



HAL
open science

Nouvelles approches pour la nano-caractérisation, et la micro- et nano-robotique par sondes locales

Jérôme Polesel

► **To cite this version:**

Jérôme Polesel. Nouvelles approches pour la nano-caractérisation, et la micro- et nano-robotique par sondes locales. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2012. tel-00845307

HAL Id: tel-00845307

<https://theses.hal.science/tel-00845307>

Submitted on 5 Jun 2017

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.

Copyright

Mémoire
d'Habilitation à Diriger des Recherches

présenté à

L'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

Section : Sciences et Technologies, Physique

**Nouvelles approches pour la nano-caractérisation, et
la micro- et nano-robotique par sondes locales**

par

Jérôme Polese

Soutenu le 2 octobre 2012 devant la commission d'examen composée de :

Jean-Pierre Aimé, Directeur de Recherche - Université Bordeaux I, CBMN-CNRS	Rapporteur
Christophe Vieu, Professeur des Universités à l'INSA de Toulouse, LAAS-CNRS	Rapporteur
Pierre Parot, Directeur de Recherche au CEA de Marcoule, DSV/iBEB/SBTN/LIRM	Rapporteur
Luc Chassagne, Professeur à l'Université de Versailles-St Quentin en Yvelines, LISV	Président
Simon Scheuring, Directeur de Recherche à l'Université Aix-Marseille, INSERM	Examineur
Tomaso Zambelli, Directeur de Recherche à l'ETH de Zürich, LBB	Examineur
Jacques Cousty, Directeur de recherche au CEA de Saclay, DSM/IRAMIS/SPCSI	Examineur

CEA Saclay, DSM/IRAMIS, Service de Physique et de Chimie des Surfaces et Interfaces (SPCSI)





energie atomique • énergies alternatives

Copyright © 2012 - Jérôme Polese Maris

“The copyright of this manuscript rests with the author. No quotations from it should be published without the author's prior written consent and information derived from it should be acknowledged.

“Le copyright de ce manuscrit incombe à l'auteur. Aucune citation de ce manuscrit ne devra être publiée sans le consentement écrit de l'auteur. L'auteur devra avoir connaissance des informations dérivées de ce manuscrit.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury qui ont évalué, critiqué et commenté le travail accompli et qui m'ont fait l'honneur de leur présence pour ma soutenance. J'adresse mes remerciements tout particulièrement à mes rapporteurs, Jean-Pierre Aimé (Directeur de Recherche - Université Bordeaux I, CBMN-CNRS), Christophe Vieu (Professeur des Universités à l'INSA de Toulouse, LAAS-CNRS), Pierre Parot (Directeur de Recherche au CEA de Marcoule, DSV/iBEB/SBTN/LIRM) qui ont pris le temps de lire en profondeur ce manuscrit. Je remercie également Simon Scheuring (Directeur de Recherche à l'Université Aix-Marseille, INSERM), Tomaso Zambelli (Directeur de Recherche à l'ETH de Zürich, LBB) et Jacques Cousty (Directeur de recherche au CEA de Saclay, DSM/IRAMIS/SPCSI) d'avoir participé à mon jury de soutenance. Je tiens également à remercier Luc Chassagne (Professeur à l'Université de Versailles-St Quentin en Yvelines, LISV) qui a présidé mon jury.

Je souhaite également remercier Elisabeth Bouchaud, Jacques Cousty et Serge Palacin de m'avoir accueilli en 2008 au CEA au sein du Service de Physique Chimie des Surfaces et Interfaces (SPCSI).

J'adresse un remerciement soutenu envers Christophe Lubin et François Thoyer, mes fidèles techniciens qui ont permis la concrétisation de nombreux projets. Je n'oublie pas Pascal Viel (ton soutien et tes précieux conseils au CEA ont toujours été décisifs), Thomas Berthelot avec qui j'ai pu réaliser de si beaux projets interdisciplinaires à la frontière de la Physique-Chimie-Biologie.

Merci aux biologistes du CEA. Hervé Volland pour son soutien inconditionnel et ses encouragements sur mes travaux, Cécile Féraudet-Tarisse pour nos riches discussions sur les anticorps et l'utilisation des sondes locales en biologie, Jean-Luc Pellequer avec qui nous avons pu enrichir nos résultats de discussions et simulations numériques sur les protéines.

J'adresse aussi une pensée pour tous mes collègues de travail du SPCSI, notamment les techniciens Fred, Bruno, Sylvain, Bruno avec qui j'ai partagé des moments de bonne humeur quotidiens.

Je remercie également Stéphane Régnier de l'ISIR de Jussieu (UPMC), avec qui j'ai pu valider avec grand plaisir l'utilisation des sondes locales à capteurs intégrés pour la microrobotique. Je n'oublie pas les différents stagiaires que j'ai encadrés lors de cette période et qui ont débroussaillé un grand nombre de sujets.

Merci à Stéphane Guilet et Christophe Roblin du LPN de Marcoussis pour cette belle opportunité de collaboration sur les biocapteurs en polymères avec les moyens de la salle blanche.

Je remercie sincèrement Harry Heinzelmann et Raphaël Pugin du CSEM de Neuchâtel de m'avoir accueilli de 2005 à 2008 dans leur équipe pour démarrer une nouvelle activité de recherche sur les sondes locales et les MEMS pour la biologie. Je leur suis reconnaissant de m'avoir confié la conduite de différents projets sur cette thématique si passionnante et si innovante.



Je remercie très amicalement, l'ensemble de mes collègues de travail du CSEM et plus particulièrement André Meister, Martha Liley, et Peter Vettiger avec qui j'ai partagé des réunions de travail toujours fructueuses de nouvelles idées. Je n'oublie pas aussi Réal Ischer et Eric Bernard, techniciens "magiques" dont les compétences de haut niveau ont permis de réaliser les prototypes du CSEM.

Je n'oublie pas aussi la joie et l'honneur que j'ai eu à être invité à l'ETH de Zürich par Julia Vorholt (Institute of Microbiology) et Tomaso Zambelli (Laboratory of Biosensors and Bioelectronics), pour mener au sein de l'institut de microbiologie des recherches passionnantes sur les levures et les cellules HeLa avec Eva, Orane et Philip.

Bien évidemment, les résultats des travaux de recherche réalisés ne pourraient être obtenus sans l'implication des doctorants, post-doctorants et stagiaires que j'ai encadrés durant cette période. Je remercie donc très chaleureusement Ali Makky, Vincent Martinez, Carlos Caldas, Jérémy Legrand, Anthony Vuillemin, Juan Camilo Acosta pour les travaux décisifs qu'ils ont accomplis.

Enfin, je termine ces remerciements en exprimant toute ma reconnaissance à mes parents, mes sœurs, à Liliane et à Cannelle.

Pour affronter le chemin accidenté d'un chercheur, j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés celle qui m'a le mieux compris et qui a toujours eu les mots apaisants pour que je continue dans les moments les plus sombres, et à qui je dédie cette habilitation. Merci Cécilia.



energie atomique • énergies alternatives

« En science comme ailleurs, l'inertie intellectuelle, la mode, le poids des institutions et l'autoritarisme sont toujours à craindre. »

Hubert Reeves, extrait de « Patience dans l'azur »

Table des matières

Nouvelles approches pour la nano-caractérisation, et la micro- et nano-robotique par sondes locales ¹	
Remerciements	3
I) Curriculum vitae	8
I. 1 Expérience professionnelle	10
I. 2 Cursus / Diplômes.....	10
I. 3 Prix et Honneurs	11
I. 4 Encadrements de personnel scientifique et technique.....	11
I.4.1 Co-Encadrements de Doctorants	11
I.4.2 Encadrements de chercheurs Post-Doctorant	12
I.4.3 Encadrements de Techniciens.....	13
I.4.4 Encadrements d'étudiants de Master2, Master, DEA et TIPE.....	13
I. 5 Enseignements et formations dispensés, support pédagogique	14
I. 6 Organisation d'évènements scientifiques	15
I. 7 Liste des publications, brevets, et autres	16
I. 8 Présentations, séminaires and Conférences	20
II) Bilan Scientifique	24
II.1 Introduction.....	25
II.2 Nano-outils pour la biologie	31
II.2.1 Microleviers piézorésistifs à technologie silicium	31
II.2.2 Réseaux de leviers et détection interférométrique parallèle	39
II.2.3 Nanoseringue cellulaire : le FluidFM	46
II.3 Nanosondes piézoélectriques : imagerie Haute Résolution et Robotique sous Ultra Vide	51
II.3.1 Imagerie Haute Résolution sous Ultra Vide	51
II.3.2 Micro- et Nano- Robotique sous Ultra Vide	58
II.4 Conclusions.....	62
III) Prospectives	63
III.1 Préambule	64
III.2 Axe de Recherche 1 : Imagerie Haute Résolution et spectroscopie de force à l'échelle de la protéine à sonde locale à capteur intégré	65
III.3 Axe de Recherche 2 : Imagerie Haute Vitesse et nanomanipulateur à sonde locale Haute Fréquence pour l'environnement biologique	71



III.4 Axe de Recherche 3 : Biocapteurs polymériques, interrogation sans fil et microfluidique	75
IV) Bibliographie	78
V) Publications significatives fournies	90



energie atomique • énergies alternatives



I) Curriculum vitae

I. 7 Liste des publications, brevets, et autres

Total: 47

36 articles publiés dans des journaux internationaux, 1 chapitre de livre, 1 livre, 8 brevets publiés, 1 brevet déposé

NanoLetters - 1, Physical Review B - 2, Langmuir - 2, Sensors and Actuators B: Chemical - 2, PlosOne - 1, Journal of Applied Physics - 2, Review of Scientific Instruments - 2, Nanotechnology - 7, Applied Physics Letters - 2, Japanese Journal of Applied Physics - 1, Advanced Functional Materials - 1, ACS Applied Materials & Interfaces - 1, Journal of Molecular Recognition - 2, Microscopy and Analysis - 1, Microelectronic Engineering - 1, Journal of Biomechanics - 1, Journal of Physics: Conference Series - 3, Physica E - 1, Journal of Vacuum Science & Technology B - 1, IEEE International Conference on Intelligent Robots and Systems - 1, Photoniques - 1, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences:Chimie - 1

Publications – articles dans journaux internationaux

2013

- _ J. C. Acosta, J. Polesel-Maris, F. Thoyer, H. Xie, S. Haliyo, S. Régnier, "Gentle and Fast Atomic Force Microscopy with piezoelectric scanning probe for Nanorobotics Applications", *Nanotechnology* 24, 065502 (2013)
- _ A. Makky, P. Viel, S. W. Chen, T. Berthelot, J. Pellequer, J. Polesel-Maris, "Piezoelectric Tuning Fork probe for AFM imaging and Specific recognition Force Spectroscopy of an enzyme and its ligand", *Journal of Molecular Recognition*, sous presse (2013)
- _ X. Li, C. Hugon, J. Polesel-Maris, V. Martinez, D. Sakellariou, "Simple procedure for the fabrication of flexible NMR shim coils", *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences:Chimie*, en ligne (2013),

2012

- _ E. Potthoff, O. Guillaume-Gentil, D. Ossola, J. Polesel-Maris, S. LeibundGut-Landmann, T. Zambelli, J. A. Vorholt, "Rapid and serial quantification of adhesion forces of yeast and mammalian cells", *Plos One* 7, e52712 (2012)
- _ J. Polesel-Maris, Th. Berthelot, "Une nouvelle sonde locale pour la microscopie à force atomique en milieu biologique", *Photoniques* 60, 51-54 (2012)
- _ A. Makky, Th. Berthelot, C. Feraudet-Tarisse, H. Volland, P. Viel, J. Polesel-Maris, "Substructures High Resolution Imaging of Individual IgG and IgM Antibodies with Piezoelectric Tuning Fork Atomic Force Microscopy", *Sensors and Actuators B: Chemical* 162(1), 269-277 (2012)
- _ J. Polesel-Maris, J. Legrand, Th. Berthelot, A. Garcia, P. Viel, A. Makky, S. Palacin, "Force Spectroscopy by Dynamic Atomic Force Microscopy on Bovine Serum Albumin proteins changing the tip hydrophobicity, with piezoelectric tuning fork self-sensing scanning probe", *Sensors and Actuators B: Chemical* 161(1), 775-783 (2012)

2011

- _ J. Polesel-Maris, C. Lubin, F. Thoyer, J. Cousty, "Combined dynamic STM and FM-AFM investigations on polythiophene chains on graphite with a tuning fork sensor", *Journal of Applied Physics* 109, 074320 (2011)
- _ A. Garcia, J. Polesel-Maris, P. Viel, S. Palacin and Th. Berthelot, "Localized Ligand Induced Electroless Plating (LIEP) Process for the Fabrication of Copper Patterns Onto Flexible Polymer Substrates", *Advanced Functional Materials* 21(7), (2011)
- _ J. C. Acosta, G. Hwang, J. Polesel-Maris, S. Régnier, "A tuning fork based wide range mechanical characterization tool with nanorobotic manipulators inside a scanning electron microscope", *Review of Scientific Instruments* 82, 035116 (2011)

_ M. Favre, J. Polesel-Maris, T. Overstolz, P. Niedermann, S. Dasen, G. Gruener, R. Ischer, P. Vettiger, M. Liley, H. Heinzelmann, A. Meister, "Parallel AFM imaging and force spectroscopy using two-dimensional probe arrays for applications in cell biology", *Journal of Molecular Recognition* 24(3), 446-452 (2011)

2010

_ J. Hayton, J. Polesel-Maris, R. Demadrille, M. Brun, F. Thoyer, C. Lubin, J. Cousty and B. Grévin, "Atomic force microscopy imaging using a tip-on-chip: Opening the door to integrated near field nanotools", *Review of Scientific Instruments* 81, 093707 (2010)

_ A. Garcia, Th. Berthelot, P. Viel, J. Polesel-Maris and S. Palacin, "Microscopic study of a Ligand Induced Electroless Plating process onto polymers", *ACS Applied Materials & Interfaces* 2(11), 3043-3051 (2010)

_ J. C. Acosta, G. Hwang, F. Thoyer, J. Polesel-Maris, S. Régnier, "Tuning Forks based in situ SEM nanorobotic manipulation system for Wide Range mechanical characterization of ultra flexible nanostructures", *IEEE International Conference on Intelligent Robots and Systems*, 5780 (2010)

2009

_ J. Polesel-Maris, M.A. Venegas de la Cerda, D. Martrou, S. Gauthier, "Noise in Frequency Modulation-Dynamic Force Microscopy", *Physical Review B* 79, 235401 (2009), **Editors' Suggestion**

_ A. Meister, M. Gabi, J. Polesel-Maris, P. Behr, P. Studer, J. Vörös, P. Niedermann, J. Bitterli, M. Liley, H. Heinzelmann, T. Zambelli, "FluidFM: combining atomic force microscopy and nanofluidics in a universal liquid delivery system for single cell applications and beyond", *Nano Letters* 9(6), 2501 (2009), **recommended by the Faculty of 1000 (the most important advances in biology)**

_ H. Heinzelmann, A. Meister, P. Niedermann, J. Polesel-Maris, J. Bitterli, M. Liley, M. Gabi, P. Behr, P. Studer, J. Vörös, T. Zambelli, "NADIS: A Novel AFM-based Tool for Dispensing Fluids into Single Cells", *Microscopy and Analysis* 23(6), (2009), *Image of the Month*

_ A. Meister, J. Polesel-Maris, P. Niedermann, J. Przybylska, P. Studer, M. Gabi, P. Behr, T. Zambelli, M. Liley, J. Vörös, H. Heinzelmann, "Nanoscale dispensing in liquid environment of streptavidin on a biotin-functionalized surface using hollow atomic force microscopy probes", *Microelectronic Engineering* 86, 1481 (2009)

_ L. Pham Van, V. Kyrylyuk, J. Polesel-Maris, F. Thoyer, C. Lubin, J. Cousty, "Experimental Three-Dimensional Description of the Liquid Hexadecane/Graphite Interface", *Langmuir* 25 (2), 639-642 (2009)

_ F. Montagne, J. Polesel-Maris, R. Pugin, H. Heinzelmann, "Poly(N-isopropylacrylamide) Thin Films Densely Grafted onto Gold Surface: Preparation, Characterization, and Dynamic AFM Study of Temperature-Induced Chain Conformational Changes", *Langmuir* 25 (2), 983-991 (2009)

2008

_ G. Weder, M. Giazzon, J. Polesel-Maris, J. Vörös, M. Liley, H. Heinzelmann, "Measuring cell adhesion forces as a function of the cell cycle by force spectroscopy", *Journal of Biomechanics* 41, S22 (2008)

2007

_ T. Trevethan, J. Polesel-Maris, M. Watkins, A. L. Shluger, S. Gauthier, L. N. Kantorovich, "A comparison of dynamic atomic force microscope set-ups for performing atomic scale manipulation experiments", *Nanotechnology* 18 (34), 345503 (2007)

_ T. Trevethan, L. Kantorovich, J. Polesel-Maris, S. Gauthier, A. Shluger, "Multiscale model of the manipulation of single atoms on insulating surfaces using an atomic force microscope tip", *Physical Review B* 76 (8), 085414 (2007)

_ T. Trevethan, L. Kantorovich, J. Polesel-Maris, S. Gauthier, "Is atomic-scale dissipation in NC-AFM real? Investigation using virtual atomic force microscopy", *Nanotechnology* 18 (8), 84017-84017 (2007)

_ J. Polesel-Maris and S. Gauthier, "Noise in Frequency Modulation-Dynamic Force Microscopy", *Journal of Physics: Conference Series* 61, 949-954 (2007)

_ J. Polesel-Maris, L. Aeschmann, A. Meister, R. Ischer, E. Bernard, T. Akiyama, M. Giazzon, P. Niedermann, U. Staufer, R. Pugin, N. F. de Rooij, P. Vettiger, H. Heinzelmann, "Piezoresistive cantilever array for life sciences applications", *Journal of Physics: Conference Series* 61, 955-959 (2007)

_ H. Guo, D. Martrou, T. Zambelli, J. Polesel-Maris, A. Piednoir, E. Dujardin, S. Gauthier, M. A. F. van den Boogaart, L. M. Doeswijk, J. Brugger, "Nanostenciling for fabrication and interconnection of nanopatterns and microelectrodes", *Applied Physics Letters* 90 (9), 93113 (2007)

_ T. Akiyama, L. Aeschimann, L. Chantada, N. F. de Rooij, H. Heinzelmann, H. P. Herzig, O. Manzardo, A. Meister, J. Polesel-Maris, R. Pugin, U. Staufer, P. Vettiger, "Concept and demonstration of individual probe actuation in two-dimensional parallel atomic force microscope system", *Japanese Journal of Applied Physics Part 1* 46 (9B), 6458-6462 (2007)

_ L. Aeschimann, F. Goericke, J. Polesel-Maris, A. Meister, T. Akiyama, B. Chui, U. Staufer, R. Pugin, H. Heinzelmann, N. F. de Rooij, W. P. King, P. Vettiger, "Piezoresistive scanning probe arrays for operation in liquids", *Journal of Physics: Conference Series* 61, 6-10 (2007)

2006

_ T. Trevethan, M. Watkins, L. N. Kantorovich, A. L. Shluger, J. Polesel-Maris, S. Gauthier, "Modelling atomic scale manipulation with the non-contact atomic force microscope", *Nanotechnology* 17 (23), 5866-5874 (2006)

_ J. Polesel-Maris, H. Guo, T. Zambelli, S. Gauthier, "Mapping van der Waals forces with frequency modulation dynamic force microscopy", *Nanotechnology* 17 (16), 4204-4211 (2006)

2005

_ J. Polesel-Maris and S. Gauthier, "A virtual dynamic atomic force microscope for image calculations", *Journal of Applied Physics* 97 (4), 044902 (2005)

2004

_ J. Polesel-Maris, A. Piednoir, T. Zambelli, X. Bouju, S. Gauthier, "An experimental investigation of resonance curves on metallic surfaces in dynamic force microscopy: the influence of frozen versus mobile charges", *Nanotechnology* 15 (2), S24-S29 (2004)

2003

_ J. Polesel-Maris, A. Piednoir, T. Zambelli, X. Bouju, S. Gauthier, "Experimental investigation of resonance curves in dynamic force microscopy", *Nanotechnology* 14 (9), 1036-1042 (2003)

_ C. Bringer, V. Bardinal, L. Averseng, J. Polesel-Maris, T. Camps, P. Dubreuil, C. Fontaine, E. Bedel-Pereira, C. Vergnenegre, "Study of the photodetection behaviour of oxide-confined vertical-cavity surface-emitting lasers (VCSELs)", *Physica E-Low-Dimensional Systems & Nanostructures* 17 (1-4), 470-471 (2003)

2002

_ V. Bardinal, L. Averseng, C. Bringer, T. Camps, J. Polesel-Maris, P. Dubreuil, C. Fontaine, E. Bedel-Pereira, C. Vergnenegre, A. Munoz-Yague, "Experimental demonstration of oxide-mode influence in a dual-purpose oxide-confined vertical-cavity surface-emitting laser/resonant detector", *Applied Physics Letters* 81 (10), 1771-1772 (2002)

Livre et chapitre de livre

_ J. Polesel, "Microscopie à Force Atomique Dynamique : Eléments de Modélisation et Expérimentations en AFM", Editions universitaires européennes, Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften GmbH & Co. (2011), ISBN 978-613-1-55954-9

_ C. Santschi, J. Polesel-Maris, J. Brugger, H. Heinzelmann, in "Nanofabrication: Fundamentals and Applications", edited by A. Tseng (World Scientific publishing Co. Pte. Ltd., Hackensack, USA, 2008), p. 65, ISBN 978-981-270-076-6

Brevets

- _ J. Polesel-Maris, "Procédé de fabrication d'un capteur piezorésistif", dépôt FR 12/60072
- _ J. Polesel-Maris, Th. Berthelot, "Biosensor and method of manufacturing such a biosensor", FR2971851, WO2012114227
- _ J. Polesel-Maris, Th. Berthelot, P.Viel, "Atomic force microscope probe, method for preparing same, and uses thereof ", FR2969762, WO2012084994
- _ J. Polesel-Maris, "Device for homothetic projection of a pattern onto the surface of a sample, and lithography method using such a device", FR2966941, WO2012055833
- _ J. Polesel-Maris, "Electronic control and amplification device for a piezoelectric local probe for measuring force beneath a particle beam", WO2011092225, FR2955938
- _ J. Polesel-Maris, A. Meister, G. Gruener, "Parallel cantilever deflection measurement", EP2336789
- _ J. Polesel-Maris, F. Cardot, "Microlever containing a magneto-impedance stress sensor", EP2090877
- _ A. Meister, J. Polesel-Maris, M. Gabi, J. Vörös, T. Zambelli, "Probe arrangement for electrophysiological analysis in an AFM", US2008302960, EP1990626

Rapports scientifiques et techniques, Manuscrits

- _ Manuscrit d'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR), "*Nouvelles approches pour la nano-caractérisation, et la micro- et nano-robotique par sondes locales*", Université de Versailles (France)
- _ Internal Technical Report, "*Filter and data treatment of the deflection signal from FluidFM machine*", décembre 2011, ETH, Zürich (Suisse)
- _ Internal Technical Report, "*Interferometric detection and results on the MIP ArrayFM platform*", décembre 2007, CSEM SA, Neuchâtel (Suisse)
- _ Internal Technical Report, "*Self-sensing microlevers based on magneto-impedance strain sensor*", mai 2007, CSEM SA, Neuchâtel (Suisse)
- _ Internal Technical Report, "*Probe Array Technology – Final Report*", mars 2006, CSEM SA, Neuchâtel (Suisse)
- _ Manuscrit de Thèse, "*Modélisations et Expérimentations en Microscopie à Force Atomique Dynamique en Ultra Vide*", juin 2005, Université Paul Sabatier, Toulouse (France)
- _ Rapport de stage Master2/DEA, "*Etude expérimentale et modélisation de l'AFM en Ultra-Vide*", juillet 2002, CEMES-CNRS, Toulouse (France)
- _ Rapport de stage Master1/ Maîtrise, "*Mise au point d'une méthode d'imagerie champ proche-champ lointain de VCSELs*", juin 2001, LAAS-CNRS, Toulouse (France)
- _ Rapport de stage Licence, "*Les Fractales: Phénomènes non linéaires*", avril 2000, Université Paul Sabatier, Toulouse (France)
- _ Rapport de travail de Licence, "*Etude numérique de l'équation de diffusion et Phénomènes irréversibles*", avril 2000, Université Paul Sabatier, Toulouse (France)
- _ Rapport de travail de Licence, "*La dispersion chaotique : c'est du billard !*", juillet 1999, Université Paul Sabatier, Toulouse (France)

Code informatique publié (GNU, GPL)

- _ "*Self Consistent Image Force Interaction + virtual AFM machine*", L. Kantorovich, T. Trevethan, J. Polesel-Maris and A. Foster, **Lien WEB:**
http://www.cmp.ucl.ac.uk/~lev/codes/SciFi/manual_4.3.5.html.LyXconv/manual_4.3.5.html

Vulgarisation Scientifique

- _ Interview radiophonique sur "**FRANCE INFO**" (par Marie-Odile Monchicourt): "*Un nouvel instrument pour scruter le nanomonde*", émission du 16 Février 2012
Lien WEB: <http://www.franceinfo.fr/monde/info-sciences/un-nouvel-instrument-pour-scruter-le-nanomonde-529965-2012-02-16>

_ Communication dans le journal "**Le MONDE**" :

"[Microscope et canon à protons : Deux projets innovants distingués en Ile-de-France](#)", David Larousserie, édition du samedi 11 Février 2012

_ Communication dans la revue "**La Recherche**" :

"[Les liaisons chimiques sous le microscope](#)", Jean-François Haït, N°469 November 2012

I. 8 Présentations, séminaires and Conferences

Présentations, Séminaires sur Invitation

_ "*Strategies to investigate biological objects with success using piezoelectric tuning fork Atomic Force Microscopy*",

Invité par le comité scientifique d'ImagineNano SPM 2013, Bilbao (Espagne), 23-24 Avril 2013

_ "*Biocapteurs polymériques*",

Invité par Dr. Daniel Gillet, Séminaire du réseau de laboratoires Biotox Piratox, 13-14 Mai 2013, Ecole du Val de Grace, Paris (France)

_ "*New standards of scanning probes for Atomic Force Microscopy*",

Invité par Dr. Pierre Parot, COST Action (European Program), « Standardization in AFM for Life Sciences », Madrid (Espagne), 18-19 Octobre 2012

_ "*Tuning Fork self-sensing AFM scanning probe for Biological applications*",

Invité par Dr. François Piuze, FRENCH SWEDISH SEMINAR, Paris, UBI France, 14 Mai 2012

_ "*Self-sensing Atomic Force Microscopy (AFM) for Biology*",

Invité par Pr. Andreas Offenhäuser, Forschungszentrum Jülich GmbH, Peter Grünberg Institute (Allemagne), 19 – 20 Janvier 2012

_ "*Tuning Fork self-sensing AFM scanning probe for Biological applications*",

Invité par Pr. Véronique Rosilio, Physico-Chimie des Surfaces, UMR CNRS 8612-Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry (France), 3 Février 2012

_ "*Microscope à Force Atomique (AFM) pour la Biologie*",

Invited by Dr. Hervé Volland, Service de pharmacologie et d'immuno analyse (SPI), Laboratoire d'études et de recherches en immunoanalyse (LERI), CEA Saclay (France), 24 Janvier 2012

_ "*Challenges of Atomic Force Microscopy (AFM) for Biology*",

Invité par Pr. Julia Vorholt, Institute of Microbiology, ETH of Zürich (Suisse), 25 Novembre 2011

_ "*High Resolution Imaging with Tuning Fork self-sensing scanning probe: from Ultra High Vacuum to Biological environments*",

Invité par Dr. Tomaso Zambelli, Laboratory of Biosensors and Bioelectronics, ETH of Zürich (Suisse), 7 Juillet 2011

_ "*Some words about Tuning Fork scanning probes*",

Invited by Pr. Tomaso Zambelli, Laboratory of Biosensors and Bioelectronics, ETH of Zürich (Switzerland), 5th July 2010

_ "*Some words about self-sensing scanning probes*",

Invité par Dr. Jean-Philippe Bourgoïn, Workshop University of Science and Technology of China/CEA, Grenoble (France), 5 -8 Octobre 2009

_ "*Self-sensing scanning probes for biological applications*",

Invité par Pr. Pierre Parot, AFM BioMed International Summer School 2008, Marcoule (France), 28 Août- 3 Septembre 2008

Conférences

Présentations orales

2013

_ International Meeting on AFM in Life Sciences and Medicine (AFM BioMed 2013), 7th-11st May 2013, Shanghai (China):

- *Polymeric AFM hollow cantilevers for life sciences applications*

2012

_ International Conference on Nanoscience + Technology (ICN+T 2012), 23rd-27th July 2012, Paris (France):

- *Nanometric Morphology of Graphene on 6H-SiC(0001) by Combined Dynamic STM and FM-AFM with a Tuning Fork Sensor*

_ International Conference "Seeing at the Nanoscale 2012", 9th-11th July 2012, Bristol (England):

- *High Resolution AFM Imaging and Specific Biochemical Force Spectroscopy of Proteins using Piezoelectric Tuning Fork Atomic Force Microscopy*

2011

_ Forum of the Scanning Probe Microscopies, 28th March-1st April 2011, Ecully (France):

- *Une puissante technique d'étude des surfaces: Les microscopies STM et FM-AFM simultanées par diapason piézoélectrique*

_ Seventh Meeting "Plasticité et Intégrité des Génomes (PIG7)", Co-organization CEA DSV-DSM, 17th -18th November 2011, Saclay (France):

- *Matériaux innovants et sondes locales AFM pour la biologie: Self-sensing Atomic Force Microscope (AFM) for High Resolution Imaging and Force Spectroscopy of Proteins*

2010

_ IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS 2010), 18th-22nd October 2010, Taipei (Taiwan):

- *Tuning Fork based in situ SEM nanorobotic manipulation system for Wide Range mechanical characterization of ultra flexible nanostructures*

_ Trends in NanoTechnology (TNT 2010), 6th-10th September 2010, Braga (Portugal):

- *Deposition and Modification of Nanowires by FluidFM technology*

_ International Conference on Nano-Materials and Renewable Energies (ICNMRE 2010), 5th-8th July 2010, Safi (Morocco):

- *2D/3D self-organization of molecules at the liquid/solid interface*

2009

_ Trends in NanoTechnology (TNT 2009), 7th-11th September 2009, Barcelona (Spain):

- *FluidFM: combining AFM and nanofluidics in a novel tool for single-cell experiments and beyond*

_ 16th Congress European Society of Biomaterials, 6th-9th July 2009, Lausanne (Switzerland):

- *Measuring cell adhesion forces during the cell cycle by force spectroscopy*

_ Swiss User Group Surfaces and Interfaces (GSSI - SAOG 2009), 25th Annual Meeting, 23rd January 2009, Fribourg (Switzerland):

- *Force spectroscopy in liquid media - an AFM study of nanostructured surfaces functionalized with responsive molecules*

2008

_ 34th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE2008), 15th-19th September 2008, Athens (Greece):

- *Nanoscale dispensing in liquid environment of streptavidin on a biotin-functionalized surface using hollow atomic force microscopy probes*

_ 16th Congress European Society of Biomechanics, 6th-9th July 2008, Lucerne (Switzerland):

- *Measuring cell adhesion forces during the cell cycle by force spectroscopy*

_ 3rd International Conference Smart Materials, Structures and Systems (CIMTEC 2008), 9th-13rd June 2008, Acireale, Sicily (Italy):

- *A New Force Controlled Liquid Injection System for Biomedical Applications*

_ Swiss Physical Society Annual Meeting (SSP 2008), 26th March 2008, Geneva (Switzerland):

- *Stimuli responsive MEMS compatible surfaces*

2006

_ Micro- and Nano- Engineering, 17th-20th September 2006, Barcelona (Spain):

- *Piezoresistive Cantilever Array for Applications in Life Sciences*

_ International Conference on Nanoscience and Technology, 30th July-4th August 2006, Basel (Switzerland):

- *Piezoresistive Cantilever Array for Life Sciences Applications*
- *Noise in Frequency Modulation-Dynamic Force Microscopy*

_ 9th international conference on non-contact atomic force microscopy (NC-AFM 2006), 16th-20th July 2006, Kobe (Japan):

- *Simulations of controlled single atom manipulation in insulating surfaces*

2004

_ Forum 2004 of Near Field Microscopies, 23rd-26th March 2004, Bonascre (France):

- *Etude par FM-AFM de molécules d'octanedithiol déposées sur des dépôts d'or sur MoS₂(0001)*

2003

_ Nanosciences Session XVII, 14th-25th September 2003, Les Houches (France):

- *Virtual AFM for dynamic image calculations*

_ NC-AFM 2003 Sixth International Conference on Noncontact Atomic Force Microscopy, 31st August-3rd September 2003, Dingle (Ireland) :

- *Experimental studies and analysis of resonance curves in dynamic AFM*

_ Forum 2003 of Near Field Microscopies, 25th-28th March 2003, La Grande Motte (France):

- *Etude expérimentale et analyse de courbes de résonance en AFM dynamique sur différents substrats*

2001

_ SFO OPTIX 2001, 26th-28th March 2001, Marseille (France):

- *Oxide and Fabry Perot modes of photodetection of Oxide Vertical Cavity Surface Emitting Lasers used as photodetective*

Posters

2012

_ NRBC-Bio Day at NEUROSPIN, 18th December 2012, Paris (France):

- *Polymer BioSensors for specific detection of pathogen agents*

2011

_ International Meeting on AFM in Life Sciences and Medecine (AFM BioMed 2011), 23rd-27th August 2011, Paris (France):

- *Piezoelectric self-sensing AFM Scanning Probe for high resolution imaging and Dynamic Force Spectroscopy measurements*

2009

_ Forum 2009 of Near Field Microscopies, 16th-19th March 2009, Neufchâtel-Hardelot (France):

- *FluidFM: A Novel AFM-based Biotool for Liquid Dispensing*

2008

_ 7th International Symposium on Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, 8th-9th October 2008, Berlin (Germany):

- *FluidFM: A novel AFM-based tool for single-cell experiments*

_ ESF-UB Conference in Nanomedicine 2008, 19th-24th September 2008, Sant Feliu de Guixols (Spain):

- *AFM-controlled injection of labelled molecules into single living cells*

_ 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 11st-12nd September 2008, Zürich (Switzerland):

- *AFM-controlled injection of labelled molecules into single living cells under physiological conditions*

_ 30th Congress of the French Society of Cell Biology, 25th-28th March 2008, Toulouse (France)

- *Adhesion properties during the different phases of the cell cycle*

2007

_ Gordon Research Conference "Cell Contact & Adhesion", 27th May-1st June 2007, Il Ciocco (Italy):

- *Measuring cell adhesion forces on nanostructured surfaces by force spectroscopy*

_ 13th General Meeting of the Swiss Society for Biomaterials, 9th May 2007, Neuchâtel (Switzerland):

- *Measuring cell adhesion forces as a function of the cell cycle by force spectroscopy*

_ International Meeting on AFM in Life Sciences and Medicine (AFM BioMed 2007), 19th-21st April 2007, Barcelona (Spain)

- *Micro and Nano-Systems for Cellular Biomechanics*

_ Swiss User Group Surfaces and Interfaces (GSSI - SAOG 2007), 23rd Annual Meeting, 26th January 2007, Fribourg (Switzerland):

- *Measuring cell adhesion forces on nanostructured surfaces by force spectroscopy*

2006

_ International Conference on Nanoscience and Technology, 30th July-4th August 2006, Basel (Switzerland):

- *Mapping van der Waals Forces by Frequency Modulation Dynamic Force Microscopy*

_ CMI-COMLAB MicroNanoFabrication Annual Review Meeting, EPFL, 16th May 2006, Lausanne (Switzerland):

- *Probe array technology promising applications for life sciences and force spectroscopy*

_ International Workshop on Nanomechanical Sensors, 7th-10th May 2006, Copenhagen (Denmark):

- *Applications of piezoresistive scanning probe arrays for general microscopy and life science*

2005

_ NanoTech 2005, 15th-17th November 2005, Montreux (Switzerland):

- *Scanning probe arrays for life sciences and nanobiology applications*

2004

_ Forum 2004 of Near Field Microscopies, 23rd-26th March 2004, Bonascre (France):

- *Modélisation dynamique d'un FM-AFM pour le calcul d'images*



energie atomique • énergies alternatives

II) Bilan Scientifique

II.1 Introduction

Le développement de la microscopie à effet tunnel (Scanning Tunneling Microscopy, STM) et ensuite de la microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy, AFM) dans les années 80 a représenté la percée la plus significative des nanosciences, sinon leur vrai point de départ [1]. Pour la première fois, il était possible d'observer les atomes de surfaces planes dans l'espace réel, de mesurer des forces d'interaction au niveau de la molécule, et de manipuler la matière à l'échelle atomique.

Aujourd'hui, les instruments à sondes locales incluent un éventail de techniques de microscopie qui a trouvé des applications innombrables dans les laboratoires mais aussi dans l'industrie. Le STM est la plupart du temps employé pour la haute résolution sur les surfaces électriquement conductrices dans des environnements de vide très poussé (Ultra High Vacuum, UHV), et pour de la spectroscopie électronique locale. Parallèlement, la microscopie de force AFM est devenue une technique de sonde locale plus polyvalente et plus souple pour explorer les informations microscopiques sur tous types de surface (conductrice, semi-conductrice ou isolante). En environnement contrôlé sous Ultra Vide, cette microscopie de force a démontré un pouvoir de résolution atomique comparable au STM [2,3], voir sub-atomique [4]. Les microscopies à sonde locale dérivant de l'AFM forment une grande famille comprenant des techniques permettant non-seulement de caractériser la topographie de surface à des échelles nanométriques, mais aussi de quantifier localement la plupart des observables physiques et physico-chimiques. Par exemple, on y trouve la microscopie de champ proche optique (SNOM), la microscopie de champ proche électrochimique (SECM), la microscopie de champ proche thermique (SThM), mais cela n'est pas exhaustif. La Figure 1 proposée par Christoph Gerber et Hans Peter Lang en 2006 [5] illustre bien la pléthore de techniques dérivant de l'AFM.

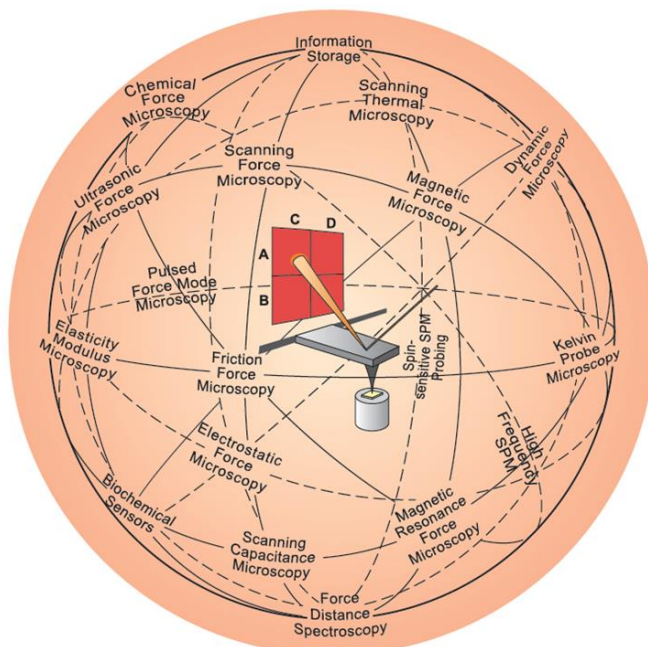


Figure 1 - La planète AFM. La sonde de force AFM (au centre) a inspiré une myriade d'autres techniques à sondes locales. A l'origine, l'AFM fut utilisé pour caractériser les topographies de surface, mais en modifiant la pointe il est possible d'explorer d'autres quantités physiques et physico-chimiques (forces magnétiques, électrostatiques, potentiels chimiques, friction, ...), et de réaliser pour chacune de ces quantités de la spectroscopie locale. D'après Gerber et Lang [5].

Depuis 1991, sous la première impulsion d'Andreas Engel [6,7], la microscopie de force AFM a été exploitée avec succès pour l'étude du monde biologique. La versatilité de l'instrument a permis

l'étude de différents objets biologiques de la protéine isolée aux tissus de cellules dans leur environnement de survie. La relative simplicité de préparation de l'échantillon dans son milieu biologique sans nécessité de marquage pour le suivi, comme par exemple en microscopie par fluorescence, fait que cet instrument trouve aujourd'hui sa place dans les laboratoires et industries en biotechnologies. Ici aussi, dans le paysage des techniques de champ proche dérivant de l'AFM, les instruments dédiés à des applications biologiques spécifiques représentent une grande famille de dispositifs comme cela a été illustré par Daniel Müller et Yves Dufrêne en 2008 [8] (voir Figure 2).

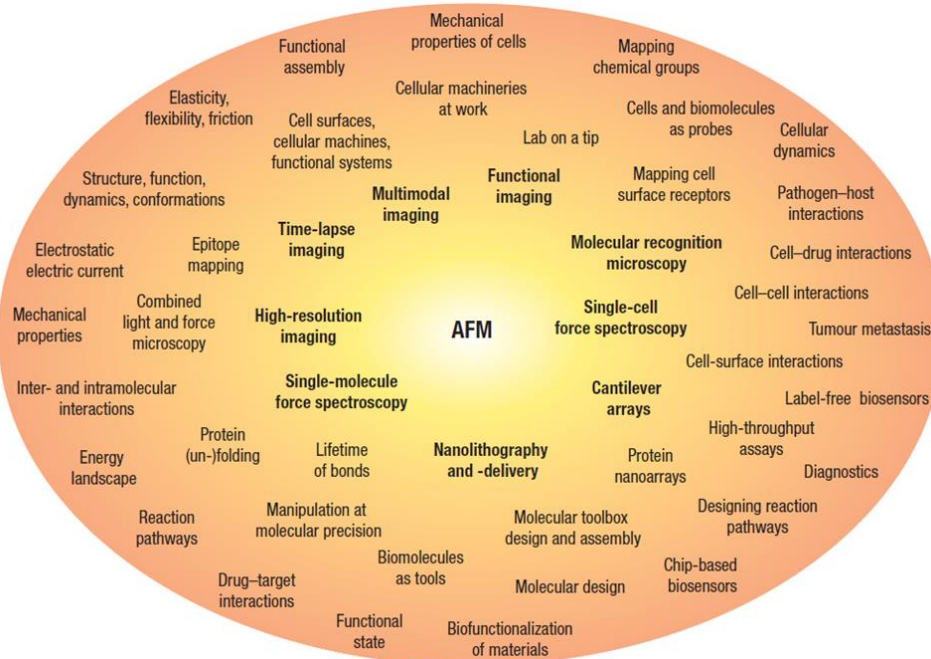


Figure 2 - La planète AFM en Biologie. Une myriade de techniques dérivant de l'AFM pour scruter exclusivement le monde biologique de la protéine jusqu'à l'échelle cellulaire. D'après Müller et Dufrêne [8].

Les techniques d'analyse basées sur l'AFM pour les mesures de forces locales en milieu physiologique ouvrent de nouvelles opportunités de caractérisation pour la nanomédecine et le diagnostic personnalisé [6,9–11]. Les nanocapteurs de force détectant des interactions moléculaires spécifiques donneur-accepteur peuvent être utilisés pour l'ingénierie pharmaceutique [12] ou la détection de bio-marqueurs [13–17]. Par exemple, ces mesures de force spécifiques permettent de mieux comprendre les mécanismes de déstabilisation des protéines dans les maladies neuro-dégénératives [18], et par quels mécanismes certaines molécules se lient et modulent les récepteurs transmembranaires des cellules [19,20]. En parallèle, l'imagerie biologique par AFM a déjà démontré sa capacité de haute résolution de structures périodiques de protéines [21], ou de protéines isolées [22–24] sans aucun équivalent instrumental pour parvenir à ces résultats ultimes en milieu biologique.

En spectroscopie de force cellulaire, une cellule est habituellement immobilisée par chimie sur une surface et mise ensuite en contact avec une pointe d'AFM (ou une autre cellule fixée sur un microlevier) durant un temps déterminé, puis retirée du substrat à une vitesse contrôlée via le déplacement de la micropoutre de l'AFM. Les forces mesurées lors de l'approche de la sonde vers le substrat donnent accès, de manière locale, aux propriétés rhéologiques de la cellule. Ainsi des corrélations peuvent être faites entre les propriétés viscoélastiques de la cellule, ou d'un tissu

cellulaire, et sa réaction à un stress [25,26] (chimique, optique, mécanique ou électrique). Ensuite, lors du retrait de la sonde AFM du substrat, des décrochements du signal de force sont révélés et donnent des indications précieuses sur les forces et mécanismes d'adhésion de la cellule. Ce genre d'analyse a déjà été utilisé pour explorer en détails les propriétés d'adhésion de la cellule sur différents substrats [27,28], avec de fortes implications concernant l'ingénierie tissulaire [26], mais aussi pour établir des différences spécifiques entre les propriétés élastiques de cellules tumorales et saines [29–32], ou vis-à-vis d'une réponse immunitaire [9].

Une caractéristique commune des sondes locales concerne l'utilisation d'une nano-sonde scrutant la surface par balayage périodique pour générer une cartographie en topographie, en force ou en toute autre observable accessible par l'instrument. A cette fin, une boucle de contre-réaction compare de manière continue l'observable mesurée à une consigne pour corriger la trajectoire de la pointe. En conséquence, les temps d'acquisition des sondes locales sont longs. Par exemple, pour une cartographie de 512x512 points avec une vitesse de balayage de la sonde de 1 seconde/ligne, le temps d'acquisition sera de l'ordre de la dizaine de minutes. Cette limitation empêche l'exploration de systèmes avec une grande dynamique temporelle. Ces verrous devront être repoussés en améliorant la bande passante des amplificateurs, la géométrie et les modes de résonances de la sonde mais aussi du scanner opérant le balayage, et en améliorant le rapport signal-sur-bruit pour diminuer le temps d'acquisition nécessaire.

Récemment, un intérêt croissant est né pour une transition de sondes locales micrométriques vers des sondes nanométriques pour augmenter les taux d'acquisition des données, améliorer la résolution de détection en force et ouvrir la voie à des caractérisations à très haute vitesse [33]. Certaines de ces problématiques de vitesse ont été partiellement résolues avec l'arrivée d'un certain nombre de prototypes de microscope AFM « Ultra-rapides » (« *High Speed AFM* ») [34–41]. Des taux d'acquisition de l'ordre de la centaine de millisecondes par image ont été atteints, mais au détriment d'un faible nombre de pixels et d'une excursion spatiale limitée (< 1 micron) du scanner de balayage. De plus, ces techniques nécessitent l'utilisation de microleviers AFM plus petits que la dizaine de microns pour conserver une haute sensibilité de détection en force avec de hautes fréquences de fonctionnement de l'ordre du megaHertz ou plus [34,42]. Cependant, la détection optique conventionnelle par faisceau laser [43] pour détecter le mouvement du microlevier AFM arrive aujourd'hui à ses limites [44] pour implémenter des sondes dont les dimensions ne sont que de l'ordre de quelques longueurs d'onde [33]. De nouvelles méthodes de détection du mouvement de la sonde AFM, ou même de nouveaux types de sondes AFM doivent donc être mis en œuvre et optimisés pour la prochaine génération d'instruments à sonde locale.

Un autre cas où la détection optique conventionnelle devient problématique concerne l'utilisation de sondes AFM en tant que robots de micro- et nano-manipulation. En effet, la pointe d'une sonde AFM a déjà été utilisée en tant que « nano-outil » polyvalent, grâce à sa précision de mouvement et de repositionnement sub-nanométrique appliquée à la lithographie, à l'assemblage de nano-objets voire d'atomes [45,46] mais aussi pour d'autres fonctions de manipulations, extraction, perforation, etc ... Ainsi, ces nouveaux « nano-outils » dérivant de l'AFM adressent aujourd'hui de nouveaux enjeux pour la robotique afin de manipuler la matière à l'échelle nanométrique dans divers environnements, de l'Ultra Vide jusqu'à la solution biologique. La nécessité de combiner plusieurs de ces nano-outils avec des fonctions différentes dans un même environnement sur un même objet oblige à la mise en œuvre de nouvelles sondes AFM, écartant les verrous d'implémentation de la détection optique.

Une stratégie prometteuse pour augmenter le flux de données tout en augmentant la vitesse d'acquisition et le rapport signal-sur-bruit consiste en la mise en réseau de sondes locales AFM opérant en parallèle. Cette architecture en réseau, auparavant démontrée par Peter Vettiger avec le Millipede [47–49], est une solution pour franchir la barrière du temps d'acquisition, mais aussi, par là même, pour repousser les limites spatiales en balayage des scanners AFM actuels. Des cartographies recomposées en topographie, force ou toutes autres observables fournies par l'instrument, sur des étendues millimétriques [50], voire centimétriques [51,52], avec une résolution nanométrique paraissent ainsi envisageables. Ce système ultime de nanocaractérisation combinera une architecture matricielle de nanocapteurs à détection intégrée qui pourront être élaborés par les techniques standards de microfabrication. L'important flux de données généré par ce système multisondes devra aussi inclure l'Instrumentation nécessaire au pilotage, et aux traitements des données pour reconstituer les cartographies.

Dans ce manuscrit, j'illustrerai par mon bilan scientifique d'après thèse, et aussi par mes perspectives de projets, comment j'ai contribué à répondre, et je continue aujourd'hui, à plusieurs des problématiques citées auparavant afin de converger vers une nouvelle génération de systèmes à sonde locale en mettant en place : 1) de nouvelles stratégies de détection intégrée pour les nanocapteurs, 2) une haute sensibilité de détection pour l'imagerie et la spectroscopie de force, 3) des implémentations pour la micro- et nano-robotique, 4) des architectures en réseau de nanocapteurs, 5) le contrôle de ces nano-outils en milieux extrêmes (Ultra Vide et environnement biologique). Un des dénominateurs communs de ces projets est l'approche multidisciplinaire essentielle entre le monde de la physique des surfaces et du champ proche, le monde de la biologie et celui de la robotique.

En premier lieu du bilan scientifique, je présenterai le développement de nano-outils innovants à sonde locale pour la biologie. L'utilisation inédite de microleviers à capteur intégré piézorésistif a permis l'étude des propriétés élastiques de cellules vivantes. L'architecture en réseau de ces sondes locales a permis d'étendre le champ d'investigation AFM au millimètre carré tout en conservant une résolution nanométrique. Pour franchir la barrière en sensibilité de détection de force, l'architecture en réseau de microleviers par détection interférométrique a permis de repousser la barrière de sensibilité à quelques picoNewtons, tout en conservant une grande couverture de balayage. Ces dispositifs sont destinés à répondre à des attentes biomédicales afin de compléter l'analyse histologique de tissus cancéreux en collaboration avec des biologistes de l'Université de Neuchâtel et du CSEM.

Pour agir, prélever et manipuler à l'échelle d'une cellule, un nouveau type de microlevier AFM creux a été développé, en collaboration avec l'ETH de Zürich. Le retour de force par AFM permet un contrôle ultime de l'injection/extraction cellulaire sans endommager la cellule. La capacité à obtenir des renseignements au niveau de la cellule unique et de perturber les cellules individuelles est d'une importance capitale pour de nombreuses questions biologiques. Il y a une prise de conscience croissante que les cellules individuelles, bien que génétiquement identiques dans une lignée, montrent des phénotypes différents et des profils différents d'expression des gènes avec une conséquence directe sur les protéines et les métabolites. Il y a donc également un besoin de modifier les cellules individuelles afin de valider ces hypothèses fondamentales. L'analyse des cellules individuelles représente un défi majeur et de nouvelles technologies innovantes pour perturber la cellule, ainsi que pour l'échantillonnage, l'extraction et la détection moléculaire avec une sensibilité plus élevée sont nécessaires. La force du système que nous avons réalisé tient à l'analyse de cellules individuelles dans des conditions physiologiques avec la possibilité unique d'effectuer plusieurs

expériences de manipulation de cellules tout en observant la réponse par microscopies optique, ou confocale.

La deuxième partie de mon bilan scientifique concerne la mise au point d'un nouveau type de sonde locale à détection intégrée piézoélectrique pour caractériser de manière unique des dispositifs moléculaires par microscopies AFM/STM combinées, sous Ultra Vide. Des cartographies STM des densités locales d'états électroniques ont ainsi pu être obtenues en parallèle de cartographies AFM des propriétés mécaniques locales d'édifices moléculaires ou atomiques. Les retombées de tels travaux de recherche de caractérisation fondamentale des couplages mécano-électroniques moléculaires concernent notamment *l'Electronique Moléculaire* et la *Chimie Organique*.

La sensibilité et la versatilité de cette nouvelle sonde piézoélectrique ont permis l'émergence de projets en nanorobotique. En premier lieu, l'intégration inédite d'une telle sonde dans un microscope électronique à balayage a permis la nanocaractérisation en force de MEMS et NEMS en collaboration avec l'ISIR de Jussieu (UMPC, Paris V). Ces résultats sans précédents ont pu établir avec précision le comportement mécanique en élongation de nanohélices en InGaAs/GaAs, sous Vide. Dans un second projet, cette même sonde nous a permis de piloter une puce de nanofabrication de nanoélectrodes, en collaboration avec l'INAC/SPrAM de Grenoble. Ce dispositif de « nanostencil » dynamique par sonde AFM piézoélectrique est aujourd'hui utilisé dans de nouveaux projets à l'INAC de Grenoble pour la conception de dispositifs pour *l'Electronique Moléculaire*

Enfin, je terminerai ce mémoire par la proposition de trois Axes de Recherche futurs. L'ensemble de ces 3 Axes converge vers un but ultime à long terme qui est la compréhension des phénomènes physiques à l'échelle de la molécule unique en particulier pour le développement de capteurs pour la chimie et la biologie avec une résolution et une sensibilité extrêmes. L'enrichissement scientifique et technique multidisciplinaire de mon bilan scientifique me permet aujourd'hui de proposer avec force ces Axes de Recherche pour les prochaines années de ma vie de chercheur.

Le tableau suivant (Tableau 1) illustre la contribution aux différents projets sur lesquels j'ai travaillé ainsi que les futurs projets que je propose en prospective pour répondre à ces enjeux et problématiques. Chacun de ces travaux réalisés et futurs projets de Recherche sera traité au cours de ce manuscrit.

		Enjeux				
Mes travaux ↓		Détection par capteur intégré	Imagerie haute résolution/ Spectroscopie de Force	Micro- Nano- Robotique	Architecture en réseaux de sondes	Environnements extrêmes: Ultra Vide, ou biologique
Bilan Scientifique	Réseaux de cantilevers à détection piézorésistive	X	X		X	Biologique
	Réseaux de cantilevers à détection interférométrique		X		X	Biologique
	Nanoseringue cellulaire: le FluidFM		X	X		Biologique
	Résolution moléculaire et atomique: le Qplus	X	X			Ultra Vide
	Manipulation et sonde de force pour NEMS/MEMS, pilotage d'une micropuce	X	X	X		Ultra Vide
Futurs Projets	Haute Résolution et Harpon moléculaire	X	X			Biologique
	Nanomanipulateur Ultra Rapide	X	X	X		Ultra Vide → Biologique
	Biocapteurs en polymère	X	Spectroscopie Force	X	X	Biologique

Tableau 1 - Tableau récapitulatif de mon Bilan Scientifique et de mes futurs travaux de Recherche, traités au cours de ce manuscrit.

II.2 Nano-outils pour la biologie

Au cours de mon parcours scientifique en Suisse au sein de la division Nanotechnologies et Sciences du Vivant au CSEM de Neuchâtel, en tant que chercheur/ingénieur en Recherche et Développement, et au sein de l'Institut de Microbiologie de l'ETH de Zürich, en tant que partenaire et scientifique invité, j'ai pu mener différents projets et encadrer des étudiants et des techniciens pour aboutir à une collection de systèmes à sondes locales dédiés au monde biologique. Ces nouveaux dispositifs permettent notamment l'étude fondamentale des propriétés mécaniques des cellules, l'adressage contrôlé en force d'une seule cellule pour l'extraction/injection de matériel biologique, ou la manipulation de cette cellule à des fins d'analyse.

II.2.1 Microleviers piézorésistifs à technologie silicium

Mes encadrements pour ce projet: *Real Ischer (Technicien, CSEM), Gilles Weder (Doctorant, CSEM), Eric Bernard (Technicien, CSEM)*

La microscopie AFM appliquée à l'étude des cellules vivantes fournit désormais des informations fondamentales pour la biologie mais aussi pour la médecine. Cependant, la dynamique cellulaire est très lente et dans le même temps l'accès à une grande statistique de mesures est essentielle pour mettre en évidence des corrélations entre pathologie et propriétés mécaniques des cellules comme cela a été montré par plusieurs équipes [29–32] sur des cellules tumorales. Le but de ce projet était d'aborder cette problématique en parallélisant les mesures de force AFM en utilisant des réseaux de microleviers. J'ai mené ce projet de développement d'un tel système de mesures biomécaniques en parallèle sur une grande collection de cellules. La stratégie de détection adoptée ici repose sur une mesure piézorésistive de chaque microsonde formant un réseau.

La réponse mécanique et les propriétés d'adhérence des cellules sont des questions fondamentales pour comprendre le fonctionnement des phases de métastases des cellules cancéreuses. Pour former une tumeur métastatique, une cellule cancéreuse se détache de la tumeur initiale pour migrer vers un autre lieu de l'organisme, y adhérer, et proliférer en une nouvelle tumeur. Un certain nombre de travaux ont démontré que les cellules tumorales ont un module d'élasticité plus faible que les cellules saines [30], ce qui leur permet de traverser l'épithélium pour ensuite migrer dans le corps via le système cardiovasculaire ou le système lymphatique. Les modifications de leurs propriétés d'adhérence sont à l'origine de leur faculté à se détacher de la tumeur pour continuer leur migration et sont aussi une autre problématique fondamentale où de nouveaux instruments de diagnostics dédiés sont aujourd'hui nécessaires. La technique AFM peut ainsi apporter de nouveaux éléments de réponse par rapport à ces deux questions fondamentales. Cependant, les études basées sur l'AFM sont encore trop coûteuses en temps d'analyse tenant au fait qu'une statistique très importante de mesures est nécessaire. Pour transposer cette technologie d'analyse très sensible vers les laboratoires hospitaliers, pour par exemple des applications de dépistage, le volume de données à produire sur ce type de mesure doit être augmenté tout en restant dans des temps d'analyses rapides. Récemment, les techniques de « High Speed AFM » (AFM en temps réel) ont émergé [34,35] mais ne sont pas adaptées : 1) aux faibles dynamiques temporelles cellulaires (par exemple, une seule mesure de spectroscopie de force sur une cellule peut nécessiter un temps d'acquisition de quelques minutes à quelques heures [53,54]), 2) et au champ spatial millimétrique nécessaire pour étudier une grande collection de cellules sur un tissu [55].

Le principe de détection utilisé pour ce projet se base sur le phénomène d'effet piézorésistif découvert en 1856 par Lord Kelvin. Ce principe est aujourd'hui utilisé dans différents détecteurs de

pression ou de force facilement intégrable. Ainsi, la première utilisation pour mesurer le mouvement d'un microlevier AFM date de 1992 par Marco Tortonese [56] qui obtint la résolution atomique sur plusieurs surfaces dont HOPG. Une déflexion du microlevier, provoquée par l'interaction pointe-surface, induit une contrainte mécanique au niveau de la poutre, avec un niveau maximum de contrainte au niveau de la zone d'encastrement du microlevier de longueur l sur la puce. Un placement judicieux de la jauge de contrainte piézorésistive sera donc fait à ce niveau, et éloignée de la fibre neutre de la micropoutre [57]. Cette contrainte induit une élongation en longueur Δl et en section de la piézorésistance, et donc une variation de la résistance électrique ΔR comme illustré sur la Figure 3. Le facteur de proportionnalité K entre l'élongation relative $\Delta l/l$, ou contrainte, et la variation relative de résistance électrique $\Delta R/R$ est nommé « facteur de jauge » ou « Gauge factor ». Pour une piézorésistance purement métallique, le facteur de jauge est relié à un effet purement géométrique avec des valeurs typiques de 2 à 4. Pour une piézorésistance élaborée dans un semi-conducteur dopé, un effet quantique lié à l'état cristallin modifié du matériau peut exalter le facteur de jauge à des valeurs comprises entre 50 et 100 [58,59]. L'effet piézorésistif dans le silicium et le germanium dopés a été mis en évidence par Charles Smith (Bell labs) en 1954 [60]. Une contrainte mécanique appliquée sur ces matériaux induit des modifications de structure énergétique des bandes de valence et de conduction, altérant ainsi le nombre et la mobilité des porteurs libres et changeant la valeur macroscopique de résistance ΔR .

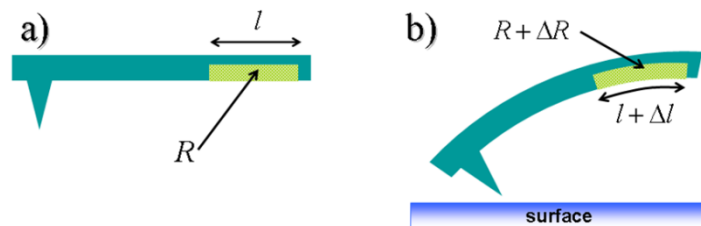


Figure 3 - a) schéma d'une micropoutre au repos. b) La même micropoutre subit une interaction de surface via sa pointe. La déflexion de la structure ainsi induite provoque une variation de l'élongation relative proportionnelle à une variation relative de résistance électrique tel que : $\Delta R/R=K. \Delta l/l$, avec K le facteur de jauge ou « Gauge factor » dépendant du matériau composant la piézorésistance.

L'expression du facteur de jauge est obtenue par différentiation de l'expression de la résistance électrique $R = \frac{\rho.l}{w.t}$ avec la résistivité ρ du matériau, les dimensions en longueur l , largeur

w , et épaisseur t de la piézorésistance. Ainsi : $\frac{\Delta R}{R} = \frac{\Delta \rho}{\rho} + \frac{\Delta l}{l} - \frac{\Delta w}{w} - \frac{\Delta t}{t}$.

Pour un matériau élastiquement isotropique, on introduit la contrainte axiale $\frac{\Delta l}{l} = \varepsilon$, et les

contraintes latérales liées par le coefficient de Poisson du matériau tel que $\frac{\Delta w}{w} = \frac{\Delta t}{t} = -\nu.\varepsilon$.

L'expression du facteur de jauge étant alors définie par:

$$K = \frac{1}{\varepsilon} \frac{\Delta R}{R} = (1 + 2.\nu) + \frac{1}{\varepsilon} \frac{\Delta \rho}{\rho}$$

Ce facteur de jauge est ainsi la somme d'une contribution purement géométrique $K_{geom} = 1 + 2\nu$, dominante par exemple dans les métaux purs, et une contribution liée à la résistivité du solide $K_\rho = \frac{1}{\varepsilon} \frac{\Delta\rho}{\rho}$ qui devient dominante dans les semiconducteurs, ou dans les nanotubes de carbone [61–63] ou le graphène [64].

J'ai pu ainsi mener au CSEM un projet visant à développer et à intégrer des réseaux de tels microleviers AFM piézorésistifs en silicium dopé au bore [65,66] illustrés en Figure 4. La microfabrication des microleviers piézorésistifs a été faite en collaboration avec l'Institut de MicroTechnique (IMT) de l'Université de Neuchâtel (U. Staufer, L. Aeschmann, T. Akiyama) [67]. L'originalité du travail provenait de l'utilisation inédite de sondes AFM piézorésistives en milieu tamponné biologique grâce au dépôt de matériaux passivants inorganiques au niveau des électrodes (Figure 4c)). La technologie silicium utilisée pour la fabrication découle directement des travaux du Millipede [47–49] inventé par Peter Vettiger (IBM Zürich), avec qui j'ai eu l'honneur de collaborer au cours de ce projet. Les champs d'application d'un tel dispositif couvrent l'imagerie AFM et la spectroscopie de force dédiée au monde biologique, avec l'avantage de pouvoir fonctionner en solutions turbides contrairement aux AFM conventionnels utilisant la détection optique laser/photodiode [43] pour détecter le mouvement du microlevier. La préparation des échantillons biologiques nécessite ainsi moins d'étapes de purification. De plus, l'approche laser/photodiode n'est pas compatible avec une détection parallèle couvrant une matrice de nombreux microleviers comme nous y sommes parvenus dans ce projet.

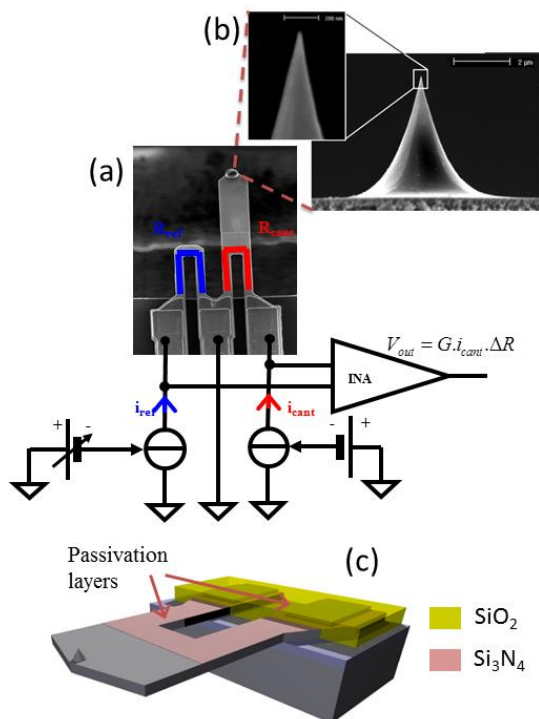


Figure 4 - a) Vue détaillée au microscope électronique d'un microlevier piézorésistif doté d'une piézorésistance (en rouge), avec dans sa proximité une deuxième piézorésistance référence (en bleue) permettant par mesure différentielle d'ôter les perturbations corrélées (bruits mécaniques, bruits électromagnétiques, bruits hydrodynamiques en milieu liquide, dérive thermique). Le schéma de principe de mesure différentielle repose sur deux sources de courant constant dont une réglable pour calibrer le système. Les deux signaux sont ensuite différenciés et amplifiés par un amplificateur d'instrumentation à très faible niveau de bruit avec un gain de 1000. Le signal de sortie est directement proportionnel à la déflexion de la micropoutre. b) Vue détaillée de la pointe du microlevier et de son apex pouvant être inférieur à 20 nm de rayon. c) Mise en évidence des couches inorganiques de passivation (SiO₂ et Si₃N₄) déposées durant la microfabrication des microleviers. Cette passivation des zones conductrices (électrodes et piézorésistances) permet à la sonde de fonctionner en solution biologique.

Nous avons fait le choix d'utiliser une méthode inédite de mesure par deux sources de courant constant pour chaque sonde (Figure 4b)), en lieu et place du traditionnel pont de Wheatstone utilisé pour les jauges de contrainte piézorésistives [56]. Cette approche facilite l'automatisation de

calibration de chaque sonde des réseaux de microleviers, tout en gardant d'excellentes performances de sensibilité comme relaté sur le tableau de la Figure 5.

	Length (μm)	Thickness (μm)	$\Delta R/R$ per Å	Force constant (N/m)
This work	150	0.7	1.8×10^{-7}	< 0.1
M. Tortonese, Proc. of Transducers '91, IEEE cat. No. 91CH2817-5, 1991	175	2	1.2×10^{-7}	4
M. Tortonese, Stanford University, Ph.D Thesis 1993	170	3.8	8.5×10^{-7}	16.4
B. W. Chui et al., Appl. Phys. Lett. 69 (18), 1996	150	1	2×10^{-7}	0.1
Park Scientific Instruments, Sunnyvale, California	150	2	2.5×10^{-7}	2.5

Figure 5 - Tableau comparatif des performances de microleviers AFM piézorésistifs faisant référence à l'état de l'art comparable dans la littérature. Les sondes réalisées dans le cadre de ce projet (première ligne) ont la particularité inédite de conserver des constantes de raideur inférieure à 0.1 N/m essentielle pour caractériser, sans être invasif, des objets biologiques fragiles en mode Contact AFM. Cette optimisation mécanique a été réalisée tout en gardant des sensibilités de détection piézoélectrique ($\Delta R/R = 1.8 \cdot 10^{-7}$ par Angström) dans la moyenne des autres systèmes.

La Figure 6 illustre l'électronique de pilotage que nous avons conçue pour piloter jusqu'à 16 microleviers piézorésistifs en parallèle, et intégrée sur le scanner et l'électronique de contrôle d'un AFM commercial *MultiMode Veeco* (Santa Barbara, Etats-Unis).

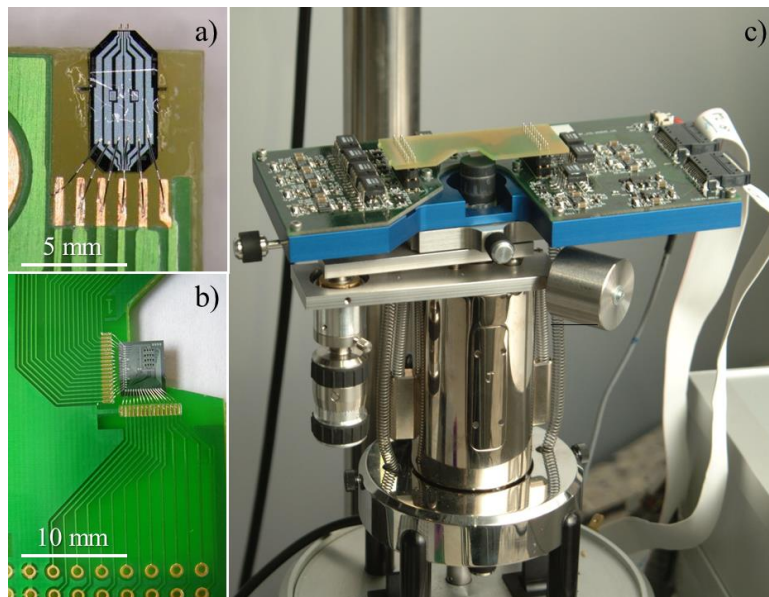


Figure 6 - Intégration des matrices de microleviers piézorésistifs. Puces en technologie silicium de réseaux de microleviers a) 2x1 et b) 4x4 fixées et soudées sur une carte électronique PCB spécialement conçue à cet effet. Les zones de soudure ont été passivées avec un polymère biocompatible pour permettre l'immersion totale des réseaux de sondes en solution biologique. c) Vue d'ensemble de l'intégration mécanique et électronique des matrices de microleviers piézorésistifs sur un AFM commercial MultiMode (Veeco). Une carte électronique spécifique pouvant piloter le fonctionnement de 16 microleviers en parallèle a été réalisée dans le cadre du projet.

Les performances du système ont été directement caractérisées sur des systèmes biologiques. La Figure 7 illustre les capacités en imagerie AFM en mode contact d'un des microleviers piézorésistifs sur des fibroblastes. Le bruit en topographie est de l'ordre de 4.8 Angströms RMS sur 1 kHz, sachant que le préamplificateur utilisé a une bande passante de 100kHz avec une dynamique

linéaire de mesure de déflexion des leviers de +/- 5 microns. Une étude plus fondamentale de la sensibilité du capteur nous a permis de révéler que le bruit en $1/f$ (appelé aussi « Flicker noise ») est prédominant [56]. Ce bruit prenant source au niveau des interfaces entre les électrodes de contact et la piézorésistance, ici en silicium dopé au bore, où des mouvements de charges à basse fréquence sont suspectés [59,68]. Nous avons aussi noté l'influence sur ce bruit des recuits thermiques (conventionnels et rapides) durant la microfabrication des microleviers. Un modèle analytique admis [59,69] et rendant compte de cet effet de charges sur le bruit basse fréquence en $1/f$ a été proposé par Hooge [70]. Une forte valeur de piézorésistance induira une forte variation de résistance pour une contrainte mécanique donnée, mais le bruit en $1/f$ généré sera plus important. En définitive d'après les travaux de Roukes [33,58], le rapport signal-sur-bruit pour un capteur piézorésistif à semiconducteur avec des facteurs de jauge de 50 à 100 est similaire à un capteur piézorésistif à électrode métallique dont le facteur de jauge est relié à un effet purement géométrique avec des valeurs typique de 2 à 4. Cependant, les récents travaux sur les propriétés piézorésistives du graphène [64,71,72] présentant une grande mobilité des porteurs libres avec un faible bruit en $1/f$ et un facteur de jauge de l'ordre de 150, laissent entendre que cette barrière du rapport signal-sur-bruit puisse être franchie.

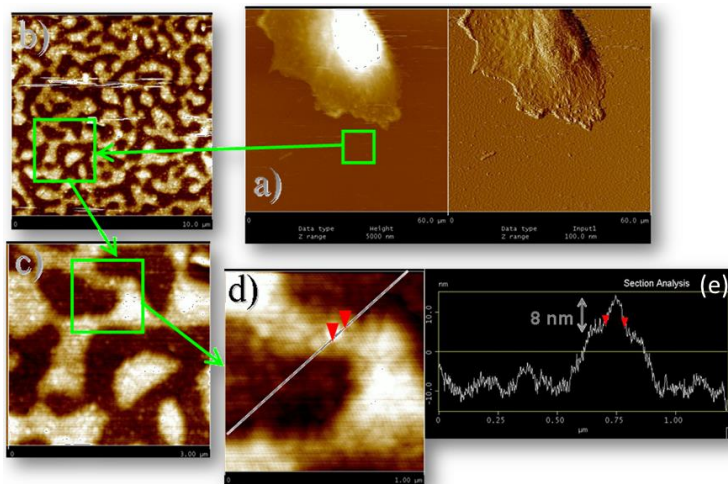


Figure 7 - Caractérisation expérimentale des possibilités de résolution en topographie des sondes AFM piézorésistives, ici sur une surface polymérique (poly(méthylmethacrylate) (PMMA)/poly(2-vinylpyridine) (P2VP)) après une croissance de cellules fibroblastiques. La séquence d'images concerne le même échantillon scruté avec la même sonde à des échelles couvrant la centaine de microns jusqu'au micron. La résolution latérale dépendante de l'apex de la pointe a été estimée à 30 nm. En hauteur, des détails de quelques nanomètres peuvent être aisément détectables. Pour une bande passante de 1kHz, le bruit de détection est de l'ordre de 4.8 Angströms RMS.

La caractérisation de sensibilité de détection en force a été réalisée sur un système de référence de chaînes polymériques de polylysine en solution et liées électrostatiquement à une surface de verre. Les interactions entre la pointe en silicium du microlevier et la polylysine sont brisées lors de la courbe retour de la sonde avec des signatures de dégrafages sous forme de sauts de force, comme illustré sur la Figure 8. Une statistique de ces courbes nous a permis d'estimer une résolution en force de l'ordre de 160 picoNewtons. Cette valeur est supérieure au seuil de détection des AFM à détection optique laser/photodiode mais permet cependant d'étudier un grand nombre de systèmes ligands type antigène-anticorps [73], et est largement suffisante pour l'étude des propriétés mécaniques en spectroscopie cellulaire [26].

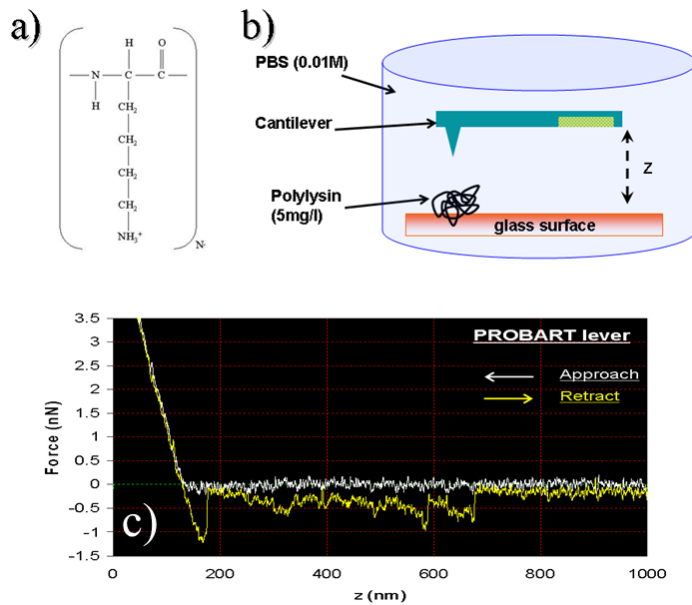


Figure 8 - Caractérisation expérimentale des possibilités de résolution en force des sondes AFM piézorésistives sur un système chimique de référence, ici par études de dégraiffages des liaisons non-spécifiques de chaîne polymérique de a) D-poly(lysine) (150 kDa). b) Le microlevier piézorésistif, après nettoyage par UV/ozone, est immergé dans une cellule fluïdique contenant du tampon PBS (0.01 M). Les chaînes de D-poly(lysine) ayant été préparées sur une surface de verre par liaisons électrostatiques fortes. c) La spectroscopie de force témoigne, sur la courbe retour (en jaune), de sauts reflétant des liaisons rompues par la trajectoire de la pointe sur les chaînes de polymères. Une statistique de ces courbes nous a permis d'estimer une résolution en force de l'ordre de 160 picoNewtons.

En application directe du dispositif, nous avons pu collaborer avec les biologistes de l'Université de Neuchâtel (Suisse) et du CSEM pour étudier les propriétés élastiques de cellules fibroblastes de la peau (voir Figure 9). Des liens ont ainsi pu être directement quantifiés entre le module d'élasticité de la cellule, estimé par le modèle analytique de Hertz-Sneddon [74] appliqué sur les courbes de force, et sa phase cellulaire [54,75].

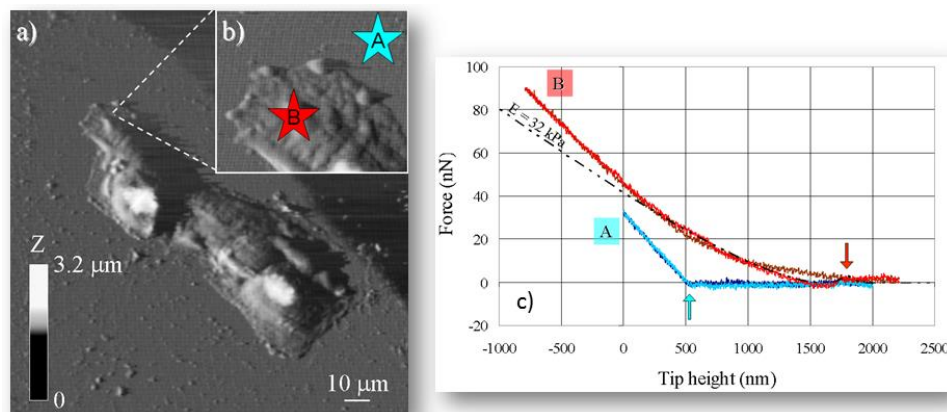


Figure 9 - Spectroscopie de force en solution sur une cellule fibroblaste vivante sur un substrat en silice. La sonde AFM piézorésistive passivée permet a) l'imagerie AFM stable, et détaillée b), des cellules sur des périodes de plusieurs heures (6h30 dans le cas présent, en mode force constante). c) La même sonde nous a permis de caractériser les propriétés mécaniques de la cellule (point B) par spectroscopie de force et d'estimer un module d'élasticité de 32 kPa en ajustant un modèle mécanique de Hertz-Sneddon [74]. Par comparaison, une courbe de force a aussi été produite sur la surface dure de silice (point A).

L'utilisation d'une matrice de deux leviers a permis de démontrer le potentiel en imagerie AFM en mode hauteur constante sur des objets biologiques fragiles que sont les cellules (voir Figure 10) sans endommager l'échantillon grâce à la raideur du microlevier de l'ordre de 60 mN/m.

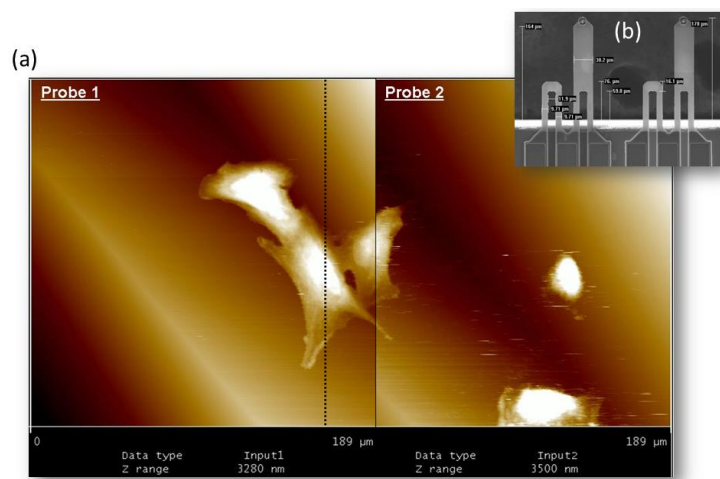


Figure 10 - L'utilisation d'un réseau de deux microleviers (voir détail) en parallèle permet d'augmenter la couverture spatiale d'imagerie AFM, ici en mode hauteur constante, tout en conservant une résolution latérale et axiale nanométrique.

L'extension de cette imagerie AFM parallèle en solution avec une matrice de 16 microleviers piézorésistifs permet de couvrir un champ spatial d'investigation AFM de l'ordre de $800\mu\text{m} \times 1400\mu\text{m}$ (Figure 11), tout en gardant une résolution nanométrique tributaire de l'apex des pointes en terminaison des microleviers. En utilisant le déplacement en Z du scanner du microscope et le même réseau de 16 microleviers, la spectroscopie de force peut être aussi parallélisée en une fois sur plusieurs sondes AFM (Figure 12). L'avantage de la technique est multiple. D'autre part, en utilisant un même ciblage biochimique pour chaque sonde, on augmente la statistique des mesures et on réduit le temps d'acquisition. Le rapport signal-sur-bruit du système peut être ainsi accru par effet de moyenne. En utilisant un ciblage biochimique différent pour chaque sonde, on ouvre une perspective sur du multiplexage de détection pour discerner rapidement les affinités d'interaction d'une collection de récepteurs différents greffés sur la pointe et connus sur un même échantillon de cellules. Ce dispositif pourra donc devenir complémentaire de la DFS (Dynamic Force Spectroscopy) utilisé en AFM par spectroscopie de force moléculaire avec le modèle de Bell-Evans [76–78] pour obtenir des informations fondamentales du paysage énergétique d'une protéine (enthalpie libre de réaction, constante de dissociation, distance de transition), mais avec un flux de mesures beaucoup plus conséquent que par l'utilisation conventionnelle d'une seule sonde AFM.

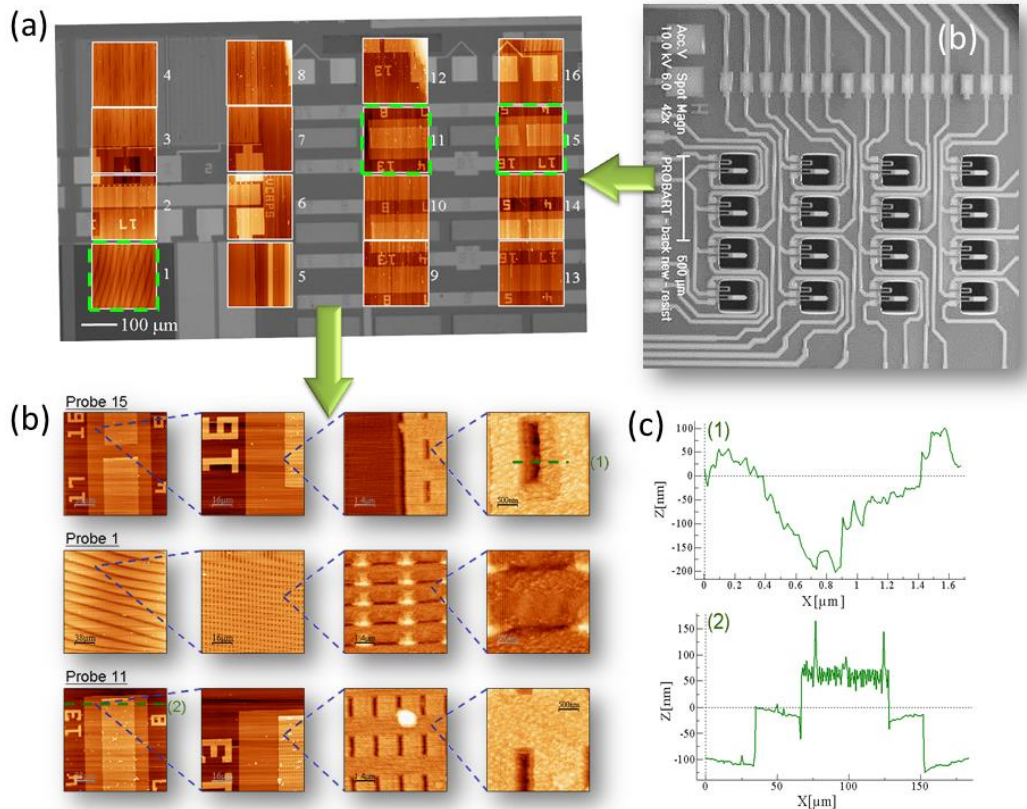


Figure 11 - a) 16 images AFM produites simultanément sur une surface de silicium micro-structurée, en mode hauteur constante en milieu aqueux, en utilisant b) une matrice de 4x4 microleviers piézorésistifs. b) Un balayage plus restreint de l'unique scanner permet de raffiner le niveau de détails topographiques sur plusieurs zones simultanément pour atteindre c) des résolutions nanométriques. Bien que le scanner de balayage du microscope MultiMode (Veeco) soit limité à 200 μ m X 200 μ m, le réseau de microleviers permet de couvrir un champ spatial d'investigation AFM de l'ordre de 800 μ m X 1400 μ m.

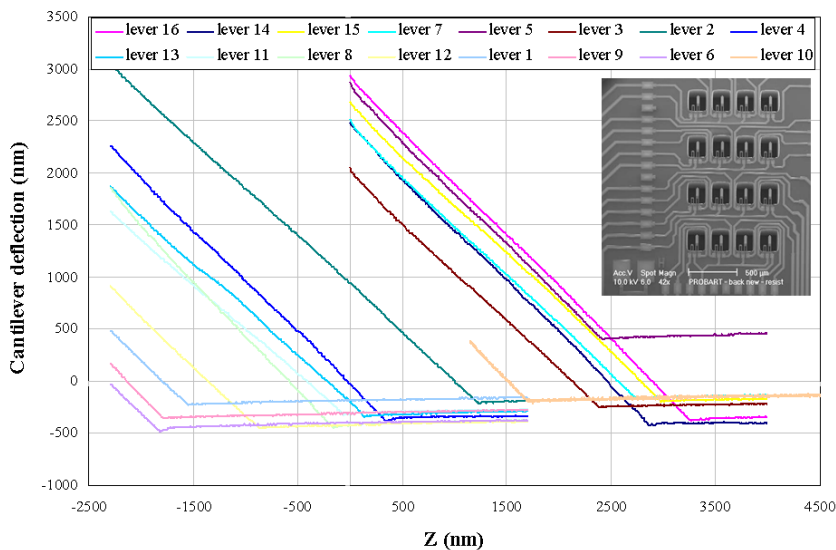


Figure 12 - Spectroscopie de 16 courbes de force acquises simultanément, dans les mêmes conditions que les résultats de la Figure 11 avec le même réseau 4x4 de microleviers.

II.2.2 Réseaux de leviers et détection interférométrique parallèle

Mes encadrements pour ce projet: Anthony Vuillemin (stagiaire Master/ 4^{ème} année ingénieur, EPFL), Real Ischer (Technicien, CSEM), Eric Bernard (Technicien, CSEM), Gilles Weder (Doctorant, CSEM)

Les problématiques ciblées par ce nouveau projet sont les mêmes que le précédent projet à sondes piézorésistives concernant la caractérisation massive par technique AFM des propriétés mécaniques et d'adhérence d'une collection de cellules. La grande statistique de mesures étant le point essentiel ciblé par l'instrument, avec l'avantage ici d'une plus haute sensibilité de détection en force. J'ai donc eu la possibilité de proposer au CSEM ce nouveau projet par détection interférométrique de réseau de microlevier AFM.

Depuis les années 90, plusieurs équipes scientifiques ont développé des systèmes de mise en parallèle d'imagerie AFM multisondes sur une même puce [52,79–81] (jusqu'à plusieurs milliers pour le Millipede proposé par Peter Vettiger [49]). Dans la plupart des cas, la mesure de chaque microlevier fut faite par une jauge de contrainte piézorésistive. Nous fûmes les premiers à démontrer un tel procédé de détection sur réseau de microleviers pour l'étude en milieu biologique [65,66]. Néanmoins cette approche souffre de la difficulté et du coût de fabrication de ces réseaux de microleviers à capteur intégré à haute valeur ajoutée. Particulièrement pour les applications biologiques, les sondes d'analyse entrant en interaction avec les biomatériaux doivent être facilement échangeables, jetables, et donc à faible coût, pour éviter tout problème de contamination. Une autre limitation de l'approche à capteur intégré piézorésistive tient au fait de son niveau de bruit à basse fréquence avec pour origine un bruit en $1/f$ plus élevé que la détection optique AFM. Les sensibilités de détection restent aujourd'hui meilleures d'un facteur 10 sur les AFM à détection optique externe [82], en régime continu ou mode contact AFM, bien que cet arrangement ne soit pas le plus propice pour travailler en solution turbide. Certaines équipes ont déjà proposé l'utilisation du système laser/photodiode pour la mesure séquentielle de vecteurs de microleviers [83,84], mais les problématiques de croisements de faisceaux laser croisés deviennent très difficilement solubles quand les différences en déflexion entre deux microleviers deviennent trop importantes. Pour cette raison, mais aussi pour garder une grande flexibilité dans le choix des géométries des réseaux de sondes avec une très grande sensibilité de détection en force, nous avons proposé un développement par détection optique basé non-plus sur une mesure de déflexion, mais basé sur une mesure interférométrique globale. Les problèmes de contamination croisée de faisceaux lumineux sont ici résolus. Contrairement à la détection optique laser/photodiode conventionnelle des AFM, qui est sensible au déplacement angulaire du microlevier, l'interférométrie est sensible à la différence de chemin optique induit par le déplacement vertical (le long de l'axe optique) du microlevier [85]. Nous fûmes la première équipe scientifique à développer un tel système pour la détection de réseau de microleviers AFM en milieu biologique [86] avec un brevet déposé [87].

Le principe de détection repose sur la comparaison d'un faisceau lumineux monochromatique d'intensité I_1 provenant de la face arrière réfléchissante des microleviers et d'un faisceau lumineux en cohérence de phase d'intensité I_2 provenant d'un miroir de référence. La juxtaposition des deux ondes crée un interférogramme traduisant le mouvement vertical des microleviers sous forme d'un déplacement latéral de franges d'interférence. Ce mouvement vertical induit une différence de chemin optique (Δz) modulant l'intensité lumineuse de l'interférogramme suivant :

$$I(\Delta z) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(\frac{4\pi n}{\lambda} \Delta z\right)$$

Avec la longueur d'onde λ de la source lumineuse, n l'indice de réfraction du milieu. Donc la mesure du déphasage $\Delta\varphi$ des franges procure l'information de mouvement vertical du microlevier tel que :

$$\Delta z = \frac{\lambda}{4\pi n} \Delta\varphi$$

La Figure 13 illustre un exemple de résultats que nous avons atteints par ce type de réseaux de microleviers à détection interférométrique en imagerie AFM à large champ spatial (de l'ordre du mm^2) et en spectroscopie de force sur un échantillon de cellules 3T3. La résolution nanométrique en topographie de chaque image AFM composant la mosaïque dépend en latéral de la qualité des apex des pointes (ici de l'ordre de 50 nm), et a été estimée à 1 nm en axial. La résolution en force avec les microleviers en nitrure de silicium, de 10 mN/m de constante raideur, permet d'atteindre des seuils détectables de 10 picoNewtons.

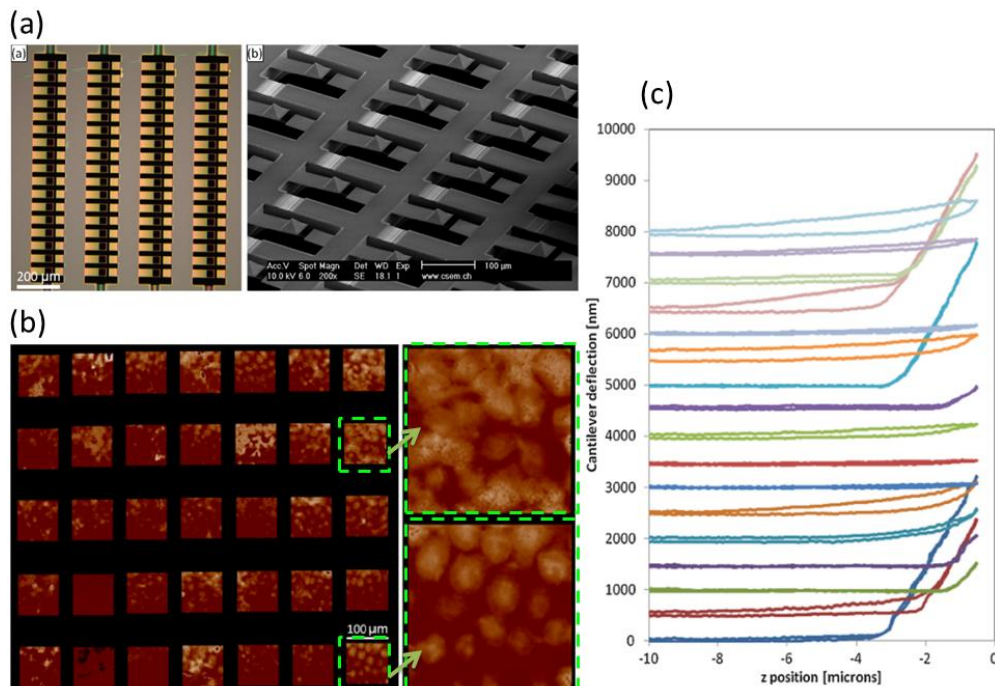


Figure 13 - a) Images optique et en microscopie électronique d'un réseau de 68 leviers en nitrure de silicium dorés en face arrière, élaboré au CSEM. La microscopie électronique permet de discerner la géométrie en pyramide en 4 faces des pointes avec des apex caractérisés à moins de 50 nm. b) Un réseau de 35 leviers, similaire au précédent en a), nous a permis d'obtenir une image AFM composée à grande échelle (de l'ordre du mm^2) d'une culture de cellules 3T3 en solution tampon. c) Spectroscopie de 17 courbes de forces produites en simultanément avec le même réseau de leviers sur les cellules. On notera la courbure, au niveau de la zone de contact des courbes de force, donnant une indication sur les propriétés élastiques des cellules (Cf. Figure 9).

Nous avons réalisé le système interférométrique autour d'un interféromètre de Linnik [86,88] comme illustré sur la Figure 14. Il s'agit d'un interféromètre de Michelson doté de lentilles de correction permettant de symétriser la forme du front d'onde provenant de l'échantillon avec celui

provenant du bras de référence. Ce travail a fait l'objet d'un stage de Master de modélisation analytique et numérique (sous ZEMAX et MATLAB) que j'ai encadré. La source cohérente d'illumination est une diode laser à faisceau circulaire (BlueSky Research, $\lambda=658$ nm) qui est traitée pour obtenir un pinceau lumineux collimaté de 20 mm de diamètre, avant d'être séparé en deux faisceaux en cohérence de phase : un faisceau de référence et en un faisceau échantillon illuminant le réseau de sondes AFM au-dessus de l'échantillon.

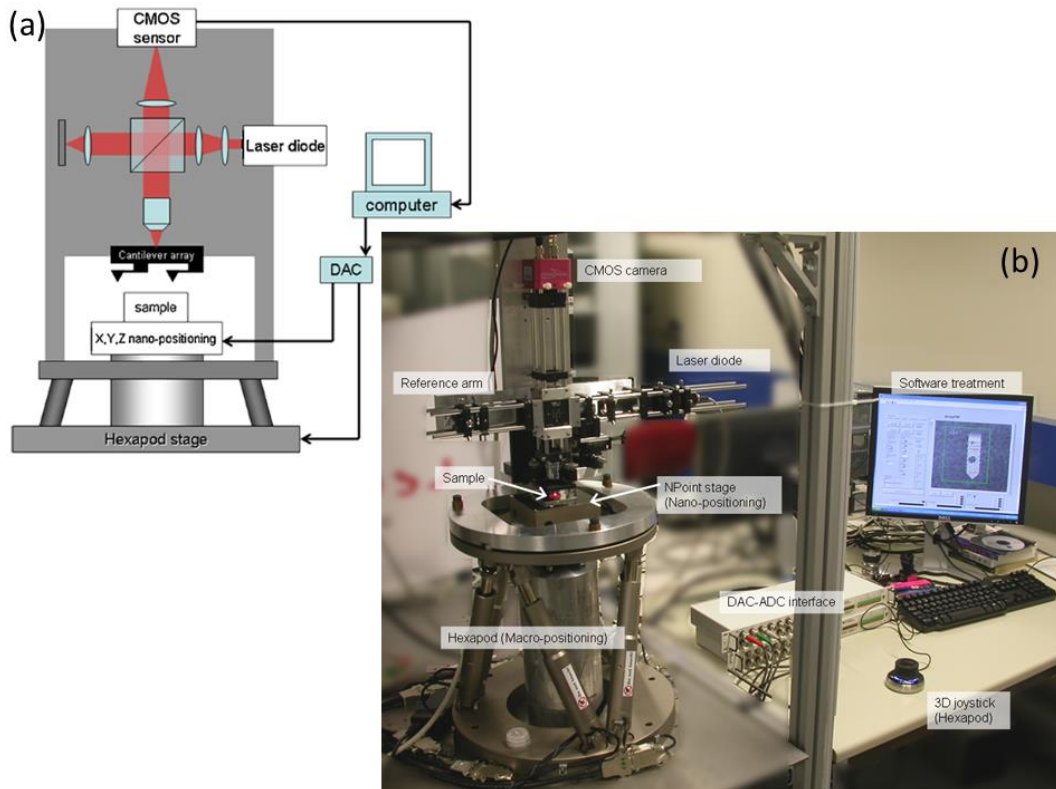


Figure 14 - Intégration des matrices de microleviers sur le microscope AFM à détection parallèle interférométrique. a) Vue schématique du microscope AFM interférométrique basé sur un interféromètre de Linnik pour traduire les mouvements des microleviers en interférogrammes. b) Photographie du dispositif complet que j'ai réalisé durant ce projet interne CSEM. On notera l'utilisation d'un système Hexapode (Physik Instruments GmbH) conférant au microscope 6 degrés de liberté pour le positionnement précis en translation et en angulaire du réseau de microleviers AFM, solidaire de l'interfomètre, par rapport à la surface.

Le réseau de microleviers est monté sur un support (Figure 15) doté de 5 degrés de liberté en translation et rotation pour un ajustement de centrage par rapport à l'axe optique du système. La puce de microleviers est illuminée par le faisceau échantillon via un objectif de microscope (Nikon 20M/Plan) à très longue distance de travail et à grande ouverture numérique. Le même objectif est utilisé pour créer, via une lentille de focalisation, l'image réelle de la puce, réfléchissant le faisceau lumineux, sur le capteur CMOS de la caméra (PhotonFocus, 1024x1024 pixels, 150 fps). De façon similaire, le faisceau référence, commutable manuellement, est réfléchi par un miroir orientable (voir Figure 16). Les deux faisceaux en cohérence de phase sont recombinaés dans le cube séparateur (THORLABS), ce qui produit l'interférogramme du réseau de sondes AFM sur la caméra CMOS.

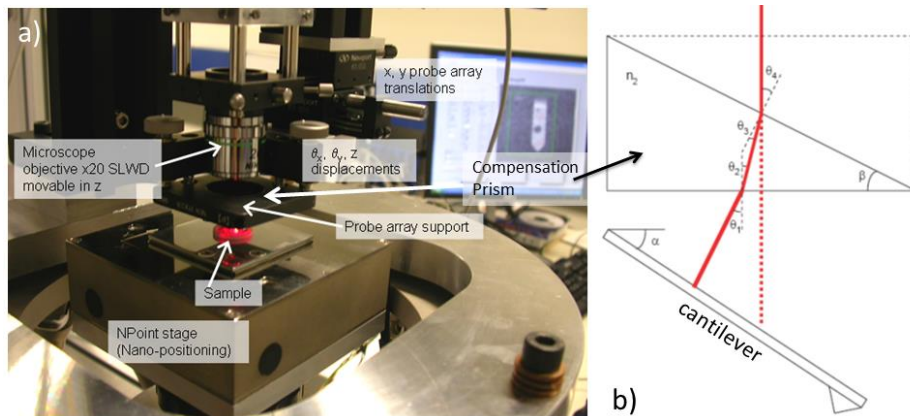


Figure 15 - a) Vue détaillée de la tête de l'interféromètre supportant le réseau de microleviers AFM. On notera la présence d'un objectif Nikon 20 M/Plan de faible grossissement (x20) et présentant une large ouverture numérique ($NA=0.35$) et une longue distance de travail ($WD=19.9$ mm). Ces trois conditions sont nécessaires pour pouvoir exploiter des réseaux de sondes à large étendue latérale tout en gardant une haute résolution d'imagerie. b) La longue distance de travail de l'objectif par rapport à la position des sondes permet en outre de loger aisément un prisme de compensation pour corriger le trajet des rayons lumineux réfléchis par la face arrière des microleviers et devant être couverts par l'ouverture numérique de toute la chaîne optique en amont, particulièrement l'objectif. En effet, par microfabrication, les microleviers présentent un angle d'environ 11° .

Le miroir orientable du bras de référence (Figure 16) permet de calibrer l'inclinaison des franges de l'interférogramme (Figure 17a) et Figure 18a)). Une lentille de compensation a été rajoutée sur le bras du faisceau de référence pour obtenir un front d'onde de référence similaire au front d'onde du bras échantillon (venant du réseau de microleviers). Dans cette configuration optimisée les franges de l'interférogramme sont parallèles et équidistantes (Figure 16c)), et ainsi exploitables pour la mesure de déplacement vertical.

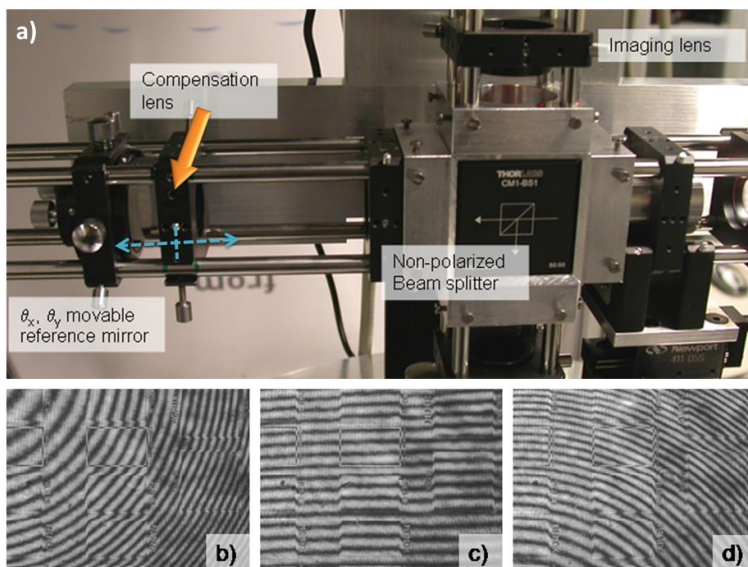


Figure 16 - a) La lentille de compensation de l'interféromètre en configuration Linnik permet par translation de corriger le front d'onde du bras optique du miroir de référence. b), c) et d) : En jouant sur la position de cette lentille, on peut compenser un front d'onde de référence similaire au front d'onde du bras échantillon (venant du réseau de microlevier). Dans cette configuration optimisée c), les franges de l'interférogramme sont parallèles et équidistantes. C'est dans cette configuration que la mesure optique est exploitable pour remonter à l'information de déflexion des microleviers.

Durant le balayage de la surface, les microleviers sont soumis à une déflexion via le contact avec la pointe. Ce mouvement induit une variation latérale des franges d'interférences qui sera détectée par la caméra CMOS et traitée par une application spécifique, programmée sous LABVIEW (National Instruments), pour extraire l'information de déflexion du microlevier (en unité métrique)

des profils à des lieux précis de l'interférogramme de la sonde (détails sur la Figure 17). La dynamique en déflexion du microlevier peut dans certains cas être supérieure à la moitié de la longueur d'onde de la source lumineuse laser ($\lambda/2=329$ nm), ce qui est le cas pour un balayage AFM en mode hauteur constante sur des cellules dont les hauteurs peuvent être supérieures au micron. Dans ce cas, la détection interférentielle butte sur la problématique de l'ambiguïté de phase bien connue des opticiens. Pour résoudre ce problème, nous avons conçu un protocole temps réel permettant d'éviter l'ambiguïté de phase tout en conservant la sensibilité de détection nanométrique de l'interféromètre. La méthode, que nous avons brevetée [87], est explicitée sur la Figure 17.

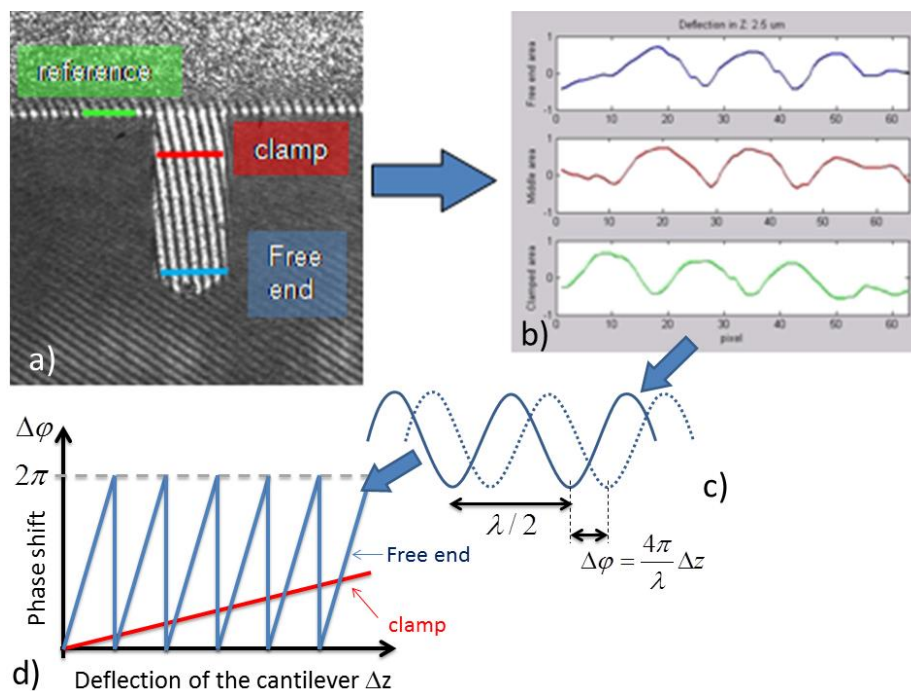


Figure 17 - a) Image expérimentale de l'interférogramme obtenu sur un microlevier au-dessus d'une surface de silicium. Le mouvement des franges d'interférence est proportionnel au mouvement axial du microlevier. Trois profils b) de frange sont extraits de l'image : un premier (en bleu, « Free end ») à l'extrémité du microlevier, au niveau de la pointe, pour mesurer avec précision la déflexion jusqu'à $\lambda/2$, un deuxième (en rouge, « Clamp ») proche de la zone d'encastrement du microlevier pour lever le problème d'ambiguïté de phase du premier profil repoussant ainsi la limite de détection en déflexion au-delà de $\lambda/2$, et un troisième (en vert, « reference ») positionné sur la partie fixe de la puce maintenant le microlevier. Ce dernier permet ainsi par mesure différentielle avec le premier et le deuxième profils de supprimer les perturbations mécaniques corrélées de la mesure de déflexion du microlevier. c) La mesure du déphasage $\Delta\phi$ est directement proportionnelle au mouvement axial Δz du microlevier. d) Le problème de l'ambiguïté de phase de mesure de la déflexion Δz , profil « Free end », est résolu par l'utilisation combinée du profil « clamp ». Le signal « Free end » procurant une plus grande sensibilité de mesure que le signal « clamp ».

La Figure 18 illustre expérimentalement l'application du protocole évitant l'ambiguïté de phase durant la mesure de déflexion de 4 sondes en simultanément. On constate que cette méthode est dépendante de l'état de surface réfléchissant de la face arrière du microlevier. Pour obtenir une mesure de déflexion fidèle, la qualité de ce dépôt réfléchissant est critique.

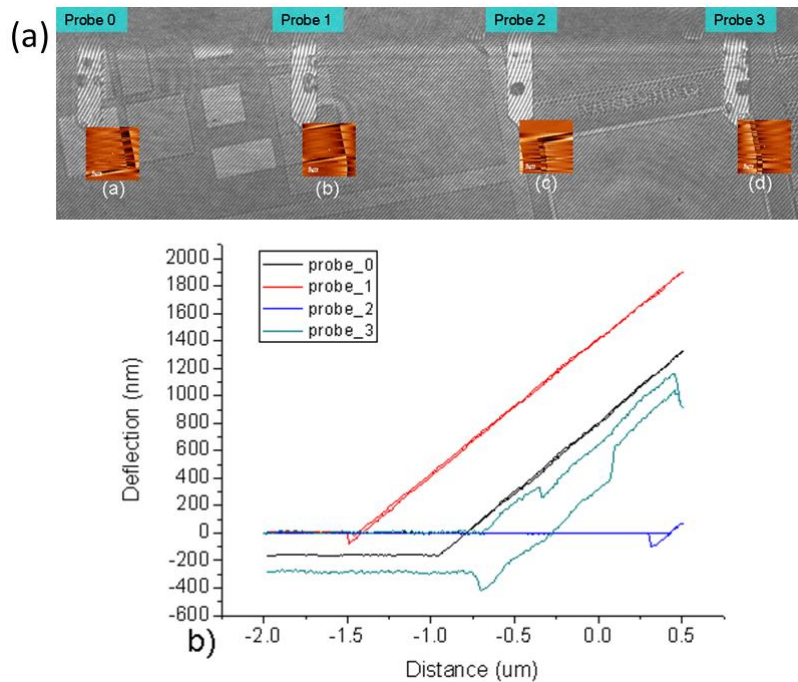


Figure 18 - a) Interférogramme d'un réseau de 4 microleviers AFM en silicium et métallisés avec une couche d'or (épaisseur de 80 nm). La méthode des profils exposée en Figure 17 permet la mesure simultanée en déflexion des 4 sondes et d'obtenir 4 images AFM en topographie d'une surface de silicium micro-structurée (en surimpression de l'interférogramme), en mode hauteur constante. b) Les 4 courbes de forces obtenues en parallèle avec ce même système permettent :

- 1) de mettre en évidence pour les sondes 0 et 1 une mesure en déflexion au-delà de $\lambda/2$ (avec la longueur d'onde du laser $\lambda = 658$ nm), démontrant le fonctionnement de l'algorithme à deux profils pour lever l'ambiguïté de phase,
- 2) de constater l'importance de la qualité du dépôt réfléchissant en face arrière du microlevier pour éviter des « accidents » de mesure de déflexion comme pour la sonde 3.

L'application LABVIEW que nous avons développée permet, en outre par un algorithme de reconnaissance de forme, d'automatiser la procédure de placement des profils de détection sur une matrice de sondes, sans limitation au niveau de la forme et de la quantité de microleviers. La même application LABVIEW permet aussi le contrôle de la plateforme pour la séquence d'alignement angulaire de la puce par rapport à la surface. L'approche automatique pilote ainsi séquentiellement l'Hexapode (Physik Instruments, Figure 14) et la table de nanositionnement (NPoint, $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$, Figure 15). L'application permet aussi la définition des échelles de balayage de la surface pour ensuite reconstruire l'image AFM avec la mosaïque des cartographies obtenues pour chaque sonde du réseau.

Pour parvenir au niveau de sensibilité nanométrique en topographie AFM et de quelques picoNewtons en spectroscopie de force, nous avons pris un soin particulier à optimiser les boucles mécaniques de la structure. Un effort particulier a aussi été fait sur l'optimisation des bruits optiques. Par exemple, un système antiflex à polariseur et lame quart d'onde, utilisé habituellement en microscopie interférentielle RICM [89], a permis de « nettoyer » l'image optique de réflexions multiples non-désirées et sources d'artefacts interférentiels comme illustré sur la Figure 19.

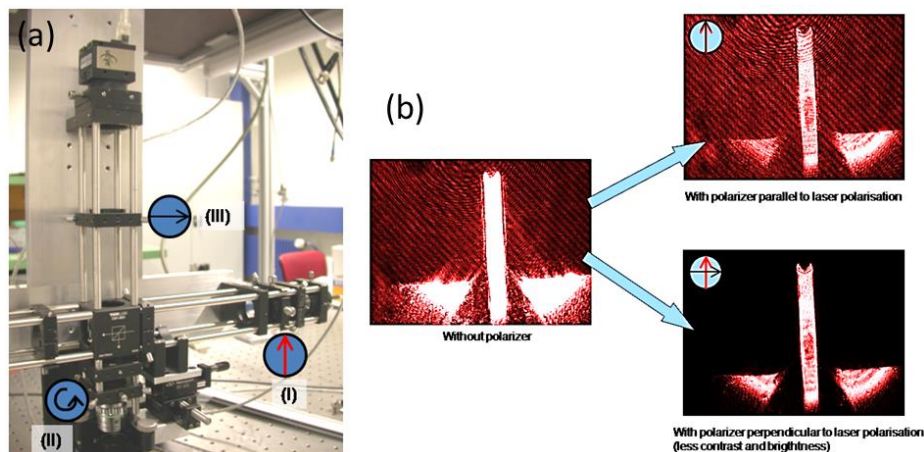


Figure 19 - a) L'interféromètre utilisé contient une série d'éléments optiques (lentilles, prisme, cube séparateur, hublot d'interface, ...) qui génèrent, par réflexions multiples, des artefacts interférentiels sur b) l'image optique à traiter par la caméra. Pour effacer ces perturbations, un système antiflex [89] a été intégré. Celui-ci comprend a) : un polariseur tournant avant la caméra (III), une lame $\lambda/4$ au niveau de l'objectif (II), et profite de la polarisation naturellement rectiligne de la source laser (I). b) Ainsi, quand le polariseur tournant (III) est perpendiculaire à la polarisation rectiligne de la source laser, l'image obtenue sur la caméra, ici d'un microlevier, est « nettoyée » des artefacts optiques précités.

Les ouvertures numériques de chaque élément de l'axe optique de l'interféromètre ont été systématiquement validées par simulations numériques (MATLAB et ZEMAX) pour éviter tout problème de superposition d'information (par filtrage fréquentiel spatial, simulable par transformée de Fourier, comme illustré sur la Figure 20) de l'interférogramme provenant du microlevier avec l'interférogramme provenant de la surface et source d'artefacts de mesure.

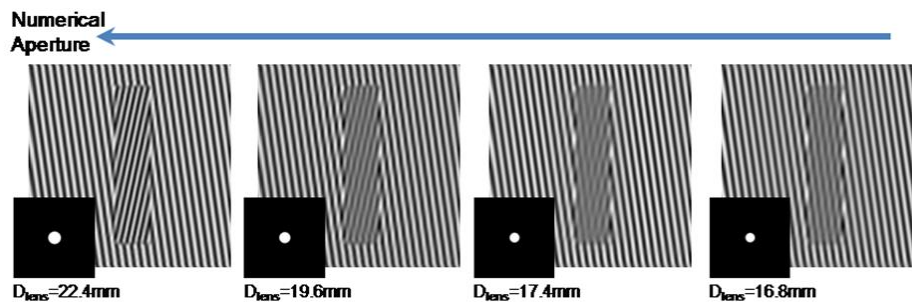


Figure 20 - Simulation numérique de l'effet de l'ouverture numérique de l'optique d'imagerie sur le capteur CMOS de la caméra, via le diamètre de la lentille de focalisation de l'interféromètre Linnik (voir Figure 14). Une faible ouverture numérique est à proscrire pour éviter une superposition d'information de l'interférogramme provenant du microlevier (rectangle central de l'image) avec l'interférogramme provenant de la surface (zone autour du rectangle central de l'image). Cela est d'autant plus gênant que la surface possède des propriétés réfléchissantes similaires à la face arrière du microlevier.

Cette plateforme interférométrique optimisée a récemment été équipée d'un système fluide avec radiateur Peltier à 37°C permettant le suivi de culture cellulaire sous boîte de Petri sur de longues périodes (plusieurs heures). De nouveaux projets en biologie cellulaire avec l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) et l'Université de Neuchâtel ont aujourd'hui été amorcés par le CSEM utilisant ce système (projet suisse nano-tera.ch, [PATLiSci: « Probe Array Technology for Life Science Applications »](#)). Des mesures biomécaniques sur des cellules cancéreuses humaines du mélanome WM239 compartimentées dans des puits d'analyses ont ainsi été dernièrement réalisées [90]. Le système apporte ainsi des informations complémentaires sur la mécanique cellulaire aux biologistes, en plus de l'analyse histologique conventionnelle de tissus cancéreux. Une étude de valorisation est aussi en cours au CSEM pour une valorisation commerciale de l'instrument.

II.2.3 Nanoseringue cellulaire : le FluidFM

Mes encadrements pour ce projet: *Eva Potthoff (doctorante, ETH Zürich), Orane Guillaume-Gentil (post-doctorante, ETH Zürich)*

Les micropipettes en verre sont conventionnellement utilisées par les biologistes pour l'injection intracellulaire (Figure 21), le « patch clamp » [91] ou le dépôt extracellulaire de solutions sur des cellules viables. La micropipette est de ce fait lentement approchée de la cellule par l'utilisation de micromanipulateurs avec contrôle visuel suivi par microscopie optique. Cependant, au cours de cette opération, la cellule est souvent malmenée et endommagée ce qui provoque la plupart du temps une mort cellulaire et l'échec de l'expérience, y compris pour des biologistes très expérimentés dans ce genre d'exercice. Pour apporter une réponse à cette problématique ayant un enjeu fondamental pour la biologie cellulaire et la recherche médicale, en association avec le Dr. Tomaso Zambelli de l'ETH de Zürich, j'ai initié l'utilisation de microleviers AFM à microcanal, développés initialement au CSEM, pour réaliser ces opérations délicates de manière reproductible.



Figure 21 - Injection intracellulaire conventionnelle à l'aide de micropipettes en verre. D'après T. K. Chowdhury (1969) [92]. Durant cette opération délicate, les contraintes mécaniques non contrôlées de la micropipette sur la cellule entraînent la plupart du temps l'échec de l'expérience, y compris pour des biologistes très expérimentés dans ce genre de manipulation.

La Figure 22 est une vue schématique du système AFM de microinjection/microextraction cellulaire, que nous avons nommé FluidFM pour « Fluidic Force Microscope » et breveté [93,94]. Le microlevier creux en technologie de fabrication silicium est la clef de voûte du système. Le point remarquable du système est d'utiliser le retour de force AFM ultrasensible (jusqu'à la dizaine de picoNewtons) pour stopper et contrôler dans le temps l'indentation de la pointe du microlevier creux. Cela permet de laisser intacte et vivante la cellule, en évitant son endommagement physique. Ce système s'adresse aux mêmes problématiques que la micropipette en verre, mais avec l'avantage proposé par la microfabrication pour réaliser de façon reproductible des sondes parfaitement calibrées (géométrie, constante de raideur, aspect et finesse de la pointe pour la perforation membranaire). A côté de cela, nous avons aussi utilisé cette sonde pour réaliser de l'imagerie AFM de cellule, de la nanolithographie de biopuces [95], de la micromanipulation de cellules par aspiration, et de la spectroscopie de force AFM [96,97].

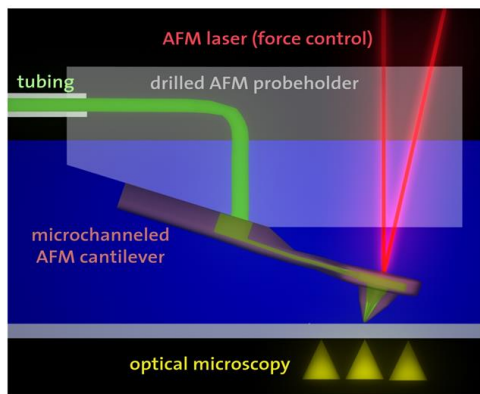


Figure 22 - Schéma de principe du FluidFM. Celui-ci permet de piloter en force et en déplacement X,Y et Z via un scanner, un microlevier AFM creux doté d'un microcanal et d'une pointe percée d'un trou submicrométrique. Le microcanal est interfacé à une fluidique externe permettant le pilotage en pression pour des opérations d'injection ou de succion via le trou de la pointe. La déflexion du levier AFM est mesurée par un système conventionnel optique (laser/photodiode). Un microscope optique inversé permet de suivre le positionnement de la pointe sur l'échantillon transparent, mais aussi de combiner l'imagerie AFM avec l'imagerie optique (champ clair, ou fluorescence/confocale).

La Figure 23 représente la première intégration des microleviers creux fabriqués au CSEM sur un système AFM commercial JPK Nanowizard II. Les modifications mécaniques ont permis d'intégrer aussi la fluidique avec un pompage péristaltique (FLUIGENT) assurant le contrôle en surpression/dépression au niveau du microcanal intégré dans le microlevier. Un soin particulier a été apporté au découplage mécanique de la tête du scanner AFM de la tubulure nécessaire à la fluidique. Des simulations numériques nous ont aussi permis d'estimer les débits au niveau de la pointe percée (de 100 femtolitres/s à 0.1 femtolitre/s) en fonction du diamètre du trou submicrométrique, du diamètre des différents capillaires et du microcanal de pointe, et de la pression atteignable par la pompe externe (voir informations supplémentaire dans [97]).

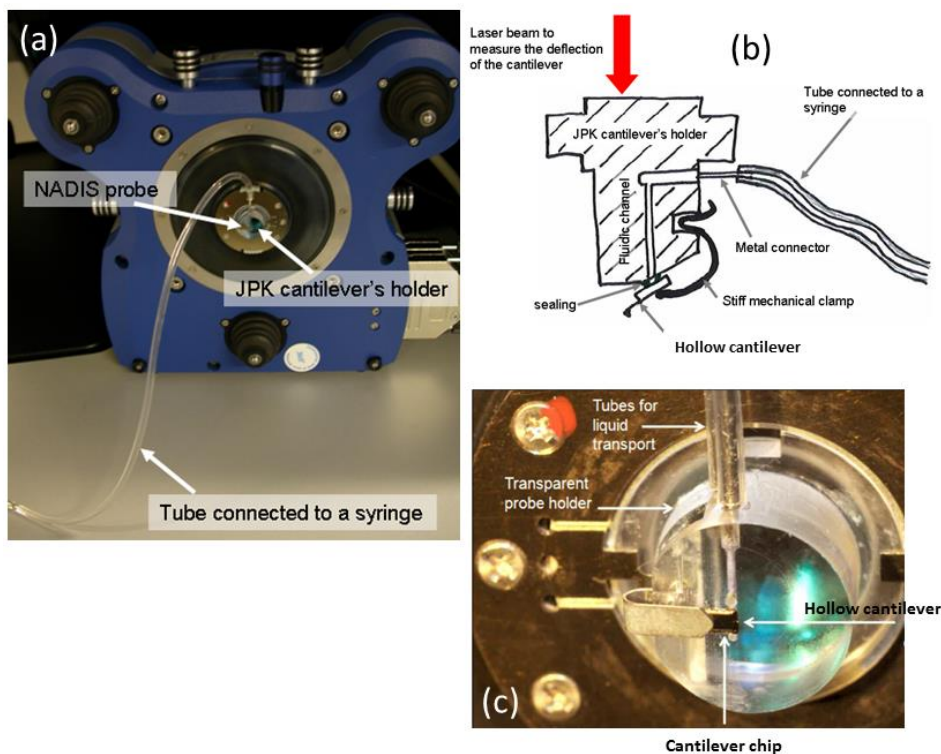


Figure 23 - a) Vue de l'implémentation du système FluidFM, avec la fluidique connectée, sur la tête d'un AFM JPK NanoWizard II. b) Schéma de principe originel ayant servi de base à la conception du système FluidFM (d'après J. Polesel et T. Zambelli, 2006). c) Vue détaillée de la puce, contenant le microlevier creux, fixée par plaquage mécanique sur le nez de la tête AFM (transparent en PMMA). Ce plaquage mécanique permet aussi, via un joint en élastomère, d'assurer l'étanchéité avec la jonction fluidique traversant le nez porte-sonde.

La microfabrication des microleviers creux a été réalisée dans la salle blanche du CSEM (SAMLAB, Neuchâtel), par une structuration de deux wafers silicium oxydés localement et fusionnés sous haute température et sous haute pression de manière à obtenir les microcanaux [97]. La pointe à l'extrémité de la poutre est réalisée durant les premières étapes d'élaboration par dépôt PVD de nitrure de silicium dans un moule de silicium définissant la pyramide à 4 faces. Une attaque humide KOH permet ensuite de libérer les microleviers creux en silice. La sonde est ensuite métallisée avec de l'or au niveau de la face arrière pour obtenir une surface réfléchissante nécessaire à la détection optique en déflexion (laser/photodiode). De l'or est aussi déposé au niveau de la pointe pour faciliter l'évacuation des charges électriques lors du nanopercage par FIB (Focus Ion Beam, EPF Lausanne) du trou submicrométrique de passage au niveau de la pointe pyramidale creuse. Les résultats de la microfabrication sont illustrés sur la Figure 24.

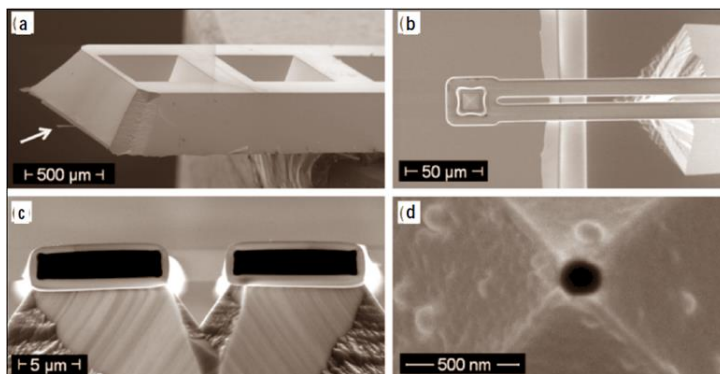


Figure 24 - Vues détaillées au microscope électronique de la puce fluidique terminée par le microlevier creux en silice (a) flèche blanche, et b)). c) Vue en coupe du microcanal à l'intérieur du microlevier. d) Détail sur l'apex de la pointe en nitrure de silicium du microlevier et percé par FIB d'un trou de 100 nm de diamètre.

Sur une même base de microleviers creux, avec des raideurs effectives de 0.3 N/m, deux types de pointes ont été définis pour les premières études d'injection cellulaire. La Figure 25 montre ces deux configurations. Dans le premier cas, nous avons fait le choix de percer le trou à côté de l'apex de la pointe. Cela permet de conserver une pointe très effilée (apex de l'ordre de 20 nm) permettant une perforation aisée de la membrane cellulaire comme cela est clairement visible sur la courbe de force de la Figure 25a2) par un décrochement caractéristique.

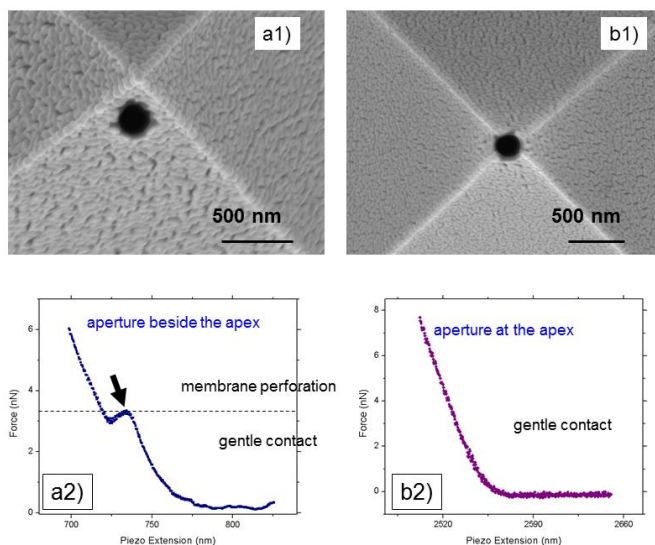


Figure 25 - a1) Détail sur l'apex de la pointe d'un microlevier creux avec un trou de 200 nm de diamètre percé par FIB. Dans ce cas, l'apex pointu de la pointe est laissé intact et permet une perforation aisée de la membrane cellulaire, comme illustrée sur la courbe de force en approche a2). b1) Détail sur l'apex de la pointe d'un microlevier creux avec un trou de 200 nm de diamètre percé par FIB au centre de la pyramide de la pointe. Dans ce cas, l'apex de la pointe modifié ne permet pas une perforation de la membrane cellulaire, comme illustrée sur la courbe de force en approche b2). Pour une même gamme de force appliquée que pour a2) (de 0 à 6 nanoNewtons), la pression locale exercée par la terminaison de la pointe n'est plus suffisante pour rompre la membrane.

Cette signature mécanique permet à l'utilisateur de contrôler l'arrêt de l'indentation de la cellule une fois celle-ci perforée, pour éviter un endommagement irréversible de la membrane

cellulaire. A ces niveaux faibles de pression appliquée sur la cellule (estimées à 3 à 10 kPa), nous avons pu vérifier par imagerie AFM consécutive une « réparation » systématique de la membrane par diffusion lipidique sur le lieu de la perforation. Dans le deuxième cas, le trou a été percé en lieu et place de l'apex de la pointe (Figure 25b1)). Dans ce cas, pour les mêmes niveaux de force appliquée, la perforation membranaire n'est plus possible, la pression de déchirement n'est plus suffisante. Ce deuxième type de pointe a donc été utilisé avec succès pour réaliser du dépôt membranaire non-invasif extra-cellulaire comme cela est exposé sur la Figure 26.

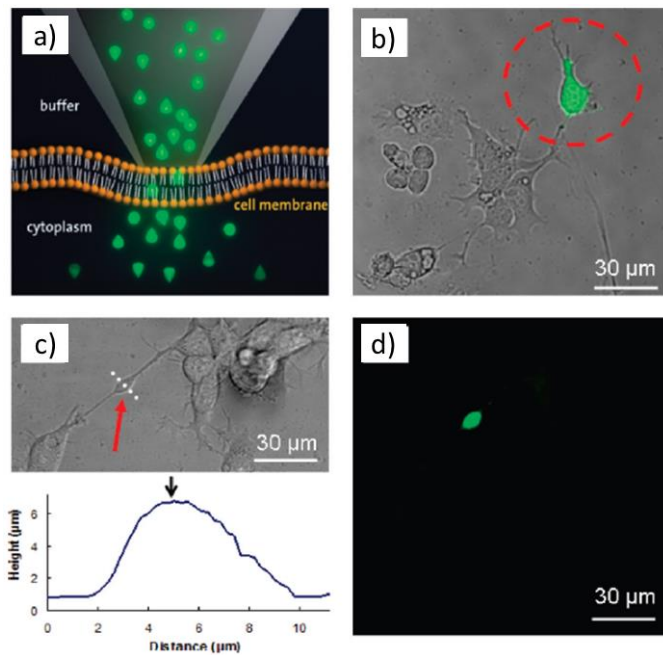


Figure 26 - Dépôt membranaire non-invasif sur des cellules de neuroblastome NG108. a) Schéma de principe de dépôt membranaire par contact « doux » de la pointe. La pointe est maintenue en contact avec une régulation en force de 1 nN. Les agents actifs présents en solution dans le microcanal du microlevier diffusent spontanément à travers la membrane vers le cytoplasme. Le trou submicronique de passage est situé à l'extrémité de la pointe. b) Superposition de l'image optique en DIC avec l'image obtenue par épifluorescence après le dépôt membranaire ciblé sur une cellule avec du CellTracker (fluorescence verte). La pointe du microlevier creux contenant le CellTracker dans son microcanal est positionnée dans la région définie par le cercle rouge pointillé. La pointe est ensuite laissée en contact avec la membrane à force constante durant 15 minutes, avant d'acquérir les images optiques en fluorescence et en DIC. c) Image optique en DIC de deux cellules de neuroblastome connectées par un neurite exhibant une vacuole (flèche rouge). Au-dessous : profil en topographie de la vacuole obtenu avec le microlevier en AM-AFM (Amplitude=50 nm). La flèche noire indique le point choisi pour approcher la pointe en mode force constante pour le dépôt. c) Image en fluorescence correspondante obtenue après le dépôt non-invasif, pendant 1 minute, d'acridine orange (fluorescence verte sur l'image) sur la membrane de la vacuole. L'acridine devient fluorescente au contact de l'ADN et l'ARN cellulaire, atteint par diffusion. L'image en fluorescence montre le signal lumineux sur la vacuole avec une intensité en fluorescence décroissante le long du neurite. Cela illustre la capacité du microlevier creux FluidFM à délivrer localement de manière contrôlée un soluté dans des structures subcellulaires.

L'injection contrôlée a été réalisée en conservant la première configuration de pointe (Figure 25a1)) avec le trou de passage situé à côté de l'apex. Cette injection cellulaire a été validée par marquage fluorescent observé par microscopie confocale comme cela est montré sur la Figure 27.

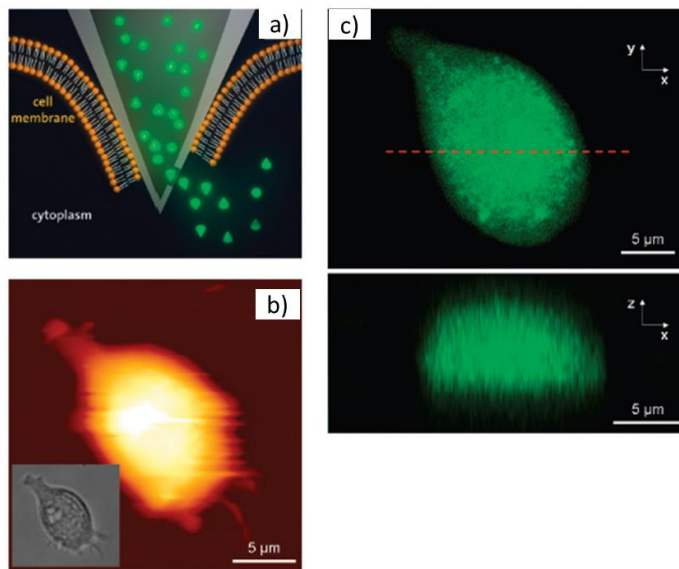


Figure 27 - Injection intracellulaire par perforation contrôlée en force de la membrane cellulaire de myoblastes C2C12. a) Schéma de principe de la procédure d'injection. Le perçage latéral de la pointe permet de conserver un apex effilé facilitant la perforation membranaire (force nécessaire > 3 nN), à la manière d'une seringue médicale. b) Image en AM-AFM (amplitude=30nm) d'une cellule avant injection (détail : image optique en DIC de la même cellule). La résolution spatiale de l'image AFM de l'ordre de 200 nm confirme la capacité du microlevier creux d'être utilisé en tant que nanopipette et sonde AFM. Sur cette image AFM, la sonde est positionnée sur le point souhaité de la cellule pour la perforation et l'injection. c) Image optique confocale (plan X,Y et plan X,Z suivant le profil en rouge pointillé) confirmant de manière tridimensionnelle l'injection du marqueur FITC (25µg/ml de fluorescein isocyanate sodium salt dissout dans du PBS (pH 7.4)) pendant 15 secondes. L'épaisseur de 6 microns de la cellule mesurée par fluorescence est en accord avec la hauteur mesurée par AFM.

Le système FluidFM est aujourd'hui utilisé pour répondre à des questions de biologie fondamentale au sein de l'Institut de MicroBiologie (IMB) de l'ETH de Zürich par le biais de nombreux projets. J'ai pu participer, récemment (octobre à décembre 2011) durant une mise à disposition au sein de l'IMB, à l'encadrement d'une doctorante en Microbiologie (Eva Potthoff) et d'une post-doctorante en biologie cellulaire (Dr. Orane Guillaume-Gentil). Ces nouvelles expériences concernent notamment l'injection contrôlée de virus dans des bactéries et l'étude de la propagation des protéines ainsi exprimées par marquage fluorescent. Une autre étude utilise un nouveau type de microlevier creux sans pointe pour piéger des levures *candida albicans* sur le levier par succion [98] et effectuer ainsi de la spectroscopie de force cellulaire reproductible sur une collection de cellule sans devoir changer le microlevier, et sans nécessité de fonctionnalisation chimique de greffage de la cellule comme cela est habituellement fait en spectroscopie cellulaire par AFM.

En partenariat avec l'IMB et le LBB (Laboratory of Biosensors and Bioelectronics) de l'ETH de Zürich, nous avons soumis en janvier 2012 une proposition de projet européen ERC *Grant* « Synergy » qui permettra de répondre à de nouvelles questions fondamentales en Microbiologie tout en améliorant le système FluidFM, et en couplant celui-ci à une mesure par spectromètre de masse.

Par ailleurs, une spin-off de l'ETH de Zürich, CYTOSURGE (<http://www.cytosurge.ch/>), a été créée pour valoriser nos brevets déposés [93,94] par l'exploitation commerciale de cet instrument via la société Suisse NANOSURF (<http://www.nanosurf.com/>).

II.3 Nanosondes piézoélectriques : imagerie Haute Résolution et Robotique sous Ultra Vide

Au cours de mon parcours de chercheur au CEA de Saclay, j'ai pu initier de nouveaux projets concernant la caractérisation à haute résolution de systèmes physico-chimique orientés vers l'Electronique Moléculaire au moyen d'un nouveau type de sonde locale à capteur intégré piézoélectrique. Ces travaux m'ont permis aussi de tisser des liens avec l'équipe INAC/SPRAM de Grenoble et l'équipe ISIR (UPMC Jussieu, Paris V) pour développer de nouvelles stratégies de nanofabrication et de nanorobotique sous Ultra Vide au moyen de cette nouvelle sonde locale.

II.3.1 Imagerie Haute Résolution sous Ultra Vide

Mes encadrements pour ce projet: José Moran Meza (*Doctorant, CEA*), Christophe Lubin (*Technicien, CEA*), François Thoyer (*Technicien, CEA*), Carlos Caldas (*Master/4^{ème} année ingénieur, ESIEE*)

Le microscope à effet tunnel (STM) permet d'observer la répartition des atomes à la surface d'un échantillon conducteur. Cette haute résolution est atteinte quand la pointe du microscope est à quelques angströms de la surface. Dans ces conditions, différentes interactions apparaissent entre la pointe et la surface. Nous nous sommes intéressés à la caractérisation de ces interactions et à leurs conséquences sur les images obtenues avec un nouveau type de microscope à sonde locale que j'ai pu développer au sein de notre équipe CEA. Cet instrument s'adresse à une compréhension fondamentale des dispositifs de l'*Electronique Moléculaire*.

Ce nouveau microscope permet d'obtenir simultanément différentes imageries, suivant le signal utilisé pour la régulation en distance de la sonde [99]. Avec une régulation basée sur le courant tunnel (topographie STM), les cartographies de variation du gradient de force et de dissipation des forces d'interaction pointe/surface sont enregistrées [100]. Quand la régulation conserve constant le décalage en fréquence (topographie par microscopie à force atomique (AFM), à l'aide de la modulation de fréquence (FM-AFM) [101]), les variations du courant tunnel et de dissipation énergétique sont cartographiées. La comparaison entre ces différentes informations s'avère extrêmement fructueuse pour quantifier les couplages mécano-électroniques à l'échelle moléculaire.



Figure 28 - Sonde à diapason piézoélectrique (CITIZEN AMERICA CFV206 40.000KAZF) dotée d'une pointe platine/iridium de 50 microns de diamètre et effilée électrochimiquement (indiquée par la flèche noire) permettant les mesures STM et AFM simultanées. Cette sonde a été entièrement réalisée par nos soins.

Le cœur de ce microscope à sonde locale est un diapason piézoélectrique en quartz, maintenu en oscillation à sa fréquence de résonance, sur lequel est fixée une pointe de platine/iridium (Figure 28), avec un rayon d'apex inférieur à 20 nm, nécessaire pour une imagerie AFM bien résolue. L'utilisation avantageuse d'une sonde à capteur intégré piézoélectrique permet de s'affranchir de la traditionnelle détection optique des AFM [43], et permet une très grande souplesse quant au choix du type de pointe utilisée (matériaux, formes). Nous avons ainsi pu contrôler le pilotage d'une puce de silicium en lieu et place de la pointe au cours d'un autre projet [102] décrit page 59. L'effet piézoélectrique direct est un phénomène caractérisé par l'apparition de charges électriques à la surface de certains cristaux lorsqu'ils sont soumis à une contrainte mécanique. La flexion de la structure mobile va générer une contrainte dans le matériau piézoélectrique, ici du quartz, qui va se traduire par l'apparition de charges. Il faut noter que ce mode de détection est peu

utilisé pour les mesures statiques de flexion à cause de courants de fuites importants mais est par contre bien adapté pour les mesures en mode dynamique.

Pour piloter cette sonde, nous avons conçu un double amplificateur AFM-STM (Figure 30), entièrement réalisé au sein de notre laboratoire, permettant de traiter des signaux de très bas niveau (picoAmpère) issus du diapason et de la pointe avec une bande passante de l'ordre de la centaine de kHz. A titre comparatif, il est intéressant de noter qu'à utilisation comparable sous Ultra Vide d'un microscope AFM en mode dynamique basé sur un cantilever silicium conventionnel ou bien sur une sonde tuning fork, les bruits d'origine thermique en mode FM-AFM sont du même ordre de grandeur dans les deux cas, comme souligné sur le tableau de la Figure 29. Le bruit prédominant pour la sonde AFM à tuning fork piézoélectrique sera essentiellement dépendant du niveau de bruit du préamplificateur transimpédance en amont de la chaîne de mesure [103–106].

En mode FM-AFM, pour une sonde avec une constante de raideur K_{probe} , oscillant à sa fréquence de résonance f_0 et dans un régime de petite amplitude (de l'ordre de l'Angström [107]), on établit une relation directe entre l'écart en fréquence mesuré Δf et le gradient de force effectif $\langle k_{ts} \rangle$ entre la pointe et la surface tel que :

$$\Delta f = \langle k_{ts} \rangle \frac{f_0}{2 \cdot K_{probe}}$$

Le bruit en fréquence $\delta \Delta f$ limitera donc la sensibilité en détection de gradient de force, avec le gradient de force minimal détectable :

$$\delta \langle k_{ts} \rangle = 2 \cdot K_{probe} \frac{\delta \Delta f}{f_0}$$

Ce bruit en fréquence dépendra majoritairement : 1) du bruit thermique, introduit par Albrecht et al. [108], 2) du bruit du détecteur [109], et 3) du bruit d'oscillation, introduit par Kobayashi et al. [110]. Ce troisième terme n'est à considérer que pour le cas où le facteur de qualité Q est bas (par exemple en milieu liquide). Ces trois sources de bruit sont indépendantes et peuvent être sommées en quadrature pour obtenir la densité spectrale de bruit totale à considérer :

$$\eta_{FM} = \sqrt{\eta_{thermal}^2 + \eta_{detector}^2 + \eta_{thermal}^2} = \sqrt{\frac{k_B \cdot T \cdot f_0}{2\pi \cdot K_{probe} \cdot A^2 \cdot Q} + \frac{2 \cdot \eta_q^2}{A^2} \cdot f^2 + \frac{\eta_q^2}{2 \cdot Q^2 \cdot A^2} \cdot f_0^2}$$

avec η_q la densité de bruit du détecteur dépendant de sa densité électrique de bruit η_{el} et de sa sensibilité S tel que $\eta_q = \eta_{el}/S$. Le bruit en fréquence total s'obtient par intégration de la densité spectrale de bruit sur la bande passante B du microscope avec :

$$\delta \Delta f = \sqrt{\int_0^B \eta_{FM}^2 df} = \sqrt{\frac{k_B \cdot T \cdot f_0 \cdot B}{2\pi \cdot K_{probe} \cdot A^2 \cdot Q} + \frac{2 \cdot \eta_q^2}{3 \cdot A^2} \cdot B^3 + \frac{\eta_q^2 \cdot f_0^2}{2 \cdot Q^2 \cdot A^2} \cdot B}$$

Donnant le gradient de force minimal détectable :

$$\delta\langle k_{ts} \rangle = \frac{2.K_{probe}}{f_0} \sqrt{\frac{k_B.T.f_0.B}{2\pi.K_{probe}.A^2.Q} + \frac{2.\eta_q^2}{3.A^2}.B^3 + \frac{\eta_q^2.f_0^2}{2.Q^2.A^2}.B}$$

Dans cette dernière expression, la dépendance cubique à la bande passante du deuxième terme de bruit lié au détecteur reflète le rôle prépondérant du bruit du préamplificateur entre la sonde locale et l'électronique de traitement dans le seuil minimal de détection. Dans le cas d'un capteur intégré à diapason piézoélectrique, ce terme est la plupart du temps plus grand que le terme de bruit d'origine thermique.

$$S_F^{th} = 4.k_B.T \cdot \frac{K_{probe}}{Q.\omega_0}$$

$$S_{\Delta f}^{th} = \frac{k_B.T}{2\pi} \cdot \frac{f_0}{K_{probe}.Q.A^2}$$

$$S_A^{th} = \frac{1}{K_{probe}^2} \cdot \frac{S_{Fth}}{\left(1 - \frac{f^2}{f_0^2}\right)^2 + \left(\frac{f}{Q.f_0}\right)^2}$$

$$S_\phi^{th} = \frac{4.S_A^{th}}{A^2}$$

Probe	Force Noise (fN/√Hz)	Frequency Noise (mHz/√Hz) FM-AFM	Amplitude Noise (pm/√Hz) AM-AFM	Phase Noise (mrad/√Hz) PM-AFM
<i>Standard silicon cantilever</i> (k=30 N/m, Q=10000, f=150 kHz, A=5nm)	8.4	3.6	2.42	1
<i>Tuning Fork probe</i> (k=8000 N/m, Q=5000, f=32 kHz, A=0.1nm)	363	7.3	0.23	4.6

Figure 29 - Tableau comparatif des densités spectrales de bruit d'origine thermique pour les modes AFM dynamiques FM-AFM, AM-AFM (modulation d'amplitude) et PM-AFM (modulation de phase) [111], pour une utilisation comparable sous Ultra Vide d'un microscope AFM en mode dynamique basé soit sur un cantilever silicium conventionnel, soit sur une sonde tuning fork.

Nous avons apporté un soin particulier à la structure de la chaîne d'amplification des signaux STM et AFM (voir Figure 30). Afin de gagner en rapport signal-sur-bruit et en bande passante, un étagement à deux niveaux a été choisi. Un premier double préamplificateur (parties AFM et STM, voir Figure 30b)) a ainsi été réalisé sur un support en céramique Macor avec des pistes en or (obtenues par lithographie) avec une fixation des composants au moyen d'une colle EPOTEK conductrice, ceci afin d'être mis sous Ultra-Vide (gamme des 10^{-10} - 10^{-11} mbar), sans problème de dégazage. Ainsi, les deux signaux issus de la sonde sont amplifiés en minimisant les problèmes de capacités parasites et de bruits: le courant tunnel *pointe-surface* STM et le courant de déplacement interélectrode de la sonde piézoélectrique oscillant à la résonance (illustrés sur la Figure 30d)). Ensuite, un deuxième étage d'amplification AFM/STM (Figure 30c) et d)), situé à l'extérieur de l'enceinte Ultra Vide du microscope (Figure 30a)), a été réalisé et connecté au premier étage. Pour éviter tout problème de contamination croisée des signaux électriques AFM et STM (courants électriques de quelques picoAmpères), nous avons mis en œuvre une architecture à trois masses électriques (Figure 30d)) : une masse flottante pour la partie STM, une masse flottante pour la partie AFM, et une masse châssis. Au final, cette architecture nous permet d'obtenir un gain transimpédance de 3 GigaOhm pour le signal STM avec une densité de bruit en courant de 20 femtoAmpère/√Hz, et un gain de 2.7 GigaOhm pour le signal AFM avec une densité de bruit en amplitude de 25 femtomètres/√Hz. La bande passante AFM et STM est de l'ordre de 100kHz, ce qui est un avantage non-négligeable pour effectuer de la spectroscopie rapide en courant I(V) ou en distance Z (voir Figure 34). Le deuxième étage d'amplification dispose en plus de filtres commutables (3kHz, 1kHz et 330Hz) pour travailler à plus petit courant (inférieur au picoAmpère).

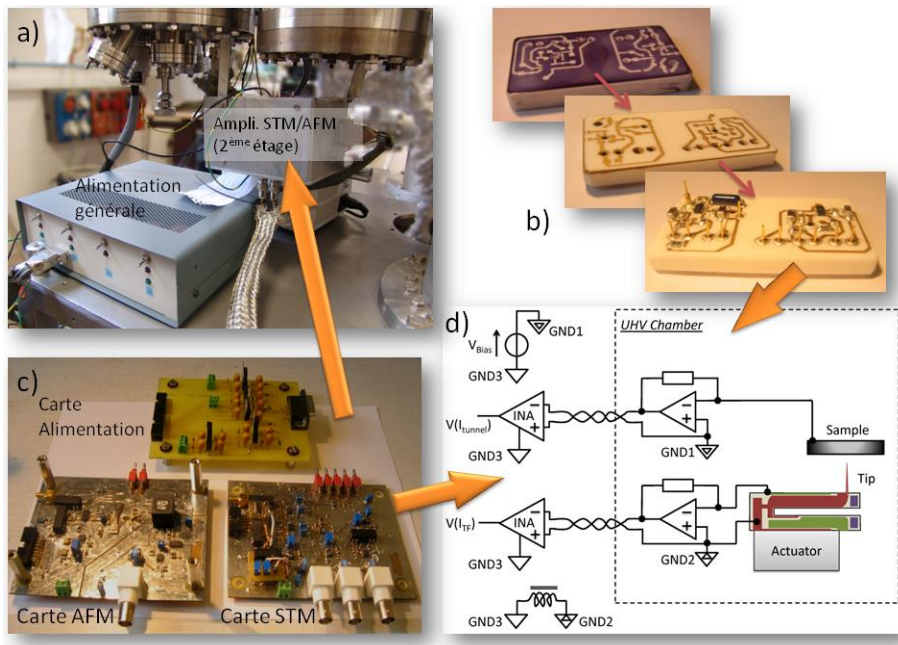


Figure 30 - a) Vue du deuxième étage d'amplification STM/AFM sous le microscope, avec son boîtier d'alimentation. b) Vue du double préamplificateur (premier étage) compatible Ultra Vide et permettant l'imagerie combinée STM et AFM. c) Détails des trois cartes réalisées composant le deuxième étage d'amplification STM/AFM. d) Schéma synoptique illustrant les connexions entre la sonde piézoélectrique, le double préamplificateur (premier étage) mis sous Ultra Vide et le deuxième étage d'amplification STM/AFM, situé à l'extérieur de l'enceinte du microscope. Les signaux amplifiés sont directement exploitables par l'électronique de contrôle du microscope.

Nous avons fait le choix de modifier une tête VT-AFM (Omicron Nanotechnology GmbH) présente dans le laboratoire pour implémenter notre instrumentation pour l'imagerie combinée AFM/STM. Comme illustré sur la Figure 31, nous avons dû modifier plusieurs parties mécaniques de la tête pour accueillir d'une part le double préamplificateur AFM/STM, et d'autre part nos nouvelles sondes piézoélectriques (voir Figure 28). La connectique électrique de la tête a été totalement revue pour être compatible avec notre électronique à deux masses flottantes, en plus de la masse châssis (voir Figure 30d).

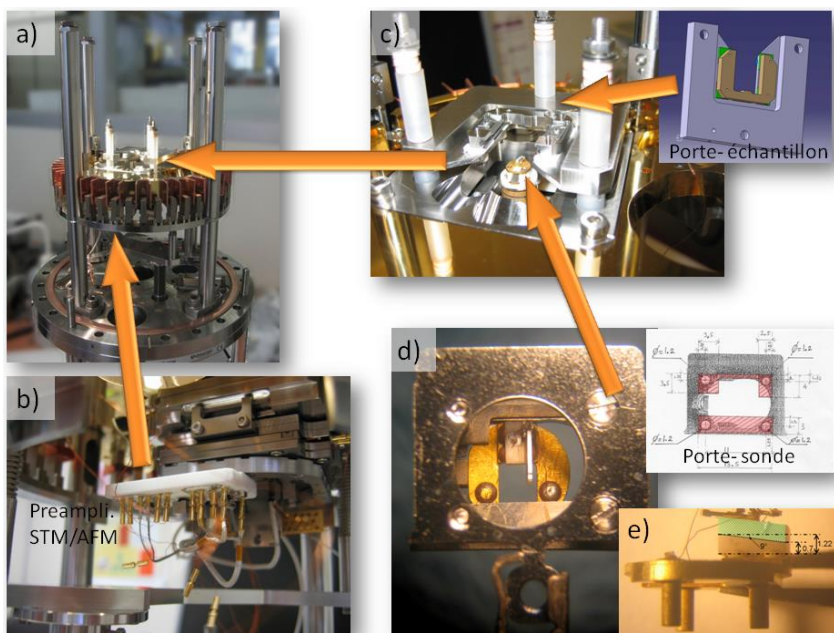


Figure 31 - a) Vue générale de la tête du VT-AFM (Omicron Nanotechnology GmbH) modifiée par nos soins pour accueillir la nouvelle électronique et la nouvelle mécanique pour réaliser de l'imagerie STM/AFM combinée sous Ultra Vide. b) Détail du double préamplificateur (1^{er} étage, voir Figure 30b)) disposé et connecté sous la tête au plus près de la sonde. c) Nouvelle plaquette porte-échantillon réalisée spécifiquement pour le fonctionnement en masse « flottante » en AFM/STM. d) Porte-sonde Omicron modifié pour accueillir nos nouvelles sondes AFM/STM (voir Figure 28). e) Détail des modifications nécessaires des tripodes tenant compte de l'encombrement des diapasons avec la pointe collée au-dessus.

L'obtention de pointes très effilées avec des rayons d'apex nanométriques est d'autant plus indispensable pour l'imagerie AFM que pour la caractérisation STM à l'échelle moléculaire. Pour ce faire, nous avons mis en place un protocole inédit de micro-usinage électrochimique illustré sur la Figure 32. Les pointes en platine/iridium utilisées présentent l'avantage d'être stables chimiquement comparativement au traditionnel tungstène qui s'oxyde rapidement. Nous avons ici aussi réalisé une électronique (voir Figure 32a)) permettant de contrôler la forme d'onde, le temps d'attaque, l'amplitude et le nombre de salves électrochimiques pour obtenir de façon reproductible des rayons de pointe en deçà de quelques dizaines de nanomètres. La finesse des pointes a été vérifiée par microscopie électronique (Figure 32c)), mais aussi par l'obtention de la résolution atomique en mode AFM et STM sur graphite (Figure 32d)) et graphène/SiC (Figure 36).

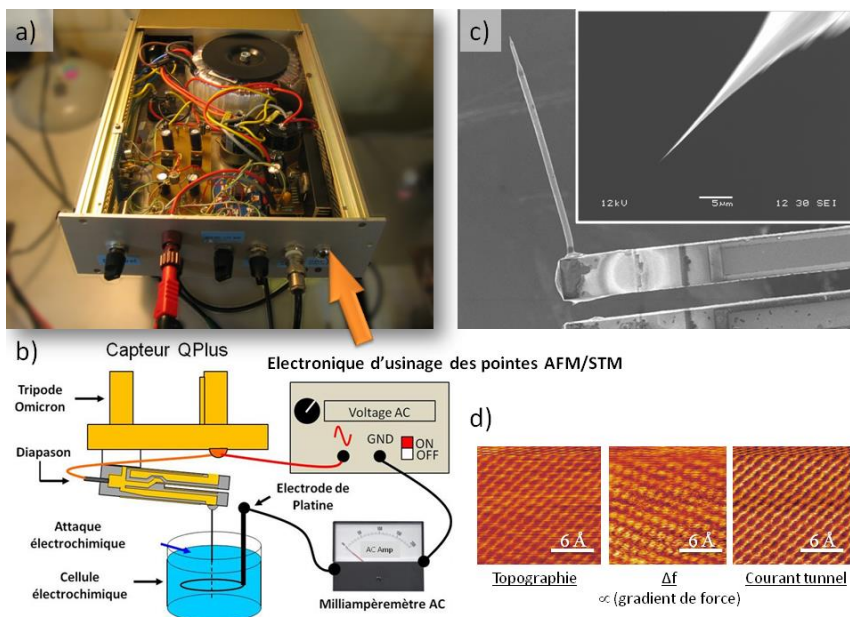


Figure 32 - a) Electronique réalisée spécialement pour le micro-usinage reproductible des pointes AFM/STM. b) Schéma synoptique illustrant le micro-usinage électrochimique des pointes. c) Image MEB d'une pointe Pt/Ir effilée après usinage électrochimique, et fixée sur le diapason piézoélectrique. Détail : apex de la pointe avec un rayon de pointe mesuré à 20 nanomètres. d) Résolution atomique obtenue avec la pointe c) sur graphite en STM/FM-AFM combinés donnant accès à la topographie, au gradient de force (proportionnel à Δf) et au courant tunnel.

Les mesures des propriétés électroniques et mécaniques locales de chaînes polymériques de 3-dodecylthiophene (P3DDT) adsorbées sur une surface de graphite HOPG ont permis de valider la sensibilité moléculaire de notre instrument [1]. En régulation de distance par le courant tunnel, la topographie STM (Figure 33a)) et les cartographies de variation du gradient de force et de dissipation des forces d'interaction pointe/surface sont obtenues. La régulation en mode écart en fréquence (vrai mode FM-AFM) a aussi été menée (Figure 33b)) pour décorrélérer les effets de trajectoire de pointe du rôle des interactions de surface liées à la présence des molécules.

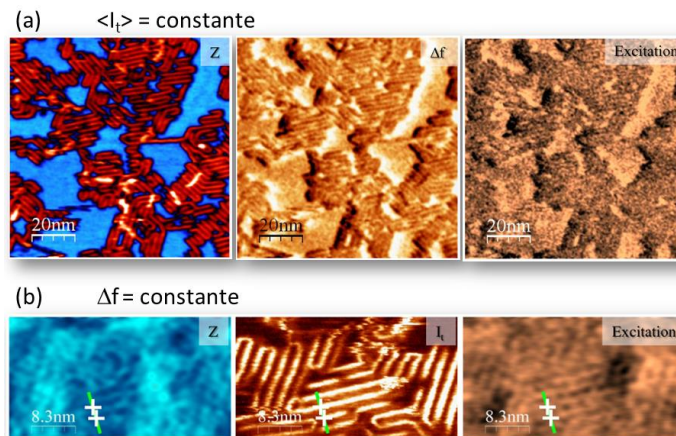


Figure 33 - (a) Images en topographie, écart en fréquence et dissipation énergétique obtenues en régulation en courant tunnel moyen ($\langle I_t \rangle = 4.3$ pA, $V_{\text{tunnel}} = -1$ V, amplitude d'oscillation de 92 pm (picomètres) avec $f = 35.9$ kHz). En topographie, les molécules de P3DDT apparaissent comme des lignes protubérantes (en rouge, et en blanc pour quelques molécules en 2^{ème} couche), parallèles aux trois directions denses du réseau atomique du graphite (en bleu). En Δf (proportionnel au gradient de force), les zones sombres correspondent à des faibles écarts en fréquence et sont associées aux molécules de P3DDT. En dissipation, la cartographie de la variation de dissipation en énergie de l'oscillateur révèle une dissipation plus faible sur les îlots de molécules. (b) Images FM-AFM en topographie, courant tunnel moyen et dissipation énergétique obtenues en régulation en écart en fréquence ($\Delta f = +196.1$ Hz, $V_{\text{tunnel}} = -1$ V, amplitude d'oscillation de 92 pm (picomètres) avec $f = 35.9$ kHz).

En comparant ces images, on constate que le "relief" est inversé entre la topographie et les variations de gradient de force : la pointe d'un STM subit des variations de forces répulsives quand elle est au-dessus des chaînes de polythiophène adsorbées et sur la surface de graphite nue (Figure 34). Sur les images en régulation STM ou AFM, nous sommes parvenus à mesurer de manière inédite la dissipation en énergie de quelques millielectronVolts/cycle à l'échelle de quelques molécules. En parallèle, l'information fournie par l'écart en fréquence de la sonde oscillante permet une mesure directe des gradients de force en jeu entre la pointe et la surface. D'autres images produites en régulation de distance en mode FM-AFM (écart en fréquence constant, Figure 33b) et de la spectroscopie en distance (Figure 34) démontrent le caractère moins répulsif des molécules [99].

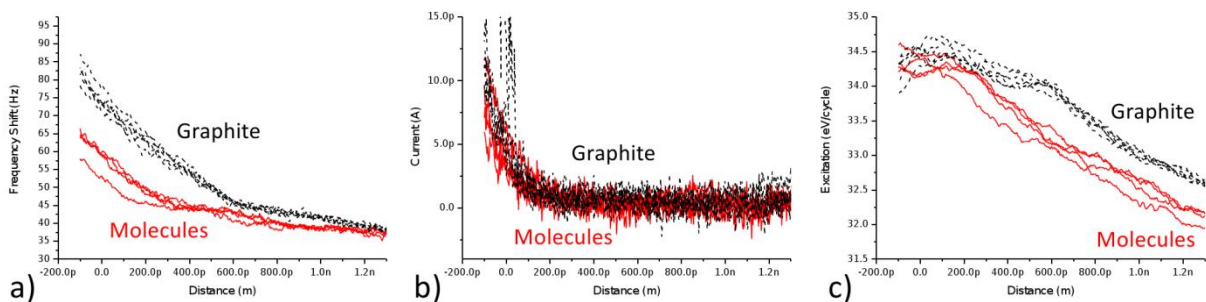


Figure 34 - Courbes de spectroscopie d'approche a) en écart en fréquence, b) en courant tunnel et c) en dissipation énergétique en différents lieux de la surface observée sur la Figure 33a) : sur les chaînes moléculaires de P3DDT (en rouge), sur des zones de graphite nues (en noir). La spectroscopie d'approche en distance illustre le comportement répulsif des forces mises en jeu dès l'apparition b) du courant tunnel, grâce à la courbe a) d'écart en fréquence acquise simultanément. Ces résultats montrent aussi que même pour de très bas courants (< 10 pA) la pointe d'un STM subit des variations de forces répulsives quand elle est au-dessus des chaînes de polythiophène adsorbées ou sur la surface de graphite nue. La courbe c) permet de quantifier une différence de dissipation en énergie de l'ordre de 100 millielectronVolts/cycle, dans les conditions d'imagerie de la Figure 33, entre les zones de graphite sans molécules, et les zones sur les chaînes moléculaires de P3DDT.

Ainsi, nous avons observé par STM/FM-AFM combinés, de manière non-invasive à température ambiante, ces îlots 2D de molécules de P3DDT faiblement adsorbées sur le graphite en opérant avec des amplitudes d'oscillation en deçà de l'Angström [99]. Ces résultats obtenus de manière inédite avec une telle sonde à température ambiante démontrent le potentiel prometteur de ce nouveau microscope.

Par ailleurs, cette imagerie combinée STM/FM-AFM nous a aussi permis de scruter d'autres systèmes de l'*Electronique sur Supports Souples* comme celui de nano-îlots de cuivre d'électrodes obtenues par croissance électrochimique sur des substrats isolants en polymère du type Acrylonitrile-Butadiène-Styrène (ABS) et polyamide (PA) [112]. En addition, une autre étude d'observation AFM/STM a aussi été menée avec l'équipe de Fabrice Charra (LEPO, CEA Saclay) sur des réseaux de « ressorts moléculaires » de paracyclophanes. La compréhension des effets d'apparition/disparition de certaines de ces molécules observés dans le réseau en topographie STM a pu commencer à être élucidé grâce aux cartographies, sans précédent, en gradient de force (i.e. Δf) et en dissipation acquises simultanément. En effet, ces images supplémentaires à Haute Résolution (Figure 35) révèlent une signature de la présence « mécanique » de la molécule, bien que celle-ci n'apparaissent pas sur l'image en topographie régulée sur la densité électronique (STM).

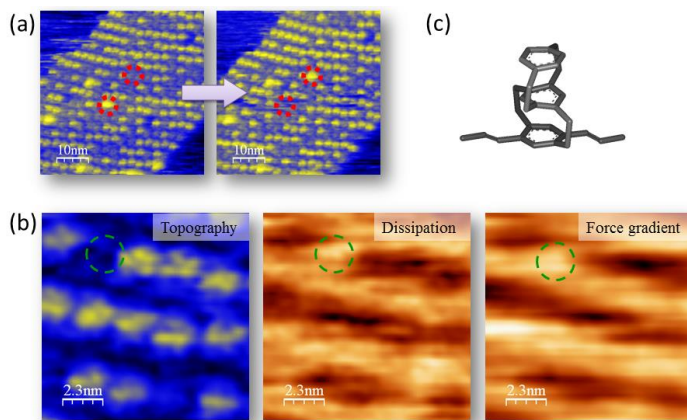


Figure 35 - a) Séquence de deux images en topographie en mode STM montrant le phénomène d'apparition/disparition de certaines de ces molécules de paracyclophane dans le réseau (cercles rouges), sur HOPG. b) Images Haute Résolution en topographie, écart en fréquence (i.e. gradient de force) et dissipation énergétique obtenues en régulation en courant tunnel moyen. Ces deux dernières cartographies révèlent une signature de la présence « mécanique » de la molécule, bien que celle-ci n'apparaisse pas sur l'image en topographie régulée sur la densité électronique (STM). c) Modèle chimique d'un paracyclophane à 3 niveaux.

Actuellement, des feuillets de graphène sur SiC sont étudiés au moyen de ce nouvel instrument AFM/STM (Figure 36). Ce sujet de recherche fait l'objet d'un travail de thèse (José Moran Meza) que je co-encadre au sein de notre équipe. Les retombées de tels travaux de recherche de caractérisation fondamentale des couplages mécano-électroniques d'édifices moléculaires concernent notamment l'*Electronique Moléculaire* et la *Chimie Organique*.

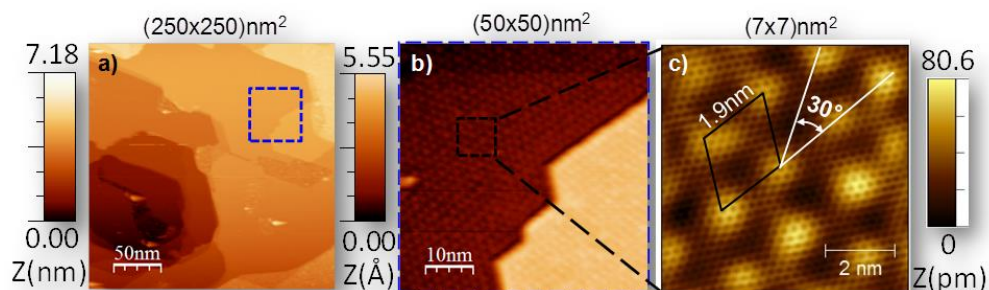


Figure 36 - Premiers résultats d'imagerie sur graphène. Images STM du graphène sur SiC déposé sur Si obtenues avec la sonde détaillée en Figure 28. a) Terrasses lisses ($I_T=100\text{pA}$, $V_T=-500\text{mV}$). b) Réseau hexagonal centré, agrandissement de l'image a) ($I_T=300\text{pA}$, $V_T=-50\text{mV}$). c) coexistence de deux réseaux hexagonaux dus à la reconstruction du SiC et au graphène ($I_T=300\text{pA}$, $V_T=-50\text{mV}$).

II.3.2 Micro- et Nano- Robotique sous Ultra Vide

II.3.2.1 Nanomanipulation de nanohélices en InGaAs/GaAs et caractérisation du comportement mécanique en force

Mes encadrements pour ce projet: Juan Camilo Acosta Meija (Doctorant, ISIR-UPMC), François Thoyer (Technicien, CEA)

Devant les résultats prometteurs obtenus avec notre instrument AFM/STM, nous avons intégré avec succès la même sonde piézoélectrique et la même électronique de pilotage et d'amplification du signal dans un microscope électronique à balayage (MEB, Leica stereoscan 260 Cambridge instruments), en collaboration avec l'ISIR de Jussieu (Institut des Systèmes Intelligents et de Robotique, Université Pierre et Marie Curie, Paris). Cette électronique, que nous avons protégée par un dépôt de brevet [113], permet de faire de la manipulation et de la caractérisation en force (AFM) de micro- et nano-systèmes observés simultanément en temps réel par MEB sous un faisceau électronique [114,115] (voir détails en Figure 37). L'extinction temporaire du faisceau électronique permet aussi de la caractérisation simultanée AFM/STM dans le MEB [113]. La publication [114] insérée à la fin de ce manuscrit relate les détails des résultats obtenus sur des mesures de force de nanohélices en InGaAs/GaAs, dans le cadre de la thèse de Juan Camilo Acosta [116] que j'ai co-encadré. Je poursuis actuellement cette collaboration avec l'ISIR pour intégrer ce dispositif en solution tampon afin de caractériser les propriétés mécaniques d'objet biologique (brin d'ADN, fibre de collagène). Ce futur travail est étayé dans les Axes de Recherche présentés dans les prospectives à la fin de ce manuscrit, à la page 71.

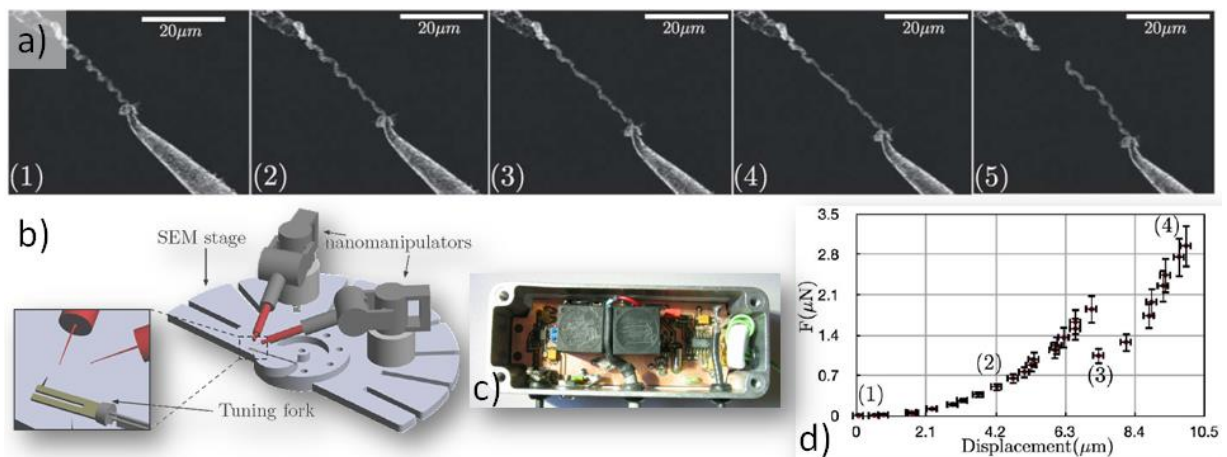


Figure 37 - a) Séquence d'images obtenue en microscopie électronique (MEB) durant l'élongation d'une nanohélice en InGaAs/GaAs. La pointe du haut provient de la sonde AFM piézoélectrique tuning fork, la pointe du bas est déplacée par un nanomanipulateur. b) Schéma du dispositif expérimental des nanomanipulateurs et du diapason piézoélectrique (Tuning Fork) AFM intégré à l'intérieur du MEB. c) Détail du préamplificateur AFM adapté pour le MEB. d) Courbe de force obtenue par notre mesure AFM à sonde piézoélectrique durant l'élongation de la nanohélice en InGaAs/GaAs illustrée en a).

II.3.2.2 Pilotage d'une puce de Nanostencil pour la réalisation et la caractérisation de nanoélectrodes sous Ultra Vide

Mes encadrements pour ce projet: *Christophe Lubin (Technicien, CEA), François Thoyer (Technicien, CEA)*

En collaboration avec le Laboratoire d'Electronique Moléculaire Organique & Hybride (équipe de Benjamin Grévin, INAC/SPrAM, Grenoble), nous avons poursuivi l'utilisation de la sonde polyvalente à tuning fork pour piloter par AFM des puces de nanostencil (i.e. « nanopochoir », voir par exemple la référence [117] pour les détails de la procédure de nanostencil) pour l'élaboration de nanoélectrodes sur une surface isolante. Le dispositif est décrit sur la Figure 38 avec un exemple de résultats de tracé de nanoélectrodes.

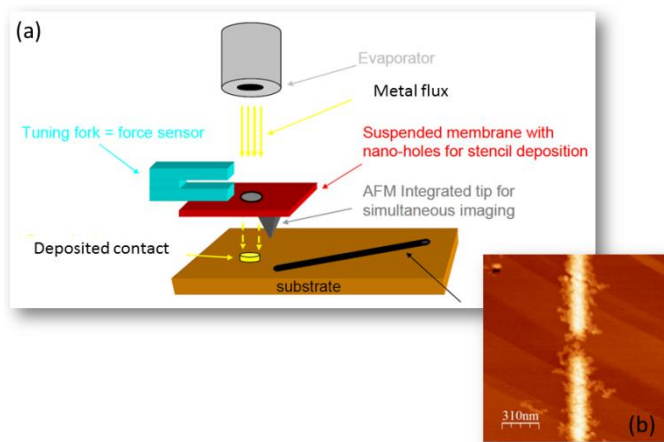


Figure 38 - a) Schéma du dispositif de Nanostencil dynamique pour le dépôt de nanoélectrodes métalliques. La puce « pochoir », dotée d'une pointe d'apex nanométrique, est maintenue par une sonde piézoélectrique tuning fork qui permet l'approche contrôlée en force de la puce sur la surface. L'obturation ou l'ouverture du flux d'atomes métalliques en face arrière de la puce, combinée avec le déplacement spatial en X,Y et Z de la table porte-échantillon laisse une grande liberté dans le tracé dynamique des nanoélectrodes. b) Résultat de nanostencil dynamique de tracé de deux nanoélectrodes d'or (hauteur = 10nm, largeur = 165 nm) sur un substrat de TiO₂. L'image AFM a été réalisée en modulation d'amplitude (AM-AFM) par la même sonde « tuning fork+puce avec pointe » que celle utilisée pour le nanostencil.

Une première difficulté à surmonter fut le positionnement précis de la puce dotée d'une micropointe d'apex nanométrique en regard de la surface d'étude (voir Figure 39). A cette fin, nous sommes restés sur le choix de modifier la même tête VT-AFM (Omicron Nanotechnology GmbH) présente dans notre laboratoire, déjà modifiée en AFM/STM, et aussi dans le laboratoire partenaire à l'INAC de Grenoble, pour implémenter notre instrumentation pour le nanostencil par sonde à tuning fork. Les tests et protocoles de montage et pilotage de la sonde nanostencil ont d'abord été validés dans notre laboratoire à Saclay, avant d'être répliqués au laboratoire de Grenoble pour l'étape finale de fabrication des nanoélectrodes.

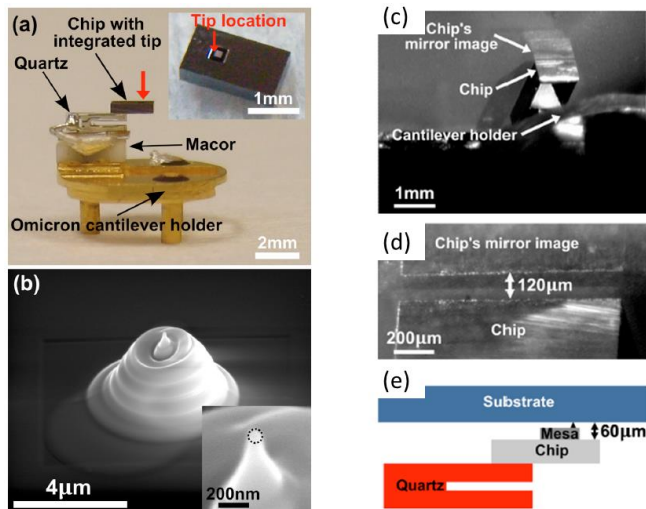


Figure 39 - a) Vue de la sonde tuning fork piézoélectrique montée sur un tripode et permettant le pilotage de la puce de nanostencil (voir détail) sur la surface [102]. b) Détails de la nanopointe en tungstène, réalisée par dépôt FIB, sur la puce de nanostencil et permettant l'imagerie AFM. c) et d) Vue renversée de la puce sur la sonde tuning fork à l'approche d'une surface de TiO_2 . e) Schéma explicite du dispositif photographié en a), c) et d) et ayant permis la réalisation et l'imagerie AFM des nanoélectrodes de la Figure 38b).

Une autre problématique considérée fut la stratégie à adopter pour le pilotage AFM de la sonde équipée d'une puce de nanostencil en silicium du même ordre de grandeur en masse (voir Figure 39a) et Figure 40a)). A cette fin, nous avons réalisé des simulations par éléments finis (code ASTER) pour avoir une idée claire de l'influence majeure de la puce de nanostencil sur les modes d'oscillation de la sonde (Figure 40b), c) et d)). Les résultats numériques ont été confirmés expérimentalement par une étude en résonance (Figure 40e)).

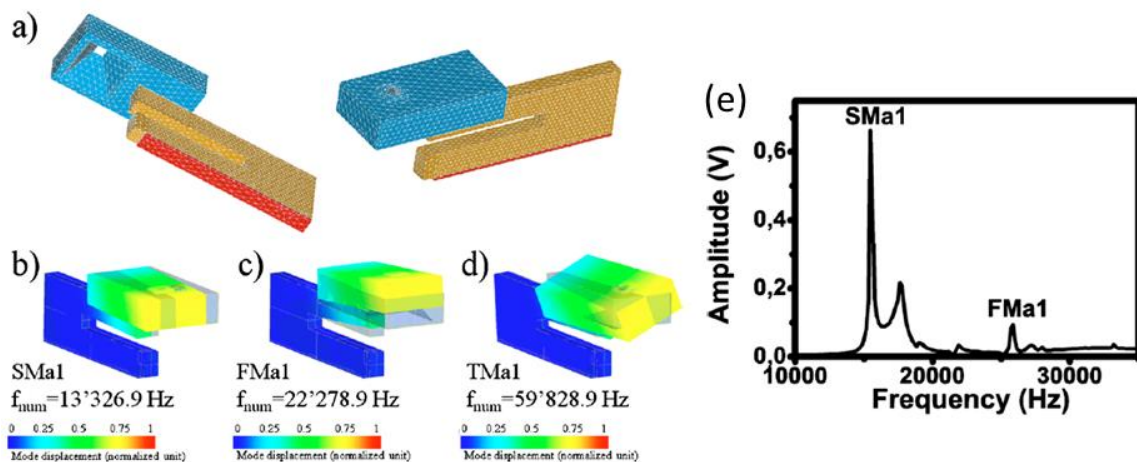


Figure 40 - a) à d), Simulations par éléments finis (Code ASTER + SALOME) des modes propres de résonance de la sonde Tuning Fork équipée de la puce de nanostencil en silicium. La zone en rouge en a), figée dans la simulation, correspond au collage à l'époxy de la sonde sur son support tripode (voir photo Figure 39a)). Trois modes à basse fréquence apparaissent dans la simulation, dont deux (SMA1, mode en cisaillement, et FMa1, mode normal) ont été retrouvés dans la mesure expérimentale e) en résonance. Ces simulations numériques nous ont permis d'utiliser le mode le plus apte au pilotage de la puce sur la surface (approche pour nanostencil dynamique et imagerie en mode AM-AFM et FM-AFM).

Le mode présentant le plus de sensibilité en détection a donc été choisi pour piloter l'approche de la puce en mode FM-AFM. Les courbes d'approches obtenues sont illustrées Figure 41a) et b), et permettent un arrêt précis de la sonde sur un point de fonctionnement évitant la destruction de la puce et de sa pointe (Cf. Figure 39), tout en maintenant un contact permanent avec la surface durant la fabrication des nanoélectrodes. Nous avons confirmé la sensibilité du mode d'imagerie en FM-AFM ainsi que la qualité de la pointe en extrémité de la puce de nanostencil en réalisant des images de chaînes auto-assemblées d'oligomères pi-conjugués adsorbés sur HOPG

(Figure 41c)). Des images stables et reproductibles ont été obtenues sur cet échantillon fragile. Ce dispositif désormais fonctionnel de nanostencil dynamique par sonde AFM piézoélectrique est utilisé dans de nouveaux projets à l'INAC de Grenoble pour la conception de dispositifs pour l'Electronique Moléculaire [102,118].

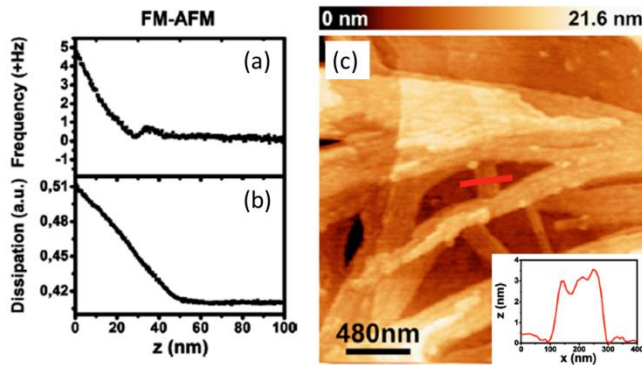


Figure 41 - a), b) Spectroscopie en mode FM-AFM (Δf et dissipation) sur une surface de graphite avec la sonde tuning fork illustrée en Figure 39a). c) Malgré la raideur effective importante de la sonde estimée à 44 kN/m, l'imagerie en FM-AFM utilisant le mode SMA1 de chaînes auto-assemblées d'oligomères pi-conjugués adsorbés sur HOPG a été réalisée. Le mode utilisé présente une sensibilité suffisante pour obtenir une imagerie stable sans perturber l'échantillon fragile. Détail : profil en topographie extrait de l'image.

II.4 Conclusions

Au cours des projets scientifiques que j'ai pu mener durant mon parcours de chercheur, plusieurs types de sondes locales innovantes ont été mises en œuvre avec de nouvelles stratégies de pilotage [79] : 1) pour explorer et agir sur le monde biologique à l'échelle de la cellule, et 2) pour scruter, manipuler et fabriquer à l'échelle du nanomètre en environnement Ultra Vide. Chaque étude a fait l'objet d'un travail détaillé des avantages apportés en termes de sensibilité, versatilité, rapidité par rapport à une problématique scientifique et technique précise. Ainsi des concepts inédits de systèmes à base de sondes locales ont pu émerger durant ce parcours. Les systèmes de sonde locale à capteur intégré augurent de nouvelles approches pour la nanocaractérisation et la micro – et nano-robotique sous vide et en milieu biologique. L'ensemble de ces travaux a donné lieu à des publications et à des brevets. Un de ces projets a notamment permis l'émergence d'une spin-off pour commercialiser le système FluidFM. La couleur multidisciplinaire est aussi un dénominateur commun de ces projets. J'ai eu aussi l'opportunité d'encadrer plusieurs étudiants en stage, des doctorants, post-doctorants et des techniciens qui ont été des acteurs essentiels dans ces réalisations. J'ai aussi apprécié de pouvoir dispenser quelques cours et formations à des étudiants de l'Ecole Centrale d'Electronique de Paris, des élèves ingénieurs de l'ETH de Zürich, et des employés du CEA (techniciens, doctorants). En parallèle, les collaborations pérennes que j'ai pu créer durant ce parcours avec les équipes de l'ETH de Zürich, l'équipe SPrAM de l'INAC de Grenoble, ou l'ISIR de Jussieu (UPMC – Paris VI) m'ont permis de beaucoup apprendre de champs scientifiques orthogonaux au mien. C'est cet enrichissement scientifique et technique multidisciplinaire qui me permet aujourd'hui de proposer avec force trois Axes de Recherche pour les prochaines années de ma vie de chercheur.



energie atomique • énergies alternatives

III) Prospectives

III.1 Préambule

Les perspectives des projets que j'envisage pour les années à venir s'appuient sur l'expérience de mon bilan scientifique et sur de nouveaux résultats préliminaires. Je compte orienter mes Recherches suivant trois Axes principaux.

Un premier Axe traite de l'imagerie Haute Résolution obtenue à l'échelle moléculaire avec des sondes locales à capteurs intégrés mais transposée au monde biologique à l'échelle de la protéine, avec de nouvelles problématiques liées au milieu liquide. De nombreux résultats préliminaires renforcent cette nouvelle ouverture vers le Vivant, et orientent les futurs résultats à une échelle de 1 à 3 ans.

Un deuxième Axe s'appuie sur le savoir-faire déjà acquis concernant l'utilisation de sonde locale pour la Robotique à l'échelle du nano. Je compte poursuivre la collaboration avec l'ISIR de Jussieu vers un système de nanomanipulation destinée au milieu biologique. L'aspect Haute Vitesse d'imagerie AFM, et aussi de nanomanipulation, avec un nouveau type de sonde locale à développer sera un nouveau paramètre essentiel qui sera inclus dans la démarche. Certains résultats préliminaires nous montrent déjà les pistes à prendre, mais il s'agit d'un projet que j'inscris dans les 4 à 5 ans à venir.

Le troisième et dernier Axe proposé est le plus prospectif. L'idée est de remplacer les procédés de microfabrication habituels de biocapteurs en technologie silicium par une approche non-conventionnelle en « tout polymère ». Je propose ici une rupture technologique qui permettrait de réduire les coûts de fabrication de tels dispositifs organiques tout en gardant d'excellentes sensibilités en détection. La versatilité et la portabilité des capteurs polymériques proposés sont aussi des paramètres clefs de la démarche. La chimie sur polymère permettant : 1) la métallisation d'électrodes sur polymères, et 2) la spécificité de greffage biochimique qui a déjà été mise au point dans notre laboratoire. La souplesse de ces méthodes d'élaboration sur polymères ouvriront la voie à de l'intégration de microfluidique et d'antenne d'interrogation sans fil autour de ces nouveaux capteurs. Cette base de travail combinée au savoir-faire que j'ai acquis dans les différentes méthodes de détection dans les micro- et nano- capteurs appuient cette nouvelle initiative que j'estime sur une durée de 10 ans.

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

III.2 Axe de Recherche 1 : Imagerie Haute Résolution et spectroscopie de force à l'échelle de la protéine à sonde locale à capteur intégré

Mes encadrements pour ces travaux préliminaires : *Ali Makky (post-doctorant C'NANO, CEA), Christophe Lubin (technicien, CEA), François Thoyer (technicien CEA), Jérémy Legrand (stagiaire Master2, Paris XI), Alexandre Garcia (doctorant, CEA), Carlos Caldas (stagiaire Master, 4^{ème} année ingénieur, ESIEE)*

Ce premier Axe de Recherche est dans la continuité de l'utilisation inédite des sondes locales à capteurs intégrés pour la Haute Résolution en milieu biologique. Le but est de converger vers des systèmes permettant d'aboutir à la même sensibilité de détection en topographie et en force que la microscopie AFM conventionnelle à détection optique (laser/photodiode) déjà utilisée pour l'imagerie Haute Résolution de protéines [21,119]. Au cours de mon bilan scientifique, j'ai pu déjà démontrer le potentiel en sensibilité des microleviers piézorésistifs pour l'imagerie et la spectroscopie de force sur les cellules. Au cours d'un autre projet exposé dans le bilan scientifique, j'ai aussi montré les capacités d'imagerie Haute Résolution à l'échelle moléculaire et atomique sous Ultra Vide avec les sondes AFM à tuning fork piézoélectrique. En plus de leur sensibilité, ces dernières sondes présentent aussi l'avantage du choix de la pointe terminant la sonde. Ce choix au niveau du matériau n'est ainsi plus limité au silicium comme pour les cantilevers d'AFM standards. Cela ouvre de nouvelles voies concernant une éventuelle chimie de fonctionnalisation de la pointe, et à des formes de pointe de longueur millimétrique, d'apex nanométrique, pour accéder à des espaces concis inatteignables par des cantilevers AFM conventionnels. De plus, l'approche capteur intégré de cette sonde AFM permettra une imagerie AFM en milieu turbide contrairement aux AFM conventionnels à détection optique externe (laser/photodiode) [43].

A titre préliminaire de cet Axe de Recherche, j'ai pu ainsi réaliser une nouvelle plateforme à sonde AFM piézoélectrique pour le milieu liquide (illustrée sur la Figure 42) afin de valider cette nouvelle approche de caractérisation moléculaire d'objets biologiques en solution.

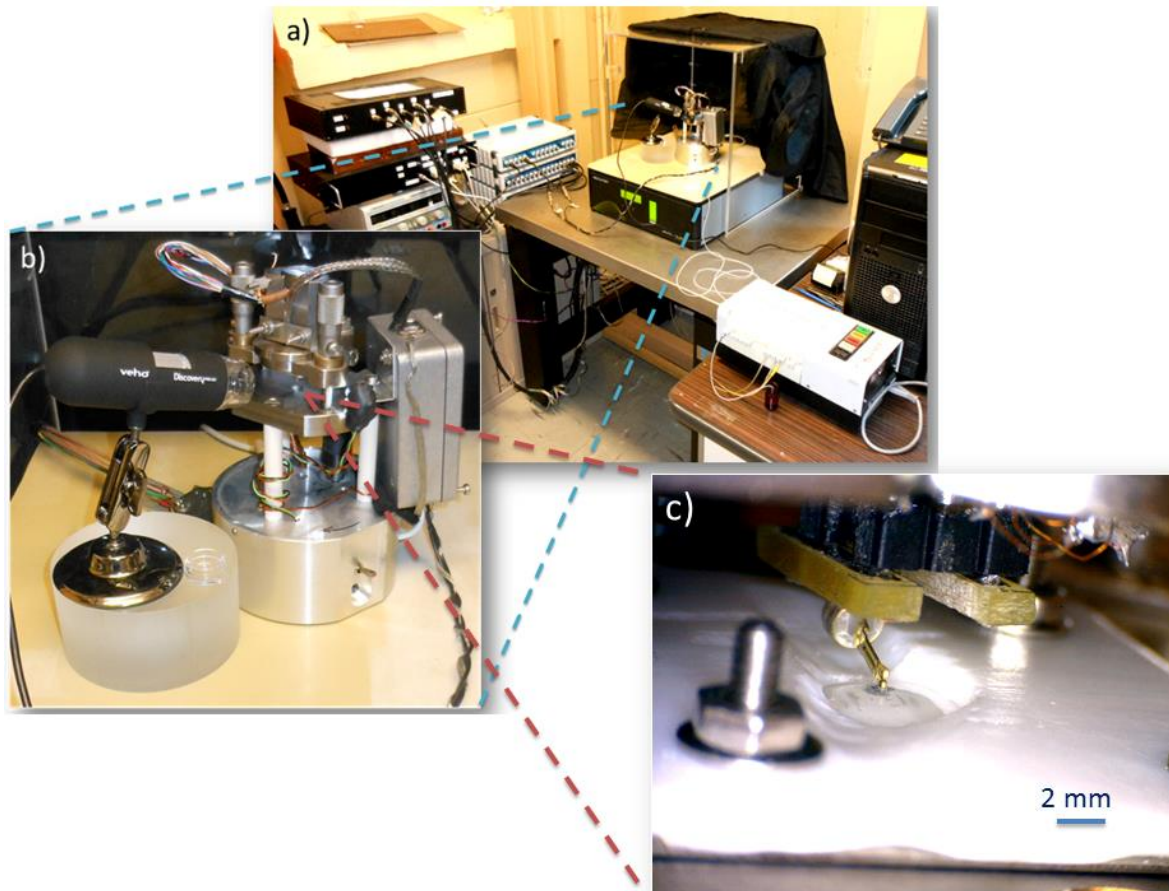


Figure 42 - a), b) Vue générale du dispositif de microscopie AFM à sonde locale piézoélectrique utilisable en milieu liquide. c) Vue détaillée de la cellule fluidique réalisée en Teflon pour le travail en milieu liquide de la sonde tuning fork, ici discernable.

Cette plateforme nous a déjà permis de valider et breveter [23,120–122] certaines méthodologies inédites de préparation de ces nouvelles sondes pour le milieu biologique. En particulier la fonctionnalisation biochimique des pointes, et les méthodologies pour la passivation des électrodes de fonctionnement du capteur intégré évitant les problèmes de fuites électriques et de corrosion lors de l’immersion en solution saline. Un de ces protocoles de passivation est publié dans la référence [122]. La Figure 43 illustre le comportement de la sonde AFM piézoélectrique passivée en solution tampon.

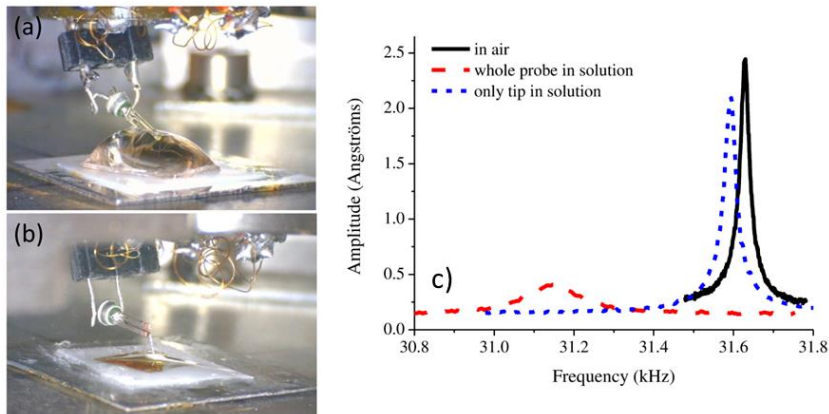


Figure 43 - Deux configurations d'utilisation de la sonde tuning fork piézoélectrique AFM, dotée d'une pointe, en milieu liquide (tampon PBS) : a) la sonde est entièrement immergée dans le liquide, b) seule la pointe est immergée. Notons que pour le cas a), un dépôt de passivation électrique des électrodes est indispensable pour le fonctionnement en milieu aqueux sans problème de fuite de courant ou de corrosion. c) Courbes de résonance expérimentales obtenues pour les deux cas précités, ainsi qu'une caractérisation de la même sonde à l'air (en noir). On notera l'effet du liquide (immersion partielle de la pointe (en bleu pointillé), et immersion totale de la sonde (en rouge pointillé)) sur le facteur de qualité et la fréquence de résonance.

Le milieu liquide apporte ainsi de nouvelles questions fondamentales concernant les aspects hydrodynamiques de la sonde oscillante, et diélectriques qui modifient drastiquement les propriétés de résonance (voir Figure 44), mais aussi la façon de piloter la sonde AFM en milieu liquide.

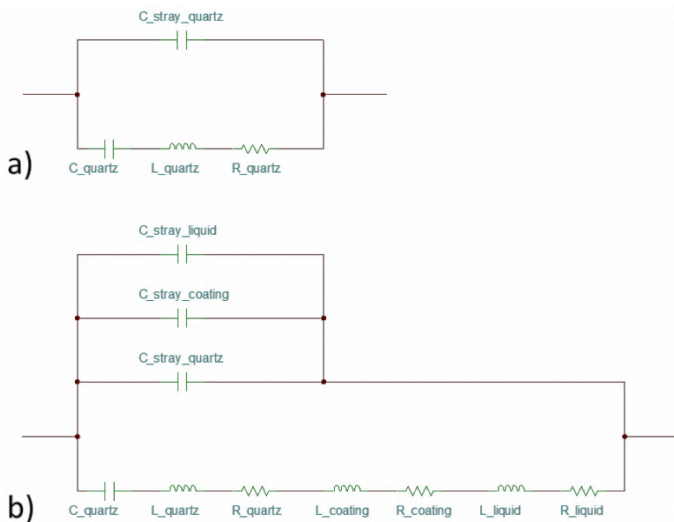


Figure 44 - a) Modèle équivalent de Butterworth-Van Dyke d'un résonateur tel que le tuning fork en quartz utilisé dans ce travail. C_{quartz} étant la capacité équivalente liée à la raideur mécanique du résonateur, L_{quartz} étant l'inductance équivalente liée à la masse effective du résonateur, R_{quartz} étant la résistance équivalente liée à la dissipation mécanique (ou facteur de qualité) du résonateur, et $C_{\text{stray_quartz}}$ étant la capacité parasite inter-électrodes du résonateur. b) Le même résonateur doté d'un revêtement passivant et immergé dans un liquide subit une modification de son modèle équivalent électrique. En particulier, les termes résistifs R_{liquid} et R_{coating} s'ajoutent provoquant une dégradation du facteur de qualité, et les nouveaux termes inductifs L_{liquid} et L_{coating} provoquent un décalage de la fréquence de résonance. La capacité parasite inter-électrodes du résonateur augmente aussi. Cette configuration modélise les constatations expérimentales de la Figure 43c).

En considérant ces nouveaux comportements de la sonde en solution, nous avons donc changé la stratégie de pilotage du résonateur piézoélectrique avec une nouvelle électronique. Cela nous a permis de retrouver une sensibilité suffisante en détection de force de l'ordre de 80 picoNewtons, comparable aux systèmes AFM conventionnels. Cela a été confirmé par une étude de spectroscopie de force de dénaturation de protéine BSA (Bovine Serum Albumine) par liaisons non-spécifiques en utilisant des pointes carbonées fonctionnalisées (-OH, -CH₃ et -NH₂) sur un tuning fork

[122]. Cette étude est illustrée sur la Figure 45. Dans ce même travail préliminaire aux thèmes de Recherches de ce premier Axe, nous avons aussi pu établir le protocole analytique pour convertir les données brutes en amplitude et phase, fournies par la sonde AFM piézoélectrique, en information de force (voir Informations Supplémentaires dans la référence [122]).

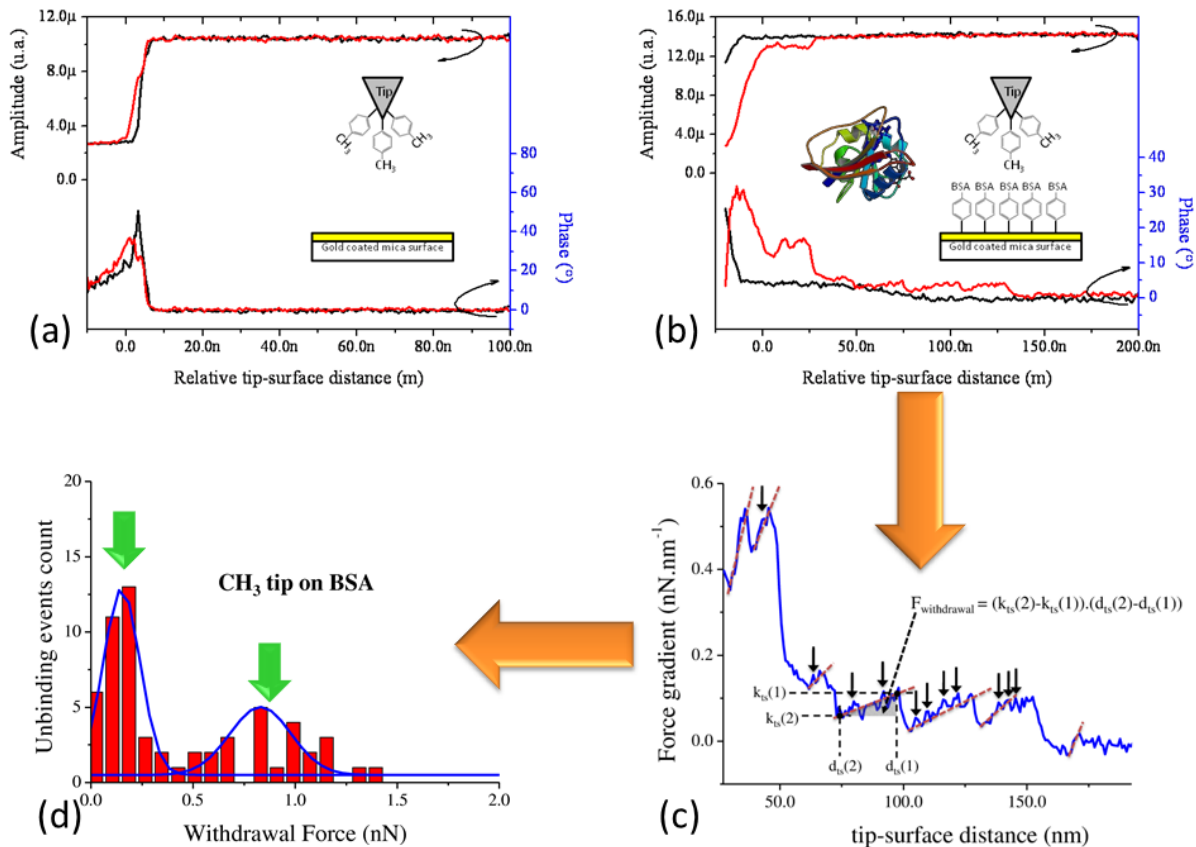


Figure 45 - Etude en spectroscopie de force de dénaturation mécanique de protéines BSA (Bovine Serum Albumin) au moyen d'une sonde tuning fork piézoélectrique terminée par une pointe carbone fonctionnalisée en $-CH_3$ en solution Tris 10mM, KCl 10mM, $MgCl_2$ 10mM à pH=8.2. a) Spectroscopie dynamique en amplitude et phase avec une pointe fonctionnalisée $-CH_3$ sur une surface de mica dorée nue. Les courbes d'approche (noir) et de retrait (rouge) sont superposables et ne témoignent d'aucun mécanisme de greffage entre la pointe et la surface. b) Même procédure expérimentale en greffant des protéines BSA sur la surface de mica dorée par procédé GraftFast [122]. Les courbes d'approche (en noir) et de retrait (en rouge) ne sont plus superposables, et la courbe de retrait (en rouge) comporte des sauts multiples d'amplitude et de phase. Cela révèle des dégreffages de liaisons chimiques entre la pointe fonctionnalisée et les protéines. c) En utilisant un formalisme analytique [123,124], les courbes d'amplitude et de phase en b) sont converties en courbes de gradient de force. Une intégration des zones continues de gradient de force permet d'estimer les forces nécessaires aux dégreffages des liaisons entre la pointe fonctionnalisée et les protéines. d) En répétant l'étape c) sur une collection de courbes, on obtient une statistique de comptage révélant deux pics de forces à 150 pN et 830 pN caractéristiques de sauts intermédiaires et principaux durant la dénaturation mécanique de la protéine. Le même type de résultats et de conclusion ont aussi été obtenus avec une pointe fonctionnalisée $-NH_2$. En revanche, une pointe fonctionnalisée hydrophile $-OH$ n'a donné aucune signature d'interaction avec les protéines [122].

Afin d'évaluer la capacité de ce premier dispositif pour l'imagerie Haute Résolution des protéines de petites tailles avec une morphologie structurée, nous avons étudié la topographie des deux types d'anticorps immunoglobuline G (IgG) et immunoglobuline M (IgM) adsorbés sur une surface de mica en utilisant deux modes d'AFM dynamique différents l'AM-AFM et le PM-AFM, pour les IgG et les IgM respectivement. Ce travail a pu se faire grâce à une collaboration avec l'équipe des

biologistes d'immunoanalyse et diagnostic du CEA (LERI/DSV) qui nous a préparé les échantillons biologiques afin que nous puissions les étudier. En effet, les anticorps sont des protéines plasmatiques globulaires qui ont une masse molaire de l'ordre de 150 kiloDaltons et qui jouent un rôle important dans la défense immunitaire de l'organisme. Ces anticorps peuvent exister sous formes de monomères (IgG), dimères (IgA) ou pentamères (IgM).

La topographie des IgG adsorbés, obtenue avec notre instrument AFM sur une surface de mica, et présentée sur la Figure 46, montre que ces protéines adoptent une structure sous forme de Y avec trois lobes qui correspondent respectivement aux domaines Fc et Fab. De plus, des courbes de profil de ces IgG ont montré que le domaine Fc a une hauteur plus élevée que les domaines Fab, ce qui est confirmé par les données bibliographiques. D'autre part, nous avons pu démontrer que les IgG peuvent adopter différentes orientations dues à leur adsorption aléatoire à la surface du mica, comme le montrent les images AFM de la Figure 46. La structure cristallographique connue de ces objets permet de corréliser aux orientations de la protéine observées par AFM.

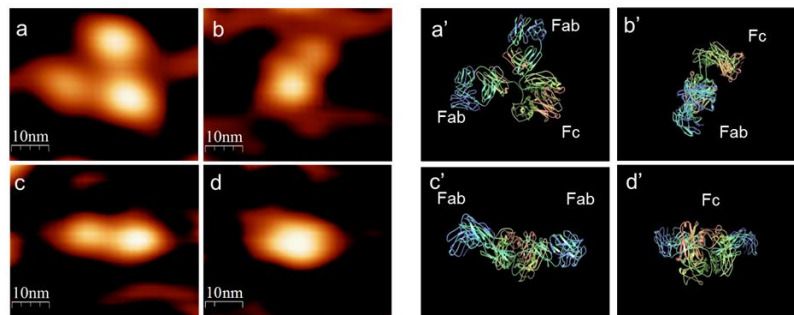


Figure 46 - Gauche : Topographie d'anticorps IgG monoclonaux (immunoglobulin- γ 1 (IgG1), Ana-3) adsorbés sur une surface de mica. Images expérimentales en AM-AFM obtenues avec une sonde tuning fork piézoélectrique terminée par une pointe en Platine/Iridium effilée par attaque électrochimique à un rayon d'apex de 50 nm [23]. a) Image d'un anticorps IgG reposant sur les trois lobes. b) IgG reposant sur un lobe Fab. c) IgG reposant sur son unité Fc. d) IgG sur ses deux unités Fab. Droite : a', b', c' et d' sont les structures cristallographiques de l'IgG dans les différentes orientations (ref : PDB (Protein Data Bank): 1IGY).

Pour aller plus loin dans la capacité de notre sonde piézoélectrique AFM à résoudre avec une Haute Résolution des protéines de structure plus complexe et plus fragile que les IgG, nous avons aussi caractérisé des anticorps IgM. En effet, les immunoglobulines M (IgM) sont des protéines plasmatiques globulaires (900 kiloDaltons). Ces anticorps possèdent une structure pentamérique qui se compose de 5 sous-unités IgG qui sont liées les unes aux autres de façon covalente par des ponts disulfures avec une glycoprotéine centrale appelée chaîne J.

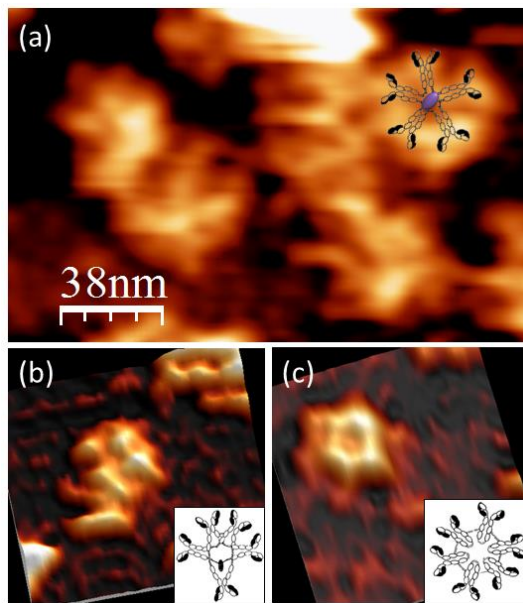


Figure 47 - a) Topographie d'anticorps IgM monoclonaux (immunoglobulin- μ (IgM), Sha-22) adsorbés sur une surface de mica. Images expérimentales en PM-AFM obtenues avec la même sonde tuning fork qu'utilisée en Figure 46. Sur cet amas de quelques IgM, on reconnaît la forme pentamérique de l'anticorps (superposition du modèle, en filigrane noir). b) Image AFM d'un anticorps IgM isolé présentant une anomalie topologique. c) Image AFM d'un IgM isolé présentant une forme hexamérique où on constate une lacune au centre en lieu et place de la glycoprotéine J-chain. Ces deux anomalies d'IgM avaient déjà été suggérées dans la littérature par E. J. Wiersma et al. [125] (modèles en détails sur b) et c)), mais sans observation directe comme nous le démontrons ici par imagerie AFM.

La topographie en mode PM-AFM des IgM adsorbés à la surface de mica, présentée sur la Figure 47a), montre des structures pentamériques avec des structures de morphologies variées. Ces dernières pourraient être expliquées par une orientation différente des IgM à la surface. La Figure 47b) et c) montrent clairement des structures d'IgM présentant des anomalies structurales grâce au pouvoir en résolution de notre microscope.

Ces essais préliminaires de capacité de résolution en force et en topographie sans précédents, et que nous avons publiés [23], vont désormais nous permettre d'aller plus loin dans l'étude d'aspects plus fondamentaux concernant les interactions spécifiques entre un ligand et une protéine. A cette fin, nous sommes en train de mettre en place une chimie spécifique d'électrogreffage, à base de sels de diazonium, sur la pointe métallique. Cette chimie nous permet d'accrocher de manière covalente et stable, par exemple, un ligand biologique. Ce procédé nous permet également d'introduire une chaîne mobile (« linker » PEG) entre la pointe et le ligand permettant ainsi une optimisation de l'interaction protéine/ligand. La mise place d'une étude AFM par DFS (*Dynamic Force Spectroscopy*) des différents systèmes biochimiques réalisés et de leur intégration avec le modèle de Bell-Evans [77,78,126] nous permettra d'obtenir des informations fondamentales du paysage énergétique d'une protéine (enthalpie libre de réaction, constante de dissociation, distance de transition). Ces informations énergétiques seront couplés à de l'imagerie Haute Résolution de la protéine pour observer en « direct » ces changements structurels par variation des paramètres du proche environnement (pH, température, présence d'analytes, ...). Ces études fondamentales par AFM permettront une compréhension plus ultime des mécanismes mis en œuvre lors d'interaction protéine/ligand dans les réactions enzymatiques, ou lors d'interactions spécifiques anticorps/antigènes à la base de la reconnaissance de pathologies mais sur des quantités moléculaires, y compris en solutions turbides peu filtrées. L'apport de la sonde AFM à capteur intégré piézoélectrique sera aussi avantageux pour étudier sous obscurité totale des systèmes biologiques photosensibles (par exemple les mécanismes de photosynthèse).

III.3 Axe de Recherche 2 : Imagerie Haute Vitesse et nanomanipulateur à sonde locale Haute Fréquence pour l'environnement biologique

Mes encadrements pour ces travaux préliminaires : *Juan Camilo Acosta Meija (doctorant, ISIR-UPMC), Christophe Lubin (technicien, CEA), François Thoyer (technicien, CEA), Carlos Caldas (stagiaire Master/ 4^{ème} année ingénieur, ESIEE)*

Dans cet Axe de Recherche, les aspects Robotique et nanomanipulation, et imagerie AFM Haute Vitesse seront explorés avec la mise au point d'un nouveau type de plateforme à sonde locale à capteur intégré de micro- et nano- manipulation. A terme cette plateforme sera tournée vers les besoins spécifiques du monde biologique.

Les problématiques visées par un tel dispositif sont le suivi « temps réel » de la dynamique de la cellule jusqu'à l'échelle de la protéine, tout en permettant d'interagir sur ces objets pour les analyser par spectroscopie de force, les déplacer dans des zones d'analyse ou les assembler pour créer de nouvelles fonctionnalités à partir de briques du vivant.

Récemment, un intérêt croissant est né pour passer de sondes locales micrométriques à des sondes nanométriques pour augmenter les taux d'acquisition des données, améliorer la résolution de détection en force et ouvrir la voie à des caractérisations à très haute vitesse. Certaines de ces problématiques de vitesse ont été partiellement résolues avec l'arrivée d'un certain nombre de prototypes de microscopes AFM « Ultra-rapides » (*High Speed AFM*) [34,35,40,127,128]. Des taux d'acquisition de l'ordre de la centaine de millisecondes par image ont pu être atteints permettant de répondre à certaines attentes des biologistes pour suivre la dynamique temporelle du mouvement des protéines [129–131]. Bien que la performance soit réalisée sur une image présentant peu de pixels (128x128 pixels) et sur de faibles excursions du scanner (image inférieure au micromètre carré), le bond technologique démontre la faisabilité par de nouveaux protocoles d'asservissements dynamiques (pour les sondes locales), par l'optimisation de la géométrie du scanner et par l'utilisation de sondes oscillant au mégaHertz. Néanmoins, ces techniques rapides d'imagerie AFM nécessitent l'utilisation de microlevier AFM plus petit que la dizaine de microns pour conserver une haute sensibilité de détection en force avec de hautes fréquences de fonctionnement de l'ordre du megaHertz ou plus. Or, la détection optique conventionnelle par faisceau laser pour détecter le mouvement du microlevier AFM [43] arrive aujourd'hui aux limites de la diffraction pour pouvoir implémenter des sondes dont les dimensions ne sont de l'ordre que de quelques longueurs d'onde. De nouvelles méthodes de détection du mouvement de la sonde AFM ou même de nouveaux types de sondes AFM doivent donc être mises en œuvre et optimisées pour la prochaine génération d'instruments à sonde locale.

Un autre cas où la détection optique conventionnelle devient problématique concerne l'utilisation de sondes AFM en tant que robots de micro- et nano-manipulation. En effet, la pointe d'une sonde AFM a déjà été utilisée en tant que « nano-outil » polyvalent, grâce à sa précision de mouvement et de repositionnement sub-nanométrique appliquée à la lithographie, à l'assemblage de nano-objets voir d'atomes [45,46,103] mais aussi pour d'autres fonctions de manipulations, extraction, perforation, etc ... Ainsi, ces nouveaux « nano-outils » dérivant de l'AFM adressent aujourd'hui de nouveaux enjeux pour la robotique pour manipuler la matière à l'échelle nanométrique dans divers environnements, de l'Ultra Vide jusqu'à la solution biologique. La nécessité de combiner plusieurs de ces nano-outils avec des fonctions différentes dans un même environnement sur un même objet oblige à la mise en œuvre de nouvelles sondes AFM, écartant les verrous d'implémentation de la détection optique.

Cet Axe de Recherche vise donc à répondre à ces attentes en proposant des voies d'études utilisant les capteurs intégrés se basant sur les travaux présentés dans mon bilan scientifique. Cette exploration a déjà été amorcée par un travail de thèse soutenue (Juan Camilo Acosta Meija [116]) que j'ai co-encadré avec le Pr. Stéphane Régnier (ISIR de Jussieu, UPMC, Paris VI). L'utilisation de sondes locales piézoélectriques à basse fréquence (tuning fork) et haute fréquence (monolithe) à des fins d'imagerie et de nanomanipulation a déjà été validée à l'air et en environnement Ultra vide. La Figure 48 montre une vue de principe du système mis en œuvre avec quelques premiers résultats de faisabilité de nanomanipulation et d'imagerie rapide AFM obtenue avec des sondes locales AFM piézoélectriques Haute Fréquence inédites (Figure 49) à l'air sur des nanobilles d'or. Cette approche innovante représente déjà un bénéfice important par rapport aux systèmes AFM standards à détection optique par laser en limitant les risques habituels d'artefacts, notamment liés aux problèmes de bruits interférentiels optiques [44] ou de réglage délicat du laser en milieu liquide, avec une vitesse d'acquisition accrue. De plus, la constante de raideur importante des sondes piézoélectriques évitent le problème du saut au contact des cantilevers AFM souples, par les forces attractives de surface.

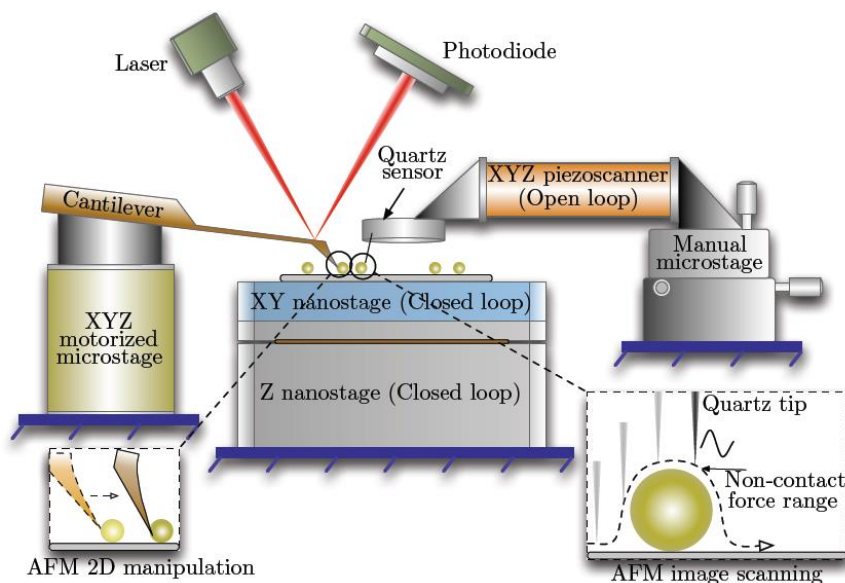


Figure 48 - Vue schématique du système robotique de nanomanipulation et d'imagerie AFM à capteur piézoélectrique Haute Fréquence, développé en collaboration avec l'ISIR/UPMC et notre équipe CEA SPCSI.

Une autre étape importante de ce projet sera donc l'optimisation du scanner de balayage pour explorer des gammes spatiales compatibles à l'échelle de la cellule. L'utilisation de réseaux de sondes pourrait être aussi une alternative intéressante pour gagner en couverture spatiale tout en pouvant utiliser des scanners avec des dynamiques spatiales plus modestes, tout en ne lézant pas le temps d'acquisition. Le bénéfice de cette dernière approche a déjà été validé dans mon bilan scientifique

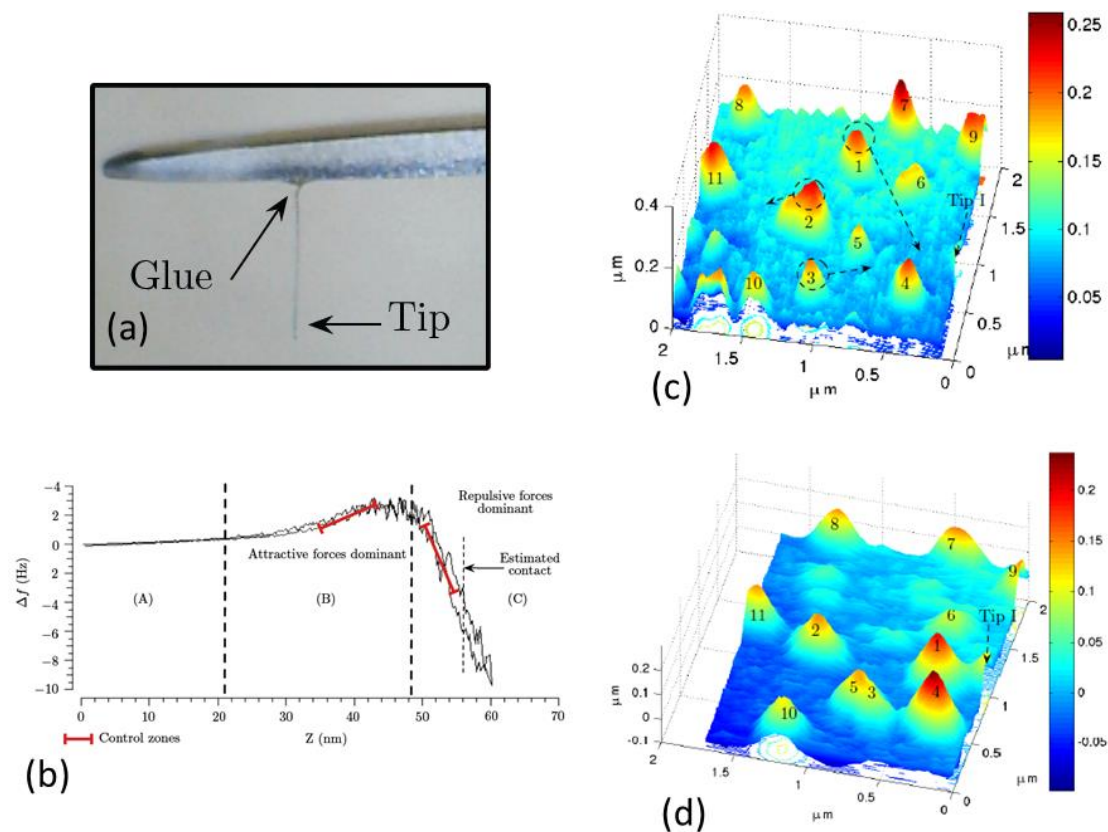


Figure 49 - a) Sonde piézoélectrique Haute Fréquence (3.57 MHz) terminée par une pointe en tungstène d'apex nanométrique (rayon d'apex de l'ordre de 50 nm). b) Spectroscopie approche/retrait en Δf obtenue avec la sonde piézoélectrique en 4 milliseconde: (A) zone sans interaction, (B) zone où les interactions attractives sont dominantes, (C) zone où les interactions répulsives sont dominantes. c) et d) : résultats de nanomanipulation rapide de nanobilles d'or (diamètre de 80 nm) faiblement adsorbées sur une surface de silicium. c) Image AFM avant nanomanipulation, d) Image AFM de la même zone après nanomanipulation des billes d'or. Temps d'acquisition d'une image = 79 s.

Le passage à l'exploration du monde biologique nécessitera plusieurs optimisations de la sonde à capteur intégré. Les optimisations géométriques pour conserver la plus grande sensibilité de détection (i.e. en gardant le facteur de qualité le plus élevé possible, une constante de raideur faible, et une haute fréquence d'oscillation) passeront nécessairement par un travail de modélisation numérique des effets hydrodynamiques de l'environnement liquide sur les modes d'oscillation de la sonde [132]. Le passage par la salle blanche de microfabrication sera ensuite déterminant pour concrétiser ces modèles. L'optimisation du fonctionnement de la sonde à capteur intégré passera aussi par l'étape cruciale de passivation biocompatible des électrodes pour éviter tout problème de corrosion ou de fuite de courant. Nous avons déjà pu produire certains résultats de faisabilité dans ce sens, illustrés sur la Figure 50, en utilisant des protocoles de passivation organique, mis au point dans notre équipe [122].

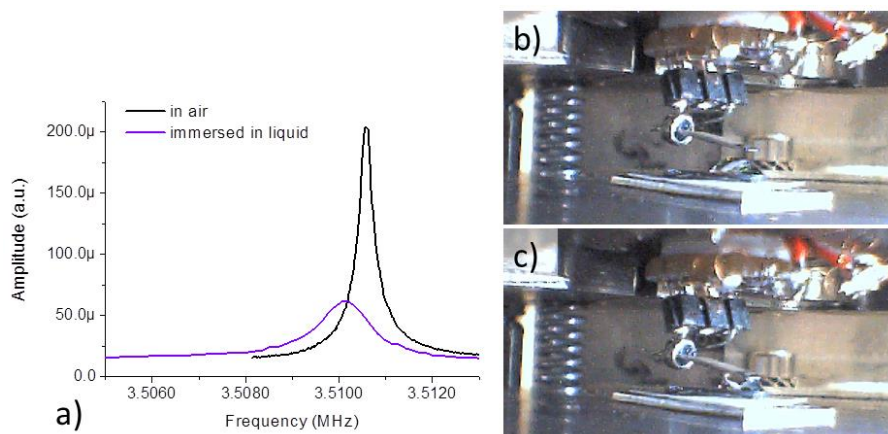


Figure 50 - Premiers résultats de preuve de faisabilité de l'utilisation de sondes piézoélectriques à Haute Fréquences (3.51 MHz) en milieu liquide (solution tampon PBS) en utilisant des protocoles de passivation organiques des électrodes déjà mis au point dans notre équipe [122]. a) Courbes de résonance b) avant immersion et c) après immersion de la sonde.

Enfin, un dernier point important qui sera abordé dans cet Axe de Recherche concernera la chimie de fonctionnalisation à appliquer pour doter la nanosonde d'une spécificité d'adressage qui sera déterminante pour les applications touchant la spectroscopie de force rapide, ou la nanomanipulation d'objets biologiques ciblés. Pour ce dernier point, notre équipe possède déjà un savoir-faire solide en ce qui concerne la fonctionnalisation chimique des biopuces [133] et la fonctionnalisation biochimique de sondes locales AFM [122].

Un sujet de thèse 2012 en co-financement ISIR-UPMC et CEA a ainsi pu être proposé pour réaliser un certain nombre d'objectifs de cet Axe de Recherche. L'obtention de la présente HDR me permettrait d'être directeur de thèse pour ce sujet.

III.4 Axe de Recherche 3 : Biocapteurs polymériques, interrogation sans fil et microfluidique

Mes encadrements pour ces travaux préliminaires : *Ali Makky (post-doctorant, CEA), Christophe Lubin (technicien, CEA), François Thoyer (technicien CEA), Vincent Martinez (stagiaire Master2/ingénieur, UTT), Audrey Boismoreau (stagiaire Master), Alexandre Garcia (doctorant, CEA)*

La démarche proposée dans cet Axe de Recherche est de proposer de nouvelles voies technologiques de microfabrication de biocapteurs en « tout polymère », se basant sur des méthodes de fabrication totalement orthogonales à la technologie silicium conventionnelle en salle blanche.

Actuellement, il existe déjà des appareils commerciaux de laboratoire de détection à des fins de diagnostic médical, ou pour l'analyse d'agents pathogènes [134]. Ces appareils utilisent soit des procédés impliquant des molécules marquées (par fluorescence, par enzyme, par radiomarquage,...) soit des procédés sans marquage comme les instruments à résonance plasmon SPR (Biacore, Biorad, Horiba, Corning) ou des résonateurs de type QCM (Q-Sense) ou bien SAW (SANDIA National Laboratories, SAW Instruments GmbH). Ces instruments représentent aujourd'hui la référence en terme de performance pour opérer à la fois de la détection génomique, protéinique et bactériologique. Néanmoins, cette instrumentation requiert un cadre d'utilisation contrôlé et stable au sein d'un laboratoire d'analyse. Une utilisation « sur le terrain » paraît difficilement envisageable.

Le premier objectif sera de parvenir à un nouveau type de biocapteur en polymère à sensibilité moléculaire et à capteur intégré pour l'analyse d'agents pathogènes par ciblage biochimique spécifique. La portabilité, la robustesse et la versatilité de ce nouveau biocapteur permettront une utilisation « sur le terrain » pour des applications touchant à la détection spécifique d'agents pathogènes. La possibilité de mise en réseau de plusieurs de ces capteurs pour le multiplexage de différentes cibles biologiques [80] sera aussi un atout de ces futurs dispositifs.

Dans un premier temps, nous proposons un projet de démarrage, récemment accepté pour financement 2012 au LABEX NanoSaclay, sur l'utilisation innovante d'un capteur intégré piézorésistif portable sous forme de microleviers (ou cantilever AFM) en polymère biofonctionnalisé. Le microlevier sera biofonctionnalisé de façon spécifique pour détecter une entité biologique précise (e.g. bactéries, antigènes, oligonucléotides, ...). Ce projet est la première brique de validation du capteur biologique. Notre équipe CEA SPCSI a récemment développée une gamme de procédés chimiques novateurs d'élaboration de microélectrodes sur polymères [112,135] qui serviront de base à l'élaboration de ces nouveaux capteurs. Une thèse a été dernièrement soutenue dans notre groupe par Alexandre Garcia [136] concernant ces nouvelles voies de métallisation des polymères souples. Un de ces procédés est illustré sur la Figure 51.

Le capteur sera interfacé, dans un deuxième temps, à une antenne passive sur la même puce en polymère, s'inspirant de nos premiers tests de fabrication en Figure 51c), pour une interrogation à distance, en perspective d'une utilisation « sur le terrain » avec différents scénarii d'utilisation envisageables (détecteurs individuels, détecteurs autonomes, détecteurs pour zones à risques,...). L'absence de source d'énergie embarquée sur cette combinaison « biocapteur + antenne passive » permettra une veille continue sur de longues périodes en environnements externes. A notre connaissance, par rapport à l'état de l'art international, il n'existe pas encore de biocapteur utilisant un tel agencement pour une utilisation touchant à la détection d'agents pathogènes ou au diagnostic médical.

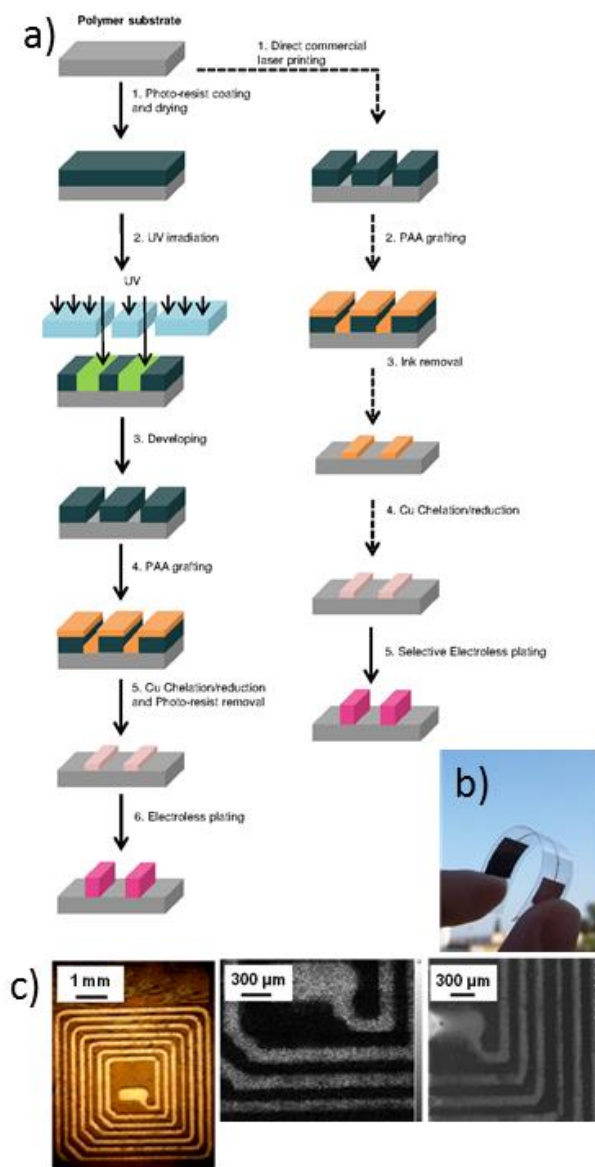


Figure 51 - a) Procédé innovant permettant le dépôt contrôlé d'électrodes sur polymères, mis au point dans notre équipe CEA SPCSI [112,135]. b) Exemple d'électrode en cuivre sur support souple PET. c) Elaboration d'une antenne passive d'interrogation à distance sur polymère souple par ce procédé (Image microscope optique, Cartographie Cu2p XPS et image en microscopie électronique du détail des électrodes en cuivre). Ces méthodes de fabrication seront utilisées dans l'Axe de Recherche.

Enfin, les possibilités de structuration chimique, que nous sommes en train de mettre en place et de breveter [121,137], permettront d'adjoindre de la microfluidique sur la même puce en polymère. L'acheminement des analytes vers le capteur sera ainsi optimisé et permettra notamment une plus grande sensibilité et spécificité de détection. Le nouveau savoir-acquis dans la réalisation de ces nouveaux biocapteurs en polymère avec canaux de microfluidique serviront de base pour des systèmes *lab-on-chip*, s'appuyant toujours sur cette nouvelle technologie « tout polymère ». Certains résultats préliminaires obtenus dans notre équipe confirment certaines voies technologiques à utiliser pour la réalisation de ces nouveaux microsystèmes en polymère (Figure 52). J'encadre actuellement deux stagiaires en Master2 et Master travaillant sur l'optimisation de ces procédés. Des questions plus fondamentales concernent le rôle des interfaces électrode/polymère sur le bruit de détection, et la chimie à mettre en œuvre pour bio-fonctionnaliser le polymère afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de détection.

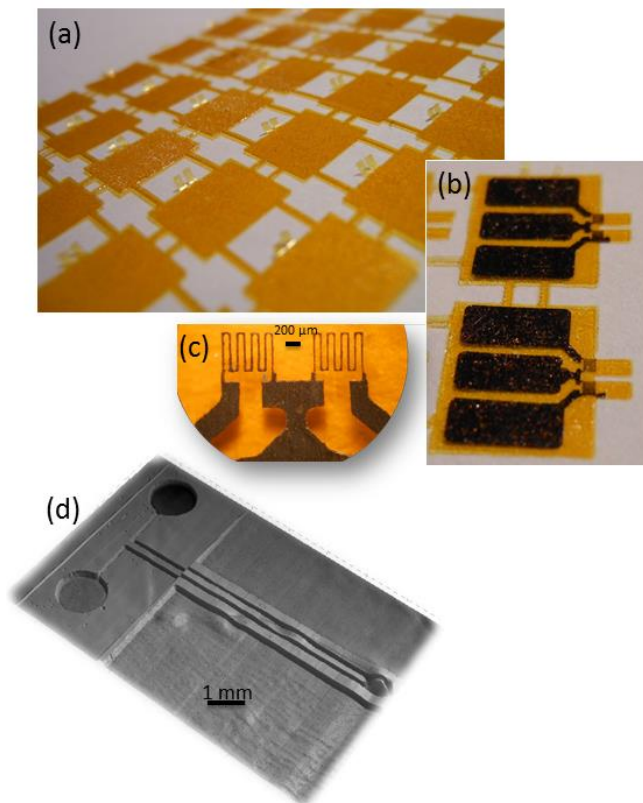


Figure 52 - Premiers résultats de preuve de faisabilité de structuration chimique de a) matrices de capteurs polymérique dotés de b) macroélectrodes et de c) microélectrodes. d) Structuration d'un microcanal entre deux réservoirs sur polymère. (CEA SPCSI)

L'aspect multidisciplinaire de ces voies de Recherche est encore une fois très marqué. En parallèle de l'aspect structuration des biocapteurs et de l'instrumentation dédiée à développer pour l'interrogation à distance sans source d'énergie embarquée sur le biocapteur, la poursuite de collaborations avec les équipes de biologistes sera essentielle concernant les aspects fondamentaux des cibles biologiques et la maîtrise de leurs interactions spécifiques et non-spécifiques aux interfaces du biocapteur. Cet aspect biologique est indissociable de la physico-chimie des interfaces et du procédé de transduction choisi pour optimiser la sélectivité et la sensibilité de détection du futur biocapteur.



energie atomique • énergies alternatives



IV) Bibliographie

- [1] F.J. Giessibl, Advances in atomic force microscopy, *Review of Modern Physics*. 75 (2003) 949-983.
- [2] S. Hembacher, F.J. Giessibl, J. Mannhart, Force microscopy with light-atom probes, *Science*. 305 (2004) 380-3.
- [3] M. Ternes, C.P. Lutz, C.F. Hirjibehedin, F.J. Giessibl, A.J. Heinrich, The Force Needed to Move an Atom on a Surface, *Science*. 319 (2008) 1066.
- [4] H.J. Hug, M. a Lantz, A. Abdurixit, P.J. van Schendel, R. Hoffmann, P. Kappenberger, et al., Subatomic features in atomic force microscopy images: Technical Comment, *Science*. 291 (2001) 2509.
- [5] C. Gerber, H.P. Lang, How the doors to the nanoworld were opened., *Nature Nanotechnology*. 1 (2006) 3-5.
- [6] P. Parot, Y.F. Dufrêne, P. Hinterdorfer, C. le Grimmellec, D. Navajas, J.-L. Pellequer, et al., Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine, *Journal of Molecular Recognition*. 20 (2007) 418-431.
- [7] A. Engel, Biological applications of scanning probe microscopes, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 20 (1991) 79-108.
- [8] D.J. Müller, Y.F. Dufrêne, Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology, *Nature Nanotechnology*. 3 (2008) 261-269.
- [9] V.N. Uversky, A.V. Kabanov, Y.L. Lyubchenko, Nanotools for megaproblems: probing protein misfolding diseases using nanomedicine modus operandi., *Journal of Proteome Research*. 5 (2006) 2505-22.
- [10] W.R. Sanhai, J.H. Sakamoto, R. Canady, M. Ferrari, Seven challenges for nanomedicine., *Nature Nanotechnology*. 3 (2008) 242-4.
- [11] L. Hood, J.R. Heath, M.E. Phelps, B. Lin, Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine, *Science*. 306 (2004) 640-3.
- [12] D.A. Lavan, D.M. Lynn, R. Langer, Moving smaller in drug discovery and delivery, *Nature Reviews*. 1 (2002) 77-84.
- [13] A. Raab, W. Han, D. Badt, S.J. Smith-gill, S.M. Lindsay, H. Schindler, et al., Antibody recognition imaging by force microscopy, *Nature Biotechnology*. 17 (1999) 902-905.
- [14] C. Stroh, H. Wang, R. Bash, B. Ashcroft, J. Nelson, H. Gruber, et al., Single-molecule recognition imaging microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (2004) 12503-12507.

- [15] F. Kienberger, C.M. Stroh, A. Ebner, M. Geretschla, A.S.M. Kamruzzahan, S.J. Smith-gill, et al., Simultaneous Topography and Recognition Imaging Using Force Microscopy, *Biophysical Journal*. 87 (2004) 1981-1990.
- [16] P. Hinterdorfer, Y.F. Dufrêne, Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy, *Nature Methods*. 3 (2006) 347-355.
- [17] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H.J. Gruber, K. Schilcher, H. Schindler, Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (1996) 3477-3481.
- [18] R.H. Pires, M.J. Saraiva, A.M. Damas, M.S.Z. Kellermayer, Structure and assembly – disassembly properties of wild-type transthyretin amyloid protofibrils observed with atomic force microscopy, *Journal of Molecular Recognition*. 24 (2011) 467-476.
- [19] Y.F. Dufrêne, Using nanotechniques to explore microbial surfaces., *Nature Reviews. Microbiology*. 2 (2004) 451-60.
- [20] I. Liashkovich, W. Hafezi, J.M. Kühn, H. Oberleithner, V. Shahin, Nuclear delivery mechanism of herpes simplex virus type 1 genome γ , *Journal of Molecular Recognition*. 24 (2011) 414-421.
- [21] C.A. Bippes, D.J. Muller, High-resolution atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins, *Reports on Progress in Physics*. 74 (2011) 086601.
- [22] D.C.G. Klein, C.M. Stroh, H. Jensenius, M.H. van Es, A.S.M. Kamruzzahan, A. Stamouli, et al., Covalent Immobilization of Single Proteins on Mica for Molecular Recognition Force Microscopy, *ChemPhysChem*. 4 (2003) 1367-1371.
- [23] A. Makky, T. Berthelot, C. Feraudet-tarisse, H. Volland, P. Viel, J. Polesel-maris, Substructures high resolution imaging of individual IgG and IgM antibodies with piezoelectric tuning fork atomic force microscopy, *Sensors & Actuators: B Chemical*. 162 (2012) 269-277.
- [24] A. San Paulo, R. Garcia, High-Resolution Imaging of Antibodies by Tapping-Mode Atomic Force Microscopy : Attractive and Repulsive Tip-Sample Interaction Regimes, *Biophysical Journal*. 78 (2000) 1599-1605.
- [25] M. Stolz, R. Gottardi, R. Raiteri, S. Miot, I. Martin, R. Imer, et al., Early detection of aging cartilage and osteoarthritis in mice and patient samples using atomic force microscopy, *Nature Nanotechnology*. (2009) 1-7.
- [26] T. Ludwig, R. Kirmse, K. Poole, U.S. Schwarz, Probing cellular microenvironments and tissue remodeling by atomic force microscopy, *Pflugers Archiv. European Journal Of Physiology*. 456 (2008) 29-49.

- [27] P.-H. Puech, A. Taubenberger, F. Ulrich, M. Krieg, D.J. Muller, C.-P. Heisenberg, Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy, *Journal of Cell Science*. 118 (2005) 4199-4206.
- [28] F. Ulrich, M. Krieg, E.-maria Schötz, V. Link, I. Castanon, V. Schnabel, et al., Wnt11 Functions in Gastrulation by Controlling Cell Cohesion through Rab5c and E-Cadherin, *Developmental Cell*. 9 (2005) 555-564.
- [29] S. Suresh, J. Spatz, J.P. Mills, A. Micoulet, M. Dao, C.T. Lim, et al., Connections between single-cell biomechanics and human disease states : gastrointestinal cancer and malaria, *Acta Biomaterialia*. 1 (2005) 15-30.
- [30] S.E. Cross, Y.-S. Jin, J. Rao, J.K. Gimzewski, Nanomechanical analysis of cells from cancer patients, *Nature Nanotechnology*. 2 (2007) 780-783.
- [31] C. Brunner, A. Niendorf, J.A. Käs, Passive and active single-cell biomechanics : a new perspective in cancer diagnosis, *Soft Matter*. 5 (2009) 2171-2178.
- [32] P. Hansma, H. Yu, D. Schultz, A. Rodriguez, E.A. Yurtsev, J. Orr, et al., The tissue diagnostic instrument, *Review of Scientific Instruments*. 80 (2009) 054303.
- [33] M.O. Li, H.X. Tang, M.L. Roukes, Ultra-sensitive NEMS-based cantilevers for sensing , scanned probe and very high-frequency applications, *Nature Nanotechnology*. 2 (2007) 114.
- [34] T. Ando, High-speed atomic force microscopy coming of age., *Nanotechnology*. 23 (2012) 062001.
- [35] T. Ando, T. Uchihashi, T. Fukuma, High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes, *Progress in Surface Science*. 83 (2008) 337-437.
- [36] J.P. Howard-Knight, J.K. Hobbs, Video rate atomic force microscopy using low stiffness, low resonant frequency cantilevers, *Applied Physics Letters*. 93 (2008) 104101.
- [37] I. Choi, Y. Kim, J.H. Kim, Y.I. Yang, J. Lee, S. Lee, et al., Fast image scanning method in liquid-AFM without image distortion., *Nanotechnology*. 19 (2008) 445701.
- [38] M.J. Rost, G.J.C.V. Baarle, A.J. Katan, W.M.V. Spengen, P. Schakel, W.A. van Loo, et al., Video-rate scanning probe control challenges : setting the stage for a microscopy revolution, *Asian Journal of Control*. 11 (2009) 110-129.
- [39] A.D.L. Humphris, B. Zhao, D. Catto, J.P. Howard-Knight, P. Kohli, J.K. Hobbs, High speed nanometrology., *Review of Scientific Instruments*. 82 (2011) 043710.
- [40] G.E. Fantner, G. Schitter, J.H. Kindt, T. Ivanov, K. Ivanova, R. Patel, et al., Components for high speed atomic force microscopy, *Ultramicroscopy*. 106 (2006) 881-7.

- [41] Y.K. Yong, S.O.R. Moheimani, I.R. Petersen, High-speed cycloid-scan atomic force microscopy, *Nanotechnology*. 21 (2010) 365503.
- [42] H. Kawakatsu, S. Kawai, D. Saya, M. Nagashio, D. Kobayashi, H. Toshiyoshi, et al., Towards atomic force microscopy up to 100 MHz, *Review of Scientific Instruments*. 73 (2002) 2317.
- [43] G. Meyer, N.M. Amer, Novel optical approach to atomic force microscopy, *Applied Physics Letters*. 53 (1988) 1045-1047.
- [44] Q.-X. Huang, Y.-T. Fei, S. Gonda, I. Misumi, O. Sato, T. Keem, et al., The interference effect in an optical beam deflection detection system of a dynamic mode AFM, *Measurement Science and Technology*. 17 (2006) 1417-1423.
- [45] O. Custance, R. Perez, S. Morita, Atomic force microscopy as a tool for atom manipulation, *Nature Nanotechnology*. 4 (2009) 803-810.
- [46] T. Trevethan, M. Watkins, L.N. Kantorovich, A.L. Shluger, J. Polesel-Maris, S. Gauthier, Modelling atomic scale manipulation with the non-contact atomic force microscope, *Nanotechnology*. 17 (2006) 5866-5874.
- [47] P. Vettiger, J. Brugger, M. Despont, U. Drechsler, U. Dürig, W. Häberle, et al., Ultrahigh density , high-data-rate NEMS-based AFM data storage system, *Microelectronic Engineering*. 46 (1999) 11-17.
- [48] P. Vettiger, G. Cross, M. Despont, U. Drechsler, U. Dürig, B. Gotsmann, et al., The “ Millipede ”— Nanotechnology Entering Data Storage, *IEEE Transactions on Nanotechnology*. 1 (2002) 39-55.
- [49] P. Vettiger, M. Despont, U. Drechsler, U. Dürig, W. Häberle, M.I. Lutwyche, et al., The “ Millipede ”— More than one thousand tips for future AFM data storage, *IBM Journal of Research and Development*. 44 (2000) 323-340.
- [50] T. Sulchek, R.J. Grow, G.G. Yaralioglu, S.C. Minne, C.F. Quate, S.R. Manalis, et al., Parallel atomic force microscopy with optical interferometric detection, *Applied Physics Letters*. 78 (2001) 1787-1789.
- [51] H. Kawakatsu, D. Saya, A. Kato, K. Fukushima, H. Toshiyoshi, Millions of cantilevers for atomic force microscopy, *Review of Scientific Instruments*. 73 (2002) 1188-1192.
- [52] S.C. Minne, J.D. Adams, G. Yaralioglu, S.R. Manalis, A. Atalar, C.F. Quate, Centimeter scale atomic force microscope imaging and lithography, *Applied Physics Letters*. 73 (1998) 1742-1744.
- [53] G. Weder, N. Blondiaux, M. Giazon, N. Matthey, M. Klein, R. Pugin, et al., Use of force spectroscopy to investigate the adhesion of living adherent cells, *Langmuir*. 26 (2010) 8180-6.

- [54] G. Weder, M. Giazzon, J. Polesel-Maris, A. Meister, M. Liley, H. Heinzelmann, Measuring cell adhesion forces as a function of the cell cycle by force spectroscopy, *European Cells and Materials*. 14 (2007) 99.
- [55] R.S. Tuan, G. Boland, R. Tuli, Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, *Arthritis Research and Therapy*. 5 (2003) 32-45.
- [56] M. Tortonese, R.C. Barrett, C.F. Quate, Atomic resolution with an atomic force microscope piezoresistive detection, *Applied Physics Letters*. 62 (1993) 834-836.
- [57] J.A. Harley, T.W. Kenny, High-sensitivity piezoresistive cantilevers under 1000 Å thick, *Applied Physics Letters*. 75 (2000) 289-291.
- [58] J.L. Arlett, J.R. Maloney, B. Gudlewski, M. Muluneh, M.L. Roukes, Self-Sensing Micro- and Nanocantilevers with Attonewton-Scale Force Resolution, *Nano Letters*. 6 (2006) 1000-1006.
- [59] J.A. Harley, T.W. Kenny, 1/f Noise Considerations for the Design and Process Optimization of Piezoresistive Cantilevers, *Journal of Microelectromechanical Systems*. 9 (2000) 226-235.
- [60] C.S. Smith, Piezoresistance Effect in Germanium and Silicon, *Physical Review*. 94 (1954) 42-49.
- [61] S. Dohn, J. Kjelstrup-Hansen, D.N. Madsen, K. Mølhave, P. Bøggild, Multi-walled carbon nanotubes integrated in microcantilevers for application of tensile strain, *Ultramicroscopy*. 105 (2005) 209-214.
- [62] T. Helbling, C. Roman, C. Hierold, Signal-to-noise ratio in carbon nanotube electromechanical piezoresistive sensors., *Nano Letters*. 10 (2010) 3350-4.
- [63] M. Cullinan, M. Culpepper, Carbon nanotubes as piezoresistive microelectromechanical sensors: Theory and experiment, *Physical Review B*. 82 (2010) 115428.
- [64] X. Chen, X. Zheng, J.-kwan Kim, X. Li, D.-W. Lee, Investigation of graphene piezoresistors for use as strain gauge sensors, *Journal of Vacuum Science and Technology B*. 29 (2011) 1-5.
- [65] L. Aeschimann, F. Goericke, J. Polesel-Maris, A. Meister, T. Akiyama, B. Chui, et al., Piezoresistive scanning probe arrays for operation in liquids, *Journal of Physics: Conference Series*. 61 (2007) 6-10.
- [66] J. Polesel-Maris, L. Aeschimann, A. Meister, R. Ischer, E. Bernard, T. Akiyama, et al., Piezoresistive cantilever array for life sciences applications, *Journal of Physics: Conference Series*. 61 (2007) 955-959.
- [67] L. Aeschimann, A. Meister, T. Akiyama, B.W. Chui, P. Niedermann, H. Heinzelmann, et al., Scanning probe arrays for life sciences and nanobiology applications, *Microelectronic Engineering*. 83 (2006) 1698-1701.

- [68] A.J. Breeze, S.A. Carter, G.B. Alers, M.B. Heaney, 1/f Noise Through the Metal–Nonmetal Transition in Percolating Composites, *Applied Physics Letters*. 76 (2000) 592.
- [69] R. Dieme, G. Bosman, T. Nishida, M. Sheplak, Sources of excess noise in silicon piezoresistive microphones a), *Journal of the Acoustical Society of America*. 119 (2006) 2710-2720.
- [70] F.N. Hooge, T.G.M. Kleinpenning, L.K.J. Vandamme, Experimental studies on 1/f noise, *Reports on Progress in Physics*. 44 (1981) 479-532.
- [71] C. Chen, S. Rosenblatt, K.I. Bolotin, W. Kalb, P. Kim, I. Kymissis, et al., Performance of monolayer graphene nanomechanical resonators with electrical readout., *Nature Nanotechnology*. 4 (2009) 861-7.
- [72] F. Schedin, a K. Geim, S.V. Morozov, E.W. Hill, P. Blake, M.I. Katsnelson, et al., Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene., *Nature Materials*. 6 (2007) 652-655.
- [73] P.P. Lehenkari, G.T. Charras, S.A. Nesbitt, M.A. Horton, New technologies in scanning probe microscopy for studying molecular interactions in cells, *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2 (2000) 1-19.
- [74] C. Rotsch, K. Jacobson, M. Radmacher, Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (1999) 921-926.
- [75] G. Weder, M. Giazzon, J. Polesel-Maris, J. Vörös, M. Liley, H. Heinzelmann, Measuring cell adhesion forces as a function of the cell cycle by force spectroscopy, *Journal of Biomechanics*. 41 (2008) S22.
- [76] F. Rico, V.T. Moy, Energy landscape roughness of the streptavidin – biotin interaction, *Journal of Molecular Recognition*. 20 (2007) 495-501.
- [77] J.-M. Teulon, Y. Delcuze, M. Odorico, S.-W.W. Chen, P. Parot, J.-luc Pellequer, Single and multiple bonds in (strept)avidin–biotin interactions, *Journal of Molecular Recognition*. 24 (2011) 490-502.
- [78] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, Energy landscapes of receptor ± ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy, *Nature*. 397 (1999) 50-53.
- [79] C. Santschi, J. Polesel-Maris, H. Heinzelmann, J. Brugger, Scanning probe array for nanoscale imaging , sensing, and modification, in: A. Tseng (Ed.), *Nanofabrication: Fundamentals and Applications*, World Scientific publishing Co. Pte. Ltd., Hackensack, USA, 2008: p. 65.
- [80] H.P. Lang, M. Hegner, C. Gerber, Cantilever array sensors, *Materials Today*. (2005) 30-36.
- [81] T. Akiyama, L. Aeschimann, L.C. Chantada, N.F. de Rooij, H. Heinzelmann, H.P. Herzig, et al., Concept and Demonstration of Individual Probe Actuation in Two-Dimensional Parallel Atomic Force Microscope System, *Japanese Journal of Applied Physics*. 46 (2007) 6458-6462.

- [82] G.E. Fantner, W. Schumann, R.J. Barbero, a Deuschinger, V. Todorov, D.S. Gray, et al., Use of self-actuating and self-sensing cantilevers for imaging biological samples in fluid., *Nanotechnology*. 20 (2009) 434003.
- [83] M. Alvarez, J. Tamayo, Optical sequential readout of microcantilever arrays for biological detection, *Sensors And Actuators B*. 106 (2005) 687-690.
- [84] M. Yue, H. Lin, D.E. Dedrick, S. Satyanarayana, A. Majumdar, A.S. Bedekar, et al., A 2-D Microcantilever Array for Multiplexed Biomolecular Analysis, *Journal of Microelectromechanical Systems*. 13 (2004) 290-299.
- [85] M. Helm, J.J. Servant, F. Saurenbach, R. Berger, Read-out of micromechanical cantilever sensors by phase shifting interferometry, *Applied Physics Letters*. 87 (2005) 064101.
- [86] M. Favre, J. Polesel-Maris, T. Overstolz, P. Niedermann, S. Dasen, G. Gruener, et al., Parallel AFM imaging and force spectroscopy using two-dimensional probe arrays for applications in cell biology., *Journal of Molecular Recognition*. 24 (2011) 446-52.
- [87] A. Meister, G. Gruener, J. Polesel-Maris, Parallel cantilever deflection measurement, U.S. Patent EP2336789A1, 2011.
- [88] M.B. Sinclair, M.P. de Boer, A.D. Corwin, Long-working-distance incoherent-light interference microscope, *Applied Optics*. 44 (2005) 7714-7721.
- [89] H. Verschueren, Interference reflection microscopy in cell biology: methodology and applications, *Journal of Cell Science*. 75 (1985) 279-301.
- [90] A. Meister, G. Weder, M. Favre, M. Giazon, T. Overstolz, M. Liley, et al., Parallel AFM Force Spectroscopy on Melanoma Cells for Cancer Research, Poster PATLiSc RTD2010, [Http://www.nano-tera.ch/pdf/posters2011/0-0-15-0.png](http://www.nano-tera.ch/pdf/posters2011/0-0-15-0.png). (2011).
- [91] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth, Pflügers Archiv Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 391 (1981) 85-100.
- [92] T.K. Chowdhury, Fabrication of extremely fine glass micropipette electrodes, *Journal of Physics E: Scientific Instruments*. 2 (1969) 1087.
- [93] A. Meister, J. Polesel-Maris, M. Gabi, T. Zambelli, J. Vörös, Probe arrangement for electrophysiological analysis in an AFM, U.S. Patent US2008302960A1, 2008.
- [94] A. Meister, J. Polesel-Maris, M. Gabi, T. Zambelli, J. Vörös, Probe arrangement for electrophysiological analysis in an AFM, U.S. Patent EP1990626A1, 2008.
- [95] A. Meister, J. Polesel-Maris, P. Niedermann, J. Przybylska, P. Studer, M. Gabi, et al., Nanoscale dispensing in liquid environment of streptavidin on a biotin-functionalized surface using hollow atomic force microscopy probes, *Microelectronic Engineering*. 86 (2009) 1481-1484.

- [96] H. Heinzelmann, A. Meister, P. Niedermann, J. Bitterli, J. Polesel-Maris, M. Liley, et al., NADIS : A Novel AFM-based Tool for Dispensing Fluids into Single Cells, Microscopy and Analysis. 23 (2009) 11-13.
- [97] A. Meister, M. Gabi, P. Behr, P. Studer, J. Vörös, P. Niedermann, et al., FluidFM: combining atomic force microscopy and nanofluidics in a universal liquid delivery system for single cell applications and beyond., Nano Letters. 9 (2009) 2501-7.
- [98] P. Dörig, P. Stiefel, P. Behr, E. Sarajlic, D. Bijl, M. Gabi, et al., Force-controlled spatial manipulation of viable mammalian cells and micro-organisms by means of FluidFM technology, Applied Physics Letters. 97 (2010) 023701.
- [99] J. Polesel-Maris, C. Lubin, F. Thoyer, J. Cousty, Combined dynamic scanning tunneling microscopy and frequency modulation atomic force microscopy investigations on polythiophene chains on graphite with a tuning fork sensor, Journal of Applied Physics. 109 (2011) 074320.
- [100] J. Polesel-Maris, H. Guo, T. Zambelli, S. Gauthier, Mapping van der Waals forces with frequency modulation dynamic force microscopy, Nanotechnology. 17 (2006) 4204-11.
- [101] R. Nishi, I. Houda, K. Kitano, Y. Sugawara, S. Morita, A noncontact atomic force microscope in air using a quartz resonator and the FM detection method, Applied Physics A. 72 (2001) S93-S95.
- [102] J. Hayton, J. Polesel-Maris, R. Demadrille, M. Brun, F. Thoyer, C. Lubin, et al., Atomic force microscopy imaging using a tip-on-chip: opening the door to integrated near field nanotools, The Review of Scientific Instruments. 81 (2010) 093707.
- [103] T. Trevethan, M. Watkins, A.L. Shluger, J. Polesel-Maris, S. Gauthier, L.N. Kantorovich, A comparison of dynamic atomic force microscope set-ups for performing atomic scale manipulation experiments, Nanotechnology. 18 (2007) 345503.
- [104] J. Welker, F. de Faria Elsner, F.J. Giessibl, Application of the equipartition theorem to the thermal excitation of quartz tuning forks, Applied Physics Letters. 99 (2011) 084102.
- [105] E. Wutscher, F.J. Giessibl, Atomic force microscopy at ambient and liquid conditions with stiff sensors and small amplitudes Atomic force microscopy at ambient and liquid conditions with stiff sensors and small amplitudes, Review of Scientific Instruments. 82 (2011) 093703.
- [106] F.J. Giessibl, F. Pielmeier, T. Eguchi, T. An, Y. Hasegawa, Comparison of force sensors for atomic force microscopy based on quartz tuning forks and length-extensional resonators, Physical Review B. 125409 (2011) 1-15.
- [107] F.J. Giessibl, H. Bielefeldt, S. Hembacher, J. Mannhart, Calculation of the optimal imaging parameters for frequency modulation atomic force microscopy, Applied Surface Science. 140 (1999) 352-357.

- [108] T.R. Albrecht, P. Grütter, D. Horne, D. Rugar, Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity, *Journal of Applied Physics*. 69 (1991) 668-673.
- [109] J. Polesel-maris, M.A. Venegas de la Cerda, D. Martrou, S. Gauthier, Noise in frequency-modulation dynamic force microscopy, *Physical Review B*. 79 (2009) 235401.
- [110] K. Kobayashi, H. Yamada, K. Matsushige, Frequency noise in frequency modulation atomic force microscopy., *Review of Scientific Instruments*. 80 (2009) 043708.
- [111] Y. Sugawara, N. Kobayashi, M. Kawakami, Y.J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, Elimination of instabilities in phase shift curves in phase-modulation atomic force microscopy in constant-amplitude mode, *Applied Physics Express*. 90 (2007) 194104.
- [112] A. Garcia, T. Berthelot, P. Viel, J. Polesel-Maris, S. Palacin, Microscopic study of a ligand induced electroless plating process onto polymers, *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2 (2010) 3043–3051.
- [113] J. Polesel-Maris, Electronic control and amplification device for a piezoelectric local probe for measuring force beneath a particle beam, U.S. Patent WO2011092225, FR2955938, 2011.
- [114] J.C. Acosta, G. Hwang, J. Polesel-Maris, S. Régnier, A tuning fork based wide range mechanical characterization tool with nanorobotic manipulators inside a scanning electron microscope., *The Review of Scientific Instruments*. 82 (2011) 035116.
- [115] J.C. Acosta, G. Hwang, F. Thoyer, J. Polesel-Maris, S. Régnier, Tuning Fork based in situ SEM nanorobotic manipulation system for Wide Range mechanical characterization of ultra flexible nanostructures, *IEEE International Conference on Intelligent Robots and Systems*. (2010) 5780.
- [116] J.C. Acosta Mejia, Atomic Force Microscopy Based Micro/Nanomanipulation, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Jussieu, France, 2011.
- [117] H. Guo, D. Martrou, T. Zambelli, J. Polesel-Maris, A. Piednoir, E. Dujardin, et al., Nanostenciling for fabrication and interconnection of nanopatterns and microelectrodes, *Applied Physics Letters*. 90 (2007) 093113.
- [118] B. Grévin, Le Masque et la Pointe, LA FEUILLE ROUGE, CEA-INAC, http://inac.cea.fr/Images/News/1047/FR_574_02.pdf. (2011) 574.
- [119] I. Casuso, F. Rico, S. Scheuring, Biological AFM : where we come from – where we are – where we may go, *Journal of Molecular Catalysis*. 24 (2011) 406-413.
- [120] J. Polesel-Maris, T. Berthelot, P. Viel, Sonde de Microscope à force atomique, son procédé de préparation et ses utilisations, U.S. Patent déposé FR10/61038, 2010.

- [121] J. Polesel-Marais, T. Berthelot, Procédé de fabrication d'un Biocapteur, U.S. Patent déposé FR11/00521, 2011.
- [122] J. Polesel-marais, J. Legrand, T. Berthelot, A. Garcia, P. Viel, A. Makky, et al., Force spectroscopy by dynamic atomic force microscopy on bovine serum albumin proteins changing the tip hydrophobicity, with piezoelectric tuning fork self-sensing scanning probe, *Sensors & Actuators: B. Chemical*. 161 (2012) 775-783.
- [123] A.J. Katan, M.H. van Es, T.H. Oosterkamp, Quantitative force versus distance measurements in amplitude modulation AFM: a novel force inversion technique., *Nanotechnology*. 20 (2009) 165703.
- [124] J.E. Sader, S.P. Jarvis, Accurate formulas for interaction force and energy in frequency modulation force spectroscopy, *Applied Physics Letters*. 84 (2004) 1801.
- [125] E.J. Wiersma, C. Collins, S. Fazel, M.J. Shulman, Structural and Functional Analysis of J Chain-Deficient IgM, *Journal of Immunology*. 160 (1998) 5979-5989.
- [126] M. Odorico, J. Teulon, O. Berthoumieu, S.W. Chen, P. Parot, J. Pellequer, An integrated methodology for data processing in dynamic force spectroscopy of ligand – receptor binding, *Ultramicroscopy*. 107 (2007) 887-894.
- [127] G.E. Fantner, P. Hegarty, J.H. Kindt, G. Schitter, G. a. G. Cidade, P.K. Hansma, Data acquisition system for high speed atomic force microscopy, *Review of Scientific Instruments*. 76 (2005) 026118.
- [128] A.D.L. Humphris, M.J. Miles, J.K. Hobbs, A mechanical microscope: High-speed atomic force microscopy, *Applied Physics Letters*. 86 (2005) 034106.
- [129] T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita, et al., High-Speed Atomic Force Microscopy for Studying the Dynamic Behavior of Protein Molecules at Work, *Japanese Journal of Applied Physics*. 45 (2006) 1897-1903.
- [130] T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito, A. Toda, A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (2001) 12468-72.
- [131] T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, D. Yamamoto, A. Miyagi, M. Taniguchi, et al., High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes, *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*. 456 (2008) 211-25.
- [132] A.-S. Rollier, Technologies microsystèmes avancées pour le fonctionnement de dispositifs en milieu liquide et les applications nanométriques, Université des Sciences et Technologie de Lille, France, 2006.

-
- [133] T. Berthelot, A. Garcia, X.T. Le, J. El Morsli, P. Jégou, S. Palacin, et al., “Versatile toolset” for DNA or protein immobilization: Toward a single-step chemistry, *Applied Surface Science*. 257 (2011) 3538-3546.
- [134] J.L. Arlett, E.B. Myers, M.L. Roukes, Comparative advantages of mechanical biosensors., *Nature Nanotechnology*. 6 (2011) 203-15.
- [135] A. Garcia, J. Polesel-Maris, P. Viel, S. Palacin, T. Berthelot, Localized Ligand Induced Electroless Plating (LIEP) Process for the Fabrication of Copper Patterns Onto Flexible Polymer Substrates, *Advanced Functional Materials*. 21 (2011) 2096-2102.
- [136] A. Garcia, Métallisation anélectrolytique des polymères induite par des ligands, ED447 - Ecole Doctorale de l’Ecole Polytechnique - Palaiseau, France, 2011.
- [137] J. Polesel-Maris, Dispositif de projection homothétique d’un motif à la surface d’un échantillon, procédé de lithographie utilisant un tel dispositif, U.S. Patent déposé FR10/58972, 2010.

V) Publications significatives fournies

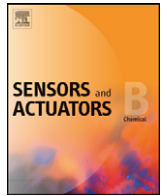
_ A. Makky, Th. Berthelot, C. Feraudet-Tarisse, H. Volland, P. Viel, **J. Polesel-Maris**, "Substructures High Resolution Imaging of Individual IgG and IgM Antibodies with Piezoelectric Tuning Fork Atomic Force Microscopy", *Sensors and Actuators B: Chemical* 162(1), 269-277 (2012), doi:10.1016/j.snb.2011.12.077

_ **J. Polesel-Maris**, J. Legrand, Th. Berthelot, A. Garcia, P. Viel, A. Makky, S. Palacin, "Force Spectroscopy by Dynamic Atomic Force Microscopy on Bovine Serum Albumin proteins changing the tip hydrophobicity, with piezoelectric tuning fork self-sensing scanning probe", *Sensors and Actuators B: Chemical* 161(1), 775-783 (2012), doi:10.1016/j.snb.2011.11.032

_ **J. Polesel-Maris**, C. Lubin, F. Thoyer, J. Cousty, "Combined dynamic STM and FM-AFM investigations on polythiophene chains on graphite with a tuning fork sensor", *Journal of Applied Physics* 109, 074320 (2011), doi:10.1063/1.3556437

_ J. C. Acosta, G. Hwang, **J. Polesel-Maris**, S. Régnier, "A tuning fork based wide range mechanical characterization tool with nanorobotic manipulators inside a scanning electron microscope", *Review of Scientific Instruments* 82, 035116 (2011), doi:10.1063/1.3541776

_ A. Meister, M. Gabi, P. Behr, P. Studer, J. Vörös, P. Niedermann, J. Przybylska, **J. Polesel-Maris**, M. Liley, H. Heinzlmann, T. Zambelli, "FluidFM: combining atomic force microscopy and nanofluidics in a universal liquid delivery system for single cell applications and beyond", *Nano Letters* 9(6), 2501 (2009), doi:10.1021/nl901384x



Substructures high resolution imaging of individual IgG and IgM antibodies with piezoelectric tuning fork atomic force microscopy

Ali Makky^a, Thomas Berthelot^a, Cécile Feraudet-Tarisse^b, Hervé Volland^b,
Pascal Viel^a, Jérôme Polesel-Maris^{a,*}

^a CEA, IRAMIS, Service de Physique et Chimie des Surfaces et Interfaces, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

^b Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immuno-analyse, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2011

Received in revised form

19 December 2011

Accepted 22 December 2011

Available online 29 December 2011

Keywords:

Atomic force microscopy

IgG

IgM

Piezoelectric probe

Tuning fork

ABSTRACT

Atomic force microscopy (AFM) has been widely used in biotechnological research to visualize proteins or cell components with a sub-nanometric resolution. Most of the commercial AFM systems use the standard optical lever method of detection. However, the optical beam deflection technique integrated in AFM presents some disadvantages such as the thermal drift due to cantilever elongation and bending caused by the heat dissipation of the laser diode. Also, optical artifacts and interferences are usually observed in liquid environment with the optical detection, and the laser beam alignment procedure can be an elaborate process in liquid environment. Thus, it is extremely interesting to find an alternative approach to resolve such type of problems. Herein, we introduce a self-sensing piezoelectric tuning fork atomic force microscope (AFM) for molecular imaging on individual proteins. AFM measurements were performed on antibodies samples (IgG and IgM) to study the stability and applicability of this sensor for investigation of soft materials with high dynamical tendency. In this work, we could characterize the substructure of isolated IgG and IgM antibodies adsorbed onto mica surface in air with high resolution imaging. Moreover, we have identified clearly different conformations and substructure differences of individual antibodies with AFM operating in Amplitude Modulation (AM-AFM) and Phase Modulation (PM-AFM) imaging. The used methodology revealed to be very promising approach for high resolution imaging of isolated proteins with well-defined structures.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The ability to obtain information at the molecular level is becoming of central importance for numerous biological questions and represents a major challenge. Innovative technologies are thus required to characterize single proteins like antibodies, avoiding standard labeling methods to reveal molecular features. Today, several methods have been used for antibodies visualization such as electron microscopy [1] or immunofluorescence microscopy [2,3]. The aforementioned methods require a lot of care in sample preparation and/or chemistry to label the analyzed biological materials.

Since its invention in 1986 by Binnig et al. [4], atomic force microscopy (AFM) has been widely used in materials where microstructure or nanostructure needs to be determined. AFM techniques have successfully demonstrated their capabilities to

reveal the molecular structures of proteins crystals [5], or isolated proteins [6,7] with a simple preparation of the studied sample. Most of the commercial AFM systems use the standard optical lever method proposed by Meyer and Amer [8] to detect the deflection of a cantilever by means of a laser reflection on the rear side of the cantilever. However, the optical beam deflection technique used in conventional AFM presents some disadvantages such as the thermal drift due to cantilever elongation and bending caused by the heat dissipation of the laser diode [9]. Also, optical artifacts and interferences are usually observed in liquid environment with the conventional optical cantilever sensing, and the laser beam alignment procedure can be an elaborate process in liquid environment. Furthermore, although there is no published data on the biological samples photodamage induced by the laser beam in conventional AFM, we thought that the focused laser beam size which is in the range of tens of micrometers in diameter [9], is most of the time greater than the cantilever width and may thus alter some photo-sensitive receptors or proteins during AFM operation. This problem could be observed in the case of AFM imaging on cells which can spread from 10 to 70 μm depending on the type of studied cells, and so being under laser illumination.

Abbreviations: AFM, atomic force microscopy; SEM, scanning electron microscopy; Ig, immunoglobulin.

* Corresponding author. Tel.: +33 01 69 08 25 47; fax: +33 01 69 08 84 46.

E-mail address: jerome.polesel@cea.fr (J. Polesel-Maris).

Thus, a non optical detection method is required and could be a good alternative method for AFM imaging. Besides the conventional AFM scheme, some scientific teams tried to implement new scanning probes on AFM instead of silicon cantilevers. Hence, self-sensing scanning probes have an increasing interest to characterize the matter at the nanometer scale. Molecular resolution at the air/liquid interface has been performed on self-assembled alkane monolayers with piezoelectric tuning fork scanning probes [10] showing very high sensitivity comparable with standard AFM cantilevered instruments. For biological aims, Rensen et al. used a tuning fork probe to image cells in air and water [11]. Another great challenge for molecular biology is to quantify specific interaction of proteins by AFM force spectroscopy where Hofer et al. applied recently a tuning fork sensor in shear mode configuration to perform avidin and lysozyme antibody recognition [12]. However, to the best of our knowledge no results have been reported till now about molecular resolution imaging of proteins with self-sensing scanning probes.

Herein we propose a new AFM probe based on a commercially available 32-kHz quartz tuning fork with an etched Pt/Ir tip used for the topographical characterization of two types of antibodies adsorbed onto mica surface. We identified clearly different conformations and substructure differences of individual antibodies in air with AFM operating in Amplitude Modulation (AM-AFM) and Phase Modulation (PM-AFM) imaging. The used methodology proved to be a very promising approach for high resolution imaging of isolated proteins with well-defined structures.

2. Materials and methods

2.1. AFM tuning fork overview

We used a custom home built AFM microscope to drive the tuning fork probe in AM-AFM (Amplitude Modulation AFM, also called Tapping mode AFM) or PM-AFM (Phase Modulation AFM) [13] (Fig. 1).

The piezotube scanner control is performed via a home built XYZ high voltage amplifier driven by the RC4 and SC4 modules of the SPM controller from NANONIS-SPECS [14]. The stepper motor (VEXTA PX245M-03AA, Interinar Electronics, LLC) of our AFM is also driven by the same SPM controller to do the auto approach of the probe to the surface.

During AFM imaging, the tuning fork's oscillation is maintained at constant excitation in AM-AFM modulation and in constant oscillation amplitude in PM-AFM modulation. The tuning fork probe is electrically excited at its free resonance frequency. The displacement current from the tuning fork is amplified by a custom home-built transimpedance preamplifier with a gain of $R_{\text{trans}} = 80 \text{ M}\Omega$ and a bandwidth of 5 MHz. The constant excitation of the tuning fork was set with the probe far from the surface in order to detect oscillation amplitude of 42 mV from the preamplifier output. This gives a detected displacement current from the tuning fork of 525 pA. The amplitude and the phase shift are demodulated by the OC4 lock-in of the SPM controller from NANONIS-SPECS [14]. WsXM software has been used for processing all the images [15].

2.2. Tuning fork probe preparation

EPSON TOYOCOM C-001R tuning fork resonator (EPSON Europe Electronics GmbH, Munich, Germany) with a free resonance frequency of 32.768 kHz was used. For the preparation of the tuning fork probe, a three steps procedure was used.

First step: A 50 μm diameter platinum/iridium wire (Pt90/Ir10), purchased from Goodfellow (Cambridge Ltd. – Huntingdon), was attached to the top of one prong of the tuning fork using an

electrically conductive silver epoxy EPO-TEK H21D (Epoxy Technology) glue with a curing temperature of 110 °C during 45 min. However, it should be noticed that several factors have to be considered before adding the tip. The quality factor of the tuning fork should remain as high as possible in order to obtain the highest sensitivity. To do this, the procedure is based on balancing the weight between the two prongs [16]. Any weight added to one of the prongs should be compensated by the other one so as to avoid decreasing the quality factor. Thus, a small amount of epoxy glue has been added to the other prong to compensate the etched tip weight.

Second step: The fixed Pt/Ir wire was electrochemically cut to the wanted dimension of 3–4 mm long at the air/liquid interface of a CaCl_2 aqueous solution (CaCl_2 5 g, H_2O 30 ml, acetone 2 ml) [17] by applying a continuous sinusoidal etching voltage between the wire and a platinum counter electrode. CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 147.02 \text{ g/mol}$) was purchased from NORMAPUR™ AR VWR international Prolabo (Leuven, Belgium). Then, the sharp tip apex was obtained by electrochemical etching of the fixed Pt/Ir in a fresh CaCl_2 electrolyte solution and using the reverse etching geometry proposed by Fotino [18]. The AC voltage applied for the electrochemical etching of the Pt/Ir tip was 22 V peak-to-peak amplitude with a sinusoidal waveform of 400 Hz frequency. Scanning electron microscopy (JEOL JSM-5500) has been used for the tip apex size characterization as depicted in Fig. 2b. Tip radius below 60 nm is routinely obtained. Subsequently, the probe was rinsed in ethanol and dried under nitrogen before operating.

Third step: The tuning fork sensor was mounted to the holder which was then clipped to the piezotube scanner (PT130.24, Physik Instrumente (PI) GmbH, Karlsruhe, Germany) of our custom home built AFM, as illustrated in Fig. 2a.

2.3. Resonance characteristics of the tuning fork scanning probe

The amplitude and phase resonance curves of the tuning fork probe in ambient conditions are illustrated in Fig. 3. These signals were acquired far from the sample in order to cancel the stray interelectrodes capacitance of the tuning fork with a compensation capacitor tunable on the preamplifier. The optimal setting of the tunable capacitor was obtained for a symmetrical amplitude resonance peak. These curves allowed us to determine the tuning fork quality factor. In our case, a quality factor of 2000 ± 400 was routinely obtained after mass compensation, and frequency detuning of the resonance towards the low frequencies due to the added mass of the tip is also observed around 27 kHz.

2.4. Tuning fork sensitivity calculation

The stiffness of the tuning fork prong was estimated equal to $k_{\text{prong}} = 2161 \text{ N/m}$ using the dimensions of the tuning fork measured under an optical microscope and using the spring constant definition introduced by Karraï and Grober [19]. The high stiffness value of tuning fork probes allows setting easily sub-nanometer oscillation amplitude compared to standard AFM silicon cantilevers. This advantage was pointed by Giessibl to enhance the signal to noise ratio for atomic resolution AFM imaging [20]. The high stiffness value prevents also the jump-to-contact of the oscillating probe for high attractive surface forces. We demonstrated in previous works that the small amplitude regime of tuning fork probes, until sub-Angström regime, is a key parameter to image weakly adsorbed molecules [10,21]. The sensitivity of a quartz tuning fork probe (S_{TF}) can be calculated as described in Eq. (1) [22]:

$$S_{\text{TF}} = 2\pi \cdot f_d \cdot 12d_{21} \cdot k_{\text{eff}} \cdot \frac{L_e}{l^2} \left(L - \frac{L_e}{2} \right) \quad (1)$$

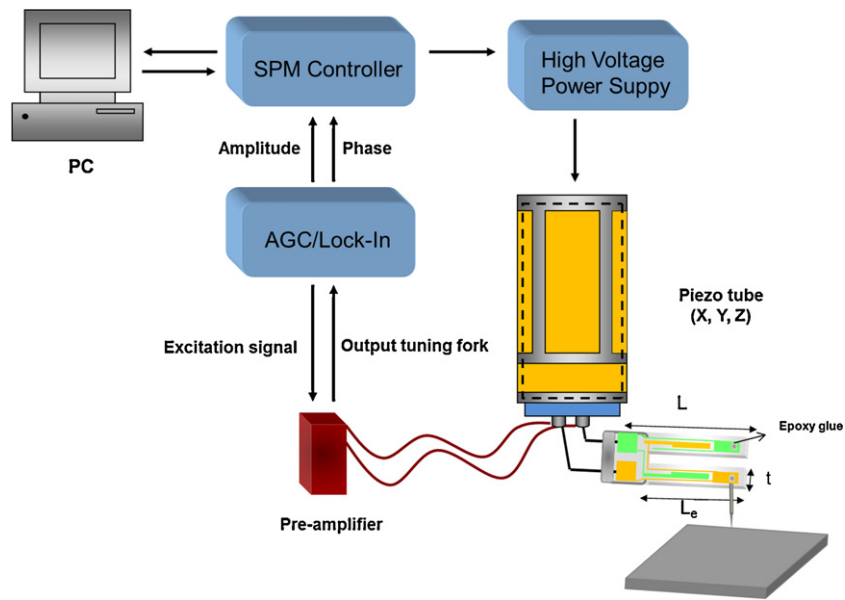


Fig. 1. The experimental setup of the tuning fork self-sensing AFM. A lock-in amplifier demodulates the amplitude and phase from the output signal from the tuning fork preamplifier. An automated gain controller (AGC) is switched on for the PM-AFM modulation to maintain constant oscillation amplitude.

where f_d is the driving frequency of the probe and d_{21} is the piezoelectric coefficient of quartz equal to 2.31 pC/N . L and L_e are the length of the tuning fork prong and that of the prong electrode respectively and were equal to 2.502 mm and 1.668 mm as measured by optical microscope, t is the thickness of the prong equal to 0.233 mm , and k_{eff} is the effective spring constant for a balanced tuning fork oscillator and is estimated to $k_{\text{eff}} = 2 \cdot k_{\text{prong}} = 4322 \text{ N/m}$, as defined for a balanced symmetrical double oscillator by Castellanos-Gomez et al. [16] and Giessibl [23]. Hence, the calculated sensitivity $S_{\text{TF}} = 1.072 \text{ nA/nm}$ gives a free oscillation amplitude $a_0 = 4.9 \text{ \AA}$, for a detected displacement current of 525 pA . We characterized a density of noise in amplitude of $154 \text{ fm}/\sqrt{\text{Hz}}$ with the OC4 spectrum analyzer of the SPM controller from NANONIS-SPECS. The origin of the density of noise is mainly due to two contributions: the tuning fork sensor noise and the preamplifier noise placed after the sensor.

2.5. Antibodies sample preparation for AFM imaging

Monoclonal murine antibodies IgG and IgM were produced in our facilities. The immunoglobulin- $\gamma 1$ (IgG1) monoclonal antibody, Ana-3, was raised against a synthetic analog of anatoxin-a [24]. The immunoglobulin μ (IgM) monoclonal antibody, Sha-22, was raised against proteinase K-treated and non-denatured scrapie-associated fibrils from Syrian hamster prion-infected brain. Both antibodies were purified using caprylic acid precipitation. Antibodies purity was assessed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the Phast System apparatus (GE Healthcare, Bucks, UK) with 4–15% polyacrylamide gels, following the manufacturer's instructions. The molecular weights of IgG and IgM light (κ/λ) chain were 25–30 kDa, and 50 kDa and 76–92 kDa for IgG heavy (γ) and IgM heavy (μ) respectively (data not shown). The obtained bands on the electrophoresis gel had the right molecular

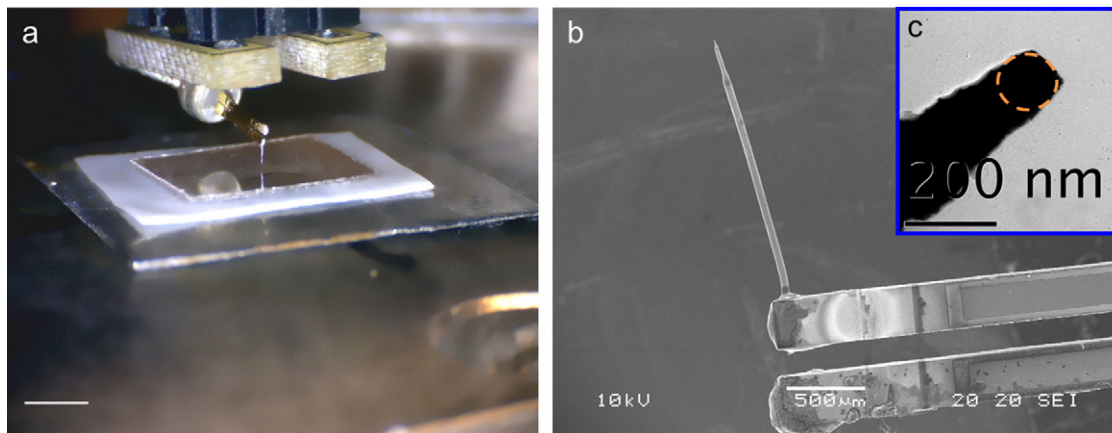


Fig. 2. (a) Close view of the tuning fork probe clipped on the AFM head, and scanning the mica surface by its high aspect ratio platinum/iridium tip (scale white bar is 2.5 mm). (b) Scanning electron micrograph of the tuning fork probe with the fixed etched platinum/iridium tip on one prong end. The opposite prong end shows the cured epoxy glue droplet for the weight compensation of the resonator. Inset: magnified view of the tip apex. (c) High-magnification TEM image tip apex, showing a blunt tip end with a radius of 50 nm .

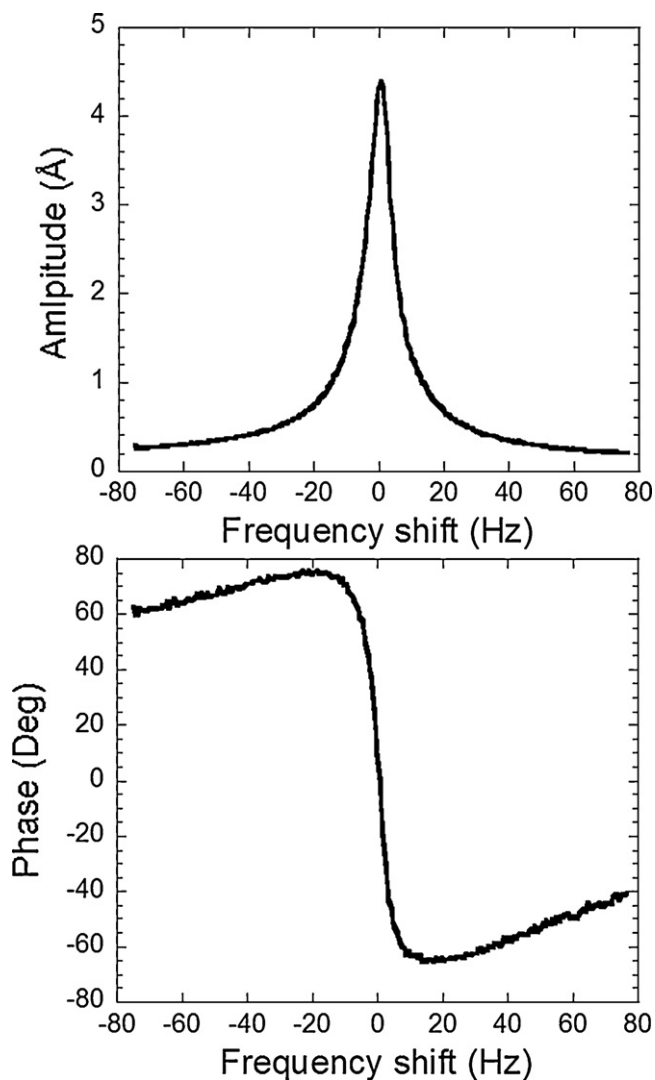


Fig. 3. Amplitude (upper) and phase (lower) responses of the tuning fork sensor when it is far from the sample. Stray interelectrodes capacitance of the tuning fork was compensated to obtain a symmetrical amplitude resonance peak. Q value is about 2000. The resonance curves are centered to the free resonance of 27 kHz of the probe.

weight. Moreover, both IgG and IgM were pure. For AFM imaging, antibodies stock solutions (1 mg/ml) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 were first filtered using sterile filters (200 nm, Spectrum Laboratories, CA) to eliminate large aggregates. Then they were diluted into small aliquots of 1/100 (for IgG) and 1/10 (for IgM) in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Lonza, Walkersville, USA). 10 μ l of these solutions was incubated on freshly cleaved mica for 1 min (for IgG) to 5 min (for IgM) before rinsing thoroughly with milliQ water and drying in a dry air stream. Samples were imaged immediately after drying at room temperature and ambient humidity with no special treatment.

3. Results and discussion

To demonstrate the capabilities for high resolution imaging of proteins of our system, we studied the IgG and IgM antibodies solutions deposited on a freshly cleaved mica surface in air. Antibodies are heavy globular plasma proteins (\sim 150 kDa for IgG and \sim 900 kDa for IgM) with well-defined structures, which made them good candidates to test the sensitivity and resolution of our AFM system for biomolecular imaging.

3.1. AFM imaging of IgG antibodies

IgG antibodies are "Y"-shaped proteins that consist of four polypeptide chains arranged in three fragments 2 Fab and 1 Fc domains (Fig. 4e). The IgG samples were imaged in AM-AFM modulation. Fig. 4a is a large scan of IgG antibodies deposited on the mica surface. The imaging is performed under ambient conditions in air.

Fig. 4a shows several globular structures with different morphologies. These structures could be related to the different IgG orientations that can adopt when they are adsorbed onto mica surface as described by some authors [6,7,25]. Moreover, few aggregates are visible on the surface but the field was mostly dominated by isolated particles. Some IgG molecules show the "Y"-shaped morphology with the three lobes accessible to AFM scanning as depicted in Fig. 4b and c. This Y-shaped morphology would correspond to the three lobes deposited on the support and this is in accordance with that observed by many authors using AFM. Moreover, the topography profiles of an individual Y-shaped antibody depicted in Fig. 4d, reveal that two of fragments or lobes have the same height of about 1.70 nm while the third fragment has a height of 2.00 nm. Such type of results has been also observed by Patil et al. [26] and they could identify the position of Fc and Fab fragments by measuring the different lobes height. The lateral dimension of an IgG molecule at its Y-shaped morphology is about 24 nm which is consistent with those determined by AFM methods (18–25 nm depending on the tip apex size and working conditions) [6,27,28]. Moreover, the lateral size of Fab and Fc lobes was 9.0 ± 0.5 nm. These small differences in lateral size of Fab or Fc with that obtained by other authors (lateral size = 8 nm) [6] using AFM could be related to a tip convolution effect. We have also measured the separation distance between Fc and Fab domains, with a mean value of 12.9 ± 2.5 nm. Moreover, the statistic histogram in Fig. 4f shows that the measured distances between Fab and Fc are mostly greater than 10 nm. These values were larger than those obtained by Thomson [7]. Conversely, Patil et al. [26] and Martinez et al. [29] have also obtained distances greater than 10 nm which is consistent with our results. This discrepancy observed in separation distances obtained by different authors, could be related to the tip convolution effect and/or to residual humidity in the sample which may provoke proteins domain distortion as it has been already mentioned by Thomson [28].

We have also analyzed the other IgG morphologies when they are adsorbed onto mica surface. Indeed, it has been shown by some authors that due to their 3-dimensional morphology [30], IgG molecules could adopt different orientations [6,25]. These orientations are shown in Fig. 5: Fig. 5a would correspond to Y-shaped antibody laying flat on its three lobes with a height about 1.5 nm which is the smallest one compared to the other orientations, Fig. 5b would represent an antibody laying on its one side, in which one Fab and Fc fragments are stacked to the surface with a height value of 1.7 nm, Fig. 5c would correspond to an antibody deposited on the surface via its Fc lobe, this orientation showed a height about 1.6 nm, Fig. 5d would be an antibody laying on the surface via the two Fab lobes with height value about 2.5 nm. For this latter, the two Fab units could not be revealed, and only an elliptic shape was detected with a lateral size equal to the distance between the 2 Fab units. This result could be explained by a convolution effect of the tip with a tip radius estimated to be less than 60 nm by electron microscopy (Fig. 2b), which can induce some lateral dimension uncertainty on the protein orientation. In other hand, it should be noticed that the measured height (\sim 1.5 nm) of IgG molecules laying flat on their three lobes, was somewhat lower than those obtained by other authors using sharp silicon tip (\sim 2 nm) [28]. This result could be related to the broad tip radius (\sim 50 nm) and to its blunt aspect as shown in Fig. 2c. In fact, large tip radius is intrinsically

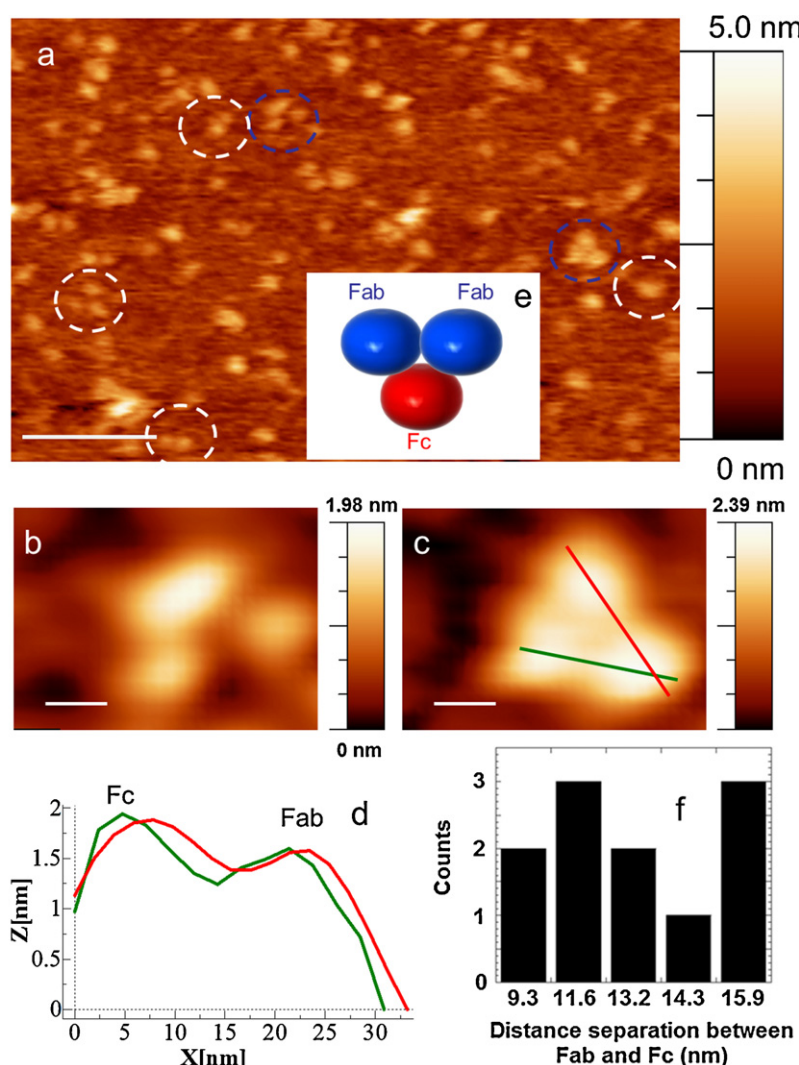


Fig. 4. (a) AM-AFM topography image of IgG antibodies adsorbed onto mica surface. (b) and (c) images of individual antibodies corresponding to those surrounded with blue dotted circles in image (a). (d) Topography profiles of an individual antibody. (e) Schematic structure of an IgG antibody. The scale bars shown are 100 nm in figure (a), and 10 nm in figures (b) and (c). (f) Histogram of separation distances between the three subunits (Fc, Fab) as measured by AFM on several IgG molecules. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

responsible for the loss of true height of imaged features as demonstrated by Santos et al. [31]. Indeed, the height loss is a direct consequence of the applied force coming from an effective area of interaction, which is in our case larger than a single sample molecule directly under the tip. Essentially, heights of features that are smaller than the effective size of the tip are compromised and will become lower as tip radius increases. The blunt aspect of the prepared tips could be related to the thermal effect during the electrochemical etching of the tip, and/or to the bubbles adhesion which provoke an increase in cone angle of the tip apex. Thus, in order to get better tips with a sharper apex (less than 50 nm radius) to obtain more precise details about the scanned features height, improvements of tips manufacturing are in progress to have a better control of the electrochemical current passing through the tip apex during the etching procedure, or by applying a magnetic field along the tips direction which led to a reduction in cone angle of the prepared tips as described by McKendry et al. [32].

3.2. AFM imaging of IgM antibodies

We investigated fine conformation details of a more complex and fragile protein structure such as IgM antibodies. Indeed, IgM

antibodies form pentamers, and their structure consists of five IgG subunits that are covalently linked together with disulfide bonds [33]. Additionally, there is a small glycoprotein at their center called J-chain which is connected through disulfide bonds with two neighboring Ig subunits [34] (Fig. 6f). Many authors have used conventional AFM methods, nanotubes [35] as probe microscopy tips, cryo-AFM [36] or bimodal atomic force microscopy [29] to image isolated IgM in air or liquids; however none of them have used a self-sensing scanning probe to image such type of well structured molecules. In our case, due to the softness of such complex proteins in ambient conditions, AM-AFM imaging modulation was not possible. We incriminate the problem of humidity of our sample that was directly imaged by AFM in air just after the dispensing the antibodies solution, washing with PBS and drying. In AM-AFM modulation the tip–surface distance regulation is performed to maintain constant the oscillation amplitude to a setpoint. In this condition, a bi-stability problem can appear where two solutions of oscillation amplitudes can exist but one is in the stable attractive mode, and the other one in the more invasive intermittent contact regime [37]. The humidity can have effect on the protein mobility avoiding the stability for sub-structure resolution, but also can affect the tip position above the surface of the transition from attractive to repulsive

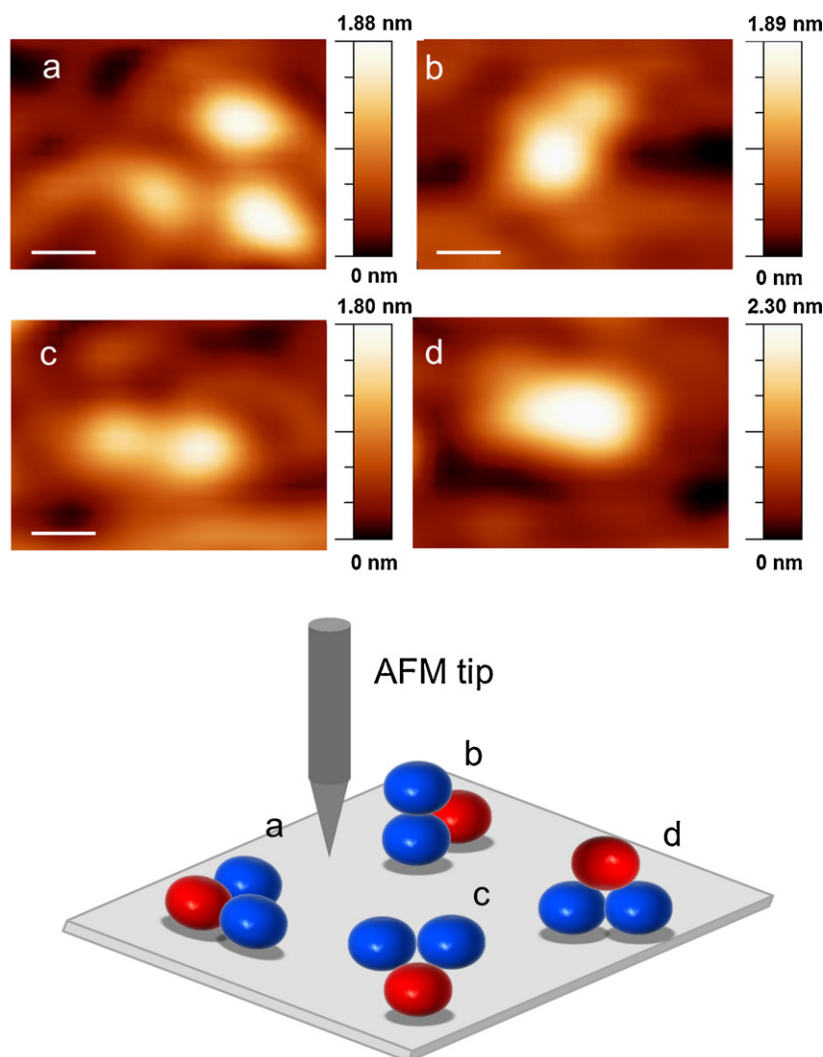


Fig. 5. Left: different IgG antibodies orientation when adsorbed onto mica surface corresponding to those surrounded with white dotted circles in Fig. 4a. (a) Y-shaped antibody, (b) two unequal domains, (c) two equal domains, (d) one domain morphology. White scale bar is 10 nm. Lower: schematic representation of spatial orientations of the IgG imaged by AFM. Red ball corresponds to Fc fragment and blue ones to Fab fragments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

forces through the intermittent formation of a capillary meniscus between tip and sample.

Thus, we have used phase-modulation atomic force microscopy (PM-AFM) [38] in constant-amplitude mode to image IgM antibodies. In PM-AFM, the probe is oscillated in constant-amplitude mode using an Automatic Gain Control (AGC) of the oscillation amplitude. The phase shift in the probe relative to the excitation signal is thus used as the feedback signal for the tip-sample distance z control, and the surface topography is obtained by measuring the z position required to keep the phase shift constant. It was suspected that PM-AFM imaging modulation to be less invasive and more stable [38,39] on IgM antibodies than AM-AFM and to influence to a lesser extent of their structure. In fact, the PM-AFM modulation avoids the bi-stability problem of AM-AFM modulation as related in several works [38,39]. In this AFM modulation the nonlinear effects of the tip-surface interactions on the resonance curve of the probe are cancelled thanks to the Automatic Gain Control of the oscillation amplitude. That is a first reason we point the need to use PM-AFM modulation to success in imaging on IgM antibodies. A second reason could also be related to the higher sensitivity of PM-AFM modulation compared to AM-AFM modulation as already reported by Kobayashi et al. [13]. In their work, authors have demonstrated

that the minimum detectable interaction force in PM-AFM modulation is decreased by approximately 30 fold compared to that in AM-AFM. Considering the pre-cited parameters of our probe with the measured amplitude density of noise, we estimate a minimum detectable tip-sample interaction forces in AM-AFM modulation of $\delta\langle F_{ts} \rangle_{AM-AFM} = 83$ piconewtons, and $\delta\langle F_{ts} \rangle_{PM-AFM} = 13$ piconewtons in PM-AFM modulation, according to the Eqs. (12) and (13) in the article of Kobayashi et al. [13]. This calculation shows the better sensitivity of PM-AFM compared to AM-AFM modulation and capabilities to applied lower imaging forces, without considering the bi-stability problems encountered in AM-AFM as discussed above.

Typical AFM images of IgM molecules adsorbed onto mica surface are shown in Fig. 6a. A star shaped structures or pentamers could be depicted in this image with other different morphologies. This apparent structure differences in individual IgM molecules could be due to their adsorption in different orientations on mica surface and to the flexible character of the Fab fragments as already suggested by other authors [26,40]. Distortions are observed on some IgMs, and are probably due to humidity effects cited before. Thomson reported that sometimes these distortions of the molecules can be removed if the sample is desiccated for a long period of time, until weeks [28].

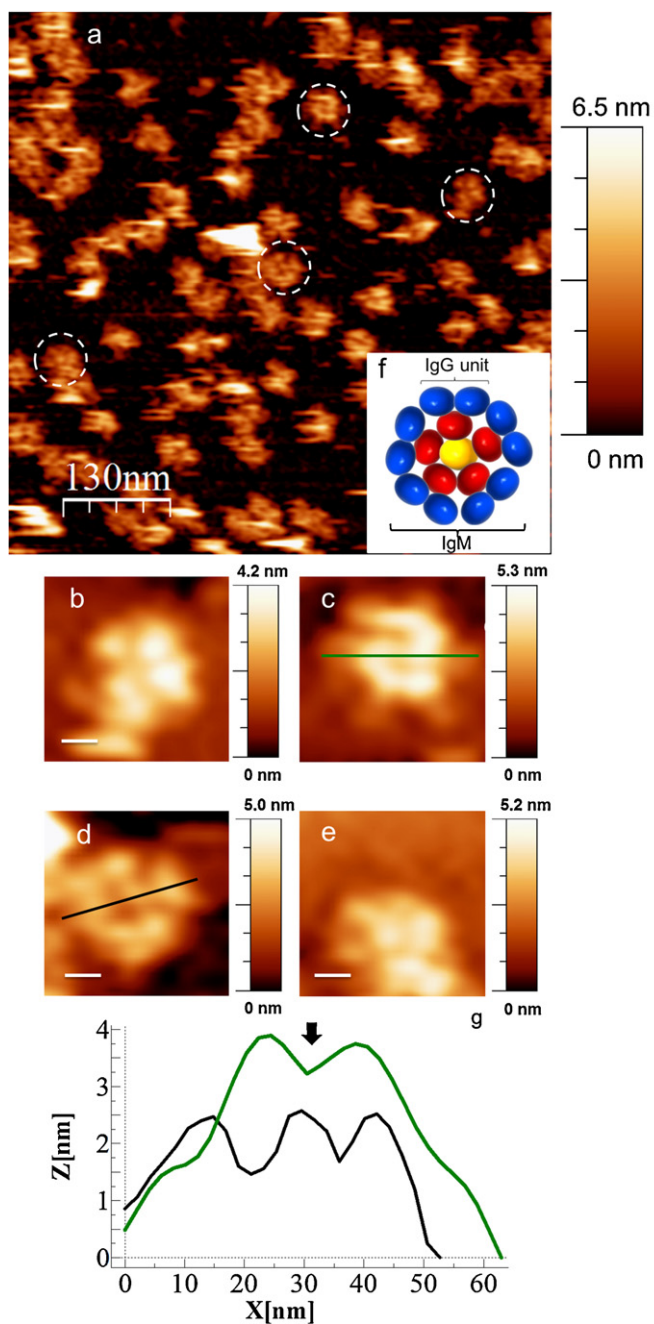


Fig. 6. (a) PM-AFM topography image ($650 \text{ nm} \times 650 \text{ nm}$) of IgM antibodies adsorbed onto mica surface. The imaging is performed under ambient conditions in air. (b), (c), (d) and (e) images of individual antibodies. (f) Schematic structure of an IgM antibody. (g) Topography profiles of IgM antibodies: black line corresponds to an IgM with a pentameric shape from figure (d); green line corresponds to that depicted in figure (e) with an hexameric shape and lacking to a J-chain (black arrow). The white scale bars shown are 130 nm in figure (a), and 14 nm in figures (b), (c), (d) and (e). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Fig. 6b–d is topography images of three individual IgM. These images show the overall pentameric shape of the IgM antibody with a central circular region (J-chain) and distinguish the different IgG monomers. The observed structures are consistent with those obtained with molecular graphics modeling reconstituted from synchrotron X-ray solution scattering data of a murin IgM [41]. Furthermore, the apparent lateral size of the IgM at its star-shape morphology of $38 \pm 1 \text{ nm}$ is in accordance with measurements given by other standard AFM or cryo-AFM

measurements ($35 \pm 3 \text{ nm}$) [29,42]. However, some of IgM molecules exhibited more than five IgG arms as observed in Fig. 6e. This later observation has been also described by some authors using conventional AFM and it has been related to a slight distortion or separation of Fab fragments within some monomers [40]. Also, it has been demonstrated in the literature that IgM molecules could be occasionally found as hexamers that lack a J-chain [43,44]. This latter description could resemble to the IgM structure depicted in Fig. 6e with the topography profiles (Fig. 6g) revealing a lacking of the J-chain of a hexameric IgM compared to a pentameric one. We quantified tip-sample force gradients of 0.22 nN/nm and 0.44 nN/nm on the IgM and IgG images respectively, using the formalism proposed in references [21,45]. This lower imaging force gradient on the IgM could explain the higher heights observed on IgM antibodies, and reported on the profiles, compared to IgG antibodies.

4. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that self-sensing tuning fork probe allows performing imaging in air of biological soft materials only weakly adsorbed on surface. In addition, the obtained high resolution images were as good as those obtained by some authors using conventional AFM methods [6,28] or carbon nanotubes tipped AFM probes [27,35]. Our system allows identifying clearly orientation of individual antibodies as well as the conformation and substructure differences for a same kind of antibody. We demonstrated that the long tip configuration of the probe, recently pointed by Higushi et al. [46], is suitable to achieve high resolution imaging using a simple method for the preparation of the self-sensing scanning probe, without requiring expensive equipment. Concerning the problem of stability of operation we had on IgM in AM-AFM, we incriminate the problem of humidity of our sample inducing tip-sample meniscus forces. In this condition, bi-stability problem can appear where two solutions of oscillation amplitudes can exist but one is in the stable attractive mode, and the other one in the invasive intermittent contact regime. The PM-AFM modulation cancelled this bi-stability problem of AM-AFM modulation and offered higher sensitivity to image the IgM antibodies. The high stiffness of the tuning fork allows it to oscillate in a stable way with very small Angström amplitudes, and thus increases its sensitivity. Added to the aforementioned, we believe that using sharper tip would help to observe higher resolution details of the scanned features.

In a previous work we have demonstrated the efficiency of our system in dynamic force spectroscopy measurements in buffer solution between functionalized tip and bovin serum albumin covalently linked to the surface [47]. The evaluation of the applicability of our AFM sensor for soft biological materials imaging in aqueous condition will be the challenge. Tuning fork AFM imaging in aqueous media is currently in progress to confirm the relevance of our AFM system for soft materials imaging both in air and liquid conditions.

Acknowledgments

This work has been financially supported by the Region Ile-de-France in the framework of C'Nano IdF. C'Nano IdF is the nanoscience competence center of Paris Region, supported by CNRS, CEA, MESR and Region Ile-de-France. We are indebted to François Thoyer, Christophe Lubin and Sylvain Foucquart concerning the mechanical design and preamplifier electronics fabrication of the custom home built AFM microscope. We acknowledge José Moran Meza for TEM characterization of the tip, and Jacques Cousty, Ahmed Hamraoui and Laurent Pham Van for fruitful discussions.

References

- [1] A.C. Davis, K.H. Roux, M.J. Shulman, On the structure of polymeric IgM, *Eur. J. Immunol.* 18 (1988) 1001–1008.
- [2] D. Zekzer, F.S. Wong, O. Ayalon, I. Millet, M. Altieri, S. Shintani, M. Solimena, R.S. Sherwin, GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 68–73.
- [3] E.L. Rosenthal, B.D. Kulbersh, T. King, T.R. Chaudhuri, K.R. Zinn, Use of fluorescent labeled anti-epidermal growth factor receptor antibody to image head and neck squamous cell carcinoma xenografts, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 1230–1238.
- [4] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930.
- [5] C. Möller, M. Allen, V. Elings, A. Engel, D.J. Müller, Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces, *Biophys. J.* 77 (1999) 1150–1158.
- [6] A. San Paulo, R. Garcia, High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes, *Biophys. J.* 78 (2000) 1599–1605.
- [7] N.H. Thomson, The substructure of immunoglobulin G resolved to 25 kDa using amplitude modulation AFM in air, *Ultramicroscopy* 105 (2005) 103–110.
- [8] G. Meyer, N.M. Amer, Novel optical approach to atomic force microscopy, *Appl. Phys. Lett.* 53 (1988).
- [9] K. Zhang, A method for reducing laser heating on atomic force microscope tips, *Eur. Phys. J. – Appl. Phys.* 53 (2011).
- [10] L.P. Van, V. Kyrlyuk, J. Polesel-Maris, F. Thoyer, C. Lubin, J. Cousty, Experimental three-dimensional description of the liquid hexadecane/graphite interface, *Langmuir* 25 (2009) 639–642.
- [11] W.H.J. Rensen, N.F. van Hulst, S.B. Kämmer, Imaging soft samples in liquid with tuning fork based shear force microscopy, *Appl. Phys. Lett.* 77 (2000).
- [12] M. Hofer, S. Adamsmaier, T.S. van Zanten, L.A. Chtcheglova, C. Manzo, M. Duman, B. Mayer, A. Ebner, M. Moertelmaier, G. Kada, M.F. Garcia-Parajo, P. Hinterdorfer, F. Kienberger, Molecular recognition imaging using tuning fork-based transverse dynamic force microscopy, *Ultramicroscopy* 110 (2010) 605–611.
- [13] N. Kobayashi, Y.J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, Y. Sugawara, High-sensitivity force detection by phase-modulation atomic force microscopy, *Jpn. J. Appl. Phys.* 45 (2006).
- [14] T. NANONIS-SPECS Zurich GmbH, 8005 Zürich, Switzerland, The complete stand-alone Scanning Probe Microscope controller from NANONIS-SPECS has been used composed of the RC4, SC4 and OC4 PLL modules, <http://www.specs-zurich.com/en/SPM-Control-System.html>.
- [15] I. Horcas, R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, A.M. Baro, WSXM. A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Rev. Sci. Instrum.* 78 (2007) 013705–013708.
- [16] A. Castellanos-Gomez, N. Agrait, G. Rubio-Bollinger, Dynamics of quartz tuning fork force sensors used in scanning probe microscopy, *Nanotechnology* 20 (2009) 215502.
- [17] A.J. Nam, A. Teren, T.A. Lusby, A.J. Melmed, Benign making of sharp tips for STM and FIM: Pt, Ir, Au, Pd, and Rh, *J. Vac. Sci. Technol. B* 13 (1995) 1556–1559.
- [18] M. Fotino, Nanotips by reverse electrochemical etching, *Appl. Phys. Lett.* 60 (1992) 2935–2937.
- [19] K. Karrai, R.D. Grober, Piezo-electric tuning fork tip-sample distance control for near field optical microscopes, *Ultramicroscopy* 61 (1995) 197–205.
- [20] F.J. Giessibl, H. Bielefeldt, S. Hembacher, J. Mannhart, Calculation of the optimal imaging parameters for frequency modulation atomic force microscopy, *Appl. Surf. Sci.* 140 (1999) 352–357.
- [21] J. Polesel-Maris, C. Lubin, F. Thoyer, J. Cousty, Combined dynamic scanning tunneling microscopy and frequency modulation atomic force microscopy investigations on polythiophene chains on graphite with a tuning fork sensor, *J. Appl. Phys.* 109 (2011), 074320–074310.
- [22] F.J. Giessibl, Atomic resolution on Si(111)-(7×7) by noncontact atomic force microscopy with a force sensor based on a quartz tuning fork, *Appl. Phys. Lett.* 76 (2000) 1470–1472.
- [23] F.J. Giessibl, F. Pielmeier, T. Eguchi, T. An, Y. Hasegawa, Comparison of force sensors for atomic force microscopy based on quartz tuning forks and length-extensional resonators, *Phys. Rev. B* 84 (2011) 125409.
- [24] M. Marc, F. Outurquin, P.-Y. Renard, C. Crémion, X. Franck, Synthesis of a (+)-anatoxin – a analogue for monoclonal antibodies production, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 4554–4557.
- [25] F. Kienberger, H. Mueller, V. Pastushenko, P. Hinterdorfer, Following single antibody binding to purple membranes in real time, *EMBO Rep.* 5 (2004) 579–583.
- [26] S. Patil, N.F. Martinez, J.R. Lozano, R. Garcia, Force microscopy imaging of individual protein molecules with sub-pico Newton force sensitivity, *J. Mol. Recognit.* 20 (2007) 516–523.
- [27] C.L. Cheung, J.H. Hafner, C.M. Lieber, Carbon nanotube atomic force microscopy tips: direct growth by chemical vapor deposition and application to high-resolution imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 3809–3813.
- [28] N.H. Thomson, Imaging the substructure of antibodies with tapping-mode AFM in air: the importance of a water layer on mica, *J. Microsc.-Oxford* 217 (2005) 193–199.
- [29] N.F. Martinez, J.R. Lozano, E.T. Herruzo, F. Garcia, C. Richter, T. Sulzbach, R. Garcia, Bimodal atomic force microscopy imaging of isolated antibodies in air and liquids, *Nanotechnology* 19 (2008).
- [30] E.W. Silvertown, M.A. Navia, D.R. Davies, Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (1977) 5140–5144.
- [31] S. Santos, V. Barcons, H.K. Christenson, J. Font, N.H. Thomson, The intrinsic resolution limit in the atomic force microscope: implications for heights of nano-scale features, *PLoS ONE* 6 (2011) e23821.
- [32] J.E. McKendry, C.S. Allen, K. Critchley, M.L. Górzny, A.S. Walton, S.D. Evans, Magnetic field enhanced nano-tip fabrication for four-probe STM studies, *Nanotechnology* 19 (2008) 085201.
- [33] H.W. Schroeder, J.D. Wald, N.S. Greenspan, Immunoglobulins: structure and function, in: W.E. Paul (Ed.), *Fundamental Immunology*, Lippincott Williams, Wilkins, 2008, pp. 125–151.
- [34] H.P. Vollmers, S. Brandlein, Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 755–765.
- [35] J.H. Hafner, C.L. Cheung, C.M. Lieber, Growth of nanotubes for probe microscopy tips, *Nature* 398 (1999) 761–762.
- [36] Y. Zhang, S. Sheng, Z. Shao, Imaging biological structures with the cryo atomic force microscope, *Biophys. J.* 71 (1996) 2168–2176.
- [37] S. Santos, V. Barcons, J. Font, N.H. Thomson, Bi-stability of amplitude modulation AFM in air: deterministic and stochastic outcomes for imaging biomolecular systems, *Nanotechnology* 21 (2010) 225710.
- [38] Y. Sugawara, N. Kobayashi, M. Kawakami, Y.J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, Elimination of instabilities in phase shift curves in phase-modulation atomic force microscopy in constant-amplitude mode, *Appl. Phys. Lett.* 90 (2007).
- [39] H. Hölscher, Theory of phase-modulation atomic force microscopy with constant-oscillation amplitude, *J. Appl. Phys.* 103 (2008) 064317.
- [40] D.M. Czajkowsky, Z.F. Shao, The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 14960–14965.
- [41] S.J. Perkins, A.S. Nealis, B.J. Sutton, A. Feinstein, Solution structure of human and mouse immunoglobulin M by synchrotron X-ray scattering and molecular graphics modelling: a possible mechanism for complement activation, *J. Mol. Biol.* 221 (1991) 1345–1366.
- [42] J. Yang, J.X. Mou, Z.F. Shao, Molecular resolution atomic force microscopy of soluble-proteins in solution, *BBA-Gen. Subjects* 1199 (1994) 105–114.
- [43] E.J. Wiersma, C. Collins, S. Fazel, M.J. Shulman, Structural and functional analysis of J chain-deficient IgM, *J. Immunol.* 160 (1998) 5979–5989.
- [44] C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M.J. Shlomchik, The generation of lymphocyte antigen receptors, in: G.P. Inc (Ed.), *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*, Garland Publishing, New York, 2001, pp. 123–154.
- [45] A.J. Katan, M.H.v. Es, T.H. Oosterkamp, Quantitative force versus distance measurements in amplitude modulation AFM: a novel force inversion technique, *Nanotechnology* 20 (2009) 165703.
- [46] S. Higuchi, H. Kuramochi, O. Kubo, S. Masuda, Y. Shingaya, M. Aono, T. Nakayama, Angled long tip to tuning fork probes for atomic force microscopy in various environments, *Rev. Sci. Instrum.* 82 (2011) 043701–043706.
- [47] J. Polesel-Maris, J. Legrand, T. Berthelot, A. Garcia, P. Viel, A. Makky, S. Palacin, Force spectroscopy by dynamic atomic force microscopy on bovine serum albumin proteins changing the tip hydrophobicity, with piezoelectric tuning fork self-sensing scanning probe, *Sens. Actuators B – Chem.* (2011) 032, doi:10.1016/j.snb.2011.11.

Biographies

Ali Makky is a post-doctoral researcher in Surface Physics at CEA Saclay in the SPCSI group of the IRAMIS institute. He obtained his doctorate degree in pharmacy at the Saint-Joseph University (Beirut, Lebanon). Then, he obtained his master degree, followed by a PhD degree in Biopharmacy and Pharmacotechnology at the University of Paris XI, faculty of pharmacy in the department of Biopharmaceutics, pharmaceutical technologies and physicochemistry. His research interests mainly focus on drug delivery, the construction and characterization of biomimetic cell membrane models to analyze the interaction of drugs with cell membranes, as well as between ligands and receptors.

Thomas Berthelot is researcher in Surface Chemistry at CEA Saclay in the SPCSI group of the IRAMIS institute. After his licence's degree in Biochemistry, he obtained his master's degree (2002) in Organic Chemistry at the University of Bordeaux I (France), followed by a PhD degree in Bioorganic Chemistry at the bioorganic chemistry group at the University of Bordeaux II (France). In 2006, he joined the CEA Saclay (France) and obtained his permanent position in 2007. Between 2007 and 2009, he participated in the creation of a surface chemistry start-up (Pegastech SA, France). His current research interests include surface chemistry and biosensors development.

Cécile Feraudet-Tarisse is a young researcher specialized in the use of monoclonal antibodies for immunotherapy, diagnosis or detection purposes. She received her PhD in Biology (Biochemistry) in 2005 from Paris XI-Orsay University (France) and did post-doctoral training in the National Veterinary School of Toulouse (France) working on prion disease immunotherapy. She is an author and co-author of several manuscripts in the area of prion diseases. She is currently an immunoanalyst at the French Atomic Agency (CEA, France).

Hervé Volland is an immunoanalyst researcher specialized in the development of assays for diagnostic or detection using different technologies (ELISA, lateral flow immunoassay, etc.). From 1993 to 1999, he served as scientist in a private company (SPI-BIO). He obtained his PhD degree in Biology in 1999 (Biochemistry) from Paris XI-Orsay University. During the year 2000, he worked in an American company (Ann Arbor–Michigan). Since 2001, he was working at the French Atomic Agency (CEA)

as an immunoanalyst. Actually, he is the head of the Laboratory of Research and Studies in Immunoanalysis.

Pascal Viel, born in 1961, obtained his PhD in electrochemistry from the Pierre et Marie Curie University of Paris (France) in 1990. In the same year he joined the Commissariat à l'Énergie Atomique in Saclay. His domains of interests have always been turned to surface chemistry. His early work was dedicated to the grafting and growth of vinylic films on metallic surfaces by electropolymerization. Now his research covers many aspects of basic and technological issues of immobilized thin organic films for liquid waste treatments and biotechnologies.

Jérôme Polesel-Maris is researcher in Surface Physics at CEA Saclay in the SPCSI group of the IRAMIS institute. In 2002, he obtained his master's degree in Physics at the University of Toulouse III (France), followed by a PhD degree in Surface Physics at CEMES-CNRS (NanoSciences Group) of Toulouse (France) in 2005. Between 2005 and 2008, he was R&D Engineer in the bioMEMS group of CSEM at Neuchâtel (Switzerland) to develop new microfabricated tools for the life sciences. His skills include scanning probe techniques (AFM, STM) and electronics design. His current research interests include biosensors development and self-sensing scanning probe microscopy.



Force spectroscopy by dynamic atomic force microscopy on bovine serum albumin proteins changing the tip hydrophobicity, with piezoelectric tuning fork self-sensing scanning probe

Jérôme Polesel-Maris*, Jérémy Legrand, Thomas Berthelot, Alexandre Garcia, Pascal Viel, Ali Makky, Serge Palacin

CEA, IRAMIS, Service de Physique et Chimie des Surfaces et Interfaces, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2011
Received in revised form 2 November 2011
Accepted 14 November 2011
Available online 23 November 2011

Keywords:

Tuning fork
Dynamic AFM
BSA
Force spectroscopy
Diazonium chemistry
Proteins stretching
Biosensor

ABSTRACT

A tuning fork AFM (atomic force microscope) scanning probe has been used to study the chemical grafting between a functionalized tip and BSA (bovine serum albumin) protein. A non-conventional chemistry based on diazonium salts has been applied to control the hydrophobicity and hydrophilicity of the tip termination, and to graft proteins on surface. Unfolding signatures during the protein stretching have been observed, using amplitude modulation (AM-AFM) control of the probe. We propose a methodology to obtain quantitative information of the withdrawal forces from the amplitude and phase signals. Our results demonstrate the great potential of this new piezoelectric probe combined in term of sensitivity and versatility of the chemical functionalization of the tip to analyze biological materials.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Analytical tools based on AFM (atomic force microscope) scanning probes for force measurement open ultrafine analysis opportunities for nanomedicine and personalized diagnosis [1–4]. Force nanosensors already demonstrated [4] their molecular sensitivity and versatility in the assessment of interactions between ligands and receptors. These nanotools could also offer selectivity in analysis by grafting the corresponding chemical moiety at the tip end. For instance, AFM technique allows to refine our understanding of the destabilization of proteins implied in neurodegenerative diseases and the mechanisms by which some molecules bind and modulate the transmembrane cells receptors [5]. AFM techniques have already demonstrated their capabilities to reveal the molecular structures of protein crystals [6], or isolated proteins [7,8] with a very light preparation of the sample to analyze. Most of the commercial AFM systems use the standard optical lever method proposed by Meyer and Amer [9] to detect the deflection of a silicon based cantilever by means of a laser reflection on its rear side. But, some scientific teams recently tried to implement alternative scanning probes, generally called “self-sensing probes” [10–19] with

a simplified implementation compared to optical lever detection. Giessibl demonstrated the use of piezoelectric tuning fork scanning probes to reveal atomic resolution of materials in ultra high vacuum [20]. Molecular resolution at the air/liquid interface has also been obtained with such probe on self assembled alkane monolayers showing very high sensitivity comparable with standard AFM cantilevered instruments [21]. For biology means, Rensen et al. used a tuning fork probe to image cells in air and in water [22], while Hofer et al. recently applied a tuning fork sensor in shear mode configuration to perform avidin and lysozyme antibody qualitative recognition [12]. Nevertheless, no works relate the quantitative study of forces implicated during protein stretching with such a probe in solution.

We propose here a complete procedure to (i) functionalize the tip of a piezoelectric tuning fork quartz sensor and (ii) quantify the withdrawal forces during the unfolding of the protein structures studied with that tip. These functionalized tips bring both compatibility with biological environments and targeted interactions with designated biological materials, as a “molecular harpoon”. The long tip (millimeters range) configuration of the tuning fork probe marks another radical difference compared to standard AFM using silicon based cantilevers with micrometers range tip. This needle-like configuration paves the way to new opportunities for sample access of scanning probe, where the embodiment of standard AFM cantilever can hinder nanoscale imaging or mechanical

* Corresponding author. Tel.: +33 0 1 69 08 25 47; fax: +33 0 1 69 08 84 46.
E-mail address: jerome.polesel@cea.fr (J. Polesel-Maris).

characterization with its too short tip. The probe will be tested for analyzing the stretching of BSA (bovine serum albumin) [23] protein. The BSA (and HSA, human serum albumin) are the principal carrier proteins of fatty acids and other hydrophobic molecules such as lysolecithin, bilirubin and bile salts in circulating plasma, and these proteins are also capable of binding with metals, hormones and a broad spectrum of therapeutic drugs. Hence, studying their interactions with various chemical groups has attracted much attention for understanding many biological systems, as well as for improving surface immobilization of proteins in biotechnology.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All standard chemicals, including *p*-dialzo-*N,N*-diethyl-toluidine hemi(zinc chloride) salt, 4 aminophenol and 1,4-phenylenediamine dihydrochloride and solvents were of research grade, purchased from Sigma Aldrich and used as received. Cathodic electrophoretic painting (GY85-0030) was provided by BASF Coatings GmbH (Muenster, Germany). Electrically conductive silver epoxy EPO-TEK H21D glue was purchased from Polytec France S.A. 50 μm diameter platinum/iridium Pt90/Ir10 wire, muscovite mica samples, and Teflon sheets were purchased from Goodfellow, Cambridge Ltd – Huntingdon. 10 μm diameter carbon fiber was purchased from HEXCEL (Les Avenières France). Acetone removable varnish (BLOCJELT Rouge) was purchased from ITW Spraytec (Asnières sur Seine, France). Iron particles were purchased from VWR (98%, mean particle size 45–100 nm). Gold substrates were obtained by successive metallic evaporation (BALZERS BAK600, Switzerland) of 5 nm of chromium underlayer and 200 nm of gold as top coat on microscopic glass slides or muscovite mica samples. Bovine serum albumin was purchased from Sigma–Aldrich and used as received.

2.2. FTIR characterization

Infrared spectra were recorded on a Bruker Vertex 70 spectrometer controlled by OPUS software. ATR mono-reflexion Pike-Miracle and Hyperion 2000 microscope accessories were implemented. The detector was for both accessories MCT working at liquid nitrogen temperature. For ATR, spectra acquisition was obtained at 2 cm^{-1} resolution after 256 scans.

2.3. Atomic force microscopy measurements

We used a custom home built AFM microscope to drive the tuning fork probe in AM-AFM (amplitude modulation AFM, also called tapping AFM) mode to approach and scan the surface (Fig. 1). As depicted in Fig. 1, the probe was clipped by a holder to the piezotube scanner (PT130.24, Physik Instrumente (PI) GmbH, Karlsruhe, Germany) of the AFM. The piezotube scanner control was performed via a home built XYZ high voltage amplifier driven by the RC4 and SC4 modules of the SPM controller from NANONIS-SPECS [24]. The stepper motor (VEXTA PX245M-03AA, Interinar Electronics LLC) of our AFM was also driven by the same SPM controller to do the auto approach of the probe to the surface. During operation, the oscillation of the tuning fork probe was maintained at constant excitation and electrically excited at its free resonance frequency set without tip interaction with the surface, but with the tip immersed in solution (Fig. 1). The displacement current from the tuning fork was amplified by a custom home-built transimpedance preamplifier with a gain of $R_{\text{trans}} = 80 \text{ M}\Omega$ and a bandwidth of 5 MHz. The constant excitation of the tuning fork was set with the probe far from the surface with an oscillation

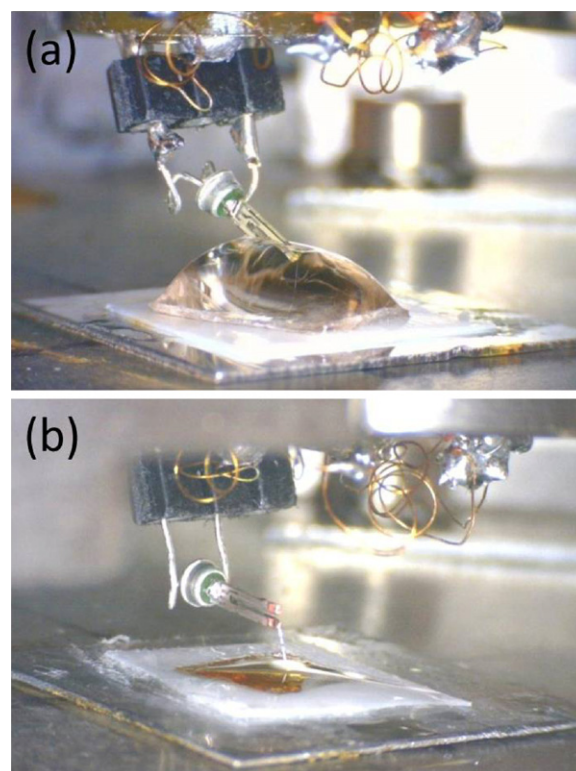


Fig. 1. Close view of the tuning fork scanning probe clipped on the custom home built AFM head, and scanning the mica surface, glued on a Teflon sheet, by its high aspect ratio platinum/iridium-carbon terminated tip. (a) Configuration with the whole probe immersed in the buffer droplet and scanning the surface, (b) configuration with only the tip kept immersed in the buffer droplet and scanning the surface.

amplitude of 22 mV from the preamplifier output, corresponding to a displacement current of the oscillating probe of 275 pA. The amplitude and the phase shift during approach/withdrawal spectroscopy curves were demodulated by the OC4 lock-in amplifier of the SPM controller from NANONIS-SPECS [24]. All the AFM spectroscopy measurements were realized in buffer solution composed of tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) at 10 mM, KCl at 10 mM and MgCl_2 at 10 mM, with a pH of 8.2. For each tip/sample case, a series of 19–37 acquisitions of amplitude and phase curves were recorded using the same experimental conditions, with the same tip on the same sample, but in different locations of the surface to ensure the reproducibility of the results. The approach and withdrawal speed were swept at 50 nm/s.

2.4. Tuning fork scanning probe fabrication

The probe were prepared from EPSON TOYOCOM C-001R tuning fork quartz resonators (EPSON Europe Electronics GmbH, Munich, Germany) with a free resonance frequency of 32.768 kHz, removed from their canister. The stiffness of one tuning fork prong was estimated at $k_{\text{prong}} = 2100 \text{ N/m}$ after measuring its dimensions under an optical microscope and applying the spring constant definition introduced by Karrai and Grober [25]. To work in ionic aqueous solution and to avoid electrical leakages, the tuning fork electrodes were coated with the cathodic electrophoretic paint diluted at 40% in MilliQ water. The quartz resonator was first cleaned in an ultrasonic bath in isopropanol followed by MilliQ water rinsing, and dried under nitrogen. Then, the electrophoretic coating of the sensor was realized by connecting its electrodes to a waveform generator (Wavetek Model 185) with very slow voltage ramp (3.4 V/min) from 0 to 17 V, and with a platinum counter

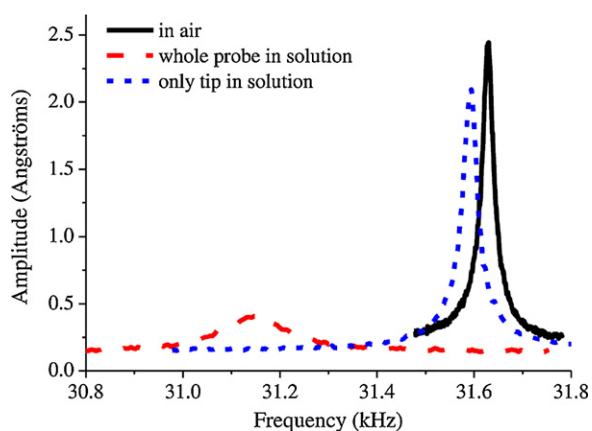


Fig. 2. Resonance curves obtained for three different configurations of the tuning fork probe with a fixed tip: in air (black filled curve), only the tip immersed in the buffer droplet as depicted in Fig. 1b (blue dotted curve), and the whole tuning fork scanning probe immersed in the buffer droplet as depicted in Fig. 1a (red dashed curve). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

electrode in the electrophoretic paint solution. After the sensor was rinsed in MilliQ water and heated at 140 °C during 15 min, we performed the same process two times more. This procedure provided a thin passivation layer on the tuning fork electrodes without any meniscus polymerization of the coating between the prongs, which could dramatically reduce the oscillation performance of the resonator. Electrically conductive silver epoxy EPO-TEK H21D glue (curing temperature 100 °C during 45 min) was used to fix the platinum/iridium wire to the tuning fork prong. The same glue was also added to the other prong to balance the tip weight, which increased the quality factor [26].

A quality factor in the order of 1800 was routinely obtained in air after mass compensation, and frequency detuning of the resonance toward the low frequencies due to the added mass of the tip was also observed around 31.63 kHz (Fig. 2). For the tip, a 50 μm in diameter platinum/iridium Pt90/Ir10 wire was glued to one free prong at the end of the tuning fork (Fig. 3a). The wire was electrochemically cut to the dimension of 1.5–2 mm long in a CaCl₂ aqueous solution [27] with a platinum counter electrode by applying a sinusoidal voltage of 22 V peak-to-peak at 400 Hz. Then, a 10 μm in diameter carbon fiber was glued with the EPO-TEK H21D at the end of the platinum/iridium wire using two micromanipulators (Research Instruments Inc., UK). A sharp apex of the carbon tip was realized by electrochemical etching in a NaHCO₃ aqueous solution [27] using the reverse etching geometry proposed by Fotino [28] but with a carbon counter-electrode. The AC voltage applied for the electrochemical etching of the carbon tip was 16 V peak-to-peak amplitude with a sinusoidal waveform of 46 Hz frequency. Tip radii below 1 μm, characterized by optical microscopy, were routinely obtained (Fig. 3b). Subsequently, the probe was rinsed in ethanol, MilliQ water and dried under nitrogen before functionalization.

2.5. Tip and surface functionalization

Most of the functionalized tips for conventional AFM are based (i) on silane chemistry for silicon tips [29] or (ii) on thiol SAM on gold coated tips [30]. These strategies present a limitation: the process used for tip functionalization depends of the surface nature, and is not suitable for any surface. To overcome this drawback in the case of carbon tips, we selected a versatile surface chemistry developed in our team [31–33]. This process called GraftFast® allows a one-step functionalization of a wide range of materials and was applied in that work to get functionalized tips and protein

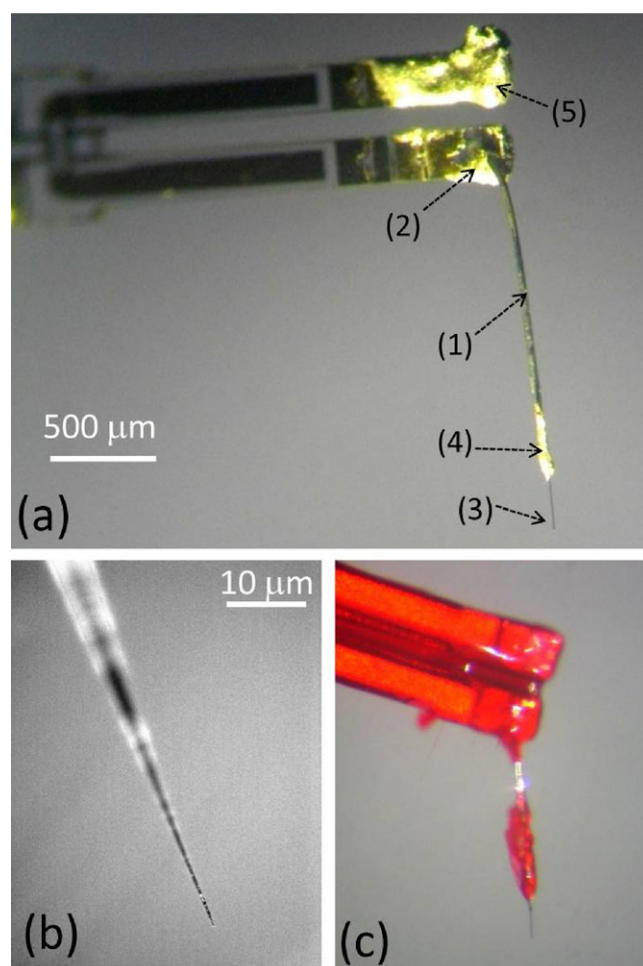
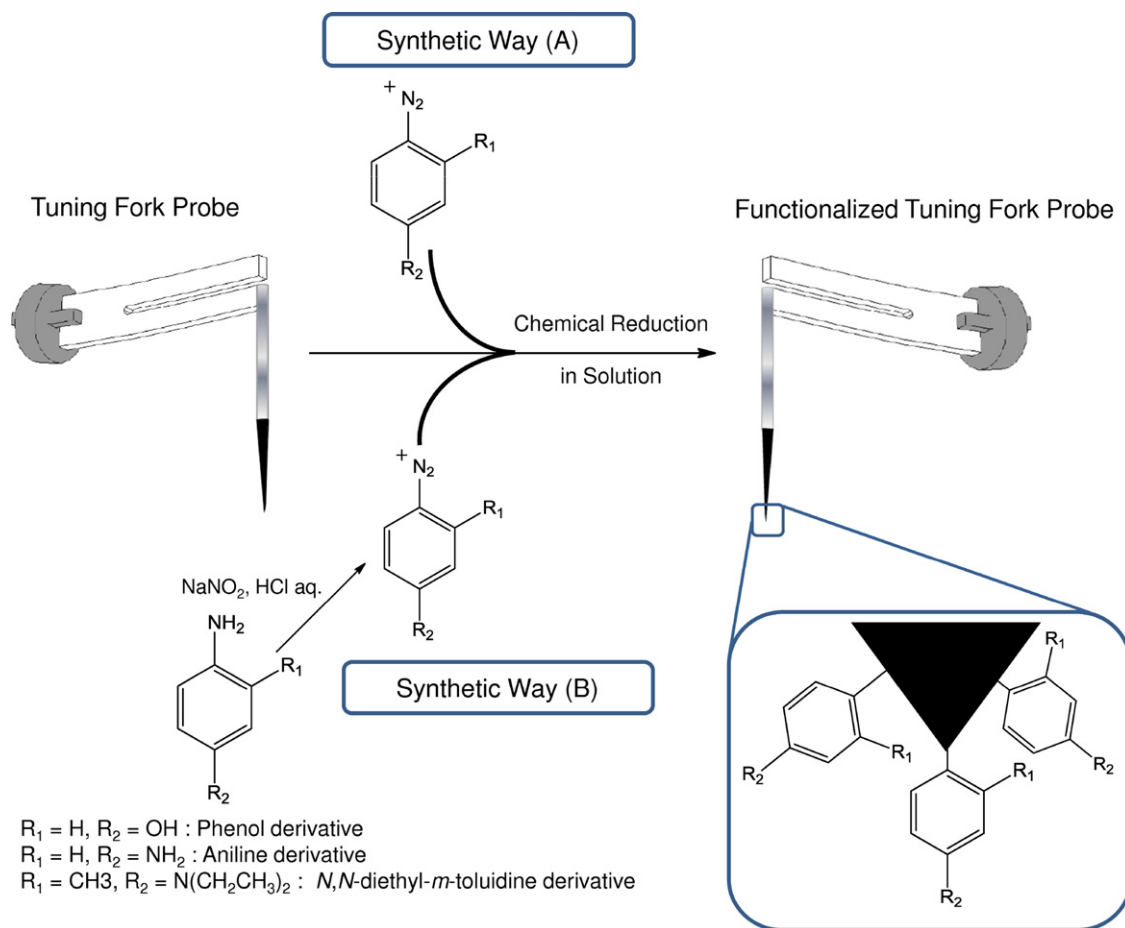


Fig. 3. Views of prepared tuning fork scanning probe for approach/withdrawal amplitude and phase spectroscopy. (a) General view of the complete probe with the platinum/iridium wire (1) glued on the tuning fork prong (2). The carbon tip (3) is glued at the end of the platinum/iridium wire (4). For the mass compensation, a drop of glue is also put on the opposite prong of the tuning fork (5). (b) Close view of the carbon tip end after electrochemical etching. (c) View of the tuning fork probe tip area covered by a varnish coating to prevent any chemical attack of the glue or tuning fork electrodes corrosion during the chemical functionalization of the carbon tip.

modified surfaces. This process creates a covalent and stable chemical bond between the pristine surfaces and the functionalized organic overlayer. A firm grafting of the chemical functionality on the tip but also a robust grafting of the protein on the substrate surface are essential to distinguish the unbinding events only due to the protein stretching and chains unfolding from direct intermolecular interactions during the AFM withdrawal force spectroscopy.

2.5.1. Tip functionalization

For the tip functionalization the method is based on a chemical reduction in solution of an aryldiazonium salt on long Pt/Ir tip terminated with a short additional carbon tip end as depicted in Fig. 3a. This Pt/Ir part of the tip insures a hard mechanical stiffness avoiding the bending of the tip during the immersion in the droplet as illustrated in Fig. 1. In order to protect the tuning fork itself from surface modification and mass uptake which could alter the resonance frequency and the quality factor, an acetone-soluble varnish was manually deposited on the tuning fork body and also on the glued areas as illustrated in Fig. 3c. Then according to the needs of changing tip end hydrophobicity and charge, the carbon tip extremities were functionalized with *p*-diazo-*N,N*-diethyl-*m*-toluidine, 4-diazo-phenol and 1-diazo-4-Phenylamine



Scheme 1. The two different chemical ways to functionalize the carbon tip.

hydrochloride through the GraftFast© protocols previously published [31,34] affording different tips bearing hydroxyl (–OH), amino (–NH₂) and methyl (–CH₃) groups. Because of the high IR absorption of carbon materials and the size of the tips, ATR FTIR analysis could not be used to characterize those grafted layers. But we performed ATR FTIR analyses on golden glass substrates introduced in the same reactive baths at the same time as the carbon tips. These indirect analyses allowed us to check the nature and quality of the grafted coatings. Then, two different chemical ways were used to functionalize the carbon tip according to the diazonium salt or amine precursor which was purchased (Scheme 1): (A) one based on the reduction in solution of the as received diazonium salt and the other one (B) based on *in situ* synthesis of diazonium salt from a precursor followed by their reduction in solution.

2.5.1.1. Synthetic way (A). *p*-Diazo-*N,N*-diethyl-*m*-toluidine hemi(zinc chloride) salt (0.294 g, 1 mM) was dissolved in MilliQ water (20 mL) under vigorous stirring. After complete dissolution, iron powder (200 mg) was then added to reduce the aryldiazonium salt in solution and start the overall grafting process. Tuning forks functionalized with a carbon tip were then introduced in the reactive bath for 15 min at room temperature. Afterwards, they were rinsed with acetone and ethanol and dried under N₂.

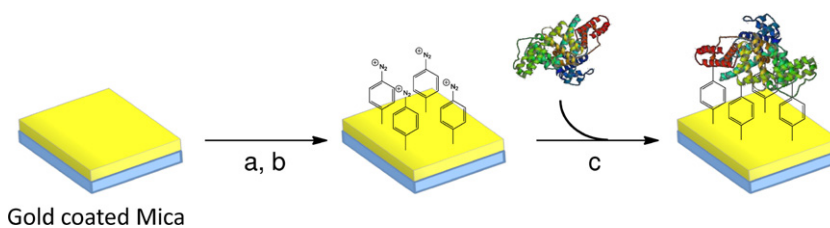
2.5.1.2. Synthetic way (B). 4-Aminophenol (1.08 g, 9.96 mM) or 1,4-phenylenediamine dihydrochloride (1.81 g, 9.96 mM) were dissolved in a solution of HCl 0.5 N (100 mL). To 10 mL of these solutions, 10 mL of a 0.1 N NaNO₂ solution were added dropwise under magnetic stirring. Iron powder (200 mg) was then added to

reduce the aryldiazonium salt in solution and start the overall grafting process. Tuning forks with a functionalized carbon tip were then introduced in the reactive bath for 15 min at 40 °C. Afterwards, they were rinsed with acetone and ethanol and dried under N₂.

2.5.2. Surface functionalization and protein immobilization

Muscovite mica samples were in a first hand cut in squares of 1 cm², cleaved and gold coated by evaporation in a vacuum chamber. According to the process summarized above and detailed in a previous paper [31], addition of sodium nitrite (1 eq.) to an acidic solution (HCl 0.25N) of *p*-phenylenediamine followed by addition of iron powder (200 mg) start the overall grafting process. Then gold coated mica was introduced and left in the solution for 15 min at 40 °C. Afterwards, samples were rinsed with deionized water and acetone in an ultrasonic bath for 5 min. The resulting polyaminophenylene (PAP) film on gold coated mica was analyzed by ATR FTIR (Supporting Information, Figure S1a).

In a second hand we need to covalently graft the protein layer. So, previous works [34,35] described a versatile way dedicated to chemical immobilization of biological materials. This extended GraftFast© process lead to spontaneously grafted biomolecules as proteins or nucleic acids on surfaces without conventional chemical activation and without releasing side products. We used this process based on a grafted-diazonium modified surface to fix compounds bearing chemical groups able to directly react with diazonium groups such as amines, phenols, etc. This procedure leads to graft in random orientations bovine serum albumin proteins on gold coated mica as depicted in Scheme 2.



Scheme 2. Chemical functionalization of gold-coated mica by GraffFast© process and BSA immobilization on activated surface. (a) 1,4-Phenylenediamine dihydrochloride, NaNO₂, HCl 0.25N, iron powder, 15 min, 40 °C. (b) NaNO₂, HCl 0.25N, 60 s r.t. (c) BSA in MilliQ water at room temperature.

The subsequent diazotisation of the grafted PAP layer was performed in aqueous medium. The PAP layer was soaked for 60 s on acidic nitrite sodium 0.1N solution, rinsed with dry acetone then finally dried with a flow of nitrogen. The diazotisation of the pristine PAP layer was confirmed by ATR FTIR spectra (Figure S1b) in Supporting Materials), with the appearance of a peak at 2257 cm⁻¹ characteristic of the diazonium salt. 200 μl of a solution of 0.9 mM BSA in MilliQ water was then deposited on the diazonium-rich mica substrate and after 15 min, the resulting sample was rinsed with a 10 mM TRIS solution. Spontaneous surface grafting [35] of BSA proteins was confirmed by infrared spectroscopy (Supporting Information, Figures S1c and S1d).

2.6. Protein surface assembling

BSA coated mica pieces were glued on a Teflon surface clamped on stainless steel holders specially designed to fit our custom home built AFM (Fig. 1). The hydrophobic Teflon area was larger than the mica sample area to confine the buffer droplet and avoid liquid leakages [36]. LOCTITE 770 polyolefin primer combined with the LOCTITE 406 glue provided a good adhesion of the mica substrate on Teflon. Samples were then immediately characterized by AFM spectroscopy.

3. Results and discussion

3.1. AFM amplitude and phase spectroscopy

To characterize the chemical interaction of the -CH₃, -NH₂ and -OH terminated tips on the BSA proteins grafted on the gold coated mica surface, we performed dynamical AFM spectroscopy and recorded simultaneously the amplitude and phase signals during the approach of the tip to the surface. The oscillation amplitude and phase were modified by the surface forces acting on the tip end. For all the AFM spectroscopy measurements shown in this work, we privileged the configuration where only the tip was immersed in the buffer solution rather than the full immersion of the entire probe, in order to keep the highest quality factor, and by the same the highest sensitivity, as illustrated on the resonance curves in Fig. 2. When only the tip was immersed in the solution, we found a quality factor of 1200, to compare with 304 when the complete probe was immersed in the buffer.

Approach and withdrawal spectroscopy curves in amplitude and phase using the three different chemically-terminated carbon tips were performed on the BSA grafted surface, as illustrated in Fig. 4. The approach curves (black lines) are similar for amine and methyl terminated tips to the uncoated carbon tip case shown in Figure S2 (Supporting Information). The reduction of the oscillation amplitude and the increase of the phase shift value, due to the tip compression on the surface, are also observed for the hydroxyl terminated tip but with a short plateau region during the tip compression. We assume steric interactions of the hydroxyl tip with the hydrophobic sites of the BSA proteins to be responsible for that peculiar behavior. On the withdrawal curves, amine and

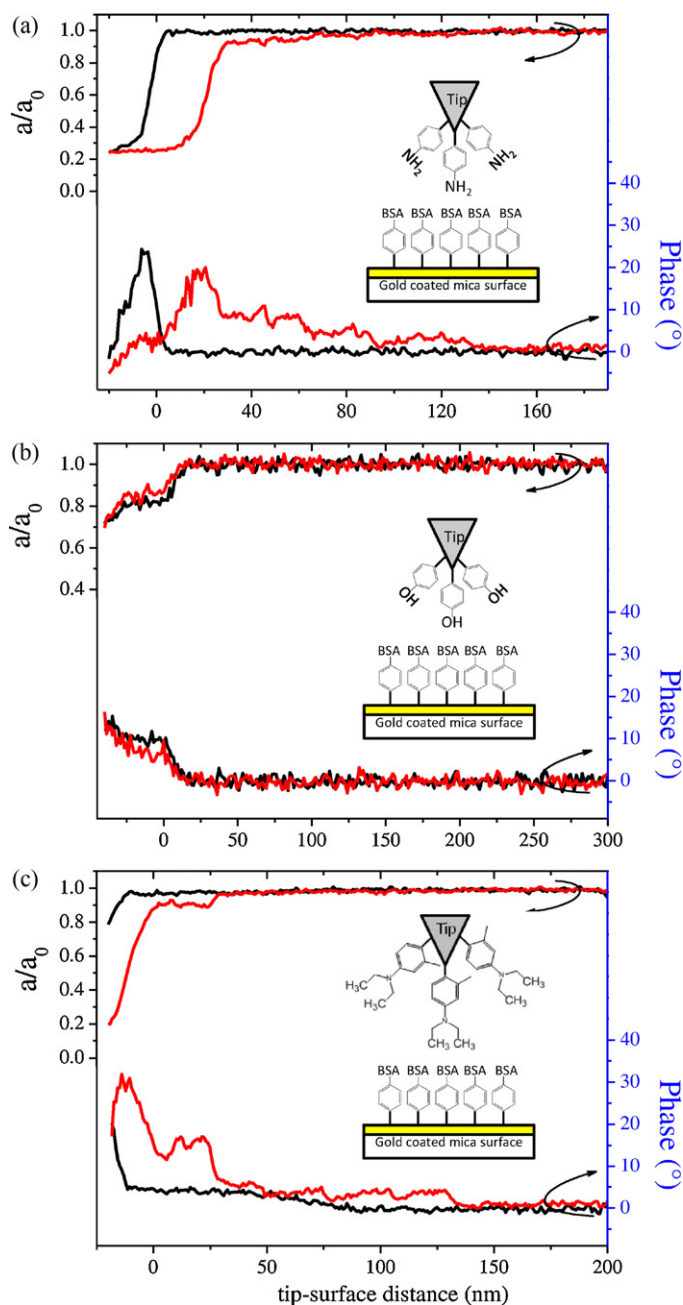


Fig. 4. Approach (in black)/withdrawal (in red) amplitude and phase spectroscopy curves obtained for three different functionalizations of the carbon tip on a gold coated mica surface with grafted BSA proteins: (a) amine terminated tip, (b) hydroxyl terminated tip and (c) methyl terminated tip. The approach and withdrawal speed of were swept at 50 nm/s. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

methyl terminated tips exhibited abrupt changes in the first and the second domain, as defined in Figure S2 of Supporting Information, and sequences of these non-linear jumps appeared clearly in the phase curve before the probe returns to its original oscillation amplitude far from the surface with a phase shift equal to zero. This behavior was observed on the BSA sample on 94.7% of the withdrawal curves with the $-\text{NH}_2$ -terminated tip and on 89.5% of the withdrawal curves with the $-\text{CH}_3$ -terminated tip as related in Table T1 (in Supporting Information). For the $-\text{OH}$ -terminated tip, the statistic of withdrawal curves containing non-linear jumps fell to 30%. The non-linear jumps contained in the withdrawal curves in amplitude and phase will be converted in force value in the next paragraph, with the calculation detailed in Supporting Information.

Reference measurements of approach and withdrawal spectroscopy curves in amplitude and phase using the three different kind of chemically terminated carbon tips were performed on a clean gold-coated mica surface (Supporting Information, Figure S3), and did not present non-linear jumps during the tip withdrawal.

3.2. Data analysis and withdrawal forces of unbinding events

Contact AFM based on low spring constant silicon cantilevers is more frequently used than dynamic AFM, as amplitude modulation (AM) or frequency modulation (FM) AFM, to perform force spectroscopy on proteins. Indeed, Contact AFM gives directly access to the interaction force values after a simple calibration of the cantilever. This is not the case for dynamic AFM where oscillating information as amplitude, phase and frequency should be converted by complex analytical and numerical treatments to obtain force gradient and force values. We detailed the formalism to convert these dynamic AFM data into force gradient and force values in Supporting Information. Fig. 5 illustrates series of force gradient curves acquired on BSA proteins with the three different functionalized tips $-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$ and $-\text{OH}$. These curves were calculated using results of withdrawal amplitude and phase spectroscopy signals as shown in Fig. 4 with Eq. (SE7) (Supporting Information). A standard deviation of ± 13 pN/nm has been evaluated from a noise analysis for the minimal force gradient detectable by the probe (Supporting Information, Figure S4).

Amino and methyl-terminated tips reveal abrupt changes in the force gradient curves with clear sequences of pull-off jumps during the tip withdrawal, revealing strong interactions between the functionalized tip and the proteins fixed on the surface. These non-linear jumps represent the molecular elasticity of a few BSA molecules tethered in parallel between the probe tip and the substrate. The multiple regions of force gradient instability may be attributed to (i) mechanical unfolding of a few BSA molecules or (ii) different regions of an individual BSA molecule or (iii) detachment of individually tethered molecules from the probe tip. BSA unfolding can take place at large distances during stretching, until jumps sequence from 150 to 200 nm as illustrated in Fig. 5. The abrupt unbinding jumps were observed where chain segments of the BSA molecules were adsorbed and tethered firmly enough to the surface to allow stretching of the protein molecules between the probe tip and the substrate, probably inducing mechanical denaturation of BSA. The situation for the hydroxyl terminated tip is more complicated: we detected some force gradient changes but with lower probability as depicted in Table T1 with 30% of unbinding jumps curves, compared to the 94.7% and 89.5% of success for respectively the amino and methyl terminated tips. We thus assume that the hydroxyl terminated tip presents less probability to interact with BSA proteins.

The retraction portion of the curve highlights the pull-off force or the force required to break short-range interactions or specific binding events. We call them unbinding events. Fig. 6 illustrates a detailed view of one withdrawal curve of $-\text{CH}_3$ tip on BSA. Force

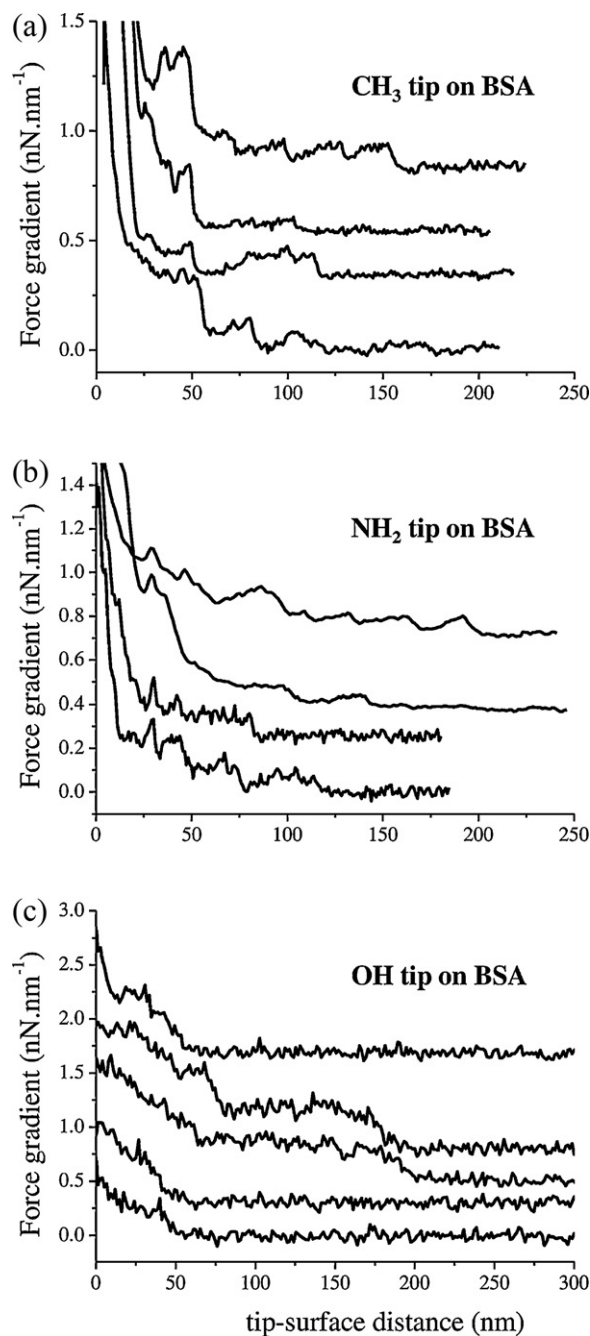


Fig. 5. Series of force gradient curves acquired on BSA proteins with the three different functionalized tip: (a) $-\text{CH}_3$, (b) $-\text{NH}_2$ and (c) $-\text{OH}$. These curves were calculated using the experimental results of withdrawal amplitude and phase spectroscopy signals. $-\text{CH}_3$ and $-\text{NH}_2$ terminated tips exhibit sequences of clear unbinding events compared to the $-\text{OH}$ tip. The curves were shifted vertically for the sake of clarity.

gradient curves allow to calculate unbinding force values, but taking care of some conditions for the data treatment as detailed by Eqs. (SE1)–(SE7) in Supporting Information. Doing this, the withdrawal force necessary to complete one unbinding event follows the integral equation (1) (e.g. grey area under the slope in Fig. 6) with:

$$F_{\text{withdrawal}} = 2 \int_{d_{\text{TS}}(1)}^{d_{\text{TS}}(2)} k_{\text{TS}}(u) du = (k_{\text{TS}}(d_{\text{TS}}(2)) - k_{\text{TS}}(d_{\text{TS}}(1))) (d_{\text{TS}}(2) - d_{\text{TS}}(1)) \quad (1)$$

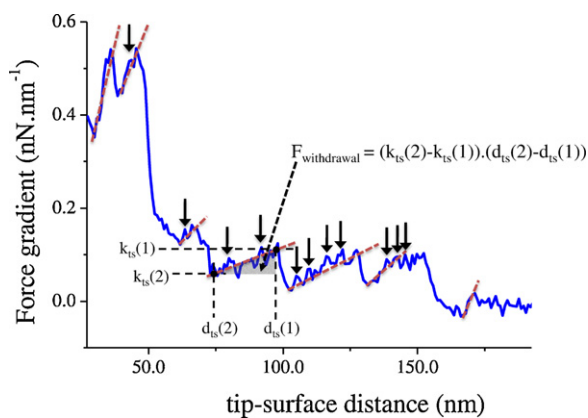


Fig. 6. Detailed force gradient curve of unbinding events sequence for the $-\text{CH}_3$ tip withdrawal on BSA sample. The slopes of a linear fit (red dashed lines) to the elastic response were used to calculate the unbinding forces of the interaction as given in equation (1) (e.g. grey area under the linear fit). Several unfolding intermediates during the withdrawal are indicated by small vertical arrows. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

With the force gradient of the tip-sample interaction (d_{ts} depending of the tip-surface distance d_{ts} , sometimes called elasticity by some authors [37]). We define the withdrawal distance for one unbinding event as $d_{ts}(2) - d_{ts}(1)$.

Histograms of Fig. 7 show the counted withdrawal forces of unbinding events for the $-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$ and $-\text{OH}$ terminated tips on BSA samples. They were produced with a custom home-built procedure written in Origin C language (Origin 8.0, OriginLab) detecting the unbinding event, and doing the linear fitting and calculation of the withdrawal force for each unbinding events. For the methyl tip, we highlighted two peak values in the histogram of Fig. 7a: one at low withdrawal force of 150 ± 100 pN (mean \pm standard error), and one other at 830 ± 175 pN with characteristic withdrawal distances of 23 ± 5 nm during proteins stretching (Supporting Information, Figure S5). The larger peak value is in the same order of magnitude as results obtained in Contact AFM experiments by Wang et al. who measured (870 ± 390 pN [38]), or Rixman et al. (790 ± 190 pN but on human serum albumin (HSA) interacting with methyl functionality [39]). We assume that the smaller peak value of 150 pN originates from unfolding intermediates appearing in the linear part before the unbinding event as illustrated in Fig. 6 (vertical small arrows) with characteristic withdrawal distances of 4 ± 4 nm (Supporting Information, Figure S5). These unfolding intermediates can appear only in dynamic AFM operation for reasons explained by Higgins et al. and Janovjak et al.: small intermediate force peaks in the force modulated curves should come from the higher loading rate, proportional to the product νk_{eff} (with ν the tip velocity), obtained with an oscillating AFM tip compared to standard force spectroscopy by Contact AFM [37]. Due to the oscillatory movement of the cantilever, tip velocities as high as tens of micrometers/s are reached both toward and away from the direction of the quasi-static pulling force. In our case, we achieved tip velocities in the order of $\nu = a\omega_d = 46 \mu\text{m/s}$. Higgins et al. and Janovjak et al. showed that the detection of unfolding intermediates in bacteriorhodopsin depends on the pulling velocity, and that an increased velocity leads to the observation of a greater number of intermediates [40]. The latter are even more visible when working at very small oscillating amplitude, as showed by Higgins et al. [41]. That is a clear advantage of oscillating AFM compared to Contact AFM for force spectroscopy, moreover when working with very small amplitude and high spring constant as it is the case for tuning fork AFM probes more prone to access to mechanical unfolding intermediates during proteins stretching.

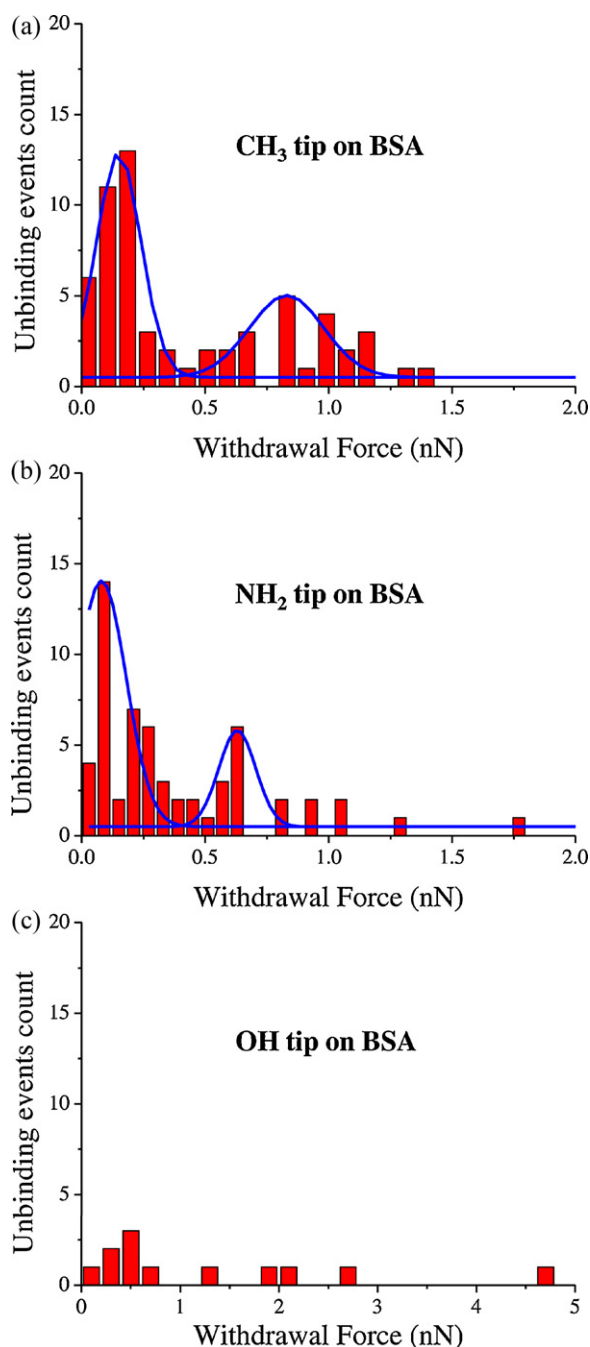


Fig. 7. Histogram plotted from the withdrawal forces of BSA chains unfolding for the three different functionalized tip: (a) $-\text{CH}_3$, (b) $-\text{NH}_2$ and (c) $-\text{OH}$. $-\text{CH}_3$ and $-\text{NH}_2$ terminated tips show clearly two withdrawal force peaks, highlighted by Gaussian function fitting. The unbinding statistic for the $-\text{OH}$ terminated tip is too low to reveal clear withdrawal peak force.

For the amine tip, we found a similar configuration with two peak values on the histogram in Fig. 7b: one at low withdrawal force of 80 ± 100 pN with characteristic withdrawal distances of 4 ± 3 nm, and another at 630 ± 90 pN with characteristic withdrawal distances of 20 ± 3 nm (Supporting Information, Figure S5). Although the latter withdrawal force value is higher than previously reported ones from Contact AFM experiments by Wang et al. who measured 380 ± 140 pN [38], we confirmed here the general trend that $-\text{NH}_2$ /BSA interaction forces are lower than for $-\text{CH}_3$ functionality. As above, we assume the former peak observed for the amine tip arises from unfolding intermediates observed in the

linear part before the unbinding event as for the methyl terminated tip, due to the oscillating tip reasons explained above. Figure S6 (Supporting Information) illustrates unfolding intermediates for the amine tip on BSA.

For the hydroxyl tip (histogram in Fig. 7c), we obtained very low statistics of unbinding events, as already indicated in Table T1. In this condition, it is not possible to reveal distinguishable withdrawal force peaks on the histogram. The few unbinding measurements obtained revealed some high force values between 1 and 5 nN, but no significant peak in the order of magnitude of hundred picoNewtons as for unfolding intermediates detected for amine and methyl tips. That is a signature that –OH functionality is less prone to protein adsorption compared to –CH₃ and –NH₂ groups. Kidoaki et al. gave the same conclusions for the lower adhesion force of –OH functionality on albumin compared to –NH₂, with the higher adhesion obtained with –CH₃ functionality [42]. We note that Wang et al. detected also high pull-off forces of 2.54 nN for –OH/BSA AFM spectroscopy. The explanation given by Wang et al. could also apply here: the phenols of the –OH terminated tip may not have packed as tightly as the other –NH₂ and –CH₃ tips evaluated in this study. If this were the case, then the BSA protein could be inserted into the hydrophobic (–phenyl–) backbone region during AFM force measurements, which would explain the high pull-off forces sometimes observed. Besides, neutral charged and hydrophilic–OH functionality has been shown to exhibit reduced protein adsorption in several works [43–45]. The same works showed that the hydrophilic –NH₂ functionality presents a positive charge that promotes favourable protein adsorption. Finally, the –CH₃ group provides neutral charge and hydrophobic surfaces for biomaterials that also increases high protein adsorption and give similar adsorption parameters as for –NH₂ functionalized surfaces with some proteins (fibronectin, monoclonal antibodies, integrin) as depicted by Keselowsky et al. [46]. The unbinding events we observed are mainly due to collective interaction of BSA proteins on several –NH₂ or –CH₃ functionalities covering the tip end. But considering the low flexibility of the molecules grafted on the tip, we attribute the unbinding events to the unfolding of BSA flexible chains. Also, dynamic AFM operation reveals unfolding intermediates before unbinding event during the stretching of the protein chains. Previous works related these low force unfolding intermediates to disruption of hydrogen bonds that stabilize the final folded state of the proteins [37,41]. The results of the experiments we did cannot solve on which amino acid the protein chains are bound on the chemical groups of the tip. We are working in this way to realize future single protein force spectroscopy with this new tuning fork probe. Nevertheless, in the frame of this work, our dynamic AFM force spectroscopy results on proteins stretching confirm our approach in terms of force sensitivity of the sensor to go further in protein characterization.

4. Conclusion

The goal of this work was to demonstrate a new operating protocol for self-sensing piezoelectric tuning fork and versatile force spectroscopy on proteins in buffer solution. This approach provided detailed information on interactions of proteins with different chemical functionalities adjusting differently hydrophobicity/hydrophilicity and charge. Specifically, we showed that dynamic AFM spectroscopy with a tuning fork probe can provide quantitative information on the magnitude of adhesion forces that can be used to guide the development of adhesion-resistant materials; to analyze protein patterned biochips, to obtain fundamental information on cell-protein-material interaction in tissue engineering. By its physical properties of oscillation, with its high spring constant and very small oscillation amplitude regime, the proposed

tuning fork probe is sensitive to low force unfolding intermediates during the protein stretching which is not the case for standard Contact AFM cantilevers used for force spectroscopy. The force sensitivity of this new probe has been quantified on proteins in buffer solution. In this sense, we consider that this work can contribute to the development of a new kind of self-sensing nanosensors for future specific protein characterization.

Acknowledgements

We are indebted to Carlos Caldas, François Thoyer, Christophe Lubin and Sylvain Foucart concerning the mechanical design and preamplifier electronics fabrication of the custom home built AFM microscope. We acknowledge Jacques Cousty and Laurent Pham Van for fruitful discussions. This work has been financially supported by the Region Ile-de-France in the framework of C’Nano IdF. C’Nano IdF is the nanoscience competence center of Paris Region, supported by CNRS, CEA, MESR and Region Ile-de-France.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.snb.2011.11.032.

References

- [1] M. Eaton, Nanomedicine, Industry-wise research, *Nature Materials* 6 (2007) 251–253.
- [2] A. Engel, Y. Lyubchenko, D. Muller, Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work, *Trends in Cell Biology* 9 (1999) 77–80.
- [3] L. Hood, J.R. Heath, M.E. Phelps, B.Y. Lin, Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine, *Science* 306 (2004) 640–643.
- [4] D.J. Muller, Y.F. Dufrene, Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology, *Nature Nanotechnology* 3 (2008) 261–269.
- [5] D.J. Muller, AFM: a nanotool in membrane biology, *Biochemistry* 47 (2008) 7986–7998.
- [6] C. Möller, M. Allen, V. Elings, A. Engel, D.J. Müller, Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces, *Biophysical Journal* 77 (1999) 1150–1158.
- [7] A. San Paulo, R. García, High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes, *Biophysical Journal* 78 (2000) 1599–1605.
- [8] N.H. Thomson, The substructure of immunoglobulin G resolved to 25 kDa using amplitude modulation AFM in air, *Ultramicroscopy* 105 (2005) 103–110.
- [9] G. Meyer, N.M. Amer, Novel optical approach to atomic force microscopy, *Applied Physics Letters* 53 (1988) 1045–1047.
- [10] J.L. Arlett, J.R. Maloney, B. Gudlewski, M. Muluneh, M.L. Roukes, Self-sensing micro- and nanocantilevers with attonewton-scale force resolution, *Nano Letters* 6 (2006) 1000–1006.
- [11] S. Higuchi, H. Kuramochi, O. Kubo, S. Masuda, Y. Shingaya, M. Aono, et al., Angled long tip to tuning fork probes for atomic force microscopy in various environments, *Review of Scientific Instruments* 82 (2011) 43701.
- [12] M. Hofer, S. Adamsmaier, T.S. van Zanten, L.A. Chtcheglova, C. Manzo, M. Duman, et al., Molecular recognition imaging using tuning fork-based transverse dynamic force microscopy, *Ultramicroscopy* 110 (2010) 605–611.
- [13] M. Koopman, B.I. de Bakker, M.F. Garcia-Parajo, N.F. van Hulst, Shear force imaging of soft samples in liquid using a diving bell concept, *Applied Physics Letters* 83 (2003) 5083–5085.
- [14] J.V. Macpherson, P.R. Unwin, Combined scanning electrochemical-atomic force microscopy: a new approach for imaging membrane transport, *European Biophysics Journal* 29 (2000) 385.
- [15] J. Polesel-Maris, L. Aeschimann, A. Meister, R. Ischer, E. Bernard, T. Akiyama, et al., Piezoresistive cantilever array for life sciences applications, *Journal of Physics: Conference Series* 61 (2007) 955–959.
- [16] J. Polesel-Maris, C. Lubin, F. Thoyer, J. Cousty, Combined dynamic scanning tunneling microscopy and frequency modulation atomic force microscopy investigations on polythiophene chains on graphite with a tuning fork sensor, *Journal of Applied Physics* 109 (2011) 074320.
- [17] B. Rogers, T. Sulchek, K. Murray, D. York, M. Jones, L. Manning, et al., High speed tapping mode atomic force microscopy in liquid using an insulated piezoelectric cantilever, *Review of Scientific Instruments* 74 (2003) 4683–4686.
- [18] T. Trevehan, M. Watkins, A.L. Shluger, J. Polesel-Maris, S. Gauthier, L.N. Kantorovich, A comparison of dynamic atomic force microscope set-ups for performing atomic scale manipulation experiments, *Nanotechnology* 18 (2007).
- [19] J. Zhang, S. O’Shea, Tuning forks as micromechanical mass sensitive sensors for bio- or liquid detection, *Sensors and Actuators B-Chemical* 94 (2003) 65–72.

- [20] F.J. Giessibl, Advances in atomic force microscopy, *Reviews of Modern Physics* 75 (2003) 949–983.
- [21] L. Pham Van, V. Kyrylyuk, J. Polesel-Maris, F. Thoyer, C. Lubin, J. Cousty, Experimental three-dimensional description of the liquid hexadecane/graphite interface, *Langmuir* 25 (2009) 639–642.
- [22] W.H.J. Rensen, N.F. van Hulst, S.B. Kammer, Imaging soft samples in liquid with tuning fork based shear force microscopy, *Applied Physics Letters* 77 (2000) 1557–1559.
- [23] H.N. Kalpana, B.C. Channu, C. Dass, P.J. Houghton, K.N. Thimmaiah, Hydrophobic interactions of phenoxazine modulators with bovine serum albumin, *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* 112 (2000) 51–61.
- [24] 8005 Z. Technoparkstrasse 1 NANONIS-SPECS Zurich GmbH Switzerland, in <http://www.specs-zurich.com/en/SPM-Control-System.html>.
- [25] K. Karrai, R.D. Grober, Piezo-electric tuning fork tip—sample distance control for near field optical microscopes, *Ultramicroscopy* 61 (1995) 197–205.
- [26] A. Castellanos-Gomez, N. Agrait, G. Rubio-Bollinger, Dynamics of quartz tuning fork force sensors used in scanning probe microscopy, *Nanotechnology* 20 (2009) 215502.
- [27] A.J. Nam, A. Teren, T.A. Lusby, A.J. Melmed, Benign making of sharp tips for STM and FIM: Pt, Ir, Au, Pd, and Rh, *Journal of Vacuum Science & Technology B* 13 (1995) 56.
- [28] M. Fotino, Nanotips by reverse electrochemical etching, *Applied Physics Letters* 60 (1992) 2935.
- [29] C.K. Riener, C.M. Stroh, A. Ebner, C. Klampfl, A.A. Gall, C. Romanin, et al., Simple test system for single molecule recognition force microscopy, *Analytica Chimica Acta* 479 (2003) 59–75.
- [30] A. Berquand, N. Xia, D.G. Castner, B.H. Clare, N.L. Abbott, V. Dupres, et al., Antigen binding forces of single antilysozyme fv fragments explored by atomic force microscopy, *Langmuir* 21 (2005) 5517–5523.
- [31] P. Viel, X.T. Le, V. Huc, J. Bar, A. Benedetto, A. Le Goff, et al., Covalent grafting onto self-adhesive surfaces based on aryldiazonium salt seed layers, *Journal of Materials Chemistry* 18 (2008) 5913.
- [32] V. Mevellec, S. Roussel, S. Palacin, T. Berthelot, C. Baudin, A. Trenggono, et al., Method for preparing an organic film at the surface of a solid substrate in non-electrochemical conditions, solid substrate thus formed and preparation kit, U.S. Patent PCT/FR2007/052556 (WO/2008/078052) (2008).
- [33] V. Mevellec, S. Roussel, L. Tessier, J. Chancolon, M. Mayne-L'Hermite, G. Deniau, et al., Grafting polymers on surfaces: a new powerful and versatile diazonium salt-based one-step process in aqueous media, *Chemistry of Materials* 19 (2007) 6323–6330.
- [34] T. Berthelot, G. Deniau, V. Huc, T. Le Xuan, F. Nekelson, S. Roussel, et al., Method for assembling two surfaces, or one surface, with a molecule of interest, U.S. Patent PCT/EP2009/053977 (WO/2009/121944) (2009).
- [35] T. Berthelot, A. Garcia, X.T. Le, J. El Morsli, P. Jégou, S. Palacin, et al., Versatile toolset for DNA or protein immobilization: toward a single-step chemistry, *Applied Surface Science* 257 (2011) 3538–3546.
- [36] D.J. Muller, A. Engel, Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins, *Nature Protocols* 2 (2007) 2191–2197.
- [37] H. Janovjak, D.J. Müller, A.D.L. Humphris, Molecular force modulation spectroscopy revealing the dynamic response of single bacteriorhodopsins, *Biophysical Journal* 88 (2005) 1423–1431.
- [38] M.S. Wang, L.B. Palmer, J.D. Schwartz, A. Razatos, Evaluating protein attraction and adhesion to biomaterials with the atomic force microscope, *Langmuir* 20 (2004) 7753–7759.
- [39] M.A. Rixman, D. Dean, C.E. Macias, C. Ortiz, Nanoscale intermolecular interactions between human serum albumin and alkanethiol self-assembled monolayers, *Langmuir* 19 (2003) 6202–6218.
- [40] H. Janovjak, J. Struckmeier, M. Hubain, A. Kedrov, M. Kessler, D.J. Müller, Probing the energy landscape of the membrane protein bacteriorhodopsin, *Structure* 12 (2004) 871–879.
- [41] M.J. Higgins, J.E. Sader, S.P. Jarvis, Frequency modulation atomic force microscopy reveals individual intermediates associated with each unfolded I27 titin domain, *Biophysical Journal* 90 (2006) 640–647.
- [42] S. Kidoaki, T. Matsuda, Adhesion forces of the blood plasma proteins on self-assembled monolayer surfaces of alkanethiolates with different functional groups measured by an atomic force microscope, *Langmuir* 15 (1999) 7639–7646.
- [43] P. Thevenot, W. Hu, L. Tang, Surface chemistry influences implant biocompatibility hidden epitopes exposed epitopes, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8 (2008) 270–280.
- [44] M. Lindblad, M. Lestelius, A. Johansson, P. Tengvall, P. Thomsen, Cell and soft tissue interactions with alkane thiols on gold surfaces, *Biomaterials* 18 (1997) 1059–1068.
- [45] Q. Tang, C.-H. Xu, S.-Q. Shi, L.-M. Zhou, Formation and characterization of protein patterns on the surfaces with different properties, *Synthetic Metals* 147 (2004) 247–252.
- [46] B.G. Keselowsky, D.M. Collard, A.J. García, Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66 (2003) 247–259.

Biographies

Jérôme Polesel-Maris is researcher in Surface Physics at CEA Saclay in the SPCSI group of the IRAMIS institute. In 2002, he obtained his master's degree in Physics at the University of Toulouse III (France), followed by a PhD degree in Surface Physics at CEMES-CNRS (NanoSciences Group) of Toulouse (France) in 2005. Between 2005 and 2008, he was R&D Engineer in the bioMEMS group of CSEM at Neuchâtel (Switzerland) to develop new microfabricated tools for the life sciences. His skills include scanning probe techniques (AFM, STM) and electronics design. His current research interests include biosensors development and self-sensing scanning probe microscopy.

Jérémy Legrand is Master student from the University of Orsay Paris XI (France). He is currently in internship position in the SPCSI group of the IRAMIS institute at CEA Saclay (France). His main research interests are scanning probe techniques and material sciences.

Thomas Berthelot is researcher in Surface Chemistry at CEA Saclay in the SPCSI group of the IRAMIS institute. After his licence's degree in Biochemistry, he obtained his master's degree (2002) in Organic Chemistry at the University of Bordeaux I (France), followed by a PhD degree in Bioorganic Chemistry at the bioorganic chemistry group at the University of Bordeaux II (France). In 2006, he joined the CEA Saclay (France) and obtained his permanent position in 2007. Between 2007 and 2009, he participated in the creation of a surface chemistry start-up (Pegastech SA, France). His current research interests include surface chemistry and biosensors development.

Alexandre Garcia obtained is engineer degree in Material sciences at the ENSCM (France) in 2007. After his master's degree in chemistry and physical chemistry for life science in 2008 at ENSCP (France), he obtained his PhD in Material Science in 2011 at the Ecole Polytechnique (France). His skills include organic and surface chemistry and polymer metallization. Since 2011, he joined the Saint Gobain research center as a permanent R&D engineer.

Pascal Viel, born in 1961, obtained his Ph.D. in electrochemistry from the Pierre et Marie Curie University of Paris (France) in 1990. In the same year he joined the Commissariat à l'Energie Atomique in Saclay. His domains of interests have always been turned to surface chemistry. His early work was dedicated to the grafting and growth of vinyl films on metallic surfaces by electropolymerization. Now his research covers many aspects of basic and technological issues of immobilized thin organic films for liquid waste treatments and biotechnologies.

Ali Makky is a post-doctoral researcher in Surface Physics at CEA Saclay in the SPCSI group of the IRAMIS institute. He obtained his doctorate degree in pharmacy at the Saint-Joseph University (Beirut, Lebanon). Then, he obtained his master degree, followed by a PhD degree in Biopharmacy and Pharmacotechnology at the University of Paris XI, faculty of pharmacy in the department of Biopharmaceutics, pharmaceutical technologies and physicochemistry. His research interests mainly focus on drug delivery, the construction and characterization of biomimetic cell membrane models to analyze the interaction of drugs with cell membranes, as well as between ligands and receptors.

Serge Palacin is Research Director at CEA and Head of the Physics and Chemistry of Surfaces en Interfaces Division at CEA Saclay. He got his PhD in 1988 on phthalocyanines-based Langmuir-Blodgett films, and spent one postdoctoral year in G.M. Whitesides's group in Harvard University. He authored ca. 135 publications, 10 book chapters and 17 patents.

Supporting Information:

Force Spectroscopy by Dynamic Atomic Force Microscopy on Bovine Serum Albumin proteins changing the tip hydrophobicity, with piezoelectric tuning fork self-sensing scanning probe

Jérôme Polesel-Maris^{}, Jérémy Legrand, Thomas Berthelot, Alexandre Garcia, Pascal Viel,
Ali Makky and Serge Palacin*

CEA, IRAMIS, Service de Physique et Chimie des Surfaces et Interfaces, F-91191 Gif-sur-
Yvette, France.

* Corresponding author: Dr. Jérôme Polesel-Maris

e-mail: jerome.polesel@cea.fr

Telephone number: +33 (0)1 69 08 25 47

Fax number: +33 (0)1 69 08 84 46

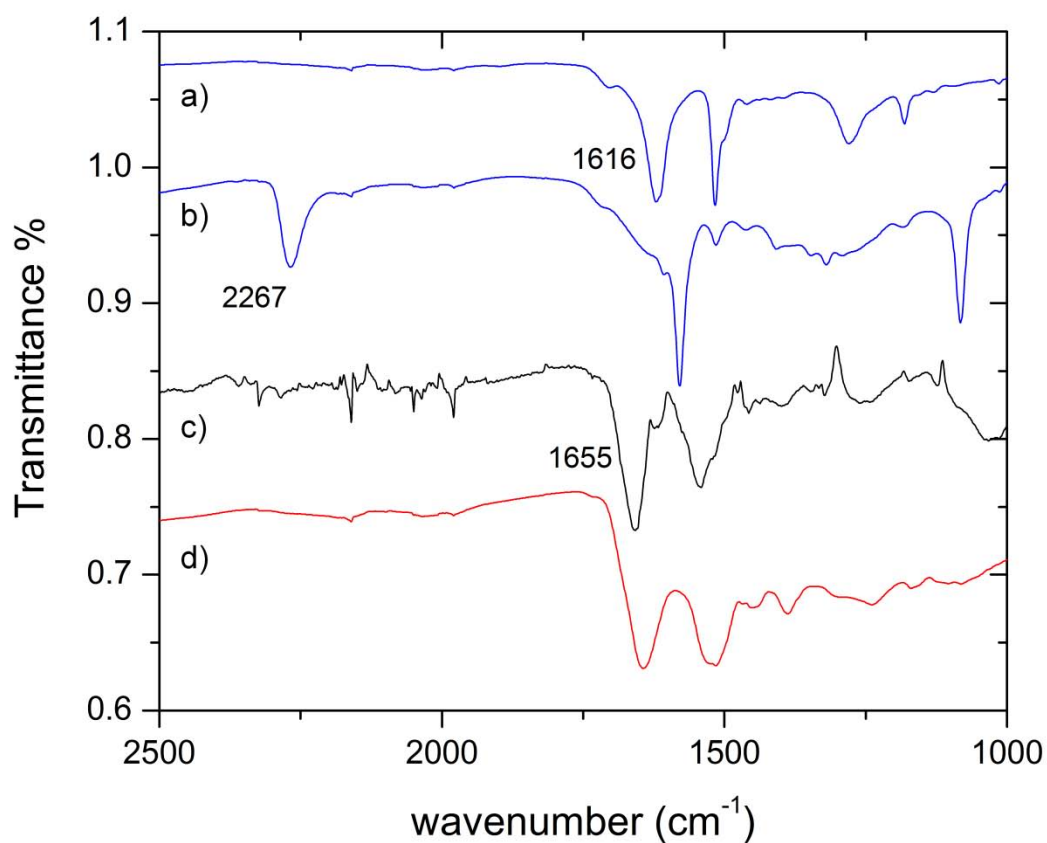


Figure S1

ATR FTIR spectra of a) PAP layer on gold coated mica (NH₂ vibration band 1616 cm⁻¹), b) rediazotization of PAP layer on gold coated mica (diazonium vibration band 2267 cm⁻¹) obtained on a gold coated mica surface, c) BSA grafting on activated surface (amide I vibration band 1655 cm⁻¹ and amide II band at 1540 cm⁻¹) and d) IR spectrum of neat BSA.

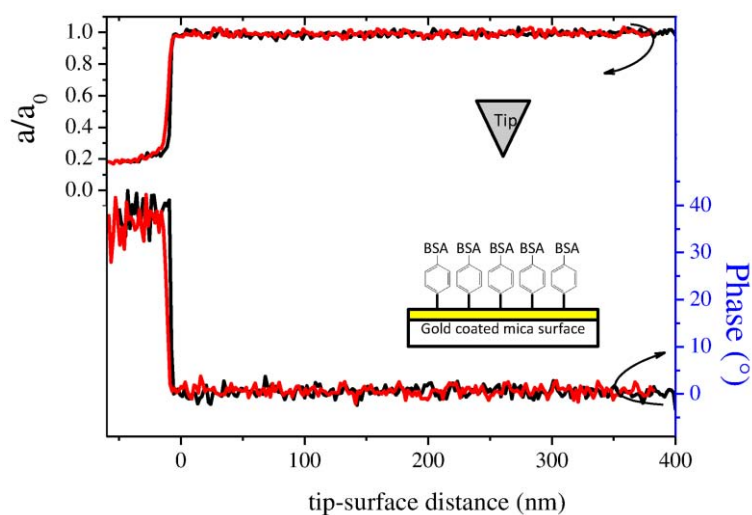


Figure S2

Approach (in black)/withdrawal (in red) amplitude and phase spectroscopy curves with a non-functionalized carbon tip on a gold coated mica surface with grafted BSA proteins. The amplitude curves are normalized by the free oscillation amplitude a_0 measured far from the surface. The approach and withdrawal speed of were swept at 50 nm/s.

Figure S2 displays spectroscopy curves obtained with an uncoated carbon tip onto the same BSA grafted surface used for the spectroscopy of figure 4. The distance axis appeared as it was acquired during spectroscopy experiments. Origin was not defined as corresponding to a tip contact point with the surface. The absolute tip-surface distance does not need to be known for the back conversion of amplitude and phase curves into force gradient and force data as shown in equation (1) of the manuscript, and detailed in equation SE1 to SE7. Approach (in black) and withdrawal (in red) curves show three distinct domains as the oscillating probe penetrates the surface. In the first domain, the tip is far from the surface with a constant amplitude oscillation and a phase shift equal to zero. In a second domain, the tip is very close to the surface with a fast decrease of the oscillation amplitude, and an increase of the phase shift due to a net repulsive interaction of the tip with the surface. In the third domain, the hard compression of the tip to the surface stops the oscillation amplitude with a low residual

plateau value corresponding to the detection noise level of the electronics. For this third domain, the phase shift curve becomes noisier and starts to decrease, because the phase shift analysis by the SPM controller is based on the oscillation signal which is stopped here. So, the phase shift signal has no significance in this domain. Based on these considerations, in the frame of this work, we consider that quantitative or qualitative analysis cannot be done in the third domain of the spectroscopy curves when the oscillation amplitude is stopped. We also checked on different points of the surface the reproducibility of the amplitude or phase curves during the approach and the withdrawal of the tip. The curves given in figure S2 are robust.

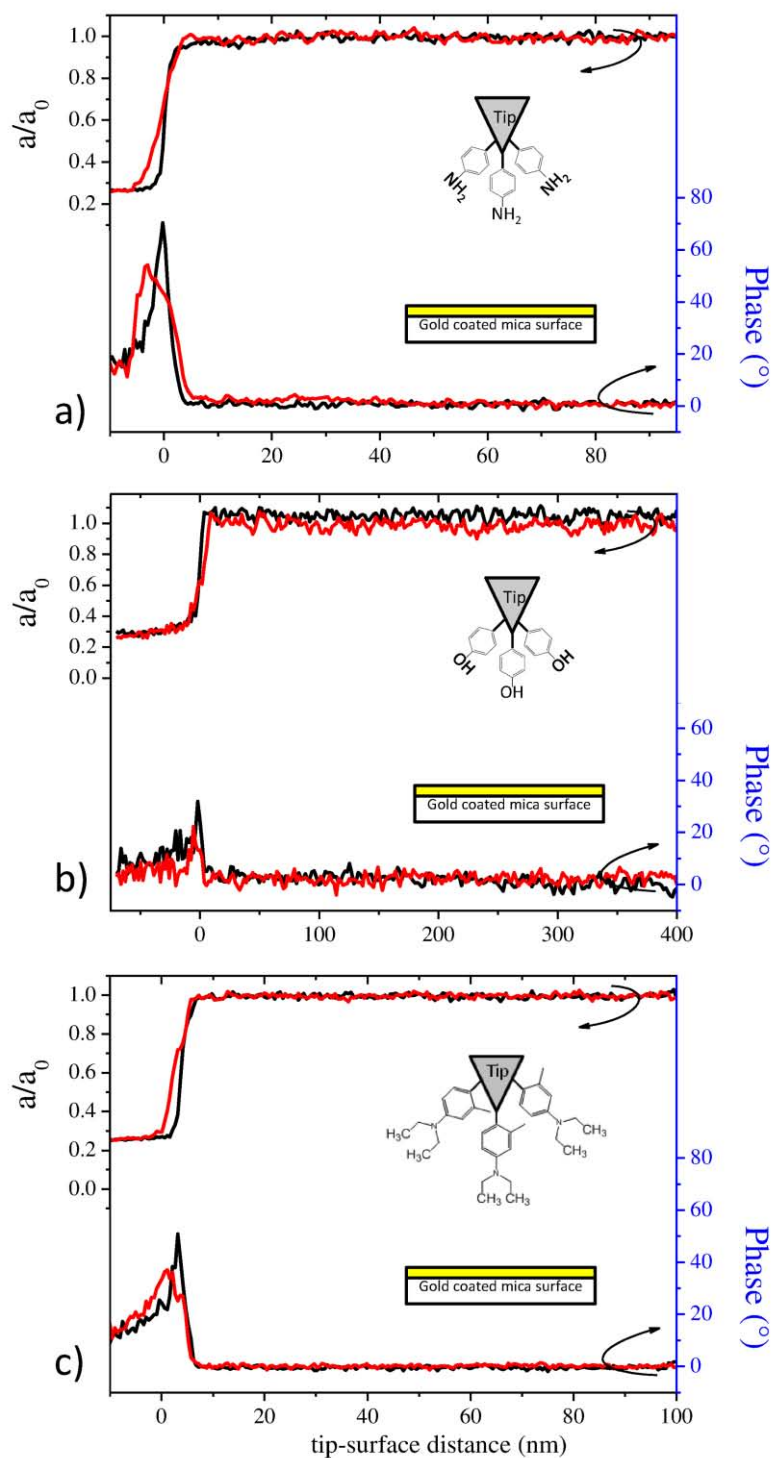


Figure S3

Approach (in black)/withdrawal (in red) amplitude and phase spectroscopy curves obtained for three different functionalizations of the carbon tip on a clean gold coated mica surface: a) amine terminated tip, b) hydroxyl terminated tip and c) methyl terminated tip. The approach and withdrawal speed were swept at 50 nm/s.

The reference measurements of approach and withdrawal spectroscopy curves of figure S3 in amplitude and phase using the three different kind of chemically terminated carbon tips were performed on a clean gold-coated mica surface. These reference curves exhibit standard amplitude and phase shift behaviour as the tip goes to the surface as for curves of figure S2, without any signature of specific interaction in the withdrawal curves. The combination of the spectroscopy reference tests of figure S2 and figure S3 allowed to confirm that the specific interaction detected on the withdrawal spectroscopy curves of figure 4 were actually due to protein stretching between the chemical functions grafted on the tip end and some BSA protein sites.

Tip end /Surface	Withdrawal curves with non-linear jumps	Total curves	Withdrawal success (%)
NH₂/Gold	0	20	0
CH₃/Gold	0	20	0
OH/Gold	0	20	0
C/BSA	1	37	2.7
NH₂/BSA	18	19	94.7
CH₃/BSA	17	19	89.5
OH/BSA	6	20	30

Table T1

This table summarizes the statistics of withdrawal non-linear jumps success for each tip/sample configuration analyzed in this work. The withdrawal events success express the ratio of withdrawal curves containing non-linear jumps over the total number of curves acquired on the sample.

Data analysis and withdrawal forces of unbinding events:

Formalism to convert dynamic AFM data of the amplitude and phase curves into force gradient and force values

Contact AFM based on low spring constant silicon cantilevers is more frequently used than dynamic AFM, as Amplitude Modulation (AM) or Frequency Modulation (FM) AFM, to perform force spectroscopy on proteins. Indeed, Contact AFM gives directly access to the interaction force values after a simple calibration of the cantilever. This is not the case for dynamic AFM where oscillating information as amplitude, phase and frequency should be converted by complex analytical and numerical treatments to obtain force values. J. Sader et al. proposed a general expression to obtain the tip-sample force F_{ts} from the normalized frequency shift signal $\Omega_{FM}(d) = \Delta\omega(d)/\omega_0$ obtained in FM-AFM, where $\Delta\omega(d)$ is the frequency shift referenced to the resonance frequency ω_0 far from any surface interaction [1]:

$$F_{ts} = 2.k_{eff} \cdot \int_d^{\infty} \left(\left(1 + \frac{a^{1/2}}{8\sqrt{\pi(u-d)}} \right) \Omega(u) - \frac{a^{3/2}}{\sqrt{2(u-d)}} \frac{d\Omega(u)}{du} \right) du \quad (SE1)$$

Numerical treatment is necessary to solve this integral expression depending of the oscillation amplitude a , the tip-surface distance d and the stiffness k_{eff} of the scanning probe. Nevertheless, it was applied successfully by M. J. Higgins et al. to quantify forces by FM-AFM of the mechanical unfolding of single titin I27 domains [2] and to measure the unbinding forces of a single receptor–ligand (biotin–avidin) interaction [3]; it was also used by D. Ebeling et al. to measure the forces acting on a Dextran chainlike molecule in PBS [4], and by H. Janovjak et al. to quantify the force gradient during unfolding of a single bacteriorhodopsin chain from native purple membranes [5]. These works were all performed with standard silicon cantilevers-based AFM with optical lever detection. To the best of our knowledge, no tuning fork AM-AFM force spectroscopy study of chain unfolding of proteins

using analytical back-treatment to obtain unbinding force values has been published yet. A. J. Katan et al. proposed for AM-AFM, an expression of the normalized frequency shift directly usable in equation (SE1), such as [6]:

$$\Omega_{AM}(d) = \frac{\omega_d}{\omega_0} \sqrt{1 + \frac{a_d}{a(d)} \cos(\varphi(d))} - 1 \quad (\text{SE2})$$

With the fixed driving frequency ω_d , the excitation amplitude a_d , the oscillation amplitude a and the phase shift φ , both depending of the tip-surface distance d . The excitation amplitude a_d depends of the free oscillation amplitude a_0 far from the surface, the quality factor Q of the probe, and the free resonance frequency ω_0 , such as:

$$a_d = \frac{a_0}{\omega_d^2} \sqrt{(\omega_0^2 - \omega_d^2)^2 + \frac{\omega_d^2 \cdot \omega_0^2}{Q^2}} \quad (\text{SE3})$$

In our experiments, the tuning fork is working with the driving frequency set to the free resonance frequency $\omega_d = \omega_0$. Hence, (SE2) with (SE3) give the new expression of the normalized frequency shift used for our data treatment:

$$\Omega_{AM}(d) = \sqrt{1 + \frac{a_0}{a(d)} \frac{\cos(\varphi(d) + \varphi_{offset})}{Q}} - 1 \quad (\text{SE4})$$

where φ_{offset} is a constant phase offset added to the phase curves starting from 0 far from the surface (see figures S2, 4, and S3) due to software calibration. φ_{offset} is set to $\pi/2$ because the driving frequency is set to the free resonance frequency ω_0 . The high stiffness value of tuning fork probes allows setting easily sub-nanometer oscillation amplitude compared to standard AFM silicon cantilevers. This advantage was pointed by F. Giessibl to enhance the signal to noise ratio for atomic resolution AFM imaging [7]. The high stiffness value prevents also the jump-to-contact of the oscillating probe for high attractive surface forces. We demonstrated in

previous works that the small amplitude regime of tuning fork probes, until sub-Angström regime, is a key parameter to image weakly adsorbed molecules [8,9]. This small amplitude regime is also an advantage to simplify the equation (SE1) for the back-conversion in force. Several methods have been proposed to calibrate the oscillation amplitude of tuning fork probes [10]. We considered the expression of the sensitivity of a quartz tuning fork probe [11]:

$$S_{TF} = \omega_d \cdot 12 \cdot d_{21} \cdot k_{eff} \cdot \frac{L_e}{t^2} \left(L - \frac{L_e}{2} \right) \quad (SE5)$$

With the piezoelectric coefficient of quartz $d_{21}=2.31$ pC/N, the length of the tuning fork prong L and L_e the length of the prong electrode estimated respectively to 2.502 mm and 1.668 mm under optical microscope, the thickness t of the prong measured at 0.233 mm, and the effective spring constant for a balanced tuning fork oscillator estimated at $k_{eff}=2 \cdot k_{prong}= 4200$ N/m, as defined by Castellanos et al. [12] and F. Giessibl [13]. Hence, the calculated sensitivity $S_{TF} = 1.186$ nA/nm gives an oscillation amplitude $a_0=2.32$ Angströms, for a detected displacement current of 275 pA. Hence, the oscillation amplitude is much lower than the withdrawal distances measured between each non-linear jump during protein stretching. In this condition, equation (SE1) simplifies to the small amplitude approximation:

$$F_{ts}(d) = 2 \cdot k_{eff} \int_d^{\infty} \Omega(u) du = 2 \int_d^{\infty} k_{ts}(u) du \quad (SE6)$$

With the force gradient of the tip-sample interaction depending of the tip-surface distance d , sometimes called elasticity [5], written:

$$k_{ts}(d) = \Omega_{AM}(d) \cdot k_{eff} \quad (SE7)$$

(SE6) allows to calculate unbinding force values from this force gradient curve, but taking care of some conditions for the data treatment. Indeed, in equation (SE1), $F_{ts}(d)$ is the

conservative component of the tip sample interaction, without any contribution from dissipative effects [3]. This equation needs the interaction force to be continuous throughout the measurement. However, our force gradient curves revealed discontinuities in the interaction during the unbinding events. To fulfil the requirement of the equation, we considered only the regions where the force was continuous, which corresponded to the elastic response of the unfolded protein chains. In this condition, the formula for the force calculation can only be applied to recover the added force necessary to complete one unbinding event separately, but without retrieving the offset information of the withdrawal forces between each unbinding event [14]. Equation (SE6) also required that the force tends to zero as the tip-surface distance approaches infinity, which is not the case in our measurements where the interaction force increases with increasing separation, with the maximum attractive force experienced by the tip just before an unbinding event. Hence, we considered the elastic response of the unfolded region as a repulsive interaction experienced during a tip approach to the surface. Considering this, the peak maximum of the unbinding event corresponded to the origin of a hypothetical surface reversing the distance direction of the data analyzed. These continuous regions of force gradient curves, before unbinding events, were already fitted by polynomial models in previous works, including worm-like chain model (WLC) fitting the elastic response of the extended protein [2,5]. In our case, as illustrated on figure 6, we simplified the treatment by using linear slopes (red dashed lines) to treat these regions. M. J. Higgins et al. already proposed such a linear fitting and showed that force values can be obtained taking care of the recommendations mentioned above [3].

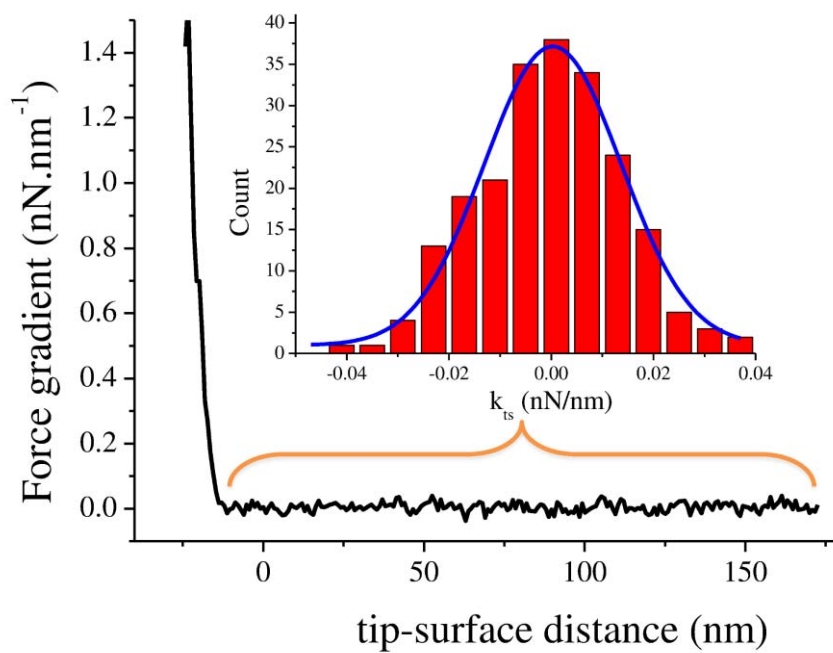


Figure S4

Noise analysis to estimate the minimal detectable force gradient. From a force gradient curve acquired with a clean carbon tip on clean gold coated mica surface, the histogram has been calculated with the data acquired in the domain where tip-surface interaction was not detectable. A standard deviation of ± 13 picoNewtons/nanometer is measured.

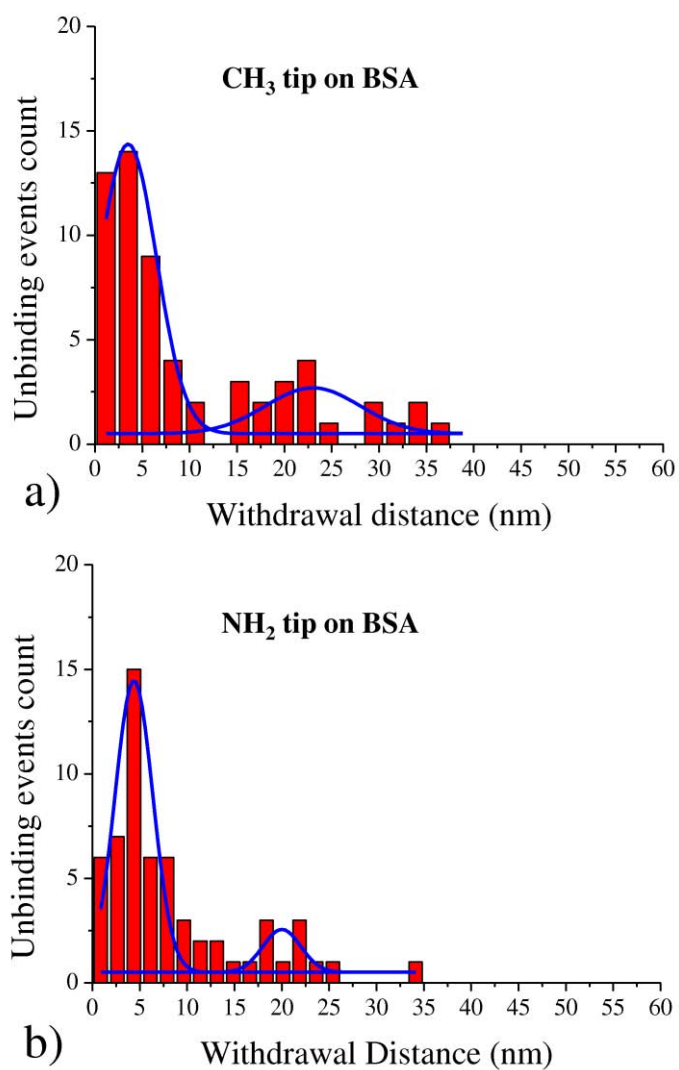


Figure S5

Histogram plotted from the withdrawal distances of BSA chains unfolding for the $-\text{CH}_3$ and $-\text{NH}_2$ functionalized tip. Gaussian function fittings highlight two withdrawal distance peaks for each case.

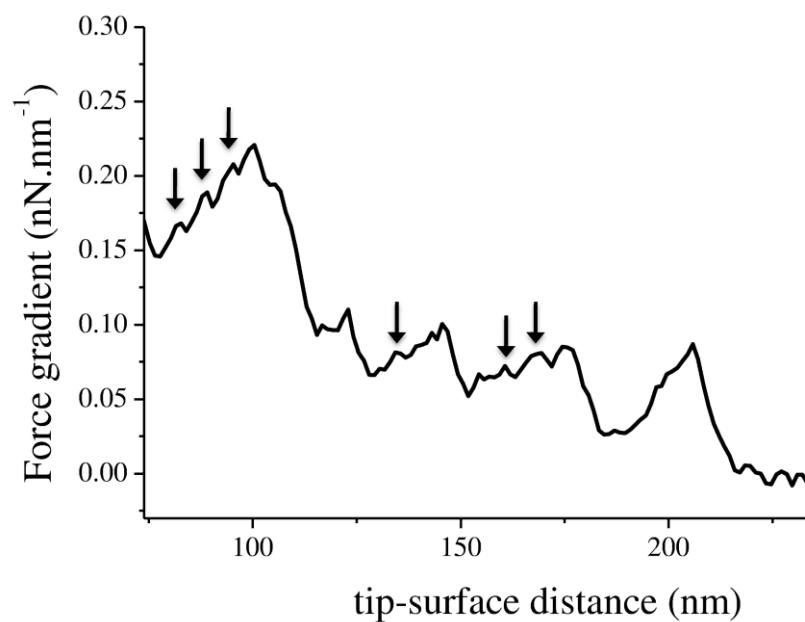


Figure S6

Detailed force gradient curve of unbinding events sequence for the $-\text{NH}_2$ terminated tip withdrawal on BSA sample. Several unfolding intermediates during the withdrawal are indicated by small vertical arrows.

References

- [1] J.E. Sader, S.P. Jarvis, Accurate formulas for interaction force and energy in frequency modulation force spectroscopy, *Applied Physics Letters*. 84 (2004) 1801.
- [2] M.J. Higgins, J.E. Sader, S.P. Jarvis, Frequency modulation atomic force microscopy reveals individual intermediates associated with each unfolded I27 titin domain., *Biophysical Journal*. 90 (2006) 640-647.
- [3] M.J. Higgins, C.K. Riener, T. Uchihashi, J.E. Sader, R. McKendry, S.P. Jarvis, Frequency modulation atomic force microscopy: a dynamic measurement technique for biological systems, *Nanotechnology*. 16 (2005) S85-S89.
- [4] D. Ebeling, F. Oesterhelt, H. Holscher, Dynamic force spectroscopy of single chainlike molecules using the frequency-modulation technique with constant-excitation, *Applied Physics Letters*. 95 (2009) 013701.
- [5] H. Janovjak, D.J. Müller, A.D.L. Humphris, Molecular force modulation spectroscopy revealing the dynamic response of single bacteriorhodopsins., *Biophysical Journal*. 88 (2005) 1423-1431.
- [6] A.J. Katan, M.H. van Es, T.H. Oosterkamp, Quantitative force versus distance measurements in amplitude modulation AFM: a novel force inversion technique., *Nanotechnology*. 20 (2009) 165703.
- [7] F.J. Giessibl, H. Bielefeldt, S. Hembacher, J. Mannhart, Calculation of the optimal imaging parameters for frequency modulation atomic force microscopy, *Applied Surface Science*. 140 (1999) 352-357.
- [8] L. Pham Van, V. Kyrylyuk, J. Polesel-Maris, F. Thoyer, C. Lubin, J. Cousty, Experimental three-dimensional description of the liquid hexadecane/graphite interface., *Langmuir*. 25 (2009) 639-642.
- [9] J. Polesel-Maris, C. Lubin, F. Thoyer, J. Cousty, Combined dynamic scanning tunneling microscopy and frequency modulation atomic force microscopy investigations on polythiophene chains on graphite with a tuning fork sensor, *Journal of Applied Physics*. 109 (2011) 074320.
- [10] G.H. Simon, M. Heyde, H.-P. Rust, Recipes for cantilever parameter determination in dynamic force spectroscopy: spring constant and amplitude, *Nanotechnology*. 18 (2007) 255503.
- [11] F.J. Giessibl, Atomic resolution on Si(111)-(7×7) by noncontact atomic force microscopy with a force sensor based on a quartz tuning fork, *Applied Physics Letters*. 76 (2000) 1470.
- [12] A. Castellanos-Gomez, N. Agraït, G. Rubio-Bollinger, Dynamics of quartz tuning fork force sensors used in scanning probe microscopy, *Nanotechnology*. 20 (2009) 215502.

- [13] F.J. Giessibl, F. Pielmeier, T. Eguchi, T. An, Y. Hasegawa, A comparative study of force sensors for scanning probe microscopy based on quartz tuning forks and length extensional resonators, arXiv.org. arXiv:1104 (2011) 1-40.
- [14] Private discussion with Allard J Katan (2011), (n.d.).

Combined dynamic scanning tunneling microscopy and frequency modulation atomic force microscopy investigations on polythiophene chains on graphite with a tuning fork sensor

Jérôme Polesel-Maris,^{a)} Christophe Lubin, François Thoyer, and Jacques Cousty
CEA, IRAMIS, Service de Physique et Chimie des Surfaces et Interfaces, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

(Received 6 October 2010; accepted 20 January 2011; published online 12 April 2011)

Polythiophene molecules adsorbed on a highly oriented pyrolytic graphite surface were studied by combined dynamic scanning tunneling microscopy (STM) and frequency modulation atomic force microscopy (FM-AFM) with a quartz tuning fork sensor operating in Qplus mode and equipped with a Pt/Ir tip. Upon completing a careful sub-ångström oscillation amplitude calibration of the probe, experiments were conducted in an ultra high vacuum at room temperature. By selecting the tip/surface distance regulation parameter, one can select the type of simultaneous information obtained in an area. For distance regulation based on the mean tunneling current, dynamic STM images together with maps of tip/surface force gradient were obtained. FM-AFM images with maps of the tunneling current were also acquired when the distance regulation was based on the frequency shift. Comparison between these images reveals interesting features. For example the tip which operates in STM mode with ultra low current (<10 pA) generates different interaction forces above molecules or graphite. Changes in energy dissipation processes as small as tens of millielectronvolts per cycle were recorded when the tip oscillates above the polymer or on the graphite surface. Hence data demonstrates that a stiff piezoelectric tuning fork of several kilonewtons/meters working as an AFM/STM probe with sub-ångström amplitude can characterize weakly adsorbed molecules. © 2011 American Institute of Physics. [doi:10.1063/1.3556437]

I. INTRODUCTION

Shortly after the scanning tunneling microscope (STM) inventors, Binnig and Rohrer,¹ received the Nobel prize and the invention of the atomic force microscope (AFM),² the first combined STM-AFM systems emerged to probe simultaneously electronic and mechanical properties at the atomic scale.^{3,4} Numerous STM-AFM instruments, working at different temperatures, have demonstrated an enormous potential to characterize various properties of crystal surfaces as silicon,⁵⁻⁷ germanium,⁸ copper,⁹ oxide surfaces,^{10,11} more complex systems as superconducting materials¹² or surfaces covered by organic molecules.¹³ Moreover recently atomic resolution on different samples has been achieved via STM-AFM characterization with a self sensing scanning probe such as the Qplus sensors.^{14,15} The tuning fork sensor simplifies the implementation of various commercial or home-built ultra high vacuum (UHV) microscopes,¹⁶⁻¹⁸ with the possibility to fix any kind of material for the tip.¹⁹ For STM-AFMs based on a quartz tuning fork, the study of deposited organic molecules on surfaces with such a system has started very recently^{20,21} showing the promising potential to characterize the mechanical and electronic properties of molecules. For example Gross *et al.* achieved atomic resolution with a Qplus on a pentacene molecule adsorbed on Cu (111) at 5 K and investigated charge distribution in metal-molecule system.²⁰ Recent works also illustrate atomic and molecular handling at 5 K via a quartz tuning fork STM-AFM.^{22,23}

This paper concerns the characterization of poly (3-dodecylthiophene) molecules adsorbed on a graphite surface in UHV at room temperature using a very stiff quartz tuning fork of several kilonewtons/meters equipped with a metal tip and working in a Qplus mode. This scanning probe gathers images either: (1) on tunneling current distance regulation (STM) together with maps of frequency shift; or (2) of frequency shift distance regulation (AFM) simultaneously with current maps. Sub-ångström amplitude oscillation of the tip brings new information on the investigated systems. Finally, we will discuss the origin of some contrast differences between STM and AFM images in terms of tip/sample interaction.

II. EXPERIMENTAL DETAILS

Herein, a tuning fork piezoelectric sensor was driven for simultaneous FM-AFM and STM imaging in ultra high vacuum (UHV, $p < 10^{-10}$ mbar) at room temperature. A CITIZEN AMERICA CFV206 40.000KAZF tuning fork (TF) with free resonance frequency of 40 kHz was used. Also the tuning fork had an estimated spring constant of 10'800 N/m (see Appendix A). In order to operate in this combined mode, Omicron's VT-AFM UHV microscope²⁴ was modified to support the mechanical and electrical driving of the probe. First, a VT-AFM's tripod cantilever holder²⁴ was adapted to receive the tuning fork as shown in Fig. 1 (Qplus mode). The upper part of the tripod's ceramic cantilever holder was first ground down to obtain a flat area to receive a tuning fork prong. The mechanical fixation of one prong of the resonator was done with H77 Epotek glue, and electrical

^{a)} Author to whom correspondence should be addressed. Electronic mail: jerome.polesel@cea.fr.



FIG. 1. (Color online) Optical image of the tuning fork probe mounted on a modified VT-AFM Omicron holder. The black arrow indicates the location of the etched Pt/Ir tip.

contacts were done with H21D Epotek conductive glue. Both glues are UHV compatible. For the tip, a 50 μm s diameter Pt/Ir wire was electrically connected to one electrode of the tuning fork's free prong end. Then, a sharp apex was realized by electrochemical etching the fixed Pt/Ir wire²⁵ using the reverse etching geometry proposed by M. Fotino.²⁶ Tip radii below 100 nm (characterized by scanning electron microscopy, SEM, and not depicted herein) are routinely obtained. Subsequently, the probe was rinsed in ethanol, dried under nitrogen, and introduced in the UHV chamber. Once in UHV, the tip did not undergo cleaning treatment. The resonance frequency shifts to 35.9 kHz due to the tip mass and quality factors are on the order of 1000 at room temperature. The mechanical actuation of the resonator is performed via the annular actuator located onto the piezotube scanner of Omicron's VT-AFM.²⁴

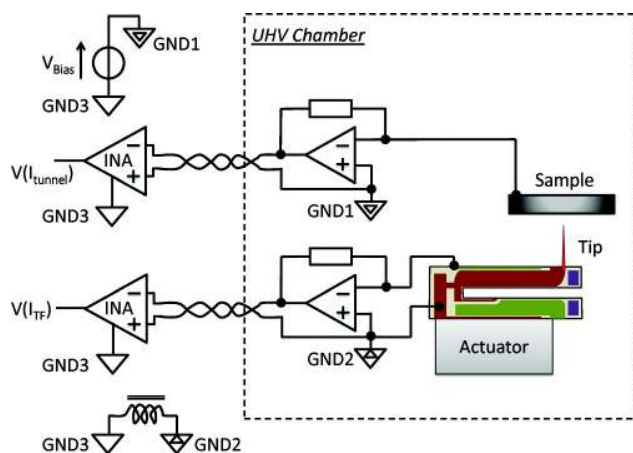


FIG. 2. (Color online) Schematic of the developed double stage amplifier. It operates simultaneously in STM and dynamic AFM. The separate floating electrical grounds for the STM and AFM parts are respectively named GND1 and GND2. The electrical ground of the microscope chamber is named GND3.

We designed a double preamplifier to operate both in dynamic STM and AFM. Fig. 2 illustrates the schematics of the first stage of the transimpedance preamplifiers in the UHV chamber, and also the external second stage amplifier based on instrumentation amplifiers. The first stage preamplifier was realized on a Macor ceramic piece with evaporated gold tracks carrying the components with the H21D Epotek conductive glue. Hence, this in-house UHV compatible circuit was fixed inside the VT-AFM microscope head close to the probe to minimize wire capacitances and electrical noises. In order to avoid cross-talks between the STM and AFM electrical signals and noisy ground loops, we used two separate floating grounds for the STM (GND1) and for the AFM (GND2) parts with external instrumentation amplifiers (INA) referenced to the chamber ground (GND3). The high common mode rejection of the INA allows us to cancel correlated noises on the electrical lines from the UHV first stage preamplifier to the second external INA stage. A tunneling bias voltage was applied between GND3 and GND1. GND2 is connected to GND3 via a choke coil to limit any high frequency noises, which are well above the operating frequency of the tuning fork. The amplified signals $V(I_{\text{tunnel}})$ and $V(I_{\text{TF}})$ are treated by NANONIS-SPECS's scanning probe microscope (SPM) controller.²⁷ The total transimpedance gain for the AFM amplifier is 264 and 150 $\text{M}\Omega$ for the STM amplifier. The preamplifiers' two stages configuration maintains a frequency bandwidth of about 60 kHz.

During operation, the tuning fork's oscillation is maintained at an amplitude setpoint A_0 . The frequency shift is demodulated by the phase locked loop (PLL) of the SPM controller from NANONIS-SPECS. Thanks to the tuning fork's high stiffness and the amplifier's high sensitivity, we operated at sub-angstrom oscillations (see the Appendix for the amplitude calibration methods). The product of the tuning fork's high spring constant by its small oscillation amplitude is large enough to avoid jump-to-contact and maintain a stable oscillation as referred by Giessibl.¹⁹ The signal provided to the probe actuator to maintain the oscillation amplitude, A_0 , is called Excitation. At least three kinds of image were simultaneously acquired on the same area of the sample surface: topography (STM or AFM), force gradient, or current maps and excitation maps. WsXM software has been used for processing all the images.²⁸

The samples were prepared following the protocol of Scifo *et al.*²⁹ A thin deposit of 2D polycrystals of poly(3-dodecylthiophene) (P3DDT) films with submonolayer coverage were prepared by drop-casting 6 μl from CHCl_3 solution (concentration 2.4 micrograms/ml) on a freshly cleaved highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) substrate. The sample is then immediately put in the UHV chamber for pumping during 24 h at room temperature. Subsequently, the sample is transferred in front of the tip of the tuning fork to start the STM and FM-AFM characterization.

III. RESULTS AND DISCUSSION

First, the results obtained with a distance regulation operating in STM mode are presented. The differences between the STM images of the sample topography and the

maps of the frequency shift and excitation variations are discussed. Spectroscopy curves realized during different tip approach measurements provide new information on the contrast observed in the different images. Finally, images with the frequency shift distance regulation in FM-AFM mode with tunneling current and excitation maps will be reported and compared.

As the amplitude of the tip oscillation is a key parameter for quantitative measurements of the dissipation processes, we report two accurate methods for calibrating this amplitude taking advantage of our STM-AFM instrument in the Appendix.

A. Tunneling current distance regulation

The distance regulation is first performed using the mean tunneling current $\langle I_t \rangle$ (see the Appendix for the definition) compared to a setpoint defined by the user. Figure 3 shows a topography image and the corresponding frequency shift and excitation maps of P3DDT chains on HOPG simultaneously obtained, with $\langle I_t \rangle = 4.3$ pA for a bias voltage $V_{\text{Bias}} = -1$ V. In the topography image, the polymer chains appear as protuberant lines parallel to particular directions of the substrate and are running parallel to the graphite surface which is not fully covered. Some chains meander. Such a topography image is in agreement with the results published by Scifo *et al.*²⁹ but for standard STM operations, i.e., no tip oscillation. Considering the frequency shift map we acknowledge the contrast is inverted compared to the topography signal. From this map, the tip clearly undergoes a different interaction force gradients when above the polymer chains or on the graphite surface. The excitation map appears noisy with some domains in which small corrugations can be distinguished. Excitation is the amplitude signal provided by the oscillation feedback controller to the probe actuator in order to keep the preset oscillation constant (here $A_0 = 92$ pm).

Two cross sections have been extracted from these images to give the profiles (I) and (II) shown in Fig. 4. From the profiles in STM topography, the apparent height of the polymer chains adsorbed on HOPG surface is 0.44 ± 0.05 nm. Two positioning crosses indicate two topography maxima on the molecules. The net positive frequency shift shows a repulsive interaction of the tip with differences of 10 Hz between a minimum above a molecule chain and a maximum on the HOPG surface. This means that, even for a very low value of the tunneling current, the tip during STM operation experiences a less repulsive interaction with the polythiophene chains than with the graphite surface. Considering the excitation profile, the excitation signal is proportional to the dissipated energy per cycle. It can be converted from the raw electrical excitation signal using the following expression:^{30,31}

$$E = \frac{\pi \cdot k \cdot A_0^2}{Q} \cdot \left(\frac{\text{Exc}}{\text{Exc}_0} - \frac{f}{f_0} \right),$$

where Exc_0 and f_0 are, respectively, the excitation signal and the free resonance frequency with the tip far from any tip surface interaction, Exc and f are, respectively, the excitation

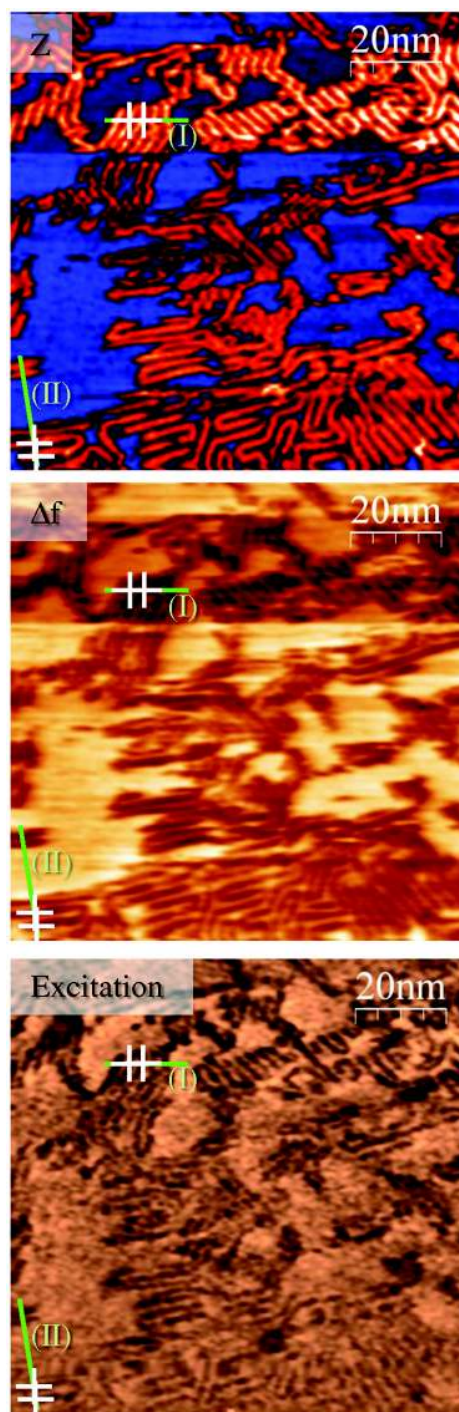


FIG. 3. (Color online) Dynamic STM images showing the topography, frequency shift and excitation maps obtained at constant mean tunneling current ($\langle I_t \rangle = 4.3$ pA for a bias voltage $V_{\text{Bias}} = -1$ V and $A_0 = 92$ pm). A plane fit correction has been performed on the topography image, and wavelet analysis has been applied to filter the excitation image.

signal and the resonance frequency with the tip interacting with the surface. Therefore, the excitation profile shows differences of about 75 meV/cycles between a minimum above a molecule chain and a maximum on the HOPG surface.

Profile (II) concerns an image area where the contrast has suddenly changed during the image acquisition. We

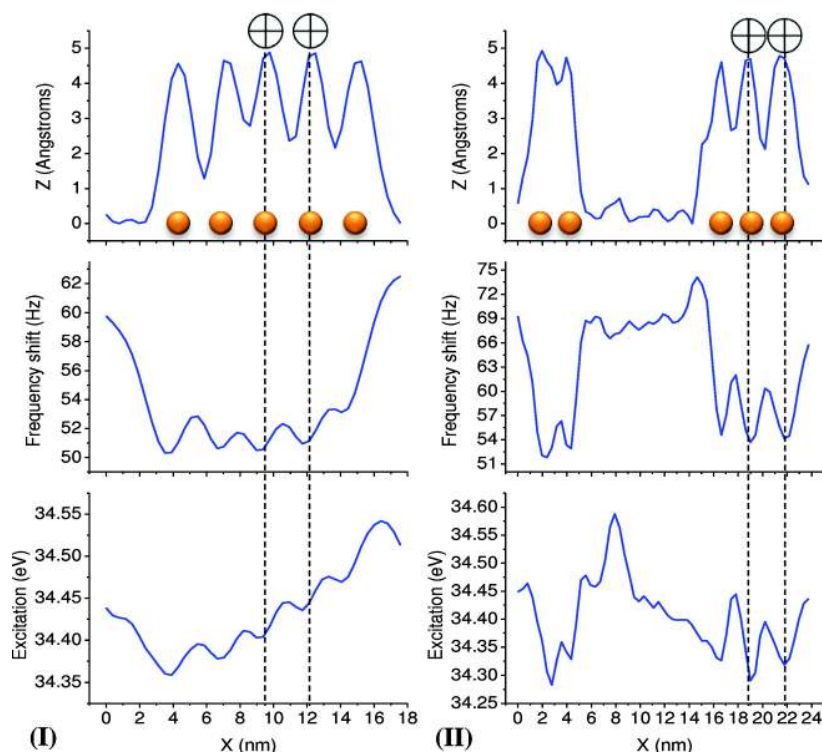


FIG. 4. (Color online) Topography, frequency shift and excitation profiles extracted from the images of Fig. 3 (see lines with crosses). The yellow disks indicate the position of the P3DDT molecules.

incriminate a tip apex change. The topography corrugation of the molecules did not change, but the frequency shift contrast between a minimum above a molecule chain and a maximum on the HOPG surface increased to about 17 Hz. Also the tip apex change increased the prevailing repulsive interaction between the tip and the clean HOPG surface with a net frequency shift passing to 70 Hz, instead of 60 Hz noted on profile (I). Furthermore, the excitation contrast between a minimum above a molecule chain and a maximum on the HOPG surface passed to 150 meV/cycle with less dissipation on the molecules compared to profile (I) net values. One can note that the inverted contrast in excitation with FM-AFM operating in tunneling current distance regulation was already observed by Loppacher *et al.*¹³ on Cu-tetra-3,5 di-tertiary-butyl-phenyl porphyrin (Cu-TBPP) submonolayer deposited on Cu(100). The authors, using a standard silicon AFM cantilever with a spring constant of 30 N/m and a working frequency of 147 kHz, found a net dissipated power of 2.7×10^{-14} W (corresponding to a dissipated energy of 4.6 eV/cycle) with a corrugation of 9×10^{-16} W (corresponding to a dissipated energy of 153 meV/cycle) between the clean surface and the minimum of the molecule. Hence, we demonstrate that a very stiff tuning fork sensor with several kilonewtons/meter of spring constant and working at sub-angstrom amplitude can achieve similar resolution of energy measurement above molecules without disturbing them.

Frequency shift and excitation approach spectroscopy curves of Fig. 5, acquired at different locations of Fig. 3, exhibit the long range behavior of the tip surface interaction. The monotonic positive frequency shift curves confirm the repulsive interaction between the tip and the surface with an increasing excitation signal. For spectroscopy in this distance range, the curves acquired above the clean HOPG areas and

P3DDT areas are not distinguishable. The mean tunneling current was also acquired in the same time of these spectroscopy curves but not shown on the figure because no signal was detected for this distance range.

For distance spectroscopy closer to the surface, on Fig. 6 four approach curves were acquired above P3DDT chains areas (in solid red) and five approach curves (in dashed black) acquired above clean HOPG area of the image of Fig. 3. The origin on the distance axis has been placed arbitrarily to correspond to the mean tunneling current set point for the images acquired on Fig. 3. The frequency shift behavior shown by these spectroscopy curves indicates a less repulsive interaction of the tip above the molecules at the distance origin than for graphite. For instance, a frequency shift equal to 60 or 55 Hz corresponds to a 0.3 nm distance shift between the curves obtained on graphite and P3DDT chains. This distance is shorter than the thickness of the alkane chains of P3DDT. The excitation approach curves show that, for the mean tunneling current setpoint used for the distance regulation of images of Fig. 3, the energy dissipation above the molecules are slightly lower rather than on the clean HOPG areas.

Several hypotheses could be proposed for explaining the contrast inversion in the STM topography compared to frequency shift map and the positive frequency shift observed during the approach curve. The first hypothesis could be related to the presence of one layer of molecules trapped at the tip end. This layer would be thick enough to avoid the tunneling current leakage with the sample, but responsible of the repulsive interaction observed by squeezing effect on the surface. Scifo *et al.*²⁹ performed experimental $I-V$ STM spectroscopy curves on a similar system and showed a very fast decreasing of the electrical conductance since two layers of P3DDT molecules are trapped between the tip and the

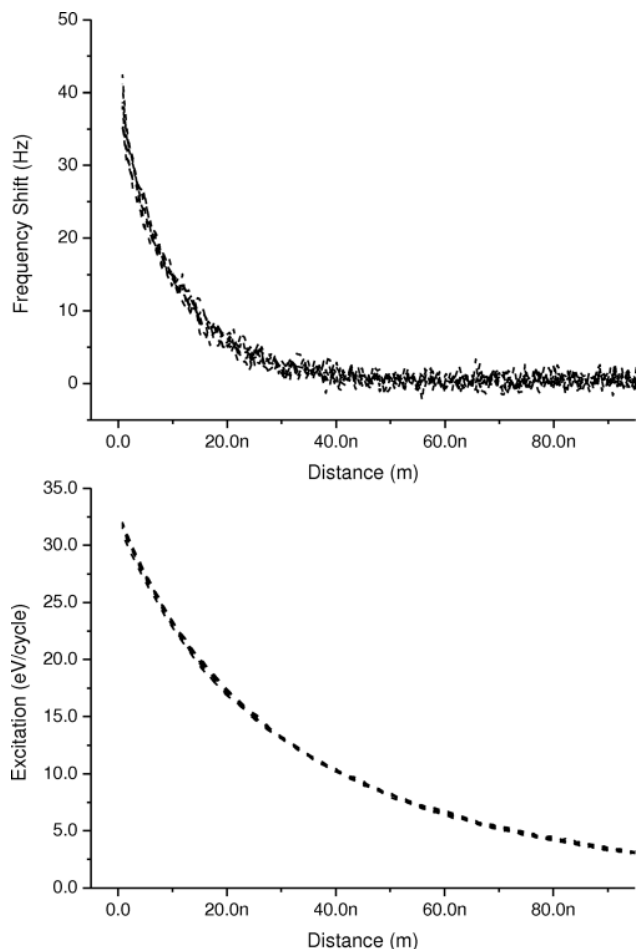


FIG. 5. Large distance range frequency shift and excitation approach spectroscopy curves performed at different locations on the images of Fig. 3 (above P3DDT chains areas and above clean HOPG areas). These spectroscopy curves exhibit the long range behavior of the tip surface interaction.

HOPG surface. Long range approach spectroscopy curves in frequency shift and in excitation of Fig. 5 support the net repulsive interaction starting at some tens of nanometers before to detect the tunneling current. Chandross *et al.*³² with massively parallel molecular dynamics simulations aimed at understanding the nanotribological properties of alkylsilane self-assembled monolayers (SAMs) on a amorphous silica compressed by a realistic AFM tip (radius of curvature ranging from 3 to 30 nm). The authors showed orders of ten of nanonewtons repulsive forces before to damage the physisorbed monolayers by removal of molecules. In the present work, the HOPG surface is well known to present elastic deformation during tip compression³³ which probably limits damaging of the molecules layer. When the tip approaches close to the surface, weakly bonded molecules on the tip moves away by repulsion and keep naked the tip end to allow the tunneling current passing. As experimentally noted by Sugimoto *et al.*,³⁴ but not fully understood by the authors, in some situations the tip apex atoms that play a role in AFM imaging cannot mediate the tunneling current, the STM image is generated by other atoms. This means that variations in the tip's apex hinder correlation between STM topography and tip/surface interaction map.

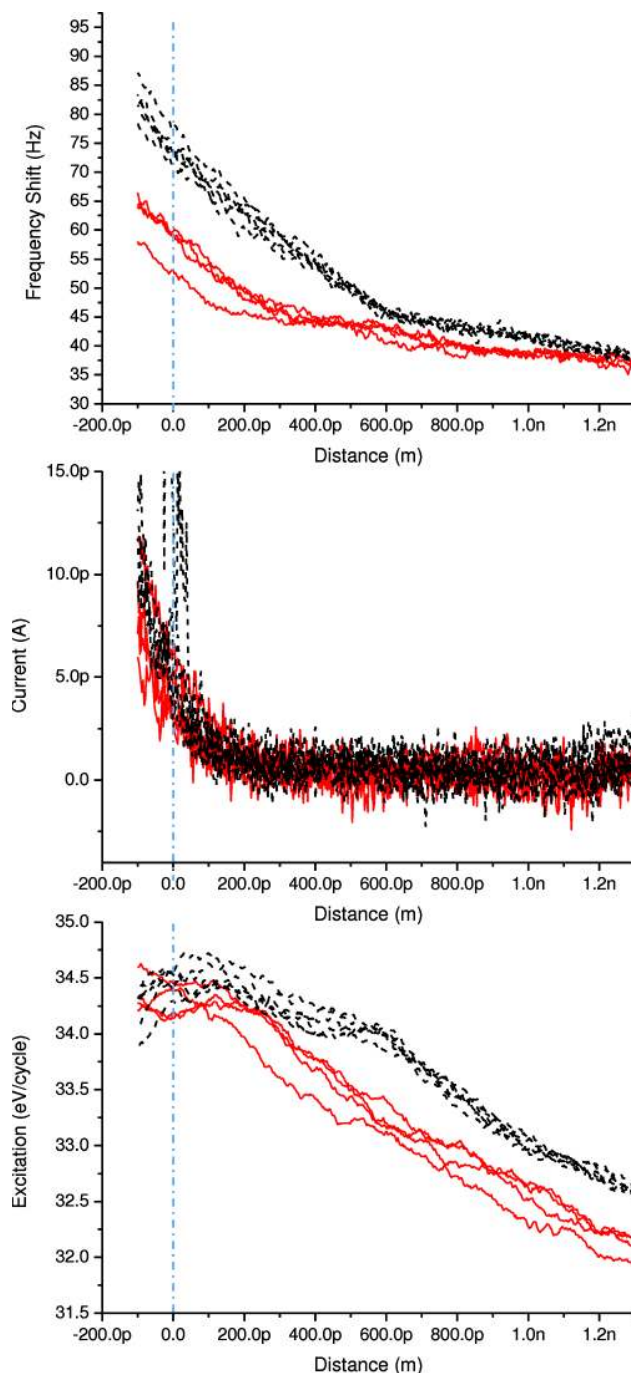


FIG. 6. (Color online) Frequency shift, mean tunneling current and excitation approach spectroscopy curves performed on the images of Fig. 3. Solid red curves acquired above P3DDT chains areas, dashed black curves acquired above clean HOPG areas.

A second origin of the contrast difference could be related to the tip/surface distance in STM regulation which is known to depend on the density of state near the Fermi level. In this model difference in the density of state of graphite and that of P3DDT causes changes in the trajectory of the tip which induce changes in the tip/surface interaction. The less repulsive interaction and less energy dissipation on the molecules areas rather than on the clean HOPG areas could be due to strong low range interactions with the tip end. For minimizing such a coupling, constant height operation of the AFM/STM to

measure the tunneling current, and the force gradient signals respectively has been proposed by some teams.^{20,34–36}

A third mechanism was proposed by Polesel-Maris *et al.*³⁷ for explaining differences between STM and AFM

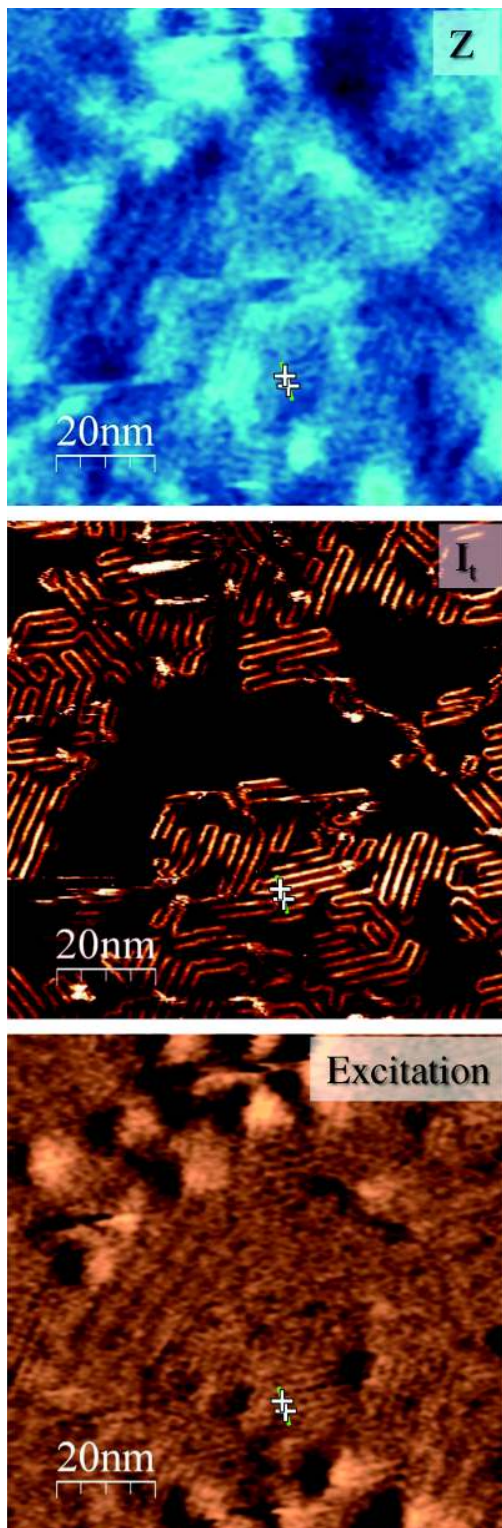


FIG. 7. (Color online) Topography image, maps of current and excitation obtained at constant frequency shift, with $\Delta f + 196.1$ Hz for a bias voltage $V_{\text{Bias}} = -1$ V and $A_0 = 92$ pm. A plane fit and a gaussian smoothing correction has been performed on the topography image, a gaussian smoothing correction has been performed on the excitation image.

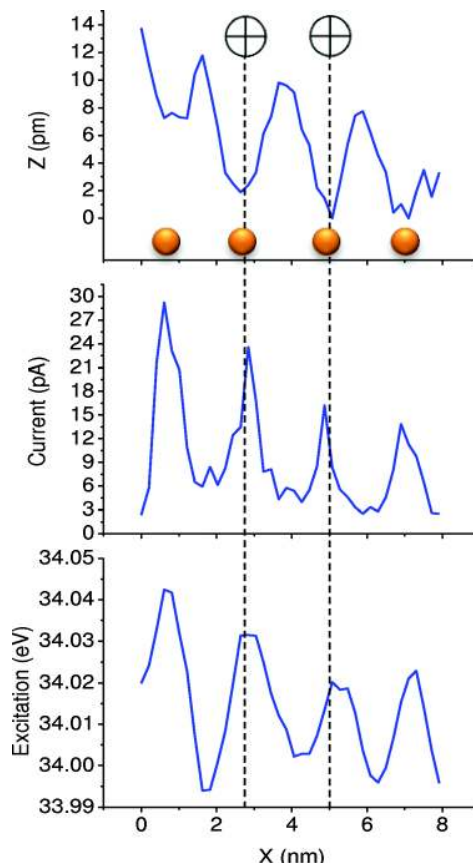


FIG. 8. (Color online) Topography, mean tunneling current and excitation profiles extracted from the images of Fig. 7 (see lines with crosses). The yellow disks indicate the position of the P3DDT molecules.

images obtained on gold nanocrystals on $\text{MoS}_2(0001)$. The authors demonstrated that the presence of gold islands modulates the long-range force gradient between the tip and the substrate.

From this discussion, knowing the real topography of the surface (total density of state) could help to eliminate some hypotheses. So, we propose to study the same system but in FM-AFM mode.

B. Frequency shift distance regulation

Molecular systems have already been studied by combined FM-AFM and STM^{13,20,21} but on the tunneling current distance regulation. Here, we report FM-AFM investigations of submonolayer of self-assembled molecules using a tuning fork sensor combined with tunneling current maps. In FM-AFM operation, we used the frequency shift to drive the distance regulation while a tunneling current $\langle I_t \rangle$ map was simultaneously recorded on the same surface area. For an amplitude oscillation $A_0 = 92$ pm, the FM-AFM images shown in Fig. 7 required a frequency setpoint of $+196.1$ Hz which is higher than the frequency shifts measured in Fig. 3 with the associated profiles of Fig. 4. The monotonic behavior of the tip-sample interaction observed on the frequency shift curves of Fig. 5 and Fig. 6 allows a stable distance regulation in AFM to achieve observation of individual polymer chains. While the contrast in the relief of the FM-AFM

image appears limited, the tunneling current map exhibits strong variations which reveal the position of the P3DDT chains. Cross sections have been extracted from these images to give the profiles of Fig. 8 with the crosses indicating the location of two topography minima. The lower topography contrast of about 8 pm is probably due to the large tip radius of the tip contributing to enhance long range interactions which could blur the short range interaction contrast, as reported by Gan³⁸ and extensively studied by Barth *et al.*³⁹ The profiles of Fig. 8 show that a minimum in topography corresponds to a maximum in the tunneling current. Hence, for these conditions of FM-AFM regulation, the contrast in the topography image is inverted: The locations of the molecules correspond to the minima, and this has been also observed on a single molecular chain. We observed that the presence of molecules reduces the dominant repulsive interaction. So, for a positive frequency shift setpoint, the molecules will appear as depletions in AFM topography in order to regulate the tip/surface distance. These experimental observations are related to different tip trajectories for FM-AFM and dynamic STM investigations on the polymer chains. These differences correspond to different variations of the tip-sample interaction. We note that Bielecki *et al.*¹⁰ highlighted that another origin of the inverted contrast in FM-AFM could be also related to local charges at the molecules or at the tip. As discussed above, the tip trajectory in STM regulation follows a constant density-of-state profile near the Fermi level, while in FM-AFM, the tip trajectory corresponds to a constant level of the force gradient. The forces involved are mainly due to Pauli repulsion for positive frequency shift where regions of high electron density overlap.²⁰ For this FM-AFM configuration, the excitation profile of Fig. 8 exhibits maxima for each minimum in topography, corresponding to each P3DDT molecule position. The excitation contrast between a maximum above a molecule chain and a minimum on the HOPG surface is about 40 meV/cycle. However, for the same oscillation parameters of Fig. 3, the contrast of the excitation image is not inverted this time. But as the frequency shift setpoint used for the AFM distance regulation is well below the distance origin previously defined, quantitative comparison with data obtained in STM regulation becomes difficult. Nevertheless, we observed that the tunneling current maxima of the profile of Fig. 8 are higher in FM-AFM regulation than the current setpoint of Fig. 3 to obtain the observation of individual polymer chains. A hypothesis to explain the higher current observed in FM-AFM regulation could be owing to the fact that the tip is closer to surface, but to compare both types of data, STM and FM-AFM distance dependent images need to be acquired in order to compare both techniques. The same conclusion was reached in Ref. 34 but for STM-AFM imaging on a clean crystal surface. Hence, the system is operating in the zone where the excitation above the P3DDT molecules becomes higher compared to the clean HOPG surface. The system operates in this regime where the dissipation contrast above the P3DDT molecules is not reversed, unlike the case of Fig. 3. Hembacher *et al.*⁴⁰ reported a decreasing tendency of the excitation signal above a clean HOPG surface in approach curves, after a plateau zone. The authors explained

the energy loss by a plucking action of the atoms on each other following a friction model for soft samples. We suppose that, in our case, the P3DDT molecules absorbed on the HOPG surface modify the friction terms and explain the different energy loss observed on the excitation map but also on the approach curves of Fig. 6.

IV. CONCLUSION

In this study, submonolayers of weakly adsorbed polythiophenes molecules on graphite were investigated with a combined STM-AFM based on a high stiff probe. We have adapted a commercial UHV microscope to fit a piezoelectric tuning fork sensor (Qplus) equipped with a Pt/Ir tip for operating both in dynamic STM and FM-AFM mode. The optimized electronics of the home-built double preamplifier allow achieving stable signal treatment of sub-angstrom oscillation amplitude of the probe at room temperature. The probe's sub-angstrom amplitude oscillation was carefully calibrated via two different methods. From tip/surface distance regulation based either on tunneling current (dynamic STM) or on frequency shift (FM-AFM), the surface reliefs can be acquired simultaneously with maps of the frequency shift/tunneling current and excitation. Comparison between these images brings new information about the tip-sample interaction and imaging conditions. Spectroscopy by distance curves in frequency shift, mean tunneling current and energy dissipation performed on clean and molecule areas helps for the interpretation of the combined AFM-STM images. For instance, the tip-sample distance where the observation of individual polymer chains is achieved is observed to be longer in STM distance regulation compared to AFM distance regulation. On the other hand, the STM tip during scanning on PDD3T molecules adsorbed on graphite suffers changes of force gradient even for very low intensity (~ 5 pA) of tunneling current. Also, contrast inversion in topography maps during STM or FM-AFM distance regulation has been shown to be different depending of the different STM or FM-AFM tip trajectories, but for an unambiguous identification of the tip-surface interaction and for the contrast formation extended numerical calculations will be necessary. Orders of magnitude of molecular energy dissipation

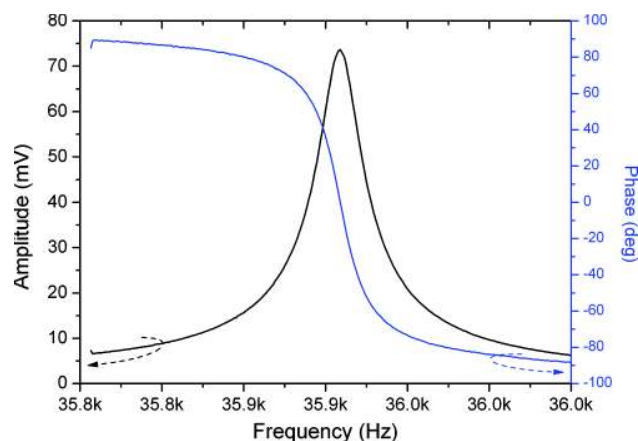


FIG. 9. (Color online) Amplitude and phase resonance curves obtained with the probe used in this work at constant excitation.

processes are quantified for such a system working at room temperature in UHV. Remarkably, these results are comparable in term of sensitivity with the standard silicon cantilever AFM systems with optical lever detection method. Further investigations by changing the tip apex radius and chemistry as well as the imaging conditions are currently in progress to quantify these observations.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Benjamin Grevin for the providing of the P3DDT molecules powder and discussions about the concoction of the solution. The authors wish to thank Laurent Pham Van for many fruitful discussions. This work has been supported by the French National Agency for Research (ANR) under the project ONDIEMO (ANR-06-NANO-002).

APPENDIX: AMPLITUDE CALIBRATION METHODS

In order to determine the amplitude oscillation in metric units, we first tried to use the method introduced by Giessibl,⁴¹ but the small oscillation amplitudes used here (below the angstrom level) are not compatible with the zero-size image technique with slow acquisition speed reported by the author. So, we introduce two other approaches more appropriate to calibrate sub-angstrom oscillation amplitude. The first one is based on the thermal noise measurement of the probe. The second one benefits of the combined AFM and STM measurements proposed by our instruments.

A. Thermal noise amplitude calibration

Thermal calibration has been already proposed in the literature.⁴¹ To obtain it, the user needs to know the resonance frequency, f_0 , and the quality factor, Q , of the probe. These parameters can be easily found by performing amplitude resonance curves at constant electrical or mechanical excitation of the probe, and sweeping the oscillation frequency as shown in Fig. 9. The spring constant, k , is

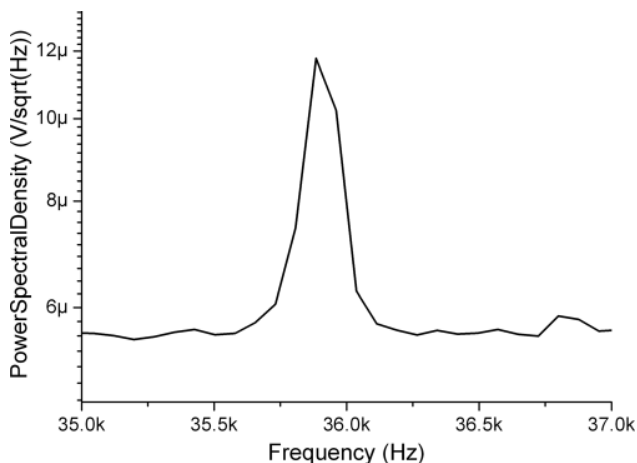


FIG. 10. PSD of noise obtained with the probe used in this work (free oscillation without driving excitation).

another parameter necessary to obtain amplitude calibration. In our work, we do an estimation of it using the dimensions of the tuning fork measured under an optical microscope and using the formula $k = E \cdot w \cdot t^3 / 4 \cdot l^3$ introduced by Karrai *et al.*,⁴² where E is the young modulus of the quartz and w , t , and l are, respectively, the width, the thickness, and the length of the beam.

After that, we measured the power spectral density (PSD) of noise of the probe with the driving excitation switched off. Figure 10 illustrates such a spectrum. This PSD spectrum is mainly due to two contributions:⁴³ (1) the thermomechanical noise of the probe; and (2) the Johnson noise due to the electronics. The electronics contribution appears as a white noise with a ground level density, $\sigma_{\text{electronics}}$. The thermomechanical amplitude noise, σ_{thermo} , is dependent on the frequency:⁴³

$$\sigma_{\text{thermo}}^2 = \frac{4 \cdot k_B \cdot T}{2 \cdot \pi \cdot f_0 \cdot Q \cdot k} \cdot \frac{1}{\left(1 - \frac{f^2}{f_0^2}\right)^2 + \left(\frac{f}{f_0 \cdot Q}\right)^2},$$

with the Boltzmann constant, k_B , and the temperature, T . At resonance, when $f = f_0$, this noise becomes:

$$\sigma_{\text{thermo}}^2 = \frac{4 \cdot k_B \cdot T \cdot Q}{2 \cdot \pi \cdot f_0 \cdot k}.$$

So, the total PSD noise obtained on a spectrum is expressed as:

$$\sigma_{\text{total}}^2 = \sigma_{\text{electronics}}^2 + \sigma_{\text{thermo}}^2.$$

Experimentally, the units on the PSD spectrum are given in $\text{V}/\sqrt{\text{Hz}}$. To convert the voltage units in metric units, let's assume the conversion factor β such as $\sigma_{\text{thermo}}^2 = \beta^2 \cdot \sigma_{\text{thermo,V}}^2$, where $\sigma_{\text{thermo,V}}$ is the density of noise obtain on the experimental spectrum in $\text{V}/\sqrt{\text{Hz}}$ and σ_{thermo} is the theoretical density of noise in $\text{m}/\sqrt{\text{Hz}}$. Hence, we obtain the expression of the conversion factor:

$$\beta(\text{m/V}) = \frac{\sigma_{\text{thermo}}}{\sigma_{\text{thermo,V}}} = \sqrt{\frac{2 \cdot k_B \cdot T \cdot Q}{\pi \cdot f_0 \cdot k}} \cdot \frac{1}{\sigma_{\text{thermo,V}}}$$

$\sigma_{\text{thermo,V}}$ is obtained by subtracting the background PSD of electronics noise to the total PSD of noise.

To illustrate the use of this latter expression, we measured from the resonance curve of Fig. 9(a) resonance frequency $f_0 = 35'908.9$ Hz and a quality factor $Q = 1465$ for a geometrically estimated stiffness of $k = 10'800$ N/m. The background PSD of noise coming from the spectrum of Fig. 10 is equal to $5.5 \mu\text{V}/\sqrt{\text{Hz}}$ with a total PSD of noise of $12 \mu\text{V}/\sqrt{\text{Hz}}$ at the resonance frequency, f_0 . So, we obtain an amplitude conversion factor of $\beta = 9.3$ pm/mV.

B. Amplitude calibration at constant tunneling current

As already established in the literature,^{19,21} the mean tunneling current with the tip oscillating with a half amplitude A is expressed such as:

$$\langle I_t \rangle = I_0 \cdot \exp(-2 \cdot \kappa_t \cdot z) \cdot \mathfrak{S}_0(2 \cdot \kappa_t \cdot A),$$

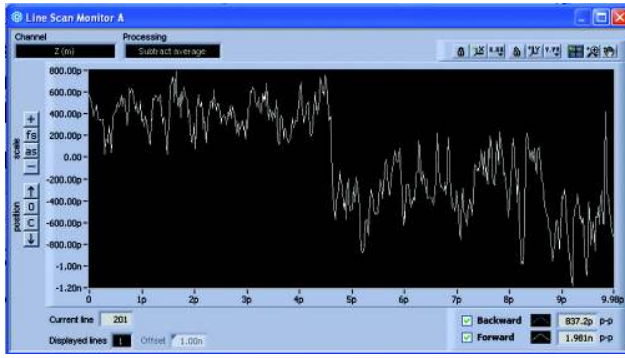


FIG. 11. (Color online) Scan line obtain on a gold surface showing the step response in z due to the change of the oscillation amplitude setpoint. The system keeps the same value of $\langle I_t \rangle$ equals to 7 pA.

with I_0 is the modified Bessel function of the first kind, $\kappa_t = \sqrt{2 \cdot m \cdot \phi} / \hbar$ with ϕ the work function and z the surface distance with the tip at rest. Let us differentiate this expression to obtain:

$$\begin{aligned} d\langle I_t \rangle &= \frac{\partial \langle I_t \rangle}{\partial A} \cdot dA + \frac{\partial \langle I_t \rangle}{\partial z} \cdot dz \\ &= 2 \cdot I_0 \cdot \kappa_t \cdot \exp(-2 \cdot \kappa_t \cdot z) \cdot [\mathfrak{S}_1(2 \cdot \kappa_t \cdot A) \cdot dA - \mathfrak{S}_0(2 \cdot \kappa_t \cdot A) \cdot dz]. \end{aligned}$$

Assuming that during the experiment A and z change such as the mean tunneling current keeps constant with $d\langle I_t \rangle = 0$. One obtains:

$$\mathfrak{S}_1(2 \cdot \kappa_t \cdot A) \cdot dA = \mathfrak{S}_0(2 \cdot \kappa_t \cdot A) \cdot dz. \quad (\text{A1})$$

Working at big oscillation amplitudes gives $\kappa_t \cdot A \gg l$ such as $dA = dz$ from Eq. (A1).⁴⁴

But, we need to use small amplitudes to improve the quality of simultaneous STM and FM-AFM measurements. Indeed, the signal-to-noise ratio of the current measurement enhances by increasing the mean tunneling current.¹⁹ This condition is fulfilled when the oscillation amplitudes are below the angstrom level with $\kappa_t \cdot A \ll l$ and $\mathfrak{S}_0(2 \cdot \kappa_t \cdot A) \rightarrow 1$ and $\mathfrak{S}_1(2 \cdot \kappa_t \cdot A) \rightarrow \kappa_t \cdot A$, following.⁴⁴ In this case, we have from Eq. (A1):

$$\kappa_t \cdot A \cdot dA = dz. \quad (\text{A2})$$

In SPM experiments, when the tip is scanning the surface, we change the amplitude setpoint keeping the same value of the mean tunneling current for the distance regulation between the tip and the surface. An oscillation amplitude A_1 needs a tip-surface distance z_1 , and an oscillation amplitude A_2 needs a tip-surface distance z_2 to maintain the same mean tunneling current $\langle I_t \rangle$. So, integrating Eq. (A2) gives the expression:

$$\frac{A_1^2 - A_2^2}{2} = \frac{\beta^2 \cdot (A_{V1}^2 - A_{V2}^2)}{2} = \frac{\Delta z}{\kappa_t},$$

with $\Delta z = z_1 - z_2$ and $A_n = \beta \cdot A_{Vn}$, where β is the conversion factor we look for to convert the measured oscillation amplitude A_{Vn} in arbitrary units (as volts) in the oscillation amplitude A_n in metric units. Then the conversion factor is written:

$$\beta(\text{m/V}) = \sqrt{\frac{2 \cdot \Delta z}{\kappa_t \cdot (A_{V1}^2 - A_{V2}^2)}}$$

To illustrate the use of this expression, we performed an AFM-STM imaging on a gold coated silicon surface with $\langle I_t \rangle = 7$ pA and $V_t = -1$ V. On one line scan we changed the oscillation amplitude setpoint from $A_{V1} = 40$ mV to $A_{V2} = 8$ mV. The Fig. 11 shows the response of the system on the distance feedback to maintain $\langle I_t \rangle$ with a step $\Delta z = 0.8$ nm. The parameter for the work function ϕ and κ_t of gold can be found in Refs. 45 and 46. So, we obtain an amplitude conversion factor of $\beta = 9.91$ pm/mV.

We showed that the two methods give very similar values for the amplitude conversion factor β . We suppose that the discrepancy could be due to the uncertainty about the spring constant of the tuning fork geometrically estimated and used in the thermal calibration method. Incidentally, the amplitude conversion factor β found by the tunneling current method can be used in the thermal calibration method equation to calibrate the spring constant of the probe.

¹G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel, *Phys. Rev. Lett.* **49**, 57 (1982).

²G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930 (1986).

³U. Dürig, J. K. Gimzewski, and D. W. Pohl, *Phys. Rev. Lett.* **57**, 2403 (1986).

⁴D. Anselmetti, C. Gerber, B. Michel, H. J. Güntherodt, and H. Rohrer, *Rev. Sci. Instrum.* **63**, 3003 (1992).

⁵D. Sawada, Y. Sugimoto, K. Morita, M. Abe, and S. Morita, *Appl. Phys. Lett.* **94**, 173117 (2009).

⁶A. Oral, R. A. Grimble, H. O. Ozer, and J. B. Pethica, *Rev. Sci. Instrum.* **74**, 3656 (2003).

⁷M. Guggisberg, M. Bammerlin, R. Lüthi, Ch. Loppacher, F. Battiston, J. Lü, A. Baratoff, E. Meyer, and H. J. Güntherodt, *Appl. Phys. A* **66**, S245 (1998).

⁸D. Sawada, Y. Sugimoto, K. Morita, M. Abe, and S. Morita, *J. Vac. Sci. Technol. B* **28**, C4D1 (2010).

⁹Ch. Loppacher, M. Bammerlin, M. Guggisberg, S. Schär, R. Bennewitz, A. Baratoff, E. Meyer, and H. J. Güntherodt, *Phys. Rev. B* **62**, 16944 (2000).

¹⁰M. Bielecki, T. Hynninen, T. M. Soini, M. Pivetta, C. R. Henry, A. S. Foster, F. Esch, C. Barth, and U. Heiz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 3203 (2010).

¹¹G. H. Enevoldsen, H. P. Pinto, A. S. Foster, M. C. R. Jensen, A. Kühnle, M. Reichling, W. A. Hofer, J. V. Lauritsen, and F. Besenbacher, *Phys. Rev. B* **78**, 045416 (2008).

¹²H. le Sueur, P. Joyez, H. Pothier, C. Urbina, and D. Esteve, *Phys. Rev. Lett.* **100**, 197002 (2008).

¹³Ch. Loppacher, M. Guggisberg, O. Pfeiffer, E. Meyer, M. Bammerlin, R. Lüthi, R. Schlittler, J. K. Gimzewski, H. Tang, and C. Joachim, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 066107 (2003).

¹⁴S. Hembacher, F. J. Giessibl, J. Mannhart, and C. F. Quate, *Phys. Rev. Lett.* **94**, 056101 (2005).

¹⁵T. König, G. H. Simon, H. P. Rust, and M. Heyde, *Appl. Phys. Lett.* **95**, 083116 (2009).

¹⁶R. H. M. Smit, R. Grande, B. Lasanta, J. J. Riquelme, G. Rubio-Bollinger, and N. Agrait, *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 113705 (2007).

¹⁷A. Bettac, J. Koeble, K. Winkler, B. Uder, M. Maier, and A. Feltz, *Nanotechnology* **20**, 264009 (2009).

¹⁸B. J. Albers, M. Liebmann, T. C. Schwendemann, M. Z. Baykara, M. Heyde, M. Salmeron, E. I. Altman, and U. D. Schwarz, *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 033704 (2008).

¹⁹F. J. Giessibl, *Rev. Mod. Phys.* **75**, 949 (2003).

²⁰L. Gross, F. Mohn, N. Moll, P. Liljeroth, and G. Meyer, *Science* **325**, 1110 (2009).

²¹N. Berdonov, A. J. Pollard, and P. H. Beton, *Appl. Phys. Lett.* **94**, 043110 (2009).

²²L. Gross, F. Mohn, P. Liljeroth, J. Repp, F. J. Giessibl, and G. Meyer, *Science* **324**, 1428 (2009).

²³M. Ternes, C. P. Lutz, C. F. Hirjibehedin, F. J. Giessibl, and A. J. Heinrich, *Science* **319**, 1066 (2008).

²⁴Omicron NanoTechnology GmbH, Limburger Strasse 75, 65232 Taunusstein, Taunusstein, Germany. <http://www.omicron.de/>. The lower part of

the head of the Omicron VT-AFM UHV microscope was mechanically adapted to receive our double preamplifier. The wiring layout was also modified on the connectors of the head to operate both in dynamic STM and AFM. The tip is connected to the electrical ground, and the tunneling bias voltage is applied on the sample holder.

- ²⁵A. J. Nam, A. Teren, T. A. Lusby, and A. J. Melmed, *J. Vac. Sci. Technol. B* **13**, 1556 (1995). <http://www.specs-zurich.com/en/SPM-Control-System.html>.
- ²⁶M. Fotino, *Appl. Phys. Lett.* **60**, 2935 (1992).
- ²⁷NANONIS-SPECS Zurich GmbH, Technoparkstrasse 1, 8005 Zürich, Switzerland. <http://www.specs-zurich.com/en/SPM-Control-System.html>. The complete stand-alone Scanning Probe Microscope controller from NANONIS-SPECS has been used composed of the RC4, SC4 and OC4 PLL modules.
- ²⁸I. Horcas, R. Fernandez, J. M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, and A. M. Baro, *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 013705 (2007).
- ²⁹L. Scifo, M. Dubois, M. Brun, P. Rannou, S. Latil, A. Rubio, and B. Grévin, *Nano Letters* **6**, 1711 (2006).
- ³⁰B. Gotsmann, C. Seidel, B. Anczykowski, and H. Fuchs, *Phys. Rev. B* **60**, 11051 (1999).
- ³¹A. A. Farrell, T. Fukuma, T. Uchihashi, E. R. Kay, G. Bottari, D. A. Leigh, H. Yamada, and S. P. Jarvis, *Phys. Rev. B* **72**, 125430 (2005).
- ³²M. Chandross, C. D. Lorenz, M. J. Stevens, and G. S. Grest, *Langmuir* **24**, 1240 (2008).
- ³³H. Sarraf, L. Škarpová, and P. Louda, *Arch. Mater. Sci. Eng.* **28**, 489 (2007).
- ³⁴Y. Sugimoto, Y. Nakajima, D. Sawada, K. Morita, M. Abe, and S. Morita, *Phys. Rev. B* **81**, 245322 (2010).
- ³⁵C. Barth, A. S. Foster, M. Reichling and A. L. Shluger, *J. Phys.: Condens. Matter* **13**, 2061 (2001).
- ³⁶O. H. Pakarinen, C. Barth, A. S. Foster, and C. R. Henry, *J. Appl. Phys.* **103**, 054313 (2008).
- ³⁷J. Polesel-Maris, H. Guo, T. Zambelli, and S. Gauthier, *Nanotechnology* **17**, 4204 (2006).
- ³⁸Y. Gan, *Surf. Sci. Rep.* **64**, 99 (2009).
- ³⁹C. Barth, O. H. Pakarinen, A. Foster, and C. R. Henry, *Nanotechnology* **17**, S128 (2006).
- ⁴⁰S. Hembacher, F. J. Giessibl, and J. Mannhart, *Phys. Rev. Lett.* **94**, 056101 (2005).
- ⁴¹F. J. Giessibl, *Appl. Phys. Lett.* **76**, 1470 (2000).
- ⁴²K. Karrai and R. D. Grober, *Ultramicroscopy* **61**, 197 (1995).
- ⁴³R. D. Grober, J. Acimovic, J. Schuck, D. Hessman, P. J. Kindlemann, J. Hespanha, A. S. Morse, K. Karrai, I. Tiemann, and S. Manus, *Rev. Sci. Instrum.* **71**, 27760 (2000).
- ⁴⁴M. Abramowitz and I. A. Stegun, *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables*, 9th printing (Dover, New York, 1972), p. 374.
- ⁴⁵S. Kondo, S. Heike, M. Lutwyche, and Y. Wada, *J. Appl. Phys.* **78**, 155 (1995).
- ⁴⁶T. T. Tsong, *Phys. Rev. B* **44**, 13703 (1991).

A tuning fork based wide range mechanical characterization tool with nanorobotic manipulators inside a scanning electron microscope

Juan Camilo Acosta,^{1,a),c)} Gilgueng Hwang,^{1,b),c)} Jérôme Polesel-Maris,² and Stéphane Régnier¹

¹*Institut des Systèmes Intelligents et de Robotique Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 7222 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex, France*

²*CEA, IRAMIS, Service de Physique et Chimie des Surfaces et Interfaces, F-91191 Gif-sur-Yvette, France*

(Received 12 August 2010; accepted 22 December 2010; published online 18 March 2011)

This study proposes a tuning fork probe based nanomanipulation robotic system for mechanical characterization of ultraflexible nanostructures under scanning electron microscope. The force gradient is measured via the frequency modulation of a quartz tuning fork and two nanomanipulators are used for manipulation of the nanostructures. Two techniques are proposed for attaching the nanostructure to the tip of the tuning fork probe. The first technique involves gluing the nanostructure for full range characterization whereas the second technique uses van der Waals and electrostatic forces in order to avoid destroying the nanostructure. Helical nanobelts (HNB) are proposed for the demonstration of the setup. The nonlinear stiffness behavior of HNBs during their full range tensile studies is clearly revealed for the first time. Using the first technique, this was between 0.009 N/m for rest position and 0.297 N/m before breaking of the HNB with a resolution of 0.0031 N/m. For the second experiment, this was between 0.014 N/m for rest position and 0.378 N/m before detaching of the HNB with a resolution of 0.0006 N/m. This shows the wide range sensing of the system for potential applications in mechanical property characterization of ultraflexible nanostructures. © 2011 American Institute of Physics. [doi:10.1063/1.3541776]

I. INTRODUCTION

Recently, many ultraflexible and elastic micro/nanostructures have been synthesized as building blocks to create microelectromechanical systems/nanoelectromechanical systems (MEMS/NEMS).^{1,2} Carbon nanotubes (CNTs),³⁻⁶ Nanowires (NWs),⁷ and nanohelices⁸⁻¹³ are the most widely synthesized and are considered as the promising elements for various NEMS and nanoelectronics. However, these devices are principally limited to laboratory prototypes, and so, they have not yet been commercialized. This is mainly due to the manufacturing challenges and physical properties which remain little known. For both of these problems, precise knowledge of the mechanical properties of these nanostructures is imperative. For example, the precise mechanical properties of NWs and NTs can predict their device characteristics. It also contributes to their arrayed growth and assembly in controlled direction thus, the manufacture of devices such as field emitters can be achieved.

The mechanical properties of these one-dimensional (1D) nanostructures could be studied using conventional atomic force microscopy (AFM) thanks to their simple mechanics. However, recently fabricated three-dimensional (3D) nanostructures such as 3D nanohelices face their challenges to understand the complex mechanics. The 3D nanohelices are inspired by nature and its complex mechanical properties. For example, the mechanics of 3D biological structures in nature such as deoxyribonucleic acid (DNA), proteins, cells,

or tissues are complicated and being studied.¹⁴ As inorganic nanohelices, the electrical and mechanical properties of SiGe/Si/Cr and SiGe/Si Helical nanobelts (HNBs) were recently characterized separately through experiments and simulations.¹² The fabrication and mechanical characterization of InGaAs/GaAs HNBs have been also described.¹³ Their excellent flexibility provides new avenues for fabrication of ultrasmall force sensors with high resolution as depicted in Fig. 1(a). The displacement of these nanohelices was detected by a recently developed visual recognition¹⁵ or piezoresistive smart sensing mechanism.¹⁶ However, their mechanical properties were only studied in the limited upper displacement region mainly due to the lack of proper calibration tools for a full range mechanics study.^{12,13} A high resolution and long range mechanical calibration system is, therefore, necessary.

As conventional force calibration tools, AFM,¹⁷ piezoresistive cantilever,¹⁸ capacitive force sensor,¹⁹ and other MEMS (Ref. 20) have mostly been used. However, their sensing resolution and range are also limited as depicted in Fig. 1(b). This means that they are insufficient to characterize the full range of nanostructure mechanics.

For this reason, we need large range force sensing tools. Our approach uses tuning forks for wide range force sensing. They have been widely used in the watch industry. Recently, they have also been used as force sensors, mainly for imaging and manipulating matter under a scanning probe microscope,²¹⁻²³ and to function as force sensors inside SEM thanks to their simple readout system by replacing laser optics.²⁴ However, these last approaches were mainly limited to the integration of AFM imaging resolution in addition

^{a)}Electronic mail: acosta@isir.upmc.fr.

^{b)}Electronic mail: hwang@isir.upmc.fr.

^{c)}These authors contributed equally to this work.

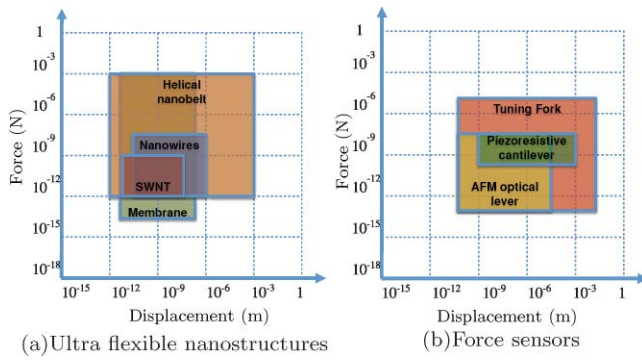


FIG. 1. (Color online) Force vs displacement diagram.

to the SEM imaging. Nanomanipulation systems based on tuning forks for mechanical characterization inside SEM have not yet been attempted.

To achieve this objective, we aim to develop a 3D nanomechanical property characterization system with large range and high resolution force sensing. The 3D characterization based on the developed sensor is achieved by SEM for an accurate visual detection and a nanomanipulation system with 3 degrees of freedom and nanometer positioning resolution. We propose a tuning fork based force sensor with a large range and a high resolution. The performance of the proposed system is proved by a full range tensile elongation study of HNB.

II. PRINCIPLES OF FORCE GRADIENT MEASUREMENT WITH A TUNING FORK

A. Overview of dynamic force sensing

Force measurement with a tuning fork is possible with standard AFM dynamic force sensing techniques, such as amplitude/phase modulation (AM/PM) and frequency modulation (FM) [see Table I]. For the first, a lock-in amplifier can be used in order to separate amplitude and phase from the original signal. From these two signals, the force can be obtained through an analytical conversion formula.^{25,26} For the second, an automated gain controller (AGC) and a phase locked loop (PLL) controller are used to obtain the resonant frequency of the tuning fork. With the shift of the resonant frequency, the gradient of the force can be obtained.^{27,28}

Selecting AM or FM depends mainly on the required settling time τ of the tuning fork. For AM–AFM regulation, the reaction time $\tau = Q/(\pi f_0)$ (where f_0 is the resonant frequency and Q is the quality factor) is highly dependent on the quality factor. Furthermore, the quality factor is higher in vacuum conditions of the SEM, and consequently, the bandwidth analysis will be limited. The FM–AFM removes the time constant dependency²⁹ of the analysis, thus allowing wide band-

TABLE I. Amplitude modulation vs frequency modulation.

	AM/PM	FM
Electronic sensing	Amplitude (V)/Phase(°)	Frequency shift (Δf)
→ Physics sensing	Force	Force gradient
Settling time	$\tau = Q/(\pi f_0)$	$\tau \approx 1/f_0$

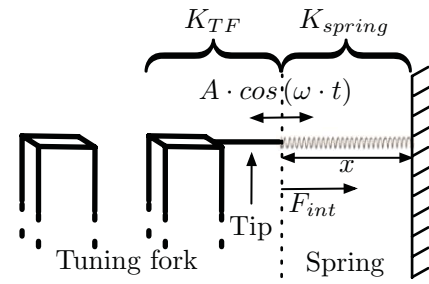


FIG. 2. Tuning fork mechanical model with virtual spring.

width with a high quality factor. This, therefore, makes it the primary selection for this work.

B. Frequency modulation gradient force sensing

The tuning fork frequency shift can be expressed as³⁰

$$\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{1}{A \cdot K_{TF}} \int_0^{1/f_0} F_{int}(\omega \cdot t) \cdot \cos(\omega \cdot t) dt, \quad (1)$$

where K_{TF} is the stiffness of the tuning fork, A is the tuning fork mechanical oscillation amplitude, F_{int} is the interaction force between the tip of the tuning fork and the sample, f_0 is the resonant frequency of the tuning fork, Δf is the frequency shift, and ω is the angular frequency of the tuning fork.

A frequency shift implies a change in the force gradient. The object in contact is consequently deforming and can be modeled as a spring [Fig. 2]. The interaction force can then be modeled with Hooke's law [Eq. (2)], where K_{spring} represents the nonconstant stiffness of the object and Δx the deformation of the object.

$$F_{int} = K_{spring} \cdot \Delta x. \quad (2)$$

The tip of the tuning fork is in contact, and aligned, with one end of the spring [Fig. 2]. Because of this alignment, the lateral stiffness of the tuning fork tip is not taken into account. Furthermore, the longitudinal stiffness of the tip is higher by several orders of magnitude than the spring, and so, can also be ignored. The elongation of the spring can be expressed as

$$\Delta x = A \cdot \cos(\omega \cdot t) + \delta x, \quad (3)$$

where $A \cdot \cos(\omega \cdot t)$ is the contribution from the oscillation amplitude of the tuning fork probe, $f = \omega/(2 \cdot \pi)$, and δx is the linear elongation of the spring.

The interaction force F_{int} of the spring model [Eq. (2)] and the displacement Δx [Eq. (3)], can be replaced in the frequency shift of the tuning fork [Eq. (1)] resulting in Eq. (4), where the stiffness of the object modeled as a spring can be obtained in terms of the resonant frequency of the tuning fork, the frequency shift, and the stiffness of the tuning fork. Details on error estimation are collated in the Appendix,

$$K_{spring} = \frac{2 \cdot \Delta f \cdot K_{TF}}{f_0}. \quad (4)$$

The stiffness of the tuning fork can be obtained using a geometrical model. The tuning fork dimensions can be measured, either with a microscope or SEM, thus the use of a geometrical method is feasible,

$$K_{TF} = \frac{E \cdot w \cdot t^3}{4 \cdot l_1^3}. \quad (5)$$

In Eq. (5), w , t , and l_1 are the width, height, and length of the tuning fork prong (geometrical parameters of the tuning fork can be seen in Fig. 5) and $E = 78.7$ GPa, is the Young modulus of the quartz crystal of tuning forks. The stiffness of the tuning fork can be assumed constant.²³

As A , K_{TF} , and f_0 are constant, Eq. (4) clearly shows that the measured frequency shift will reveal the stiffness behavior of the object.

III. TUNING FORK MECHANICAL CHARACTERIZATION SYSTEM

A. System overview

An *in situ* SEM tuning fork mechanical property characterization system is presented. An OC4-Station from SPECS-Nanonis is used for the oscillation control of the tuning fork and data acquisition. The advantages of this station are namely that it has a lock-in amplifier, a PLL, an AGC, a data acquisition hardware and software, and a real time operating system. The electronic preamplifier for the tuning fork was specially designed for use in SEM imaging conditions. These electronics will be fully described in a forthcoming article. A TTi EX752M multimode power supply unit was used with fixed ± 5 V for the tuning fork electronic preamplifier. The detailed experimental setup is shown in Fig. 3. The main advantage of this system is that all the electronics for the tuning fork and the manipulators are outside the SEM chamber, thus avoiding any influences from the electron beam and space occupation.

For vacuum environment and visual feedback, a SEM (Leica stereoscan 260 cambridge instruments) is used. Two nanomanipulators (MM3A-EM and Kleindiek) are used to

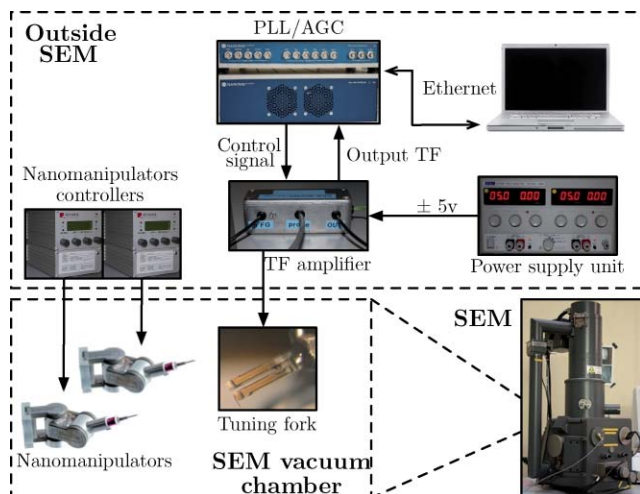


FIG. 3. (Color online) System configuration of used hardware inside and outside the SEM.

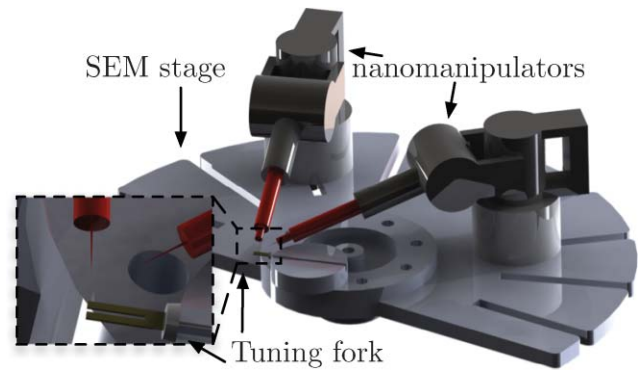


FIG. 4. (Color online) 3D CAD model of experimental setup of nanomanipulators and tuning fork inside SEM chamber.

manipulate the nanostructures. Further details on the role of the manipulators and the manipulation procedure are described in Sec. IV. Each nanomanipulator has 3 degrees of freedom and, respectively, 5, 3.5, and 0.25 nm resolution at the tip in X, Y, and Z axis. Each axis is actuated with piezo stick-slip principle and is controlled via an open loop piezo controller. Configuration of the manipulators and the tuning fork inside the SEM chamber can be seen in Fig. 4.

The tuning forks were manufactured by Citizen America – CFS206 32.768KDZB-UB. A tip is attached to the tuning fork in order to fix it to the nanostructure. Picoprobes, tungsten tips (T-4-10-1 mm, tip radius: 100 nm, GGB industries), and tips made with platinum iridium Pt90/ir10 wires are used for the nanomanipulator and the tuning fork, respectively.

B. Tuning fork probe preparation

Several factors have to be considered before adding the tip. The quality factor of the tuning fork should remain as high as possible in order to obtain the highest sensitivity. It is based on balancing the weight between the two prongs. Any weight added to one of the prongs should be compensated by the other one so as to avoid decreasing the quality factor.²³ As shown in Fig. 5, for grounding with the prong of the tuning fork, electrically conductive silver epoxy EPO-TEK H21D (Epoxy Technology) is used to fix the tip, thus avoiding electrostatic charging by electron beam inside the SEM. Glue also needs to be added for weight compensation on the other prong of the tuning fork; this can be done with either conductive or nonconductive glue. As the electron beam is mainly focused

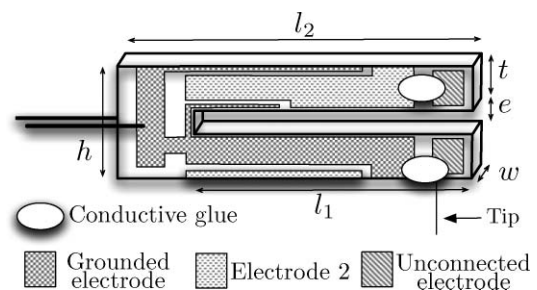


FIG. 5. Schematic of tuning fork electrodes with glued probe.

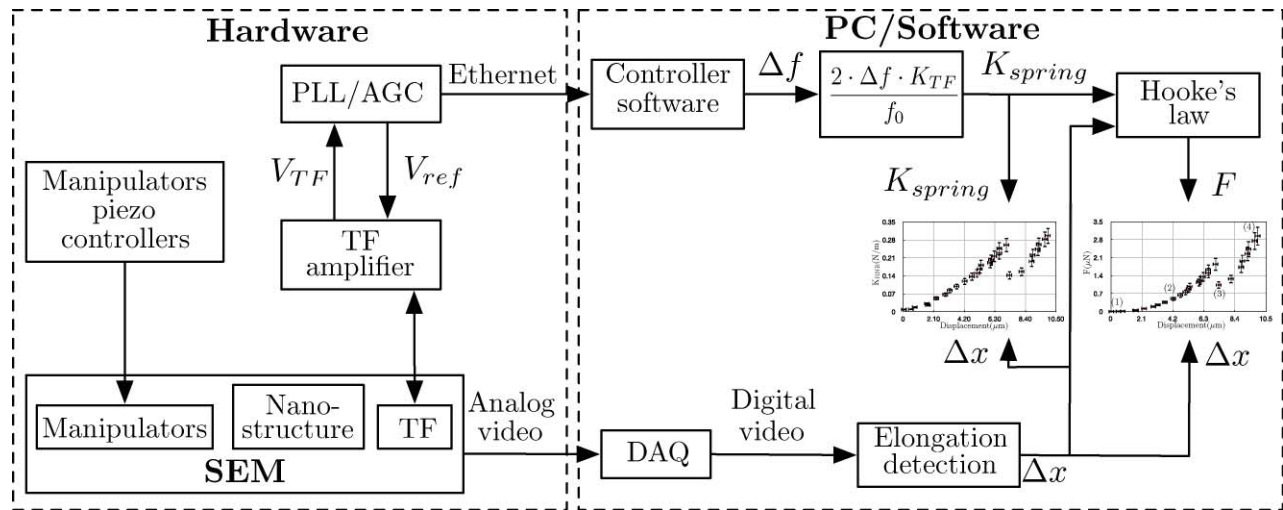


FIG. 6. Experiments' data flow for plot generation. The tuning fork frequency shift obtained, thanks to the PLL and AGC turned on, is then transformed to stiffness with Eq. (5), which is transformed to force with Hooke's law. SEM video feedback is imported to a computer with a data acquisition card. The elongation of the nanostructure is measured from video acquisition.

and zoomed on the tip of the probe, the other prong of the tuning fork has little risk of charging.

C. Data flow

The data flow of the entire experiment can be divided into three different and independent blocks (Fig. 6). The first is the nanomanipulator block. It is composed of both manipulators and their respective controllers for the piezoactuators. They are manually operated and are not connected to the rest of the setup. The second block represents all the hardware and software used for the tuning fork. The PLL and amplitude controller are needed to obtain the frequency shift. This frequency is acquired with LABVIEW based acquisition software and after the experiment is finished, it is transformed into the stiffness (under the assumption of the constant stiffness of the tuning fork²³) and the constraint force of the measured object with Eqs. (4) and (2). The last block represents the SEM based visual feedback. Analog video signal from the SEM is imported with a data acquisition card and recorded. Once the experiment is finished, the visual detection is used to estimate the nanostructure elongation. Hence, the elongation measurement and the stiffness estimation of the nanostructure give the applied force of the nanostructure.

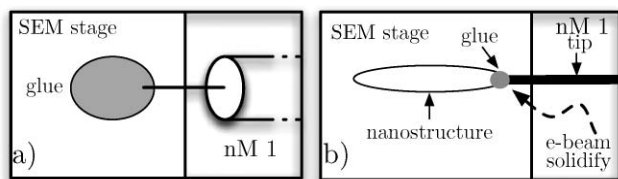


FIG. 7. Protocol for picking the nanostructure with manipulator tip. (a) Adding glue to the probe of the nanomanipulator. (b) Picking nanostructure from substrate with the nanomanipulator probe and soldering with e-beam. nM stands for nanomanipulator.

IV. MANIPULATION PROTOCOL

A. Assembly of nanostructure with manipulation setup

The tuning fork probe was fixed to the top of the SEM stage to avoid mechanical disturbances. In order to pick up the nanostructure, the free end of the nanostructure is attached to the tip of the manipulator. For this purpose, the probe of the manipulator is dipped into Nanopoxy glue [Fig. 7(a)], then it is brought closer to make contact with the end of the nanostructure [Fig. 7(b)]. The SEM electron beam is focused onto the glue to solidify it.

Two different attachments to the tip of the tuning fork and the nanostructure can be made. The first technique involves fixing the nanostructure with glue to the tip of the tuning fork. For this, glue is added to the tip of the tuning fork with the second nanomanipulator [Fig. 8(a)]. The nanostructure is then brought closer to nanomanipulator 1 to make contact with the tip of the tuning fork. The SEM electron beam is used to solidify the glue [Fig. 8(b)]. This technique allows full range characterization of the nanostructure, however, the nanostructure has to be destroyed eventually in order to disconnect the system. For the second experiment, electrostatic and van der Waals forces are used to maintain the nanostructure attached to the probe of the tuning fork. This is basically the same

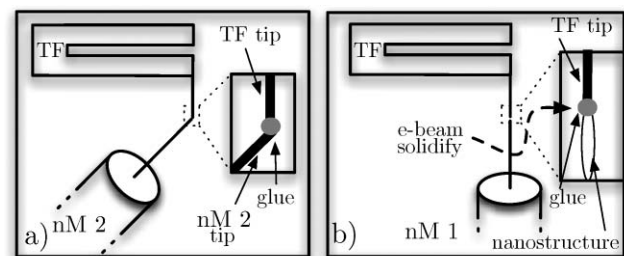


FIG. 8. Attachment with glue of the nanostructure to the tuning fork tip. (a) Adding glue to tip end of the tuning fork probe. (b) Attaching the nanostructure to the tuning fork tip and soldering with the electron beam.

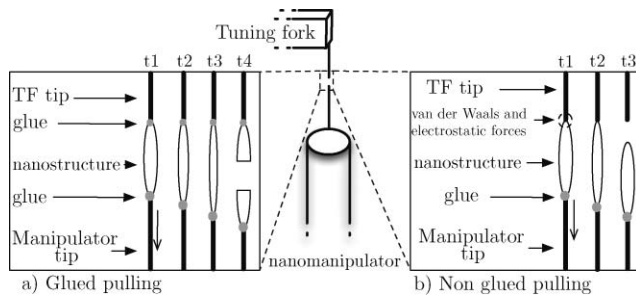


FIG. 9. Experimental protocol and configurations for longitudinal pulling. (a) Nanostructure glued to the tip of tuning fork. (b) Nanostructure not glued to the tip of tuning fork.

configuration except for the absence of applying chemical glue between the tuning fork probe and the nanostructure. Also, it is a nondestructive technique and can be repeated several times.

B. Experimental protocol

Usually, the lateral stiffnesses of ultraflexible nanostructures such as CNTs and HNBs are smaller than longitudinal ones by at least 1 order of magnitude. As a result, compressing the structure is very challenging; it might bend instead of compress. For this reason, the experimental protocol is focused on elongation of the nanostructure.

For the attachment with glue [Fig. 9(a)], the bond with glue is stronger than the mechanical resistance of the nanostructure. This guarantees that the nanostructure will break before the glue, and so full range characterization, can be achieved. For the second type of elongation [Fig. 9(b)], adhesion forces are used to maintain the bond between the nanostructure and the tip of the tuning fork. This bond depends mainly on the electrostatic force and depending on the dimensions and conductivity of the nanostructure, it could be higher or lower. Furthermore, this force can be increased by the SEM electron beam voltage and focusing it on the structure. At certain points during the elongation, the structure can be detached and the experiment can be repeated again.

V. HELICAL NANOBELT CHARACTERIZATION

InGaAs/GaAs bilayer HNBs were used for the experiments. The HNBs were fabricated by the process described in Ref. 16. Finite element method (FEM) simulation is used to estimate the deflection by the applied force onto HNBs, thus, obtaining the rest (at no elongation) stiffness. Longitudinal stiffness is estimated to be 0.009 N/m for HNB 1 and

0.011 N/m for HNB 2 as summarized in Table II. This simulation demonstrates the rest position stiffness of the HNB. Nevertheless, nonconstant behavior of the stiffness for upper elongation range was demonstrated by previous experimental works¹³ with an AFM cantilever under SEM. However, in previous works, full range measurement was not attempted due to the lack of wide range force sensing.

Two tuning fork probes were used for the experiments. The geometry information and the estimated stiffness of the two tuning forks are summarized in Table III.

A. Full range mechanical characterization of HNB

For this experiment, the HNB 1 was attached between the tuning fork tip and the manipulator tip with glue for full range characterization. With the method described in Sec. III C, frequency shift [Fig. 10(a)], the elongation of the HNB [Fig. 10(b)], the HNB stiffness [Fig. 10(c)], and the constraint force of the HNB [Fig. 10(d)] were obtained. The frequency shift noise (estimated at 5 mHz) is much lower than the frequency shift steps due to the elongation of the HNB. As the manipulators have no position feedback, the displacements are estimated from the SEM recorded video at 33 Hz frame rate with a resolution of 0.2 μm for each measurement. Details on error estimation for frequency shift and force are summarized in the Appendix.

During the motion of the nanomanipulator, different geometrical configurations of the HNB stand out: these are compiled in Fig. 10(e). At the beginning of the experiment, the HNB is in rest position and the pitch looks homogeneous [Fig. 10(e)(1)]. The stiffness of the HNB for this position was obtained with finite element simulation. To obtain the experimental stiffness of the HNB for the rest position, the difference between the tuning fork resonant frequency before and after the HNB attachment to the tuning fork tip needs to be obtained. However, one of the main problems for this measurement was that the vacuum condition of the SEM improved over time, thus making the resonant frequency increase continuously. The order of magnitude of the frequency shift due to this is in a similar range to the frequency shift due to HNB attachment. As a result, the initial stiffness could not be measured and so, it was estimated by FEM. It should be noted that the initial stiffness model by FEM was confirmed by experiments.¹³

With elongation [Fig. 10(e)(2)], the HNB shows a non-homogeneous pitch. This is due to the rotation constraint imposed by attaching glue to both sides. Further elongation increases the pitch differences in the HNB until one part of the

TABLE II. HNB specifications.

	HNB 1	HNB 2
Thickness of InGaAs/GaAs (nm)	11.6/15.6	11.6/15.6
Length (μm)	25.4	53.4
Pitch (μm)	3.9	8.9
Number of turns	6.5	6
Stripe width (μm)	1.5	2.5
Diameter (μm)	2	2.5
Longitudinal stiffness (FEM)(N/m)	0.009	0.011

TABLE III. Tuning forks' specifications with glued tip at the end of the prong.

	TF 1	TF 2
Resonant frequency f_0 (Hz)	28325.5	30895.2
Stiffness k_{TF} (N/m)	7936	7936
Quality factor	11 145	19 800
Prong length l_1 (μm)	3204	3204
Prong height t (μm)	382	382
Prong width w (μm)	238	238

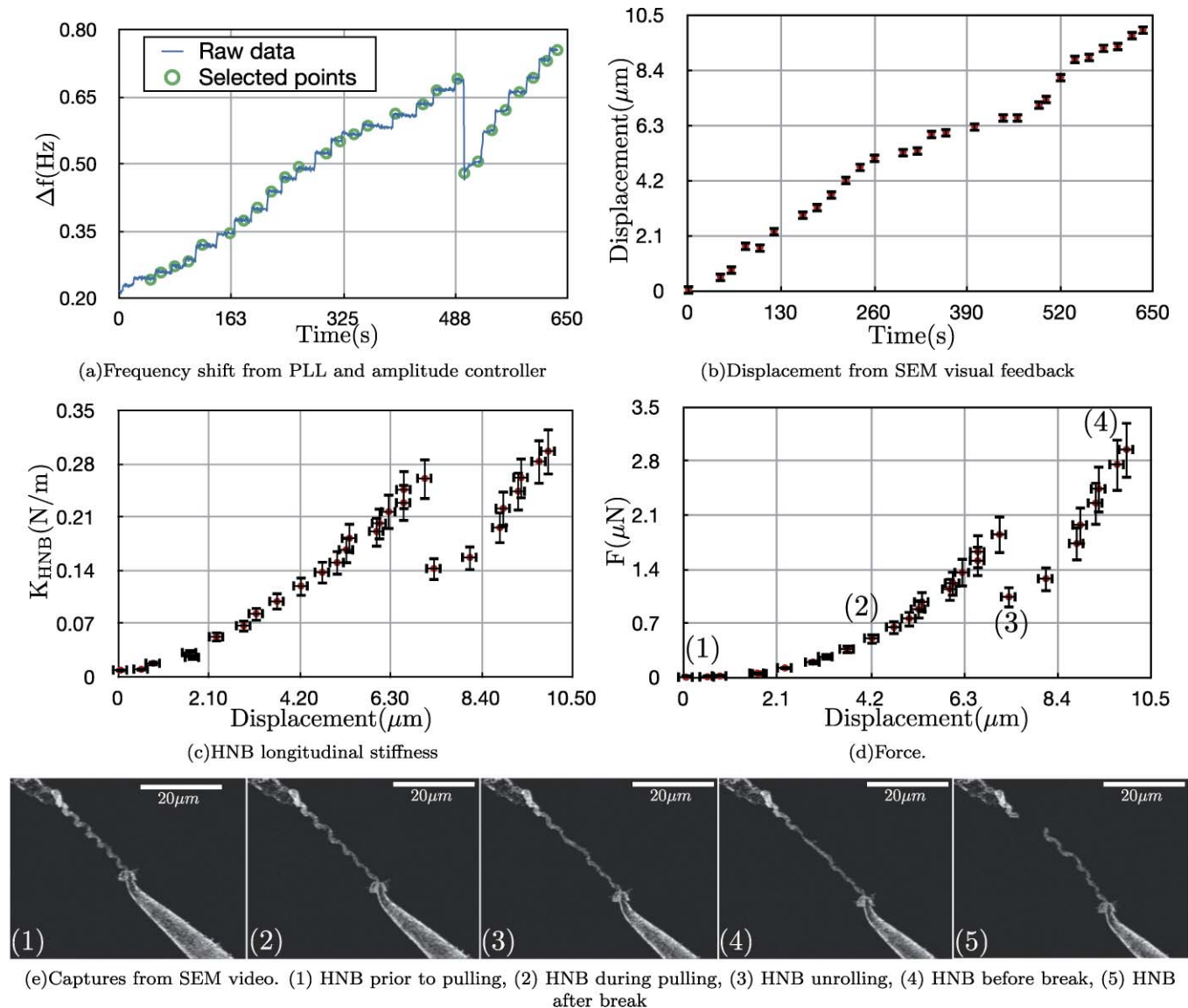


FIG. 10. (Color online) Full range longitudinal pulling.

HNB unrolls at $7.3 \mu\text{m}$ displacement at 500 s [Fig. 10(e)(3)]. Subsequently, there is a release of the strain in the HNB that is reflected in a drop of the frequency shift, stiffness, and force [Figs. 10(a), 10(c), and 10(d)]. At this point, one section of the HNB is unrolled and damaged.

Finally, the HNB is elongated until it is almost completely unrolled and damaged just before breaking [Fig. 10(e)(4)]. The HNB then breaks [Fig. 10(e)(5)]. The contact between the tips and the HNB remains after breaking to ensure the attachment process.

These results confirm the nonconstant stiffness behavior of HNBs in full range elongation. In previous works,¹³ where AFM cantilevers were inside the SEM, this behavior was not clearly measured for displacement of less than $10 \mu\text{m}$. Furthermore, the nonhomogeneous pitch of this HNB has been revealed with the nonlinear behavior of the stiffness and SEM visual feedback. The resulting elongation force, therefore, shows a highly nonlinear behavior which goes from 14.5 nN for the smallest step made to $2.95 \mu\text{N}$ before breaking. This shows the wide range sensing of the system.

B. Nondestructive characterization

The previous experiment had three principal limitations, which we aim to solve in this second experiment. First, the vacuum conditions disturbed the resonant frequency of the tuning fork with an increasing offset as time went on. Second, it is a destructive method whereby the HNB is destroyed after the experiment, and the tips of the tuning fork and manipulator can become contaminated with glue and remaining parts of the HNB. In addition to this, attaching the HNB by both ends prevents its rotation during tensile elongation, and so eventually damaging it. Finally, the SEM video is manually analyzed. This means that for every frame of interest, the elongation of the HNB is estimated with manually placed points in the video.

In order to solve the first problem, vacuum characterization is done prior to the experiment to identify the saturation time after pumping where the variation of vacuum conditions will not affect the experiment. For this purpose, frequency shift is recorded during the pumping process [inset

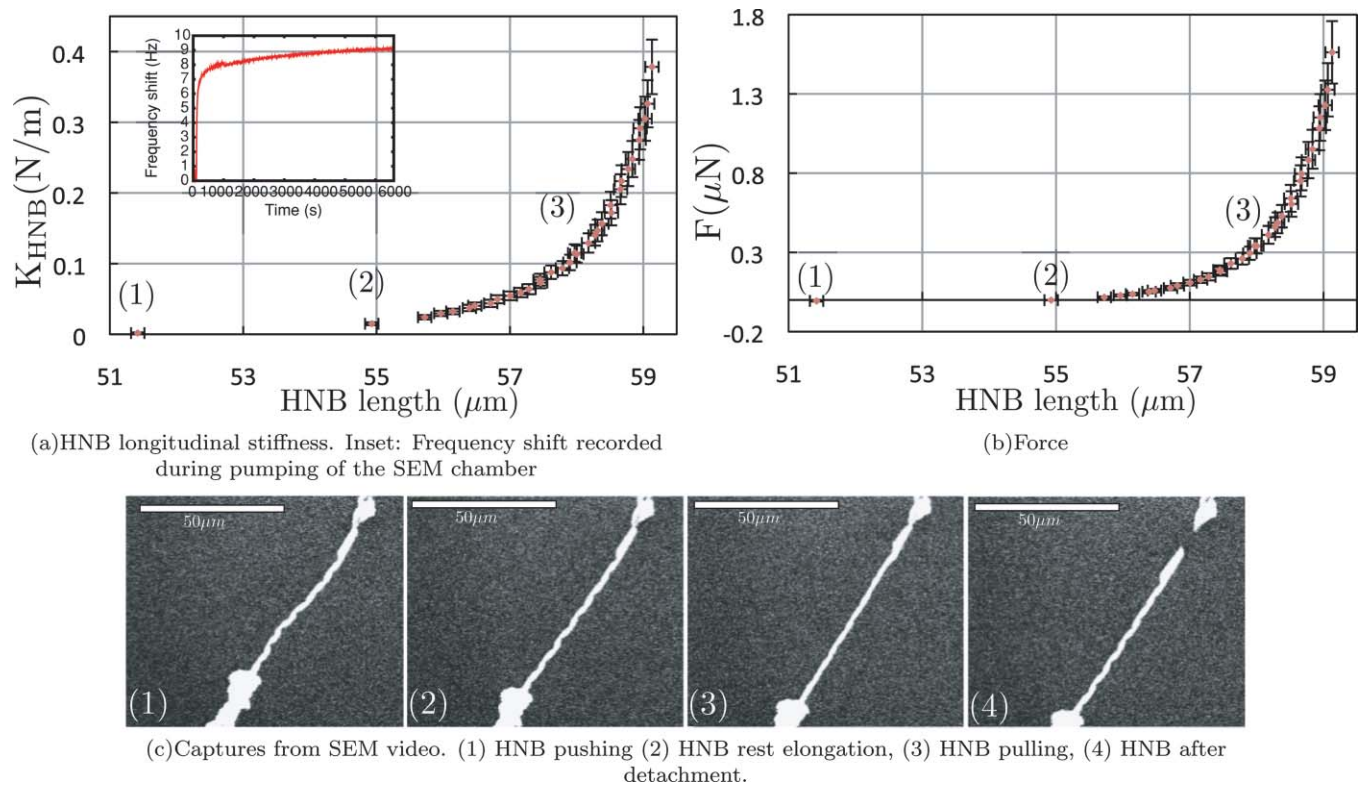


FIG. 11. (Color online) Nondestructive longitudinal pulling.

Fig. 11(a)]. After 90 min, the frequency shift drift due to vacuum conditions is small enough for a 10 min experiment. To overcome the second problem, as explained in Sec. IV, electrostatic and van der Waals forces are used to maintain the HNB attached to the tip end of the tuning fork. Frequency shift noise decreased from 5 to 1 mHz due to the higher quality factor of the tuning fork. For the elongation of the HNB, offline visual tracking software³¹ is used. This, in addition to the high contrast used in the SEM, makes the error decrease from 0.2 to 0.1 μm even though the scale passed from 20 to 50 μm .

The stiffness and force applied to the HNB are obtained in the same manner as previous experiments [Figs. 11(a) and 11(b)]. Four different moments of the experiment are highlighted. First [Fig. 11(c)(1)], the HNB is pushed and has a light “s-like” shape. This is mainly due to a much lower lateral stiffness than longitudinal stiffness of the HNB. Consequently, the stiffness measured is composed of both lateral and longitudinal and its absolute value is lower than the longi-

tudinal rest position stiffness. The elongation, being negative, results in a negative force vector. After, the HNB is elongated to the rest position [Fig. 11(c)(2)], and then, elongated further [Fig. 11(c)(3)] until it detaches from the probe of the tuning fork [Fig. 11(c)(4)].

In comparison to the previous experiment, a higher nonlinearity can be noticed. This is mainly due to the unconstrained rotation of the end of the HNB in contact with the tuning fork. As a result, the HNB freely adjusts its number of turns through elongation, avoiding damages and the loss of a helical shape. Furthermore, the estimated force of 1.56 μN before releasing corresponds to the addition of van der Waals and electrostatic forces. The results of the experiments are detailed in Table IV.

VI. CONCLUSIONS

In situ SEM robotic nanomanipulation system for dynamic mechanical characterization of ultraflexible nanostructures has been presented. A frequency modulated tuning fork is used for gradient force sensing and a method for nanostructure stiffness estimation through the frequency shift of the tuning fork was developed. For manipulation of the nanostructures, two nanomanipulators are used and an assembly protocol is developed. Two experiment protocols are proposed. For the first, the nanostructure is fixed between the tips of the tuning fork probe and manipulator for full range characterization. For the second, electrostatic and van der Waals forces are used to keep the structure attached to the tip of the tuning fork, which allows nondestructive and repeatable characterization to be done.

TABLE IV. Summary of experiments results. Exp stands for experiment.

	Exp 1	Exp 2
Degrees of freedom of manipulator	3	
Manipulator resolution in $x/y/z$ (nm)	5/3.5/0.25	
Frequency shift resolution (Hz)	0.005	0.001
→ Corresponding stiffness resolution (N/m)	0.0031	0.0006
HNB rest stiffness estimated by FEM (N/m)	0.009	0.011
HNB measured rest stiffness (N/m)	NA	0.014
HNB highest measured stiffness (N/m)	0.297	0.378
HNB highest measured elongation (μm)	9.95	4.13
→ Breaking/detaching force (μN)	2.95	1.56

For the demonstration of the system, HNBs were used. The nonconstant stiffness behavior of HNBs during their controlled tensile elongation was clearly revealed in full range for the first time to the best of our knowledge. The obtained stiffness ranges from 0.009 to 0.297 N/m with a resolution of 0.0031 N/m during full elongation and 0.011 to 0.378 N/m with a resolution of 0.0006 N/m for the nondestructive method. It was transformed into full elongation tensile forces as high as 2.95 μN for the first experiment and 1.56 μN for the second. The revealed nonlinear behavior of the stiffness with SEM visual feedback shows the capability of the proposed system to understand the mechanical properties of the nanostructure due to geometry deformation. The use of a lower spring constant tuning fork probe can dramatically improve the resolution. Despite this, the main limit of the system is the resolution of SEM visual analysis. Furthermore, the nanomanipulator can be installed on top of a closed loop controlled xyz piezo nanostage to obtain the displacement with more accuracy and increase the dexterity and resolution of the system.

The proposed system will allow dynamic mechanical characterization of other ultraflexible nanostructures, such as nanowires, nanotubes, and graphene membranes, to be possible in the future. Moreover, the dynamic measurement in addition to the dexterity of the system makes it ideal for measuring the dynamic oscillation mode of membranes for optical micromirror applications. Furthermore, by incorporating environmental electron microscopes or fluorescence optics, flexible and elastic biological nanostructures such as DNA, proteins, cells, and tissues are also in the scope of this new system.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the French Atomic Energy Commission (CEA) Fontenay aux Roses for the SEM and facilities, and the University of Tokyo for allowing us to use the two Kleindiek manipulators with their respective controllers. We thank Guy Blaise for his SEM expertise at INSTN of CEA Saclay. We also thank François Thoyer, Jacques Cousty, Christophe Lubin, and Laurent Pham Van for their fruitful discussions. This work has been supported by the French National Project NANOROL ANR-07-ROBO-0003.

APPENDIX: NANOSTRUCTURE STIFFNESS AND FORCE ERROR ESTIMATION

The nanostructure stiffness and force error are obtained with error propagation method in Eqs. (4) and (2).

$$\begin{aligned}
 eK_{\text{spring}} &= \left| \frac{\delta K_{\text{spring}}}{\delta K_{\text{TF}}} \right| \cdot eK_{\text{TF}} + \left| \frac{\delta K_{\text{spring}}}{\delta \Delta f} \right| \cdot e\Delta f + \left| \frac{\delta K_{\text{spring}}}{\delta f_0} \right| \cdot ef_0 \\
 &= \frac{2}{f_0} \cdot \left(\Delta f \cdot eK_{\text{TF}} + K_{\text{TF}} \cdot e\Delta f + \frac{K_{\text{TF}} \cdot \Delta f \cdot ef_0}{f_0} \right), \tag{A1}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 eF &= \left| \frac{\delta F}{\delta K_{\text{spring}}} \right| \cdot eK_{\text{spring}} + \left| \frac{\delta F}{\delta x} \right| \cdot ex \\
 &= x \cdot eK_{\text{spring}} + K_{\text{spring}} \cdot ex, \tag{A2}
 \end{aligned}$$

where eK_{TF} , $e\Delta f$, and ef_0 are the estimation error of the tuning fork stiffness, the frequency shift, and the resonant frequency. Here, ex is the spring elongation estimation error with SEM visual feedback.

- ¹R. Saeidpourazar and N. Jalili, *IEEE Trans. Ind. Electron.* **55**, 3935 (2008).
- ²R. Smith, D. Sparks, D. Riley, and N. Najafi, *IEEE Trans. Ind. Electron.* **56**, 1066 (2009).
- ³H. Dai, J. H. Hafner, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, and R. E. Smalley, *Nature (London)* **384**, 147 (1996).
- ⁴J. H. Hafner, C. Cheung, T. H. Oosterkamp, and C. M. Lieber, *J. Phys. Chem. B* **105**, 743 (2001).
- ⁵J. Li, A. M. Cassell, and H. Dai, *Surf. Interface Anal.* **28**, 8 (1999).
- ⁶S. Iijima, *Nature (London)* **354**, 56 (1991).
- ⁷Y. Cui and C. M. Lieber, *Science* **291**, 851 (2001).
- ⁸S. Motojima, M. Kawaguchi, K. Nozaki, and H. Iwanaga, *Appl. Phys. Lett.* **56**, 321 (1990).
- ⁹X. B. Zhang, X. F. Zhang, D. Bernaerts, G. van Tendeloo, S. Amelinckx, J. van Landuyt, V. Ivanov, J. B. Nagy, P. Lambin, and A. A. Lucas, *Europhys. Lett.* **27**, 141 (1994).
- ¹⁰X. Y. Kong and Z. L. Wang, *Nano Lett.* **3**, 1625 (2003).
- ¹¹P. X. Gao, Y. Ding, W. Mai, W. L. Hughes, C. Lao, and Z. L. Wang, *Science* **309**, 1700 (2005).
- ¹²D. J. Bell, Y. Sun, L. Zhang, L. X. Dong, B. J. Nelson, and D. Grützmacher, "Three-dimensional nanosprings for electromechanical sensors," *Sens. Actuators A: Physical* **130–131**, 54 (2006).
- ¹³D. J. Bell, L. Dong, B. J. Nelson, M. Golling, L. Zhang, and D. Grützmacher, *Nano Lett.* **6**, 725 (2006b).
- ¹⁴V. Vogel and M. Sheetz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 265 (2006).
- ¹⁵B. Kratochvil, L. Dong, L. Zhang, and B. Nelson, *J. Microsc.* **237**, 122 (2010).
- ¹⁶G. Hwang and H. Hashimoto, *Nano Lett.* **9**, 554 (2009).
- ¹⁷D. J. Müller, W. Baumeister, and A. Engel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13170 (1999).
- ¹⁸S. Park, M. B. Goodman, and B. L. Pruitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 17376 (2007).
- ¹⁹F. Beyeler, S. Muntwyler, and B. J. Nelson, *J. Microelectromech. Syst.* **18**, 433 (2009).
- ²⁰Y. U. Sun and B. J. Nelson, *J. Inf. Acquis.* **1**, 23 (2004).
- ²¹K. Karrai and R. Grober, *Appl. Phys. Lett.* **66**, 1842 (1995).
- ²²F. J. Giessibl, *Appl. Phys. Lett.* **76**, 1470 (2000).
- ²³A. Castellanos-Gomez, N. Agrait, and G. Rubio-Bollinger, *Nanotechnology* **20**, 215502 (2009).
- ²⁴M. Todorovic and S. Schultz, "Magnetic force microscopy using nonoptical piezoelectric quartz tuning fork detection design with applications to magnetic recording studies" *J. Appl. Phys.* **83**, 6229 (1998).
- ²⁵A. J. Katan, M. H. van Es, and T. H. Oosterkamp, *Nanotechnology* **20**, 165703 (2009).
- ²⁶S. Hu and A. Raman, *Nanotechnology* **19**, 375704 (2008).
- ²⁷F. J. Giessibl, *Phys. Rev. B* **56**, 16010 (1997).
- ²⁸J. E. Sader and S. P. Jarvis, *Appl. Phys. Lett.* **84**, 1801 (2004).
- ²⁹T. R. Albrecht, P. Grutter, D. Horne, and D. Rugar, *J. Appl. Phys.* **69**, 668 (1991).
- ³⁰J. E. Sader, T. Uchihashi, M. J. Higgins, A. Farrell, Y. Nakayama, and S. P. Jarvis, *Nanotechnology* **16**, S94 (2005).
- ³¹"Kinovea - motion tuner," <http://www.kinovea.org>.

FluidFM: Combining Atomic Force Microscopy and Nanofluidics in a Universal Liquid Delivery System for Single Cell Applications and Beyond

André Meister,^{†,§} Michael Gabi,^{‡,§} Pascal Behr,[‡] Philipp Studer,^{‡,||} János Vörös,[‡] Philippe Niedermann,[†] Joanna Bitterli,[†] Jérôme Polesel-Maris,^{†,⊥} Martha Liley,[†] Harry Heinzlmann,[†] and Tomaso Zambelli^{*‡}

Swiss Center for Electronics and Microtechnology, CSEM SA, rue Jaquet Droz 1, 2002 Neuchâtel, Switzerland, and Laboratory of Biosensors and Bioelectronics, Institute for Biomedical Engineering, ETH Zurich, Gloriastrasse 35, 8092 Zurich, Switzerland

Received April 30, 2009

ABSTRACT

We describe the fluidFM, an atomic force microscope (AFM) based on hollow cantilevers for local liquid dispensing and stimulation of single living cells under physiological conditions. A nanofluidic channel in the cantilever allows soluble molecules to be dispensed through a submicrometer aperture in the AFM tip. The sensitive AFM force feedback allows controlled approach of the tip to a sample for extremely local modification of surfaces in liquid environments. It also allows reliable discrimination between gentle contact with a cell membrane or its perforation. Using these two procedures, dyes have been introduced into individual living cells and even selected subcellular structures of these cells. The universality and versatility of the fluidFM will stimulate original experiments at the submicrometer scale not only in biology but also in physics, chemistry, and material science.

In the last two decades, atomic force microscope (AFM)¹ has revolutionized surface science at the nanoscale, not only as a microscope with atomic resolution^{2,3} but also as a nanofabrication tool displacing atoms,⁴ manipulating and reshaping complex molecules,⁵ and delivering molecules extremely locally on a surface.⁶ AFM is also starting to contribute to cell biology, elucidating features of membrane morphology,⁷ mechanical properties,⁸ division mechanism,⁹ metabolism,¹⁰ voltage-induced deformation¹¹ or adhesion,^{12,13} and potentially as a cancer detection tool.¹⁴ However, in these and similar experiments, the use of the AFM to manipulate cells remains largely limited to (sometimes crude) mechanical processes such as indentation, compression, stretching, and scraping. One notable exception to this list is the transport of molecules into a cell via reversible binding to an AFM tip.^{15–17}

Here we present a novel use of AFM principles to manipulate living biological cells by stimulation through delivery of active agents directly from a solution; the fluidFM (for fluidic force microscope) combines the accurate force-controlled positioning of AFM with the versatility of fluidics.¹⁸ A microsized channel is integrated in an AFM cantilever and connected via channels in the AFM chip holder to a delivery system, thus creating a continuous and closed fluidic channel that can be filled with an arbitrary chosen solution and can be immersed in a liquid environment (Figure 1a). An aperture in the AFM tip at the end of the cantilever allows liquids to be dispensed locally. Force feedback is ensured by a standard AFM laser detection system that measures the deflection of the cantilever and thus the force applied by the tip to the sample during approach and dispensing.

While this approach is similar to microinjection using glass pipettes, there are a number of essential differences. Microinjection uses optical microscopy to control the position of the glass pipet tip both in the *xy* plane and in the *z* direction (via image focusing). As consequence of the limited resolution of optical microscopy, subcellular domains cannot be addressed and tip contact with the cell

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: zambelli@biomed.ee.ethz.ch.

[†] Swiss Center for Electronics and Microtechnology, CSEM SA.

[‡] Institute for Biomedical Engineering, ETH Zurich.

[§] These authors contributed equally to the work.

^{||} Present address: London Centre for Nanotechnology, 17-19 Gordon Street, London WC1H 0AH, United Kingdom.

[⊥] Present address: CEA Saclay, DSM/IRAMIS/SPCSI, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

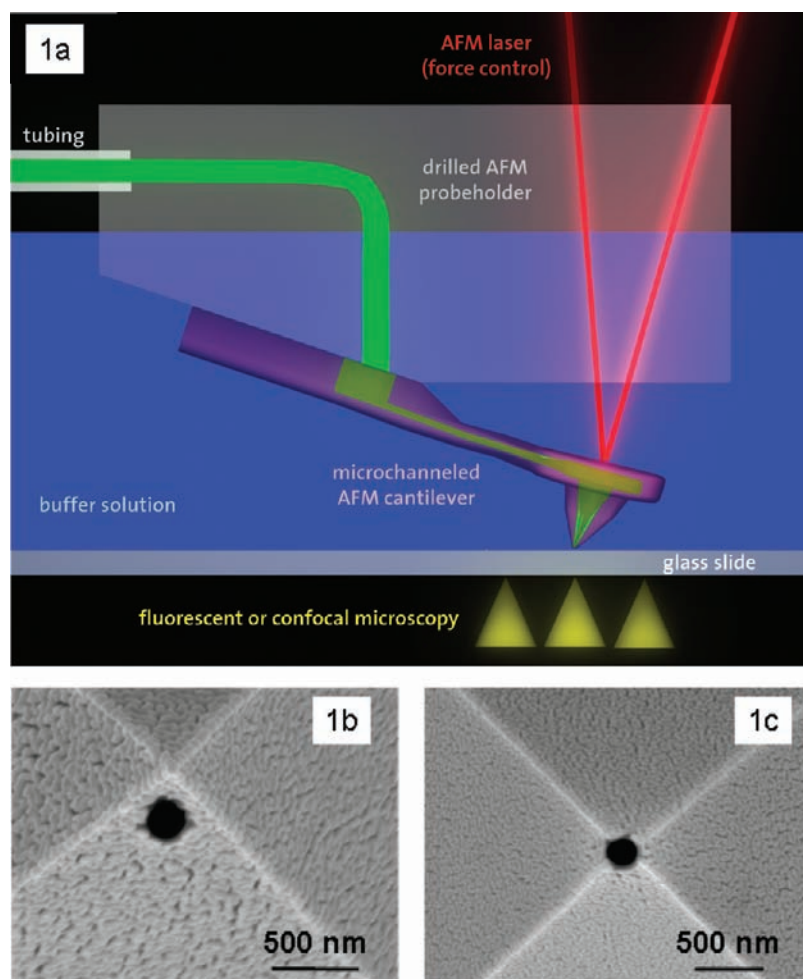


Figure 1. The fluidFM. (a) Diagram showing a microchanneled cantilever chip fixed to a drilled AFM probeholder. The system was shown to be watertight up to 4 bar internal overpressure but overpressures of the order of 10 mbars were usually applied. The fluidFM can be operated in air or with the whole system (probeholder and chip) immersed in a liquid. The external liquid or bath and the liquid in the microchannel may be the same or may be different. During liquid dispensing, the substrate can be simultaneously observed with an optical microscope either through the transparent probe holder or through the glass substrate. (b) Scanning electron micrograph of the aperture beside the apex of the pyramidal AFM tip for the intracellular injection experiments as in Figure 3. The tip is made of silicon nitride (Si_3N_4) with a wall thickness of 100 nm. The apertures are milled by focused ion beam with a diameter ranging from 1 μm down to 100 nm. Thin Si_3N_4 walls are compulsory for milling such nanosized holes. Before the FIB milling, a metallic layer (gold or platinum) is deposited on both sides of the cantilever to avoid charging effects during milling and increase the reflectivity for the AFM laser. (c) Scanning electron micrograph of the aperture at the apex of the pyramidal AFM tip for the cell staining experiments by gentle contact as in Figure 4.

membrane cannot be discriminated from tip penetration of the membrane. Cells are often lethally damaged and skilled personal are required for microinjection.^{19–23} The limited resolution of this method and the absence of mechanical information contrast strongly with the high resolution imaging and the direct control of applied forces that are possible with AFM. Precise force feedback reduces potential damage to the cell; the cantilever geometry minimizes both the normal contact forces on the cell and the lateral vibrations of the tip that can tear the cell membrane during microinjection; the spatial resolution is determined by the submicrometer aperture so that injection into subcellular domains becomes easily achievable.

The inclusion of force control in the dispensing/injection system also enables extremely local dispensing on surfaces. With force feedback, the dispensing tip can be brought into very close contact with a sample without risk of damage

either to the sample or to the tip so that a minimal amount of solution can be released directly at the chosen spot. Local dispensing will allow precise stimulation of cells, applying biomolecules to a well-defined position on one cell that may either be isolated or part of an ensemble or network of cells. It will also open new possibilities in biochemical analysis, for example, allowing analyte solutions to be dispensed locally on an array of antibodies.

Microchanneled AFM cantilevers were produced using an original microfabrication process based on thermal fusion bonding of two previously etched silicon wafers to create cavities lined with silicon dioxide within the body of the silicon. This was followed by a selective silicon etch to produce free-standing silicon dioxide structures.^{24,25} The result is a hollow glass cantilever attached to a silicon chip (see Supporting Information Figures S1 and S2). The closed microchannel within the cantilever enters the silicon chip and ends in an

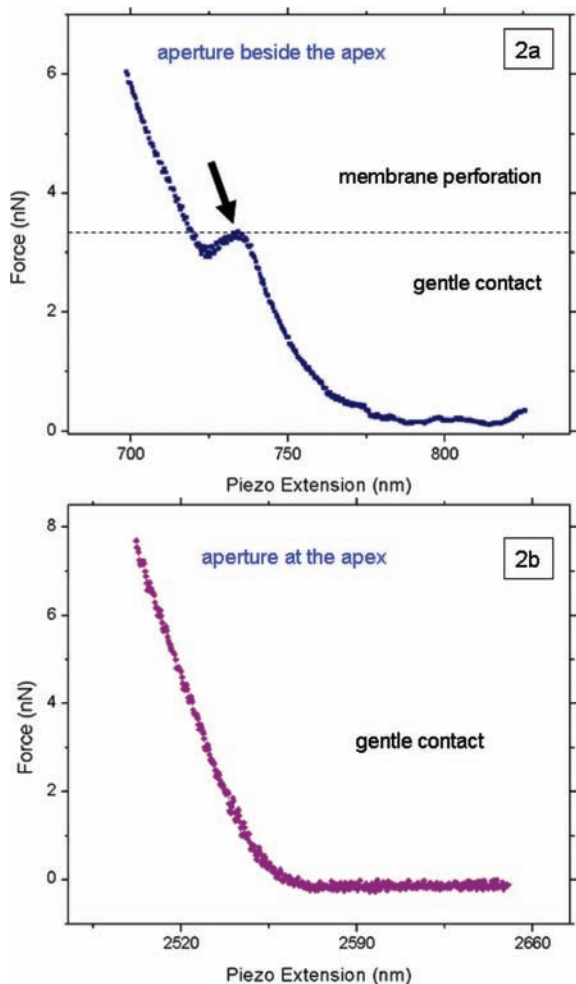


Figure 2. Contact regimes with the cell membrane. (a) Typical force distance curve on a myoblast cell for a cantilever with an aperture milled beside the pyramid apex like in Figure 1b ($k = 0.3$ N/m, approach of 50 nm/s); the arrow indicates the typical discontinuity corresponding to indentation of the cell membrane. The set point of around 3 nN thus separates the two contact regimes, the gentle contact on the cell membrane and the membrane perforation for intracellular injection. (b) Typical force distance curve on a myoblast cells for a cantilever with an aperture of 1 μm milled at pyramid apex like in Figure 1c ($k = 0.3$ N/m, approach of 50 nm/s); no indentation discontinuity appears with this aperture configuration.

open reservoir. An aperture at the apex of the cantilever tip is opened using focused ion beam milling (FIB). Profiting from the flexibility of FIB, the relative positions of the hole and the tip apex can be chosen to facilitate the experiments to be carried out either at the side of the apex for injection into a cell after perforation of its membrane (Figure 1b) or at the apex for dispensing onto a surface or gentle contact with the cell membrane (Figure 1c). Similar microchanneled silicon nitride probes with an aperture located at the base of the tip have been fabricated for Dip-Pen applications that are limited to operation in controlled air atmosphere because such micromachined fountain pens were not combined with a drilled probholder.^{24,26,27} Also tapered glass pipettes have not been used for single-cell manipulation yet possibly because of the limited control on the aperture location and the apex sharpness.^{28–30}

The force detection system of the fluidFM is so sensitive that the interactions between tip and sample can be reduced to the piconewton range enabling two different strategies when addressing fragile samples such as living cells. At small force set points, the hollow cantilever with the aperture beside the apex as in Figure 1b can be brought into gentle but close contact with cells without unwished puncturing of the cell membrane (see Figure 2a). On the other side, membrane perforation for intracellular injection is simply achieved by selecting a higher force set point taking advantage of the extremely sharp tip (radius of curvature on the order of tens of nanometers) as indicated by the typical indentation jump of the force–distance curve of Figure 2a.³¹ If the aperture is milled at the tip apex as in Figure 1c, no indentation jump is observed in the force–distance curves (see Figure 2b) meaning that the tip with this configuration remains in “gentle contact” with the membrane without tearing it.

Intracellular injection (see Figure 3a) was demonstrated by using fluorescein isocyanate sodium salt (FITC) as dye because it neither binds to the cell membrane nor does it spontaneously diffuse across it. Figure 3b is an AFM topography image of a myoblast cell taken in the amplitude-modulation (AM) mode with the fluidic channel filled with a physiological solution containing the FITC dye. The AM mode decreases the force exerted on the cell because the effective stiffness of the probe becomes $k_{\text{eff}} = k/Q$ with Q as the quality factor of the cantilever in liquid environment (see Supporting Information, Figure S2b). The cell is resolved with a spatial accuracy down to 200 nm details confirming the ability of the microchanneled cantilevers to act both as scanning probe and as nanopipette. Upon completion of the AFM imaging, the probe was stopped and positioned with the AFM controller over a selected point of the cell. As we are relying on the force–distance curve of the tip approach to the cell in order to determine the set point necessary to penetrate into the cell membrane, we switched to the contact mode, introduced the extremity of the tip into the cell, injected the fluorescent solution by hydrostatic pressure for few seconds, and finally retracted the tip far away from the selected cell. From simulations of the flow rates through the aperture of such hollow cantilever (see Supporting Information, Figure S3), we can estimate that the injected amount of FITC solution is less than 10 fL. Figure 3c is a fluorescent image taken with a confocal scanning laser microscope (CLSM) of the same cell in Figure 3b. It can be seen that the introduction of liquid into the cell has resulted in the appearance of a fluorescence signal without an important change in the cell volume. To demonstrate that the dye is inside the cell, z-stack images were taken. The corresponding cross section shows a fluorescent intensity not only at the cell membrane but also in the cytosol. The fact that the dye remains in the cell indicates that the membrane recovers and reseals tightly after the withdrawal of the tip. Figure 3d,e shows intracellular injection of FITC into three neurons one after the other with the same microchanneled cantilever proving that probes can be used for consecutive manipulation without clogging.

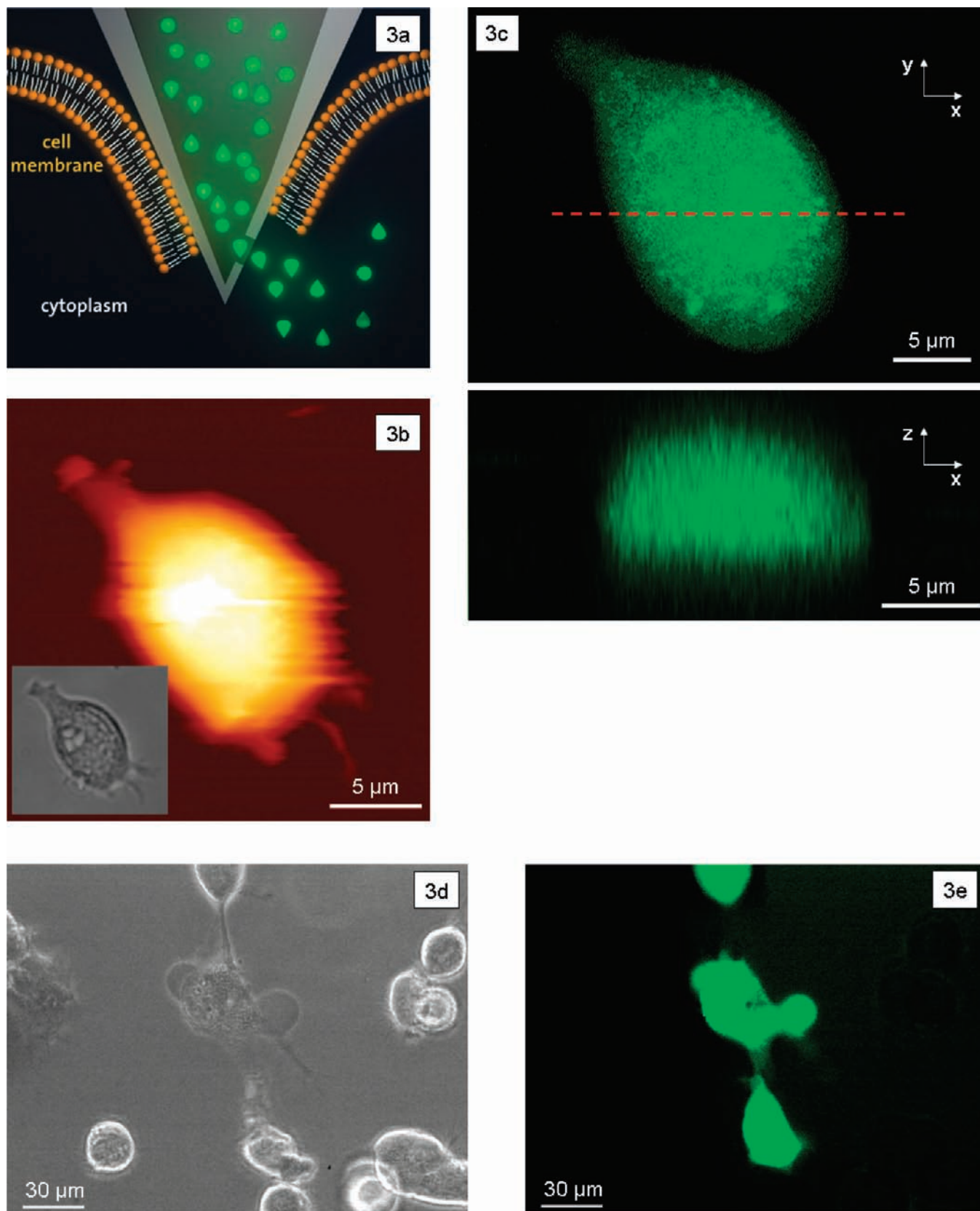


Figure 3. Intracellular injection by force-controlled perforation of the cell membrane. (a) Diagram showing the intracellular injection procedure by membrane perforation (not to scale). The aperture is intentionally milled beside the apex in order to exploit the nanometric curvature radius of the pyramid to facilitate the membrane indentation (set point of 3 nN at least). (b) Differential interference contrast image of a myoblast and corresponding AFM image (amplitude of 30 nm, scan rate of 0.3 s, cantilever as in Figure S2). (c) CLSM stack image of the same cell for $z = 1 \mu\text{m}$ after FITC intracellular injection of 15 s and corresponding cross section along the dashed red line; the fluorescent thickness of $6 \mu\text{m}$ is in accordance with the height of the cell measured by AFM. (d,e) Differential interference contrast image of neuroblastoma and corresponding fluorescent image upon FITC intracellular injection of the three ones in the middle.

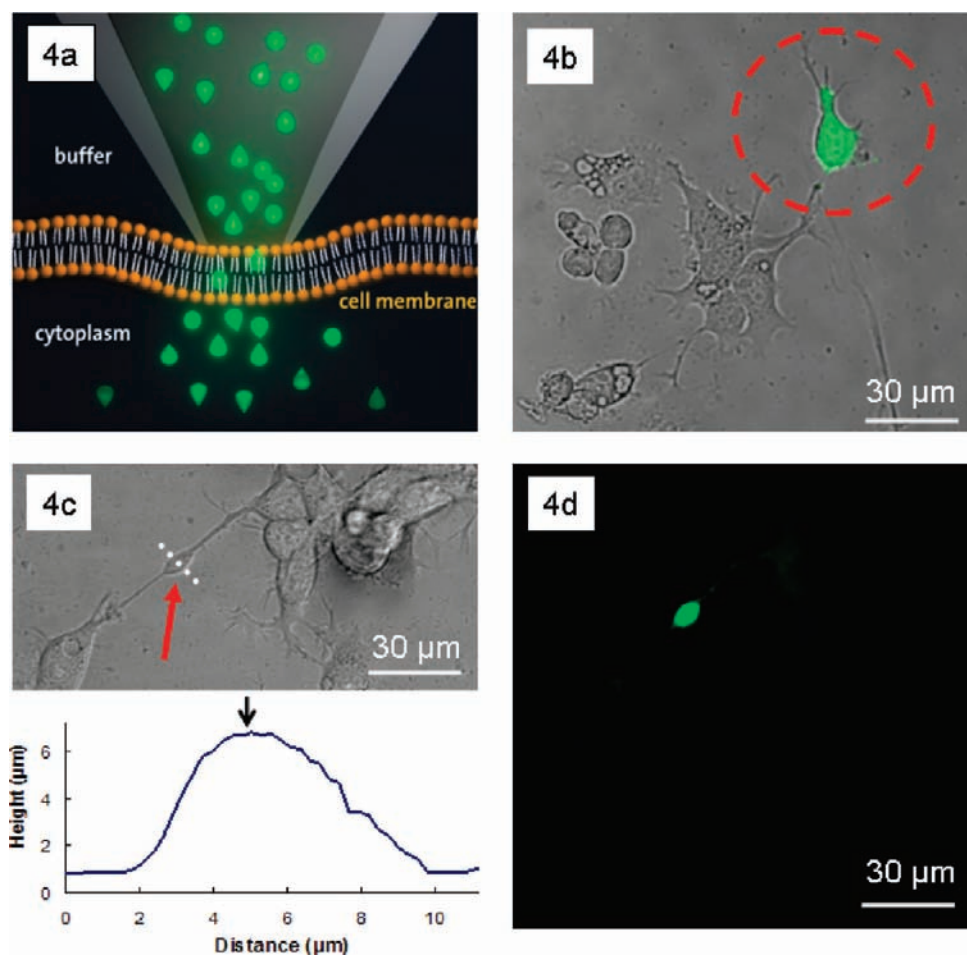


Figure 4. Staining living neuroblastoma cells by gentle contact on the cell membrane. (a) Diagram showing the staining procedure by gentle contact (not to scale). The hollow tip is maintained in contact with the cell membrane thanks to the force feedback (set point of less than 1 nN). The active agents dissolved in the solution of the microchannel spontaneously diffuse across the membrane into the cytoplasm. (b) Superposition of a differential interference contrast image and of the corresponding fluorescent one of a cell after staining with CellTracker green. The microchannelled cantilever filled with CellTracker green is positioned over the cell in the red circle using the optical microscope. The tip is then brought into gentle contact with the cell membrane by the AFM force feedback system and left there for 15 min, before taking the fluorescent and phase contrast image. (c) Optical image in differential interference contrast method of two neuroblastoma cells connected by a neurite forming a varicosity-like structure (red arrow) and corresponding AFM profile along the white dotted line (AM mode, amplitude of 50 nm, scan rate of 0.1 s, cantilever as in Supporting Information, Figure S2a). The black arrow indicates the point on the profile where the tip was precisely approached with the AFM control. (d) Corresponding fluorescence image after staining the varicosity-like structure with acridine orange for 1 min.

The gentle contact procedure is demonstrated by staining live neuroblastoma cells as illustrated in Figure 4a. A microchannelled cantilever filled with CellTracker green, a membrane-permeant dye, was positioned over one cell using an optical microscope.³² It was then touched onto the cell and left in gentle contact until the dye diffused into the cytoplasm. CellTracker green was used because its fluorescence depends on the enzymatic activity of a live cell. CellTracker green is a nonfluorescent chloromethyl derivative that passes through the cell membrane into the cytoplasm where enzymatic activity converts it into a fluorescent membrane-impermeable species.

Figure 4b shows several neuroblastoma cells on a glass slide in a physiological buffer. The fluidFM cantilever filled with CellTracker green was touched onto the cell marked by the red circle and left for 15 min, which is the time necessary for the cell to metabolize the agent diffusing through the membrane and express the fluorescent product.

The cell addressed with the tip became fluorescent whereas neighboring cells were not, demonstrating that the dye was indeed introduced into the selected cell, that the cell was not lethally damaged, and that the staining procedure does not affect nearby cells.

The precise delivery of a dye into a cellular substructure can also be achieved thanks to the imaging capacities of the AFM. A region is first scanned with fluidFM and the topographical information is used to access structures too small for optically controlled microinjection systems. Figure 4c is a differential interference contrast image of two neuroblastomas connected by a neurite that forms a varicosity-like structure in the middle. The cantilever was positioned on top of the varicosity using an AFM profile of the sample (Figure 4c, bottom) and a solution containing the membrane-permeant dye, acridine orange, was delivered directly onto the varicosity for 1 min.³² The corresponding fluorescent image (Figure 4d) shows a bright varicosity with decreasing

fluorescence intensity along the neurite. This demonstrates ease with which solutes can be delivered in a controlled manner into selected subcellular structures with the fluidFM.

Introduction of material into a cell in an AFM-based procedure has been achieved by other authors.^{15–17} In their approaches, the AFM nanoneedle was coated or functionalized with selected molecules and then pushed through the cell membrane into the cytoplasm where the molecules were released. However, this approach is limited to vanishingly small quantities of those molecules that can be reversibly bound to an AFM tip and then spontaneously desorb from the tip to the intracellular environment. On the contrary, the fluidic channel of the fluidFM represents an infinite reservoir for the active agent moreover in a form that is immediately available for repeated delivery as it is not bound to the tip.

Since the biomolecules to be introduced into the cell no longer have to be grafted or adsorbed to the AFM tip but are simply dissolved in a delivery solution, a much wider range of applications of intracellular injection becomes available than with the methods of Chen, Cuerrier, or Han. This range now spans from the insertion of particles to study how they move inside the cell according to their chemical functionalization, to the insertion of proteins, genes (eventually into the nucleus), enzymes, ligands for fundamental research of cell biology but also for applications like tissue engineering from single ad hoc infected cells. In addition, the gentle contact approach opens the door for studies such as the behavior of viruses at the cell membrane or the interaction of drugs with transmembrane proteins.

In conclusion, we have shown novel applications using hollow force-controlled AFM cantilevers. The microchanneled cantilevers were successfully connected to a delivery system via a modified AFM probeholder thus enabling force-controlled dispensing of a solution containing selected molecules into individual cells in a physiological environment. The cantilever geometry and the AFM force feedback allow very local as well as facile delivery of molecular species to cells either by gentle contact with their membrane or by perforation of the latter.

The experiments described here demonstrate the potential of the fluidFM in the field of single-cell biology through precise stimulation of selected cell domains with whatever soluble agents at a well-defined time. We confidently expect that the inclusion of an electrode in the microfluidics circuit will allow a similar approach toward patch-clamping with force controlled gigaseal formation. Other strategies at the single-cell level, such as the controlled perforation of the cell membrane for local extraction of cytoplasm will also be explored.

Finally, the universality and versatility of the fluidFM opens the way for original experiments in the following wide spectrum of disciplines: in physics (e.g., droplet interactions), materials sciences (e.g., submicrometer etching), chemistry (e.g., local functionalization of polymer layers), and molecular electronics (e.g., deposition of conductive polymers onto nanoelectrodes).

Acknowledgment. The development of the fluidFM was supported by the Swiss innovation promotion agency CTI-KTI through a “feasibility project” (Contract No. 9191.1 PFNM-NM). The partial support of the Swiss Federal Office for Education and Science (OFES) in the framework of the EC funded project NaPa (Contract No. NMP4-CT-2003-500120) for the development and microfabrication of the hollow cantilevers is gratefully acknowledged. We are indebted to Paul Lüthi and Stephen Wheeler (ETH LBB workshop) for their technical help and to Daniel Schaffhauser (ETH LBB) for the simulations of the flow rates.

Supporting Information Available: Description of Materials and Methods. Figure S1: Micrographs of the microchanneled cantilevers. Figure S2: Resonance peaks of a microchanneled cantilever in different environments. Figure S3: Water flow rates through the microchanneled cantilevers for different values of the aperture diameter at the tip apex. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930–933.
- (2) Giessibl, F. J. *Science* **1995**, *267*, 68–71.
- (3) Barth, C.; Reichling, M. *Nature* **2001**, *414*, 54–57.
- (4) Sugimoto, Y.; Abe, M.; Hirayama, S.; Oyabu, N.; Custance, O.; Morita, S. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 156–159.
- (5) Thalhammer, S.; Stark, R. W.; Müller, S.; Wienberg, J.; Heckl, W. M. *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*, 232–237.
- (6) Piner, R. D.; Zhu, J.; Xu, F.; Hong, S. H.; Mirkin, C. A. *Science* **1999**, *283*, 661–663.
- (7) Henderson, E.; Haydon, P. G.; Sakaguchi, D. S. *Science* **1992**, *257*, 1944–1946.
- (8) Simon, A.; Cohen-Bouhacina, T.; Aime, J. P.; Porte, M. C.; Amedee, J.; Baquey, C. *Cell. Mol. Biol.* **2004**, *50*, 255–266.
- (9) Matzke, R.; Jacobson, K.; Radmacher, M. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 607–610.
- (10) Pelling, A. E.; Sehati, S.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S.; Gimzewski, J. K. *Science* **2004**, *305*, 1147–1150.
- (11) Zhang, P. C.; Keleshian, A. M.; Sachs, F. *Nature* **2001**, *413*, 428–432.
- (12) Benoit, M.; Gabriel, D.; Gerisch, G.; Gaub, H. E. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 313–317.
- (13) Helenius, J.; Heisenberg, C. P.; Gaub, H. E.; Müller, D. J. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 1785–1791.
- (14) Cross, S. E.; Jin, Y. S.; Rao, J.; Gimzewski, J. K. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 780–783.
- (15) Chen, X.; Kis, A.; Zettl, A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 8218–8222.
- (16) Cuerrier, C. M.; Lebel, R.; Grandbois, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *355*, 632–636.
- (17) Han, S.-W. *Nanomedicine* **2008**, *4*, 215–225.
- (18) Whitesides, G. M. *Nature* **2006**, *442*, 368–373.
- (19) Davis, B. R.; Yannariello-Brown, J.; Prokopishyn, N. L.; Luo, Z. J.; Smith, M. R.; Wang, J.; Carsrud, N. D. V.; Brown, D. B. *Blood* **2000**, *95*, 437–444.
- (20) Stephens, D. J.; Pepperkok, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 4295–4298.
- (21) Laforge, F. O.; Carpino, J.; Rotenberg, S. A.; Mirkin, M. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 11895–11900.
- (22) Lu, Z.; Chen, P. C. Y.; Nam, J.; Ge, R. W.; Lin, W. *J. Micromech. Microeng.* **2007**, *17*, 314–321.
- (23) Schlau, M. G.; Falls, E. M.; Ziober, B. L.; Bau, H. H. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 015101.
- (24) Hug, T. S.; Biss, T.; de Rooij, N. F.; Stauffer, Q. *Dig. Tech. Pap. Transducers '05*, **2005**, *2*, 1191–1194.
- (25) Meister, A.; Przybylska, J.; Niedermann, P.; Santschi, C.; Heinzelmann, H. *NSTI-Nanotech 2008* **2008**, *3*, 273–276.

- (26) Deladi, S.; Tas, N. R.; Berenschot, J. W.; Krijnen, G. J. M.; de Boer, M. J.; de Boer, J. H.; Peter, M.; Elwenspoek, M. C. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 5361–5363.
- (27) Deladi, S.; Berenschot, J. W.; Tas, N. R.; Krijnen, G. J. M.; de Boer, J. H.; de Boer, M. J.; Elwenspoek, M. C. *J. Micromech. Microeng.* **2005**, *15*, 528–534.
- (28) Lewis, A.; Kheifetz, Y.; Shambrodt, E.; Radko, A.; Khachatryan, E.; Sukenik, C. *Appl. Phys. Lett.* **1999**, *75*, 2689–2691.
- (29) Hong, M. H.; Kim, K. H.; Bae, J.; Jhe, W. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 2604–2606.
- (30) Taha, H.; Marks, R. S.; Gheber, L. A.; Rousso, I.; Newman, J.; Sukenik, C.; Lewis, A. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 1041–1043.
- (31) Hategan, A.; Law, R.; Kahn, S.; Discher, D. E. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2746–2759.
- (32) The membrane-permeable CellTracker and acridin orange were used in combination with ethidium bromide to differentiate between living and apoptotic cells.

NL901384X

Supplementary Information

FluidFM: combining atomic force microscopy and nanofluidics in a universal liquid delivery system for single cell applications and beyond

André Meister^{1*}, Michael Gabi^{2*}, Pascal Behr², Philipp Studer^{2†}, János Vörös², Philippe
Niedermann¹, Joanna Bitterli¹, Jérôme Polesel-Maris^{1‡}, Martha Liley¹, Harry
Heinzelmann¹, Tomaso Zambelli^{2§}

¹ Swiss Center for Electronics and Microtechnology, CSEM SA, rue Jaquet Droz 1, 2002
Neuchâtel, Switzerland

² Laboratory of Biosensors and Bioelectronics, Institute for Biomedical Engineering, ETH
Zurich, Gloriastrasse 35, 8092 Zurich, Switzerland

* These authors contributed equally to the work.

† Present address: London Centre for Nanotechnology, 17-19 Gordon Street, London
WC1H 0AH, United Kingdom

‡ Present address: CEA Saclay, DSM/IRAMIS/SPCSI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

§ Corresponding author. e-mail: zambelli@biomed.ee.ethz.ch

Microfabrication

A possible procedure to fabricate hollow AFM probes by means of micromachining techniques was reported by Deladi et al. [S1, S2]. The proposed process is based on a sacrificial etching of polycrystalline silicon encapsulated in two silicon nitride layers. The microchanneled probes used in the present paper are fabricated without using sacrificial layers. The microfabrication relies on the thermal fusion bonding of two pre-processed silicon (Si) wafers. The feasibility for this process was demonstrated by Hug et al. [S3]. The basic principle is to structure in a first wafer with holes going through the entire wafer thickness. A second wafer is structured to have small trenches. After aligning both wafers in such a way that the holes coincide with the trenches, they are thermal fusion bonded. During this process, all Si exposed surfaces get thermally oxidized, also the trenches. Using selective etching, the oxidized trenches are released from the Si matrix, to form free standing and hollow silicon dioxide structures. The detailed process is described in reference [S4].

Modification of the AFM probe holder

We drilled a channel with a diameter of 0.5 mm into the original JPK probe holder (Berlin, Germany) made of polycarbonate to connect the microchanneled cantilever chip with the liquid reservoir.

Preparation of the microchanneled cantilevers

The chips were cleaned with O₂ plasma treatment to make the channel surface hydrophilic. After manipulation, they were stored in bi-distilled water also for several days. Just before a new experiment, they were rinsed with an SDS 2% solution and underwent the O₂ plasma treatment.

Substrates

PMMA rings were glued with PDMS onto glass coverslides to form a dish on an optically transparent substrate. The so formed dishes were cleaned with propanol, ethanol, rinsed with water and blown dried with N₂. The substrates underwent an O₂ plasma treatment and then 0.1mg/ml poly(L-lysine) (Sigma-Aldrich, Switzerland) in 10mM HEPES buffer (pH 7.4) was deposited onto the substrate to improve cell adhesion.

Cell culture

NG108 neuroblastoma cells or C2C12 myoblasts were cultured at standard conditions in DMEM, 10% bovine serum, 50 U Penicillin and 50 μ g/ml Streptomycin. They were plated on a poly(L-Lysine) coated substrate prepared as described just above and used for the single cell experiments after 1-2 days in vitro.

Intracellular injection

The fluidFM was filled with 25 μ g/ml fluorescein isocyanate sodium salt (FITC) dissolved in phosphate buffered saline (pH 7.4) to visualize the dye injection into viable NG108 neuroblastoma or C2C12 myoblast cells.

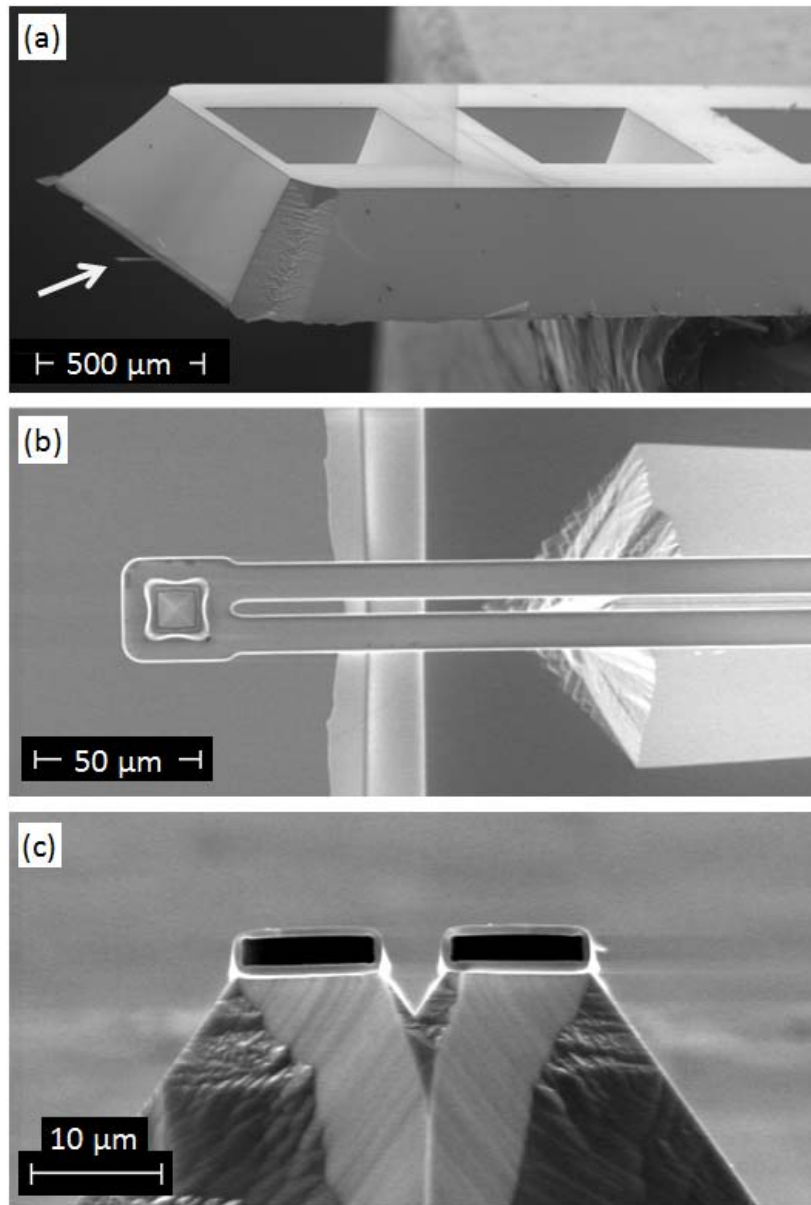


Figure S1. (a) Probe chip with the reservoirs and the hollow cantilever (arrow). The tip located at the end of the cantilever points towards the bottom of the image. (b) Cantilevers were fabricated with only one channel or two channels (U-shaped), every channel being connected to its respective reservoir. The micrograph depicts a 150 μm long U-shaped cantilever. The stiffness of such cantilevers is of the order of 10 N/m, but can be reduced down to 0.1 N/m by modifying their geometry. (c) Cross-section of the two legs of a U-shaped cantilever, with typical microchannel dimensions of 2 μm in height and 10 μm in width. The cantilever walls are made of silicon dioxide with a thickness of about 800nm.

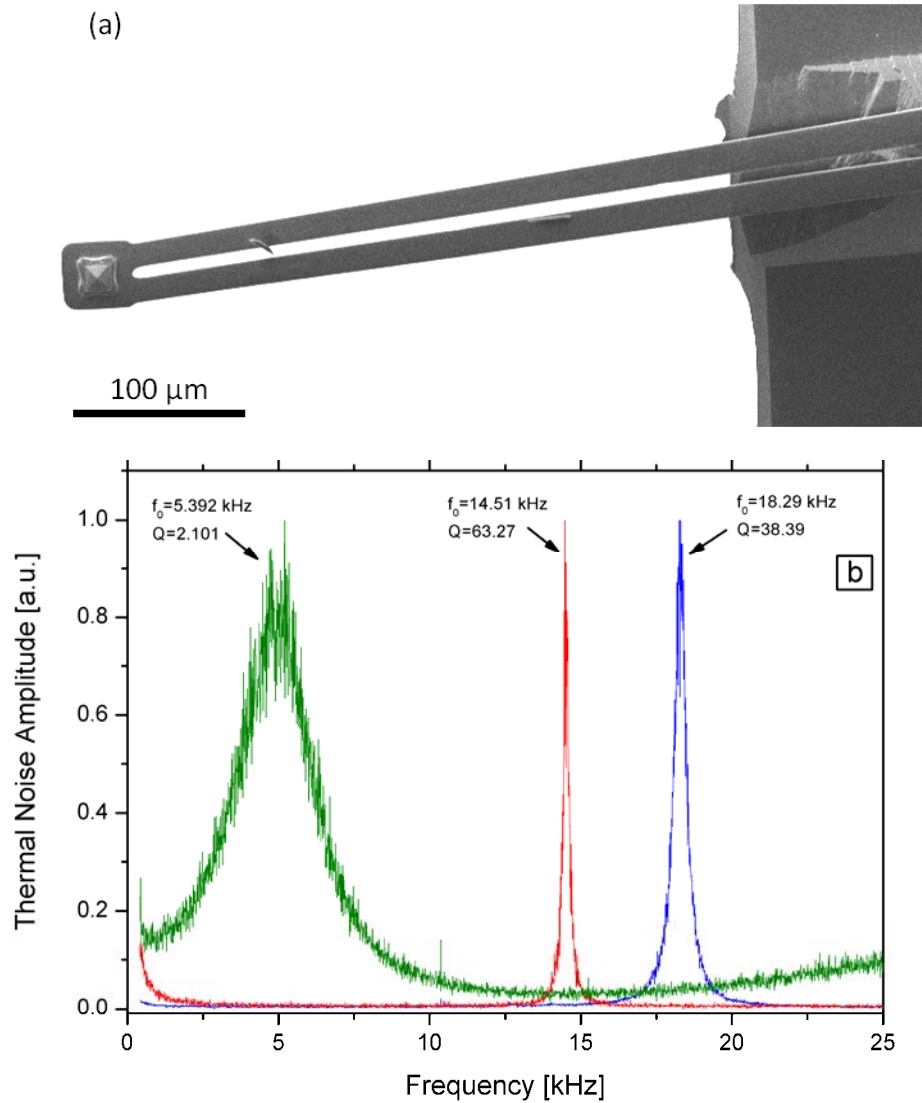


Figure S2. (a) SEM micrograph of a 500 μm long cantilever. A typical value of $k = 0.26 \text{ Nm}^{-1}$ was obtained by means of the thermal noise method available with the JPK controller. (b) Thermal noise spectrum of such cantilever in three different conditions: in air with empty microchannel (blu), in air with the microchannel filled with physiological buffer (red) and in physiological buffer with filled microchannel (green). The given values of the resonance frequency f_0 and of the quality factor Q were estimated with a Gaussian fitting.

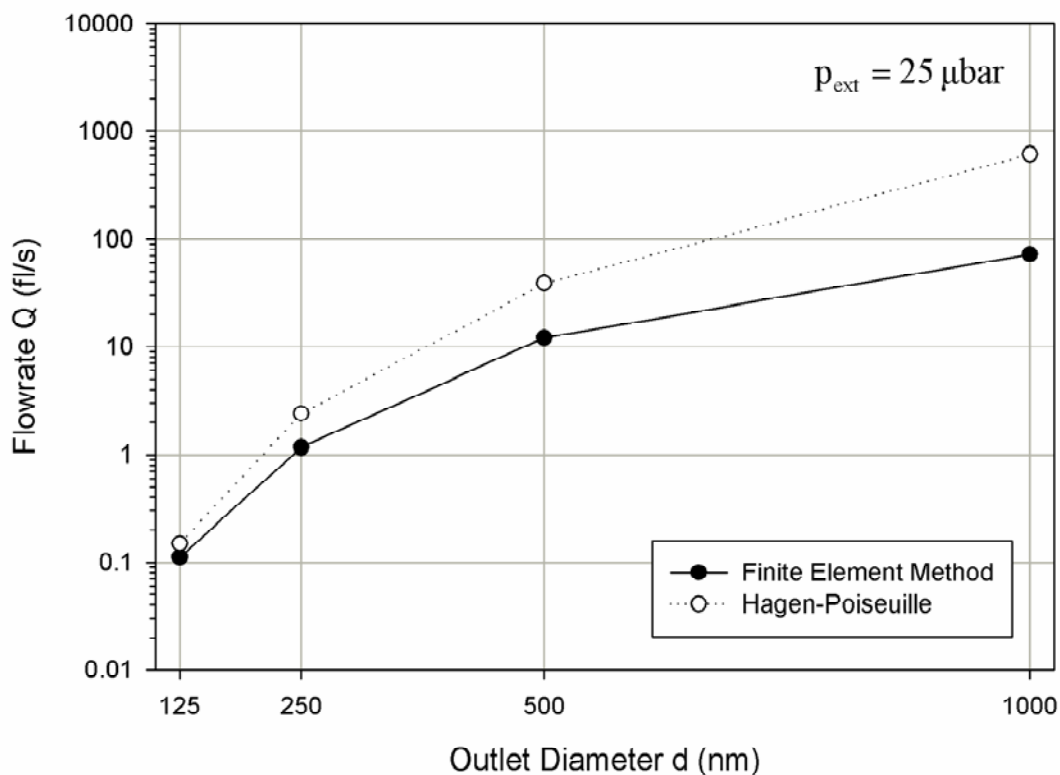


Figure S3. Calculated flow rates in femtoliter per second of an incompressible liquid with the viscosity of water at the tip aperture for different values of the diameter and an applied pressure of 25 μbar . White circles: flow rates derived according to the Hagen-Poiseuille equation of classical hydrodynamics. Black circles: flow rates determined with the finite element method by means of the COMSOL software for a cantilever with the same three dimensional geometry of that of Figure S3a. The flowrate was found to be proportional to the applied pressure. The value of 25 μbar corresponds to a hydrostatic pressure of 0.25 mm and to the minimum sensitivity of commercial pressure controllers.

References

- [S1] S. Deladi, N. R. Tas, J. W. Berenschot, G. J. M. Krijnen, M. J. de Boer, J. H. de Boer, M. Peter, and M. C. Elwenspoek, Micromachined fountain pen for atomic force microscope-based nanopatterning, *Appl. Phys. Lett.* 85, 5361 (2004).
- [S2] S Deladi, J W Berenschot, N R Tas, G J M Krijnen, J H de Boer, M J de Boer and M C Elwenspoek, Fabrication of micromachined fountain pen with in situ characterization possibility of nanoscale surface modification, *J. Micromech. Microeng.* 15, 528–534 (2005).
- [S3] Hug, T.S., Biss, T., de Rooij, N.F. & Staufer, Q. Generic fabrication technology for transparent and suspended microfluidic and nanofluidic channels. *Transducers '05, Digest of Technical Papers, Vols 1 and 2*, 1191-1194 2162 (2005).
- [S4] Meister, A., Przybylska, J., Niedermann, P., Santschi, C. & Heinzlmann, H., Hollow Atomic Force Microscopy Probes for Nanoscale Dispensing of Liquids, *NSTI-Nanotech 2008 Vol. 3*, ISBN 978-1-4200-8505-1, 273