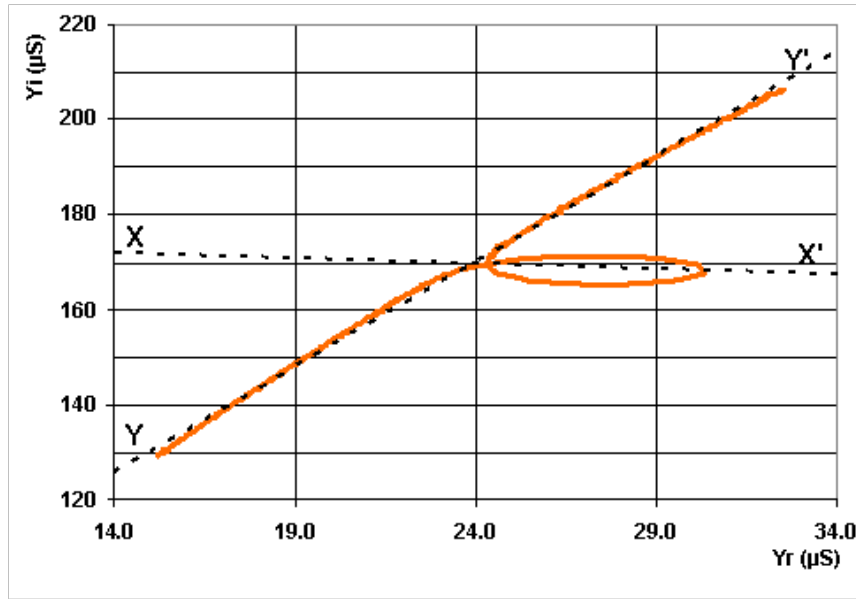


Figure 3.16 : Représentation de la partie réelle (Y_r) et imaginaire (Y_i) de l'admittance d'une micromembrane dans le plan complexe (les axes XX' et YY' sont perpendiculaires malgré l'aspect visuel dû à des échelles différentes sur les axes Y_r et Y_i).

Lorsque l'on s'intéresse à la modélisation des spectres dynamiques générés par un résonateur, le tracé des signaux dans le plan complexe (partie imaginaire en fonction de partie réelle = plan de Nyquist) donne des informations importantes. Comme le montre la figure 3.16, la représentation dans le plan complexe des signaux obtenus sur la figure 3.1 permet de mettre en évidence deux comportements : tout d'abord, hors résonance, les données sont extrapolables par une courbe linéaire (axe YY') ; ensuite, le pic de résonance est seulement généré sur l'axe correspondant à la partie réelle (représenté par l'axe XX'). Ainsi, à partir de ces observations, les équations régissant la partie réelle et imaginaire de l'admittance peuvent être décrites par :

$$Y_r = a_1 \omega + b_1 \quad \text{et} \quad Y_i = a_2 \omega + b_2 \quad (3.17)$$

D'un point de vue électrique, ces équations peuvent être obtenues (pour $b_2 = 0$) par une capacité (C) en parallèle avec une résistance (d'admittance y_0), si la capacité est complexe ($C = c_0 + jc_1$), ce qui donne :

$$Y = y_0 + jC\omega \quad (3.18)$$

En discriminant partie réelle et partie imaginaire à partir de l'équation 3.18, les expressions établies dans l'équation 3.17 deviennent :

$$Y_r = y_0 - jc_1\omega \quad \text{et} \quad Y_i = c_0\omega \quad (3.19)$$

Pour valider le circuit proposé pour la compensation des éléments parasites, les effets dus à une capacité complexe en parallèle avec une résistance ont été soustraits aux signaux obtenus sur les figures 3.1 et 3.16 et les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.17.

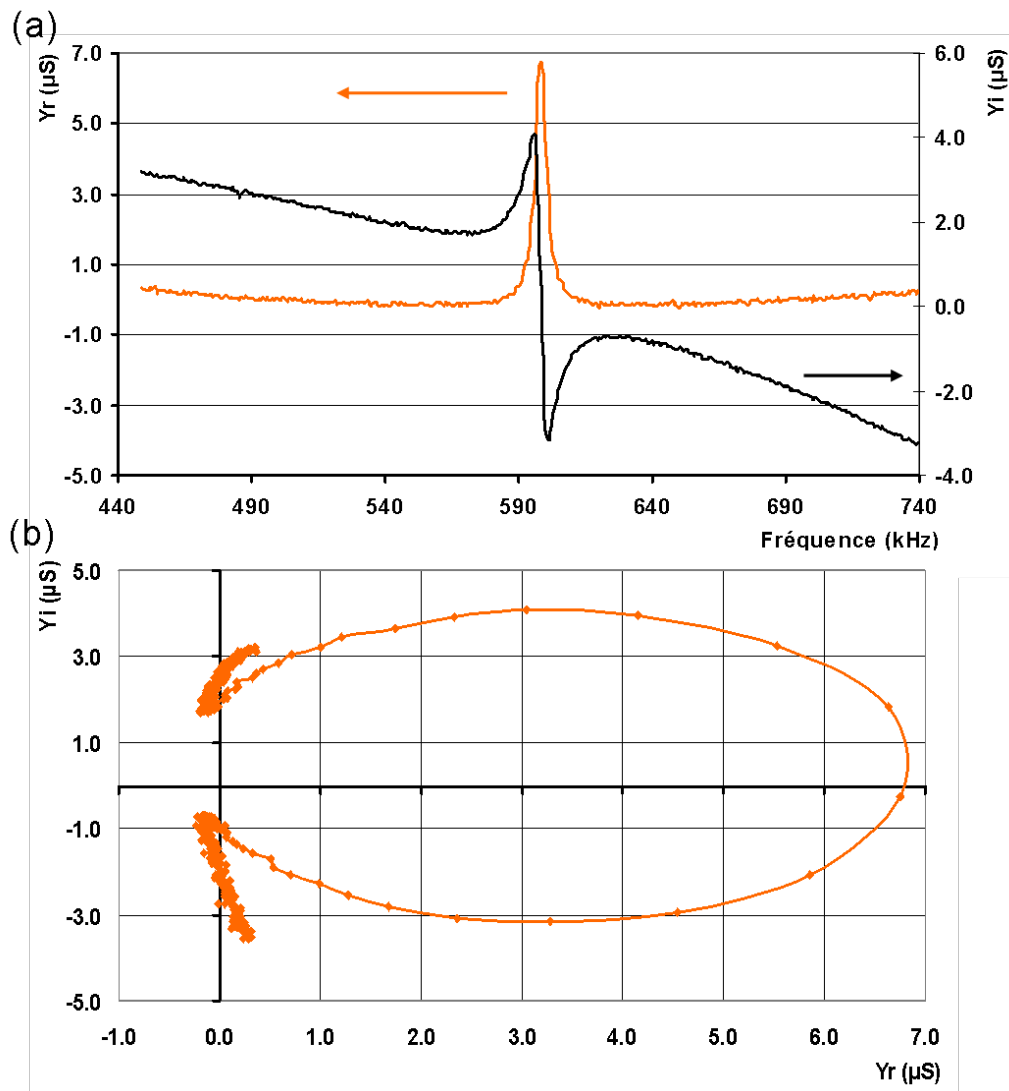


Figure 3.17 : Comportement dynamique d'une micromembrane après compensation théorique des éléments parasites. (a) Partie réelle et imaginaire de l'admittance en fonction de la fréquence. (b) Partie réelle et imaginaire de l'admittance dans le plan complexe.

D'après la figure 3.17a), il est clair que le seul signal qui apparaît encore est le pic de résonance, traduisant l'efficacité de la compensation. Sur la partie réelle de l'admittance, la pente hors résonance a été éliminée et ramenée au zéro de l'axe. Pour confirmer ce résultat, le tracé dans le plan complexe (figure 3.17b)) montre que la résonance peut être facilement déterminée, puisque ce sont les seuls points ayant une partie réelle positive et l'accumulation de points sur l'axe imaginaire avant et après la résonance traduit la compensation efficace des éléments parasites. Ainsi, la modélisation du comportement dynamique expérimental des micromembranes a déterminé le circuit de compensation et montre que les éléments parasites ne sont pas seulement capacitifs. L'implémentation électronique peut maintenant être mise en œuvre, non seulement au niveau de la compensation dynamique mais aussi des autres niveaux définis par le cahier des charges.

III.5.3 Implémentation de la carte électronique

Pour développer une électronique spécifique à l'actionnement des micromembranes et la détection des fréquences de résonance sur des spectres « idéaux », plusieurs niveaux ont été élaborés, comme le montre la figure 3.18. Tout d'abord, l'actionnement des structures par la couche piézoélectrique a été réalisé par l'utilisation d'un synthétiseur digital direct (DDS) qui génère un signal sinusoïdal pour une fréquence donnée. Pour l'actionnement, la phase du DDS a été fixée à zéro alors que le gain détermine l'amplitude de la sinusoïde.

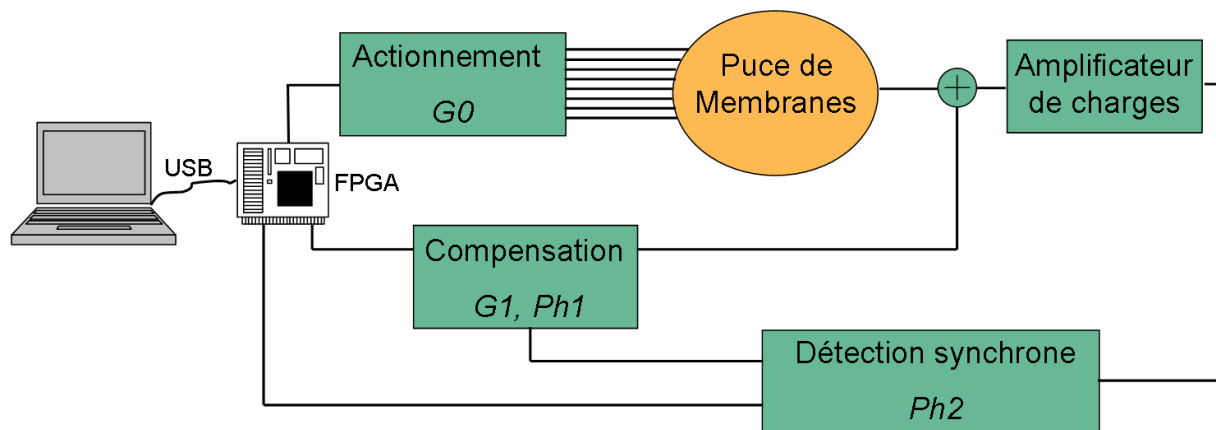


Figure 3.18 : Schéma de principe de l'implémentation de la carte électronique.

Ensuite, le signal nécessaire pour la compensation est produit par un autre DDS dont la phase est déterminée à 180° moins l'angle de dissipation et le gain est variable pour une compensation dynamique. Pour ce prototype de la carte électronique, seule la compensation capacitive a été implémentée. Néanmoins, l'injection de la tension générée par le DDS 1 dans une capacité pour différentes valeurs de gain produit un courant correspondant au terme capacitif nécessaire à la compensation. En plus de la correspondance entre les équations et l'implémentation électronique, l'utilisation d'une capacité n'ajoute pas de bruit au courant de compensation et produit automatiquement une dépendance linéaire avec la fréquence, évitant la prise en compte des effets de second ordre.

Le courant généré par la micromembrane et la branche de compensation sont ensuite ajoutés électriquement dans un amplificateur de charges. Comme une synchronisation synchrone a été choisie pour la discrimination de la partie réelle et imaginaire du signal issu de l'amplificateur de charge, le premier DDS est utilisé pour la partie réelle alors qu'un troisième DDS à phase variable est nécessaire pour la partie imaginaire. A ce niveau, il est important de noter que le plan complexe subit une rotation de 90° à cause de l'amplificateur de charge, donc la résonance apparaît sur la partie imaginaire du signal.

La partie matérielle de la carte est contrôlée par un FPGA (Field Programmable Gate Array) qui supervise les commandes de l'ordinateur transmises par liaison USB (Universal Serial Bus). Le FPGA pilote chaque point du balayage en fréquence initié par la branche d'actionnement, de compensation et les paramètres en fréquence. Ainsi, pour chaque valeur de fréquence, il commande les trois DDS, les gains variables et le niveau de numérisation avant d'envoyer les données à l'ordinateur.

Enfin, pour pouvoir utiliser la carte électronique, un logiciel spécifique a été développé pour piloter l'ensemble des paramètres variables et permettre la calibration automatique de chaque micromembrane pour établir leurs paramètres de compensation. Sont ensuite générés des balayages en fréquence à partir des paramètres initiaux établis. Le système de multiplexage permet, pour ce prototype, des balayages sur huit membranes. Ainsi, les spectres en fréquence issus d'une ou plusieurs structures sont recueillis et affichés dans des fenêtres spécifiques. Une extrapolation non-linéaire par les équations mécaniques de la résonance des données recueillies permet d'utiliser l'ensemble des points (de 1000 à 4000 points par balayage) et ainsi, les paramètres d'intérêt tels que la fréquence de résonance et le facteur de qualité sont déterminés avec précision. L'extrapolation permet aussi d'éviter un moyennage sur les mesures obtenues pour chaque fréquence, augmentant la vitesse du système. Enfin, une dernière possibilité du logiciel concerne le suivi temps-réel de la fréquence de résonance et du facteur de qualité par balayages successifs. Là-encore, de une à huit micromembranes peuvent être utilisées en même temps. C'est donc un système complet qui a été développé, de l'implémentation électronique de la carte mêlant composants analogiques et numériques (cf. figure 3.19) à une interface logicielle conviviale pour une utilisation aisée, optimale et parallèle des micromembranes.

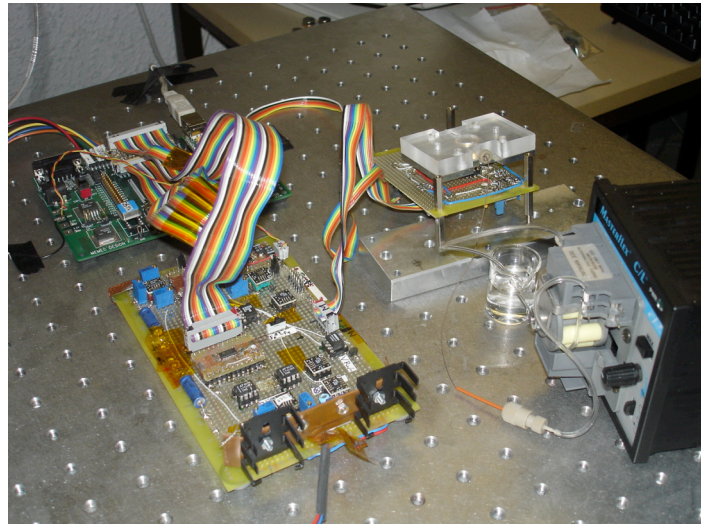


Figure 3.19 : Photographie du prototype de la carte électronique dédiée aux micromembranes.

III.5.4 Validation de la carte électronique par la caractérisation dynamique de micromembranes

La compensation dynamique de la capacité statique est nécessaire pour un rapport signal-sur-bruit élevé et pour déterminer ainsi avec précision la fréquence de résonance et le facteur de qualité des micromembranes fabriquées. Pour illustrer ces propos, la figure 3.20a) représente le spectre en fréquence de la même micromembrane que celle présentée sur la figure 3.1 mesuré avec la carte électronique spécifique, sans utiliser la compensation dynamique. Dans ce cas, une compensation statique pour une valeur de capacité est ajoutée au spectre initial en fréquence. Malgré la persistance d'une pente hors résonance, cette mesure valide déjà la capacité du système à actionner les structures et à détecter les charges générées par la couche piézoélectrique, permettant l'observation de la résonance.

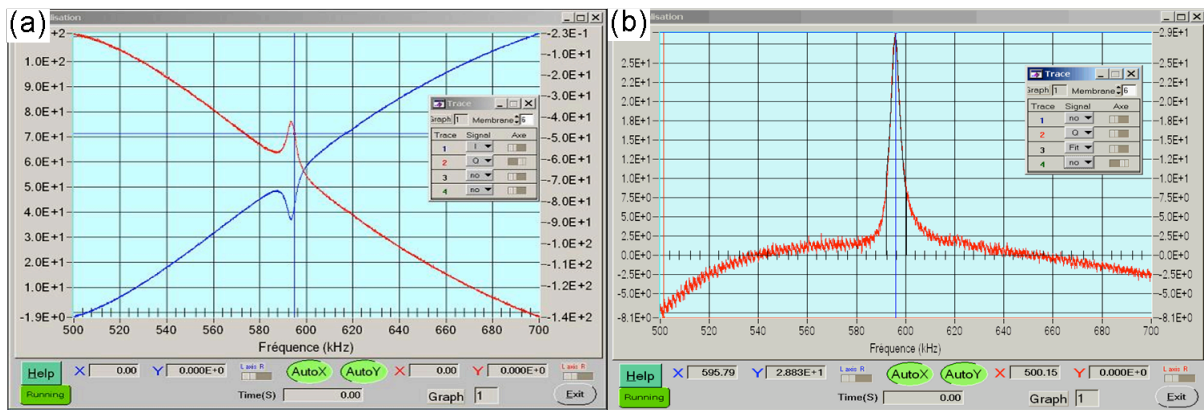


Figure 3.20 : Spectre de résonance mesuré par l'électronique dédiée pour une micromembrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$ a) avec une valeur de compensation et b) avec la compensation dynamique.

Ensuite, après la calibration automatique pour déterminer les paramètres de gain et phase de la compensation dynamique pour chaque point de fréquence hors résonance, la fonction générée permet d'obtenir un spectre où quasiment l'ensemble des effets des éléments parasites ont été supprimés, comme représenté sur la figure 3.20b). Malgré les légères imperfections du spectre hors résonance, la résonance apparaît clairement et la planéité de la courbe autour de la résonance est suffisante pour une extrapolation permettant une détermination précise de la fréquence de résonance et du facteur de qualité. Le manque de planéité pour une bande de fréquence supérieure à 100 kHz autour de la résonance provient principalement de la calibration de la courbe de compensation par un polynôme du second ordre, mais dont la fonction utilisée pour les mesures de spectres est réduite à un polynôme du premier ordre pour réduire les temps de calcul et faciliter l'implémentation électronique. Aussi, l'absence de compensation résistive dans ce prototype réduit la qualité de la compensation car cela induit une valeur de gain et de phase pour chaque fréquence du spectre. Néanmoins, un balayage de 20 kHz autour de la résonance est suffisant pour profiter de l'ensemble des points du pic dans l'extrapolation. La qualité des spectres obtenus valide ainsi la capacité de la carte électronique à extraire précisément les caractéristiques dynamiques des micromembranes, puisque le bruit de mesure sur la fréquence de résonance a été déterminé à 3 Hz dans l'air lors du suivi temps-réel de la fréquence. Cette validation a donc permis d'aborder un premier cas d'application concernant la calibration expérimentale de la sensibilité massique de micromembranes issues du lot de fabrication de génération 4.

III.5.5 Calibration en masse de micromembranes caractérisée par la carte électronique

Les matrices de micromembranes issues du lot de fabrication de génération 4 ont été conçues pour une utilisation en tant que biocapteur. Les dimensions des structures ($R_1 = 50 \mu\text{m}$, $R_2 = 100 \mu\text{m}$) sont identiques pour obtenir des caractéristiques dynamiques similaires, afin de rendre possible la comparaison des variations de fréquence lors des expériences de biorecognition en parallèle. L'optimisation des étapes de microfabrication offre une reproductibilité des fréquences de résonance intéressante puisque l'écart-type sur l'ensemble de la plaque n'excède pas 12 kHz pour une fréquence de résonance moyenne de 505 kHz dans l'air, ce qui représente une dispersion de l'ordre de 2.4 %. De plus, la déformation statique des

structures est faible (de l'ordre de - 300 nm), donc le modèle mécanique dynamique présenté en début de ce chapitre permet d'établir les caractéristiques théoriques des micromembranes. La valeur de fréquence de résonance théorique pour une micromembrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$ a été déterminée par le modèle égale à 502.7 kHz, ce qui représente une erreur entre la valeur théorique et la valeur moyenne expérimentale de 0.5 %. La cohérence des valeurs a ainsi permis d'aborder la calibration de la sensibilité massique des structures dans l'air au niveau théorique et de la corrélérer à des résultats expérimentaux.

La calibration en masse de structures résonantes est généralement faite par l'ajout contrôlé de masses sur la surface. Les masses ajoutées peuvent être uniformément réparties sur la surface (par le dépôt d'une couche métallique par exemple [15]) ou ponctuelles [15], c'est-à-dire que la dimension des masses ajoutées reste négligeable devant les dimensions globales de la structure. Dans notre cas, la calibration par ajout de masses ponctuelles a été choisie. En effet, des billes calibrées de silice de $1.57 \pm 0.06 \mu\text{m}$ de diamètre ont été déposées sur la surface d'une membrane par une micropipette connectée à un microinjecteur, système développé par Thierry Ondarçuhu au CEMES à Toulouse [16]. La carte électronique spécifiquement développée pour les structures a permis le suivi temps-réel de la fréquence de résonance lors du dépôt des différentes quantités de microbilles. Pour contrôler précisément le positionnement de la micropipette, elle a été montée sur un micromanipulateur. Ainsi, l'injection de billes en solution a été effectuée par dépôts successifs de gouttes de 5 à 30 μm de diamètre qui, après évaporation du solvant, comprennent de 2 à 40 particules. La calibration des micromembranes a donc été menée par mesure de la fréquence de résonance avant et après le dépôt des microbilles et corrélée à la variation de masse équivalente. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.21 et montrent tout d'abord une variation linéaire de la fréquence avec le nombre de billes. Cette variation a aussi été établie par le modèle via la sensibilité théorique massique qui, dans le cas de la micromembrane utilisée, donne une valeur de -0.471 pg/Hz pour une fréquence de résonance de 515 kHz. La bonne correspondance entre les variations théoriques et expérimentales de fréquence de résonance confirme les valeurs du modèle et détermine ainsi la sensibilité en masse des micromembranes dans l'air.

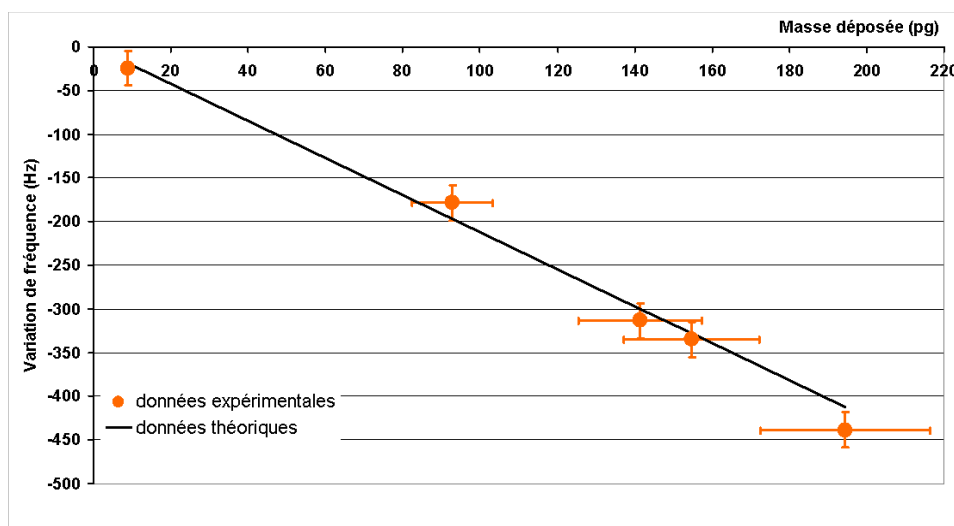


Figure 3.21 : Variation de la fréquence de résonance expérimentale et théorique lors de dépôts successifs de microbilles calibrées pour une micromembrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$.

Un autre paramètre d'importance pour la caractérisation des structures concerne la détermination de la masse minimum détectable. De manière générale, la quantité minimum détectable d'un mesurande peut être déterminée par rapport au bruit de mesure du phénomène physique permettant la transduction du mesurande, via la sensibilité [17]. Ainsi, la masse minimum détectable expérimentale peut être déterminée par la formule :

$$\partial M_{\min} = \text{Bruit}_{\text{fréquence}} S_n \quad (3.20)$$

Cette équation montre que la masse minimum détectable dépend non seulement des caractéristiques intrinsèques des structures, telles que la sensibilité, mais dépend aussi du système de détection de la fréquence de résonance. L'électronique dédiée a été développée dans un souci de bruit électronique minimum pour une détermination précise de la fréquence de résonance. Ainsi, dans l'air, le bruit de mesure, déterminé à 3 Hz (pour une bande passante de 1.5 MHz), permet le calcul d'une masse minimum détectable expérimentale par utilisation de la sensibilité massique :

$$\partial M_{\min_exp} = 1.417 \text{ pg}$$

Comparativement, la masse minimum détectable établie par l'équation théorique empirique (3.9) donne une valeur de 581.2 pg pour la micromembrane d'intérêt. Le rapport entre la valeur théorique et expérimentale est de 410, ce qui montre que l'équation théorique donne une limite supérieure pour cette quantité, mais éloignée de la valeur expérimentale. En effet, l'équation (3.9) est établie pour une variation de fréquence égale à la demi-largeur à mi-hauteur du pic de résonance. Or, dans le système électronique développé, l'utilisation d'une extrapolation des données augmente nettement la résolution de la mesure puisque la fréquence de résonance est déterminée à partir de l'ensemble des points du spectre de résonance et pas seulement la valeur où l'amplitude est maximale. Ainsi, le bruit de mesure est largement réduit et cet effet se traduit par une masse minimum détectable expérimentale faible par rapport à la valeur théorique. Ce sont donc des valeurs de sensibilité assez élevées et une masse minimum détectable faible qui caractérisent les micromembranes dans l'air.

En ce qui concerne les propriétés des structures en milieu liquide, une première étape consiste en la validation de leur comportement en utilisant la carte électronique dédiée. La micromembrane calibrée dans l'air a été soumise à différents mélanges eau-glycérol, conformément aux expériences réalisées lors de la caractérisation dynamique des structures par analyse d'impédance. Le suivi temps-réel de la fréquence de résonance, présenté sur la figure 3.22, montre que l'allure de la courbe est similaire à celle obtenue avec l'analyseur d'impédance (cf. figure 3.15), les variations de fréquence étant différentes à cause de la sensibilité massique (membranes identiques en géométrie mais issues de deux lots de fabrication). Ce résultat valide néanmoins la capacité de l'électronique dédiée à détecter la fréquence de résonance des micromembranes en milieu liquide.

Néanmoins, la calibration expérimentale des structures en milieu liquide n'a pas encore été achevée, à cause de la localisation difficile de masses à la surface des structures. Une possibilité pour déterminer une sensibilité expérimentale en milieu liquide consiste en l'adsorption de nanoparticules fonctionnalisées et calibrées en masse sur une micromembrane aussi fonctionnalisée pour l'accroche des particules sur la surface [18]. Mais cette technique ne permet pas un contrôle de la quantité de nanoparticules adsorbées sur la surface. Une autre possibilité serait de contrôler l'adsorption de particules calibrées par l'intermédiaire d'un concentrateur électroosmotique qui attire les espèces à détecter sur la surface, tel que celui

développé par Laurent Tanguy dans le cadre de sa thèse [19]. Il reste néanmoins plausible que la cohérence des résultats théoriques et expérimentaux obtenus dans l'air permet d'étendre les valeurs théoriques au milieu liquide, par l'intermédiaire du modèle de Lamb, validé précédemment. Ainsi, une estimation de la sensibilité massique des micromembranes en milieu liquide a été calculée à partir des valeurs dans l'air et donne :

$$S_{0_liq} = -1.273 \text{ pg/Hz}$$

Par contre, la méthode utilisée pour la détermination expérimentale de la masse minimum détectable dans l'air peut être appliquée en milieu liquide. Le suivi de la fréquence de résonance a permis de déterminer un bruit de mesure de 9 Hz en milieu liquide, ce qui donne une masse minimum détectable de :

$$\partial M_{\min_exp_liq} = 11.45 \text{ pg}$$

Comme pour l'air, la masse minimum détectable expérimentale est meilleure que la valeur théorique, puisque la valeur donnée par le modèle est de 809.8 pg. Néanmoins, malgré un facteur 3 de réduction de la sensibilité, celle-ci est assez élevée et la masse minimum détectable reste faible. Les performances des micromembranes couplées à la résolution de l'électronique dédiée permettent ainsi d'aborder l'utilisation des structures en tant que biocapteur.

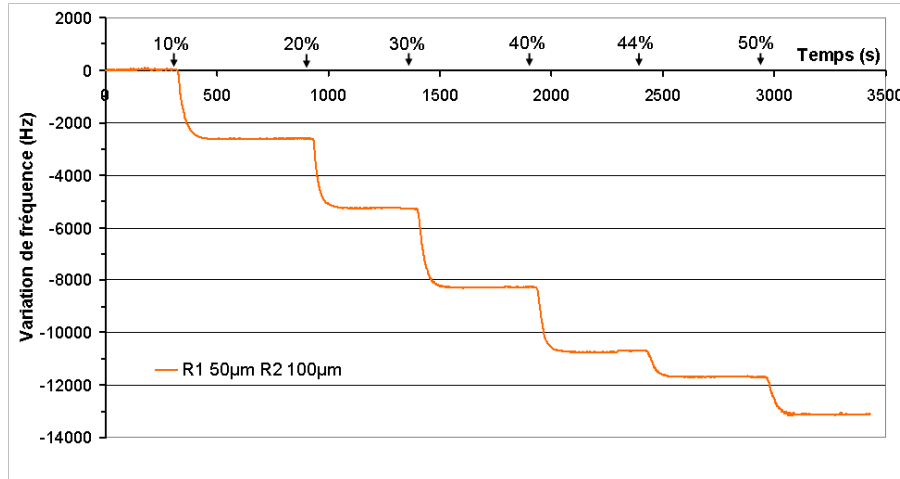


Figure 3.22 : mesure temps-réel de la fréquence de résonance par l'électronique dédiée lors de l'injection en flux de différents mélanges eau-glycérol (le pourcentage représente la proportion en masse de glycérol) sur une micromembrane où $R_1 = 50 \mu\text{m}$ et $R_2 = 100 \mu\text{m}$.

III.6 Conclusion

Dans ce chapitre, la capacité de micromembranes à actionnement et détection intégrées a été étudiée et optimisée, aussi bien dans l'air qu'en milieu liquide. Cette étude a permis d'établir les performances dynamiques des structures qui, grâce à une carte électronique dédiée, offrent la possibilité de mesures résolutive de fréquence de résonance et de facteur de qualité, en mode multiplexé. L'ensemble des caractéristiques des micromembranes sont résumées dans le tableau 3.3 et comparées à celles de biocapteurs commerciaux de référence : la résonance plasmonique de surface (SPR) et la microbalance à quartz (QCM). Au-delà des

performances physiques des outils, d'autres critères méritent maintenant d'être pris en compte. C'est pourquoi, même si les matrices de micromembranes ont une sensibilité massique inférieure à celle de la SPR (mais meilleure que celle de la QCM), d'autres avantages tels que le multiplexage quasiment illimité ou la facilité de transport permettent d'envisager des expériences sur le terrain, ouvrant d'autres champs d'application. C'est donc un compromis de différentes caractéristiques qui fait la force des structures développées en proposant des aptitudes qui ne sont encore que peu prises en compte pour les biocapteurs, mais dont le besoin est une réalité [20]. Il reste maintenant à démontrer expérimentalement l'utilisation des micromembranes pour la détection d'espèces biologiques, en adéquation avec les capacités mises en évidence.

	Gamme de fréquence	Sensibilité massique en milieu liquide	Masse minimum détectable (pg)	paramètres mesurés	Multiplexage intégré	Portabilité	Convivialité
SPR (Biacore 3000)	-	-1 pg/(mm ² .RU)	2	1 (angle de l'onde réfléchie)	4 canaux	impossible	moyenne (besoin de programmation)
QCM (QCM-D 300 ou E4)	5 ou 10 MHz	-177 pg/(mm ² .Hz) ou -0.001 (Hz/MHz)/(pg/mm ²)	2800	2 (fréquence de résonance et dissipation)	non	difficile	bonne
Micromembranes	100 kHz - 1 MHz	-42.9 pg/(mm ² .Hz) ou -0.13 (Hz/MHz)/(pg/mm ²)	11.45	2 (fréquence de résonance et facteur de qualité)	16 membranes actuellement	aisée	bonne

Tableau 3.3 : Récapitulatif des caractéristiques des micromembranes comparées à celles des biocapteurs commerciaux de référence.

Références

- [1] R. D. Blevins, *Formulas for Natural Frequency and Mode Shape* (1979), New York, USA.
- [2] M. L. Roukes, *Technical digest of the Solid-State Sensor and Actuator Workshop* (2000), 367.
- [3] J. E. Sader, *J. Appl. Phys.*, 84 (1) (1998), 64.
- [4] H. Lamb, *Proc. Royal Soc. London A*, 98 (1920), 205.
- [5] L. Meirovitch, M. Kwak, *AIAA Journal*, 28(8) (1990), 1509.
- [6] Y. A. Ilinskii, B. Lipkens, T. S. Lucas, T. W. Van Doren, E. A. Zabolotskaya, *J. Acoust. Soc. Am.*, 104(5) (1998), 2664.
- [7] L. Nicu, C. Bergaud, *J. Micromech. Microeng.*, 14(5) (2004), 727.
- [8] C. Gui, R. Legtenberg, H. A. C. Tilmans, J. H. J. Fluitman, M. Elwenspoek, *J. Microelectromech. Syst.*, 7(1) (1998), 122.
- [9] Y. Kim, *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, 50(12) (2003), 1683.
- [10] A. C. Guyton, J. E. Hall, *Textbook of Medical Physiology, 10th edition* (2000), W. B. Sanders, Philadelphia, USA.
- [11] C. Bergaud, L. Nicu, *Rev. Sci. Instrum.*, 71 (2000), 2487.
- [12] S. Boskovic, J. W. M. Chon, P. Mulvaney, J. E. Sader, *J. Rheol.*, 46 (2002), 891.
- [13] C. Lee, T. Itoh, T. Suga, *Sens. Actuators A*, 72 (1999), 179.
- [14] J. D. Adams, L. Manning, B. Rogers, M. Jones, S. C. Minne, *Sens. Actuators A*, 121 (2005), 262.
- [15] H. Campanelle, J. Esteve, J. Montserrat, A. Uranga, G. Abadal, N. Barniol, A. Romano-Rodriguez, *Appl. Phys. Lett.*, 89 (2006), 033507.
- [16] C. Ayela, T. Alava, D. Lagrange, D. Remiens, C. Soyer, T. Ondarçuhu, A. Greve, L. Nicu, *IEEE Sensors Journal*, sous presse.
- [17] K. K. Park, H. J. Lee, G. G. Yaralioglu, A. S. Ergun, Ö. Oralkan, M. Kupnik, C. F. Quate, B. T. Khuri-Yakub, T. Braun, J-P. Ramseyer, H. P. Lang, M. Hergner, C. Berger, J. K. Gimzewski, *Appl. Phys. Lett.*, 91 (2007), 094102.
- [18] M. Guirardel, L. Nicu, D. Saya, Y. Tauran, E. Cattan, D. Remiens, C. Bergaud, *Jap. J. Appl. Phys.*, 43(1A/B) (2004), L111.
- [19] L. Tanguy, Thèse doctorat en cours sous la direction de L. Nicu, Université de Toulouse.
- [20] M. Urdea, L. A. Penny, S. S. Olmsted, M. Y. Giovanni, P. Kaspar, A. Shepherd, P. Wilson, C. A. Dahl, S. Buchsbaum, G. Moeller, D. C. Hay Burgess, *Nature*, S1 (2006), 74.

CHAPITRE IV : Détection d'espèces biologiques par des biocapteurs sans marquage

IV.1 Introduction

Dans le domaine des biocapteurs, les travaux de recherche concernent essentiellement la couche biologique sensible pour optimiser la spécificité de la reconnaissance biologique, et la méthode de transduction pour améliorer la sensibilité de la transduction. Dans les chapitres précédents, les études présentées ont permis d'élaborer les conditions adaptées à un fonctionnement de type biocapteur à partir des structures de type micromembranes. Cependant, la détection de biomolécules dans des milieux complexes tels que des sérums nécessite une couche biologique favorable à une reconnaissance hautement spécifique. C'est pourquoi, nous avons utilisé les outils de référence tels que la résonance plasmonique de surface (SPR) et la microbalance à quartz (QCM) pour optimiser la couche biologique sensible, dans le but de détecter des anticorps contenus dans un sérum par des antigènes immobilisés sur or. Le modèle biologique concerne le diabète de type I, dont le diagnostic peut être fait par la recherche d'autoanticorps dans le sérum.

Pour diversifier les surfaces d'accroche et faciliter le protocole d'immobilisation d'antigènes (sur un cas modèle), des études à la QCM sur l'accroche de Poly-L-lysine PEG fonctionnalisées sur dioxyde de silicium et l'interaction avec des anticorps ont été effectuées, avant de démontrer la faisabilité de ce protocole sur les micromembranes dont le fonctionnement a été optimisé. A cause du faible rendement de fabrication des structures, seuls des travaux sur dioxyde de silicium comme couche d'accroche ont pu être réalisés. Néanmoins, le modèle biologique choisi est suffisant pour des études préliminaires de reconnaissance biologique en milieu liquide et temps-réel grâce aux micromembranes et pour montrer la capacité de ces structures à fonctionner comme des biocapteurs.

De plus, les problèmes liés à l'utilisation de biorécepteurs naturels ont sollicité notre intérêt pour les polymères à empreinte moléculaire (MIP) et leur combinaison avec des microstructures résonantes. Une étude approfondie sur la fonctionnalisation individuelle de membranes par des MIP et la polymérisation a été faite avant de s'intéresser à la transduction parallèle du phénomène d'impression, caractéristique de ces polymères. La qualité des résultats obtenus permet ainsi de combiner les avantages liés à l'utilisation de microsystemes électromécaniques, tels que la sensibilité, l'adressage parallèle ou la robustesse, et ceux des polymères à empreinte moléculaire, tels que la stabilité dans le temps ou la résistance aux conditions environnantes.

IV.2 Reconnaissance temps-réel, sans marquage d'anticorps par une couche biologique optimisée

IV.2.1 SPR et QCM-D pour la détection d'anticorps dans un sérum

IV.2.1.1 Motivations

Le diabète de type I, dit diabète insulino-dépendant, est une maladie autoimmune qui se traduit par une réponse immunitaire contre des protéines normalement tolérées par le système immunitaire [1]. Il en résulte la présence d'autoanticorps dans le sérum de patients dirigés contre deux protéines : la GAD et l'IA-2. Or, à l'heure actuelle, ces anticorps, marqueurs de la pathologie, sont détectés par des outils de radioimmunologie, coûteux et lourds à mettre en œuvre puisqu'ils nécessitent la manipulation de radio-éléments. C'est pourquoi, des techniques alternatives, basées sur la reconnaissance sans marquage des anticorps par des antigènes immobilisés, ont été mises en œuvre. Pour cela, une étude a été récemment publiée sur la détection d'anticorps anti-GAD par la protéine GAD immobilisée sur un biocapteur SPR [2]. Dans le contexte de la protéine IA-2, nous avons choisi un modèle basé sur un peptide synthétique de quinze acides aminés de la partie juxtamembranaire de la protéine (résidus 668-682) et des anticorps polyclonaux contre ce peptide. Pour optimiser la détection des anticorps, une étude complémentaire par SPR et QCM a été développée pour déterminer une limite de détection par SPR des anticorps anti-peptide dans un sérum humain. Cependant, ces travaux d'optimisation passent tout d'abord par une immobilisation des peptides favorable à une biorecognition spécifique.

IV.2.1.2 Immobilisation de peptides sur surface d'or et étude de l'interaction avec les anticorps anti-peptide

La structure linéaire de peptides et leur synthèse aisée font qu'ils sont un matériel de choix à immobiliser à la surface des biocapteurs. En effet, les difficultés liées aux protéines sont de plusieurs ordres : tout d'abord, au niveau de l'obtention de protéines recombinantes suffisamment pures et antigéniquement réactives une fois purifiées ; ensuite, la structure tertiaire de protéines limite leur immobilisation contrôlée à la surface d'un support et le maintien de l'antigénicité après immobilisation. C'est pourquoi, après l'étude approfondie de la structure de la protéine IA-2, a été synthétisé (selon la référence [3]) un peptide antigénique de quinze acides aminés dont la séquence est : CYGSPSSHSSTPSWSEEP. Ce peptide, que l'on nommera P pour des raisons de lisibilité, comprend au niveau du N-terminal un résidu de trois acides aminés (CYG) qui sert de bras espaceur et présente une fonction thiol utilisée pour l'immobilisation covalente sur la surface du transducteur.

De manière générale, l'immobilisation de biorécepteurs sur une surface d'or peut être faite par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée (SAM) de groupements alkane thiols. Dans notre cas d'étude, une SAM de MUA (11-mercaptoundecanoic acid) est utilisée, les fonctions carboxyliques seront utilisées pour le couplage covalent des peptides. Un contrôle de la quantité de biorécepteurs à la surface du transducteur est souhaitable pour favoriser leur accessibilité par les anticorps anti-peptide et ainsi diminuer l'encombrement stérique. La densité de groupes fonctionnels -COOH peut être réduite en utilisant une SAM mixte, ici un mélange de MUA (11-mercaptoundecanoic acid) et MUD (11-mercaptop-1-undecanol), ce dernier apportant un groupe fonctionnel hydroxyle -OH non fonctionnalisable dans nos conditions. L'activation des groupements carboxyles de la monocouche est faite par action de NHS (N-hydroxysuccinimide) / EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) qui permet à l'ester actif ainsi formé de réagir avec les fonctions amines (figure 4.1) du PDEA (2-(2-pyridinyldithio)ethaneamine). Ce réactif bifonctionnel PDEA comporte un pont disulfure qui lui permet de réagir par échange de thiol avec le résidu cystéine N-terminal du peptide. Le peptide P peut être ainsi couplé de manière

covalente à la surface d'or du transducteur. Par une étape finale de saturation, une solution composée de cystéine permet de neutraliser les groupements -COOH activés n'ayant pas réagi avec les peptides (le protocole expérimental détaillé est donné dans la référence [4]).

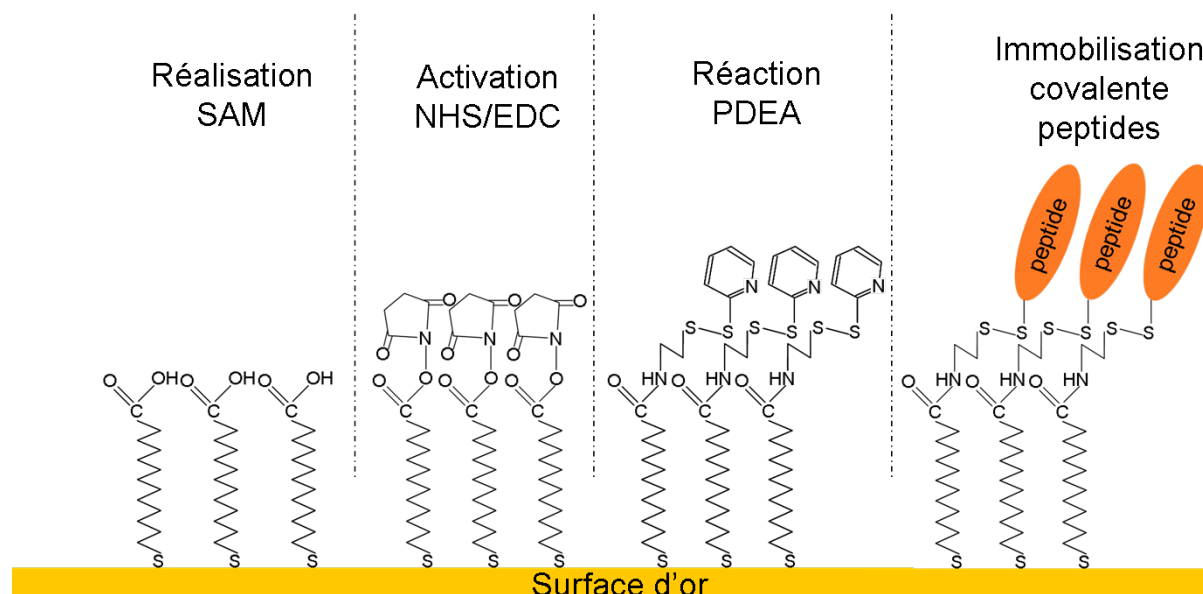


Figure 4.1 : Schéma simplifié du protocole mis en œuvre sur surface d'or.

Hormis la formation de la monocouche autoassemblée, l'ensemble des étapes présentées ont été suivies en temps-réel par SPR dans un appareil Biacore 3000. Pour valider les optimisations sur la détection des anticorps anti-P par les peptides P, un peptide irrelevante issu de la thyroïde peroxidase humaine (appelé T et de formule CYGARLRDSGRAYLPFVPP) est immobilisé de la même façon que P, sur un autre canal, et nous disposons de son anticorps spécifique anti-T. Un troisième canal est un canal dit « contrôle » sur lequel est réalisée la chimie de couplage mais sans le peptide. Le multiplexage possible sur quatre canaux de l'appareil Biacore 3000 permet de réaliser et de suivre les interactions simultanément sur nos 3 canaux.

La première étape d'optimisation concerne la variation du niveau de réponse de l'anticorps en fonction du niveau d'immobilisation du peptide. Pour cela, en utilisant la même concentration en peptide (100 $\mu\text{g/ml}$), nous avons fait varier le temps d'injection du peptide et mesurer les différents niveaux d'immobilisation obtenus sur une SAM composée uniquement de fonctions carboxyles (appelée SAM_{100% COOH}). Les résultats, présentés sur la figure 4.2, montrent que pour un temps d'injection inférieur à 15 minutes, la densité de peptides augmente avec le temps d'injection ainsi que la réponse anticorps (voir insert de la figure 4.2) alors que pour un temps d'injection supérieur à 15 minutes, la réponse anticorps atteint un maximum encore dépendant de la concentration en anticorps. Ainsi, pour un temps d'injection de peptide de 24 minutes, la densité atteint 250 pg/mm^2 sur une SAM composée à 100 % de MUA pour un niveau de reconnaissance des anticorps de 101 pg/mm^2 et 206 pg/mm^2 aux concentrations de 1 $\mu\text{g/ml}$ et 2 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Les concentrations en anticorps choisies inférieures ou égales à 2 $\mu\text{g/ml}$ seront compatibles avec le taux d'anticorps détectés dans le sérum de patient [4]. Les niveaux de réponses SPR obtenus (<200 RU) seront compatibles avec les études cinétiques comparatives que nous voulons réaliser.

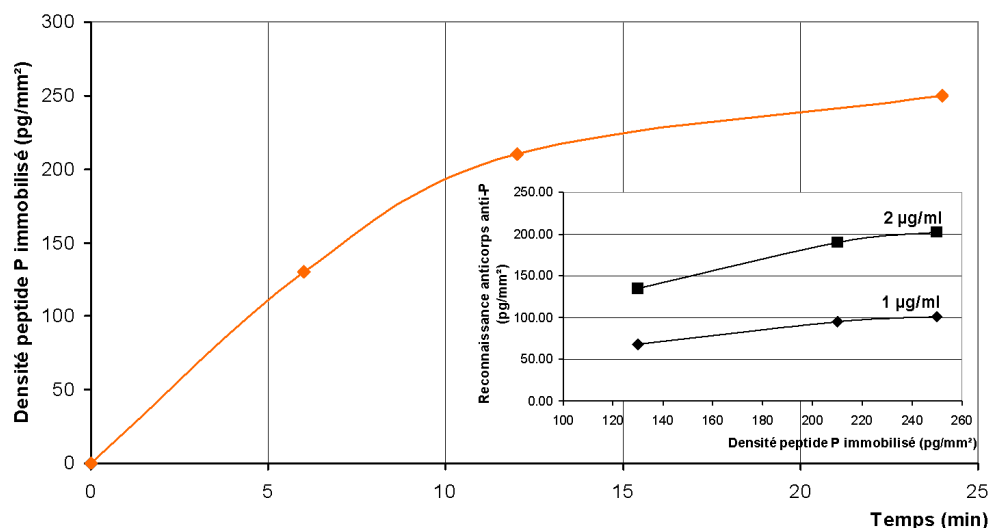


Figure 4.2 : Influence du temps d'injection sur la densité de peptides immobilisés. L'insert montre le niveau de reconnaissance des anticorps par les peptides pour les différents temps d'immobilisation de peptides.

Maintenant que le temps optimum d'incubation pour l'immobilisation des peptides est établi, il est intéressant d'étudier l'influence de la quantité de peptides immobilisés sur la réponse des anticorps anti-peptide. Pour contrôler la densité de biorécepteurs à la surface du transducteur, nous avons fabriqué des monocouches comprenant différentes quantités de fonctions hydroxyles et carboxyles, les fonctions carboxyles étant les seules réactives dans notre protocole d'immobilisation. Ainsi, trois types de SAM ont été réalisés : une première ne comportant que des fonctions actives carboxyles ($\text{SAM}_{100\% \text{ COOH}}$), une deuxième comprenant autant de fonctions hydroxyles que carboxyles ($\text{SAM}_{50\% \text{ COOH}}$) et une dernière composée de 25 % de fonctions carboxyles et 75 % de fonctions hydroxyles ($\text{SAM}_{25\% \text{ COOH}}$). L'intérêt dans le contrôle de la quantité de peptides immobilisés provient du fait qu'en diminuant le nombre de groupements réactifs $-\text{COOH}$, l'accessibilité des peptides peut être accrue [5] et les interactions non-spécifiques au niveau de la couche peuvent être réduites, grâce à une meilleure résistance des fonctions hydroxyles aux interactions non-spécifiques par rapport aux fonctions carboxyles [6]. Ces deux effets peuvent résulter en un rapport signal-sur-bruit (défini par le rapport entre les interactions spécifiques et non-spécifiques) amélioré.

Pour valider le respect des rapports entre les groupements hydroxyles et carboxyles dans la composition de la SAM, le niveau d'immobilisation de peptides a été mesuré pour chaque monocouche préparée. Les résultats, présentés sur la figure 4.3a), montrent une proportionnalité acceptable entre le nombre de groupements carboxyles introduit dans la SAM et le niveau d'immobilisation de peptides obtenu. Mais c'est au niveau de l'interaction avec les anticorps anti-peptide que l'influence de la quantité de peptides immobilisés est révélée. Comme le montre la figure 4.3b), le niveau de réponse en RU des anticorps ramené par unité de densité de peptide immobilisé (soit 1 RU) varie selon la composition de la monocouche. Une augmentation linéaire de ce rapport avec la concentration en anticorps peut être observée et la pente pour chacune des trois SAM décroît avec l'augmentation de la densité de peptides immobilisés. En effet, la pente calculée vaut 2.53 pour la $\text{SAM}_{25\% \text{ COOH}}$, 1.53 pour la $\text{SAM}_{50\% \text{ COOH}}$ et 0.48 pour la $\text{SAM}_{100\% \text{ COOH}}$. Ces résultats montrent que le niveau de réponse des anticorps est meilleur pour la monocouche comportant 25 % de fonctions actives, ce qui indique un compromis intéressant entre le niveau de réponse anticorps obtenu et la limitation des probables effets d'encombrement stérique, se traduisant par une accessibilité accrue.

Ainsi, l'optimisation de la composition de la couche permet de mieux contrôler le taux de d'immobilisation des peptides et permet d'optimiser la capacité de réponse des anticorps. De plus, la généricité du protocole établi permet d'envisager son transfert à la microbalance à quartz (QCM) et comparer non seulement le comportement des deux transducteurs (SPR et QCM-D) au niveau de l'immobilisation, mais aussi en termes de cinétique d'interaction entre les peptides et les anticorps anti-peptide.

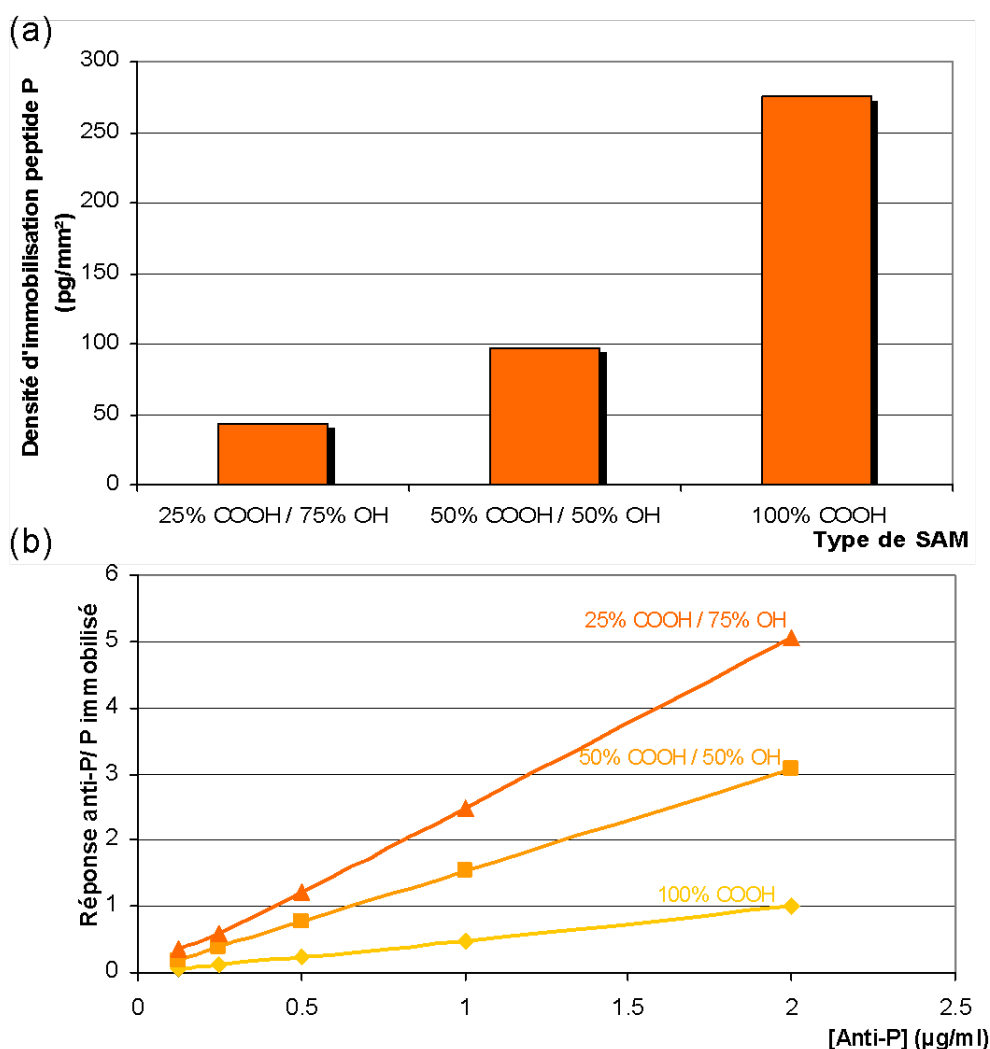


Figure 4.3 : (a) Influence de la composition de la monocouche autoassemblée (SAM) sur la densité de peptides immobilisés à la saturation. (b) Influence de la concentration en anticorps spécifiques anti-P sur le niveau de reconnaissance ramené par unité de densité de peptides immobilisés.

La faisabilité par QCM du protocole d'immobilisation des peptides établi par SPR a débuté par une calibration des temps d'incubation nécessaires à chaque étape du protocole sur deux monocouches : une première SAM composée à 50 % de fonctions actives COOH et 50 % de fonctions OH et une seconde comportant 25 % de groupes carboxyles et 75 % de groupes hydroxyles. Une fois le protocole réalisé, nous avons comparé les niveaux de densité massique mesurés par les deux technologies. Les valeurs sont présentées dans le tableau 4.1 et montrent que les rapports $\Delta m_{\text{SPR}}/\Delta m_{\text{QCM}}$ mesurés à la saturation sont proches de un pour les deux compositions de SAM. Ces résultats traduisent la généricité du protocole puisque les

niveaux de masse ramenés à l'aire de la surface d'accroche du transducteur sont similaires pour les deux outils utilisés. Mais la QCM mesure aussi la contribution de l'eau emmagasinée dans la couche présente sur la surface d'or (la QCM mesure une masse humide alors que la SPR mesure une masse sèche) par l'intermédiaire de la dissipation. Or, la nature peptidique des biorécepteurs immobilisés limite le fait que les molécules d'eau du milieu soient piégées dans la couche, se traduisant par une faible variation de la dissipation lors de l'immobilisation des peptides. Ce résultat confirme l'équivalence des variations de masse mesurées par QCM et SPR et valide ainsi le transfert du protocole établi par SPR à la QCM.

SAM	$\Delta m_{\text{SPR}}/\Delta m_{\text{QCM}}$	ΔD_{QCM}
SAM _{25% COOH}	1	$-0.26 \cdot 10^{-6}$
SAM _{50% COOH}	0.99	$-0.3 \cdot 10^{-6}$

Tableau 4.1 : Rapport des densités de peptides immobilisés obtenues par QCM et SPR pour deux types de SAM et variation de la dissipation mesurée par QCM.

Une nouvelle étape dans la validation de la couche biologique sensible concerne la dynamique de l'activité antigénique des peptides immobilisés. Même si la reconnaissance des anticorps anti-peptide par les peptides a été précédemment validée par SPR (cf. figure 4.3b)), il est intéressant de comparer la cinétique d'interaction obtenue par SPR et QCM. Pour effectuer cette comparaison, la SAM_{50% COOH} fonctionnalisée avec le peptide P a été utilisée et les anticorps anti-P ont été injectés à différentes concentrations à un débit de 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ (débit élevé pour limiter les effets de transfert de masse) pour les deux techniques. Tout d'abord, comme le montre la figure 4.4, les concentrations d'anticorps utilisées à la QCM sont plus élevées que celles utilisées à la SPR. Cela provient de la sensibilité massique plus faible de la QCM, par rapport à celle de la SPR. Cependant, une variation de masse révélant la reconnaissance des anticorps est observée par SPR et QCM et un effet dose traduisant l'influence de la concentration en analyte sur le niveau de la réponse a aussi pu être mesuré. La comparaison des cinétiques d'interaction peut donc être effectuée. Pour cela, un modèle cinétique du second ordre a été choisi afin de tenir compte de la bivalence des anticorps. En effet, la présence de deux paratopes sur un anticorps peut induire des effets d'avidité influant sur la cinétique de l'interaction. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.2. Avec ce modèle, les constantes d'affinité mesurées par SPR et QCM sont comparables, même si des différences sont observées au niveau des constantes d'association et dissociation. Ces différences peuvent provenir de la concentration élevée en anticorps injectée à la QCM qui augmente la probabilité que des effets de transfert de masse puissent apparaître. Aussi, il a été démontré dans la littérature que le mode d'injection des analytes influe sur la cinétique [7]. Or, dans le cas de la QCM, la circulation du flux est circulaire alors que dans le cas de la SPR, le flux est linéaire.

Ces résultats cinétiques, bien qu'imparfaits, démontrent que le protocole d'immobilisation mis au point par SPR peut s'adapter aussi à la QCM et valident ainsi la genericité du protocole établi pour l'immobilisation de peptides sur surface d'or, ainsi que la dynamique de la reconnaissance des anticorps anti-peptide. Mais, jusqu'à présent, seule l'interaction spécifique anticorps anti-P/P a été prise en compte. Or, pour une biorecognition performante, les interactions non-spécifiques doivent être minimales. C'est pourquoi, nous avons étudié le rapport signal-sur-bruit mesuré par SPR afin d'optimiser la couche. Le choix d'utilisation de la SPR provient du multiplexage des canaux, pour une étude simultanée des interactions spécifiques et non-spécifiques.

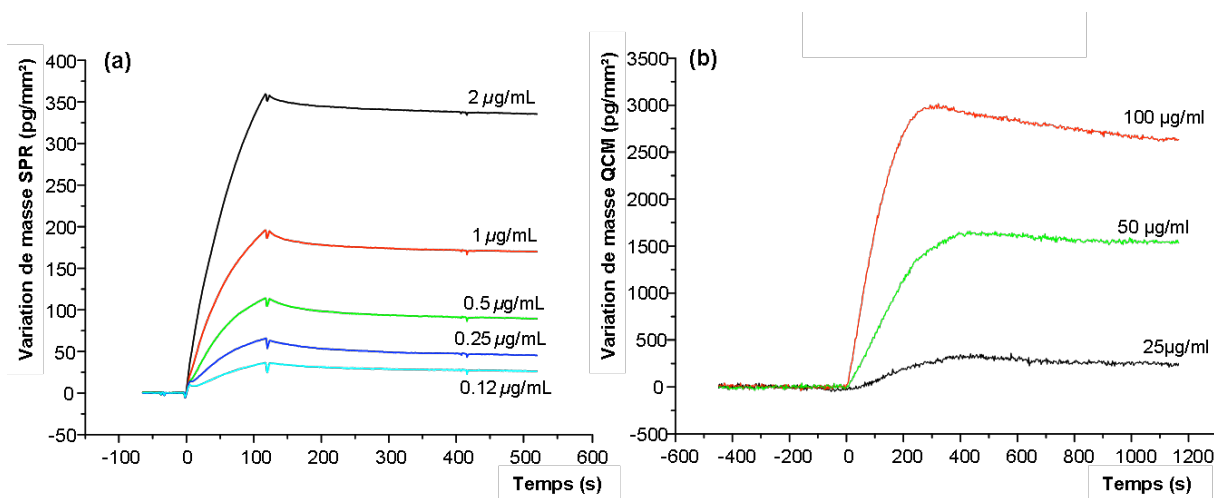


Figure 4.4 : Influence de la concentration en anticorps anti-P sur le niveau de reconnaissance mesurée par (a) SPR et (b) QCM.

Transducteur	Modèle cinétique	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
SPR	Second ordre bivalent	$(5.77 \pm 0.18) \cdot 10^4$	$(4.51 \pm 0.25) \cdot 10^{-2}$	$(7.81 \pm 0.49) \cdot 10^{-7}$
QCM	Second ordre bivalent	$(2.69 \pm 0.31) \cdot 10^3$	$(1.35 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	$(5.01 \pm 0.63) \cdot 10^{-7}$

Tableau 4.2 : Constantes cinétiques de l'interaction spécifique anti-P/P obtenues par QCM et SPR.

IV.2.1.3 Optimisation du rapport signal-sur-bruit

Pour évaluer la contribution des interactions non-spécifiques sur les trois types de monocouches fabriquées (SAM_{100%} COOH, SAM_{50%} COOH et SAM_{25%} COOH), le peptide spécifique P et le peptide irrelevante T sont immobilisés à la même densité massique sur deux canaux du transducteur SPR. La reconnaissance des anticorps anti-P est ensuite mesurée simultanément sur les deux canaux fonctionnalisés pour cinq concentrations d'anticorps (de 0.125 µg/ml à 2 µg/ml). Le rapport signal-sur-bruit est défini par le rapport entre le niveau de liaison lors de l'interaction spécifique anti-P/P et le niveau de liaison lors de l'interaction non-spécifique anti-P/T. Les résultats obtenus pour les trois compositions de SAM sont présentés sur la figure 4.5a). D'après ce graphique, les plus fortes valeurs de rapport signal-sur-bruit sont obtenues avec la SAM_{25%} COOH suivie de la SAM_{50%} COOH quelque soit la concentration en anticorps. Ces courbes montrent aussi que le rapport augmente légèrement avec la concentration en anticorps, ce qui laisse supposer que les interactions non-spécifiques varient peu avec l'augmentation de la concentration alors que les interactions spécifiques suivent un effet dose. Ainsi, même si les interactions spécifiques sont au moins cinq fois supérieures aux interactions non-spécifiques (sauf dans les plus faibles concentrations où il est de quatre environ), il est nécessaire d'améliorer encore ce rapport signal-sur-bruit en prévision du passage de sérum (milieux complexes très chargés en protéines).

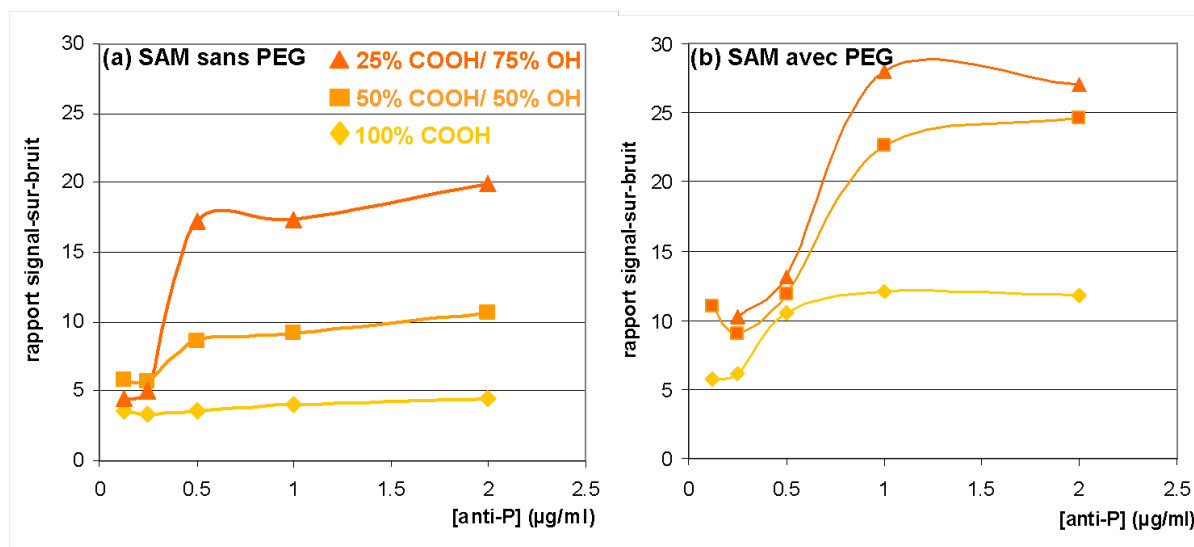


Figure 4.5 : Influence de la composition de la SAM sur le rapport signal-sur-bruit pour (a) des monocouches sans chaînes polyéthylène glycol (PEG) et (b) des monocouches avec des chaînes PEG. Le rapport signal-sur-bruit correspond au rapport entre le niveau obtenu pour l'interaction spécifique anti-P/P et l'interaction non-spécifique anti-P/T.

De manière générale, à l'origine des interactions non-spécifiques, il y a entre autres des liaisons de type hydrophobe-hydrophobe entre les protéines et la SAM. L'introduction de chaînes polyéthylène glycol (PEG) hydrophiles dans la couche limite les effets d'adsorption passive des protéines [8,9]. C'est pourquoi, lors de la réalisation de la monocouche autoassemblée, nous avons remplacé les molécules à chaînes aliphatiques MUA et MUD par des dérivés contenant six chaînes PEG supplémentaires, donnant des molécules SH-(CH₂)₁₁-(O-CH₂-CH₂)₆-O-CH₂-COOH et SH-(CH₂)₁₁-(O-CH₂-CH₂)₆-O-CH₂-OH, respectivement. Les monocouches formées par ces molécules permettent d'immobiliser les peptides à des niveaux comparables à ceux obtenus sur les SAM sans PEG (résultats non montrés). L'étude des rapports signal-sur-bruit a donc pu être menée et les niveaux comparés à ceux obtenus sans les chaînes PEG. Les résultats, présentés sur la figure 4.5b), montrent tout d'abord que le rapport signal-sur-bruit est plus élevé lors de l'introduction des chaînes PEG, comparativement au rapport obtenu sur les monocouches initiales. Aussi, une nette augmentation du rapport pour les SAM PEG 25% COOH et 50% COOH peut être observée pour une concentration en anticorps anti-P supérieure ou égale à 1 µg/ml.

L'ensemble des résultats obtenus, que ce soit au niveau de l'interaction spécifique anti-P/P qu'au niveau des interactions non-spécifiques, montre que la SAM comprenant des chaînes PEG et composée à 25% de fonctions carboxyles et 75% de fonctions hydroxyles donne les meilleures performances. Nous avons donc choisi d'utiliser cette monocouche pour les expériences de détection des anticorps dans un sérum humain.

IV.2.1.4 Vers une application diagnostic : reconnaissance d'anticorps dans un sérum humain

Avant d'étudier la concentration minimum détectable d'anticorps anti-peptide dans un sérum humain, il est intéressant de s'attarder sur le comportement de la monocouche fonctionnalisée en termes d'interactions non-spécifiques lors de l'injection de sérum humain. Pour cette étude, un mélange de trois sérums humains sains (provenant de l'Etablissement

Français du Sang) dilué 100 fois a été utilisé sur une monocouche fonctionnalisée avec les peptides P comprenant des chaînes PEG et composée de 25% de groupes COOH et 75% de groupes OH. Comme ces travaux concernent une étude comportementale, la QCM a été utilisée, non seulement pour quantifier les interactions non-spécifiques induites par le sérum, mais aussi approfondir les propriétés viscoélastiques de la couche dans cette configuration. En effet, des détergents sont souvent utilisés pour réduire les adsorptions non-spécifiques induites par les protéines du sérum. Mais la présence de détergent peut changer les propriétés d'une protéine en affectant sa structure et ainsi affecter les interactions à étudier. Aussi, les informations données par la dissipation permettent d'étudier l'effet sur la couche de détergents mélangés à un sérum. Dans notre cas, plusieurs surfactants ont été testés et les meilleurs résultats ont été obtenus avec le N-lauroylsarcosine (communément appelé sarkosyl). Comme le montre la figure 4.6a), la seule injection de sérum dilué au 1 :100 donne une nette diminution de la fréquence de résonance, indiquant un fort niveau d'adsorption non-spécifique des protéines du sérum. Par contre, l'addition de sarkosyl à des taux de 0.25%, 0.5% et 1% au sérum réduit les interactions non-spécifiques, et l'utilisation de 1% de sarkosyl supprime presque totalement toute adsorption. Mais l'utilisation d'une quantité de détergent élevée peut détériorer la couche biologique sensible. C'est pourquoi, nous avons représenté les variations de dissipation en fonction des variations de fréquence, ce tracé étant caractéristique de l'évolution des propriétés viscoélastiques de la couche. Comme présenté sur la figure 4.6b), une pente pour chaque taux de sarkosyl a été calculée, dont la valeur donne des informations sur la flexibilité de la couche. Les différentes pentes obtenues en fonction de la quantité de sarkosyl montrent que les adsorptions non-spécifiques des protéines du sérum en présence de détergent induisent des changements de rigidité de la SAM. Ainsi, en comparant la pente lors de l'injection de sérum sans sarkosyl à celles calculées pour les différents taux de détergent, nous avons trouvé que les propriétés viscoélastiques de la SAM PEG fonctionnalisée étaient similaires sans sarkosyl et avec 0.5% de sarkosyl. De plus, la variation de fréquence de résonance est réduite d'un facteur trois lors de l'addition de 0.5% de sarkosyl (figure 4.6a)), révélant une nette diminution des interactions non-spécifiques. Ces résultats ont déterminé notre choix d'ajouter 0.5% de sarkosyl dans la solution de sérum contenant les anticorps pour les expériences de détection d'anticorps par SPR dans les sérums.

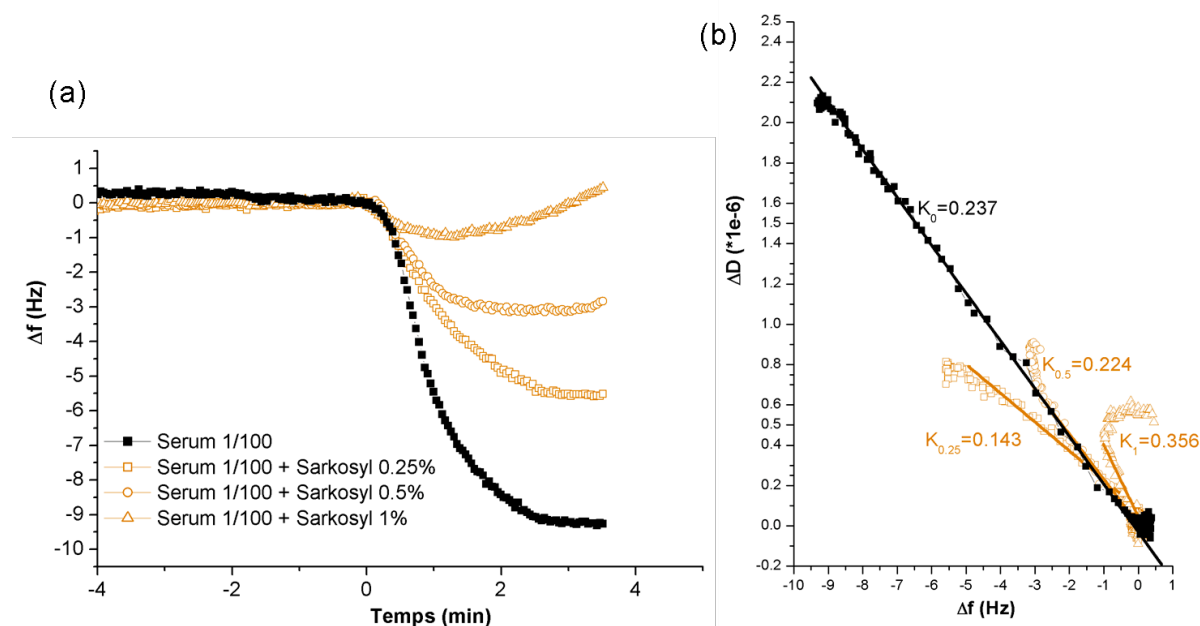


Figure 4.6 : Influence de la quantité de sarkosyl mélangée à un sérum humain (dilué 100 fois) pour une SAM PEG 25% COOH/ 75% OH sur (a) le niveau d'interactions non-spécifiques et (b) les propriétés viscoélastiques de la couche.

Comme il a été vu, pour minimiser l'influence de variabilité de composition du sérum, un mélange de trois sérums humains sains a été utilisé. Pour déterminer une limite de détection des anticorps anti-P, différentes quantités de ces derniers ont été dilués dans le mélange de sérums (à une dilution 1/100) en présence de 0.5% de sarkosyl. Ainsi, comme le montre la figure 4.7, une concentration de 0.2 nM en anticorps a pu être détectée de manière reproductible par SPR sur la monocouche PEG composée à 25% de groupes carboxyles et 75% de groupes hydroxyles. La courbe de calibration obtenue est linéaire dans la gamme 0.2-13.3 nM, confirmant la haute résolution de la détection. Les conditions d'optimisation préalablement établies font que le niveau d'interactions non-spécifiques sur le peptide témoin est négligeable. Comparativement, la limite de détection obtenue est dix fois plus faible que celle obtenue dans des études par SPR pour la détection d'anticorps anti-GAD [2, 10]. De plus, nous avons montré la faisabilité dans un environnement sérique de la détection d'anticorps polyclonaux. La limite de détection obtenue s'insère dans une réalité diagnostic puisqu'elle s'intègre dans la gamme de détection des autoanticorps anti-IA2, mesurée par fluorométrie sur des sérums de patients atteints par le diabète de type 1 [11], même si la limite obtenue se trouve dans les valeurs hautes de concentrations effectives chez les patients. Néanmoins, l'ensemble des résultats montre une démarche possible pour l'optimisation de la couche biologique sensible pour augmenter la spécificité d'un biocapteur qui est capitale pour le développement de ce domaine. Mais, malgré la généricité du protocole, le nombre d'étapes nécessaires à l'immobilisation des biorécepteurs ne serait pas encore favorable au transfert du protocole sur les micromembranes. En effet, la première étape de validation des structures fabriquées en tant que biocapteur passe par un protocole d'immobilisation simple, pour une biorecognition aisée. Aussi, comme il a été vu, le rendement de structures effectives nous a incité à utiliser des membranes avec le dioxyde de silicium de passivation comme couche d'accroche qui, couplée à une monocouche de poly-l-lysine PEG fonctionnalisée, représente un cas simple pour la mise en évidence de la capacité des microstructures pour la transduction d'une biorecognition d'affinité.

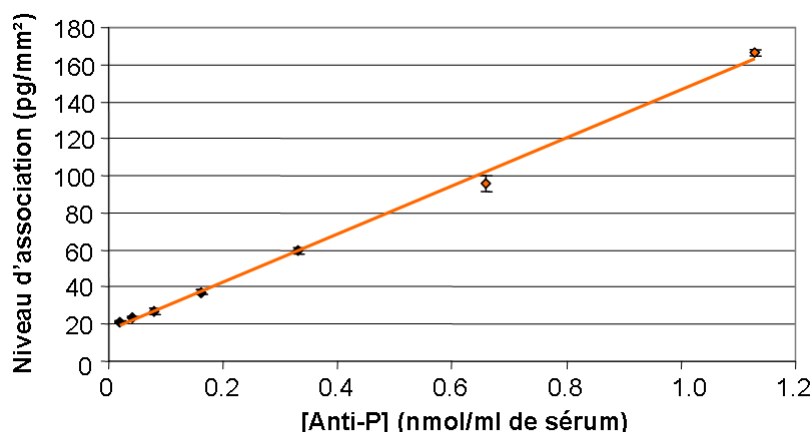


Figure 4.7 : Niveau de reconnaissance spécifique d'anticorps anti-P injectés dans un sérum humain.

IV.2.2 Micromembranes piézoélectriques pour la détection sans marquage d'anticorps en milieu liquide

IV.2.2.1 Motivations

Pour valider la capacité de micromembranes circulaires pour la transduction d'une reconnaissance biologique, la première étape passe par l'élaboration d'un protocole simple d'immobilisation de biorécepteurs sur la surface des structures. Une méthode simple utilise l'intégration des biorécepteurs avec la couche d'immobilisation, pour une fonctionnalisation de la surface en une seule étape. Comme il a été vu dans le chapitre I, le polymère poly-L-lysine (PLL) comprenant des chaînes PEG est intéressant pour l'immobilisation de biomolécules. En effet, la base composée de PLL correspond à un polymère facile d'utilisation pour son auto-assemblage sur une surface telle que le dioxyde de silicium pendant que les chaînes PEG agissent comme une barrière contre les adsorptions non-spécifiques. De plus, la fonctionnalisation de cette couche d'immobilisation par des biomolécules pouvant servir de biorécepteurs d'affinité permet d'élaborer un protocole en une étape avant l'étude de la biorecognition d'analytes. Dans notre cas, des PLL-PEG fonctionnalisés par le FITC (Fluorescéine Iso Thio Cyanate) de la société Surface Solutions ont été utilisés pour valider par spectroscopie de fluorescence leur immobilisation sur la surface de SiO₂ des micromembranes, en sus de la variation de fréquence de résonance. Les molécules de FITC servent aussi d'antigènes modèles pour les expériences de reconnaissance d'anticorps anti-FITC monoclonaux. Pour calibrer le modèle biologique utilisé, la microbalance à quartz a été utilisée avant de transférer le protocole sur les micromembranes. Aussi, pour améliorer la stabilité en fréquence des structures, une cellule fluide thermorégulée a été développée avec mise à température du fluide injecté sur les membranes, pour empêcher des artefacts de mesure.

IV.2.2.2 Elaboration d'un protocole de reconnaissance d'anticorps par des antigènes immobilisés sur dioxyde de silicium

Dans la section précédente, nous avons démontré un comportement cinétique similaire lors de l'étude d'une interaction de type antigène-anticorps mesurée par QCM et SPR. Cette validation par QCM, dont le principe de fonctionnement est proche de celui des micromembranes, a conforté notre choix d'utiliser cette méthode de transduction pour la calibration de notre protocole modèle. Une autre raison essentielle d'utiliser la QCM est la nature de la surface : des PLL-PEG immobilisés sur de la silice activée. Cette surface est disponible avec des transducteurs à quartz, mais non utilisable avec des puces SPR (rappelons que la surface d'un transducteur SPR doit être un métal noble).

Le protocole établi est schématisé sur la figure 4.8a). La première étape consiste en l'auto-assemblage des PLL-PEG-FITC sur la surface du quartz suivi de l'étude de l'interaction antigène-anticorps anti-FITC/ FITC. La surface d'immobilisation étant du SiO₂ activé, l'activation du dioxyde de silicium est faite par plasma oxygène ($P = 300 \text{ W}$, $t = 30 \text{ s}$) avant le montage du quartz dans l'appareil. Après la stabilisation du signal par régulation thermique de la puce et du fluide, la solution contenant les PLL-PEG-FITC (à une concentration de 1 mg/ml dans un tampon aqueux salin à pH 7.4) a été injectée et la variation de fréquence de résonance a été mesurée en temps-réel, pour déterminer le temps minimum d'immobilisation. La courbe obtenue, présentée sur la figure 4.8b), montre une diminution rapide de la fréquence de résonance pendant les cinq premières minutes de l'injection, avant une stabilisation lente de la fréquence. La diminution de fréquence est significative d'un ajout de masse et la reproductibilité des résultats lors de plusieurs essais d'injection valident l'accroche électrostatique des PLL-PEG-FITC. Les variations obtenues sont de plus

cohérentes avec les valeurs de la littérature [12]. Pour chaque expérience, une faible quantité de tampon glycine à pH 1.8 est injectée pour supprimer les agrégats de poly-l-lysine ou les chaînes polymériques faiblement accrochées sur la surface.

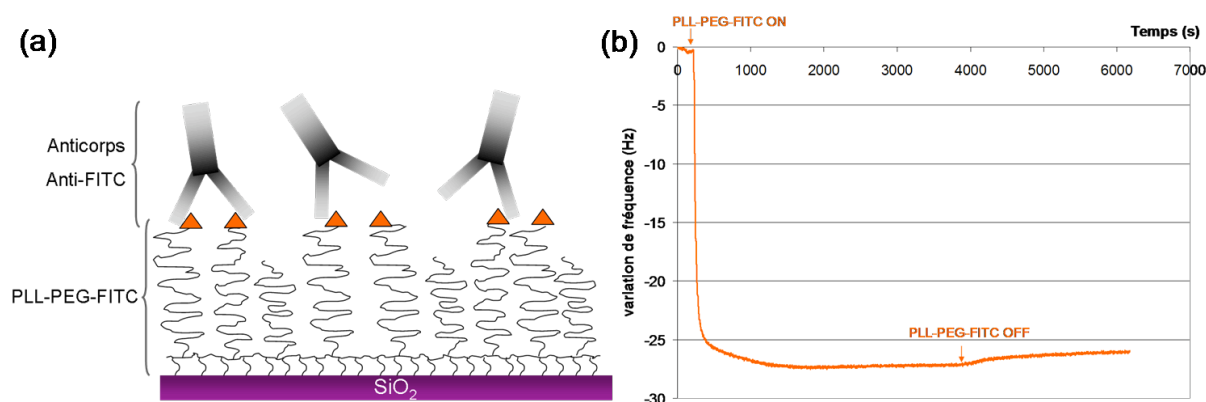


Figure 4.8 : (a) Schématisation du protocole de reconnaissance d'anticorps anti-FITC par des antigènes FITC immobilisés via une monocouche de PLL-PEG. (b) Suivi temps-réel par QCM de l'adsorption électrostatique de PLL-PEG-FITC.

Une fois validée l'immobilisation de biomolécules FITC servant d'antigènes sur une surface de SiO_2 , les interactions avec des anticorps anti-FITC ont pu être abordées. Pour cela, les anticorps sont injectés à différentes concentrations (de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ à 50 $\mu\text{g/ml}$) et la variation de fréquence de résonance est mesurée pour chaque concentration. Entre chaque injection, la surface PLL-PEG est régénérée par l'utilisation d'une solution de glycine à pH 1.8 permettant à la fréquence de retomber à son niveau initial. Les courbes cinétiques sont présentées sur la figure 4.9a). Tout d'abord, concernant la spécificité de l'interaction, l'injection d'anticorps spécifiques anti-FITC à une concentration de 30 $\mu\text{g/ml}$ se traduit par un niveau de liaison de 3800 pg/mm^2 . Au contraire, l'injection d'anticorps non-spécifiques anti-GST à la même concentration se traduit par un niveau inférieur à 150 pg/mm^2 . L'efficacité des chaînes hydrophiles PEG est donc clairement mise en évidence, induisant une biorecognition spécifique. La validation de la spécificité de l'interaction permet d'étudier l'influence de la concentration en anticorps sur le niveau de liaison mesuré. Comme le montrent les figures 4.9a) et b), un effet dose a été obtenu avec une tendance à atteindre un niveau plateau pour une concentration en anticorps supérieure à 30 $\mu\text{g/ml}$. L'antigène ainsi immobilisé conserve une affinité suffisante pour permettre une détection en anticorps de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de manière spécifique.

Les résultats obtenus en QCM démontrent la faisabilité de ce protocole simplifié à une seule étape d'interaction antigène –anticorps sur cristal de quartz recouvert de silice activée et vont nous permettre de transférer ce protocole sur les micromembranes fabriquées et mettre ainsi en mise en évidence une biorecognition par les microstructures.

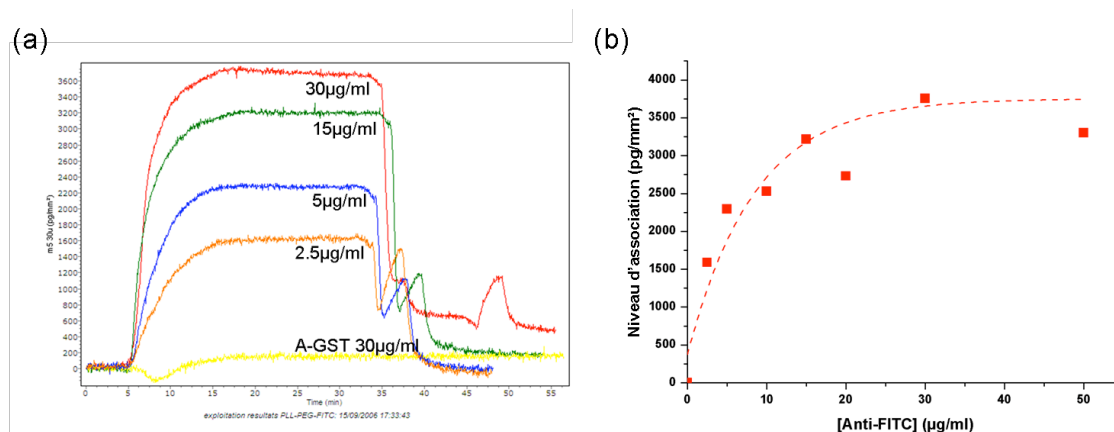


Figure 4.9 : (a) Suivi temps-réel de l'interaction spécifique anti-FITC/ FITC pour différentes concentrations en anticorps. (b) Influence de la concentration en anticorps anti-FITC sur le niveau de reconnaissance.

IV.2.2.3 Optimisation de l'environnement de micromembranes pour la détection temps-réel d'anticorps

Les matériaux piézoélectriques dérivant des céramiques, des changements de température induisent des variations des propriétés du matériau qui se répercutent sur la stabilité de la fréquence de résonance [13]. Des effets similaires sont aussi observés sur les métaux tels que le platine [13]. Ainsi, pour limiter l'influence de la température sur le comportement fréquentiel des micromembranes et éviter des artéfacts de mesure lors des expériences de biorecognition, nous avons développé un système de régulation thermique de la puce encapsulée et du fluide injecté. En effet, le liquide étant en contact direct avec la surface des micromembranes, il doit être à la même température que la puce. Cela se traduit par un besoin de réguler le fluide en amont de la cellule fluidique. Les travaux réalisés par Xavier Dollat (Assistant Ingénieur, service Informatique et Instrumentation) au LAAS-CNRS ont permis de développer une cellule fluidique thermo-régulée spécifique aux structures, telle que celle présentée sur la figure 4.10. Ce système environnant peut être décomposé en trois parties : un premier bloc pour la régulation de la puce et la cellule fluidique, un deuxième pour la régulation du fluide avant l'injection dans la cellule et enfin, le système de régulation thermique. En ce qui concerne le bloc de régulation de la puce et la cellule fluidique, il est tout d'abord important de noter que la capsule fluidique permettant l'injection du liquide sur les micromembranes est identique à celle fabriquée en première génération de cellule fluidique (cf. chapitre III, section III.4.1). La régulation thermique de la puce et du fluide en contact avec la puce est assurée par l'insertion du système puce+capsule fluidique entre deux blocs d'aluminium structurés à la forme du système. Ensuite, la mise en température du fluide avant son injection sur la puce est réalisée par l'enroulement d'un capillaire entre deux blocs d'aluminium rainurés pour accueillir le tube. Le liquide propulsé par la pompe péristaltique traverse ainsi le capillaire régulé thermiquement, permettant une mise à température du fluide avant son injection sur la surface des micromembranes. Les blocs précédemment décrits sont tous les deux régulés thermiquement, par une base composée d'un Peltier dont une des faces est en contact avec le bloc d'aluminium et l'autre face est liée à un radiateur utilisé pour la dissipation de la chaleur. Un capteur de température situé au plus proche de la puce permet, par l'intermédiaire d'un système électronique, la régulation thermique de l'ensemble (composé de la puce, la capsule fluidique et le capillaire enroulé) avec une précision de 1/100 °C, sur une plage de température de 15 °C à 40 °C.

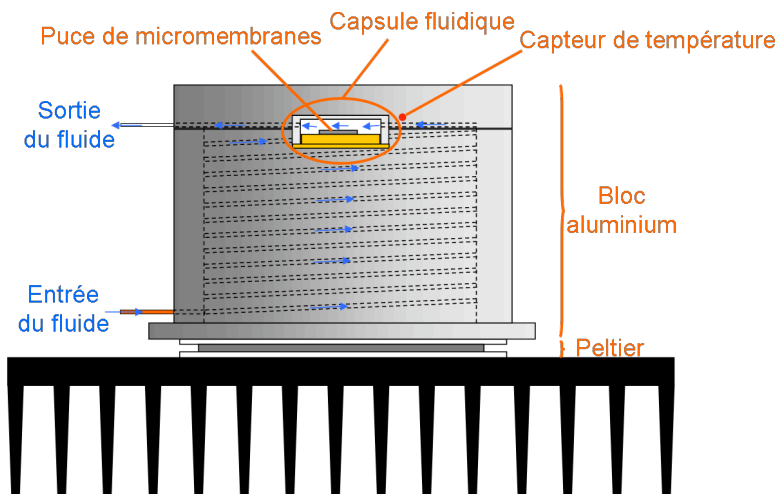


Figure 4.10 : Représentation schématique de la cellule fluide thermorégulée développée pour les micromembranes.

Le système de régulation thermique de l'environnement de la puce de micromembranes induit des modifications de la carte électronique. En effet, l'accès réduit aux contacts du boîtier TO8 se traduit par le besoin de développer une tête de mesure de la carte électronique intégrable au système de régulation. Cette contrainte a été résolue par la fabrication de trois cartes PCB circulaires connectées entre elles et montées sur le système de régulation pour rendre possible le branchement de la puce encapsulée sur le boîtier TO8. Une limande assure le lien entre la tête de mesure et la carte principale de l'électronique dédiée. Ainsi, après validation de la tête de mesure, le système global, comprenant la puce encapsulée et montée dans la cellule de régulation, a été testé pour valider la régulation thermique. Après plusieurs heures de stabilisation pour obtenir une température uniforme sur l'ensemble du système, la fréquence de résonance d'une micromembrane a été mesurée pendant près de douze heures lors de l'injection en continu de tampon aqueux. Le résultat, présenté sur la figure 4.11, montre une augmentation de la fréquence de 90 Hz sur neuf heures, ce qui fait en moyenne une dérive de 10 Hz/h. L'efficacité de la régulation thermique est confirmée par la comparaison entre une mesure de stabilité de la fréquence de résonance sans régulation et celle obtenue avec régulation thermique, comme présenté dans l'insert de la figure 4.11. La faible variation de fréquence sur une période de 7 minutes lors de l'utilisation de la cellule fluide régulée valide le système développé. De plus, une expérience biologique de reconnaissance excède rarement une heure. Les performances de régulation du système sont donc satisfaisantes pour envisager le transfert sur les micromembranes du modèle précédemment établi par QCM: fonctionnalisation d'une surface de dioxyde de silicium par des PLL-PEG-FITC et étude de l'interaction anti-FITC/FITC, par mesure temps-réel de la fréquence de résonance en milieu liquide.

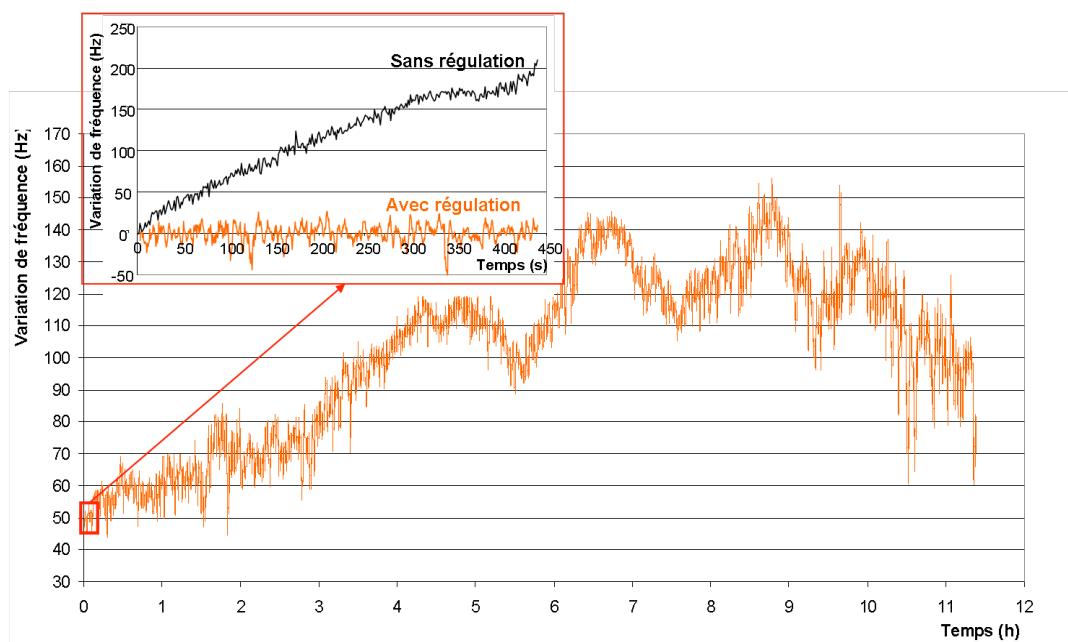


Figure 4.11 : Suivi temps-réel de la fréquence de résonance d'une micromembrane en milieu liquide en utilisant la cellule fluïdique thermorégulée. L'insert montre l'efficacité de la régulation sur la stabilité de la fréquence.

IV.2.2.4 Potentiel de micromembranes en tant que biocapteur

La couche de dioxyde de silicium de passivation déposée sur les micromembranes, en plus de protéger les pistes électriques des courts-circuits lors de l'utilisation des structures en milieu liquide, peut aussi servir de couche d'accroche pour les poly-l-lysine-PEG-FITC. Le protocole établi à la QCM peut ainsi être reproduit sur les micromembranes. L'adsorption électrostatique des PLL-PEG fonctionnalisés sur les structures est faite par injection en flux de la solution en utilisant la cellule fluïdique thermorégulée avec une mesure temps-réel de la fréquence de résonance d'une micromembrane de génération 4 (chapitre II, section II.2.3). Le résultat, présenté sur la figure 4.12, montre que l'injection d'une solution de PLL-PEG-FITC à une concentration de 1 mg/ml se traduit par une diminution de la fréquence de résonance. Cette diminution de fréquence est cohérente avec une augmentation de masse. Le calcul de la densité de greffage équivalente donne, par l'intermédiaire de la sensibilité massique en milieu liquide, une valeur de 5600 pg/mm². Comparativement, en négligeant l'influence viscoélastique de la couche immobilisée, la densité de greffage mesurée par QCM est de 4779 pg/mm². Ce résultat donne une différence de moins de 20%. De plus, les images obtenues par spectroscopie de fluorescence (cf. figure 4.12) confirment la présence des PLL-PEG-FITC sur la surface des micromembranes par comparaison de la fluorescence avant l'injection de la solution et après l'incubation.

L'ensemble de ces résultats valide ainsi le suivi temps-réel de l'adsorption électrostatique de la couche d'immobilisation fonctionnalisée par mesure de la fréquence de résonance des micromembranes en milieu liquide.

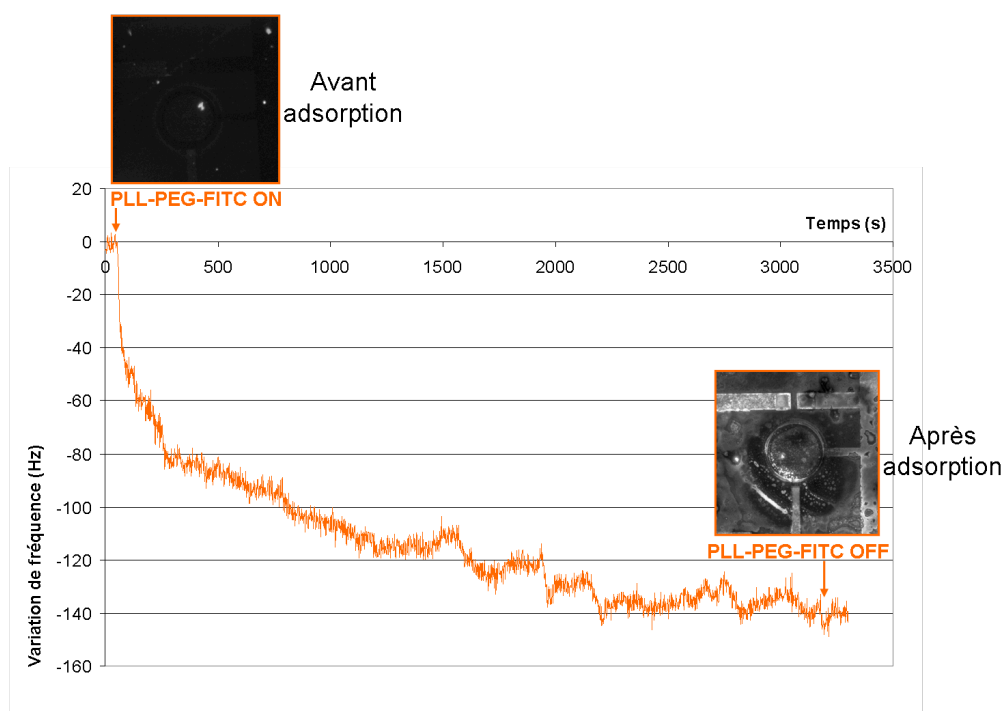


Figure 4.12 : Mesure temps-réel de la fréquence de résonance d'une micromembrane lors de l'adsorption électrostatique de PLL-PEG-FITC. Les images par fluorescence confirment la présence de PLL-PEG-FITC sur la surface de la micromembrane.

Pour étudier le comportement de la fréquence de résonance lors de l'interaction spécifique entre les anticorps anti-FITC et les antigènes FITC immobilisés, une solution de 500 μl d'anticorps anti-FITC à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ a été injectée en flux à un débit de 50 $\mu\text{l/min}$. Ces conditions expérimentales sont les mêmes que celles utilisées lors de l'étude de l'interaction par QCM. Après plusieurs essais, une courbe telle que celle présentée sur la figure 4.13 a pu être observée. Le suivi temps-réel de la fréquence de résonance a permis de déterminer une variation de densité à la surface de la micromembrane via la sensibilité massique établie en milieu liquide, en négligeant la contribution viscoélastique de l'interaction antigène-anticorps. Tout d'abord, il est important de noter qu'une augmentation de densité a été mise en évidence, ce qui suggère la transduction possible de la biorecognition des anticorps par les antigènes. Les conditions expérimentales étant similaires à celles utilisées à la QCM, la comparaison des résultats obtenus est rendue possible. D'après la figure 4.13, les niveaux de densité à la fin de l'injection des anticorps ont atteint le niveau d'équilibre et donnent une valeur de 4000 pg/mm^2 mesurée sur la micromembrane et une valeur de 3400 pg/mm^2 mesurée à la QCM, ce qui fait un écart de 17.6 %. L'écart obtenu est proche de celui calculé lors de l'adsorption des PLL-PEG-FITC, montrant une reproductibilité de comportement. Nous n'avons pas pu comparer les résultats obtenus dans des conditions adaptées à l'étude cinétique (effet dose) mais nous pouvons présager de certaines différences dues entre autres aux différences de schéma d'injection et de vitesse de diffusion. Des études complémentaires doivent être faites, non seulement pour confirmer le résultat obtenu avec les micromembranes (et vérifier la spécificité), mais aussi étudier le comportement cinétique. Néanmoins, bien que préliminaire, la cohérence des résultats obtenus à la fois pour l'adsorption des PLL-PEG-FITC et pour l'interaction spécifique anti-FITC/FITC montre la capacité des micromembranes pour la reconnaissance quantitative d'espèces biologiques avec une mesure en milieu liquide et un suivi temps-réel de l'interaction.

Le potentiel des microstructures fabriquées en tant que biocapteur permet d'envisager d'autres applications. Le deuxième modèle étudié concerne les polymères à empreinte moléculaire (MIP) immobilisés sur ces micromembranes. La combinaison des micromembranes avec des polymères à empreinte moléculaire a été envisagée pour profiter des avantages de microsystèmes électromécaniques résonants couplés à ceux offerts par les MIP, pour se rapprocher d'un biocapteur « idéal ».

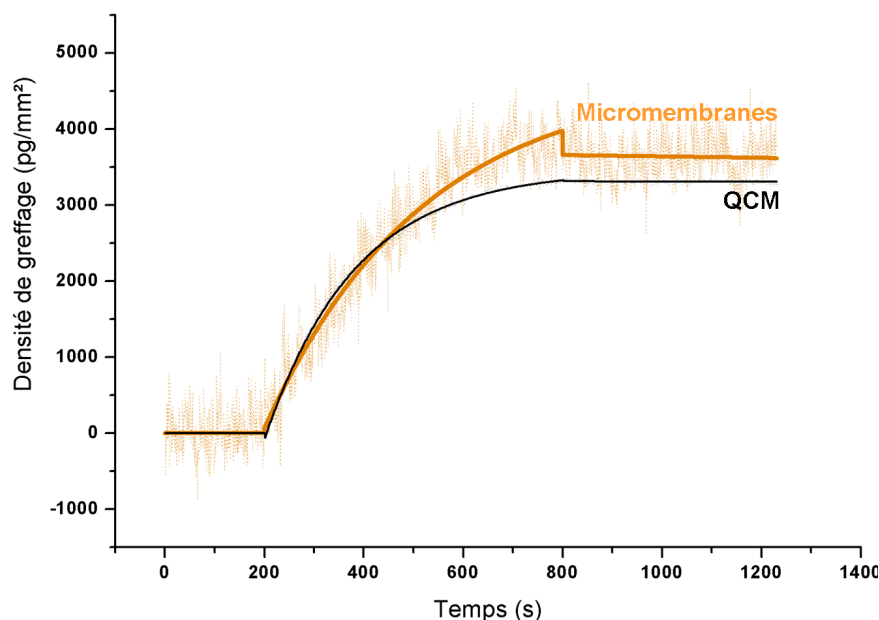


Figure 4.13 : Niveau de reconnaissance obtenu lors de l'interaction spécifique anti-FITC/FITC mesuré par une micromembrane et par QCM.

IV.3 Combinaison de micromembranes piézoélectriques résonantes avec les polymères à empreintes moléculaires

IV.3.1 Motivations

Comme la main dans un gant, les polymères à empreinte moléculaire (MIP) synthétiques permettent d'encapsuler des molécules analytes naturelles telles que des anticorps, des enzymes ou des petites molécules. Partant de ce constat, les MIP peuvent être utilisés pour deux applications principales : soit ils sont produits en « bulk » pour la filtration d'une solution par exemple [14], soit ils sont déposés sur une surface (comme la surface d'un transducteur par exemple), servant ainsi de couche biologique sensible [15]. Cependant, la combinaison fiable de MIP avec des transducteurs reste un véritable défi. En effet, depuis les travaux pionniers de F. Dickert [16] où ceux de K. Haupt [17] sur l'utilisation de MIP avec la microbalance à quartz, la fonctionnalisation de la surface de biocapteurs sans marquage par des MIP a suscité un intérêt majeur [18,19], même si ces techniques souffrent d'un manque de multiplexage et d'intégration. Seul un exemple dans la littérature de puces SPR peut être qualifié de multicapteur MIP, même si ce n'est pas un biocapteur intégré [20]. Les avantages offerts par les techniques de microfabrication permettent de résoudre ces problèmes d'intégration et multiplexage, comme il a déjà été démontré par les capacités des micromembranes fabriquées. Nous avons donc combiné les microstructures avec des

polymères à empreinte moléculaire et les résultats obtenus correspondent à la première preuve expérimentale de la détection parallèle et sans marquage des analytes présents dans le MIP. En fait, au-delà de la détection des molécules cibles, c'est l'ensemble des étapes caractérisant les MIP qui ont été étudiées par l'intermédiaire des micromembranes, comme présenté dans les paragraphes suivants.

IV.3.2 Fonctionnalisation individuelle de micromembranes par des MIP

La fonctionnalisation individuelle des micromembranes passe par l'utilisation d'un outil spécifique de dépôt. Le robot Bioplume développé au LAAS-CNRS offre la possibilité d'un dépôt contrôlé d'une solution sur une surface par l'intermédiaire de leviers en silicium (cf. figure 4.14 et thèse de Thierry Leïchlé pour une étude approfondie [21]). Ces leviers sont fabriqués par les techniques standard de microfabrication et montés sur un système de déplacement automatisé à trois degrés de liberté. La procédure de dépôt commence par le chargement du levier avec une solution de MIP contenant le mélange prépolymérisé. Nous avons choisi d'étudier dans notre système un MIP spécifique de l'herbicide acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D), dont le comportement est connu [22] et un polymère appelé polymère non-imprimé (NIP) ayant la même composition que le MIP sans la molécule cible, utilisé comme contrôle négatif. Ainsi, après le chargement d'une solution de MIP ou de NIP, le dépôt des solutions sur la surface des micromembranes s'effectue par le contact direct entre la surface et la pointe du levier, comme présenté sur la figure 4.14. Le volume déposé est ajusté par le contrôle du temps de contact entre la pointe et la surface. Ainsi, en mesurant la fréquence de résonance des micromembranes avant et après le dépôt des solutions, la diminution de fréquence ($\Delta f_{\text{dépot}}$) mesurée permet le calcul du volume de polymère déposé via la sensibilité massique (S_{air}) des structures et la densité équivalente des MIP (ρ_{MIP}), par l'intermédiaire de la formule :

$$V_{\text{MIP}} = \frac{\Delta f_{\text{dépot}}}{S_{\text{air}} \cdot \rho_{\text{MIP}}} \quad (4.1)$$

Dans cette formule, la densité équivalente des MIP est calculée par une moyenne des densités des différentes molécules constitutives du polymère, mais leur viscosité a été négligée. Ainsi, cinq volumes différents de solution de MIP 2,4-D ont été déposés, allant de 8.4 pl à 68.1 pl.

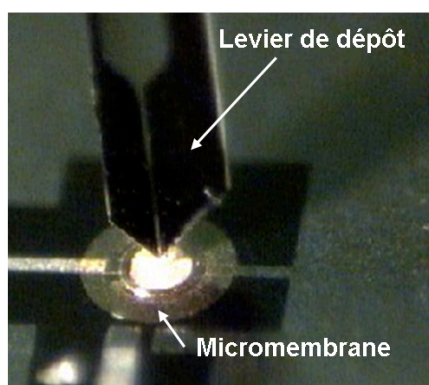


Figure 4.14 : Image du dépôt d'une solution de MIP sur une micromembrane grâce au robot Bioplume.

Suivant le dépôt des mélanges prépolymérisés des solutions MIP et NIP, les micromembranes fonctionnalisées sont connectées à l'électronique dédiée et placées sous une atmosphère saturée en azote, suivie de la mise en marche de la lampe à ultra-violet pour initier la polymérisation.

IV.3.3 Polymérisation des MIP déposés

La portabilité du système comprenant les micromembranes et l'électronique dédiée permet la mesure temps-réel de la fréquence de résonance pendant la polymérisation des MIP. Un exemple de courbe est présenté sur la figure 4.15. Quand la lampe UV est allumée, une forte augmentation de la fréquence de résonance est observée pendant les cinq premières minutes, suivie d'une phase de stabilisation de la fréquence. A ce niveau, deux effets peuvent induire une augmentation de fréquence : une diminution de masse ou une augmentation de rigidité. Cependant, la température n'excédant pas 306 K, la composition des solvants et des monomères ne peuvent pas subir une évaporation significative. L'augmentation de fréquence est donc révélatrice de l'adhésion du polymère sur la surface et la rigidification de la couche pendant la polymérisation par réticulation des différents monomères. La validité du comportement, déduite de la mesure de fréquence de résonance, est confirmée par l'augmentation négligeable de la fréquence sur une membrane où aucun polymère n'a été déposé, supprimant ainsi les hypothèses d'influence de la température sur la mesure. Le suivi temps-réel de l'évolution de la fréquence de résonance des micromembranes pendant la polymérisation du MIP correspond à la première mise en évidence des phénomènes se déroulant pendant la polymérisation et permet une calibration pour la détermination d'un temps minimum de polymérisation. De plus, les variations de fréquence mesurées à la fin de la polymérisation pour les différents volumes déposés montrent une linéarité significative de l'efficacité et la fiabilité de la transduction électromécanique pendant cette étape (cf. insert de la figure 4.15).

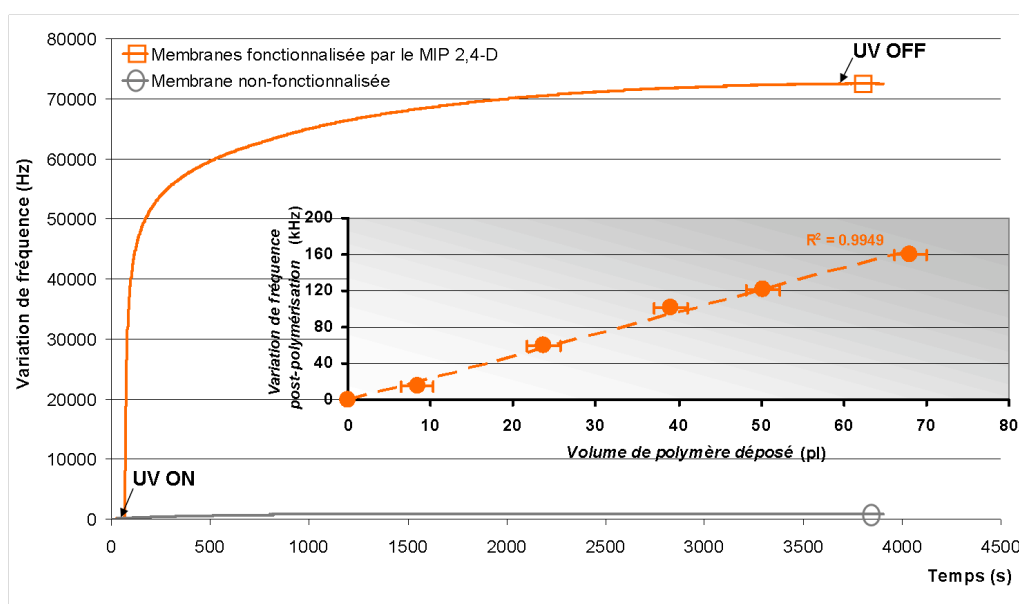


Figure 4.15 : Suivi temps-réel de la fréquence de résonance de micromembranes lors de la polymérisation du MIP 2,4-D. L'insert montre la variation de fréquence à la fin de la polymérisation du MIP 2,4-D pour différents volumes de solutions déposés.

La caractérisation de la polymérisation des MIP par l'intermédiaire des micromembranes permettra d'approfondir l'étude lors des cycles d'incubation et d'extraction de la molécule cible, correspondant réellement à l'application biocapteur visée.

IV.3.4 Transduction du phénomène d'impression

Suivant la polymérisation, des expériences de mesure de fréquence de résonance à la fin de chaque étape de lavage du polymère ou d'incubation avec une solution aqueuse de 2,4-D permettent la transduction de la présence des molécules cibles 2,4-D, significative du phénomène d'impression. Tout d'abord, après trois lavages successifs dans un mélange acétique/ éthanol, une augmentation nette de la fréquence (+ 47.9 kHz) est mise en évidence sur la micromembrane fonctionnalisée avec le MIP 2,4-D alors qu'une variation de fréquence négligeable est observable sur le contrôle, comme le montre la figure 4.16. Cette augmentation de fréquence est significative d'une perte de masse, traduisant l'extraction des molécules de 2,4-D du polymère. Lorsque le polymère est ensuite incubé dans une solution saline de 2,4-D à une concentration de 10 μ M, la mesure de fréquence après cette étape montre une diminution de -15.3 kHz sur la membrane fonctionnalisée avec le MIP 2,4-D par rapport au niveau obtenu après rinçage. A ce niveau, plusieurs remarques peuvent être faites. Tout d'abord, la diminution de fréquence est observable sur la membrane fonctionnalisée avec le MIP alors qu'une variation négligeable apparaît sur le contrôle. Ainsi, la diminution de fréquence est significative d'une augmentation de masse et met en évidence la transduction quantitative du phénomène d'impression. Ensuite, il est clair que le niveau obtenu après l'impression de l'analyte dans le polymère est inférieur à celui mesuré lors du premier rinçage. Ce comportement provient du phénomène d'impression où le nombre de sites accessibles lors de l'impression est inférieur à 100 %. Mais, même si le rendement n'est pas de 100 %, la transduction quantitative de la présence de l'analyte est caractérisée et validée par la reproductibilité des valeurs obtenues lors de la répétition des cycles d'extraction et d'accroche des molécules 2,4-D. En effet, un écart type de 1.7 kHz a été calculé pour les valeurs de fréquence mesurées après les étapes de rinçage et d'incubation, ce qui fait une dispersion de 0.3 % par rapport à la fréquence de résonance obtenue après le premier lavage.

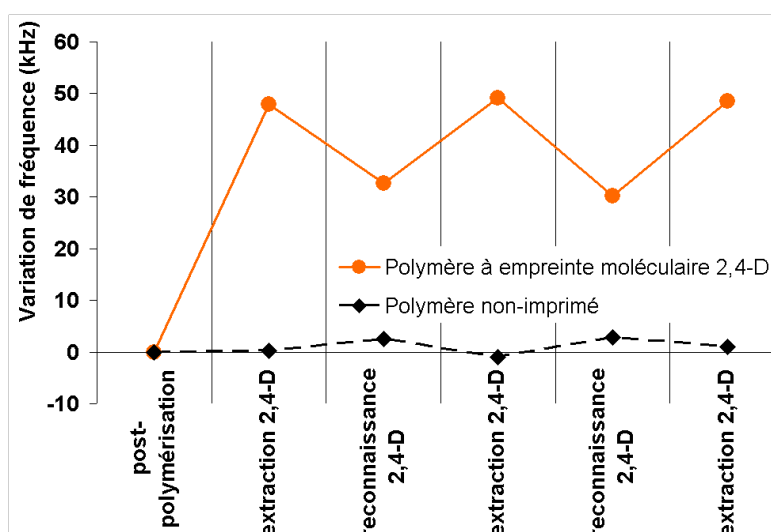


Figure 4.16 : Variation de la fréquence de résonance d'une micromembrane lors de cycles répétés d'extraction et de reconnaissance de l'analyte 2,4-D.

Puisque la reproductibilité et la spécificité des mesures ont été satisfaisantes, les cycles d'incubation et de rinçage ont été répétés sur les différentes micromembranes fonctionnalisées. Comme le montre la figure 4.17, la variation de fréquence de résonance après l'étape d'incubation (par rapport à la valeur mesurée après l'étape de rinçage) se montre dépendante du volume de polymère déposé. Comme la quantité de molécules 2,4-D a augmenté avec le volume de MIP déposé, la variation (en valeur absolue) de fréquence a également augmenté, ce qui montre la transduction efficace et quantitative de l'impression. Cependant, le comportement non linéaire de la courbe obtenue indique une meilleure accessibilité du MIP en surface qu'en volume. En effet, quand la quantité de MIP augmente, la variation de fréquence tend vers une valeur maximum, qui peut être due à des limitations causées par le transfert de masse, malgré l'utilisation d'un agent co-porogène induisant une porosité volumique pour les MIP déposés. Mais l'ensemble des résultats obtenus permet de valider l'efficacité des microstructures pour la transduction quantitative et spécifique du phénomène d'impression.

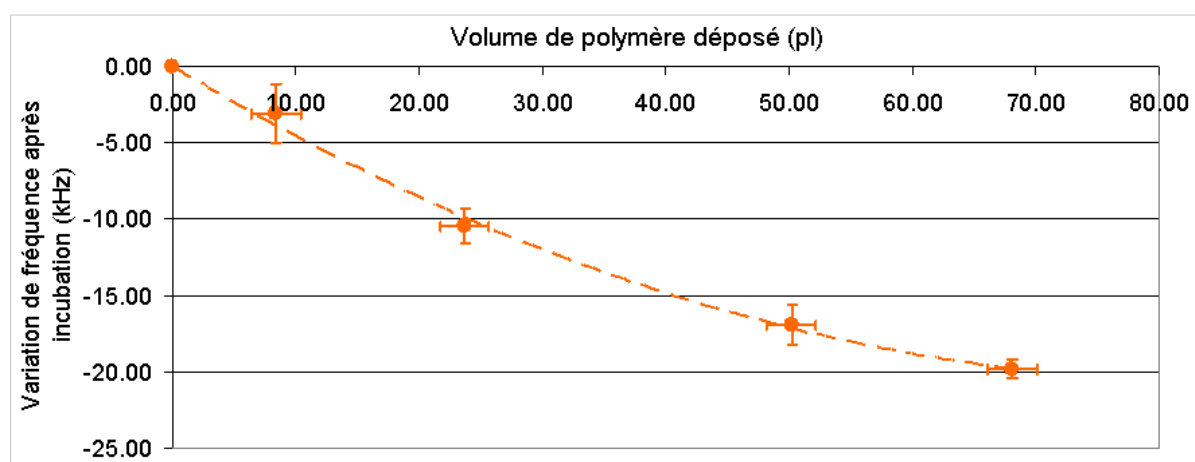


Figure 4.17 : Influence du volume de polymère déposé sur la variation de fréquence de résonance lors de la reconnaissance de l'analyte 2,4-D.

IV.3.5 Spécificité de la reconnaissance

Malgré la spécificité de la reconnaissance donnée par la membrane contrôle, il est important d'étudier la sélectivité du MIP 2,4-D avec des molécules structurellement proches de la molécule cible. Des études publiées sur le MIP 2,4-D montrent une bonne sélectivité de ce polymère, lors de mesures faites par radioactivité [22]. Donc, pour confirmer la spécificité grâce aux micromembranes, des expériences de reconnaissance ont été faites en incubant le MIP 2,4-D dans des solutions de 2,4-D et des solutions d'acide phénoxyacétique (POAc) à différentes concentrations, avec des étapes intermédiaires de rinçage. Comme le montre la figure 4.18, la molécule POAc est un bon candidat pour ces expériences puisque sa structure diffère seulement de deux atomes de chlore par rapport au 2,4-D.

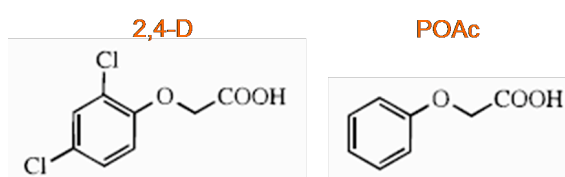


Figure 4.18 : Structure des molécules 2,4-D et POAc.

Ainsi, lors de l'incubation dans une solution de 2,4-D, une variation de fréquence de résonance (-16.5 kHz comme présenté sur la figure 4.19) est observée de manière reproductible pour une concentration supérieure ou égale à 10 μM , alors qu'aucune variation significative ne peut être mise en évidence sur le polymère contrôle, quelque soit la concentration de la solution. Aussi, le niveau initial a été atteint lors de chaque étape de rinçage, confirmant la détection spécifique de l'analyte 2,4-D. Par contre, lors de l'incubation du MIP 2,4-D dans une solution de POAc, aucune variation de fréquence n'est observable pour une concentration inférieure à 100 μM . Pour des concentrations supérieures ou égales à 100 μM , des variations de fréquence équivalentes ont été obtenues avec le 2,4-D et le POAc, alors que la membrane fonctionnalisée par le NIP ne montre aucune variation significative, quelque soit la molécule. Ce niveau de concentration dix fois supérieur pour obtenir le même niveau de fréquence entre le 2,4-D et la POAc est en accord avec la littérature, où cet effet a aussi été mis en évidence lors de la transduction de l'impression par spectroscopie infra-rouge [23]. Ainsi, le comportement du MIP 2,4-D révélé par les micromembranes est confirmé par des études utilisant d'autres moyens de transduction, validant la détection parallèle et sans marquage mise en œuvre avec les microstructures fabriquées.

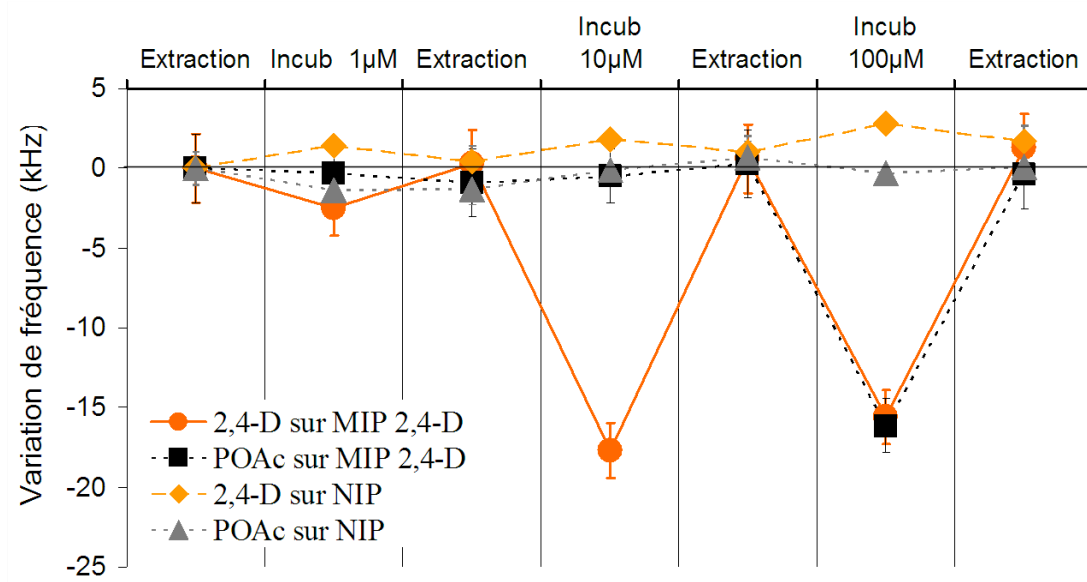


Figure 4.19 : Influence de la concentration en 2,4-D et POAc sur la variation de fréquence de résonance de micromembranes fonctionnalisées par le MIP 2,4-D et le NIP

Une dernière étape dans la validation de la transduction concerne la vérification que les comportements différents du MIP 2,4-D et du NIP ne proviennent pas d'une différence de morphologie des deux polymères. Pour effectuer cette vérification, nous avons utilisé un microscope à force atomique (AFM) en mode contact pour caractériser la surface des polymères. Les images obtenues, présentées sur la figure 4.20, montrent tout d'abord l'effet de l'agent co-porogène. En effet, en l'absence de PVAc, la planéité de la surface montre une faible porosité. Par contre, l'ajout de PVAc 1 % aux solvants porogènes se traduit par l'apparition de pores visibles sur le MIP 2,4-D et le NIP. De plus, la taille, la densité et la distribution des pores sur la surface est équivalente pour les polymères. La taille des pores varie majoritairement de 200 à 400 nm en diamètre, avec quelques pores de 100 nm de diamètre. Ainsi, la caractérisation des polymères par AFM confirme la structure similaire du MIP 2,4-D et du NIP, ce qui valide l'ensemble des résultats obtenus et montre donc une bonne spécificité de la reconnaissance. La qualité des résultats obtenus permet de qualifier ces

expériences comme étant la première preuve expérimentale de la combinaison de MEMS résonants avec des polymères à empreinte moléculaire pour la reconnaissance sans-marquage, sensible, parallèle, intégrée et spécifique de biomolécules.

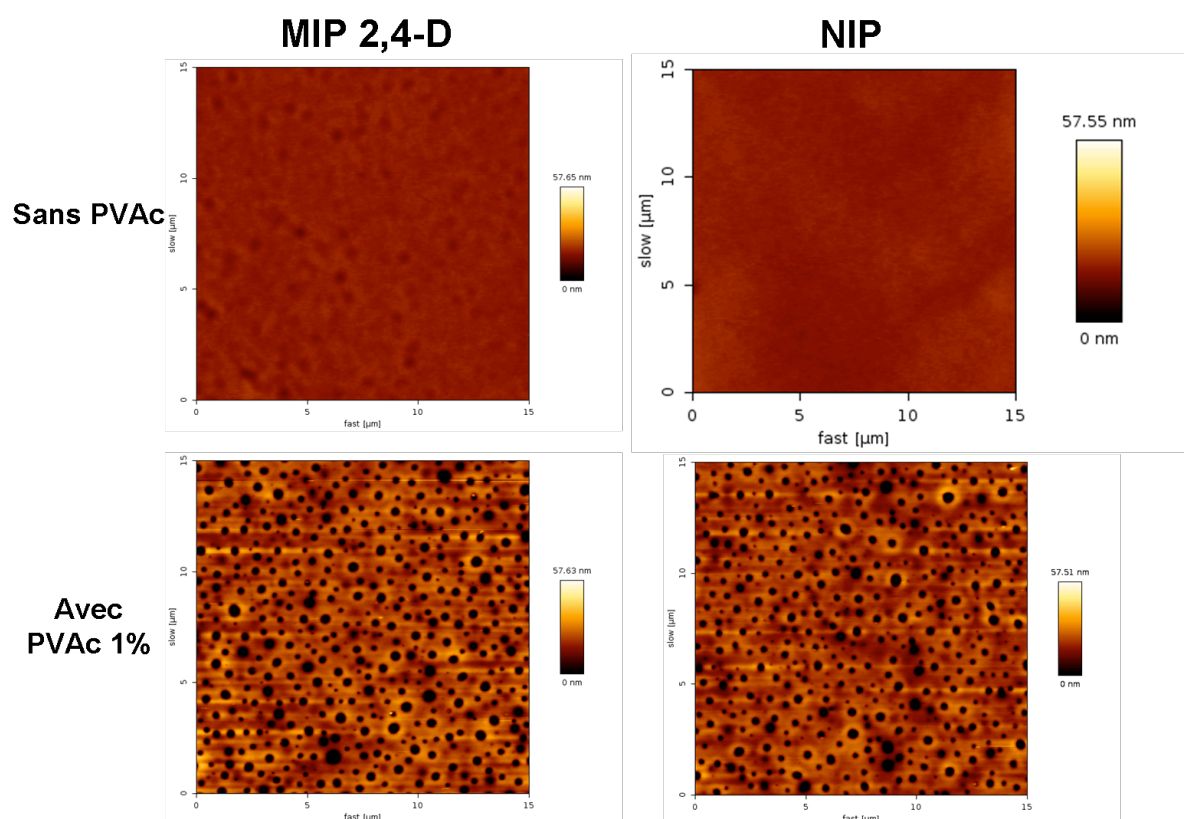


Figure 4.20 : Images AFM (mode contact) de la structure en surface du MIP 2,4-D et du NIP en présence ou non de l'agent co-porogène PVAc.

La combinaison des micromembranes piézoélectriques résonantes avec les polymères à empreinte moléculaire termine ce chapitre applicatif.

IV.4 Conclusion

En résumé, après la mise en place d'un protocole optimisé par l'utilisation complémentaire de la SPR et de la QCM pour la détection d'anticorps dans un sérum humain, la capacité des micromembranes pour la détection d'anticorps en temps-réel et en milieu liquide a été mise en évidence. A l'issue de ces expériences préliminaires, les avancées faites par l'utilisation de MIP couplées au souci permanent d'intégration des capteurs pour un usage portable, permet d'envisager maintenant des études environnementales sur le terrain, allant de l'analyse d'échantillons de sol à des échantillons d'eau, pour connaître la composition de ces milieux, en supprimant les étapes intermédiaires lors du passage du milieu de mesure aux essais de laboratoire.

Références

- [1] C. F. Verge, D. Stenger, E. Bonifacio, P. G. Colman, C. Pilcher, P. J. Bingley, G. S. Eisenbarth, *Diabetes*, 47(12) (1998), 1857.
- [2] J. W. Lee, S. J. Sim, S. M. Cho, J. Lee, *Biosens. Bioelectron.*, 20(7) (2005), 1422.
- [3] D. Laune, F. Molina, G. Ferrieres, S. Villard, C. Bes, F. Rieunier, T. Chardes, C. Granier, *J. Immunol. Methods*, 267(1) (2002), 53.
- [4] C. Ayela, F. Roquet, L. Valera, C. Granier, L. Nicu, M. Pugnère, *Biosens. Bioelectron.*, 22(12) (2007), 3113.
- [5] T. Wink, S. J. Van Zuilen, A. Bult, W. P. Van Benkom, *Analyst*, 122(4) (1997), 43R.
- [6] V. V. Silin, H. Weetall, D. J. Vanderah, *J. Colloid Interface Sci.*, 185(1) (1997), 94.
- [7] P. E. Sheehan, L. J. Whitman, *Nano Lett.*, 5(4) (2005), 803.
- [8] M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 25 (1996), 55.
- [9] M. Schaeferling, S. Schiller, H. Paul, M. Kruschina, P. Pavlickova, M. Meerkamp, C. Giammasi, D. Kambhampati, *Electrophoresis*, 23 (2002), 3097.
- [10] S. H. Choi, J. W. Lee, S. J. Sim, *Biosens. Bioelectron.*, 21(2) (2005), 378.
- [11] A. Westerlund-Karlsson, K. Suonpaa, M. Ankelo, J. Ilonen, M. Knip, A. E. Hinkkanen, *Clin. Chem.*, 49 (2003), 916.
- [12] R. Marie, A. B. Dahlin, J. O. Tegenfeldt, F. Höök, *Biointerphases*, 2(1) (2007), 49.
- [13] G. A. C. M. Spierings, G. J. M. Dormans, W. G. J. Moors, M. J. E. Ulenaers, P. K. Larsen, *J. Appl. Phys.*, 78(3) (1995), 1926.
- [14] J. L. Urraca, M. C. Moreno-Bondi, A. J. Hall, B. Sellergren, *Anal. Chem.*, 79 (2007), 695.
- [15] F. Vandevelde, T. Leïchlé, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, K. Haupt, *Langmuir*, 23(12) (2007), 6490.
- [16] F. L. Dickert, P. Forth, P. Lieberzeit, M. Tortschanoff, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 30 (1998), 759.
- [17] K. Haupt, K. Noworyta, W. Kutner, *Anal. Commun.*, 36 (1999), 391.
- [18] K. Haupt, K. Mosbach, *Chem. Rev.*, 100 (2000), 2495.
- [19] K. Lettau, A. Warsinke, M. Katterle, B. Danielsson, F. W. Scheller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45(42) (2006), 6986.
- [20] S. C. CHuang, G. B. Lee, F. C. Chien, S. J. Chen, W. J. Chen, M. C. Yang, *J. Micromech. Microeng.*, 16 (2006), 1251.
- [21] T. Leïchlé, *Bioplume: a MEMS-based picoliter droplet dispenser with electrosputting means for patterning surfaces et the micro- and the nanometer scales*, thèse, spécialité Matériaux, Technologie et Composants de l'Electronique, Toulouse (2006).
- [22] K. Haupt, A. Dzgoev, K. Mosbach, *Anal. Chem.*, 70 (1998), 628.
- [23] M. Jakusch, M. Janotta, B. Mizaikoff, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Chem.*, 71 (1999), 4786.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La variété des biocapteurs sans marquage offre des possibilités intéressantes de détection de biomolécules dépendant du type de molécules à détecter essentiellement. De part leur généricité dans le principe de détection, les capteurs de masse permettent la transduction sensible d'une large variété de reconnaissances biologiques, allant des anticorps aux petites molécules. Le succès des biocapteurs de masse est porté par le succès de la résonance plasmonique de surface et la microbalance à quartz. Mais les microsystèmes électromécaniques montrent maintenant un fort potentiel pour résoudre les problèmes liés à l'intégration et au multiplexage, en sus de la sensibilité accrue. En fonctionnement statique, ces systèmes présentent l'avantage d'une haute sensibilité mais restent limités dans l'interprétation quantitative des signaux mesurés. Au contraire, les MEMS résonants se comportent comme des capteurs de masse, affichant une généricité dans les champs d'application. Cependant, les dispositifs de type leviers sont limités par des facteurs de qualité faibles en milieu liquide, réduisant leur capacité d'analyse. C'est principalement pour cette raison que des structures de type membrane ont été développées. De plus, elles présentent une robustesse accrue par rapport aux leviers.

Dans cette thèse, nous avons présenté le potentiel de micromembranes piézoélectriques résonantes pour la détection d'espèces biologiques. De nombreuses améliorations ont été apportées, de l'intégration de l'actionnement et de la détection des fréquences de résonance à l'adressage individuel des structures, pour obtenir des biocapteurs fiables. C'est ainsi qu'a pu être démontrée de manière préliminaire la capacité de biorecognition quantitative d'anticorps en milieu liquide et en temps-réel par les micromembranes et qu'a pu être démontrée expérimentalement une combinaison possible de polymères à empreinte moléculaire (MIP) avec des MEMS résonants.

Le principe de fonctionnement des micromembranes fabriquées est basé sur la mise en mouvement des structures à leur fréquence de résonance et sur la détection des spectres générés. La variation de fréquence de résonance étant proportionnelle à la variation de masse, la mesure de fréquence donne une information directe sur la présence de biomolécules à la surface du transducteur. Mais le niveau d'intégration requis par les biocapteurs passe par la structuration d'une couche piézoélectrique permettant l'actionnement des structures et la détection des fréquences de résonance par la même couche. Donc, les techniques de microfabrication employées pour la réalisation des structures doivent permettre l'intégration de la couche piézoélectrique, faite de PZT. D'autres étapes ont aussi été nécessaires pour l'obtention des structures, dont la plus critique concerne la libération des membranes. Des optimisations de la gravure profonde du silicium ont été nécessaires pour atteindre une reproductibilité de comportement des structures oscillantes.

Suivant la fabrication, l'essentiel des travaux réalisés a concerné la caractérisation des membranes, tant au niveau statique que dynamique. Les contraintes dans les matériaux générées pendant la fabrication induisent une déflexion initiale non nulle des structures. Afin d'appréhender cette déflexion et de démontrer l'intégration de la couche piézoélectrique, nous avons développé un modèle analytique, validé par des simulations par éléments finis, qui permet de simuler le comportement statique des micromembranes. Le design de ces

micromembranes a été complexe à modéliser. La bonne corrélation observée entre les valeurs théoriques et expérimentales de déflexion statique a validé l'utilisation du modèle que nous avons élaboré pour l'étude de l'influence de la tension de polarisation statique du PZT sur la déflexion verticale. Les mesures de déflexion pour différentes valeurs de potentiel ont permis, par l'intermédiaire du modèle, de déterminer le coefficient piézoélectrique transverse d_{31} . De plus, l'influence du potentiel statique sur ce paramètre a été mise en évidence, montrant que le d_{31} suit un cycle d'hystérésis en fonction de la tension de polarisation, avec des valeurs allant de ± 30 pm/V à ± 75 pm/V. En mode dynamique, les oscillations se superposent à un état d'équilibre statique défini par la tension de polarisation, d'où l'importance de cette étude, et donc l'optimisation du comportement dynamique passe aussi par l'optimisation du comportement statique.

La caractérisation dynamique des micromembranes a permis de déterminer des conditions optimales de fonctionnement pour les applications biocapteur. Tout d'abord, la validation de l'actionnement et la détection intégrés par la couche piézoélectrique dans l'air a permis de générer des spectres de résonance électriques dont l'exploitation a amélioré la qualité du comportement. L'influence de la tension de polarisation a été reprise pour confirmer les optimisations faites en mode statique. Ainsi, une tension de polarisation de -4V a été trouvée comme optimum pour une amplitude maximale d'oscillation à la résonance. Ensuite, une tension d'excitation fixée à 100 mV permet de s'affranchir d'effets non-linéaires, préjudiciables pour la mesure précise des fréquences de résonance.

En milieu liquide, une première étape sur la capacité de génération de spectres de résonance a été validée, montrant l'utilisation possible des structures, oscillant dans un fluide newtonien. Mais, dans un fluide, le comportement du facteur de qualité est primordial car de lui dépend la résolution du capteur. Donc les études se sont portées non seulement sur la fréquence de résonance mais aussi sur le facteur de qualité. Tout d'abord, des changements de masse environnante du fluide (par changement de la densité du fluide) induisent des variations de fréquence qui ont été corrélées à un modèle analytique. La concordance des résultats a validé le comportement de la fréquence de résonance en milieu liquide. En ce qui concerne le facteur de qualité, des valeurs plutôt élevées ont été mesurées, puisque ce dernier atteint 150 lors du dépôt d'une goutte sur la surface des structures. Un résultat similaire en flux a pu être obtenu par l'injection contrôlée de microbulles dans la solution. Mais pour utiliser les micromembranes de manière optimale, une carte électronique spécifique aux structures a été développée pour obtenir une valeur précise de la fréquence de résonance et du facteur de qualité avec une mesure simultanée sur plusieurs membranes.

L'élaboration d'un tel système électronique a permis de calibrer expérimentalement les membranes en masse et la comparaison avec un modèle théorique dynamique a permis de déterminer une sensibilité dans l'air de : $S_{\text{air}} = -15 \text{ pg}/(\text{Hz} \cdot \text{mm}^2)$ pour une masse minimum détectable de 1.4 pg. Le modèle établi dans l'air a été étendu au milieu liquide pour obtenir une sensibilité de : $S_{\text{liq}} = -43 \text{ pg}/(\text{Hz} \cdot \text{mm}^2)$ et une masse minimum détectable de 11.4 pg. Les valeurs trouvées montrent une sensibilité en masse environ dix fois supérieure à celle de la microbalance à quartz et permet d'afficher un potentiel des micromembranes pour la détection d'espèces biologiques.

La caractérisation fine des structures a permis d'appréhender des applications biocapteurs selon deux formats. Mais hormis les aspects de transduction, l'autre composante principale d'un biocapteur est la nature de la couche sensible biologique. Nous avons étudié par SPR et QCM la mise au point d'un protocole de greffage de peptides sur une surface d'or

pour la détection d'anticorps dans un sérum humain. Cette étude s'est intégrée dans un modèle, à visée diagnostic, de détection d'autoanticorps dans le sérum, appliqué au diabète de type I. L'étude s'est donc portée sur l'optimisation de la couche biologique, à la fois au niveau du contrôle de la densité de greffage des peptides qu'au niveau de l'amélioration du rapport signal-sur-bruit. La densité de greffage est contrôlée par la composition de la monocouche auto-assemblée alors que le rapport signal-sur-bruit est amélioré par l'introduction de chaînes polyéthylène glycol hydrophiles. L'ensemble des optimisations faites sur la spécificité de la reconnaissance a abouti à la détection d'anticorps spécifiques anti-peptide dans un sérum humain avec une limite inférieure à 0.2 nM. Cette valeur correspond à une réalité diagnostic, et se situe dans la gamme des hautes valeurs de concentration en autoanticorps dans le sérum de patients atteints du diabète de type I.

Les applications abordées avec les micromembranes ont concerné deux types de reconnaissance. Tout d'abord, concernant la détection d'anticorps, le protocole mis en place a été calibré par QCM selon un schéma où les antigènes ont été immobilisés par l'intermédiaire d'une monocouche de poly-l-lysine polyéthylène glycol fonctionnalisée sur une surface de silice. La transposition du protocole sur les micromembranes a montré une variation en temps réel de la fréquence de résonance lors de l'adsorption électrostatique des PLL-PEG-FITC et une comparaison des niveaux avec la QCM a montré une erreur d'environ 17%. La détection d'anticorps a ensuite pu être suivie en temps-réel et une erreur (comparativement avec la QCM) proche de celle obtenue lors la fonctionnalisation de la surface a été observée (environ 17%). L'étude cinétique demande des expériences complémentaires et ces résultats, bien que préliminaires, tendent à valider l'utilisation des micromembranes pour la transduction temps-réel et en milieu liquide d'une biorecognition antigène- anticorps.

Dans un deuxième temps, une avancée considérable sur le potentiel des structures en tant que biocapteur a été démontrée lors de la fonctionnalisation des membranes par des MIP. Tout d'abord, au niveau de la transduction du comportement des MIP lors de la polymérisation, le suivi temps-réel de la fréquence de résonance a permis de mettre en évidence la réticulation du MIP. Puis, l'application biocapteur a été validée par la transduction quantitative et multiplexée de l'impression des molécules cibles dans le polymère, comparativement à un polymère contrôle. La sélectivité du MIP a aussi été confirmée par comparaison avec des données de la littérature. Cette application correspond à la première combinaison expérimentale de MIP avec des MEMS résonants, à comportement fiable. La combinaison de MIP avec les micromembranes permet d'envisager le développement d'un véritable système pour l'analyse environnementale. En effet, la stabilité et la résistance à des conditions agressives (de pH, de température, etc.) des MIP, grâce à une structure polymérique synthétique, combinée aux performances des micromembranes, permet d'envisager une utilisation de biocapteurs hors des laboratoires encore peu courante. De plus, le dernier prototype de la carte électronique dédiée (non présenté dans cette thèse) permet un fonctionnement autonome des structures sur un système alimenté à 12V. L'ensemble du système développé permet donc d'envisager des expériences sur le terrain pour des analyses d'eau ou de sol par exemple. L'autonomie et la portabilité jouent en faveur de l'utilisation d'un biocapteur pour les pays en voie de développement où un besoin crucial de systèmes à faible consommation d'énergie est clairement identifié, tant au niveau du système qu'au niveau de la conservation. Les enjeux sont de taille et offrent un exemple du profit apporté par les outils des pays riches aux pays en voie de développement.

La question se pose maintenant de l'évolution des micromembranes qui, malgré les avancées considérables réalisées, souffrent intrinsèquement d'un manque de sensibilité en

masse. En suivant le fil conducteur de cette thèse, l'évolution naturelle serait de diminuer la taille des structures. En effet, la sensibilité augmentant avec la diminution en taille, passer de microsystèmes électromécaniques (MEMS) aux nanosystèmes électromécaniques (NEMS) permettrait d'améliorer cette sensibilité. Des études sur des NEMS de type levier faites par l'équipe M. L. Roukes montrent des sensibilités pouvant atteindre le zeptogramme (10^{-21} g) [1]. Mais les conditions environnantes cryogéniques (la température doit être au plus proche du zéro absolu (-273.15 K)) ne permettent pas à l'heure actuelle d'envisager l'utilisation de structures avec une telle sensibilité en tant que biocapteur. Par contre, en condition normale d'utilisation, l'augmentation de la sensibilité des NEMS offrirait une résolution performante. Cependant, l'utilisation de NEMS signifie aussi la prise en compte du temps de réponse des capteurs [2]. Comme le montre la figure C.1, la concentration minimum détectable d'un nanosystème dépend fortement du temps de réponse pouvant atteindre plus de 10^4 s (environ 3 heures) pour des concentrations de l'ordre de l'attomolaire (aM). Ce paramètre est donc à prendre en compte. Enfin, la complexité actuelle des membranes, en termes de fabrication, nécessite un travail important de nanofabrication pour obtenir des structures similaires. Par exemple, l'intégration à des échelles nanométriques de matériaux piézoélectriques n'est pas aboutie. Quoiqu'il en soit, une évolution naturelle représente des travaux ambitieux dont l'aboutissement rapprocherait ces biocapteurs d'un cas idéal [3].

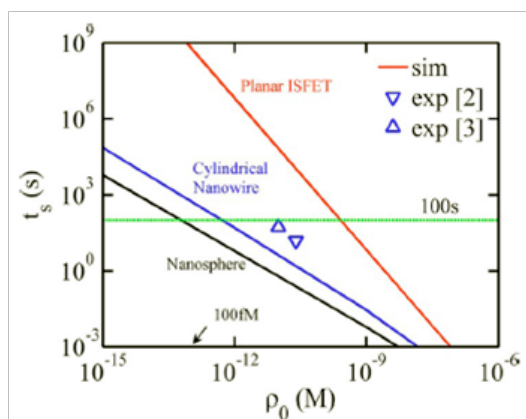


Figure C.1 : Influence de la concentration minimum détectable de protéines sur le temps de réponse de nanosystèmes (Courtoisie de M. A. Alam [2]).

Des travaux récents sur l'utilisation de leviers millimétriques piézoélectriques remettent en question la recherche permanente pour l'amélioration de la sensibilité en diminuant la taille des structures [4,5]. En effet, la plupart des applications biocapteurs en utilisant des MEMS résonants sont faites sur le premier mode de vibration. Or, la fréquence de résonance et le facteur de qualité augmentant avec le mode de vibration, cela se traduit par une sensibilité et une résolution accrues. Ainsi, l'équipe de R. Mutharasan a montré que des leviers millimétriques piézoélectriques actionnés à un mode de vibration plus élevé que le fondamental permet de détecter des biomolécules en milieu liquide avec des sensibilités de l'ordre de 1 fg/Hz [4]. Ainsi, des protéines ont pu être détectées en temps réel à une concentration de 100 fg/ml, ce qui fait de ce biocapteur un des plus résolutifs actuellement. Cette possibilité, plus simple à mettre en œuvre pour les structures de type membranes que la fabrication de NEMS, est à l'étude par notre équipe au LAAS-CNRS en tant que solution alternative pour la transduction sensible, résolutive, intégrée et parallèle d'une biorecognition par des structures de type membranes.

Références

- [1] Y. T. Yang, C. Callegari, X. L. Feng, K. L. Ekinici, M. L. Roukes, *Nano. Lett.*, 6(4) (2006), 583.
- [2] P. R. Nair, M. A. Alam, *Appl. Phys. Lett.*, 88 (2006), 233120.
- [3] M. Li, H. X. Tang, M. L. Roukes, *Nature*, 2 (2007), 114.
- [4] D. Maraldo, K. Rijal, G. Campbell, R. Mutharasan, *Anal. Chem.*, 79 (2007), 2762.
- [5] G. A. Campbell, D. deLesdernier, R. Mutharasan, *Sens. Actuators B*, 127 (2007), 376.

Liste de publications

Les travaux présentés dans cette thèse ont contribué aux publications suivantes :

Revues

- **C. Ayela**, T. Alava, D. Lagrange, D. Remiens, C. Soyer, T. Ondarçuhu, A. Greve, L. Nicu, « Electronic scheme for multiplexed dynamic behavior excitation and detection of piezoelectric silicon-based micromembranes », **IEEE Sensors Journal**, sous presse.
- **C. Ayela**, F. Vandeveldel, D. Lagrange, K. Haupt, L. Nicu, « Combining resonant piezoelectric micromembranes with molecularly imprinted polymers », **Angewandte Chemie International Edition** 46 (2007).
- **C. Ayela** and L. Nicu, “Micromachined piezoelectric membranes with high nominal quality factors in Newtonian liquid media: A Lamb’s model validation at the microscale”, **Sensors & Actuators B: chemical** 123, 860-868 (2007).
- **C. Ayela**, F. Roquet, L. Valera, C. Granier, L. Nicu and M. Pugnieri, “Antibody-antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D. A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum”, **Biosensors & Bioelectronics** 22, 3113-3119 (2007).
- F. Vandeveldel, T. Leichlé, **C. Ayela**, L. Nicu and K. Haupt, “Direct patterning of molecularly-imprinted microdot arrays for sensors and biochips”, **Langmuir** 23, 6490-6493 (2007).
- **C. Ayela**, C. Soyer, E. Cattani, C. Bergaud and L. Nicu, “Determination of the d_{31} piezoelectric coefficient of $\text{PbZr}_x\text{Ti}_{1-x}\text{O}_3$ thin films using multilayer buckled micromembranes”, **Journal of Applied Physics** 100, 054908 (2006).

Conférences

- **C. Ayela**, M. Pugnieri, L. Nicu, “Piezoelectric micromembranes for the fabrication of a diagnostic chip based on the real-time monitoring of antigen-antibody interactions”, **Transducers’07**, Lyon France (2007, poster).
- **C. Ayela**, F. Vandeveldel, K. Haupt, L. Nicu, “Molecularly Imprinted Polymer-Based Immunoassay of Herbicide Acids Using Resonant Piezoelectric Membranes with Integrated Actuation and Read-Out Capabilities”, **The Materials Research Society spring meeting**, San Francisco USA (2007, oral).
- O. Thomas, L. Nicu, **C. Ayela**, C. Touzé, “Buckling and non-linear vibrations of a piezoelectric stratified plate - Application to a MEMS biosensor”, **Euromech 2007**, Porto Portugal (2007, oral).
- F. Roquet, **C. Ayela**, L. Nicu, M. Pugnieri, «Antibody-antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D. A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum », **DiPIA 2007 Conference**, Phoenix USA (2007, poster).

- T. Alava, **C. Ayela**, L. Nicu, « Electrical equivalent circuit for air and liquid characterization of a multilayer micromembrane with piezoelectric actuation and read-out capabilities », **Modeling and Simulation of Microsystems Conference**, Santa Clara USA (2007, poster).
- O. Thomas, L. Nicu, **C. Ayela**, C. Touzé, « Flambage et vibrations non-linéaires d'une plaque stratifiée piézoélectrique. Application à un bio-capteur MEMS », **8^e Colloque National en Calcul des Structures**, Giens France (2007, poster).
- D.Lagrange, **C.Ayela**, E.Cattan, C.Soyer, L.Nicu, "Specific nearby electronic scheme for multiplexed excitation and detection of piezoelectric silicon-based micromembranes resonant frequencies using FPGA technology", **IEEE of Sensors Conference**, Daegu Corée-du-sud (2006, oral).
- **C.Ayela**, F.Vandeveld, K.Haupt, L.Nicu, "Molecularly Imprinted Polymer-based immunoassay using resonant piezoelectric membranes with integrated actuation and detection scheme", **Micro and Nano Engineering Conference**, Barcelone Espagne (2006, poster).
- F.Vandeveld, **C.Ayela**, L.Nicu, K.Haupt, "Molecularly Imprinted Polymer-based immunoassay using resonant piezoelectric membranes with integrated actuation and detection scheme", **MIP2006 Conference**, Cardiff UK (2006, poster).
- **C.Ayela**, T.Leichle, E.Cattan, C.Soyer, C.Bergaud, M.Pugniere, L.Nicu, "High quality factors of silicon membranes with piezoelectric actuation and detection scheme for biosensing purpose in liquid media", **IEEE International Frequency Control Symposium**, Miami USA (2006, oral).
- **C.Ayela**, E.Cattan, C.Soyer, C.Bergaud, M.Pugniere, L.Nicu, "Determination of the d_{31} piezoelectric coefficient of PZT using dedicated microelectromechanical systems", **The Materials Research Society Full Meeting**, Boston USA (2005, poster).

Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel

Résumé :

Les avantages liés à la réduction de taille et la microfabrication, caractéristiques des microsystèmes électromécaniques (MEMS), sont favorables à l'utilisation de microstructures dans le domaine des biocapteurs. Dans ce contexte, nous avons développé des micromembranes résonantes à actionnement et détection intégrés, par l'intermédiaire d'une couche piézoélectrique (PZT), pour la transduction d'une reconnaissance biologique. Après la fabrication de matrices de micromembranes par les techniques de microfabrication, des travaux de caractérisation statique ont permis d'appréhender le comportement initial des structures et de déterminer les propriétés du matériau piézoélectrique. Ces optimisations ont ensuite servi de base pour la caractérisation dynamique des micromembranes, qui correspond à leur mode de fonctionnement en tant que capteur de masse. Ainsi, après la validation de l'actionnement intégré des structures et la détection des fréquences de résonance par les deux effets piézoélectriques, la génération optimisée de spectres a permis de développer une électronique spécifique aux structures et de les calibrer en masse pour la détermination de la sensibilité dans l'air : $S_{\text{air}} = -15 \text{ pg}/(\text{mm}^2 \cdot \text{Hz})$. La caractérisation dynamique approfondie a permis enfin d'aborder l'utilisation des membranes en tant que biocapteur pour deux types d'application : une première orientée diagnostic par la détection spécifique en temps-réel et en milieu liquide d'anticorps alors que la seconde application concerne la combinaison des micromembranes avec des polymères à empreinte moléculaire (MIP). Cette seconde application, orientée analyse environnementale, permet de profiter des avantages liés aux MIP, tels que la stabilité et la structuration des polymères, avec ceux des micromembranes, tels que la sensibilité et le multiplexage intégré. Ces travaux correspondent à la démonstration des capacités de micromembranes résonantes pour la détection fiable, sensible, intégrée et multiplexée de biomolécules.

Mots-clés :

MEMS, biocapteur, matériau piézoélectrique, résonance, temps réel, diagnostic, polymère à empreinte moléculaire (MIP).

Silicon-based resonant micromembranes with integrated piezoelectric actuation and detection for the real time detection of biological molecules

Abstract :

The advantages provided by size reduction and microfabrication, inherent to the Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), considerably empowered these structures for specific use as biosensors. With this in mind, we have developed resonant micromembranes with an integrated actuation and detection scheme thanks to a piezoelectric layer (PZT), allowing the transduction of a biological recognition. Following to the fabrication of matrices of micromembranes using standard micromachining techniques, initial behavior of the structures and piezoelectric material properties were determined by static characterization. Optimizations made in this configuration were used for the dynamic characterization of the membranes, corresponding to their working mode as mass sensors. Thus, validation of the integrated actuation of the structures and detection of resonant frequencies thanks to the reversible piezoelectric effect, allowed to develop a dedicated electronic set-up for the matrices of micromembranes, which mass sensitivity in air was determined equal to $-15 \text{ pg}/(\text{mm}^2 \cdot \text{Hz})$. The integrated dynamic characterization of the structures gave us the opportunity of studying the potential of micromembranes as transducers for biosensing applications: a first one in a diagnostic approach by the specific detection of antibodies in real time and in liquid medium while the second application concerned the combination of the micromembranes with molecularly imprinted polymers (MIP). This environmental analysis approach was experimented using the benefits of MIPs, such as stability and engineering capabilities, with those of the micromembranes, such as sensitivity and integrated multiplexing. These biosensing applications correspond to the demonstration of the potential of resonant micromembranes for reliable, sensitive, integrated and parallel detection of biomolecules.

Keywords :

MEMS, biosensor, piezoelectric material, resonance, real time, diagnostic, molecularly imprinted polymer (MIP).