

Sommaire

INTRODUCTION	7
CHAPITRE I : Introduction à la sécurité biologique et présentation des bioMEMS comme solution à la problématique	10
I.1.Introduction à la menace bactériologique	10
I.1.1. Historique	10
I.1.2. Agents pathogènes concernés	11
I.1.3. Stratégies publiques.....	12
I.1.4. Dispositifs actuellement déployés.....	15
I.2. Les BioMEMS : Solution idoine à la problématique de bio-défense	17
I.2.1. Introduction aux biocapteurs.	17
I.2.1.1. Définition.	17
I.2.1.2. Les biorécepteurs.	20
I.2.1.3. Les techniques d'immobilisation	24
I.2.1.4. Méthodes de transduction	29
I.2.2. Les bioMEMS : solution idoine à la problématique de bio-défense	40
I.2.2.1. Définition, avantages et inconvénients.....	40
I.2.2.2. BioMEMS statiques.....	43
I.2.2.3. BioMEMS résonants.....	46
Références	52
CHAPITRE II : Design et fabrication de micromembranes à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive	61
II.1. Dimensionnement des micromembranes.....	61
II.1.1. Contexte et pré-acquis.	61
II.1.2. Etude du comportement dynamique des micromembranes : Détermination de la sensibilité massique	62
II.1.3. Optimisation du mode de fonctionnement.	68
II.1.3.1. Analyse modale par éléments finis	69
II.1.3.2. Avantages d'une opération des membranes sur des modes supérieurs au fondamental.....	70
II.1.4. Remarques sur la théorie de l'actionnement	72
II.1.5. Optimisation de la détection piézorésistive.....	73
II.1.5.1. Eléments de théorie, optimisation du dimensionnement des piézorésistances	73
II.1.5.2. Choix des modes de résonance	75
II.1.6. Vibrations dans un fluide, modélisation théorique associée.	77
II.2. Fabrication, et conditionnement des micromembranes résonantes.	80
II.2.1. Présentation du contexte général	80
II.2.2. Module de détection piézorésistive	80
II.2.3. Module d'actionnement piézoélectrique.....	84
II.2.3. Fin du processus de fabrication face avant	86
II.2.4. Libération des membranes	88
II.3. Intégration des microsystèmes.....	94
II.3.1.Packaging des microsystèmes	94
II.3.2. Electronique de détection.....	95
II.3.2.1.Objectifs	95

II.3.2.2. Principe et fabrication	96
II.3.3. Cellule fluïdique associée	101
II.4. Conclusion	102
Références	105

CHAPITRE III : Caractérisation dynamique des micromembranes résonantes dans l'air et dans le liquide..... 107

III.1. Comportement dynamique des membranes dans l'air	107
III.1.1. Caractérisation des modes de résonance des membranes dans l'air	107
III.1.2. Détection piézorésistive et spectre de résonance dans l'air	110
III. 1.3. Suivi multiplexé des fréquences de résonance dans l'air	115
III. 2. Détection piézorésistive et suivi de la résonance du mode (0,1) dans le fluide	117
III.2.1 Effet de la présence de fluide sur la résonance	117
III.2.2. Amélioration du facteur de qualité grâce à la boucle de rétroaction.....	120
III.2.3. Suivi multiplexé, de la fréquence de résonances des membranes oscillant dans le fluide en temps réel.....	123
III.2.4. Retour sur le modèle théorique : validation du modèle Lamb étendu au mode (0,1)	126
III.3. Conclusion.....	128
Références	130

CHAPITRE IV : Détection d'agents pathogènes simulant la menace biologique par une matrice de micromembranes..... 131

IV.1. Objectifs	131
IV.2. Optimisation d'un protocole biochimique de détection d'agents pathogènes simulant la menace.....	133
IV.2.1. Greffage d'anticorps sur de surfaces de dioxyde de silicium.....	133
IV.2.2. Greffage d'anticorps sur des surfaces d'or	140
IV.2.3. Détection spécifique d'agents pathogènes grâce à la microbalance à quartz	141
IV.3. Détection spécifique d'agents pathogènes simulant la menace par une matrice de micromembranes à détection piézorésistive.....	153
IV.3.1. Contexte, objectifs et sélection des puces	154
IV.3.2. Fonctionnalisation des micromembranes et protocole de biodétection d'agents simulant menace.....	154
IV.3.3. Résultats et discussion	156
IV.3.4. Conclusion	163
Références	165

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 166

Glossaire des abréviations utilisées	170
Annexe A : Détermination de la limite de flambement des micromembranes.....	172
Annexe B : Identification des 15 premiers modes de résonance des micromembranes.....	174
Annexe C : Simulations de la nature des effets parasites de la pastille piézoélectrique sur les piézorésistances de mesure et de référence.....	178
Annexe D : Liste du matériel biologique et des fournisseurs	182
Annexe E : Liste des publications	184

INTRODUCTION

Depuis la dissolution du Pacte de Varsovie en 1991 et la fin de la guerre-froide, les résolutions de conflits par le biais de guerres conventionnelles entre deux acteurs d'égale puissance, tendent à diminuer pour laisser place à des oppositions militaires (découlant de puissantes dominations et exploitations économiques) dans lesquelles les acteurs engagés ne sont pas de même taille ni de même nature et ne poursuivent pas l'accomplissement des mêmes buts. Ce concept dénommé « guerre asymétrique » est amplement détaillé au V^{ème} siècle avant J.C par Sun Tzu dans son œuvre majeure : « l'art de la guerre ». Une guerre asymétrique met en jeu deux acteurs dont l'un a sur l'autre une domination logistique et technologique écrasante. La stratégie du belligérant en infériorité numérique et matérielle consiste à frapper les points faibles de l'adversaire de manière à provoquer le plus d'effets néfastes pour le moindre coût humain et matériel. Dans ce contexte, les velléités d'utilisation de l'arme biologique contre son opposant se révèlent de plus en plus importantes.

L'arme biologique possède en effet deux avantages primordiaux pour être utilisée lors de conflits asymétriques. Premièrement, une grande infection causant de nombreuses pertes peut être générée à partir de quelques souches pathogènes (virus, bactéries, bacilles) qu'il est relativement facile de se procurer, ce qui permet d'user d'un effet de levier considérable. Deuxièmement, l'utilisation comme armes biologiques de maladies à fort de taux de mortalité ou très contagieuses a un impact psychologique important sur les troupes et les populations civiles. Or, lors d'une guerre asymétrique, les populations civiles de l'adversaire le plus fort sont souvent visées par l'adversaire faible dans l'intention de générer des mouvements de désapprobation du conflit. C'est en connaissance de ces facteurs, que les organisations militaires et politiques des pays occidentaux ont décidé de mettre en place d'importantes stratégies publiques et de lourds moyens de financement afin de disposer des moyens les plus adaptés à réduire l'impact d'une attaque à l'arme biologique sur les populations ou les troupes combattantes. Le déclenchement de ces réponses publiques est conditionné à la capacité de détecter de manière précise et rapide, l'occurrence, l'intensité et la nature d'une attaque biologique.

Le problème de la détection et de l'identification de la nature d'une attaque biologique est un problème dans lequel de nombreux points sont à optimiser. La solution de détection doit être capable de reconnaître la nature de l'arme biologique employée de manière extrêmement spécifique, parmi un très grand ensemble d'entités biologiques naturellement présentes dans l'air, afin de ne pas déclencher de fausses alertes qui auraient un effet psychologique sur la population presque aussi important qu'une attaque avérée. La solution de détection doit identifier l'attaque dans un temps assez court afin d'éviter la propagation de l'arme biologique à d'autres lieux. La réalisation de ce dernier point peut être effectuée en multipliant le déploiement de systèmes de détection et en diminuant les temps de réponse des systèmes déployés.

Certaines de ces exigences sont de même nature que celles rencontrées dans les sciences et technologies des biocapteurs, proposant des moyens de détection novateurs pour des applications de diagnostic clinique ou biologique. Au sein de ce domaine, les MicroSystèmes ElectroMécaniques destinés à des applications biologiques (soit dénommés BioMEMS) possèdent les caractéristiques

essentielles à l'élaboration de la solution de détection de l'arme biologique aux performances idéales en termes de coût, d'autonomie, de spécificité et de sensibilité de la reconnaissance biologique, de multiplexage et de temps de réponse. Même si les performances des BioMEMS en termes de fiabilité de leur fonctionnement restent encore largement à améliorer, la recherche dans ce domaine prend chaque année plus d'importance.

En se situant dans un tel contexte, les travaux de cette thèse ont porté sur la conception, la fabrication et la caractérisation de microsystèmes résonants pour la détection d'agents biologiques simulant la menace biologique. Basée sur un principe de microgravimétrie, la diminution de la fréquence de résonance de la structure peut être reliée à un greffage d'entités biologiques possédant une certaine masse à la surface du microsystème. Nous avons réalisé dans cette optique la conception et la fabrication de micromembranes résonantes en silicium. Le principe de microgravimétrie induit la nécessaire mise en vibration des micromembranes ainsi que la capacité de rendre compte par un moyen de détection de ce mouvement vibratoire afin d'en extraire les caractéristiques. Dans l'optique de parvenir à des solutions de détection faiblement encombrantes, robustes et autonomes, la mise en place de ces deux fonctions se fait dans notre cas par une couche piézoélectrique intégrée à la membrane pour l'actionnement et par une jauge piézorésistive pour la détection du mouvement. Le procédé de fabrication des micromembranes étant collectif, les membranes sont regroupées par puces ce qui permet d'envisager la détection de plusieurs espèces biologiques en parallèle. Enfin, la robustesse de la structure mécanique des micromembranes permet d'envisager leur utilisation dans des cadres pratiques extérieurs difficiles. Ainsi, nous réalisons la pertinence du choix d'un système de micromembranes résonantes à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive intégrés pour répondre à l'ensemble des exigences caractérisant un système de biodétection d'agents simulant la menace biologique.

Au cours du premier chapitre de ce manuscrit, nous introduirons des notions concernant le contexte de l'utilisation de l'arme biologique. Nous effectuerons ensuite un bref tour d'horizon des stratégies publiques et des moyens technologiques mis en œuvre pour organiser la réponse à cette menace en mettant en lumière le fort besoin actuel en solutions de détection d'agents de la menace biologiques hautement sensibles, spécifiques, robustes, autonomes, peu encombrantes et hautement multiplexées. Nous procéderons à une rapide étude des grands principes des biocapteurs dans le but d'aider à la recherche de la solution espérée. Un tour d'horizon des BioMEMS consacrés à la détection est alors conduit et leur potentiel dans cette recherche est évalué.

Le deuxième chapitre se consacre en premier lieu aux études théoriques et aux simulations ayant soutenu les réflexions autour du dimensionnement des micromembranes tant du point de vue de la caractéristique dynamique que de l'actionnement et de la détection. Ensuite, la fabrication des micromembranes est analysée ainsi que le conditionnement du BioMEMS au sein d'un prototype de plate-forme de détection d'agents biologiques simulant la menace. Cette plateforme est constituée d'une interface informatique de visualisation et de contrôle, d'une cellule fluide accueillant le milieu réactionnel abritant les micromembranes et d'une électronique d'actionnement de mesure dont le principe de fonctionnement et la fabrication sont brièvement expliqués.

Le troisième chapitre s'articule autour des différents tests de caractérisation dynamique des micromembranes résonantes que ce soit dans l'air ou dans le liquide. Est exposé également le protocole de validation de la capacité de la plate-forme à suivre l'évolution de la fréquence de résonance de plusieurs micromembranes résonantes dans le liquide selon le mode de vibration (0,1) en simultané.

Le quatrième et dernier chapitre s'attachera tout d'abord à décrire le processus de détermination de la manière optimale de greffer à la surface des micromembranes des biorécepteurs spécifiques aux agents à détecter. Enfin, nous résumerons et analyserons les résultats obtenus avec la plateforme de détection pour des expériences de détection d'agents biologiques pathogènes simulant la menace.



CHAPITRE I :

Introduction à la sécurité biologique et présentation des bioMEMS comme solution à la problématique

I.1.Introduction à la menace bactériologique

I.1.1. Historique

Longtemps avant que l'homme ne découvre l'existence des bactéries, il connaissait d'expérience les ravages occasionnés par la dissémination de maladies, à partir d'aliments, d'eau souillée ou encore d'animaux contaminés. Ce pouvoir de destruction a été exploité à de nombreuses reprises au cours de conflits entre civilisations à mesure que celles-ci parvenaient à localiser (même grossièrement) le médiateur des infections. Dès le VI^{ème} siècle avant l'ère chrétienne, les Assyriens utilisaient l'ergot de seigle, dont la toxine principale provoque de fortes hallucinations pour empoisonner les puits des villages ennemis [1]. Cette utilisation constitue le plus vieux témoignage connu d'armes biologiques. Au cours de l'ère moderne, en 1346, l'armée Tatare assiégeant le comptoir génois de Caffa eut l'idée de catapultier par-dessus les murailles les cadavres de ses soldats morts de la peste, provoquant *intra muros* une épidémie fatale aux assiégés [2]. Plus tard, au XV^{ème} siècle, les historiens rapportent que Francisco Pizarro fit offrir aux amérindiens des vêtements contaminés par la variole [3]. Cette même stratégie fut utilisée 300 ans plus tard par le baron Jeffrey Amherst contre les indigènes amérindiens de la tribu des Delaware [4]. Durant la première moitié du XX^{ème} siècle, l'utilisation d'armes biologiques fut systématisée entre autre par l'armée Japonaise. Au cours de la guerre sino-japonaise, l'empereur Hirohito ordonna, par mandat impérial, la création de l'unité 731, chargée de mettre en place un programme de recherche sur plusieurs maladies telles le choléra ou le typhus en vue d'utiliser ces infections comme armes biologiques à grande échelle. De nombreuses expérimentations sur des cobayes humains furent alors menées [5].

La première convention internationale destinée à interdire l'usage d'armes bactériologiques fut signée par 135 pays en 1925 sous le nom de Protocole de Genève [6]. Cependant, statuant uniquement quant à l'utilisation d'agents pathogènes en temps de guerre, et non sur le stockage, la production et l'acquisition de telles armes biologiques, la portée de cette convention fut très limitée. De fait, de nombreux pays initièrent ou poursuivirent des programmes de développement et d'études d'armes bactériologiques. En complément de ce protocole, une nouvelle convention beaucoup plus restrictive fut signée en 1972. La convention sur l'interdiction des armes biologiques (CABT) interdit tout stockage, développement, production et acquisition d'agents pathogènes pour toute fin non pacifique [7]. Bien que signée aujourd'hui par 162 pays, elle demeure néanmoins insuffisante puisque elle n'instaure pas d'organes de vérification de ces dispositions. Ainsi plusieurs pays pourtant signataires de la CABT (comme l'U.R.S.S., la Lybie, l'Irak) ont lancé ou intensifié depuis des programmes de Recherche et de Développement d'armes biologiques [8]. De 1980 à 2001, un processus de révision de la CABT est lancé afin de pallier les manquements de cette dernière. Ce processus aboutira à un échec suite au retrait unilatéral des Etats Unis des négociations.

En dehors des activités des Etats, signataires ou non de la CABT, de nombreux groupes et organisations terroristes ont cherché à se procurer et à utiliser des souches de bactéries pathogènes contre la société civile. De 1990 à 1994, la secte japonaise Aum tente en vain de se procurer le virus Ebola, puis échoue dans sa tentative de disséminer des souches de *Bacillus anthracis* (maladie du charbon) depuis le toit d'un immeuble [9] [10]. Le premier et plus notoire attentat terroriste utilisant avec succès l'arme biologique fut certainement l'envoi de lettres contenant *Bacillus anthracis* à des journaux et sénateurs américains, provoquant cinq décès parmi les récipiendaires [11].

En dehors du fait qu'elles laissent les infrastructures intactes tout en neutralisant les opérants tactiques (tout comme l'arme chimique), la spécificité des armes biologiques réside dans le fait qu'une faible quantité de matériel biologique, en contaminant un petit groupe de personnes pourra se multiplier indéfiniment et contaminer de larges populations si aucune réponse n'est apportée.

I.1.2. Agents pathogènes concernés

Les agents pathogènes considérés comme de potentielles armes biologiques sont de quatre types : Bacilles (e.g. *Bacillus anthracis*), Virus (e.g. filovirus Ebola), Toxines (e.g. toxine botulique) et bactéries Gram positif (e.g. souches pathogènes d'*Escherichia coli*). Le Centre de Contrôles des Maladies et de Prévention des Etats-Unis (*Center for Disease Control and Prevention*) fournit une liste en trois catégories des agents pathogènes susceptibles d'être employés comme arme biologique [12] [13]. Cette liste fait valeur de référence dans les politiques de prévention du risque biologique, en France notamment [14]. Elle prend en compte la rapidité de dissémination des agents par contagion, leur virulence mais également la qualité de la préparation des organismes de santé pour le traitement des maladies induites. Plus généralement, c'est la capacité globale de l'agent pathogène considéré à semer le chaos au sein d'une société qui est prise en compte, tant du fait des dommages sanitaires qu'il cause que de l'impact psychologique que sa propagation peut avoir sur la population. Cette liste est détaillée ici :

Catégorie A :

Agents pathogènes à forte virulence, débouchant sur de forts taux de mortalité chez les patients infectés, susceptibles de provoquer une large panique au sein de la population et nécessitant la mise en place de mesures de traitement et de préventions spéciales et drastiques.

Premièrement, on distingue dans cette catégorie plusieurs types de bacilles comme *Bacillus anthracis* provoquant la maladie du charbon, mais également *Yersinia pestis* vecteur de la peste et *Francisella tularensis* vecteur de la tularémie. Cette catégorie comporte également le poxvirus lié à la variole et les filovirus et arenavirus liés aux fièvres hémorragiques virales dont les exemples les plus connus sont l'Ebola et la fièvre de Marburg. Enfin, on note dans cette catégorie la présence d'une toxine très puissante, la toxine botulique (Botulisme).

Catégorie B :

Agents pathogènes de seconde priorité, dont la dissémination et la contagion sont modérément aisées, avec des taux de morbidité et de mortalité au sein de la population modérément élevés. Les agents pathogènes nécessitant l'augmentation des moyens de surveillance et des capacités de diagnostic sont également concernés.

Cette catégorie inclut :

- Les coccobacilles *Bacillus suis*, *Bacillus melitensis*, *Bacillus abortus* et *Bacillus canis* du genre *Brucella* provoquant chez l'homme la brucellose
- Les bactéries Gram-négative *Burkholderia mallei* et *Burkholderia pseudomallei* provoquant des formes plus ou moins violentes de morve.
- La bactérie *Chlamydia psittaci* pouvant induire trachomes, lymphogranulomes vénériens et chlamydioses
- La bactérie *Coxiella burnetii*, vecteur de la coxiellose (aussi appelé fièvre Q)
- La bactérie *Rickettsia prowazekii*, vecteur du typhus exanthématique.
- Les alphavirus à la base de plusieurs types d'encéphalites virales
- La nécrotoxine epsilon impliquée dans de nombreux cas de gangrène sécrétée par la bactérie *Clostridium perfringens*.
- L'entérotoxine B en jeu dans de nombreuses intoxications alimentaires violentes et sécrétée par plusieurs staphylocoques.
- La Ricine, toxalbumine six mille fois plus toxique que le cyanure, présente à l'état naturel dans les graines de l'arbre *Ricinus communis* (Ricin)

Cette catégorie comporte également plusieurs agents pathogènes représentant des menaces pour la sûreté alimentaire ou susceptibles de rendre l'eau impropre à la consommation. Ainsi sont incluses les bactéries du genre salmonelles, shigelles (causant de violentes dysenteries) et la souche O157:H7 d'*Escherichia coli* en ce qui concerne la contamination alimentaire. Les bactéries *Vibrio cholerae* (induisant le choléra) et *Cryptosporidium parvum* sont également concernées en tant que contaminant de sources d'eau potable.

Catégorie C :

La dernière catégorie regroupe les agents pathogènes causant certaines maladies émergentes. Ces agents, bien que peu préoccupants actuellement, sont surveillés de près car étant facilement disponibles, faciles à produire et à disséminer, ils pourraient être modifiés via des manipulations de biotechnique relativement simples afin d'acquérir une létalité importante. Deux exemples de ces agents pathogènes émergents sont le Nipah virus ou le hantavirus, respectivement colportés par certaines espèces de chauve-souris et certaines espèces de rongeurs sylvestres. Causés par l'expansion des zones d'habitation à certains endroits de la planète, la réduction des milieux naturels de ces espèces entraînera à terme un plus grand contact avec les êtres humains susceptible de favoriser la mutation de ces virus et leur transmission à l'Homme.

I.1.3. Stratégies publiques

En comparaison de la relative facilité de leur mise en œuvre, l'impact, réel ou perçu, que peuvent susciter les armes bactériologiques présente un énorme danger tant pour les troupes en

opération que pour la société civile. Les stratégies militaires et publiques de réponse et d'anticipation de cette menace sont intégrées au sein d'un positionnement plus global lié à l'anticipation de différents aspects de guerres « non conventionnelles » souvent associés sous l'acronyme : risque NRBC (Nucléaire, radiologique, biologique et chimique). Ainsi, les stratégies développées pour la réponse au risque biologique comportent de nombreux protocoles et structures communes avec celles mises en place pour la réponse aux risques nucléaire et chimique. Cette convergence d'approche ne doit cependant pas faire oublier le caractère spécial de la menace biologique (rappelé en section I.1.1) Ainsi, de nombreux états développés mettent en place des plans d'investissements pour la recherche et la préparation logistique permettant de concevoir, puis de mettre en œuvre, des solutions adaptées aux spécificités du risque biologique.

En France, suite aux attentats à l'anthrax survenus aux Etats-Unis en 2001, le ministre de la santé fait ajouter au plan Vigipirate un volet dénommé Plan Biotox destiné à la vigilance et au renseignement quant aux menaces biologiques sur le territoire. Ce plan se charge également de coordonner la mise en œuvre de moyens de réponse, de traitement et de décontamination suite à des événements de dissémination (accidentelle et intentionnelle : attentats) d'agents biologiques pathogènes. Parallèlement, la Délégation Générale de l'Armement donne son expertise technique et scientifique aux instruments de prévention, de protection et de détection de la menace biologique. Elle finance également de nombreuses recherches de pointe pour le développement de nouveaux concepts et outils adaptés à la spécificité de la protection biologique et à l'amélioration de son efficacité globale. Enfin, en 2005, le Centre de Défense Nucléaire Biologique et Chimique (CDNBC) est créé avec pour mission d'organiser sur le terrain la réponse à une dissémination d'agents biologique pathogènes et également d'assurer la formation continue des armées à l'adaptation et à la réaction à ce risque biologique.

Aux Etats-Unis, la réponse à une éventuelle attaque biologique (visant les militaires ou la population civile) est coordonnée par deux agences gouvernementales : le Centre de Réduction des Menaces pour la Défense (DTRA- Defense Threat Reduction Agency) et le Centre de commande stratégique pour le combat des armes de destruction massive (US-STRATCOM for Combating Weapons of Mass Destruction) [15]. L'effort de recherche et de développement ainsi que la gestion de la fourniture logistique sont quant à eux organisés par le « Joint Program Executive Office for Chemical and Biological Defense » (JPEO-CBD) [16]. Cet organisme coordonne les actions de plusieurs unités de recherche militaires thématiques afin de développer les outils et stratégies nécessaires à la protection des forces armées et des populations civiles sur le territoire américain. L'évaluation (et le financement) de la fourniture logistique et de l'effort de recherche pour la défense chimique et biologique est effectuée chaque année par le Programme de Défense Chimique et Biologique (CBDP). En 2007, 609 millions de dollars (sur les 1,500 millions dont est doté le CBDP) étaient consacrés à la recherche et développement pour la mise au point de solutions novatrices pour protéger les individus, détecter les contaminations biologiques, décontaminer les structures et fournir des contre-mesures médicales [17].

En dépit des différentes organisations, il est possible de synthétiser les diverses approches quant à la réaction opportune à une attaque biologique en quatre missions.

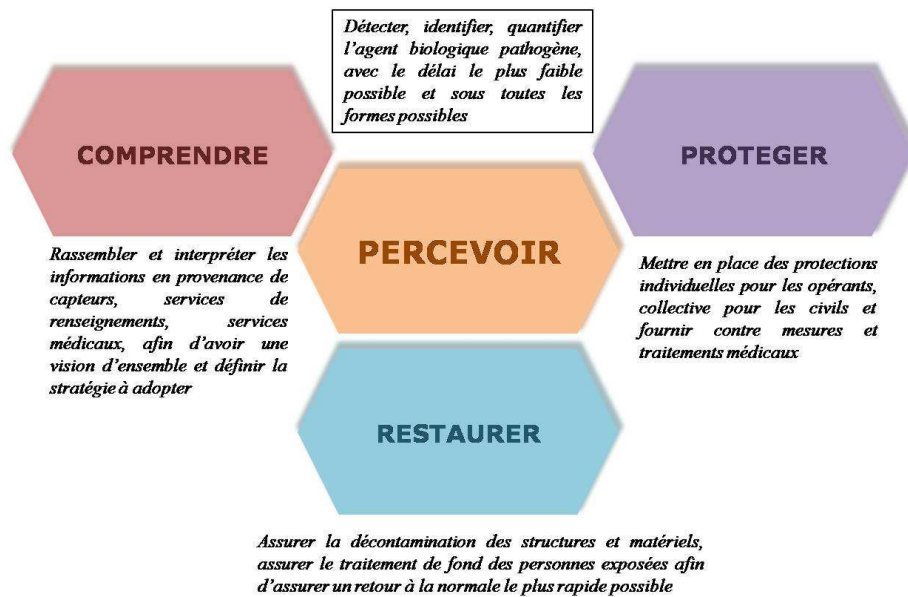


Figure 1.1 : Percevoir et identifier la nature de la menace, comprendre son étendue et son importance, protéger les populations civiles et les troupes et enfin restaurer l'intégralité des capacités opérationnelles ou économiques mises à mal lors de l'épisode, constituent les quatre piliers de la réponse à la menace biologique.

Parmi ces quatre axes de la réponse à une menace biologique, il est important de noter que l'étape de perception de la réalité d'une attaque bactériologique est un préalable *sine qua non* du déclenchement de la réponse à l'attaque bactériologique. Connaissant la virulence et la facilité de contagion des agents pathogènes de classe A, il est évident que plus la perception de la dissémination d'un agent sera rapide, plus efficace sera la réponse.

Le premier moyen de perception d'une attaque ou d'un risque biologique passe par l'analyse des cas de maladie à déclaration obligatoire. Une fois le diagnostic établi pour une maladie de ce type, les autorités sanitaires sont averties et une intervention spécifique est mise en place. Compte tenu du temps d'incubation de certaines maladies par rapport à leur vitesse de dissémination et de contagion, il serait peu judicieux de baser le déclenchement d'une réponse sanitaire sur la déclaration des premiers cas pathologiques. En fait, dans le cas d'une attaque biologique, le temps de réponse entre l'attaque et sa détection a une si grande influence sur le nombre de pertes civiles et militaires et sur la perte de capacité opérationnelle que les agences gouvernementales n'envisagent pas comme une option future l'absence de moyens de détection rapides et sélectifs. Dans cette optique, un effort considérable est effectué sur le développement, l'amélioration et la mise en service de solutions de détection appropriées.

La plupart des études et expertises sur les moyens de détection considère le cas initial d'agents pathogènes disséminés dans l'air sous forme d'aérosols (grâce à de petits avions épandeurs ou même de sprays de poche). Les moyens de détection à mettre en œuvre doivent donc être capables de collecter de grandes quantités d'air et de les concentrer en échantillons plus réduits. Puis, les systèmes de détection doivent être capables de détecter la présence de micro-organismes au sein des échantillons. Enfin, ils doivent être à même d'identifier avec exactitude les micro-organismes dont la présence a été avérée, afin de renseigner le commandement ou les autorités sur la nature de la réponse à donner.

Les défis à relever sont vastes pour plusieurs raisons. Premièrement, les environnements humains sont riches en micro-organismes endémiques de toute sorte, souvent présents en bien plus

grande concentration dans l'air que les agents pathogènes vecteurs de l'attaque biologique. De plus, les caractéristiques de masse et de volume des micro-organismes constitutifs de ce « bruit de fond » biologique sont souvent proches des agents pathogènes ciblés. Les systèmes de détection doivent donc répondre à un impératif crucial de sélectivité. Ensuite, partant du caractère inconnu d'une attaque biologique, les systèmes de détection doivent être à même d'identifier plusieurs types d'agents pathogènes en même temps. Leur polyvalence dans ce domaine est une exigence très forte pour des systèmes axés sur la veille permanente d'une liste d'agents pathogènes aux caractéristiques très variées. Enfin, et comme suggéré plus haut, le temps de réponse des systèmes de détection constitue un facteur clé, permettant de les ranger en deux groupes fonctionnels [12].

Les systèmes de détection qui, de par les technologies de détection mises en jeu, offrent des temps de détection et d'identification des agents pathogènes allant de quelques heures à quelques jours, sont dits « detect-to-treat » (détecter pour traiter). Ils se conjuguent aux moyens d'analyses biologiques conventionnels permettant de savoir avec précision quel est l'agent pathogène responsable d'une dissémination avérée ou de confirmer un soupçon.

Les systèmes de détection offrant des temps de détection et d'identification d'un agent pathogène inférieur à l'heure sont dits « detect-to-prevent » (détecter pour protéger) et doivent permettre la mise en place d'une alerte dans le but d'éviter ou de limiter la contamination humaine lorsqu'une dissémination d'agents pathogènes est avérée. C'est dans ces derniers systèmes de détection que se concentre la majorité des efforts de recherche actuellement déployés.

Le caractère imprévisible d'une attaque biologique contre les forces armées ou la population civile conjugué avec sa relative facilité de préparation comparée aux dégâts occasionnés, pousse les pouvoirs publics et militaires à encourager le développement de systèmes de détection peu chers, fiables, pouvant être facilement déployés et dont les informations peuvent être massivement mises en réseau. Le but ultime est de disposer d'un ensemble de moyens de détection dont la mise en commun permet de percevoir en temps réel et dans sa globalité une dissémination d'agents pathogènes, son étendue et sa gravité.

I.1.4. Dispositifs actuellement déployés

Les premiers systèmes de détection biologique développés par les militaires ont consisté à mettre en commun des instruments de traitement et détection biologique disponibles dans le commerce dans le cadre de plateformes de détection. Ces plateformes sont mobiles lorsqu'elles sont assemblées sur des véhicules (Véhicule BIDS, USA) ou stationnaires et destinées à être installées sur le champ de bataille (Plate-forme EPABT, France). En procédant au comptage ainsi qu'à des études de dimensions des entités biologiques collectées par des méthodes d'immunologie et de bioluminescence, elles procèdent à l'identification précise de la nature de l'attaque. Ces plateformes sont difficilement réductibles en taille et nécessitent un ou plusieurs opérateurs humains.



Figure 1.2 : Photographie de deux systèmes de détection de menaces biologiques sur théâtre d'opérations opérationnels : à gauche, Véhicule équipé du « Système de détection biologique intégré » (BIDS), équipant l'armée des Etats-Unis d'Amérique ; à droite, Plate-forme « Ensemble provisoire d'alerte biologique de théâtre » équipant l'armée française.

Les armées américaines et canadiennes disposent également de plusieurs outils de détection d'aérosols biologiques à distance. Le BAWS (Biological Agent Warning Sensor, développé par le Massachusetts Institute of Technology) procède à l'illumination par laser de l'aérosol environnant et mesure les photons réfléchis par cet aérosol. En comparant en permanence la mesure temps-réel à un historique des mesures précédentes, il peut percevoir l'arrivée d'un aérosol dans l'environnement où il est positionné en moins de 10 min. Il peut aussi discriminer un changement d'environnement lié à un aérosol biologique de celui lié à un nuage de poussière [18]. Combiné à un système d'identification biologique composé d'un collecteur et d'une banque d'échantillons étalons destinés à la comparaison avec l'échantillon d'air extrait, il forme le système JBPDS (Joint Biological Point Detection System). Capable d'identifier la nature d'une attaque parmi 10 AGB (Agent de Guerre Biologique) en 20 minutes, le système JBPDS est déployé depuis 2001, au sein des bases aériennes, des ports et des navires. Possédant une sensibilité améliorée par rapport à la génération précédente, son coût à l'unité reste cependant très élevé (350 K\$) et son encombrement, certes relatif, lui interdit cependant une application comme système de détection embarqué sur fantassin ou à distance. Il reste néanmoins un système dit « détecter-pour-protéger »

En ce qui concerne la dissémination d'AGB dans un lieu public, le Laboratoire Lawrence Livermore a développé un système autonome compact réalisant la collecte, le tri, et le comptage des espèces biologiques par cytométrie de flux. Le système APDS (pour Autonomous Pathogen Detection System) réalise ensuite une opération de lyse des entités biologiques puis d'amplification de matériel génétique par un système de PCR automatisé (Réaction en chaîne par polymérase) et identifie enfin l'agent biologique pathogène par dosage immunoenzymatique sur support solide (technique ELISA). Il permet d'identifier 100 espèces de bactéries et de virus différents pour un temps de réponse d'environ 90 min. Ce dernier paramètre positionne ce système dans la catégorie des systèmes de détection dit « détecter-pour-traiter », néanmoins il est opérationnel à l'heure actuelle dans plusieurs gares et aéroports (San Francisco, Albuquerque) et dans les métros de New York et Toronto.

Chacun des systèmes déployés décrits ici a permis de combler avec satisfaction un rôle vacant bien précis dans chaque cas applicatif. Chacun pourtant, souffre des défauts inhérents au type d'exigence qu'il entend satisfaire pour une application donnée. Par exemple, la plate forme APDS qui a l'avantage d'identifier de nombreuses espèces différentes souffre d'un manque de portabilité et de temps de réponse relativement longs. S'il nous était confié la mission de définir le système de détection idéal qui permettrait de répondre à ces multiples demandes, nous pourrions rassembler l'ensemble des caractéristiques que ce système devrait posséder :

- ✓ Haute sensibilité de la détection

- ✓ Grande spécificité de la reconnaissance biologique (déclenchement de fausses alertes non souhaitable)
- ✓ Grande durée d'utilisation
- ✓ Coût relativement faible pour pouvoir en équiper le plus possible de lieux et d'opérants tactiques
- ✓ Encombrement réduit (pour les mêmes raisons que précédemment)
- ✓ Temps de réponse le plus court possible.
- ✓ Possibilité d'utilisation multiple (régénération après utilisation)

A ce stade, il convient de se rendre compte que, parmi cet ensemble d'exigences, nombreuses sont celles que l'on retrouve dans la recherche et le développement de systèmes de détection d'agents biologiques destinés à d'autres domaines (médical, sécurité alimentaire, recherche médicale). En effet, depuis plus de 40 ans, le monde scientifique porte, chaque année davantage, ses efforts pour fournir des solutions performantes de détection d'entités biochimiques destinées à une vaste gamme d'applications. Le terme de **biocapteur** a été inventé afin de regrouper, sous un même objet d'étude, l'ensemble de ces recherches.

A l'heure actuelle, les biocapteurs sont en passe de devenir la ligne d'horizon de nombreuses espérances en termes de solutions de détection rapides, bon marché et fiables. Ainsi, dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous attacherons d'abord à définir les principes de fonctionnement et caractéristiques principales des biocapteurs en mettant en correspondance les principes physico-chimiques disponibles avec une ou plusieurs applications en termes de détection d'AGB. Ensuite, nous rapporterons les avantages et promesses remarquables des biocapteurs basés sur des MicroSystèmes ElectroMécaniques (**BioMEMS**) et montrerons dans quelle mesure ces derniers laissent entrevoir la satisfaction des exigences citées plus haut pour la détection d'AGB. Nous dresserons alors un état de l'art non-exhaustif des BioMEMS en incluant fortement ceux destinés à la détection de la menace biologique.

I.2. Les BioMEMS : Solution idoine à la problématique de bio-défense

I.2.1. Introduction aux biocapteurs.

I.2.1.1. Définition

En se basant sur la définition donnée par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC, 1999) et sur celles rencontrées dans la littérature [19] [20], on peut définir l'objet de notre étude comme suit : un biocapteur est un dispositif intégré et autonome, capable de fournir une information analytique quantitative ou semi-quantitative, sélective, en combinant un élément de détection biologique et un transducteur physico-chimique. Le transducteur assure la transformation de la reconnaissance biologique en un signal physiquement mesurable (figure 1.3). A partir de cette définition, on peut mettre en exergue les caractéristiques clés des biocapteurs que sont la sensibilité et la sélectivité. La sensibilité est liée aux caractéristiques du transducteur capable de transformer chaque événement de reconnaissance biologique en un signal biologique de plus ou moins grande intensité. La sélectivité quant à elle, comme évoqué plus haut, est liée à la capacité de la couche biologique sensible

à reconnaître uniquement l'élément ciblé (analyte) au sein d'un environnement biologique dense et varié.

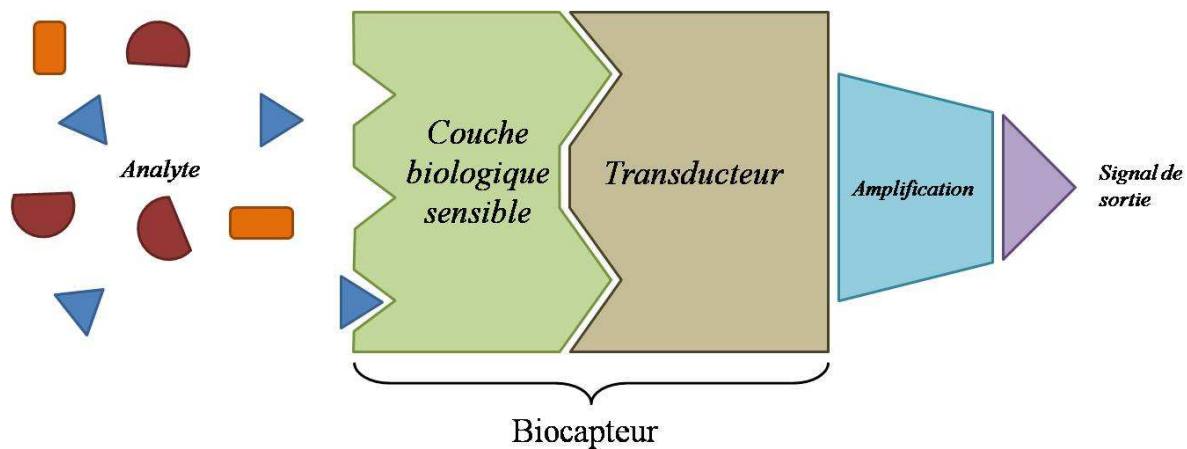


Figure 1.3 : Schéma de principe des différents éléments constitutifs d'un biocapteur.

Les promesses des biocapteurs en termes de sensibilité, sélectivité mais également de temps de réponse (dont l'horizon est représenté par les mesures en temps réel), de faible coût de fabrication et les grandes potentialités de miniaturisation ont enthousiasmé le monde scientifique. Chaque année et cela depuis les premières apparitions du terme [21], les publications et brevets traitant de biocapteurs sont plus nombreux.

Paradoxalement, le nombre de biocapteurs ayant fait l'objet d'une commercialisation moyenne ou grande échelle reste encore aujourd'hui limité. Ainsi, il a été montré que près de 80% des recherches et développements menés dans ce domaine n'aboutissaient pas à des applications commerciales. Les entreprises faisant une offre commerciale viable de biocapteurs restent encore majoritairement sur des marchés de niche [22], notamment pour le domaine militaire des biocapteurs appliqués à la défense biologique (citons l'exemple de QTL biodetection [23]). Cependant, étant donné que l'effort porté sur les biocapteurs est en constante augmentation, on peut prédire l'apparition de quelques succès commerciaux grand public basés sur des biocapteurs [24].

Une des manières de classer les différents types de biocapteurs consiste à les différencier en fonction des diverses couches biologiques sensibles et transducteurs utilisés.

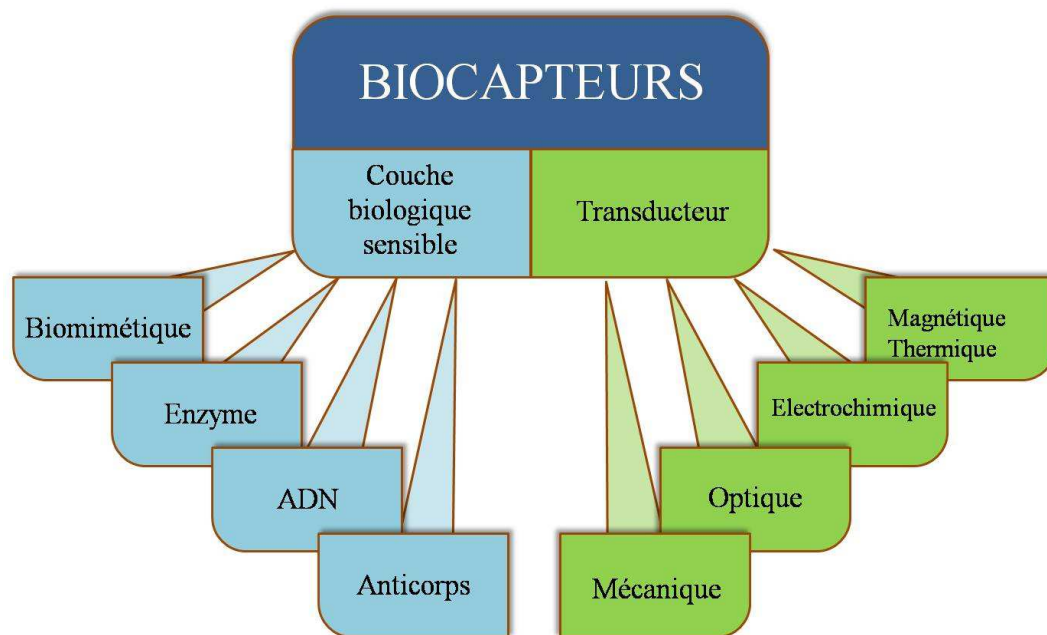


Figure 1.4 : Classification schématique des biocapteurs en fonction des couches biologiques sensibles et des moyens de transduction utilisés.

La couche biologique sensible consiste en un arrangement spatial de biorécepteurs réalisant l'accroche de l'élément biologique ciblé à la surface du capteur. Afin d'assurer la meilleure spécificité du biocapteur, cette couche biologique permet l'accrochage préférentiel de l'élément ciblé au sein du milieu réactionnel mais permet également de protéger le capteur des accroches non spécifiques d'autres éléments biologiques. Les biorécepteurs peuvent être de plusieurs types : biocatalytique (enzymes), immunologique (anticorps) ou encore basés sur des chaînes d'acide désoxyribonucléique. Il convient de noter ici que des biocapteurs basés sur des biorécepteurs biomimétiques (i.e. polymères à empreinte moléculaire) [25] ou constitués de parties d'organismes cellulaires [26] ont été développés. Cependant, ils ne seront pas abordés dans ce manuscrit.

Le transducteur, quant à lui, réalise la transformation du signal biologique en un signal physiquement mesurable. Il est principalement de nature optique, électrochimique ou mécanique. D'autres principes de transduction tels que des méthodes magnétiques ou calorimétriques sont possibles mais relativement moins répandus.

En ce qui concerne les domaines de diffusion des biocapteurs commerciaux, c'est sans aucun doute le milieu médical et clinique qui profite du plus grand nombre d'applications. Le plus grand succès commercial reste le capteur de glucose sanguin pour les individus souffrant du diabète. Ce biocapteur portable est pourtant basé sur une technologie développée il y a plus de 40 ans [27]. D'autres biocapteurs portables, aisément manipulables, ont connu un développement commercial à grande échelle. Recensons l'i-STAT Portable Clinical AnalyserTM un biocapteur permettant de doser dans le sang du patient plusieurs électrolytes (sodium, potassium, calcium), gaz (oxygène dioxyde de carbone) et autres molécules (urée, glucose, hématoците) [28]. Cependant en majorité les biocapteurs commerciaux sont de plus grosses tailles et destinés principalement aux laboratoires d'analyses et de recherche où ils ont trouvé leur place comme instruments de paillasse pour l'évaluation d'interactions biologiques. Ainsi, le système BiacoreTM (Biacore AB, Suède) basé sur des principes de résonance plasmonique de surface [29] mais également le système QCM-D (Microbalance à quartz avec suivi de la dissipation, Q-sense, Suède) sont maintenant très répandus [30].

Notons également que la recherche sur les biocapteurs a permis l'émergence d'applications dans le domaine de la sécurité alimentaire [31] et environnementale [32]. Par exemple, pour évaluer la toxicité globale des eaux, l'évaluation de la demande biologique en oxygène (BOD) est un moyen éprouvé et a fait l'objet d'applications commerciales (ROD TOXTM) [33] [34]. D'autres biocapteurs ont été développés pour évaluer les taux de cyanides [35] de PCB [36] ou encore de composés phosphoro-organiques (trois polluants très toxiques) dans l'eau [37]. En ce qui concerne la sécurité alimentaire, de nombreuses équipes développent des biocapteurs pour la détection des salmonelles [38] [39]. Citons également l'exemple commercial du MIDASPRO (Biosensori SpA, Italie) pour la détection de sources pathogènes d'*Escherichia coli* [40].

Les champs d'application des biocapteurs sont très vastes et leur description complète n'entre pas dans le cadre de cette étude. Dans les deux prochains paragraphes, nous dresserons un rapide tableau des biorécepteurs et techniques d'immobilisation les plus utilisés dans le cadre d'application biodéfense ainsi qu'une description globale des principaux moyens de transduction. Cette description nous permettra de mettre l'accent sur les grands principes de transduction mécanique et leurs ambitieuses promesses pour la reconnaissance biologique. Nous nous consacrerons alors aux biocapteurs à transduction mécanique miniaturisés : les bioMEMS et à leurs formidables promesses pour la détection d'AGB.

I.2.1.2. Une grande variété de couches biologiques sensibles : les biorécepteurs

La couche biologique sensible consiste en la conjonction de deux éléments : un *biorécepteur* immobilisé à la surface du biocapteur via une *technique d'immobilisation* spécifique. La description exhaustive et complète de ces deux éléments complémentaires dans l'optimisation de la couche biologique n'entrera pas dans le cadre de cette étude. De telles revues et descriptions du fonctionnement des biorécepteurs ont déjà été menées et peuvent être trouvées dans la littérature [41].

On distingue deux grands types de biorécepteurs : les biorécepteurs d'*affinité* et ceux dits *catalytiques* correspondant pour la plupart à des enzymes. Les enzymes sont des protéines structurées de façon à posséder un site actif leur conférant la capacité de catalyser d'une réaction chimique pour un substrat donné. L'éventuelle dénaturation de cette protéine supprime son potentiel catalytique. Pour leur capacité d'amplification de la détection, ce sont les enzymes qui ont été employés historiquement comme biorécepteurs des premiers biocapteurs [27]. Grâce à son rôle catalytique, cette protéine peut produire plusieurs milliers de molécules issues de la réaction enzymatique à la seconde. Cette génération exceptionnelle au voisinage de la surface du biocapteur confère aux enzymes d'excellents avantages dans la course à la miniaturisation des capteurs [42]. Ainsi, des temps de réponse très courts peuvent être fournis même pour des capteurs à l'échelle micrométrique [43]. La principale limite des biorécepteurs enzymatiques est leur forte propension à perdre leur capacité catalytique avec la dénaturation de leur structure protéique. Cette dénaturation peut survenir lors de variations de température ou de pH. C'est ce principal désavantage qui éloigne de nos jours les récepteurs enzymatiques du cadre des biocapteurs appliqués à la détection d'AGB.

La seconde grande famille de biorécepteurs est celle des biorécepteurs dits d'*affinité* en raison de la reconnaissance hautement spécifique de molécules biologiques qu'ils permettent (constantes de liaisons supérieures à 10^9 M^{-1}). Les plus répandues dans des applications de biocapteurs sont les

immunoglobulines (e.g. anticorps) et les molécules d'acide désoxyribonucléique et ribonucléique (e.g. ADN et ARN).

Les molécules d'ADN et ARN sont d'énormes molécules véhiculant l'information génétique des êtres vivants, elles sont uniques pour un être vivant donné. La molécule d'ADN est présente dans les cellules et organismes vivants sous la forme de deux chaînes moléculaires liées à intervalles réguliers par des ponts hydrogène sous une structure tridimensionnelle double-hélicoïdale. Ces deux chaînes peuvent également se trouver sous une forme séparée l'une de l'autre. La structure moléculaire de ces chaînes est constituée d'une suite de nucléotides. Un nucléotide est constitué d'un acide phosphorique suivi d'un sucre, le désoxyribose, sur lequel vient s'attacher une base azotée. Ces bases azotées sont de quatre types (Adénine, Cytosine, Guanine et Thymine, dans la molécule d'ARN, l'Uracile remplace la Thymine) ; elles sont responsables de l'attachement en hélice des deux chaînes d'ADN suivant un procédé associant toujours Adénine à Thymine et Cytosine à Guanine. La réaction permettant de rassembler deux brins d'ADN complémentaires en une structure à double hélice est dite réaction d'hybridation de l'ADN. La réaction d'hybridation est d'une très grande affinité, et une différence d'un nucléotide seulement peut induire des forces de liaison bien distinctes même lors de l'association de chaînes d'ADN constituées de centaines de bases [44].

La technique de biodétection basée sur l'utilisation de molécules d'ADN ou d'ARN est la suivante : une molécule d'ADN non hybridée et caractéristique d'une entité biologique en particulier est immobilisée à la surface du transducteur. Les conditions d'occurrence de la réaction d'hybridation étant alors recréées, le brin immobilisé se liera avec une molécule d'ADN présente dans le milieu réactionnel si et seulement si cette dernière possède l'enchaînement nucléotidique exactement complémentaire. En d'autres termes, cette technique possède l'avantage principal de permettre l'identification presque infaillible, au nucléotide près, de l'entité biologique ciblée dans le milieu réactionnel [45]. De plus, grâce au développement des techniques d'amplification du matériel génétique (appelé PCR pour Polymerase Chain Reaction, méthode basée sur la réplication de faibles quantités de molécules d'ADN pour en produire des milliards de copies en quelques heures), de très faibles quantités de micro-organismes peuvent être détectées. Les travaux d'Hartley et Baeumner ont par exemple montré la détection de l'ADN extrait puis amplifié à partir d'une seule spore de *Bacillus anthracis* [46].

Bien qu'affichant des performances de sensibilité impressionnantes, la détection par hybridation de brins d'ADN en utilisant la PCR nécessite un traitement de l'échantillon de plusieurs heures. Le temps de détection associé a été cependant réduit à une heure en utilisant la méthode dite de PCR en temps réel, pour laquelle le processus d'amplification du matériel génétique est suivi au fur et à mesure.

La réalisation d'une telle identification requiert cependant de nombreux préalables à même de limiter les conditions d'utilisation des molécules d'ADN comme biorécepteurs. Tout d'abord, l'ADN doit être extrait de l'organisme ciblé en solution. Or, celui-ci se trouve systématiquement à l'intérieur d'une ou plusieurs membranes moléculaires définissant l'enveloppe du micro-organisme visé. Accéder à la molécule d'ADN de l'entité biologique signifie ainsi détruire par lyse son enveloppe externe. Il faut ensuite procéder à la déshybridation de la structure en double hélice afin de disposer de molécules d'ADN monobrin capables alors de venir s'hybrider avec le biorécepteur immobilisé. L'ensemble de ces étapes nécessite plusieurs traitements consécutifs et variés de l'échantillon à analyser. Même si des efforts considérables ont été faits pour miniaturiser l'ensemble des procédés de traitement des échantillons et d'amplification par PCR [47] [48], les biocapteurs basés sur biorécepteurs ADN ne

peuvent pas actuellement être utilisés sur un champ opérationnel militaire. Selon les experts scientifiques des laboratoires militaires américains, cette catégorie de biocapteurs n'est pas prête à fournir des solutions de protection individuelles et portables efficaces. Par contre, leur intérêt demeure important à travers divers biocapteurs de laboratoire permettant l'identification infaillible de l'agent de guerre biologique utilisé. Enfin, il est essentiel de souligner que des biocapteurs utilisant des brins d'ADN ont été prouvés efficaces pour la détection d'organismes biologiques inconnus ou génétiquement modifiés. Ceci a été réalisé par Higgins *et al* en procédant à la reconnaissance d'un agent biologique modifié grâce à une partie de l'ADN non modifié par rapport à l'original [49]. En ce sens, les biocapteurs d'AGB utilisant la reconnaissance de brins d'ADN complémentaires, sont une voie royale pour le développement et la commercialisation de biocapteurs dits « detect-to-treat » aux performances d'identification exceptionnelles.

Les immunoglobulines sont des protéines assurant l'exécution de la réponse immunitaire spécifique au sein des êtres vivants. Ces protéines sont composées de deux chaînes lourdes (environ 440 acides aminés chacune) et de deux chaînes légères (220 acides aminées) articulées entre elles grâce à des liaisons disulfure. Chaque anticorps est spécifique pour un antigène donné. En effet, chaque anticorps est le produit d'une réponse immunitaire déclenchée au moment de la reconnaissance de l'antigène par le système immunitaire de l'animal ou de l'être humain. Représentée le plus souvent sous la forme d'un Y (cf. figure 1.5), la structure de chaque molécule d'immunoglobuline comporte deux parties. Le fragment cristallisable (F_c) est commun à tous les anticorps d'une même espèce et le fragment dit « Antigen Binding » spécifique à l'antigène cible pour chaque anticorps. Il existe plusieurs sortes d'immunoglobulines. Les immunoglobulines G (IgG) sont les plus nombreuses au sein du système immunitaire, ce sont les molécules qui fournissent le plus gros contingent lors de la réponse immunitaire face à un pathogène invasif. Pour cette raison mais également de par leur méthode de production en laboratoire, les IgG sont les anticorps les plus utilisés par les biologistes et physico-chimistes. Cependant, d'autres immunoglobulines (notamment IgA et IgE) peuvent être employées comme biorécepteurs.

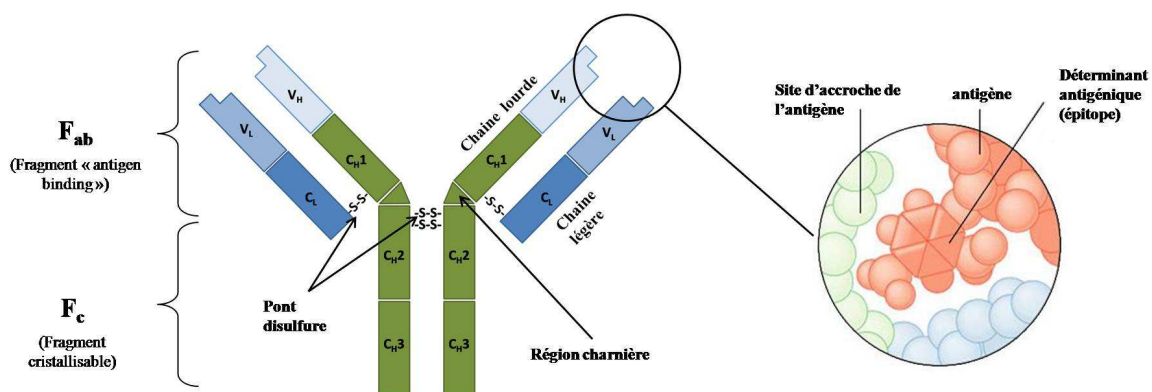


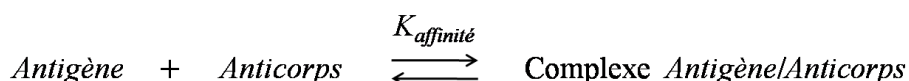
Figure 1.5 : Schéma de la structure d'un anticorps (éléments sous copyright ©Pearson Education 2004)

Le fragment F_c d'un anticorps n'intervient pas dans la reconnaissance spécifique de l'antigène, il possède cependant des propriétés biologiques importantes. Il détermine la durée de demi-vie de l'anticorps dans l'organisme (environ 21 jours pour l'IgG) [50]. Il permet la formation de complexes d'anticorps ayant des rôles biologiques variés. Par exemple le pentamère IgM est formé des cinq IgG reliés par leur fragment constant, il possède de plus de grandes capacités d'agglutination des antigènes

et exhibe une forte capacité bactéricide et lytique. La structure moléculaire du fragment constant d'un anticorps incorpore de nombreuses fonctions carboxyles (-COOH) et amines (-NH₂) qui seront susceptibles d'être utilisées aisément afin d'immobiliser les anticorps à la surface de transducteurs.

Le fragment F_{ab} dit « Antigen Binding » est quant à lui le principal agent de la reconnaissance spécifique de l'antigène. Chaque antigène possède des molécules de surface caractéristiques appelées déterminants antigéniques ou épitopes. Ce sont les molécules qui permettent la fixation des immunoglobulines à la surface de l'antigène. Les immunoglobulines se fixent à l'épitope de l'antigène grâce à leurs deux sites de reconnaissance formés chacun par les extrémités des chaînes d'acides aminés du fragment variable F_{ab}. On nomme ces sites paratopes, chaque anticorps en possédant deux, les anticorps sont dits bivalents.

La liaison épitope/paratope est au cœur de la réponse immunitaire spécifique. Les forces assurant la cohésion du complexe antigène-anticorps sont de quatre types : hydrogènes, électrostatiques, de Van der Waals et hydrophobes. Ces dernières sont souvent abondantes et peuvent représenter jusqu'à la moitié de l'énergie totale de liaison. Chaque liaison antigène/anticorps est donc **réversible**. On peut associer à chaque couple antigène/anticorps (ou épitope/paratope) une énergie de liaison bien spécifique. Ce que l'on nomme **constante d'affinité** du couple antigène/anticorps est introduite alors pour caractériser la force de chaque liaison. Si l'on considère la réaction de liaison/dissociation d'un antigène et d'un anticorps, on définit la constante d'affinité comme suit :



$$K_{\text{affinité}} = \frac{[\text{Complexe Antigène / Anticorps}]}{[\text{Antigène}] * [\text{Anticorps}]}$$

Quelques méthodes biochimiques permettant de forcer la réaction de dissociation de l'antigène et de l'anticorps seront exposées à la section IV.2.3.3 du chapitre IV, mais leur description complète n'entre pas dans le cadre de cette étude.

Les biorécepteurs d'affinité sont capables de détecter de très faibles quantités d'analytes. De part leur principe de reconnaissance basé sur une très grande spécificité, ils maintiennent leur capacité de détection même en présence d'un grand type d'entités biologiques à des concentrations de plusieurs ordres supérieures à celle de l'analyte à détecter. Cette capacité a fait des biorécepteurs d'affinité de très bons candidats pour l'utilisation au sein de biocapteurs notamment pour des applications de diagnostic clinique [51] [52] [53].

La reconnaissance par un anticorps d'un antigène solidarise ce dernier avec la surface du biocapteur, les biorécepteurs d'affinité sont ainsi bien adaptés à l'utilisation au sein de biocapteur de masse. En effet, une mesure des variations de masse à la surface du capteur peut donner de précieuses informations sur l'état d'avancement de la réaction d'association antigène/anticorps. Ce principe a permis à des biocapteurs comme la microbalance à quartz (QCM) [30], dont nous livrerons une étude détaillée plus loin dans ce chapitre, de devenir un succès commercial et scientifique. Les immunoglobulines employées au sein de microbalance à quartz ont montré des capacités de diagnostic importantes. Citons par exemple le travail de Peduru Hewa *et al* sur la détection des virus de la grippe A et B dans des échantillons cliniques à des concentrations de 10⁴ UFC/mL [54].

Les anticorps sont également largement utilisés comme biorécepteurs pour des applications de type biodéfense [55]. Hormis leurs performances en termes de spécificité de la reconnaissance, leur stabilité et la simplicité de la mise en œuvre sont très attractives. Enfin, ne nécessitant pas de prétraitements de l'échantillon ou d'amplification du matériel biologique, ils peuvent être implémentés pour des biocapteurs dits « detect-to-prevent » c'est-à-dire qu'ils permettent des temps de réponse des biocapteurs suffisamment courts. De nombreuses firmes industrielles et laboratoires en ont fait leur choix principal, notamment la firme Research International (Monroe, WA, USA) qui commercialise le système portable RAPTOR permettant la détection, grâce à une technologie basée sur des fibres optiques, de la fraction 1 de l'antigène associé à *Yersinia pestis*, à des concentrations de 50 ng/mL, y compris dans le sang pur, et cela grâce à l'usage d'anticorps spécifiques [56]. Le principe de cet appareil sera décrit plus précisément en section I.2.1.4.

I.2.1.3. Une grande variété de couches biologiques sensibles : les techniques d'immobilisation :

La manière et le procédé mis en place pour immobiliser les biorécepteurs à la surface du transducteur sont capitaux dans la détermination finale de l'efficacité du biocapteur. En effet, la technique retenue doit remplir deux fonctions essentielles, permettre le greffage des biorécepteurs afin d'assurer la bio reconnaissance spécifique mais également, limiter le nombre d'interactions non-spécifiques entre la surface et des entités biologiques non ciblées par la reconnaissance. Les conditions requises pour une immobilisation optimale des biorécepteurs à la surface du transducteur sont les suivantes :

- ✓ Les biorécepteurs ne doivent pas perdre leur fonctionnalité biologique une fois attachés à la surface du biocapteur.
- ✓ L'immobilisation doit exclure un décrochage des éléments biologiques lors de la reconnaissance ou lors de changement de milieu (force ionique, température).
- ✓ La couche biologique sensible ainsi formée doit être stable dans le temps et doit permettre aux anticorps d'exercer leur haut niveau de spécificité.

La non-réalisation d'une de ces conditions entrainera la dégradation des capacités optimales du biocapteur. Deux exemples peuvent être cités. Premièrement, l'orientation des biorécepteurs fixés est essentielle. En effet, un anticorps fixé à la surface par son fragment « antigen –binding » présentera son fragment constant au milieu réactionnel ce qui limitera grandement la possibilité d'une accroche spécifique [57]. Deuxièmement, une densité non maîtrisée peut gêner la détection. Si une trop grande densité de biorécepteurs est immobilisée à la surface du capteur, l'accès aux sites de reconnaissance de ces biorécepteurs peut se retrouver dans certains cas extrêmement détérioré [58].

Un second critère principal de l'optimisation d'une couche biologique sensible concerne la limitation des interactions non-spécifiques. Celles-ci peuvent intervenir directement entre la surface du transducteur et un élément du milieu biologique via des forces de faible énergie (même phénomène que celui de l'adsorption directe sur substrat, méthode décrite plus loin). Mais elles peuvent également survenir lorsque la spécificité des biorécepteurs est prise en défaut et qu'ils interagissent avec un autre analyte que celui devant être reconnu spécifiquement. Ces deux causes d'interactions non-spécifiques doivent être prises en compte lors du choix de la couche biologique optimale pour une application au sein d'un biocapteur

Nous effectuons ici, un rapide tour d'horizon des avantages et des inconvénients des différentes méthodes d'immobilisation de biorécepteurs à la surface d'un transducteur.

A- Adsorption directe sur un substrat solide

L'ensemble des forces permettant l'adsorption d'entités biologiques sur une surface peut être employé pour déposer de manière simple et peu coûteuse une couche de biorécepteurs. L'adsorption de biorécepteurs sur une surface est le fait de liaisons de faibles énergies. Ces liaisons peuvent être physiques lorsqu'elles sont de Van der Waals ou de type hydrophobe-hydrophobe. Elles peuvent également être chimiques lorsqu'elles interviennent via la création de ponts chimiques (lié au partage ou au transfert d'électrons entre les atomes de la surface et ceux des biorécepteurs). Dans les deux cas, la réversibilité de l'accroche obtenue par cette méthode doit être prise en compte. L'adsorption directe de biorécepteurs a été démontrée dans de nombreuses conditions et pour différents types de surface [59], pour des polymères et des métaux nobles [60] (l'or étant par exemple particulièrement employé dans les biocapteurs). Le principal désavantage de cette méthode réside dans le manque crucial de contrôle quant à l'uniformité, la densité et la qualité de la couche biologique déposée. De nombreuses études ont montré des distributions très irrégulières de biorécepteurs dont l'orientation est aléatoire. Les biorécepteurs ainsi immobilisés peuvent former des agrégats ou s'empiler suivant des couches multiples [61]. L'ensemble de ces phénomènes tend à détériorer la capacité de biorecognition spécifique de la couche biologique ainsi déposée. L'occurrence d'interactions non-spécifiques dont les phénomènes physico-chimiques ont été décrits plus haut est également favorisée par la non-uniformité liée à cette méthode d'immobilisation.

Cependant, et de par son faible coût et sa relative facilité de mise en place, cette méthode reste très fréquemment utilisée dans de nombreux tests biologiques (par exemple dans la méthode de référence ELISA [62]). Notons également que plusieurs méthodes destinées à améliorer l'uniformité de la couche déposée par adsorption directe sont à l'étude, les travaux d'Aline Cerf sur l'assemblage capillaire au sein du groupe Nanobiosystèmes du LAAS ont mis en évidence une méthode alternative de dépôt par adsorption permettant de créer des monocouches uniques de biorécepteurs sur une surface [63].

Afin de palier les limites de l'adsorption directe de biorécepteurs sur une surface, des procédures d'immobilisation par liaisons covalentes ont été développées et que nous détaillons ci-après

B- Accrochage covalent des biorécepteurs

L'accroche de biorécepteurs à la surface d'un transducteur par la formation de liaisons covalentes a été investiguée dans de nombreux domaines et pour de nombreuses surfaces. Plusieurs avantages ont motivé cette recherche. Tout d'abord, il a été montré que cette méthode ne dénaturait pas les propriétés de reconnaissance spécifique des biorécepteurs [64]. Ensuite, la réalisation de l'accroche covalente ne peut en général pas se faire directement sur le substrat et nécessite la fonctionnalisation des surfaces avec des molécules chimiques. Les procédés accompagnant cette fonctionnalisation permettent un plus grand contrôle de l'uniformité des biorécepteurs immobilisés.

Enfin, la force des liaisons covalentes confère une résistance à l'accroche des biorécepteurs pour des conditions physico-chimiques très variables (e.g. brusques variations de pH ou de température) [65].

Cette méthode retiendra notre attention en ceci qu'elle est adaptée au greffage des biorécepteurs d'affinité que sont les anticorps. Ces derniers possèdent de nombreux groupes fonctionnels de type amine et carboxyle qui ne sont pas essentiels au processus de biorecognition spécifique et qui peuvent donc être sollicités chimiquement pour réaliser l'accroche de l'anticorps à la surface. La variété de groupes fonctionnels potentiellement utilisables conjuguée à la grande diversité de surfaces fonctionnalisables a favorisé le développement de très nombreuses méthodes chimiques pour le greffage covalent de biorécepteurs. L'ensemble de ces procédés forme une « bibliothèque » de ressources biochimiques dans laquelle il convient de choisir le procédé le plus adapté à l'application visée. La description de l'ensemble de ces procédés ne faisant pas partie intégrante de cette étude, nous procéderons à une description des procédés les plus répandus permettant de greffer des biorécepteurs, sur l'or et le verre, substrats les plus communs dans le cas de biocapteurs.

Accroche covalente sur l'or

L'accroche covalente de biorécepteurs sur des surfaces d'or est très utilisée pour les biocapteurs car la couche biologique sensible générée par la méthode d'immobilisation correspondante possède des caractéristiques cruciales pour une bonne reconnaissance biologique. La principale méthode de fonctionnalisation passe par l'usage de molécules « thiols ». Ces molécules sont composées d'une base thiol, d'un bras espaceur (chaîne carbonée du groupe alkyl, $-CH_2$) et d'un groupement fonctionnel pouvant varier. Le principal intérêt de ces molécules est de former, suivant une chimie rapide en présence de solvants polaires, une monocouche auto-assemblée (SAM, Self-Assembled Monolayer). Cette monocouche permet via l'activation de ses groupements fonctionnels de greffer de manière covalente des biorécepteurs avec un très bon contrôle de l'uniformité de la couche sensible résultante [66]. L'adsorption des molécules « thiols » sur la surface d'or est régie par la formation de ponts or-thiol selon la réaction chimique suivante :



L'uniformité de la couche auto-assemblée limite considérablement les interactions non-spécifiques pouvant survenir entre la surface et les analytes présents en solution. Cependant, les chaînes carbonées composant les molécules thiols sont hydrophobes et sont à même d'être engagées dans des interactions non-spécifiques. Une méthode permettant de réduire l'occurrence d'interactions non spécifiques repose sur le choix du groupement terminal des molécules formant la monocouche auto-assemblée. Les groupements de type carboxyliques ($-COOH$) ou amines ($-NH_2$) sont communément utilisés pour le greffage des biorécepteurs, ils induisent néanmoins des taux d'interactions spécifiques relativement élevés. Une étude sur l'adsorption non spécifique d'immunoglobulines humaines a montré que l'utilisation de groupements hydroxyles ($-OH$) aboutit à des niveaux d'interaction non spécifiques bien moindres [67]. Des résultats encore plus probants ont été obtenus en intégrant des chaînes polyéthylène glycol (PEG) à la structure du bras espaceur en plus des fonctions alkyles. Comme nous l'avons vu, les interactions non-spécifiques sont pour une grande partie le fait de forces hydrophobe-hydrophobe, le caractère très hydrophile des chaînes PEG a permis d'atteindre des niveaux d'interactions non spécifiques divisés d'un facteur dix. Néanmoins, il persiste toujours un certain taux d'interactions non-spécifiques [68].

La modularité de la structure biologique et l'uniformité de la couche déposée, conjuguées à la facilité de mise en œuvre, font de l'immobilisation covalente de biorécepteurs sur une surface d'or via l'emploi d'une monocouche auto-assemblée une méthode très intéressante.

Accroche covalente sur le verre

Nous exposons ici la méthode la plus répandue pour l'immobilisation covalente de biorécepteurs sur une surface de type verre ou assimilé (dioxyde de silicium). L'usage de monocouches auto-assemblées a été démontré également pour ce type de matériaux. Le traitement sous phase vapeur d'une surface de verre par des molécules silanes entraîne sous certaines conditions [69] la formation d'une monocouche permettant ensuite le greffage des biorécepteurs. Les silanes communément employés sont de deux types : chlorosilanes ou alkoxy-silanes ; là encore ces deux molécules sont composées d'un bras espaceur formé de radicaux libres de type alkyls (-CH₃) et d'un groupement fonctionnel en plus de leur base silane. Les différentes molécules utilisées sont disponibles avec différents groupements fonctionnels. Principalement, des groupements amines sont utilisés pour l'accroche covalente des biorécepteurs (silanes 3-aminopropyltriéthoxysilane, ou APTES) et des groupements hydroxyles sont employés pour la prévention des interactions non-spécifiques (silanes n-octadecyltrichlorosilane, ou OTS). L'adsorption de ces molécules s'effectue via les fonctions hydroxyles de la surface. Les conditions de dépôt de la monocouche auto-assemblée sont plus exigeantes et moins contrôlables que dans le cas de l'or fonctionnalisé par des molécules « thiols ». Cependant pour toute une partie des biocapteurs à transduction optique, la transparence des matériaux utilisés (par exemple la section d'une fibre optique [70]) est obligatoire, l'utilisation d'or étant ainsi disqualifiée.

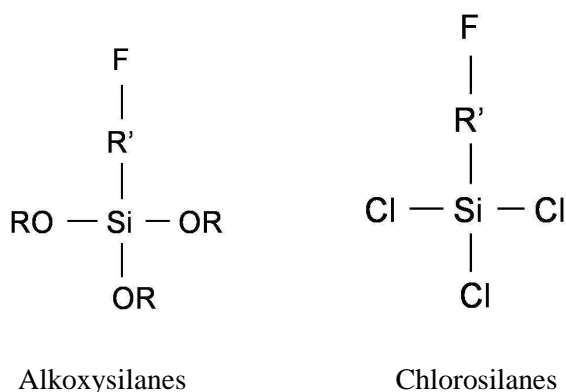


Figure 1.6 : Structure chimique de deux types de silanes communément utilisés pour l'immobilisation covalente de biorécepteurs sur des substrats de verre. R et R' sont des radicaux libres et F représente le groupement fonctionnel.

Un des principaux défauts de la méthode d'immobilisation via une monocouche à base de silanes consiste en la faible longueur de leur bras espaceur. En effet, l'interaction chimique structurant la monocouche implique une proximité atomique des radicaux libres trop grande pour permettre une juxtaposition et un ordonnancement parfait de longs bras espaceurs parallèles. L'uniformité de la monocouche auto-assemblée est parfaite lorsque les molécules de silane arborent un bras espaceur

d'une longueur de 3 carbones. Cette longueur étant trop faible pour avoir un effet significatif sur la réduction des interactions non-spécifiques, des molécules à base silanes avec des bras espaceurs longs ont été utilisées (par exemple le bras espaceur du silane OTS a une longueur de 17 carbones) avec des résultats positifs. Néanmoins, comme expliqué précédemment, avec une telle taille de radicaux libres, il n'est pas possible d'obtenir une monocouche auto-assemblée parfaitement arrangée. Il y a donc pour chaque application un compromis à trouver entre l'uniformité de la monocouche (donc sa solidarisation avec la surface) et le taux d'interactions non spécifiques [71].

Accroche covalente sur polymères

Les techniques d'accroche covalente sur polymères font l'objet d'un intérêt tout particulier dans le monde des biocapteurs. Les polymères constituent des matériaux résistants et faible coût. De plus, qu'ils soient synthétiques ou naturels ils peuvent être modifiés facilement afin de diversifier leurs propriétés ou de coller au mieux aux exigences de l'application visée. Leur bonne intégration aux structures silicium ouvre la porte à une nouvelle manière de concevoir les instruments de traitement biologique miniaturisés allant au delà de la simple détection. Ces dispositifs novateurs sont regroupés sous l'appellation de microSystèmes d'Analyse Totale (μ TAS) [72] [73].

Parmi les polymères naturels les plus utilisés dans les applications de biocapteurs, citons l'agarrose, la cellulose et les sucres dextran. L'extrémité de leur structure est souvent composée de sucres autorisant l'accroche sur la surface mais ils possèdent également certains groupements fonctionnels permettant l'accroche covalente de biorécepteurs. Ces polymères sont caractérisés par leur grande hydrophilicité. Ce caractère est dû à la prédominance des groupes hydroxyles (-OH) au sein de leur structure chimique. Ceci leur confère la capacité de ne générer que très peu d'interactions non-spécifiques et ceci même pour des milieux biologiques denses et complexes tels que les sérums [74].

Parmi les polymères de synthèses les plus utilisés, il convient de citer les polymères basés sur des chaînes de lysines. Les poly-L-lysines ont été particulièrement étudiés pour leur grande capacité d'adsorption [75], cependant cette propriété avait pour corollaire un haut niveau d'interaction non-spécifique. Des études faisant état d'une incorporation d'une chaîne poly(éthylène glycol) (PEG) au sein de la structure poly-L-lysine ont permis de combiner l'excellent pouvoir d'adsorption et un effet de limitation des interactions non spécifiques au sein d'une nouvelle molécule prometteuse (PLL-g-PEG) en terme de passivation de surface [76] mais également en terme de greffage covalent de biorécepteurs [77].

En conclusion, il nous faut mettre en exergue la grande variété de solutions disponibles pour assurer le greffage covalent de biorécepteurs à la surface d'un transducteur. En fonction du principe de transduction retenu, de la surface du transducteur et de l'application visée, il convient de sélectionner avec précision la méthode la plus adaptée. Globalement, même si de grandes disparités de performances existent entre les différentes méthodes, l'accroche covalente de biorécepteurs permet d'obtenir une couche biologique sensible pertinente pour une bonne reconnaissance biologique. Les recherches et les développements futurs se feront sur un plus grand contrôle de l'orientation des biorécepteurs (paramètre d'une grande influence sur la biorecognition) et sur la limitation des interactions non spécifiques. En effet, l'importance de ces interactions est liée directement à la limite de détection (LOD, définition dans le paragraphe suivant) du capteur par rapport à un analyte ciblé

[78]. Cette considération est au cœur des travaux de Hucknall *et al* qui proposent un nouveau type de fonctionnalisation de surface verre et assimilés qui est basée sur une sur-fonctionnalisation de couche auto-assemblée d'alkanethiols par des peignes déployant latéralement des longues chaînes hydrophobes. Cette toute dernière chimie de passivation, dénommée Poly(OEGMA), présente des taux records de résistance à l'adsorption non-spécifique de protéines pour des milieux biologiques complexes tels que le sang [79].

I.2.1.4. Méthodes de transduction

L'élément transducteur d'un biocapteur est indispensable à la conversion d'un événement de reconnaissance biologique (par la couche sensible) en un signal physiquement mesurable et interprétable via une amplification et/ou une interface dédiée. Les performances d'un transducteur sont définies à travers deux notions fondamentales : sa spécificité et sa sensibilité. On introduit la spécificité d'un transducteur comme la relative facilité de génération/différenciation entre un signal lié à un événement de reconnaissance biologique et un signal lié à tout autre événement extérieur (changement de conditions de pression ou de température, accrochage d'un élément non biologique ou accroche d'un élément biologique autre que celui visé). D'autre part, on introduit la sensibilité du transducteur comme l'intensité du signal délivré pour un événement unique de reconnaissance biologique. Cette grandeur prendra diverses dimensions physiques en fonction du principe de transduction. Si la sensibilité d'un transducteur est une donnée fondamentale de celui-ci, elle est toujours associée à la quantité biologique appelée limite de détection (LOD pour « Limit Of Detection »). Cette limite correspond à la plus petite quantité d'analyte cible que le biocapteur sera à même de détecter. La LOD prend donc en compte à la fois la sensibilité du transducteur et le niveau de bruit du signal utile dans lequel interviendra cette détection. Si le signal utile du transducteur possède un niveau de bruit équivalent en intensité à la variation de signal que provoquerait le greffage d'une certaine quantité d'analyte, alors le biocapteur ne pourra que détecter au mieux le greffage d'une quantité d'analyte supérieure, définissant ainsi une limite d'utilisation intrinsèque au biocapteur.

Parmi les méthodes de transduction, notamment dans la catégorie des principes de transduction optique, certaines nécessitent le marquage des analytes ciblés avec des espèces chimiques ou biochimiques aux propriétés permettant la transduction. La principale représentante de ces méthodes est la détection par marquage des analytes avec des fluorophores. L'intérêt principal des méthodes de détection avec marquage est leur potentialité à offrir des limites de détection proches de la molécule ou du virus unique [80]. Les désavantages principaux sont l'altération des caractéristiques de reconnaissance spécifique des biorécepteurs, l'ajout d'un marqueur ayant effectivement une influence sur les forces de liaison mises en jeu dans la liaison antigène/anticorps [81], ainsi que la nécessaire préparation de l'échantillon à traiter avant la détection afin de réaliser ledit marquage.

Dans le cadre de cette thèse nous nous intéressons à l'ensemble des solutions réalisant la reconnaissance d'AGB selon le principe « détecter-pour-protéger » (ou pour alerter). Les dernières considérations devraient donc logiquement nous pousser à nous restreindre au cas des biocapteurs sans-marquage. Cependant, depuis des temps récents, les progrès réalisés dans la miniaturisation des procédés de transduction optique par fluorescence ainsi que les méthodes d'amplification localisée de l'intensité du signal issu de fluorophore ont rendu caduque cette restriction, tout particulièrement dans le domaine des biocapteurs appliqués à la défense biologique [55]. Ainsi, de nombreux exemples de biocapteurs fonctionnant sur un principe de transduction optique nécessitant le marquage des analytes

par des fluorophores ont montré des performances en termes de maniabilité, miniaturisation et temps de détection considérables. Ces récents développements conjugués à une forte sensibilité ont introduit avec force ces biocapteurs avec marquage dans la catégorie des biocapteurs pour la défense biologique dits « détecter-pour-protéger ». Nous décrivons donc les principes de transduction de ces biocapteurs à l'aune de leurs performances en se référant à des travaux précis, au même titre que ceux des biocapteurs sans marquage.

A- Transduction optique

Historiquement, un des premiers principes de transduction optique développé pour des applications biologiques fut la transduction par fluorescence [82]. Dans cette méthode, les analytes se greffant à la surface du biocapteur sont marqués par des fluorophores émettant de la lumière à une longueur d'onde caractéristique. Traditionnellement, un utilisateur réalisant l'observation de ces signaux lumineux était à même de détecter ou non la détection spécifique du biocapteur. Ce principe, souffrant d'un encombrement considérable, a néanmoins été adapté afin de réaliser de nombreux tests en parallèle. Une illustration de cette amélioration réside dans les formidables progrès en termes de multiplexage des biodétections offert par les puces à ADN [83].

Les conditions nécessaires à la réalisation pratique de tels tests sont de plusieurs natures. Tout d'abord, il faut pouvoir assurer la distribution des échantillons et des produits de marquage ou de rinçage selon un ordre déterminé. Dans cette optique, de nombreux biocapteurs par fluorescence s'appuient sur des structures microfluidiques réalisant le transport efficace des échantillons nécessaires. Les travaux de Taitt *et al* [84] présentent une structure miniaturisée composée d'un circuit d'adressage microfluidique en PDMS (Polydimethylsiloxane), d'un guide d'onde plan fonctionnalisé par des anticorps spécifiques et d'une caméra CCD, permettant la réalisation pour un volume d'encombrement très réduit des tests de reconnaissance biologique multiples. Afin de limiter au minimum les étapes de rinçage nécessaires à l'évacuation des fluorophores non greffés à la surface du biocapteur, cette étude présente un usage particulier de fibres optiques, déjà largement employées pour des applications de diagnostic ou de séquençages de l'ADN en microbiologie clinique [85]. L'analyte se fixe via des anticorps immobilisés sur la tranche de fibres optiques conçues de manière à émettre une onde évanescente. D'autres anticorps marqués par des fluorophores viennent ensuite réaliser le « sandwich » immunologique. L'usage de l'onde évanescente permet d'exciter uniquement la fluorescence des fluorophores présents à la surface de la fibre optique donc greffés de manière spécifique aux biorécepteurs. La détection de trois toxines en parallèle est reportée pour des concentrations minimales de l'ordre du *ng/mL* et des temps de réponse de l'ordre de la dizaine de minutes [84]. Cette technique basée sur l'excitation localisée de fluorophores via l'onde évanescente émanant d'un guide d'onde planaire se généralise maintenant sous le terme fluorimétrie par réflexion interne totale (TIRF). Cette technique fait l'objet depuis quelques années de nombreux efforts de recherche [86] [87] [88] et a donné lieu à la commercialisation d'un système de détection d'AGB dénommé RAPTOR (Research International, Woodinville, WA, USA). Ce système, combinant fluorescence et multiplexage des capteurs à fibres optiques permet de détecter de nombreux AGB (tels l'entérotoxine B du staphylocoque mais bien d'autres tels *Bacillus anthracis* et *Francisella tularensis*) [89]. D'autres techniques de biodétection à transduction optique avec marquage utilisant des points quantiques (Quantum dot) à la place de fluorophores sont reportées [90].

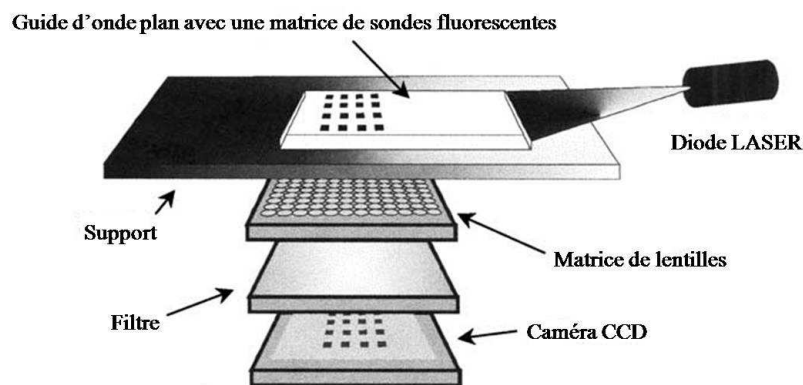


Figure 1.7 : Schéma de principe du biocapteur développé par Taitt *et al*, un guide d'onde générant une onde évanescente permettant de concentrer l'excitation de la fluorescence dans son voisinage. Le signal de fluorescence est lu grâce à une caméra CCD.

Grâce à des améliorations constantes, d'excellentes applications commerciales ont été développées pour la détection d'AGB par des techniques de marquage, avec de bonnes performances. Pour autant, certains obstacles inhérents à la technologie de détection avec marquage ne peuvent être dépassés. Ainsi, le traitement des échantillons par des réactifs particuliers permettant le marquage des antigènes implique le plus souvent une maintenance essentielle et répétée. De par ce coût élevé en maintenance et le (toujours fréquent) recours à un opérateur pour l'interprétation des résultats, ces biocapteurs ne constituent pas de bons candidats pour un déploiement massif destiné à la surveillance automatisée et redondante de lieux publics et de troupes.

D'autres techniques de transduction optique ne nécessitent pas un marquage des antigènes. Ces techniques utilisent principalement la modification de conditions physiques à la surface du transducteur (variation d'épaisseur, d'indice optique) pour fournir des informations qualitatives et quantitatives sur la réaction de reconnaissance biologique. Certaines de ces techniques ont été déployées pour la caractérisation physique de matériaux et ont été modifiées ensuite pour rendre compte de changements physiques induits par des modifications biologiques. A titre d'exemple, on peut signaler les travaux de Striebel qui, en 1995, détecte une reconnaissance biologique de type antigène/anticorps en mesurant par ellipsométrie la différence d'épaisseur entre l'adsorption simple des antigènes sur la surface et la formation de couples antigène/anticorps [91].

Parmi l'ensemble de ces techniques, l'une d'entre elle mérite d'être mise en avant, eu égard aux nombreuses publications scientifiques et applications commerciales dont elle est le point de départ ; il s'agit de la résonance plasmonique de surface (SPR). Découverte au cours des années 1970, cette technique s'est révélée très attractive comme méthode de transduction pour le suivi d'interactions biologiques grâce aux travaux de Liedberg sur la détection de biomolécules en 1982 [92]. Suite à quoi, les avancées technologiques en optique et en fonctionnalisation de surfaces ont permis à la SPR de s'imposer (notamment en couplage avec les biorécepteurs d'affinité) comme une technique très puissante permettant le suivi quantitatif, de haute précision et en temps réel de plusieurs interactions biologiques en parallèle.

La description des phénomènes physiques à l'œuvre au sein de la transduction par SPR n'entre pas dans le cadre de cette étude, cependant certaines études complètes existent [93] [94] et il nous est possible d'en tracer une rapide description. Dans cette technique, une onde incidente frappe une interface diélectrique-métal conducteur (le plus souvent verre-or) avec un angle d'incidence satisfaisant les conditions de réflexion totale décrites par les lois de Descartes. Sous ces conditions, une onde évanescence est générée dans le métal conducteur avec une longueur d'onde égale à celle de la lumière incidente. La pénétration de l'onde évanescence dans le matériau conducteur provoque la création d'une onde électromagnétique basée sur la génération de plasmons et se propageant sur la face opposée du matériau. Cette onde plasmonique se propage selon un vecteur d'onde dépendant de l'indice de réfraction du milieu. Sous la condition d'égalité des vecteurs d'onde entre cette onde dite plasmonique et l'onde incidente, un phénomène dit d'absorption résonante de l'énergie de l'onde incidente par l'onde plasmonique se produit induisant une onde réfléchi très fortement atténuée. Le vecteur d'onde de l'onde plasmonique dépend principalement de l'épaisseur du matériau conducteur et de l'indice de réfraction à l'interface or/canal. Le vecteur d'onde de l'onde incidente dépend quant à lui de l'angle d'incidence et de la longueur d'onde. Cette dernière donnée restant invariante, l'onde réfléchi très atténuée par le phénomène d'absorption résonante d'énergie se produit pour un certain angle de réflexion.

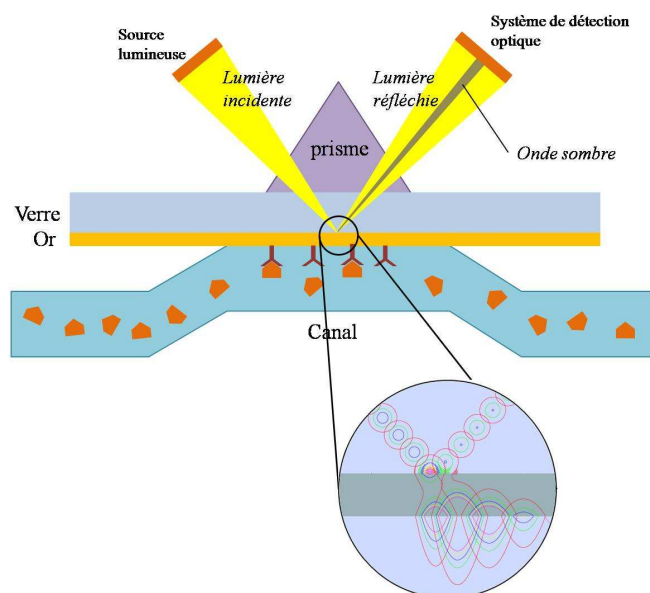


Figure 1.8 : Principe de la résonance plasmonique de surface

La transduction d'interactions biologiques par ce principe s'effectue via une variation d'indice optique localisée à la surface du transducteur. Une augmentation de concentration à la surface, résultant par exemple de l'accroche d'antigènes sur leurs immunoglobulines spécifiques se traduit par une assez forte modification de l'indice optique à l'interface transducteur/milieu biologique. Cette modification d'indice optique s'équilibre par une modification de l'angle de l'onde incidente permettant la réalisation de la résonance plasmonique de surface. Cela se traduit donc par une variation de l'angle de l'onde sombre réfléchi correspondant au phénomène d'absorption résonante d'énergie. Les progrès considérables en matière de miniaturisation et d'intégration d'instruments de détection optique permettent de suivre les variations de l'angle de l'onde sombre réfléchi à une précision de l'ordre du millièrme de degré. L'obtention de la résonance plasmonique de surface à l'interface du transducteur nécessitant des variations très précises des propriétés optiques, cette

méthode de transduction se révèle capable de traduire l'avancement de réaction biologique avec une grande sensibilité.

Ce fort potentiel a été exploité avec succès par la société suédoise Biacore qui fournit des solutions de suivi de plusieurs réactions biologiques en temps réel, sans marquage et en parallèle [95]. Les performances des appareils commercialisés par la société Biacore en font des techniques de biorecognition fortement sensibles : une variation d'un millidegré de l'angle de l'onde réfléchie traduit un changement de concentration surfacique de l'ordre de 1 pg/mm^2 . Ces performances ont permis aux appareils de cette société de devenir des appareils de référence utilisés par de nombreuses équipes pour valider des protocoles de bio-fonctionnalisation/détection [96]. Parallèlement aux développements de ces instruments de laboratoire, plusieurs travaux ont mis à jour l'utilisation des techniques SPR pour la mise au point de solutions portables miniaturisées d'agents pathogènes simulant la menace. La commercialisation réussie du capteur *Spreeta* 2000 (Texas Instruments Inc., Dallas, TX) découle de ce travail de recherche. Ce capteur est basé sur des cellules SPR jetables réalisant la détection une fois insérées au sein d'un dock de lecture des résultats [97]. La détection de l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* est rapportée pour des concentrations de l'ordre du femtomolaire [98].

Malgré l'ensemble des performances décrites, il convient de noter certaines limitations à l'utilisation et au développement de capteurs basés sur la résonance plasmonique de surface. Tout d'abord, les biocapteurs utilisant la SPR ne peuvent être réduits en dessous d'une certaine taille critique déterminée par la taille minimale de l'ensemble des composants optiques nécessaires. Ce dimensionnement limite actuellement le développement de solutions commerciales de détection d'AGB par SPR complètement intégrées, portables et automatisées. Le deuxième facteur limitant est lié au coût de l'ensemble des composants optiques rendant le prix de tels capteurs incompatible avec une distribution massive. Enfin, le phénomène de SPR nécessite l'usage d'un matériau noble (en général l'or) ce qui limite de fait le choix de méthode d'immobilisation des biorécepteurs.

B- Transduction électrochimique.

Historiquement, et de par la facilité de leur mise en œuvre, les transducteurs électrochimiques furent ceux qui équipèrent les premiers biocapteurs. Leur principe repose sur la mesure électrochimique d'un signal direct ou indirect issu de la reconnaissance biologique. Ce signal est en général lié à l'action de biorécepteurs catalytiques de type enzymatiques. Il y a trois méthodes de transduction électrochimique : la méthode ampérométrique, la méthode potentiométrique et la méthode conductimétrique. De par leur simplicité générale de mise en œuvre, ces trois méthodes de transduction sont au centre d'une activité de recherche florissante se traduisant par une multitude de solutions différentes. La description de l'ensemble des techniques développées n'entre pas dans le cadre de cette étude. Ainsi, après avoir décrit le principe de chacune des méthodes, nous aborderons brièvement un exemple lié à la détection d'AGB ainsi qu'une application commerciale. Soulignons néanmoins que l'ensemble de ces méthodes se caractérise par un faible coût de mise en œuvre, une adaptation à la fabrication de masse, une grande sensibilité et un faible besoin en énergie électrique pour fonctionner. Toutes ces raisons font des biocapteurs à transduction électrochimique d'excellents candidats pour des systèmes de détection d'AGB hautement intégrés et facilement transportables.

La transduction ampérométrique se base le plus souvent sur la mesure d'un courant entre une électrode de mesure et une électrode de référence, induit via une réaction d'oxydoréduction. Cette

réaction est directement ou indirectement la conséquence de la biorecognition. Dans cette optique, l'utilisation d'anticorps couplés avec des enzymes est fréquente [99], l'anticorps effectuant la fixation spécifique de l'antigène, l'enzyme opérant la génération d'électrons à la source du courant induit.

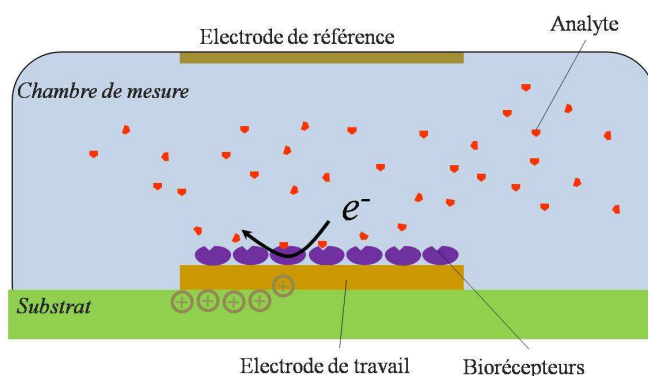


Figure 1.9: Schéma descriptif du principe d'une transduction ampérométrique. Ici, la mesure s'effectue en mesurant le courant électrique entre les deux électrodes.

De nombreux appareils commerciaux permettant de mesurer des courants allant jusqu'à la centaine de nanoAmpères, les méthodes ampérométriques se caractérisent par une grande sensibilité et une capacité limite de détection de faibles quantités d'analytes. Ainsi grâce à des anticorps marqués par la peroxydase, Skládal et son équipe rapportent en 2005 la mesure d'un courant électrique associé à la biorecognition de la bactérie *Francisella tularensis* pour une concentration limite de 100 UFC/ml [100]. La même année, un article de Rao *et al* décrit la détection de *Salmonella typhii* directement dans des échantillons de sérum humain attestant ici d'une caractéristique importante de la transduction ampérométrique: une forte sensibilité maintenue indépendamment de la turbidité du milieu [101].

En ce qui concerne le champ d'application des biocapteurs à transduction ampérométrique, le domaine clinique a vu apparaître de nombreuses solutions commerciales notamment pour la détection du glucose sanguin [102]. Ce n'est pas le cas cependant de la détection d'agents liés à la menace biologique pour laquelle peu d'applications commerciales ont vu le jour. Citons néanmoins la société Biosensori S.p.A. (Genova, Italie) appartenant au groupe Sartorius AG (Göttingen, Allemagne) qui produit le biocapteur MiDas-Pro capable de détecter en 20 min plusieurs espèces de bactéries pathogènes dans l'eau [103].

Le deuxième principe de transduction électrochimique fréquemment employé est la transduction potentiométrique. Cette méthode se base sur la mesure d'une différence de potentiels entre une électrode de référence et une électrode de mesure. La différence de potentiels est créée à l'électrode de mesure par la présence ou la génération d'ions associés à une reconnaissance biologique ou bien encore par la présence de biomolécules chargées. Là encore, le couplage avec des anticorps marqués par une enzyme a montré de bonnes performances. Les biocapteurs à transduction potentiométrique prennent le plus souvent la forme d'une électrode à ion sélectif ou d'un Transistor à Effet de Champ à Ion Sélectif (ISFET)

Pour illustrer la première technique, citons le cas des capteurs potentiométriques adressables par un flux lumineux ou LAPS (ou Light Addressable Potentiometric Sensor). Ce biocapteur est basé sur des hétérostructures à base de silicium, d'oxyde de silicium et de nitrure de silicium possédant la propriété de devenir sensibles aux variations d'interface de force ionique uniquement lorsqu'elles sont illuminées par une diode électroluminescente. Là encore, un couplage avec des catalyseurs enzymatiques permet la détection d'agents biologiques via le suivi du pH. Ercole rapporte la détection de souches d'*Escherichia coli* grâce à des anticorps spécifiques marqués par l'uréase [104]. Des limites de détection de l'ordre 100 UFC/ml en 1,5 heure ont été rapportées avec cette technique pour des sources pathogènes d'*Escherichia coli*. Une version commerciale proposant huit capteurs LAPS multiplexés est produite par la société Smith Detection (Warrington, Royaume-Uni) avec des performances de détection de 10^3 UFC/mL pour *Bacillus anthracis* et de 0,1 ng/mL pour la toxine botulique [105].



Figure 1.10 : Photographie de huit capteurs LAPS multiplexés (courtoisie de Pohanka)

Le principe définissant la deuxième technique se base sur la fabrication de transistors à effet de champ dont la grille est constituée d'un matériau sensible à un changement de force ionique à son interface. L'utilisation de matériaux particuliers tels le nitrure de silicium [106], le pentaoxyde de tantale [107] ou plus récemment le trioxyde de tungstène [108] peuvent être utilisés pour des applications de mesure du pH. Cette technique a permis la détection de bactéries simulant la menace également grâce au couplage d'anticorps avec des biorécepteurs enzymatiques générant l'acidification du milieu [109].

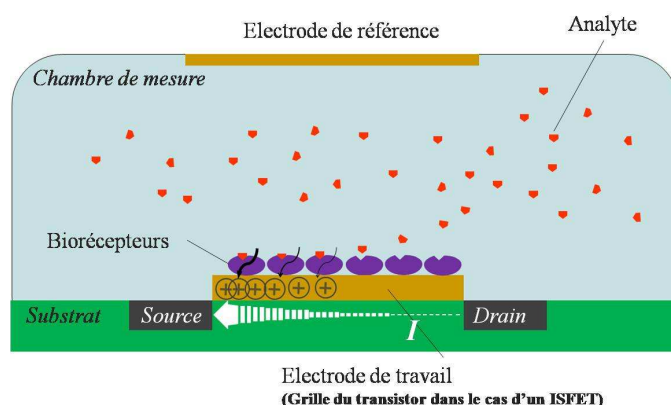


Figure 1.11 : Schéma descriptif du principe d'une transduction potentiométrique. Ici, il s'agit d'une transduction basée sur un transistor à effet de champ à ion sélectif (ISFET), dans ce cas précis la variation du potentiel de l'électrode est mesurée via la variation du courant drain-source. Dans le cas d'une électrode à ion sélectif, le potentiel est directement mesuré par voltamétrie entre les deux électrodes (travail et référence).

L'apport de la miniaturisation des composants de la microélectronique a ouvert la voie au développement de biocapteurs IsFET ultra-sensibles. Les progrès dans la production et la manipulation de nano-objets (en particulier de nanofils semi-conducteurs) ont généré des applications prometteuses. L'équipe de Lieber a ainsi démontré l'utilisation d'un nanofil de silicium dopé P comme grille d'un IsFET nanométrique [110]. Ces dispositifs ont permis de repousser les limites de détection des virus [111].

Les transducteurs conductimétriques représentent la dernière catégorie de transducteurs électrochimiques régulièrement employés. Leur principe est basé sur la mesure de variations d'impédances électriques entre deux électrodes. Cette méthode leur confère une grande facilité de mise en place puisque ne nécessitant pas d'électrodes de référence, comme le montre la figure 1.12

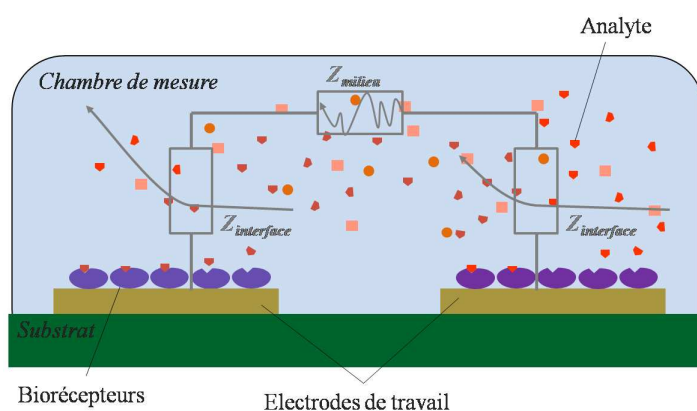


Figure 1.12: Schéma descriptif du principe d'une transduction conductimétrique. Ici, la mesure s'effectue en mesurant l'impédance entre les deux électrodes de travail. Le sens de variation des impédances d'interfaces en fonction de la quantité de couples biorécepteurs/analytes a été choisi arbitrairement.

Les variations d'impédances peuvent survenir à l'interface des électrodes mais également au sein du volume entre les électrodes. Cette dualité peut être un avantage ou un inconvénient selon qu'elle est recherchée ou rejetée.

Lorsqu'on cherche à rejeter cette dualité pour étudier des effets de reconnaissance biologique localisée à l'interface des électrodes, une technique employée peut être de confiner les biorécepteurs au sein de membranes ou de films de type Langmuir-Blodgett afin de limiter les interactions biologiques à une zone précise, permettant ainsi de négliger les variations de l'impédance à travers le volume du milieu réactionnel [112]. A l'inverse, lorsque les interactions biologiques sont libres d'intervenir à tout endroit de la chambre de réaction, il est possible d'obtenir plusieurs informations en simultané sur des organismes biologiques évoluant au sein de la chambre, notamment grâce à la combinaison de plusieurs types de transductions électrochimique : par exemple, conductimétrie et ampèrométrie pour la détection d'*Escherichia coli* et le suivi de composés biologiques liés à son activité [113].

C- Transduction mécanique.

Les principales méthodes de transduction mécanique employées jusqu'aux dernières années se basent sur l'utilisation d'ondes mécaniques ou acoustiques. Le principe de biodétection utilisant la transduction mécanique implique une localisation de la propagation de l'onde au travers ou à la surface d'un matériau. Le site de la reconnaissance biologique se situe sur le passage de l'onde. Un changement de propriétés mécaniques, induit par la réaction biologique, sur le trajet de l'onde implique une perturbation des caractéristiques de celles-ci (vitesse ou amplitude). La mesure des perturbations via l'analyse de spectres en fréquence ou le suivi d'amplitude de vibration permet de quantifier les informations souhaitées sur la reconnaissance biologique. Les changements de propriétés mécaniques évalués par cette méthode sont majoritairement des variations de masse, cependant certains transducteurs mécaniques sont conçus pour exhiber une plus grande sensibilité aux variations d'états de contrainte mécanique.

En ce qui concerne les solutions techniques permettant de générer et détecter les ondes nécessaires à une transduction mécanique, les matériaux piézoélectriques se sont révélés d'exceptionnels candidats. Découverte vers la fin du 19^{ème} siècle par Pierre et Jacques Curie, la piézoélectricité n'a cessé depuis de susciter un intérêt croissant. Le principal avantage de ce phénomène réside dans sa réversibilité. En effet, ce qui est communément appelé « effet piézoélectrique direct » traduit la capacité d'un matériau piézoélectrique à générer des charges électriques lorsque soumis à une contrainte mécanique, alors que l'« effet piézoélectrique indirect » traduit la capacité de ce même matériau à exhiber une déformation mécanique sous l'influence d'un champ électrique [114]. C'est cette formidable dualité qui a permis l'application de la piézoélectricité à de nombreux domaines, le plus célèbre et répandu étant les sondes à échographie dans lequel un matériau piézoélectrique joue le rôle d'actionneur de l'onde ultrasonique émise et en même temps de transducteur de l'onde réfléchie [115]. Plusieurs types de matériaux piézoélectriques ont pu être utilisés pour la conception de biocapteurs à transduction mécanique. Les plus répandus d'entre eux sont le quartz, l'oxyde de Zinc (ZnO) ou le zircono-titanate de plomb (PZT).

On dénombre de nombreux transducteurs mécaniques basés sur la propagation d'ondes acoustiques générées par des matériaux piézoélectriques. Notons à ce point de la description que la plupart d'entre eux utilisent une onde acoustique excitée à la fréquence de résonance du système {dispositif de génération- milieu de propagation –dispositif de détection}. Ainsi, l'analyse de spectre en fréquence constitue le plus souvent le moyen de suivre les perturbations de l'onde acoustique. Une perturbation de la vitesse de l'onde dans le milieu de propagation modifiera la fréquence de résonance, un amortissement de l'onde acoustique se traduira quant à lui par une diminution de l'amplitude de l'onde excitée à sa fréquence de résonance.

On classifie l'ensemble de ces transducteurs en fonction du mode de propagation de l'onde et également de la localisation de celle-ci à la surface ou dans le volume du matériau piézoélectrique. Si l'onde est confinée à l'interface du matériau avec le milieu réactionnel, les transducteurs sont dits à onde de surface ; si la propagation a lieu à travers le substrat, les transducteurs sont dits à ondes de volume. Pour chaque transducteur, le type d'onde et de propagation choisie est influencé par les conditions extérieures de différentes manières et il convient de choisir le type d'onde le plus adapté à un problème de reconnaissance biologique donné. Dans ce paragraphe, nous aborderons brièvement les transducteurs à onde acoustique de surface puis, par souci de synthèse, nous aborderons les transducteurs à ondes acoustiques de volume à travers le cas de la microbalance à quartz avec suivi de dissipation : la QCM-D.

L'exemple le plus répandu de transducteur à ondes acoustiques de surface est la transduction par des résonateurs SAW (Surface Acoustic Wave) et SH-SAW (Shear-Horizontal Surface Acoustic Wave). Ces deux principes diffèrent par la nature de l'onde de surface mise en jeu. Pour les SH-SAW, l'onde générée se propage en majeure partie suivant un mouvement de cisaillement horizontal. Ceci a pour conséquence de limiter la perte d'énergie due au mouvement du matériau piézoélectrique lorsqu'en contact avec un fluide et fait des transducteurs SH-SAW de bons candidats à l'utilisation en milieu liquide. Très récemment, les travaux de Bisoffi *et al* [116] rapportent l'utilisation de transducteurs SH-SAW basés sur un substrat piézoélectrique de Tantalate de lithium (LiTaO_3) pour la détection de souche de virus B4 Cocksackie et également de souche d'Hantavirus comme le Virus Sin Nombre (SNV). La détection spécifique de ces agents d'AGB est effectuée via le greffage à l'interface du milieu de propagation d'anticorps spécifiques aux espèces ciblées.

Les transducteurs à ondes acoustiques de surface de type SAW sont basés quant à eux sur une onde se propageant via un déplacement perpendiculaire à la surface. Ceci a pour avantage de confiner plus efficacement l'énergie de l'onde puisque les pertes dans le substrat sont limitées. Ce confinement permet aux transducteurs à ondes acoustiques de surface de type SAW d'être les transducteurs acoustiques les plus sensibles aux variations de masse [117]. Cependant le mode de déplacement de l'onde induit une forte compression de celle-ci lorsqu'elle vibre au sein d'un fluide. Ce désavantage crucial explique le fait que la plupart des études de biorecognition en milieu liquide se basent sur les transducteurs SH-SAW.

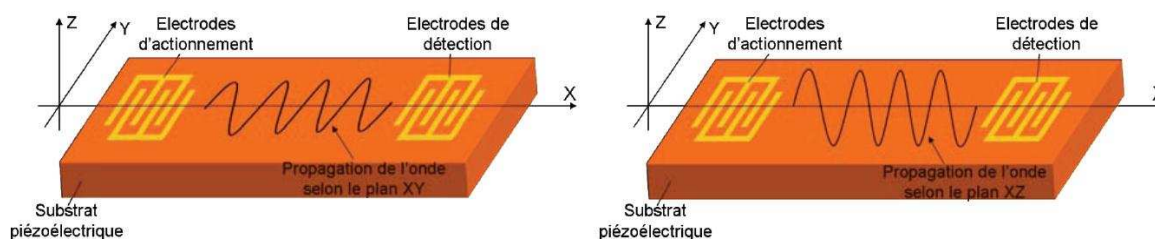


Figure 1.12 : Schéma descriptif du principe d'une transduction mécanique par Surface Acoustic Wave (SAW, à gauche) puis par Shear Horizontal Surface Acoustic Wave (SH-SAW, à droite)

Si la plupart des transducteurs à ondes acoustiques ont été développés de prime abord pour des opérations dans l'air ou le vide, l'intérêt croissant porté aux applications de reconnaissance biologique a rendu prépondérante la problématique d'amortissement de l'onde dans un milieu fluide. Comme vu précédemment, cette problématique a poussé en avant les transducteurs à ondes acoustiques à déplacement horizontal. Dans le cas des ondes volumiques, cette considération invite à se consacrer aux transducteurs à ondes TSM (pour « thickness shear mode »). En effet, ce type de transduction mécanique présente les plus grands avantages comparatifs pour le suivi de réaction biologique dans un milieu liquide. Ceci n'est pas démenti par le succès notoire des techniques de microbalance à quartz basés sur la mise en vibration TSM d'un cristal de quartz. Le capteur commercial correspondant est commercialisé par la société Q-sense (Göteborg, Suède) sous le nom de QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with dissipation monitoring) et s'est imposé comme instrument de référence pour le suivi d'interactions biologiques en milieu fluide, au même titre que la Résonance Plasmonique de Surface.

La contribution théorique majeure à la compréhension des transducteurs TSM dont fait partie la microbalance à quartz fut apportée par Sauerbrey qui démontra une relation linéaire entre la variation de masse à la surface du transducteur (Δm , kg) et la variation de la fréquence de résonance (Δf , kg) [118]. Cette relation s'écrit pour un quartz de la façon suivante:

$$\Delta m = \rho_f \delta_f = -\frac{t_q \rho_q}{nf} \Delta f = \frac{C_f}{n} \Delta f \quad (1.1)$$

Dans cette relation, ρ_f et δ_f sont respectivement la densité et l'épaisseur du film déposé à la surface du transducteur ; ρ_q et t_q sont respectivement la densité et l'épaisseur du quartz ; enfin, n représente le rang de l'harmonique concernée. Cette relation est valable sous deux conditions : la masse du film déposé est négligeable devant la masse du cristal de quartz, le film déposé doit être uniforme sur la surface et solidaire de celle-ci. La sensibilité massique C_f dépend uniquement des paramètres ρ_q et t_q , il s'agit donc d'un paramètre intrinsèque au système.

Les premières applications de la grande sensibilité offerte par la microbalance à quartz furent développées pour l'étude et le contrôle de la création de films minces de type oxydes à travers des processus de corrosion d'électrodes [119][120]. Dans ce cadre, les conditions de validation de l'équation de Sauerbrey sont entièrement satisfaites. Cependant, pour des applications de reconnaissance biologique, la couche biologique peut présenter des propriétés viscoélastiques telles que la vibration du quartz s'en trouve affectée. Les travaux datant de 1999 de Voivona *et al* présentent un cadre théorique analytique pour cette viscoélasticité des films biologiques déposés sur un quartz à ondes TSM [121]. Ce modèle traduit le fait que l'onde générée par le cisaillement du quartz subit un phénomène d'absorption d'énergie au niveau du film déposé. Cette perte d'énergie vibratoire au niveau du film biologique est appelée dissipation et est différente selon l'harmonique considérée. Le suivi de cette dissipation fournit des informations précieuses quant aux propriétés du film biologique déposé. En effet, la dissipation de l'onde de cisaillement du quartz lors de sa propagation dans le film mince biologique dépendra de plusieurs paramètres incluant la conformation physique des composants de la couche, la rugosité et la distribution de charge surfacique ou encore la quantité d'eau piégée au sein de la couche déposée. La figure 1.13 présente deux cas de mesures de dissipation différentes. Le système QCM-D effectue la mesure de la dissipation en observant la décroissance exponentielle de l'amplitude de vibration du quartz après ouverture du circuit d'excitation. Dans le cas d'un film mince très solidaire de la surface, la décroissance de l'onde sera lente, traduisant une faible dissipation d'énergie dans la couche biologique alors que dans le cas d'un échantillon aux caractéristiques viscoélastiques prononcées, la dissipation d'énergie sera forte et la décroissance de l'amplitude de vibration très rapide.

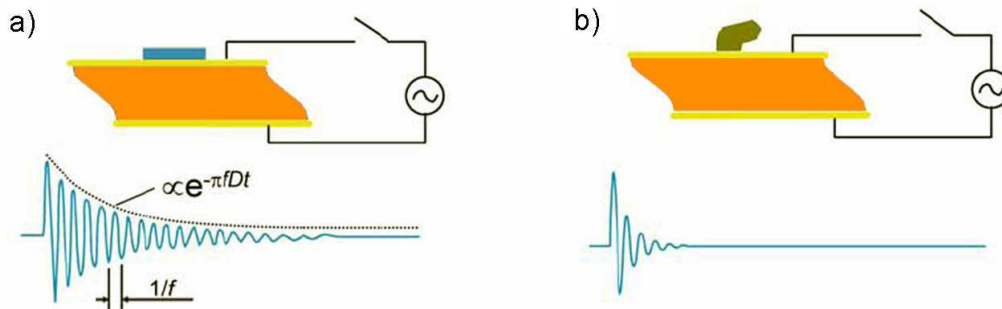


Figure 1.13 : Schéma descriptif du principe de la microbalance à quartz avec suivi de la dissipation (QCM-D) pour deux exemples : un substrat rigide est accroché à la surface, la vibration est faiblement amortie, un substrat dit souple, la vibration est rapidement amortie.

Cette dualité entre mesure de la fréquence de résonance et suivi de la dissipation, ajoutée à la possibilité de suivre des réactions très différentes sur de nombreuses surfaces, permet au système QCM-D d'être utilisé avec succès dans de nombreux domaines d'application allant du diagnostic précoce de marqueurs de cancer [122], à l'étude des propriétés d'adhésion des cellules [123] ou encore à l'analyse de colonies microbiennes [124]. La dualité de mesure de la QCM-D, permet en particulier des études sur le changement de conformation notamment de protéines qui seraient impossibles avec les techniques de résonance plasmonique de surface [125]. L'étude citée en référence conclut toutefois sur une complémentarité nécessaire de ces deux techniques.

Afin de bénéficier des avantages de la transduction mécanique par microbalance à quartz pour la détection d'AGB, de nombreuses équipes de recherche ont mis au point des capteurs microbalance à quartz personnalisés afin de pouvoir atteindre un plus grand niveau d'intégration, de portabilité ou de multiplexage des mesures. Citons dans le domaine de la biodétection d'AGB, les travaux de Hao *et al* [126] qui proposent un biocapteur couplant microbalance à quartz et récepteurs d'affinité pour détection de spores de *Bacillus anthracis*. Quatre types d'accroches des anticorps anti-*Bacillus anthracis* sont étudiés. C'est l'accroche des biorécepteurs via la pré-adsorption sur la surface d'une protéine appelée « protéine A » qui aboutit aux meilleurs résultats. Cette protéine combine la grande facilité d'adsorption des protéines sur surface d'or à la capacité de lier le fragment constant des immunoglobulines, assurant ainsi l'orientation optimale des sites de détection vers le milieu réactionnel. Cette méthode de greffage d'immunoglobulines a elle-même été développée grâce à des études sur microbalance à quartz [127]. Les LOD obtenues par Hao *et al* pour des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus* immobilisés par cette méthode sont de 10^3 spores/mL pour un temps de réponse de 30 min. Toujours articulée autour du couple QCM/biorécepteurs d'affinité, une récente étude a montré la détection de souches de virus de la grippe H1N1 avec un système de microbalance à quartz. Cette étude présente un cas peu traité dans le domaine des biocapteurs basés sur des récepteurs d'affinité à savoir la détection des souches de virus à partir d'un aérosol contenant au minimum 4.10^6 spores/m³ [128].

En résumé, les plateformes basées sur des microbalances à quartz ont montré leur potentiel dans l'étude de films biologiques souples ainsi qu'une grande versatilité d'usage. Dans le domaine des biocapteurs à microbalances visant la détection d'AGB, on dénombre toujours certaines limitations relatives, entre autres, à des seuils de détection moins avantageux qu'avec d'autres techniques et une plus grande difficulté dans le multiplexage massif.

I.2.2. Les bioMEMS : solution idoine à la problématique de bio-défense

I.2.2.1. Définition, avantages et inconvénients

Par définition, un microsystème est un système de taille micrométrique. Partant de ce cadre, Tous les systèmes électriques produits par l'avènement des techniques de micro-fabrication pour la

microélectronique constituent des microsystèmes. La définition des MicroSystèmes ElectroMécaniques (ou MEMS) se pose en restriction de celle des microsystèmes simples. Un MEMS est un microsystème incluant au moins une partie mécanique dans son fonctionnement, en plus des composantes électriques. Historiquement, le terme de MEMS est apparu au moment de l'introduction d'éléments mécaniques à des microsystèmes électriques. Ainsi, le premier MEMS désigné comme tel fut le transistor à grille résonnante développé par l'équipe de Nathanson en 1967 [129]. Dans cette application, un transistor à effet de champ de taille micrométrique est équipé d'une grille constituée d'une micro-poutre suspendue. La mise en résonance de la grille suspendue a une influence sur le potentiel de grille du transistor. Ce cas historique a l'avantage de lever l'ambiguïté entre les définitions de MEMS et de microsystème. Si le transistor à effet de champ classique de taille micrométrique constitue un microsystème (système électrique de taille micrométrique), il ne peut pas être qualifié de MEMS puisqu'il n'intègre aucune partie mécanique.

Les MEMS regroupent sur un même substrat des éléments de plusieurs types à savoir des éléments d'actionnement, des éléments de traitement de données et des capteurs. Cette synergie de plusieurs fonctions intégrées à un même ensemble confère aux MEMS depuis leur invention un pouvoir d'attraction fort pour la convergence de la biologie et des systèmes physiques miniaturisés. Les efforts de plus en plus importants dans le développement de solutions MEMS pour des applications biologiques ont justifié la création d'un sous ensemble appelé BioMEMS. Un BioMEMS est un système destiné à la modification, au traitement, au stockage, à la livraison ou bien encore à la détection d'entités biologiques basé sur des phénomènes d'actionnement et/ou de transductions électromécaniques. Là encore la même distinction s'impose entre BioMEMS et biomicrosystèmes, ainsi, par exemple, dans notre compréhension, un biocapteur à transduction ampérométrique ne peut constituer un BioMEMS puisqu'il ne fait intervenir aucun phénomène mécanique. Cette définition est plus restrictive que certaines définitions présentes dans la littérature [130] mais nous permet de restreindre dans les prochains paragraphes, l'étude des capteurs basés sur des BioMEMS à ceux utilisant un actionnement mécanique et/ou basés sur une transduction mécanique.

L'activité scientifique et technologique autour des bioMEMS et des bioNEMS (étant le pendant des bioMEMS à l'échelle nanométrique) s'est considérablement renforcée au cours des dix dernières années. Leurs performances en termes de miniaturisation, de faible coût de fabrication, de rapidité d'action et d'intégration les ont placés au centre de l'attention des scientifiques chargés de pourvoir des solutions performantes, massivement parallélisées, principalement aux biologistes et médecins. Les applications dans ces deux domaines sont florissantes et plusieurs revues gravitent autour de ces instruments, la revue *Biomedical microdevices* [131] se consacre en grande partie à ce domaine qui est aussi fortement présent dans plusieurs revues à grande visibilité internationale telles que *Lab-on-a-chip* [131] ou encore *Biosensors and Bioelectronics* [132].

Les bioMEMS ont été appliqués avec succès dans plusieurs domaines de la médecine et de la biologie ; la description exhaustive de l'ensemble de ces applications ne peut entrer dans le cadre de cette étude, néanmoins nous effectuons un rapide tour d'horizon. On dénombre de nombreuses applications développées pour la délivrance localisée de médicaments, ces dispositifs se basent sur la considération qu'une faible quantité de substance active délivrée efficacement à un endroit précis engendre des coûts de traitement et des effets secondaires plus faibles qu'une plus grosse quantité de médicaments libérée dans tout l'organisme [133]. Ces dispositifs sont le plus souvent constitués de microréservoirs [134] contenant la substance à administrer et équipés de différents types de MEMS, micro-pompes [135] et de micro-valves [136] permettant la distribution des solutions. De nombreuses applications ont vu le jour également dans les domaines de la tribologie [137] et l'outillage pour la

chirurgie [138]. Enfin, de nombreux laboratoires sur micro-puces ont été inventés, remplissant le rôle des systèmes d'analyses biologiques classiques mais fournissant également des techniques d'analyse et de manipulation nouvelles. Dans ce domaine, le potentiel des bioMEMS offre des perspectives passionnantes puisqu'ils permettent d'envisager l'automatisation d'analyses individuelles d'entités biologiques présentes en un seul exemplaire. Citons en démonstration les travaux de David B. Serrel qui rapporte la fabrication d'un bioMEMS d'analyse de cellules uniques, en l'occurrence des fibroblastes [139]. En permettant le déplacement opposé latéral des deux parties d'une plateforme circulaire sur laquelle adhère la cellule étudiée, ce système permet d'analyser les forces cellulaires intervenant en réaction de ce cisaillement. Ce renseignement sur chaque type de cellule est capital puisque les stress mécaniques appliqués aux cellules ont été reconnus comme ayant une influence notable sur leurs propriétés métaboliques [140].

Le domaine d'application qui suscite cependant l'intérêt le plus important de la communauté scientifique réside dans les BioMEMS pour la détection biologique. Les bioMEMS et bioNEMS destinés à la reconnaissance spécifique d'entités biologiques sont basés sur deux principes de transduction mécanique différents [141]. Dans le premier, le greffage de molécules biologiques induit un changement de stress à la surface de structures mécaniques suspendues, cette variation de stress provoque le mouvement de la structure libre pour la compenser et c'est cette information qui est ensuite mesurée. On parle alors de BioMEMS statiques. Le deuxième principe est basé sur le suivi de la fréquence de résonance de structures mécaniques pouvant être mises dans un régime de vibration entretenu ou libre. Le greffage d'espèces biologiques à la surface de la structure vibrante provoque une augmentation de la masse de celle-ci, induisant alors une variation de la fréquence de résonance. Le terme de BioMEMS dynamiques (ou résonants) est alors employé.

Qu'ils soient statiques ou dynamiques, il convient à ce stade de synthétiser l'ensemble des avantages comparatifs des BioMEMS appliqués à la biodétection. Tout d'abord, ils constituent une technique de détection sans marquage ce qui présente les avantages exposés plus tôt dans ce manuscrit. Ensuite, et ce point sera explicité en détail au long de cette section, leurs faibles dimensions leur permettent de reconnaître le greffage de très peu de molécules ou d'espèces biologiques. Il en résulte que les BioMEMS destinés à la détection présentent des sensibilités faisant jeu égal avec les techniques de détection avec marquage par fluorophores. Leur compatibilité avec les techniques de microfabrication leur permet de bénéficier de l'implémentation de nombreuses composantes, optiques, électriques, piézoélectriques, permettant d'assurer une transduction très fortement intégrée (ainsi qu'un actionnement intégré dans le cas de BioMEMS dynamiques). Ceci confère aux BioMEMS une portabilité naturelle et bien souvent une grande robustesse. Comme cela a été précisé dans la section précédente, étant basés sur un principe de microgravimétrie, les BioMEMS dynamiques sont bien adaptés au couplage avec des récepteurs d'affinité tels que les anticorps. Enfin de par leur taille réduite et lorsqu'ils sont combinés avec des circuits microfluidiques, ils adressent le plus souvent un faible volume de milieu réactionnel via une faible surface d'interface. Ceci présente un double intérêt à savoir l'économie en réactifs pour les chimies de fonctionnalisation assurant l'immobilisation des biorécepteurs et la réduction drastique des temps de réponse permettant d'attester la bio-détection.

Le lecteur est ici invité à mettre en regard de cette liste, l'ensemble des conditions nécessaires à la réalisation d'un système de détection d'AGB de type « détecter-pour –prévenir ». Ce faisant, il apparaît évident de souligner la grande adéquation entre avantages offerts par les bioMEMS de détection et les attentes des services scientifiques, civils et militaires, quant à la nécessité de posséder des solutions de détection permettant de prévenir une dissémination d'AGB le plus en amont possible. Cette adéquation pousse les services de recherche des armées des grands pays occidentaux (DARPA

aux USA, DGA/MRIS en France) à investir financièrement dans la recherche de solutions BioMEMS innovantes pour la détection d'entités biologiques. Si, à cela, on ajoute que, étant issus de procédés de microfabrication collective, le coût de revient par unité est beaucoup plus faible pour les BioMEMS que pour d'autres techniques de biodétection, on peut envisager un déploiement massif de capteurs portables à un ensemble d'opérants ou en grand nombre dans les lieux stratégiques.

Dans les deux paragraphes suivants, nous présentons les figures de mérite des récents développements scientifiques dans les deux domaines que constituent les BioMEMS statiques et les BioMEMS dynamiques (ou résonants). L'effort sera porté sur les BioMEMS adressant la détection d'AGB, néanmoins afin de témoigner au mieux des développements les plus significatifs de la discipline, nous aborderons quelques exemples notoires de BioMEMS destinés à des applications cliniques ou de laboratoire.

I.2.2.2. BioMEMS statiques

Les bioMEMS conçus pour être utilisés en mode statique sont basés essentiellement sur des structures de types levier. Historiquement, l'intérêt de ces structures mécaniques, un rectangle suspendu de type plongeur, fut démontré dans le cadre de l'imagerie de surface par microscopie à force atomique (AFM) [142]. Dans cette technique, un levier suspendu supportant une pointe liée à l'extrémité de sa face inférieure parcourt une surface donnée. Les interactions entre l'extrémité de la pointe et les reliefs de la surface provoquent la déflexion du levier. Dans le cas des bioMEMS statiques, la déflexion des leviers intervient pour compenser l'apparition d'une différence de contrainte d'une des deux faces par rapport à l'autre. Cette différence de contrainte est générée par les forces surfaciques induites lors de l'adsorption des analytes formant un film mince à la surface [143].

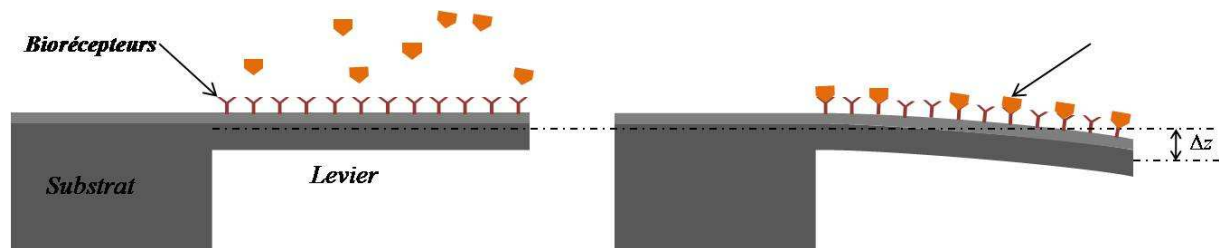


Figure 1.14 : Principe du fonctionnement d'un BioMEMS statique (ici un micro-levier), le greffage des analytes à la surface via les biorécepteurs induit une différence de contrainte surfacique entre les faces supérieures et inférieures, contrainte qui est relaxée par la déflexion Δz du levier

Depuis plus d'un siècle, le cadre théorique permettant de comprendre ce phénomène a été établi et l'équation de Stoney synthétise la relation entre la déflexion du levier Δz à la différence de contraintes surfaciques $\Delta\sigma$ entre les deux faces (supérieures et inférieures) [144].

$$\Delta z = \frac{4(1-\nu)L^2}{Et^2} \Delta\sigma \quad (1.2)$$

Dans cette équation, E et ν représentent respectivement le module d'Young et le coefficient de Poisson du levier et L et t , sa longueur et son épaisseur.

On constate que si la longueur du levier augmente ou bien si l'épaisseur de celui-ci diminue, une même différence de stress entre les deux faces se traduira par une déflexion plus importante et donc une sensibilité plus grande [145].

L'instauration de la différence de contrainte surfacique liée à un greffage biologique ne peut intervenir que pour une adsorption sélective sur l'une des deux faces, ainsi on devine la nécessité d'une fonctionnalisation différenciée sur chacune des deux faces. De nombreuses configurations sont évoquées dans la littérature. A titre d'exemple, l'équipe de Majumdar greffe des anticorps biotinylés via une liaison biotine/streptavidine sur la face supérieure d'un levier de dimensions micrométriques (épaisseur 500 nm, largeur 40 μm et longueur 200 μm) et utilise deux types de chimie de passivation différentes pour la face arrière, à savoir une passivation par adsorption de d'albumine sérique de bovin (BSA) et par greffage covalent de PEG-silanisés [146]. Majumdar *et al* observent que la détection d'antigènes par les anticorps est largement optimisée dans le deuxième cas (celui connu pour limiter au mieux les interactions non-spécifiques), ils rapportent alors une sensibilité de détection d'antigènes sériques spécifiques de la prostate (PSA) à une concentration de 1ng/mL.

Afin de rendre compte de la déflexion du levier, les systèmes de biodétection basés sur des bioMEMS statiques ont tout d'abord fait intervenir, comme pour le microscope à force atomique, un système de détection externe basé sur la réflexion d'un faisceau laser sur la surface du levier. Cette technique (dénommée Optical Beam Deflection, OBD) permet de pouvoir adresser facilement plusieurs leviers séquentiellement afin d'effectuer plusieurs essais de biodétection en parallèle. La figure 1.15 présente le principe d'une détection optique de la déflexion d'un levier. Cependant, elle souffre de limitations liées notamment à la difficulté de focaliser un faisceau sur des leviers lorsque ceux-ci sont immergés dans un milieu fluide pour le suivi d'interactions en temps réel. Même si cette limitation a été dépassée pour de nombreuses études [147], cela a nécessité des éléments d'alignement supplémentaires aux systèmes optiques externes déjà nécessaires à cette technique. Cette nécessaire instrumentation externe s'oppose à la nécessité de miniaturisation des moyens de transduction qui sous-tend notre réflexion pour des bioMEMS portables, robustes et économiques. Ainsi, de nombreuses techniques permettant de rendre compte de la déflexion de levier sans instrumentation externe ont été investiguées.

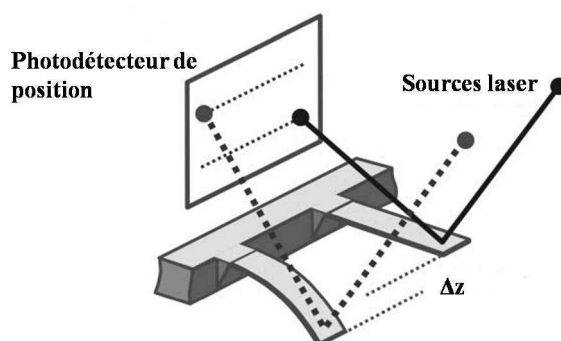


Figure 1.15 : Schéma descriptif du principe de la mesure de la déformation d'un levier par déflection d'un faisceau optique (Optical Beam Deflection, OBD)

Il convient de recenser les efforts fournis pour le développement de plusieurs techniques intégrées de mesure de déflexion de leviers. Les techniques basées sur la piézoélectricité mesurent les charges générées par la déflexion du levier au sein d'un matériau piézoélectrique déposé sur sa face supérieure [148]. La méthode capacitive traduit quant à elle la variation de la capacité formée par le substrat et le levier lorsque ce dernier est défléchi [149]. Enfin la méthode dite de transistors intégrés consiste à construire un transistor MOS (Metal Oxyde Semiconductor) à effet de champ à l'encastrement d'un levier silicium en disposant le canal du transistor parallèlement au levier de sorte que la déflexion de celui-ci induise une contrainte subie par le canal, modifiant alors le courant de drain du transistor [150].

Au sein des techniques de mesure embarquée de la déflexion du levier, celle des jauges piézorésistives doit retenir notre attention en ceci que les promesses qu'elle laisse entrevoir incitent de plus en plus d'équipes à les intégrer. Dans cette technique, la contrainte induite au sein du matériau par la déflexion du levier fait varier la résistance d'une jauge piézorésistive. Les piézorésistances sont souvent montées en pont de Wheatstone pour réaliser des mesures différentielles permettant d'éliminer au mieux les sources de bruits électriques et thermomécaniques [151]. Cette technique a été employée avec succès pour des opérations dans l'air [152] mais également dans le liquide pour la détection de biomolécules en profitant notamment de l'essor récent de leviers en polymères. En effet, l'équipe d'Anja Boisen rapporte l'intégration de jauges piézorésistives au sein de leviers en résine SU-8 [153]. L'optimisation de la précision de la mesure de déflexion est obtenue lorsqu'un deuxième levier de même dimension est utilisé pour effectuer des mesures de déflexion différentielles. La détection de l'adsorption de molécules de Mercaptohexanol par ces mêmes leviers est rapportée. Les leviers en polymères permettent d'espérer des sensibilités à la contrainte de l'ordre de 10 fois supérieures que pour ceux en silicium. Le cadre théorique de la réponse à la sur-contrainte induite par la couche biologique déposée n'est toutefois pas complètement transposable et un effort a été fourni afin de rendre compte fidèlement de leur comportement [154].

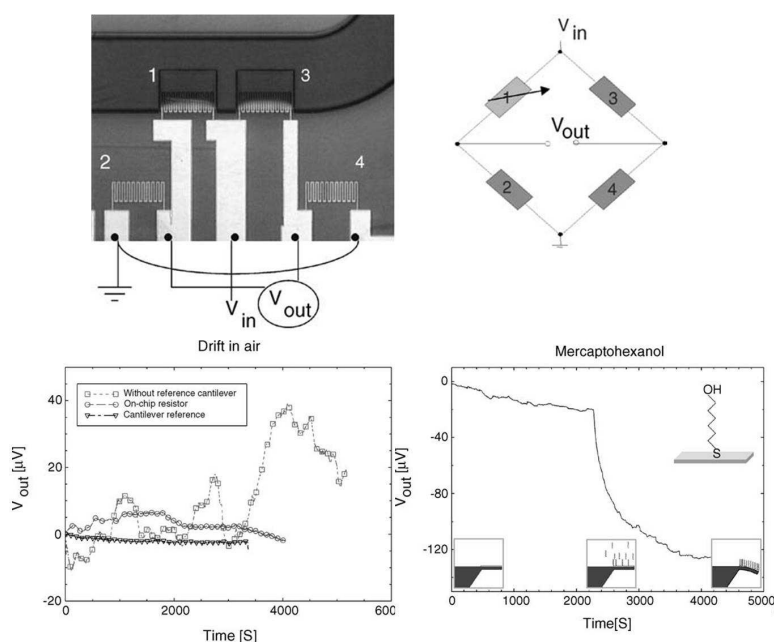


Figure 1.16 : Principe de la mesure différentielle de la déformation de leviers par des jauges piézorésistives intégrées montées en pont de Wheatstone. La courbe en bas à gauche montre que le plus faible niveau de bruit est atteint lorsque la mesure différentielle est effectuée entre deux jauges appartenant à deux leviers suspendus. La courbe de droite montre l'évolution de la déformation du cantilever consécutive à l'adsorption de molécules de mercaptohexanol.

Bien qu'offrant d'encourageantes promesses en termes de sensibilité de la détection [147], miniaturisation et intégration à des procédés de fabrication CMOS [155] ou bien encore en terme d'optimisation de la réduction des sources de bruits [156], les BioMEMS statiques possèdent certaines limitations inhérentes au principe de transduction retenu. Tout d'abord, la déformation du levier étant résultante de changements d'état de contrainte surfacique, il est très ardu de réaliser la calibration de ces leviers micrométriques afin d'obtenir des informations quantitatives sur la réaction biologique. Enfin, et cela est lié à l'assertion précédente, le dépôt des espèces biologiques en un film homogène sur toute la surface du capteur est une condition préalable nécessaire à la génération de contraintes surfaciques induites. Or, cette condition n'est pas vérifiée pour des éléments biologiques de larges volumes (pour des cellules par exemple). Elle n'est plus vérifiée non plus lorsqu'il s'agit de la détection de l'adsorption de très petites quantités de molécules. Cette considération limite l'usage des BioMEMS statiques pour des applications de très haute sensibilité (type détection de molécules uniques). C'est pour s'affranchir de ce type de restrictions que la communauté scientifique s'est tournée vers les BioMEMS fonctionnant selon un mode dynamique. En effet, ces derniers, de part le principe de transduction mis en jeu, possèdent la même universalité de détection que les techniques basées sur l'usage de microbalance à quartz.

I.2.2.3. BioMEMS résonants

Les BioMEMS dynamiques ont comme caractéristiques communes d'utiliser la résonance de structures vibrantes suspendues. Ainsi, l'évolution de la **fréquence de résonance** f de la structure constitue le signal utile à relier à la masse cumulée des analytes immobilisés à la surface du BioMEMS. Afin de maintenir la structure en vibration, il convient de disposer d'une source d'actionnement active. Il est indispensable également de disposer d'un moyen de détection du mouvement vibratoire de la structure. De part la dualité de leurs effets, les matériaux piézoélectriques ont constitué un choix cohérent pour de nombreux bioMEMS dynamiques pour lesquels ils remplissent à la fois le rôle d'actionnement et de détection. Qu'ils nécessitent des composants externes ou qu'ils soient entièrement intégrés au BioMEMS, divers moyens d'actionnement sont rencontrés dans la littérature : thermo-optiques [157], thermiques [158], magnétiques [159] ou bien encore électrostatiques [160].

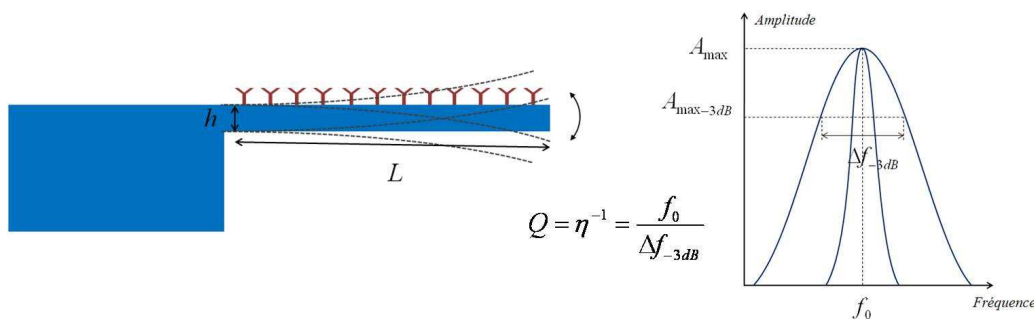


Figure 1.17: Principe de fonctionnement d'un BioMEMS dynamique, ici un levier dans un mouvement de vibration hors-du-plan. À droite, représentation schématique de deux courbes de résonance respectivement symboliques de facteur de qualité Q faible et élevé.

L'amplitude des variations de la fréquence de résonance pour une unité de masse déposée à la surface du résonateur constitue un paramètre capital des BioMEMS dynamiques. Notée S_{freq} , cette valeur caractéristique de l'efficacité de la transduction mécanique est appelée **sensibilité massique** du BioMEMS en fréquence. Ce paramètre crucial est habituellement relié à la donnée de la **masse minimum détectable** en introduisant le **facteur de qualité** de la résonance du BioMEMS. Le facteur de qualité, paramètre critique pour l'évaluation des performances d'un BioMEMS dynamique, noté Q , représente le rapport entre l'énergie injectée dans le résonateur pour sa mise en vibration et l'énergie dissipé par celui-ci, mesurées sur un cycle de vibration. Plus le facteur de qualité est élevé, plus petite sera la masse minimum détectable. La figure 1.17 représente deux cas de résonance, l'une avec un facteur de qualité élevé (pic étroit), l'autre avec un facteur de qualité faible (pic large), on peut constater que, même avec une sensibilité élevée, une petite variation de fréquence pourrait être détectée dans le premier cas et ne serait pas résolue dans le deuxième. La formule suivante exprime la relation entre les deux paramètres :

$$\delta M_{\min} \propto |S_{freq}|^{-1} \frac{f}{Q} \quad (1.3)$$

Cette dissipation est due pour les bioMEMS principalement aux pertes d'énergie mécanique à travers l'encastrement au substrat de la structure suspendue et à travers les forces de frottement visqueux imposées par le milieu environnant gazeux ou liquide. Dans le cas d'études de résonance de microsystèmes dans le vide, la dissipation est principalement dominée par les pertes d'énergies à travers l'encastrement. A l'inverse pour l'opération du BioMEMS au sein d'un liquide newtonien, ces dernières sont négligeables devant les frottements visqueux [161].

L'activité scientifique autour des bioMEMS résonants est de plus en plus intense, les équipes de recherche sur le sujet s'attachent à optimiser les microsystèmes ainsi que les technologies d'actionnement et de détection dans le but d'obtenir les plus grandes sensibilités et les plus grands facteurs de qualité, ceci afin d'atteindre les plus petites limites de résolution massiques. Dans ce domaine, les résultats pour des structures de types nano-leviers (nous sommes là dans le domaine de BioNEMS) obtenus en opérant les structures dans un vide poussé ont permis d'atteindre des performances impressionnantes. Citons les travaux de Michael Roukes qui démontre en 2008 la fabrication et l'utilisation de nano-ponts résonants dans un vide poussé et 37 Kelvins avec des facteurs de qualité de 10000 et capable de résoudre l'accroche de 7 zeptogrammes de Xénon (soit environ 30 atomes) [162]. Il nous faut mentionner également le succès de l'équipe d'Harold Craighead qui démontre la détection de l'hybridisation d'un brin unique d'ADN à son complémentaire immobilisé sur un plot d'or à la surface d'un nanolevier résonant dans le vide (l'hybridisation est faite dans le liquide et les mesures de fréquences de résonance dans le vide) à des fréquences de l'ordre de la dizaine de MégaHertz et des facteurs de qualité allant jusqu'à 7800 [163]. Ces résolutions records bien qu'exceptionnellement enthousiasmantes ne doivent pas nous faire oublier le nécessaire recours à un appareillage lourd (cryostats, chambres et pompes à vide). De même, le protocole séquentiel (mesure de la résonance/réaction biologique/ comparaison de la résonance), même s'il a permis d'atteindre des détections de quelques unités de virus (cf. les travaux de Rashid Bashir [164]) interdisent une reconnaissance biologique en temps réel, condition première d'un BioMEMS appliqué à la détection « détecter-pour-protéger » d'AGB.

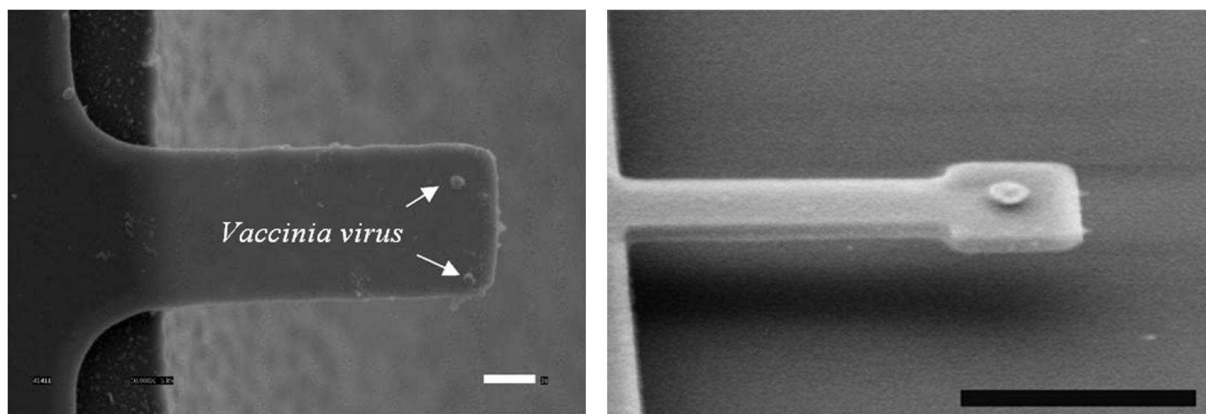


Figure 1.18 : A gauche, photographie d'un micro-levier permettant la détection en mode dynamique de deux entités de *Vaccinia virus* (courtoisie de Rasheed Bashir). A droite, photographie d'un micro-levier permettant la détection de l'hybridisation de deux mono-brins d'ADN, le plot d'or au centre sert à contrôler la localisation du mono-brin faisant office de biorécepteur (courtoisie d'Harold Craighead).

Les résultats décrits jusqu'à présent sont le plus souvent obtenus pour des structures de types leviers ou ponts. En opposition à leur simplicité de fabrication et leurs bonnes performances dans l'air et dans le vide, le principal désavantage de ces structures est de subir fortement l'influence des frottements visqueux dans le liquide. Etant entouré presque intégralement par le liquide, les frottements sont maximisés. De plus, les leviers les plus répandus vibrent selon un mouvement hors-plan impliquant donc de « soulever » le volume de liquide supérieur. Ainsi le facteur de qualité de ces structures diminue drastiquement dans le liquide, atteignant au mieux quelques dizaines d'unités [165].[166]. Si ces facteurs de qualité sont insuffisants pour atteindre des résolutions massiques poussées, il convient néanmoins de citer les travaux de l'équipe de Raj Mutharasan à l'Université de Drexel qui, grâce à des leviers piézoélectriques de taille millimétrique à actionnement et détection piézoélectrique intégrés ($f = 57 \text{ kHz}$; $Q_{\text{(liquide)}} = 32$; $S_{\text{freq (liquide)}} = 14 \text{ ng/Hz}$), détecte dans le fluide et en temps réel des concentrations d'AGB remarquablement basses. Son équipe rapporte la détection de *Bacillus anthracis* à une concentration minimale de 300 spores/mL [167] et d'une source pathogène d'*Escherichia coli* à 700 UFC/mL avec des temps de réponse de l'ordre de 20 minutes et un équipement relativement simple [168]. Afin d'atteindre des résolutions massiques permettant de résoudre la bactérie unique puis la protéine unique avec des micro et nano leviers, il a fallu l'approche de rupture proposée par l'équipe de Scott Manalis au Massachusetts Institute of Technology, dont l'idée originale était de faire vibrer des micro-leviers dans le vide pour bénéficier de facteur de qualité élevés et de faire circuler le milieu réactionnel au sein d'un canal microfluidique, embarqué au cœur du levier résonant. Ces microcanaux suspendus résonants aux caractéristiques remarquables ($f = 209 \text{ kHz}$; $Q = 15000$; $\delta M_{\text{min (liquide)}} = 7 \text{ zg}$ [169]) permettent de détecter en temps réel des marqueurs de cancer à des concentrations de 100 ng/mL au sein de sérum pur [170]. Le passage au sein du levier de levures uniques a été détecté mais des informations sur le volume et la densité de ces levures ont également pu être obtenues [171]. Cependant et malgré tous les avantages présentés, ces structures nécessitent toujours un appareillage lourd externe et ne peuvent être de bons candidats pour un biodétecteur d'AGB aux caractéristiques rappelées en début de section.

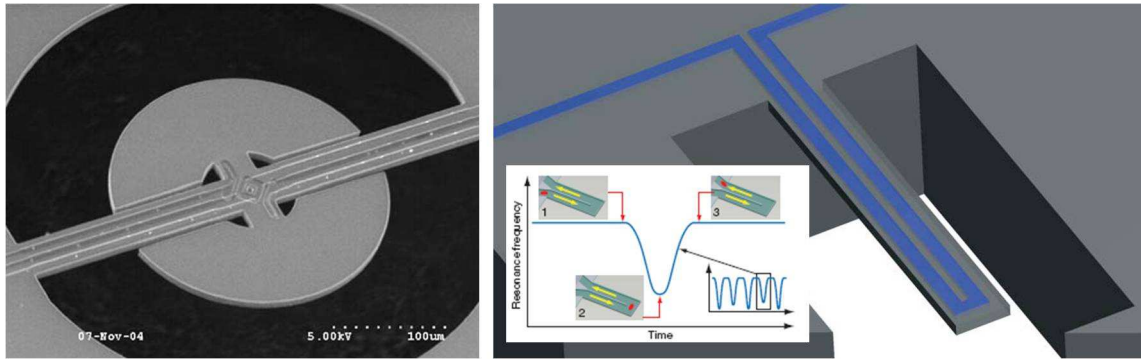


Figure 1.19 : A droite, photographie du résonateur plan à haut facteur de qualité dans le fluide, l'actionnement repose sur les forces de Lorentz générées dans les pistes électriques intégrées par un aimant externe (courtoisie d'Oliver Brand). A gauche, schéma descriptif du micro-canal suspendu résonant, l'encart montre l'effet sur la fréquence de résonance du passage d'une bactérie dans le canal (courtoisie de Scott Manalis).

Afin d'éviter la chute dramatique du facteur de qualité en présence de fluide, d'autres solutions que les leviers vibrant hors-plan ont été investiguées. Des architectures alternatives conçues pour limiter l'effet d'amortissement du fluide supérieur ont été rapportées [172]. Des modes de vibration radicalement différents ont été proposés. C'est ainsi qu'avec succès, l'équipe d'Oliver Brand a rapporté la fabrication de structures suspendues avec une détection intégrée piézorésistive présentant toutes les faces au liquide avec des facteurs de qualité autour de 100 [173]. Ceci est explicable en considérant que ces deux demi-disques suspendus à un pont central oscillent selon un mouvement dans le plan horizontal, ce mouvement de cisaillement du fluide en limite les effets d'amortissement de la vibration puisque l'influence de la masse du volume de fluide surmontant le résonateur est réduite. Enfin, des méthodes d'alimentation en boucle fermée et d'amplification électrique de la résonance consécutive à la transduction sont rapportées pour parvenir à augmenter artificiellement le facteur de qualité dans le fluide [174].

Dans le but de concevoir un BioMEMS dynamique, à actionnement et détection intégrés et présentant des sensibilités massiques et des facteurs de qualité dans le liquide qui permettent d'envisager l'application à la détection en temps réel d'AGB, une dernière alternative en terme d'architecture sera retenue pour cadre de cette étude. Cette alternative se base sur l'utilisation de diaphragmes résonants à actionnement piézoélectrique. Ce type de structure est déjà largement employé avec succès pour la génération d'ondes acoustiques ultrasonores (destinées entre autres à des applications d'imagerie par échographie) [175] [176]. Les structures vibrantes de type diaphragme (ou membranes) bien que décrivant une vibration hors-du-plan (horizontal) ont l'avantage de ne présenter qu'une seule face au liquide, ce qui limite grandement les effets de frottement visqueux. En fait, des études rapportées dans la littérature ont montré que des membranes circulaires surmontées d'un film piézoélectrique ne présentaient que peu d'amortissement dans le liquide par rapport à l'air et que ces structures ont un fort potentiel pour des applications de biodétection [177].

La démonstration du potentiel de micromembranes en silicium en tant que biocapteurs a été effectuée suite à des travaux initiés au sein du Laboratoire d'Analyses et d'Architectures des Systèmes (LAAS-CNRS) par Christian Bergaud et repris par Liviu Nicu. Publiés dans la revue *Sensors and Actuators B : Chemical* [178], ces travaux (correspondant à la thèse de Mathieu Guirardel [179]) attestent la détection prometteuse de l'hybridisation de brins complémentaires d'ADN grâce au marquage massique par des colloïdes d'or sur des membranes à actionnement piézoélectrique. Comme

le montre la figure 1.20, les membranes sont surmontées d'une couronne de PZT qui permet l'actionnement alors que la détection est réalisée par déflexion d'un faisceau optique externe. La sensibilité massique des membranes a pu être testée et la valeur obtenue était $-3,9 \text{ pg/Hz}$.

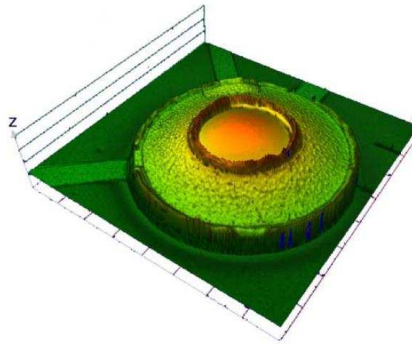


Figure 1.20 : Profil obtenu par interférométrie optique d'une micro-membrane silicium résonante pour des applications de biodétection, surmontée d'une couronne de PZT pour l'actionnement [178].

Ces travaux ont été repris lors de la thèse de Cédric Ayela [180], qui a montré la faisabilité de micromembranes de $100 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre surmontées par une pastille de PZT servant à la fois d'actionnement et de détection via la dualité des effets piézoélectriques directs et indirects. Grâce à ces micromembranes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés, Cédric Ayela a pu prouver la détection de fréquence de résonance dans le liquide via une détection intégrée et a montré le potentiel de ces micromembranes combinées à des polymères à empreintes moléculaires. Les facteurs de qualité reportés dans le liquide sont de 50 et la masse minimum détectable de $1,4 \text{ pg}$ [181].

Les travaux de Cédric Ayela ont levé le voile sur les promesses fortes des structures de type diaphragme pour assurer des applications de diagnostic et de capteurs de gaz miniaturisés à haute performance. C'est dans la poursuite de ce cadre que s'inscrivent les travaux présentés dans ce manuscrit. Sont présentés ici, la conception, la fabrication, la caractérisation de micromembranes résonantes en silicium à actionnement piézoélectrique intégré et leur intégration au sein d'un prototype de plate-forme de reconnaissance biologique pour la détection d'agents simulant la menace.

La mise à niveau des BioMEMS pour répondre au cadre exigeant de la détection d'AGB en milieu opérationnel, pour le déclenchement d'alertes, requiert la validation de plusieurs performances préalables. Premièrement, le système de détection global doit être capable de réaliser des mesures multiplexées et en temps réel. Ceci implique que le système doit pouvoir suivre les évolutions de la fréquence de résonance de plusieurs membranes en parallèle vibrant dans le liquide (solution tampon biologique ici). Ensuite, les performances de sensibilité et de masse minimum détectables doivent être satisfaisantes pour une détection la plus rapide et précise possible. Ceci implique des facteurs de qualité élevés pour les résonances ainsi qu'une bonne sensibilité massique dans le fluide. La plate-forme de détection ne doit fournir aucun faux positif (fausse alerte). Le temps de réponse du capteur microgravimétrique ainsi constitué doit être suffisamment court. Le tout doit être hautement intégré et robuste pour des applications portables.

Dans le cadre de ce manuscrit, je détaillerai l'ensemble des travaux réalisés afin de réaliser cette mise à niveau. Les principaux axes permettant de réaliser cet objectif peuvent être résumés comme suit.

L'intégration de jauges piézorésistives afin d'assurer la détection intégrée du mouvement vibratoire sera étudiée. A ce titre, nous prouverons la faisabilité d'une cohabitation physique entre piézoélectricité et piézorésistivité intégrées au sein d'une même microstructure résonante dans un fluide pour des applications biologiques. L'optimisation de la détection piézorésistive doit nous permettre d'obtenir une transduction de meilleure qualité.

Une étude sur des procédures et protocoles de fonctionnalisation biochimique des micromembranes en vue de la détection sélective de quatre types d'agent biologique sera menée. Grâce à la microbalance à quartz multiplexée (QCM-D E4) nous optimiserons les protocoles pour parvenir à la plus grande sensibilité biologique pour la surface de capture des membranes et le plus petit nombre d'interactions non-spécifiques. Nous validerons alors les processus de biorecognition et de régénération des capteurs.

Le fonctionnement des membranes selon des modes de résonance supérieurs sera prouvé afin de conserver des bons niveaux de sensibilité massique tout en permettant d'accroître la surface active de capture biologique des membranes.

La conception et la mise en place d'une électronique intégrée de précision sera décrite. Cette électronique réalisera la détection du mouvement et le suivi des fréquences de résonance des membranes vibrant dans le fluide, de manière multiplexée sur plusieurs d'entre elles. Elle intégrera également un système permettant une augmentation dynamique du facteur de qualité des membranes afin de réduire la masse minimum pouvant être résolue par nos capteurs.

Références

- [1] “Les armes chimiques dans l'Histoire,” *IRSN - Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, non-prolifération*.irsn.fr.
- [2] R. Horrox, *The Black Death*, (1994), Manchester University Press, Manchester, United Kingdom.
- [3] S. Tonev, K. Kanev, et C. Dishovsky, *Medical management of Chemical and Biological Casualties*, (2009), Sofia, Bulgaria.
- [4] R. Clarke, *The silent weapons*, (1968) D. McKay Co, New York, NY.
- [5] S.H. Harris, *Factories of Death: Japanese Biological Warfare, 1932-45, and the American Cover-Up*, (1994) London, UK.
- [6] “International Humanitarian Law - Protocole de Genève 1925.”
- [7] “Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on Their Destruction.” www.brad.ac.uk/acad/sbtwc/btwc/convention/conv.html
- [8] C. Poitevin, “Contrôle de l'interdiction des armes biologiques : un état des lieux.”, Note d'analyse du Groupe de Recherche sur la Paix et la Sécurité, (2006)
- [9] I. Reader, *Religious violence in contemporary Japan*, (2000) University of Hawaii Press, Hawaii, USA.
- [10] R.J. Kisala et M.R. Mullins, *Religion And Social Crisis In Japan: Understanding Japanese Society through the Aum Affair*, (2001) New York.
- [11] E.G. Lake, *Analyzing The Anthrax Attacks*, (2005) New York.
- [12] K. Brown, *Science*, vol. 305 (2005).
- [13] “CDC | Bioterrorism Agents/Diseases (by Category) | Emergency Preparedness & Response.”, Center for Disease Control and Prevention, www.cdc.gov
- [14] D. Raoult, “Rapport de mission sur les armes biologiques”, <http://www.timone.univ-mrs.fr/medecine/divers/>
- [15] “Chemical and Biological Defense”, Defense Threat Reduction Agency, www.dtra.mil
- [16] “Mission and Vision of the Joint Program Executive Office for Chemical and Biological Defense”, JPEO-CBD, www.jpeocbd.osd.mil
- [17] “Chemical and Biological Defense Program.” www.acq.osd.mil/cp/budget/
- [18] BAWS: Biological Agent Warning Sensor, www.lockheedmartin.com/data/assets/1537.pdf
- [19] A.F. Collings et F. Caruso, *Reports on Progress in Physics*, vol. 60 (1997).
- [20] M. Nič, J. Jiráť, B. Košata, A. Jenkins, et A. McNaught, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (2009), Research Triangle Park, NC, USA.

- [21] S.J. Updike et G.P. Hicks, *Nature*, vol. 214 (**1967**), 986-988.
- [22] J.H. Luong, K.B. Male, et J.D. Glennon, *Biotechnology advances*, vol. 26 (**2008**), 492–500.
- [23] QTL Biodetection, www.qtlbio.com
- [24] Fuji-Keizai USA, Inc., *U.S. & Worldwide: Biosensors market, R&D, applications and commercial implication*, (**2004**), New-York, USA.
- [25] K. Haupt, K. Noworyta, et W. Kutner, *Analytical Communications*, vol. 36 (**1999**), 391–393.
- [26] T.H. Rider, *Science*, vol. 301 (**2003**), 213-215.
- [27] L.C. Clark et C. Lyons, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102 (**1962**), 29-45.
- [28] “i-STAT - Abbott Point-of-Care.” www.abbottpointofcare.com
- [29] “Biacore Life Sciences.” www.biacore.com
- [30] “QCM-D Technology - Q-Sense - QCMD - quartz crystal microbalance with dissipation.” www.q-sense.com
- [31] L.D. Mello et L.T. Kubota, *Food Chemistry*, vol. 77 (**2002**), 237-256.
- [32] H. Nakamura et I. Karube, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377(**2003**), 446-468.
- [33] Y. Nomura, G. Chee, et I. Karube, *Field Analytical Chemistry*, vol. 2 (**1999**), 333-340.
- [34] “KELMA | RODTOX 2000 - On-line BOD & TOXICITY analysers.”
- [35] K. Nakanishi, K. Ikebukuro et I. Karube, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 60 (**1996**) 97-106.
- [36] S. Centi, S. Laschi, M. Fránek, et M. Mascini, *Analytica Chimica Acta*, vol. 538 (**2005**), 205-212.
- [37] K.A. Joshi, J. Tang, R. Haddon, J. Wang, W. Chen, et A. Mulchandani, *Electroanalysis*, vol. 17 (**2005**), 54–58.
- [38] J. Ye, S.V. Leichter et A.G. Rand, *Journal of Food Science*, vol. 62 (**1997**), 1067-1086.
- [39] S.T. Pathirana, J. Barbaree, B.A. Chin, M.G. Hartell, W.C. Neely et V. Vodyanoy, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 15 (**2000**), 135-141.
- [40] N.S. Hobson, I. Tothill et A.P.F. Turner, vol. 11 (**1996**), 455–477.
- [41] E. Gizeli et C.R. Lowe, *Biomolecular sensors*, (**2002**) Taylor & Francis, New York, NY.
- [42] M. Madou et M. Tierney, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 41 (**1993**), 109-128.
- [43] S.L.R. Barker, R. Kopelman, T.E. Meyer et M.A. Cusanovich, *Analytical Chemistry*, vol. 70 (**1998**), 971-976.
- [44] H. Aoki, P. Bühlmann et Y. Umezawa, *Electroanalysis*, vol. 12 (**2000**), 1272-1276.
- [45] J.L. Versage, D.D. Severin, M.C. Chu et J.M. Petersen, *Journal of clinical microbiology*, vol.

- 41 (2003), 5492.
- [46] H.A. Hartley et A.J. Baeumner, *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 376 (2003), 319–327.
 - [47] P.A. Emanuel, R. Bell, J.L. Dang, R. McClanahan, J.C. David, R.J. Burgess, J. Thompson, L. Collins, et T. Hadfield, *Journal of Clinical. Microbiology*, vol. 41 (2003), 689-693.
 - [48] J.A. Higgins, S. Nasarabadi, J.S. Karns, D.R. Shelton, M. Cooper, A. Gbakima, et R.P. Koopman, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18 (2003), 1115–1123.
 - [49] J.A. Higgins, M.S. Ibrahim, F.K. Knauert, G.V. Ludwig, T.M. Kijek, J.W. Ezzell, B.C. Courtney et E.A. Henschel, *Annals of the New York Academy of Sciences-Paper Edition*, vol. 894 (2000), 130–148.
 - [50] E. Benjamini, S. Leskowitz et G.H. Sunshine, *Immunology: a short course*, (2000) Wiley-Liss New York, NY.
 - [51] A. Kim, C.S. Ah, H.Y. Yu, J. Yang, I. Baek, C. Ahn, C.W. Park, M.S. Jun et S. Lee, *Applied Physics Letters*, vol. 91 (2007), 103901.
 - [52] G.Y. Shen, H. Wang, T. Deng, G.L. Shen et R.Q. Yu, *Talanta*, vol. 67 (2005), 217–220.
 - [53] S.T. Pathirana, J. Barbaree, B.A. Chin, M.G. Hartell, W.C. Neely et V. Vodyanoy, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 15 (2000), 135-141.
 - [54] T.M. Peduru Hewa, G.A. Tannock, D.E. Mainwaring, S. Harrison et J.V. Fecondo, *Journal of Virological Methods*, vol. 162 (2009), 14-21.
 - [55] J.J. Gooding, *Analytica Chimica Acta*, vol. 559 (2006), 137–151.
 - [56] L.K. Cao, G.P. Anderson, F.S. Ligler et J. Ezzell, *Journal of clinical microbiology*, vol. 33 (1995), 336.
 - [57] B. Lu, M.R. Smyth et R. O'Kennedy, *The Analyst*, vol. 121 (1996), p. 29R-32R.
 - [58] P. Schuck, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 26 (1997), 541-566.
 - [59] K. Catt, G. Tregear, H. Burger et C. Skermer, *Clinica Chimica Acta*, vol. 27 (1970), 267-279.
 - [60] F. Caruso, E. Rodda et D.N. Furlong, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 179 (1996), 104-115.
 - [61] J.E. Zull, J. Reed-Mundell, Y.W. Lee, D. Vezenov, N.P. Ziats, J.M. Anderson et C.N. Sukenik, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 13 (1994), 137-143.
 - [62] D.S. Tawfik, B.S. Green, R. Chap, M. Sela et Z. Eshhar, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90 (1993), 373-377.
 - [63] A. Cerf et C. Vieu, *Biophysical Journal*, vol. 98, (2010), 758a.
 - [64] G.J. Leggett, C.J. Roberts, P.M. Williams, M.C. Davies, D.E. Jackson et S.J.B. Tendler, *Langmuir*, vol. 9 (1993), 2356–2362.
 - [65] J. Wang, L.M. Frostman, et M.D. Ward, *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 96 (1992), 5224-5228.

- [66] Y.T. Kim, R.L. McCarley et A.J. Bard, *Langmuir*, vol. 9 (**1993**), 1941-1944.
- [67] V. Silin, H. Weetall et D.J. Vanderah, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 185 (**1997**), 94-103.
- [68] J. Benesch, S. Svedhem, S.C. Svensson, R. Valiokas, B. Liedberg et P. Tengvall, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 12 (**2001**), 581-597.
- [69] A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir–Blodgett to Self-Assembly* (**1991**), Academic Press, San Diego, CA.
- [70] G.P. Anderson, J.P. Golden et F.S. Ligler, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 8 (**1993**), 249-256.
- [71] M.J. Stevens, *Langmuir*, vol. 15, (**1999**), 2773-2778.
- [72] A. Manz, N. Graber et H. Widmer, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 1 (**1990**), 244-248.
- [73] D.R. Reyes, D. Iossifidis, P.A. Auroux et A. Manz, *Analytical Chemistry*, vol. 74 (**2002**), 2623–2636.
- [74] B.G.M. Jongerius-Gortemaker, R.L.J. Goverde, F. van Knapen, et A.A. Bergwerff, *Journal of Immunological Methods*, vol. 266 (**2002**) 33-44.
- [75] B.L. Frey, C.E. Jordan, S. Kornguth et R.M. Corn, *Analytical Chemistry*, vol. 67 (**1995**), 4452-4457.
- [76] N.P. Huang, R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D.L. Elbert, J.A. Hubbell et N.D. Spencer, *Langmuir*, vol. 17 (**2001**), 489–498.
- [77] N. Huang, J. Vörös, S.M. De Paul, M. Textor et N.D. Spencer, *Langmuir*, vol. 18, (**2002**), 220-230.
- [78] A; Hucknall, S. Rangarajan, A. Chilkoti, *Advanced Materials*, vol. 21 (2009), 2441-2446
- [79] H. Ma, J. Hyun, P. Stiller et A. Chilkoti, *Advanced Materials*, vol. 16 (**2004**), 338-341.
- [80] A.J. Baeumner, B. Leonard, J. McElwee et R.A. Montagna, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 380 (**2004**), 15-23.
- [81] H. Karşilayan, I. Hemmilä, H. Takalo, A. Toivonen, K. Pettersson, T. Lövgren et V. Mikkala, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 8 (**1997**), 71-75.
- [82] S.H. Snyder, J. Axelrod et M. Zweig, *Biochemical Pharmacology*, vol. 14 (**1965**), 831-835.
- [83] G. Ramsay, *Nature Biotechnology*, vol. 16 (1998), 40-44.
- [84] C. Taitt, J.P. Golden, Y.S. Shubin, L.C. Shriver-Lake, K.E. Sapsford, A. Rasooly et F.S. Ligler, *Microbial Ecology*, vol. 47 (**2004**), 175-185.
- [85] K. Brogan et D. Walt, *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 9 (**2005**), 494-500.
- [86] A. Brandenburg, F. Curdt, G. Sulz, F. Ebling, J. Nestler, K. Wunderlich, et D. Michel, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 139 (**2009**), 245–251.
- [87] K.E. Sapsford, *Optical Guided-wave Chemical and Biosensors I* (**2010**), 3–20.

- [88] F.S. Ligler et C. Taitt, *Optical Biosensors: Today and Tomorrow*, (2008), Elsevier, Oxford, United Kingdom.
- [89] G.P. Anderson et C.A. Rowe-Taitt, "RAPTOR: A portable, automated biosensor," *Proceedings of the First Conference on Point Detection for Chemical and Biological Defense*, 2000, Williamsburg, VA:.
- [90] G. Anderson, R. Matney, J. Liu, A. Hayhurst et E. Goldman, *BioTechniques*, vol. 43 (2007), 806-811.
- [91] C. Striebel, A. Brecht et G. Gauglitz, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 9 (1994), 139-146.
- [92] B. Liedberg, C. Nylander et I. Lunström, vol. 4 (1983), 299-304.
- [93] A. Otto, *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, vol. 216 (1968), 398–410.
- [94] U. Jönsson, L. Fägerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfas, B. Persson, H. Roos, et I. Rönnberg, *Biotechniques*, vol. 11 (1991), 620–627.
- [95] "Biacore Life Sciences." www.biacore.com
- [96] J. Svitel, I. Surugiu, A. Dzgoev, K. Ramanathan et B. Danielsson, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12 (2001), 1075-1078.
- [97] T.M. Chinowsky, J.G. Quinn, D.U. Bartholomew, R. Kaiser et J.L. Elkind, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 91 (2003), 266–274.
- [98] A.N. Naimushin, S.D. Soelberg, D.K. Nguyen, L. Dunlap, D. Bartholomew, J. Elkind, J. Melendez et C.E. Furlong, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 17 (2002), 573-584.
- [99] M. Pohanka, P. Skládal et M. Kroëa, *Defence Science Journal*, vol. 57 (2007), 185–193.
- [100] P. Skladal, Y. Symerska, M. Pohanka, B. Safar et A. Macela, *Defense against Bioterror* (2005), 221-232.
- [101] V.K. Rao, G.P. Rai, G.S. Agarwal et S. Suresh, *Analytica Chimica Acta*, vol. 531 (2005), 173–177.
- [102] B. Wang, B. Li, Q. Deng et S. Dong, *Analytical Chemistry*, vol. 70 (1998), 3170-3174.
- [103] "Sartorius AG: Biotechnology and Mechatronics for Laboratory and Process Industry.", www.sartorius.com
- [104] C. Ercole, M.D. Gallo, M. Pantalone, S. Santucci, L. Mosiello, C. Laconi et A. Lepidi, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 83 (2002), 48-52.
- [105] "Smith Detection." www.smithsdetection.com
- [106] M. Niu, X. Ding et Q. Tong, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 37, (1996), 13-17.
- [107] T. Mikolajick, R. Kühnhold et H. Ryssel, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 44 (1997), 262-267.
- [108] J. Chiang, S. Jan, J. Chou et Y. Chen, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 76, (2001), p. 624-628.

- [109] M.L. Pourciel-Gouzy, W. Sant, I. Humenyuk, L. Malaquin, X. Dollat et P. Temple-Boyer, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 103 (2004), 247-251.
- [110] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, et C.M. Lieber, *Science*, vol. 293 (2001), 1289-1292.
- [111] F. Patolsky, G. Zheng, O. Hayden, M. Lakadamyali, X. Zhuang et C.M. Lieber, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101 (2004), 14017-14022.
- [112] X. Wang, S.V. Dzyadevych, J. Chovelon, N.J. Renault, L. Chen, S. Xia et J. Zhao, *Electrochemistry Communications*, vol. 8 (2006), 201-205.
- [113] R. Bhatia, J.W. Dilleen, A.L. Atkinson et D.M. Rawson, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18, (2003), p. 667-674.
- [114] W.G. Cady, *Piezoelectricity: An Introduction to the Theory and Applications of Electromechanical Phenomena in Crystals*, (1964) Dover, New York, NY.
- [115] O. Morio, *Journal of the Institute of Electrical Engineers of Japan*, vol. 119 (1999), 100-103.
- [116] M. Bisoffi, B. Hjelle, D. Brown, D. Branch, T. Edwards, S. Brozik, V. Bondu-Hawkins et R. Larson, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23 (2008), 1397-1403.
- [117] K. Korsah, C.L. Ma, et B. Dress, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 50, (1998), 110-116.
- [118] G. Sauerbrey, *Z. Physics*, vol. 155 (1959), 206-222.
- [119] E. Huber Jr. et C. Kirk Jr., *Surface Science*, vol. 5 (1966), 447-465.
- [120] C.T. Kirk et E.E. Huber, *Surface Science*, vol. 9 (1968), 217-245.
- [121] M.V. Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, et B. Kasemo, *Physica Scripta*, vol. 59 (1999), 391-396.
- [122] C.D. Corso, D.D. Stubbs, S.H. Lee, M. Goggins, R.H. Hruban et W.D. Hunt, *Cancer detection and prevention*, vol. 30 (2006), 180-187.
- [123] L. Marcotte et M. Tabrizian, *IRBM*, vol. 29 (2008), 77-88.
- [124] L. Wang, C. Wu, Z. Hu, Y. Zhang, R. Li, et P. Wang, *Journal of Zhejiang University-Science B*, vol. 9 (2008), 121-131.
- [125] F. Höök, B. Kasemo, T. Nylander, C. Fant, K. Sott, et H. Elwing, *Analytical Chemistry*, vol. 73 (2001), 5796-5804.
- [126] R. Hao, D. Wang, X. Zhang, G. Zuo, H. Wei, R. Yang, Z. Zhang, Z. Cheng, Y. Guo, Z. Cui, et Y. Zhou, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24 (2009), 1330-1335.
- [127] H. Wang, Y. Liu, Y. Yang, T. Deng, G. Shen et R. Yu, *Analytical Biochemistry*, vol. 324 (2004), 219-226.
- [128] T.W. Owen, R.O. Al-Kaysi, C.J. Bardeen et Q. Cheng, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 126 (2007), 691-699.
- [129] H.C. Nathanson, W.E. Newell, R.A. Wickstrom et J.R. Davis Jr, *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 14 (1967), 117-133.

- [130] R. Bashir, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 56 (2004), 1565-1586.
- [131] "Biomedical Microdevices." www.springer.com/engineering/biomedical+eng/journal/10544
- [132] "Biosensors and Bioelectronics - Elsevier." www.elsevier.com/locate/bios
- [133] N. Tsai et C. Sue, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 134 (2007), 555-564.
- [134] J.H. Prescott, S. Lipka, S. Baldwin, N.F. Sheppard, J.M. Maloney, J. Coppeta, B. Yomtov, M.A. Staples, et J.T. Santini, *Nature biotechnology*, vol. 24 (2006), 437-438.
- [135] A. Nisar, N. Afzulpurkar, B. Mahaisavariya et A. Tuantranont, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 130 (2008), 917-942.
- [136] K.W. Oh et C.H. Ahn, *Journal of micromechanics and microengineering*, vol. 16 (2006), R13.
- [137] B. Bhushan, *Microelectronic Engineering*, vol. 84 (2007), 387-412.
- [138] S. Chung, J.K. Kim, K.C. Wang, D. Han et J. Chang, *Biomedical Microdevices*, vol. 5 (2003), 311-321.
- [139] D.B. Serrell, J. Law, A.J. Slifka, R.L. Mahajan et D.S. Finch, *Biomedical Microdevices*, vol. 10 (2008), 883-889.
- [140] P.A. Janmey et C.A. McCulloch, *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 9 (2007), 1-34.
- [141] S. Bhattacharya, J. Jang, L. Yang, D. Akin et R. Bashir, *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, vol. 15 (2007), 1-32.
- [142] G. Binnig, C.F. Quate et C. Gerber, *Physical Review Letters*, vol. 56 (1986), 930.
- [143] K.M. Hansen et T. Thundat, *Methods*, vol. 37 (2005), 57-64.
- [144] G.G. Stoney, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, vol. 82 (1909), 172-175.
- [145] R. Datar, S. Kim, S. Jeon, P. Hesketh, S. Manalis, A. Boisen et T. Thundat, *MRS BULLETIN*, vol. 34 (2009).
- [146] M. Yue, J.C. Stachowiak, H. Lin, R. Datar, R. Cote et A. Majumdar, *Nano Letters*, vol. 8 (2008), 520-524.
- [147] G. Wu, R.H. Datar, K.M. Hansen, T. Thundat, R.J. Cote et A. Majumdar, *Nature Biotechnology*, vol. 19 (2001), 856-860.
- [148] H.P. Lang, R. Berger, C. Andreoli, J. Brugger, M. Despont, P. Vettiger, C. Gerber, J.K. Gimzewski, J.P. Ramseyer et E. Meyer, *Applied Physics Letters*, vol. 72 (1998), 383.
- [149] C.L. Britton Jr, R.L. Jones, P.I. Oden, Z. Hu, R.J. Warmack, S.F. Smith, W.L. Bryan, et J.M. Rochelle, *Ultramicroscopy*, vol. 82 (2000), 17-21.
- [150] G. Shekhawat, S. Tark et V.P. Dravid, *Science*, vol. 311 (2006), 1592-1595.
- [151] A. Boisen, J. Thaysen, H. Jensenius et O. Hansen, *Ultramicroscopy*, vol. 82 (2000), 11-16.

- [152] R. Lakhmi, H. Debeda, I. Dufour et C. Lucat, *IEEE Sensors Journal*, vol. 10, **(2010)**, 1133-1137.
- [153] A. Johansson, M. Calleja, P.A. Rasmussen et A. Boisen, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 123 **(2005)**, 111–115.
- [154] S. Heinrich, M. Wenzel, F. Josse et I. Dufour, *Journal of Applied Physics*, vol. 105 **(2009)**, 124903.
- [155] T. Müller, M. Brandl, O. Brand et H. Baltes, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 84, **(2000)**, 126-133.
- [156] C.A. Savran, T.P. Burg, J. Fritz et S.R. Manalis, *Applied Physics Letters*, vol. 83 **(2003)**, 1659.
- [157] B. Ilic, S. Krylov et H.G. Craighead, *Journal of Applied Physics*, vol. 107 **(2010)**, 034311.
- [158] L. Han et S. Chen, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 121 **(2005)**, 35-43.
- [159] D. Lange, C. Hagleitner, C. Herzog, O. Brand, et H. Baltes, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 103 **(2003)**, 150-155.
- [160] J. Gaspar, V. Chu et J.P. Conde, *Journal of Applied Physics*, vol. 93 **(2003)**, 10018.
- [161] D.R. Southworth, H.G. Craighead et J.M. Parpia, *Applied Physics Letters*, vol. 94 **(2009)**, 213506.
- [162] Y. T. Yang, C. Callegari, X. L. Feng, K. L. Ekinici et M. L. Roukes, *NanoLetters*, vol. 6 **(2006)**, 583-586.
- [163] B. Ilic, Y. Yang, K. Aubin, R. Reichenbach, S. Krylov et H.G. Craighead, *NanoLetters*, vol. 5 **(2005)**, 925-929.
- [164] L. Johnson, A.K. Gupta, A. Ghafoor, D. Akin et R. Bashir, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 115 **(2006)**, 189–197.
- [165] C. Vančura, Y. Li, J. Lichtenberg, K.U. Kirstein, A. Hierlemann et F. Josse, *Analytical Chemistry*, vol. 79 **(2007)**, 1646–1654.
- [166] G.A. Campbell et R. Mutharasan, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 122 **(2005)**, 326-334.
- [167] G.A. Campbell et R. Mutharasan, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21 **(2006)**, 1684–1692.
- [168] G.A. Campbell et R. Mutharasan, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, **(2005)**, 462-473.
- [169] T.P. Burg, M. Godin, S.M. Knudsen, W. Shen, G. Carlson, J.S. Foster, K. Babcock et S.R. Manalis, *Nature*, vol. 446 **(2007)**, 1066-1069.
- [170] M.G. von Muhlen, N.D. Brault, S.M. Knudsen, S. Jiang et S.R. Manalis, *Analytical Chemistry*, vol. 82 **(2010)**, 1905-1910.
- [171] A.K. Bryan, A. Goranov, A. Amon, et S.R. Manalis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107 **(2010)**, 999.
- [172] M. Varshney, P.S. Waggoner, C.P. Tan, K. Aubin, R.A. Montagna et H.G. Craighead, *Biophys. Res. Commun.*, vol. 305 **(2003)**, 518–522.

- [173] J.H. Seo et O. Brand, *Proceedings of 13 Int Conf Solid-State Actuators Microsystems* (2005) Seoul, Korea, 247-251.
- [174] J. Tamayo, *Journal of Applied Physics*, vol. 97 (2005), 044903.
- [175] P. Muralt, A. Kholkin, M. Kohli et T. Maeder, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 53 (1996), 398-404.
- [176] P. Luginbuhl, S. Collins, G. Racine, M. Grétilat, N. de Rooij, K. Brooks et N. Setter, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 64 (1998), 41-49.
- [177] Y. Xin, Z. Li, L. Odum, Z. Cheng, et Z. Xu, *Applied Physics Letters*, vol. 89 (2006), 223508.
- [178] L. Nicu, M. Guirardel, F. Chambosse, P. Rougerie, S. Hinh, E. Trevisiol, J. Francois, J. Majoral, A. Caminade, E. Cattani et C. Bergaud, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 110 (2005), 125-136.
- [179] M. Guirardel, "Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré: détection de l'adsorption de nanoparticules d'or", thèse, spécialité Conception de Circuits Microélectroniques et Microsystèmes, Université de Toulouse, 2003.
- [180] C. Ayela, "Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel", thèse, spécialité Conception des Circuits Microélectroniques et Microsystèmes, Université de Toulouse, 2007.
- [181] C. Ayela, F. Vandevelde, D. Lagrange, K. Haupt et L. Nicu, *Angewandte Chemie*, vol. 119 (2007), 9431-9434.

CHAPITRE II :

Design et fabrication de micromembranes à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive

II.1. Dimensionnement des micromembranes

II.1.1. Contexte et pré-acquis.

Les travaux au Laboratoire d'Analyses et d'Architectures des Systèmes de Toulouse sur les micromembranes ont été initiés en 2000 par Christian Bergaud. Après avoir travaillé sur des structures de types ponts et leviers au cours de la thèse de doctorat de Liviu Nicu (2000) [1], le choix de structures membranaires s'est imposé de part leur plus grande facilité de fabrication (une gravure quasi-traversante à partir de la face arrière d'une plaquette de silicium défini une membrane). Le fait de disposer d'une surface plane permet d'envisager plus facilement leur fonctionnalisation et leur usage en tant que biocapteur. Elles sont également plus robustes pour une utilisation dans le liquide.

L'utilisation des micromembranes résonantes à des fins de microgravimétrie se traduit par une sensibilité exprimée comme le rapport entre le changement de fréquence de résonance et la masse déposée. La sensibilité représente l'efficacité d'amplification de la méthode de transduction. Cette caractéristique intrinsèque des BioMEMS doit être estimée afin d'effectuer un dimensionnement cohérent de nos micro-résonateurs. Dans le cadre de cette étude c'est au travers de l'analyse modale du comportement dynamique des membranes que nous avons choisi d'aborder l'estimation de leur sensibilité massique intrinsèque. En effet, l'approche modale permet de décomposer l'analyse de la vibration de la membrane en l'étude de plusieurs modes de vibrations distincts. Chaque mode de vibration correspond à une fréquence de résonance propre du système et à un profil géométrique de vibration défini. Cette méthode permet l'analogie entre le problème d'une membrane solide en vibration et l'étude d'une infinité de systèmes ponctuels de type « masse-ressort ».

Afin de convertir la transduction mécanique en un signal électrique mesurable, la localisation et les paramètres géométriques des piézorésistances doivent être optimisés. Dans cette optique, nous présenterons un descriptif des principes de la détection piézorésistive. Puis, nous utiliserons un simulateur de modèles à éléments finis, afin d'étudier les caractéristiques harmoniques de la détection piézorésistive et déterminer notamment la couverture angulaire optimale des piézorésistances par rapport à l'encastrement.

En ce qui concerne l'actionnement et l'étude de la déformée statique initiale de la membrane, l'étude a été menée par C. Ayela pour des micromembranes à actionnement et détection piézoélectrique. L'étude de l'actionnement dans le cas de nos microstructures se confondrait avec celle menée par C. Ayela, ainsi nous nous référons à ces travaux pour le dimensionnement de la pastille de PZT équipant nos micromembranes. Les résultats obtenus montrent que l'efficacité d'actionnement de

la résonance est optimale lorsque le rayon de la pastille piézoélectrique est égal à la moitié du rayon total de la membrane [2]. L'étude statique permet également de déterminer sous quelles conditions les contraintes intrinsèques initiales des matériaux provoquent le flambement de la membrane. Nous dimensionnerons nos membranes afin d'éviter le flambement de leur structure lors de leur libération. Le détail de cette étape sera exposé en annexe A.

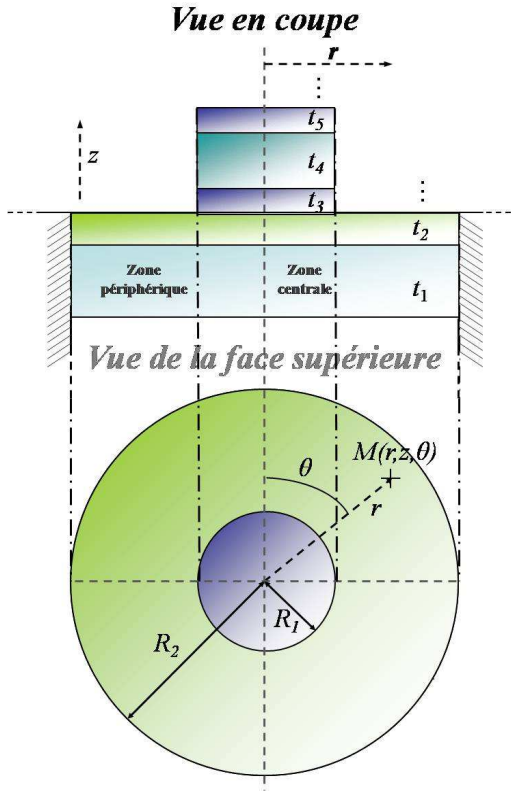
Dans un deuxième temps, nous chercherons à estimer la sensibilité massique de nos membranes lorsqu'elles vibrent dans le fluide. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le fluide environnant a une influence considérable sur les caractéristiques vibratoires des membranes et ainsi sur leur sensibilité en tant que biocapteur. Afin de prendre en compte l'influence du fluide environnant sur les propriétés vibratoires des micromembranes, nous ferons appel ici au modèle développé par H. Lamb en 1920 [3] dans le cas d'une membrane vibrant avec la face supérieure en contact avec le liquide. Nous présenterons à ce moment là les considérations théoriques nécessaires à l'extension de ce modèle, établi initialement pour le mode de vibration fondamental, aux modes de vibrations supérieurs.

En fin de section, nous conclurons par un bref récapitulatif de l'ensemble des paramètres topologiques retenus, en vertu des principes théoriques abordés, pour la conception du microsystème final.

II.1.2. Etude du comportement dynamique des micromembranes : Détermination de la sensibilité massique

Dans le cadre de cette étude, les symétries de nos micromembranes circulaires incitent à traiter le problème en coordonnées cylindriques.

Nous considérons dans ce manuscrit des micromembranes constituées d'un empilement de couches matérielles et d'une pastille (le matériau piézoélectrique utilisé pour l'actionnement) centrale constituée elle-même de plusieurs couches. La pastille permet de définir deux zones : l'une, centrale et circulaire comprenant membrane et pastille piézoélectrique, l'autre annulaire et périphérique comprenant uniquement la membrane. Les différentes couches sont supposées isotropes transverses, linéaires et d'épaisseurs constantes. La figure 2.1 représente la topographie des micromembranes ainsi que les notations employées pour la décrire.



Dimensions	Notation
t_i	Épaisseur de la couche i
R_1	Rayon de la zone centrale
R_2	Rayon externe de la zone périphérique
$u_r(r, z, \theta)$	Déplacement radial du point M
$w(r, z, \theta)$	Déflexion du point M
$u_\theta(r, z, \theta)$	Déplacement circonférentiel du point M
$F(r, z, \theta) \begin{pmatrix} F_r(r, z, \theta) \\ F_z(r, z, \theta) \\ F_\theta(r, z, \theta) \end{pmatrix}$	Résultante des forces appliqués au point M
Propriétés des matériaux	
E_i	Module d'Young de la couche i
ν_i	Coefficient de Poisson de la couche i
ρ_i	Masse volumique de la couche i

Figure 2.1 : Représentation schématique de la configuration géométrique des membranes multi-couches supportant une pastille de matériau (ici, piézoélectrique). A droite, description des différentes notations.

Afin de traiter l'analyse modale de nos micromembranes, nous considérons l'analogie avec le modèle d'une membrane circulaire encastrée sur son pourtour d'épaisseur h et de rayon R en vibration dans l'air. Ce cas est connu dans la littérature et l'analogie avec nos micromembranes reste cohérente ici, pour la détermination des modes propres de résonance dans le cas d'une membrane élastique mince (dimensions latérales grandes devant l'épaisseur). Pour traiter ce problème, nous considérons que la membrane d'épaisseur h peut être traitée comme une plaque bidimensionnelle plane avec une masse surfacique égale à ρh . L'analyse modale d'une telle structure consiste en la résolution du problème dit de la vibration libre et non-amortie de cette structure. Partant de l'équation différentielle générale régissant le mouvement du point $M(r, \theta)$ (cas d'une membrane bidimensionnelle) de la membrane au cours du temps, le problème de la vibration libre et non-amortie s'obtient en éliminant les termes dus aux forces extérieures appliquées ainsi que les coefficients d'amortissements. Ce problème en coordonnées cylindriques se décrit par la résolution de l'équation suivante

$$D \left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} \right) \times \left(\frac{\partial^2 w(r, \theta, t)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial w(r, \theta, t)}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 w(r, \theta, t)}{\partial \theta^2} \right) + \overline{\rho h} \frac{\partial^2 w(r, \theta, t)}{\partial t^2} = 0 \quad (2.1)$$

Ici, D représente la rigidité flexionnelle de la membrane et doit être calculée dans le cadre de l'analogie décrite ici comme la rigidité flexionnelle équivalente de l'ensemble de l'empilement de couches et en prenant en compte les contraintes initiales et inter-couches des matériaux. $\overline{\rho h}$ représente une masse par unité de surface représentative de la densité du matériau de la plaque.

L'analyse modale consiste alors à assumer que la solution à cette équation est une fonction où le temps et l'espace sont découplés, de la forme :

$$w(r, \theta, t) = \phi(r, \theta) \chi(t) = \phi(r, \theta) \chi e^{j\omega t} \quad (2.2)$$

Où $\chi(t)$ est une fonction harmonique du temps d'amplitude complexe χ et de pulsation ω . En combinant (2.1) et (2.2), on obtient l'équation suivante :

$$\Pi[\phi(r, \theta)] D\chi(t) + \overline{\rho h} \phi(r, \theta) \frac{\partial^2}{\partial t^2} \chi(t) = 0 \quad (2.3)$$

Avec Π un opérateur différentiel spatial linéaire du quatrième ordre défini comme suit :

$$\Pi = \frac{1}{r^4} \left(\frac{\partial^4}{\partial \theta^4} + \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} \right) - \frac{1}{r^3} \left(2 \frac{\partial^3}{\partial r \partial \theta^2} + \frac{\partial}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \left(2 \frac{\partial^4}{\partial r^2 \partial \theta^2} - \frac{\partial^2}{\partial r^2} \right) + \frac{2}{r} \left(\frac{\partial^3}{\partial r^3} \right) + \frac{\partial^4}{\partial r^4} \quad (2.5)$$

La résolution de cette équation peut être abordée sous l'angle de la recherche de valeurs propres du système formé par l'équation (2.6).

$$\Pi[\phi(r, \theta)] = \zeta \phi(r, \theta) \text{ avec } \zeta = 4\pi^2 f^2 \quad (2.6)$$

Ainsi, résoudre le problème de la vibration libre et non amortie d'une membrane consiste à chercher des valeurs du paramètre ζ pour lesquelles il existe des fonctions non nulles satisfaisant l'équation (2.6) et les conditions aux frontières caractéristiques d'une membrane encastree sur son pourtour à savoir :

$$\phi(R_2, \theta) = \frac{\partial \phi(r, \theta)}{\partial r} \Big|_{r=R_2} = 0 \quad (2.7)$$

De telles valeurs sont appelées **valeurs propres** et les fonctions associées, **fonctions propres**. La solution de ce problème pour un système à deux dimensions planaires réside en une matrice bidimensionnelle infinie de valeurs propres $(\zeta_{mn}) \forall (m, n) \in \mathbb{N} \times \mathbb{N}$ et en une matrice correspondante de fonctions propres $(\phi_{mn}) \forall (m, n) \in \mathbb{N} \times \mathbb{N}$. Chaque paire formée d'une valeur propre (donc d'une pulsation et d'une fréquence propre) et de la fonction (spatiale) propre associée définit un *mode* du système. Les fonctions propres de chaque mode sont souvent appelés *formes de mode* du système oscillant.

L'analyse modale stipule que la réponse à l'équation du mouvement de la membrane libre ou forcée (absence ou présence de forces extérieures) peut se décomposer complètement dans la base de ses modes propres de vibrations, de la manière suivante :

$$w(r, \theta, t) = \sum_{(m,n)=(0,0)}^{(\infty,\infty)} \phi_{mn}(r, \theta) \chi_{mn}(t) \quad (2.8)$$

Si l'on remplace M , par sa décomposition dans la base de ses modes propres de vibrations, alors l'équation différentielle du mouvement s'exprime comme suit :

$$\sum_{(m,n)=(0,0)}^{(\infty,\infty)} \left(\Pi[\phi_{mn}(r,\theta)] D\chi_{mn}(t) + \overline{\rho h} \phi_{mn}(r,\theta) \frac{\partial^2 \chi_{mn}(t)}{\partial t^2} \right) = 0 \quad (2.9)$$

Pour étudier un mode de résonance en particulier (n,m) , il convient de multiplier l'équation (2.9) par la forme du mode considéré et d'intégrer sur la surface de la membrane. Les formes de modes étant orthogonales entre elles, c'est-à-dire :

$$\int_A \phi_{mn}(r,\theta) \phi_{ij}(r,\theta) = A \delta_{mi} \delta_{nj}, \quad (2.10)$$

où A est la surface totale de la membrane et δ_{ab} est le symbole de Kronecker, il ne reste dans la somme de l'équation (2.9) que les produits associés au mode (m,n) que l'on cherche à étudier soit :

$$\chi_{mn}(t) \left(\int_0^{R_2} \int_0^{2\pi} \Pi[\phi_{mn}(r,\theta)] D\phi_{mn}(r,\theta) r dr d\theta \right) + \ddot{\chi}_{mn}(t) \left(\int_0^{R_2} \int_0^{2\pi} \phi_{mn}^2(r,\theta) \overline{\rho h} r dr d\theta \right) = 0 \quad (2.11)$$

A partir de cette équation, il est aisé de reconnaître la forme simple de l'équation différentielle pour un système masse-ressort oscillant non-amorti. On peut alors résumer cette analogie en introduisant les formules suivantes dans lesquelles nous définissons deux constantes, $M_{eff(m,n)}$ et $K_{eff(m,n)}$ respectivement, la masse équivalente modale et la raideur équivalente modale caractéristique de la vibration de la membrane selon le mode (m,n) .

$$M_{eff(m,n)} \ddot{\chi}(t) + K_{eff(m,n)} \chi(t) = 0 \quad (2.12)$$

$$\text{avec } M_{eff(m,n)} = \int_0^{R_2} \int_0^{2\pi} \phi_{mn}^2(r,\theta) \overline{\rho h} r dr d\theta \quad (2.13)$$

$$\text{et } K_{eff(m,n)} = \int_0^{R_2} \int_0^{2\pi} \Pi[\phi_{mn}(r,\theta)] D\phi_{mn}(r,\theta) r dr d\theta \quad (2.14)$$

La solution de l'équation différentielle à un tel système est connue et l'on peut définir ainsi la fréquence de résonance de notre système vibrant selon le mode (m,n) comme :

$$f_{mn} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K_{eff(m,n)}}{M_{eff(m,n)}}} \quad (2.15)$$

Les paramètres de masse, constante de raideur et constante d'amortissement efficace pour le mode (m,n) sont très importants pour caractériser l'état vibratoire de la membrane selon ce mode.

Ils permettent également de calculer la sensibilité massique en fréquence associée au système oscillant considéré. En effet, la sensibilité se définit comme le rapport entre le décalage de fréquence de résonance induit par un dépôt de masse et la masse dudit dépôt, cela peut se formaliser comme ceci :

$$S_{freq} = \frac{df}{dm} \quad (2.16)$$

Or, si l'on calcule les dérivées logarithmiques des deux termes de l'équation on obtient l'équation suivante :

$$\frac{df_{mn}}{f_{mn}} = -\frac{1}{2} \frac{dM_{eff(m,n)}}{M_{eff(m,n)}} = -\frac{1}{2} \frac{dM_{micromembrane}}{M_{micromembrane}} \quad (2.17)$$

Ce qui nous permet de définir la formule générale suivante pour la sensibilité massique de nos micromembranes vibrant selon le mode (m,n) :

$$S_{freq(m,n)} = -\frac{1}{2} \frac{f_{mn}}{M_{micromembrane}} \quad (2.18)$$

Avec f_{mn} , la fréquence de résonance de la membrane vibrant selon le mode (m,n) .

Notons enfin qu'il est possible sous certaines conditions d'émettre l'hypothèse d'une relation linéaire entre la masse totale de la micromembrane $M_{micromembrane}$ et la masse modale effective de la micromembrane vibrant selon le mode (m,n) $M_{eff(m,n)}$. Il est alors possible d'écrire :

$$S_{freq(m,n)} = \frac{df_{mn}}{dm} = -\frac{1}{2} \frac{f_{mn}}{M_{micromembrane}} = -\frac{1}{2} \frac{C_{mn} f_{mn}}{M_{eff(m,n)}} \quad (2.19)$$

Avec C_{mn} le rapport entre masse réelle de la micromembrane et masse effective de la micromembrane vibrant selon le mode (m,n) .

Dans l'optique d'estimer la sensibilité de nos micromembranes vibrant selon le mode (m,n) selon l'équation (2.18), il convient de calculer f_{mn} , ce qui impose de connaître $M_{eff(m,n)}$ et $K_{eff(m,n)}$ avec précision (cf équation 2.15).

Dans le cas de nos membranes, il convient afin de connaître ces deux paramètres d'intégrer la contribution en masse et en raideur de chaque couche. Il serait nécessaire alors de séparer en deux termes l'intégration des équations (2.13) et (2.14) pour distinguer la zone circulaire centrale constituée d'un empilement de 5 couches de la zone périphérique annulaire constituée de deux couches seulement (cf figure 2.1).

Le calcul de la masse effective de nos micromembranes se conduirait alors comme suit :

$$M_{eff(m,n)} = \underbrace{\left(\sum_{i=1}^2 \rho_i t_i \right) \int_{R_1}^{R_2} \int_0^{2\pi} \phi_{mn}^2(r, \theta) r dr d\theta}_{\text{Zone périphérique}} + \underbrace{\left(\sum_{i=1}^5 \rho_i t_i \right) \int_0^{R_1} \int_0^{2\pi} \phi_{mn}^2(r, \theta) r dr d\theta}_{\text{Zone centrale}} \quad (2.20)$$

Dans ce calcul, les formes de modes $\phi_{mn}(r, \theta)$ sont considérées comme étant identiques aux formes de modes d'une membrane monocouche d'épaisseur h de masse volumique ρ de rayon R et encastrée sur son pourtour. La formalisation des formes des modes de vibration ainsi que des fréquences de résonance est donnée par Blevins [4] sous la forme d'une combinaison de fonctions de Bessel du premier ordre, non modifiée J_m et modifiée I_m :

$$\phi_{mn}(r, \theta) = \left[J_m \left(\frac{\lambda_{mn} r}{R} \right) - \frac{J_m(\lambda_{mn})}{I_m(\lambda_{mn})} I_m \left(\frac{\lambda_{mn} r}{R} \right) \right] \cos m\theta \quad (2.21)$$

et

$$f_{mn} = \frac{\omega_{mn}}{2\pi} = \frac{\lambda_{mn}^2}{2\pi R^2} \left[\frac{Eh^2}{12\rho(1-\nu^2)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.22)$$

λ_{mn} représente un coefficient sans dimension, caractéristique de chaque mode de vibration.

Cette hypothèse est considérée comme valide sous la condition (dite des *membranes minces*) que l'épaisseur de l'empilement multicouche constitutif de la membrane soit faible devant les dimensions latérales de celle-ci. Ceci sera vérifié dans notre cas (voir section fabrication II.2).

Le calcul de $K_{eff(m,n)}$, nécessaire pour obtenir f_{mn} se mènerait quant à lui en partant de l'équation suivante [5]:

$$K_{eff(m,n)} = \underbrace{D_{périphérique} \int_{R_1}^{R_2} \int_0^{2\pi} \left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} \phi_{mn}(r, \theta) \right)^2 r dr d\theta}_{\text{Zone périphérique}} + \underbrace{D_{centrale} \int_0^{R_1} \int_0^{2\pi} \left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} \phi_{mn}(r, \theta) \right)^2 r dr d\theta}_{\text{Zone centrale}} \quad (2.23)$$

En dépit de la relative simplicité de la méthode analytique modale, une estimation de la fréquence de résonance des micromembranes basée sur le calcul des constantes modales de masse et de raideur effectives aurait pour principal désavantage de ne pas prendre en compte l'effet des contraintes internes initiales des matériaux. Ces précontraintes sont générées lors du dépôt des différents matériaux et ont une influence non négligeable sur le comportement dynamique des micromembranes [2]. Ces précontraintes internes sont réparties comme suit pour les différentes couches de nos micromembranes :

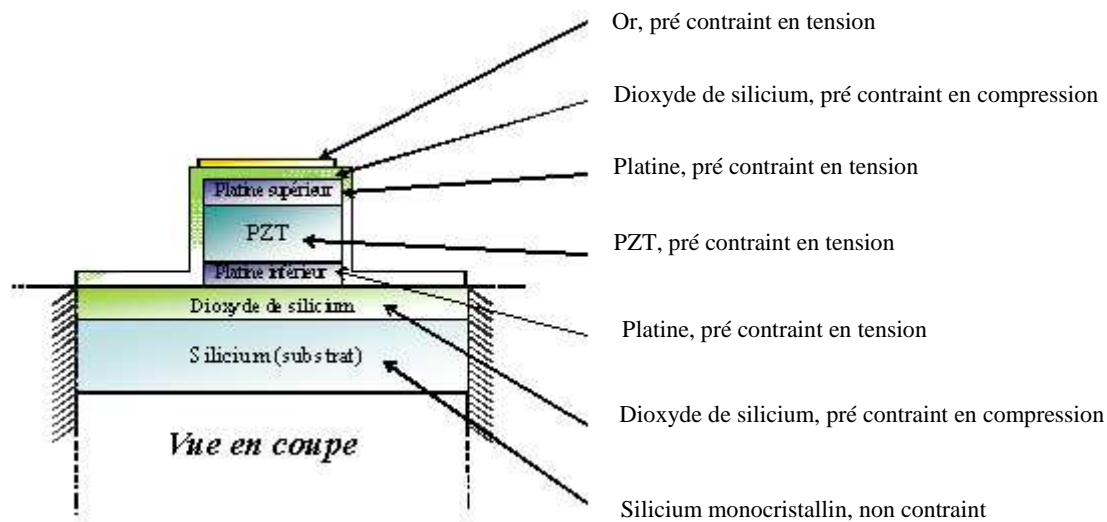


Figure 2.2 : Représentation en coupe de l'empilement de matériaux constitutifs du modèle éléments finis de la membrane.

Matériau	Contrainte	Méthode de mesure ou référence
Dioxyde de silicium	-220 MPa	Valeur estimée en mesurant la flèche en déformation d'une plaquette de Silicium (non-contraint) sur laquelle a été déposé le matériau considéré sur la totalité d'une de ses faces
Platine	500 MPa	Branger et al [6]
Or	90 MPa	Valeur estimée en mesurant la flèche en déformation d'une plaquette de Silicium (non-contraint) sur laquelle a été déposé le matériau considéré sur la totalité d'une de ses faces
PZT	200 MPa	Delobelle <i>et al</i> [7]

Table 2.1 : Valeurs numériques des contraintes initiales des matériaux des micromembranes.

La poursuite de la modélisation analytique du comportement dynamique de nos micromembranes jusqu'à un tel degré de raffinement est possible mais ne fait pas partie du cadre de cette étude. En effet, le caractère global de notre approche nécessite de pouvoir estimer la sensibilité massique associée à nos micromembranes grâce à une méthode efficace relativement rapide. Ceci peut être accompli en intégrant les effets des contraintes internes par le biais d'une analyse modale à partir d'un modèle à éléments finis. Le temps nécessaire sera alors bien inférieur à celui requis pour mener à son terme une telle modélisation analytique.

L'analyse modale à partir d'un modèle à éléments finis nous permet d'extraire les valeurs de fréquence de résonance et de masse effective et ainsi de déduire la sensibilité massique estimée pour nos membranes

II.1.3. Optimisation du mode de fonctionnement.

II.1.3.1. Analyse modale par éléments finis

On note chaque mode de résonance d'une membrane circulaire grâce à deux indices (m,n) servant à les différencier. On définit pour une membrane circulaire en vibration, les diamètres nodaux comme les lignes horizontales coupant la membrane par un diamètre et le long desquelles l'amplitude de vibration est nulle. De même, on définit les cercles nodaux comme les cercles centrés sur le centre de la membrane le long desquels l'amplitude de vibration est nulle au cours du temps (l'encastrement n'étant pas, par convention, un diamètre nodal possible). La donnée du couple d'entiers (m,n) correspondant respectivement au nombre de diamètres nodaux et au nombre de cercles nodaux suffit à décrire un mode de vibration. Il existe deux types de modes, les modes non dégénérés et les modes dégénérés. Les modes non-dégénérés sont les modes ne possédant pas de diamètres nodaux ($m=0$), pour ces modes possédant l'axisymétrie par rapport à l'axe z , une seule fréquence de résonance est possible. Les modes dégénérés quant à eux sont associés à deux ou plusieurs fréquences de résonance voisines, les formes de modes associés étant identiques via une rotation d'un angle $\frac{\pi}{q}$ (q étant un rationnel).

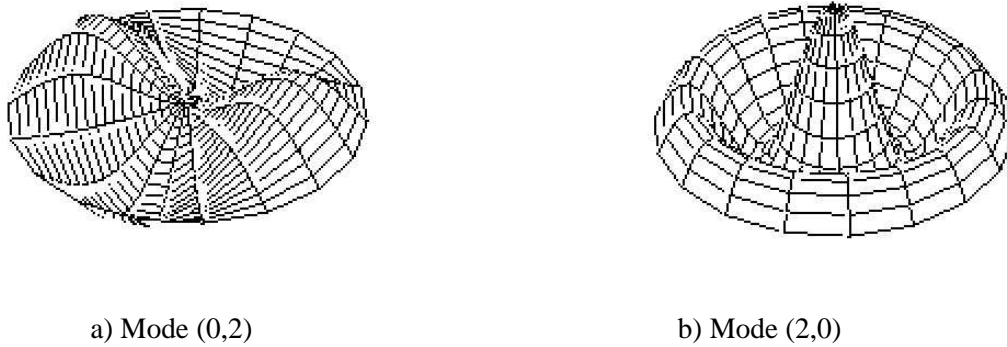
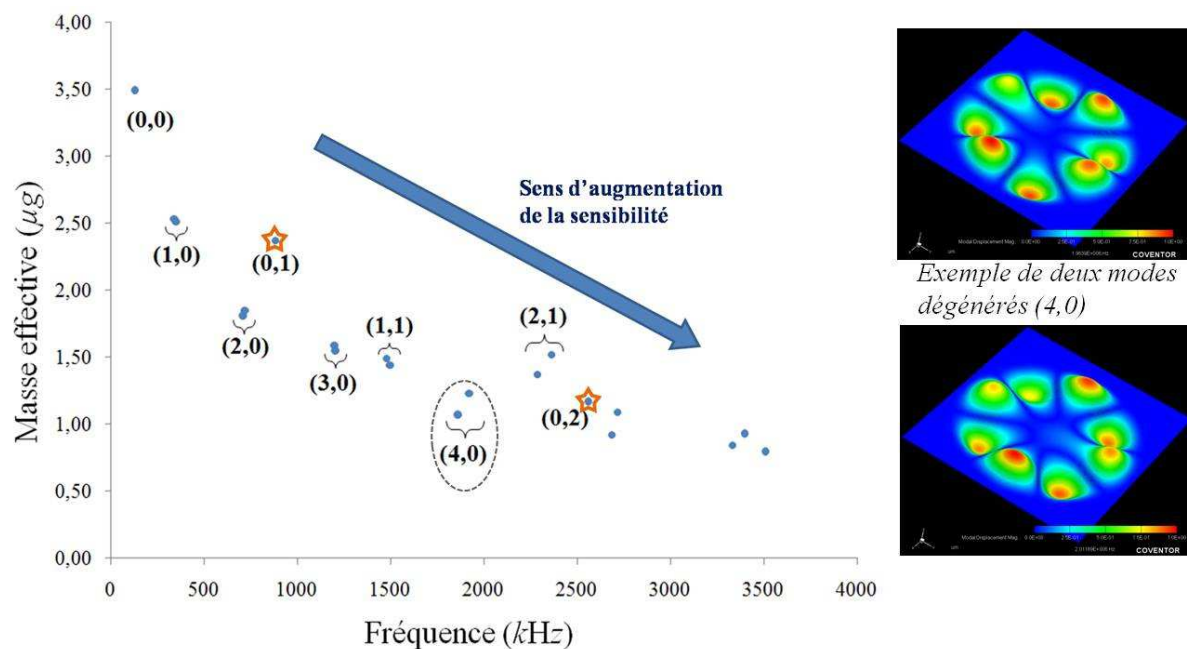


Figure 2.3 : Représentation schématique de la forme de mode, à gauche d'un mode dégénéré et à droite d'un mode non-dégénéré.

Les simulations modales nécessaires au dimensionnement des différentes membranes composant les puces avant leur fabrication (cf *section II.2*) ont été réalisées à l'aide du logiciel de simulation par modèles à éléments finis CoventorWare 2007. Les contraintes de chaque couche ont été implémentées dans le logiciel en fonction des valeurs communément rencontrées dans la littérature (cf *fig 2.2*). La piézorésistance n'a pas été prise en compte car considérée comme négligeable dans une analyse modale pour des raisons abordées plus tôt. Différentes structures de maillage du modèle des membranes ont été testées. La structure retenue comme vraiment adaptée à la géométrie de la membrane circulaire étudiée ici a été le modèle basé sur un arrangement de tétraèdres de différentes tailles. Cette structure permet d'adapter la précision du maillage au degré de détail des structures, plus large pour le substrat, plus précise autour des structures de la pastille d'actionnement. Pour ce type de modèle, l'utilisateur définit une taille moyenne pour l'ensemble des tétraèdres du modèle. Plusieurs dimensions ont été testées et une taille moyenne des tétraèdres de $2\ \mu\text{m}$ a permis d'atteindre un optimum entre précision de la mesure et temps de calcul. Ici, nous présentons l'analyse conduite pour une micromembrane d'un rayon de $400\ \mu\text{m}$ avec une pastille d'actionnement de rayon $200\ \mu\text{m}$. La

table 2.2 et la figure 2.4 présentent les fréquences de résonance ainsi que les masses effectives modales associées à chacun des 15 premiers modes de cette membrane.



Mode	Fréquence de résonance (kHz)	Masse effective (μg)	Raideur effective (kg.s^{-2})
(0,0)	128,06	3,49	2,26E+03
(1,0)	336,75	2,53	1,13E+04
(1,0) (rotation $\pi/2$)	347,58	2,51	1,20E+04
(2,0)	704,65	1,81	3,54E+04
(2,0) (rotation $\pi/4$)	715,18	1,85	3,74E+04
(0,1)	878,26	2,37	7,23E+04
(3,0)	1195,51	1,59	8,95E+04
(3,0) (rotation $5\pi/6$)	1199,63	1,55	8,81E+04
(1,1)	1476,34	1,49	1,28E+05
(1,1) (rotation $\pi/2$)	1492,11	1,44	1,27E+05
(4,0)	1856,73	1,07	1,45E+05
(4,0) (rotation $\pi/8$)	1917,94	1,23	1,78E+05
(2,1)	2282,39	1,37	2,82E+05
(2,1) (rotation $\pi/4$)	2360,29	1,52	3,34E+05
(0,2)	2556,06	1,17	3,02E+05

Table 2.2 : Table des résultats de l'analyse modale menée grâce à une simulation par éléments finis pour une membrane de 400 μm de rayon surmontée d'une pastille piézoélectrique

II.1.3.2 Avantages d'une opération des membranes sur des modes supérieurs au fondamental.

Au cours des précédents travaux menés sur les micromembranes résonantes au sein du groupe Nanobiosystèmes, la seule approche envisagée pour augmenter la sensibilité des membranes était de réduire leurs dimensions. En effet, on réalise ainsi une augmentation de la fréquence de résonance de la membrane suivant le mode fondamental tout en diminuant de fait la masse de la membrane. Cependant, l'expérience passée au sein du groupe a montré que la réduction de la taille des membranes allait de pair avec une difficulté grandissante de maîtrise de la géométrie. Cette incertitude a une influence substantielle sur l'efficacité de la détection piézorésistive (*cf section II.1.5*). De plus, pour des dimensions latérales inférieures à 10 μm , les pastilles de PZT déposées présenteront de nombreuses anomalies de leur capacité piézoélectrique. La non-maturité de ces technologies pour de telles dimensions nous incite à envisager une approche différente que la réduction en taille pour augmenter la sensibilité des membranes. Ici, nous justifions les deux principaux arguments qui nous ont amenés à envisager l'utilisation de membranes plus larges

Premièrement, dans le cadre d'une détection du mouvement par des jauges piézorésistives, un paramètre critique à contrôler concerne la position de ces jauges par rapport à l'encastrement. Or, la réduction en taille entraîne des procédés de gravure moins contrôlables et donc une plus grande incertitude quant à la position relative des jauges piézorésistives vis-à-vis de l'encastrement. En réalisant des membranes plus grandes, ce problème est contourné.

Deuxièmement, la problématique qui nous occupe exige des temps de réponse du capteur relativement courts. Si le capteur possède une masse minimum détectable correspondant à n entités biologiques, le temps de réponse du capteur sera le temps moyen pour que n espèces biologiques présentes en solution se greffent à la surface du biocapteur. Or, seuls des phénomènes de diffusion sont responsables du mouvement des entités biologiques au sein de la solution. Pour deux capteurs de masse minimum détectable identique, mais possédant des surfaces vibrantes fonctionnalisées de taille différente, le temps de réponse sera plus court pour le capteur possédant la surface de capture fonctionnalisée la plus grande.

En réaction à ces deux arguments, il faut objecter que par rapport aux derniers travaux sur le sujet (pour rappel, les micromembranes utilisées pendant les travaux de thèse de Cédric Ayela faisaient 100 μm de rayon), toutes choses égales par ailleurs, l'utilisation de membranes aux rayons plus importants entraînera une diminution de la sensibilité massique. C'est pour combler cette perte de sensibilité que nous combinerons dans le cadre de cette étude, membranes avec des rayons de l'ordre du demi-millimètre et vibration selon des modes supérieurs au fondamental (i.e. des modes (m,n) avec $(m,n) \neq (0,0)$). En effet, la fréquence de résonance augmente pour les modes de vibrations supérieurs. La sensibilité massique associée aux modes de vibration supérieurs sera donc meilleure que celle associée au mode fondamental de part ce simple fait.

Enfin, lors de la vibration de la micromembrane dans un milieu liquide, l'utilisation du mode de vibration fondamental provoque un fort couplage entre la membrane et le liquide présent sur sa face ; ce couplage contribue à ce que le mode fondamental soit fortement amorti par le fluide environnant. Southworth *et al* ont montré que l'utilisation de modes de résonance supérieurs tendait à réduire ce couplage et donc à réduire l'amortissement des vibrations par la présence d'un fluide environnant [8].

II.1.4. Remarques sur la théorie de l'actionnement

La mise en vibration de la membrane est réalisée par la pastille piézoélectrique via l'utilisation de l'effet piézoélectrique indirect. L'application d'une tension aux bornes du matériau piézoélectrique génère principalement une extension transversale du matériau. Etant solidaire du reste de la membrane, cette extension génère des contraintes latérales au sein de la membrane. Or, la pastille piézoélectrique se situant hors du plan neutre (par définition, plan dans lequel les contraintes s'équilibrent dans un état global de contraintes nulles), les contraintes latérales s'exerçant sur la membrane se traduisent par la génération d'un moment de flexion distribué. C'est ce moment de flexion qui induit la déformation de la membrane selon l'axe z . Il est possible d'exprimer une relation formelle entre la tension appliquée aux bornes de la couche piézoélectrique et le moment résultant appliquée à la membrane. L'établissement d'une telle relation a permis à DeVoe [9] de modéliser des structures résonantes de type pont à actionnement et détection piézoélectrique sous la forme simple d'un circuit électrique équivalent permettant de rendre compte facilement de la résonance du système actionnement-pont-détection complet. Une étude pour étendre le modèle de DeVoe établi pour des ponts piézoélectriques au cas de membranes à actionnement et détection piézoélectrique (traités dans les travaux de thèse de Cédric Ayela) a été effectué et a donné lieu à plusieurs publications [10][11]. Par souci de synthèse, nous n'intégrons pas la description de ce modèle au sein de ce manuscrit. Le choix a été fait de s'en tenir aux fondements de la théorie piézoélectrique suffisant pour expliquer la mise en régime de vibration entretenue de la membrane.

Les équations fondamentales de la piézoélectricité en coordonnées cartésiennes stipulent la relation suivante entre le champ électrique appliqué $\vec{E}(E_x, E_y, E_z)$ et la déformation (longitudinale et en cisaillement) du matériau piézoélectrique :

$$\begin{bmatrix} \epsilon_{xx} \\ \epsilon_{yy} \\ \epsilon_{zz} \\ \epsilon_{yz} \\ \epsilon_{zx} \\ \epsilon_{xy} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{21} & d_{31} \\ d_{12} & d_{22} & d_{32} \\ d_{13} & d_{23} & d_{33} \\ d_{14} & d_{24} & d_{34} \\ d_{15} & d_{25} & d_{35} \\ d_{16} & d_{26} & d_{36} \end{bmatrix} \bullet \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad (2.24)$$

Dans notre cas, le champ électrique est généré par l'application d'une tension V_{in} , aux bornes du condensateur plan, constitué du matériau piézoélectrique et des deux électrodes métalliques. Nous faisons ici l'approximation du condensateur plan infini et assumons que $E_x = E_y = 0$. De plus, nous négligeons les déformations de cisaillement qui n'ont que peu d'influence dans le cas de structures suspendues pour lesquelles l'épaisseur est négligeable devant les dimensions latérales. Alors, nous déduisons de (2.24) que l'essentiel de la déformation du matériau sera porté par les coefficients piézoélectriques d_{31} , d_{32} et d_{33} . Ceci est particulièrement vrai dans le cas du PZT qui possède des coefficients électriques transverses d_{31} et d_{32} élevés, justifiant son utilisation comme actionneur dans de nombreuses applications [12].

Parmi ces trois coefficients, celui lié à la déformation verticale d_{33} génère un gonflement du

matériau piézoélectrique selon l'axe z . L'influence de ce gonflement sur la mise en vibration de la membrane peut être négligée en comparaison des effets des coefficients piézoélectriques de déformation longitudinale transverse d_{31} et d_{32} . Ceux-ci sont presque entièrement responsables de la création du moment distribué, générateur de la vibration de la membrane [13].

L'influence de la tension d'actionnement et du rayon de la pastille d'actionnement sur l'efficacité de l'actionnement a été déjà étudiée lors de la réalisation de plusieurs configurations de membranes résonantes. Le point de fonctionnement optimal a été trouvé pour une tension d'actionnement sinusoïdale d'amplitude 100 mV et centrée autour d'une valeur continue appelé bias et égale à +1V [2].

II.1.5. Optimisation de la détection piézorésistive

II.1.5.1. Éléments de théorie, optimisation du dimensionnement des piézorésistances.

La capacité de certains matériaux à exhiber des changements de résistivité électrique sous l'action d'un stress mécanique, phénomène désormais connu sous le nom de piézorésistivité, a été découverte par Lord Kelvin en 1856. Au 20^{ème} siècle, alors que les matériaux cristallins étaient utilisés pour de nombreuses applications électriques, les capacités piézorésistives exceptionnelles du silicium et du germanium furent redécouvertes et amplifiées par Smith [14][15]. La piézorésistivité des métaux est principalement liée à la modification de la géométrie du matériau (s'il est cristallin, il s'agit le plus souvent d'un changement de la longueur de maille caractéristique). Ainsi, si l'on exprime la sensibilité piézorésistive κ d'un métal, soit le rapport entre la variation relative de résistance et la variation relative de sa longueur, on peut écrire :

$$\kappa = \frac{\frac{\Delta R}{R}}{\frac{\Delta l}{l}} \quad (2.25)$$

Or, nous connaissons l'expression de la résistance de ce conducteur comme étant :

$$R = \rho_e \frac{l}{S} \quad (2.26)$$

Avec ρ_e la résistivité du matériau, l la longueur et S la section du conducteur. La résistivité d'un métal aux propriétés piézorésistives ne peut être considérée comme constante. Il convient de considérer sa variation avec le volume V du métal grâce à la relation suivante.

$$\frac{d\rho_e}{\rho_e} = C \frac{dV}{V}$$

avec C la constante de Bridgman ($C_{\text{métal}} \approx 1$; $C_{\text{semiconducteur}_P} = 100$; $C_{\text{semiconducteur}_N} = -100$). Nous obtenons alors :

$$\frac{\Delta \rho_e}{\rho_e} = C \frac{\Delta V}{V} = C \left(\frac{\Delta L}{L} + \frac{\Delta S}{S} \right) = C (\epsilon_L + 2\epsilon_T)$$

On peut alors exprimer la différentielle de l'équation (2.26) :

$$\frac{\Delta R}{R} = C \left(\frac{\Delta L}{L} + \frac{\Delta S}{S} \right) + \frac{\Delta L}{L} - \frac{\Delta S}{S} = [C(1 - 2\nu) + 1 + 2\nu] \epsilon_L = K \epsilon_L$$

Le changement de la taille de la maille cristalline modifie la résistivité du matériau. Le changement de la résistance est lié quant à lui, au changement de la résistivité conjugué à la modification du volume du matériau soumis à une contrainte. On peut alors obtenir le facteur de sensibilité piézorésistive du métal sous la forme suivante [16] :

$$\kappa = C(1 - 2\nu) + 1 + 2\nu \quad (2.27),$$

Ce qui nous donne une valeur proche de 2 pour les métaux.

Dans le cas de matériau semi-conducteurs, la sensibilité piézorésistive observée peut être dans certains cas jusqu'à deux ordres de magnitude supérieure à celle exhibée par les métaux. En effet, le caractère piézorésistif de certains semi-conducteurs ne repose pas uniquement sur un changement de géométrie induit par la contrainte mais également sur une altération de la structure de bandes de conduction des éléments constitutifs du réseau sous l'effet de la contrainte appliquée. Ceci se traduit en théorie par une dépendance du paramètre ρ_e à la contrainte via l'introduction de coefficients piézorésistifs transverses spécifiques aux semi-conducteurs, liés à la modification de la mobilité des porteurs de charge sous l'influence des contraintes.

Les piézorésistances fabriquées à partir d'un matériau semi-conducteur sont fortement influencées par la lumière et la température, induisant des caractéristiques de dissociation/recombinaison des porteurs différentes. Afin de s'affranchir de ces effets parasites, ces piézorésistances sont souvent montées en pont de Wheatstone avec d'autres résistances de référence, permettant des mesures différentielles.

La structure piézorésistive étudiée ici est définie dans la matrice de silicium constitutive de la membrane via un procédé d'implantation ionique (*cf. section II.2.2*). Optimiser la variation relative de résistance $\frac{\Delta R}{R}$ de cette dernière nécessite de connaître parfaitement sa géométrie ainsi que sa localisation par rapport au profil de contraintes décrivant la membrane en vibration.

Etant donné qu'il n'existe pas de méthodes analytiques simplifiées pour rendre compte de la distribution des contraintes au sein d'une membrane aux couches précontraintes et vibrant selon un mode de résonance (m,n), nous avons utilisé un logiciel de simulation par éléments finis pour accéder à cette information. Une fois le profil de contraintes au sein de la membrane connu pour différentes valeurs de la fréquence d'oscillation hors résonance et à la résonance selon le mode (m,n), nous avons estimé, via ce profil, la variation de résistance relative de la piézorésistance sous une polarisation en tension.

De nombreuses configurations géométriques ont été simulées pour les piézorésistances afin de

déterminer laquelle offrait la plus grande variation $\frac{\Delta R}{R}$ à la résonance. Nous ne présenterons pas dans cette section toutes les configurations testées pour la piézorésistance. En effet, de nombreux travaux ont montré que les contraintes étaient maximales au voisinage de l'encastrement, c'est donc à cet endroit qu'on doit observer les plus grandes variations de contrainte donc de piézorésistance. De même, à l'encastrement, selon l'axe vertical z , les contraintes maximales sont confinées près de la surface (avant et arrière) de la membrane [17]. Ainsi, à titre d'exemple, après avoir fixé la position par rapport à l'encastrement et la largeur de nos piézorésistances, nous présentons les résultats de l'analyse harmonique piézorésistive autour de la fréquence de résonance du mode de vibration (0,1) pour différentes valeurs d'ouverture angulaire de la piézorésistance. La figure 2.5 représente une vue schématique de la configuration géométrique de la piézorésistance par rapport à l'encastrement, les courbes de variation relative de résistance pour les trois ouvertures angulaires sont exposées à la figure 2.6.

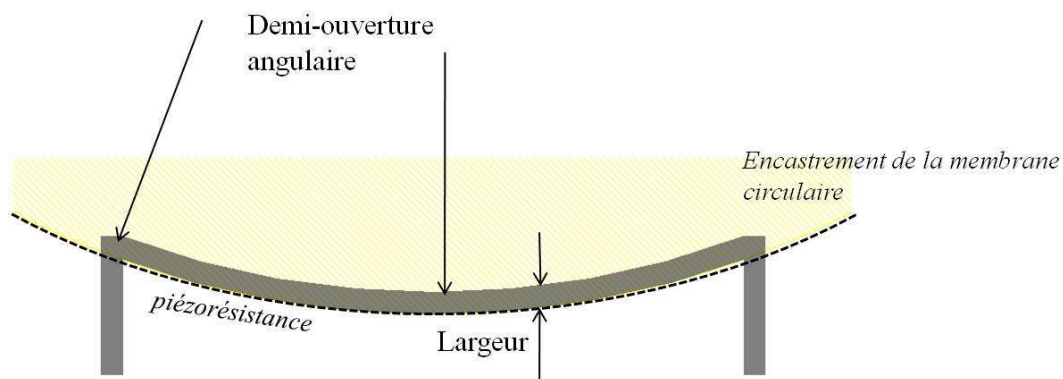


Figure 2.5 : Configuration géométrique de la jauge piézorésistive utilisée pour la détection du mouvement de la micromembrane résonante.

Ces trois configurations ont abouti aux trois courbes suivantes (*il s'agit de variations relatives de résistance en fonction de la fréquence d'excitation*).

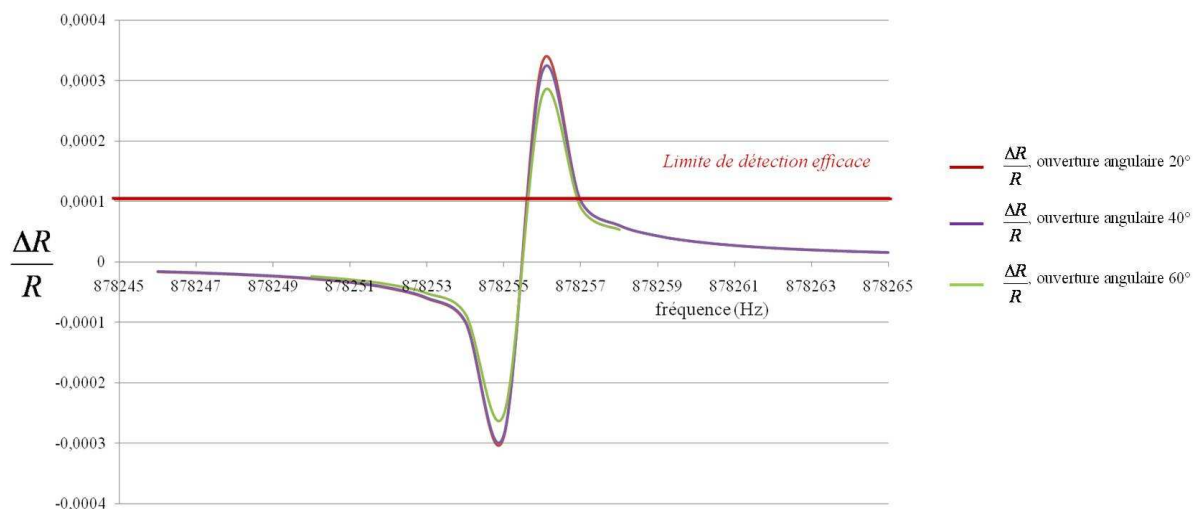


Figure 2.6 : Graphique des variations relative de la piézorésistance, pour plusieurs ouvertures angulaires différentes, en fonction de la fréquence de vibration de la membrane, autour du mode (0,1) pour une membrane avec $R_2=400 \mu m$.

Ces courbes attestent de la capacité d'un élément piézorésistif à détecter la résonance de la membrane au sein de laquelle il est intégré. Les variations relatives de résistance $\Delta R/R$, au moment de la résonance excèdent un niveau de variations relatives suffisant, défini par les caractéristiques de l'électronique de détection pour générer un signal électrique avec un rapport signal sur bruit acceptable.

II.1.5.2. Choix des modes de résonance

Il est important de s'attarder ici sur les modes de vibrations possibles pour une détection piézorésistive. Comme on a pu le constater, certains modes sont dits dégénérés lorsqu'ils possèdent au moins un axe de symétrie. Ces modes sont souvent couplés deux par deux, avec la même forme de mode de vibration mais l'un obtenu par rotation de l'autre d'un angle $\frac{\pi}{q}$ (q étant un rationnel). La

figure 2.7 donne un exemple avec le mode (2,0), d'une forme de mode dit « dégénéré ». On comprend, en observant ce mode, que certaines positions de la piézorésistances ne permettraient pas la détection du mouvement. En effet, si la jauge piézorésistive se trouve à cheval entre une zone de « ventre » d'amplitude dans un sens et une zone d'amplitude inverse, celle-ci subira deux effets inverses (l'un, sur une partie, d'augmentation de sa résistance et l'autre, sur l'autre partie de diminution) qui pourraient se compenser et ne permettre aucune détection de mouvement. C'est pour s'assurer que ce cas ne se présentera pas que nous avons décidé de ne pas viser un fonctionnement de la membrane selon les modes dits « dégénérés ».

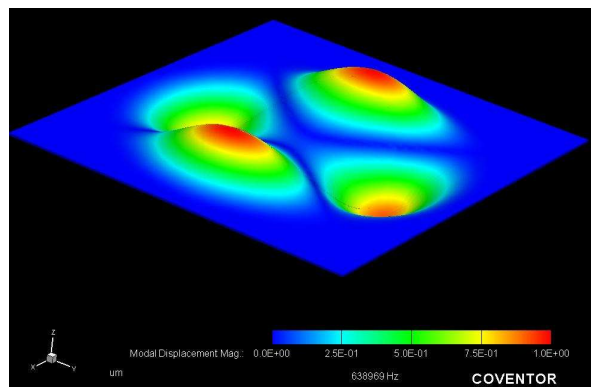


Figure 2.7: Forme modale d'un mode de vibration dégénéré (en l'occurrence le mode (2,0)) obtenue par simulation par éléments finis.

Dans le cas où la jauge piézorésistive ne serait pas située « à cheval » entre deux zones mais au sein d'un ventre d'amplitude, il ne serait pas judicieux néanmoins de choisir d'opérer les modes de vibration dégénérés pour la raison suivante : parmi deux modes couplés dégénérés, la position des diamètres nodaux est déterminée par la présence d'irrégularités topologiques qui influent la localisation de ces diamètres. Aucune méthode n'étant connue à ce jour pour déterminer de manière générique la position des diamètres nodaux d'un mode « dégénéré », il est donc difficile, pour deux modes dégénérés aux fréquences de résonance très proches de savoir avec exactitude lequel des deux modes sera effectivement détecté.

En tenant compte de l'ensemble de ces considérations, nous retiendrons deux modes de vibration supérieurs au mode fondamental susceptibles d'être utilisés : le mode de vibration (0,1) et le mode de vibration (0,2). Possédant des fréquences de résonance distinctes de tout couplage avec un autre mode, ils pourront être identifiés sans équivoque. Enfin, étant axisymétrique, il ne peut se présenter de cas où la détection par piézorésistances serait théoriquement impossible. La forme de ces deux modes obtenus à travers la simulation modale par éléments finis est donnée figure 2.8

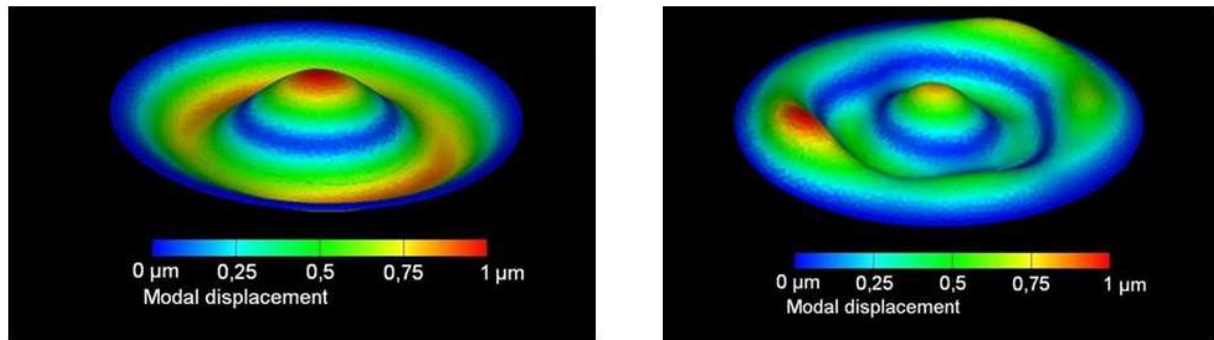


Figure 2.8 : Représentation des modes de vibrations (0,1) et (0,2) obtenus pour une micromembrane par simulation par éléments finis. La fréquence de résonance de chacun de ces deux modes est surlignée de vert clair à la table 2.1

II.1.6. Vibrations dans un fluide, modélisation théorique associée.

Afin de terminer cette revue des principes théoriques intervenant dans la prévision des caractéristiques mécaniques des micromembranes, il est nécessaire d'étudier plus en détail le cas d'une vibration en immersion dans un fluide. Les fluides considérés dans cette étude sont newtoniens et de viscosités proches de celle de l'eau. La situation théorique, décrite dans la figure suivante, est celle d'une membrane supportant sur sa face supérieure un volume de liquide considéré comme infini. Ceci signifie que la plus petite dimension de l'espace occupée par le volume de liquide doit être grande devant l'amplitude de la déformation des membranes au cours de la vibration (ce qui sera toujours le cas ici).

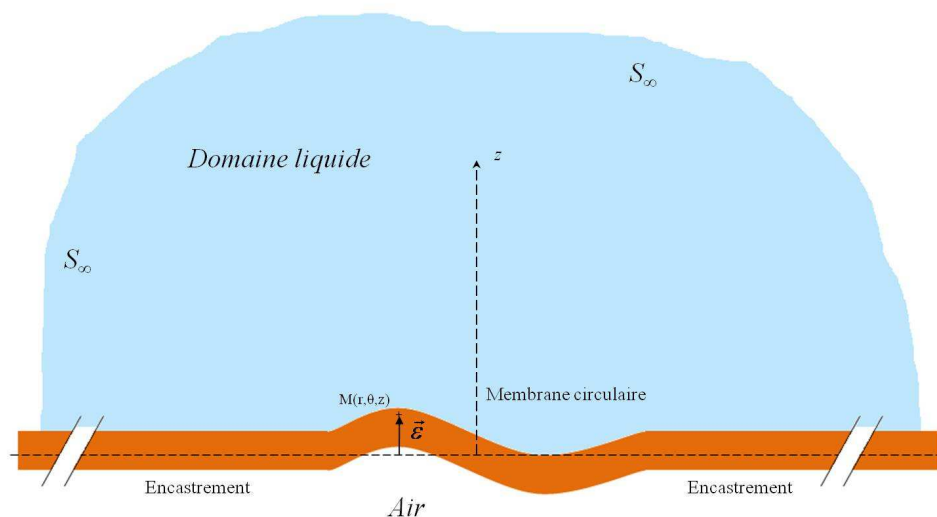


Figure 2.9 : Schéma descriptif du problème de la vibration de membranes circulaires dans un milieu liquide pour laquelle une seule des faces est en contact avec le liquide.

Il convient à ce stade d'étudier plus en détail les phénomènes responsables de l'amortissement de la vibration de la membrane. Lors d'une vibration de la micromembrane dans l'air, l'amortissement de la vibration intervient selon la manifestation de trois effets. Une partie de l'énergie de la vibration est perdue par dissipation dans le substrat au travers de l'encastrement. De plus une partie de l'énergie mécanique est employée à compresser la masse d'air contenue sous la membrane. En effet, comme il est décrit à la section II.3.1, les puces contenant les membranes sont collées sur un substrat rigide par leur face arrière, ainsi, la masse d'air comprise sous la membrane se retrouve piégée et dans l'incapacité de s'équilibrer avec l'environnement extérieur. Cette masse d'air se retrouve donc compressée à chaque vibration de la membrane. Le phénomène de perte d'énergie dû à ce phénomène est appelé amortissement de compression (*squeeze damping* en anglais). Enfin, une autre source de dissipation d'énergie mécanique intervient au travers des forces de frottement visqueux et des forces de pression entre la membrane et le fluide environnant. Dans le cas de l'air, cette contribution est négligeable.

Dans le cas d'une membrane en vibration dont la face supérieure est immergée dans un fluide visqueux (d'une viscosité proche de l'eau dans notre cas), les effets responsables de la majorité de l'amortissement ne sont pas les mêmes. On peut distinguer deux effets principaux liés à la présence de fluide sur la face supérieure de la membrane. Premièrement, l'inertie de la membrane sera augmentée puisque chaque élément volumique de la membrane devra entraîner dans sa vibration la masse de l'élément de fluide correspondant au dessus de la membrane. Cet effet peut être modélisé comme l'ajout, à la masse effective modale de la membrane, d'une masse effective liquide, reflétant ainsi l'augmentation de l'inertie de la membrane. D'autre part, l'élément de fluide entraîné dans le mouvement de la membrane subit des forces de frottement visqueux importantes avec les éléments voisins. L'effet résultant au niveau de la membrane réside en un net amortissement que l'on peut modéliser par l'ajout d'une constante d'amortissement liquide à prendre en compte dans les équations de la mécanique de la membrane [18].

L'ensemble des considérations décrites ici est issu des travaux théoriques de H. Lamb [3] décrivant le comportement de membranes circulaires vibrant avec une face en contact avec un volume semi-infini de liquide.

Le modèle de Lamb prend pour axiome initial la supposition suivante : la forme des modes de résonances d'une membrane circulaire dans l'air reste inchangée lors du passage à des oscillations dans un milieu liquide. Cette hypothèse a été validée pour des membranes circulaires macroscopiques. Partant de cet axiome, le modèle de Lamb compare l'énergie cinétique d'une membrane circulaire oscillant dans l'air et l'énergie cinétique supplémentaire causée par l'ajout de la masse virtuelle liée au liquide en contact avec la membrane en oscillation. Le rapport de ces deux énergies est appelé facteur AVMI (pour *Added Virtual Mass Increment factor*), noté β . Ce facteur permet de relier la fréquence de résonance dans l'air à celle dans le liquide par la formule suivante :

$$f_{liq} = \frac{f_{air}}{\sqrt{1+\beta}} \quad (2.28)$$

formule pour laquelle β s'exprime pour les micromembranes visées ici, par:

$$\beta_{mn} = \Gamma_{mn} \frac{\rho_{liq} R_2}{\overline{\rho t}_{moy}} \quad (2.29)$$

Ici, ρ_{liq} est la densité du liquide, les indices m et n sont utilisés pour désigner le mode de vibration utilisé ; m représente le nombre de diamètres nodaux (*i.e.* pour lesquels l'amplitude de vibration est constante et nulle au cours de la vibration) et n le nombre de cercles nodaux (sans compter l'encastrement). Le coefficient Γ_{mn} est appelé coefficient NAVMI (pour *Nondimensional Added Virtual Mass Increment factor*). Sa valeur est donnée dans la littérature [19] pour tous les modes de vibration possibles d'une membrane circulaire. Pour le mode de vibration (0,1), il est égal à 0,27613 et pour le mode de vibration (0,2), sa valeur numérique est 0,16513. Le coefficient $\overline{\rho t}_{moy}$ représente la moyenne sur la membrane de la masse surfacique, il est calculé dans notre cas comme suit, en prenant en compte la distinction entre zone périphérique annulaire et zone centrale :

$$\overline{\rho t}_{moy} = \underbrace{\frac{(R_2^2 - R_1^2)}{R_2^2} \sum_{i=1}^2 \rho_i t_i}_{\text{Zone périphérique}} + \underbrace{\frac{R_1^2}{R_2^2} \sum_{i=1}^5 \rho_i t_i}_{\text{Zone centrale}} \quad (2.30)$$

Une autre méthode d'exprimer la fréquence de résonance dans le liquide est possible, en utilisant la masse modale effective et la constante de raideur modale effective dans le liquide :

$$f_{mn_liq} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K_{eff(m,n)_liq}}{M_{eff(m,n)_liq}}} \quad (2.31)$$

Selon les hypothèses de Lamb sur les effets du fluide environnant, seules les masses et constantes d'amortissement effectives modales sont affectées par la présence du fluide. La constante de raideur effective restant inchangée, on peut déduire $M_{eff(m,n)_liq}$ et écrire alors la relation suivante pour la sensibilité massique de la micromembrane dans le liquide:

$$S_{liq_mn} = S_{air_mn} \frac{1}{(1 + \beta)^{1/2}} \quad (2.32)$$

De cette formule de la sensibilité massique pour le mode (m,n) dans le fluide, il est possible d'estimer à un facteur près la masse minimum détectable de la micromembrane en vibration dans le fluide via la relation de proportionnalité suivante :

$$M_{min_liq_mn} \propto \left| S_{liq_mn} \right|^{-1} \frac{f_{mn_liq}}{Q_{mn_liq}} \quad (2.33)$$

Avec Q_{mn_liq} étant le facteur de qualité de la vibration selon le mode (m,n) de la membrane dans le liquide.

Le calcul précis de la masse minimum détectable d'une micromembrane vibrant selon le mode (m,n) s'effectue en fonction du bruit effectif du signal de suivi de la fréquence de résonance dans le temps, comme il sera explicité au chapitre III

Nous avons alors montré la possibilité de prédire analytiquement les caractéristiques des micromembranes dans le fluide en tant que biocapteur grâce aux considérations du modèle de Lamb incrémenté pour les modes supérieurs. Cependant, une telle détermination requiert de disposer de méthodes analytiques pour estimer le facteur de qualité d'une micromembrane vibrant dans le fluide. Si de telles méthodes existent pour déterminer analytiquement le facteur de qualité d'un micro-levier résonant [20], ce n'est pas le cas pour nos structures multi-couches membranaires. Ainsi, nous procéderons à la dégradation du modèle analytique présenté en un modèle semi-analytique, semi-expérimental puisqu'une fois relevées, les valeurs expérimentales des fréquences de résonance dans l'air seront utilisées pour estimer celles dans le fluide ainsi que les sensibilités et masse minimum détectables dans le fluide.

II.2. Fabrication, et conditionnement des micromembranes résonantes.

II.2.1. Présentation du contexte général

Le procédé de fabrication des micromembranes à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive constitue la jonction de deux processus technologiques réalisés au LAAS et à l'IEMN :

La fabrication, et le packaging (ou conditionnement), des microsystèmes ont été réalisés grâce à la collaboration du service TEAM du LAAS-CNRS (pour Techniques et Equipements Appliqués à la Microélectronique) et de la Centrale Technologique de l'IEMN-CNRS.

Les couches concernant l'actionnement piézoélectrique ont été déposées puis structurées à l'IEMN. Ces étapes du processus de fabrication du microsystème ont été réalisées par Caroline Soyer, maître de conférences au sein du groupe dirigé par Denis Remiens.

Le procédé de fabrication des micromembranes à actionnement piézoélectrique représente un processus de fabrication comprenant 11 étapes de photolithographie et une gamme variée de techniques de microstructuration de surface et de volume. Nous décrivons dans la suite de ce chapitre le détail de ce processus en distinguant la fabrication des jauges piézorésistives réalisée au sein de la salle blanche du LAAS, puis le dépôt et la structuration du module d'actionnement piézoélectrique réalisés à l'IEMN et enfin la passivation des structures électriques et la libération des membranes par gravure profonde face arrière effectuées de nouveau au LAAS.

II.2.2. Module de détection piézorésistive

Le procédé de fabrication décrit dans l'ensemble de cette section II.2 est initié à partir de plaquettes de silicium de type silicium-sur-isolant (wafer SOI, Silicon-On-Insulator) de taille quatre

pouces dopées N. L'utilisation de ce type de plaquette permet un très bon contrôle de l'épaisseur des membranes. En effet, l'oxyde enterré peut être utilisé comme couche d'arrêt lors de la libération des membranes. Or, cette couche d'oxyde thermique enterré a une position et une épaisseur précisément contrôlable lors du processus de fabrication des plaquettes SOI. Les plaquettes de type SOI utilisées ici auront comme caractéristiques un silicium monocristallin qui définira les membranes d'épaisseur 5 μm , la couche d'oxyde enterré mesurant 1 μm pour un substrat de silicium de 525 μm .

La première étape du processus de fabrication est la gravure des motifs d'alignement sur la plaquette. Leur rôle est le suivant : le procédé de fabrication incluant de nombreuses étapes de photolithographie afin de structurer les matériaux, il convient de conserver un alignement des couches entre elles d'une étape à la nouvelle. C'est dans ce but que les motifs d'alignement sont gravés par gravure ionique réactive (RIE, Reactive Ion Etching) directement à travers le silicium monocristallin jusqu'à l'oxyde enterré afin de constituer une référence inamovible tout au long du procédé.

Afin de définir la forme des motifs d'alignement, on procède par photolithographie UV. Dans cette technique, l'illumination par une lumière ultraviolette d'une résine photosensible, à travers des motifs transparents définis sur un masque opaque, permet de définir au sein de la résine un ensemble de zones aux propriétés différentes. Après l'illumination, la résine est durcie via un recuit thermique sur une plaque chauffante pendant une durée précise et à une température contrôlée. Puis la plaquette est trempée dans une solution chimique appelée révélateur qui va dissoudre certaines parties de la résine. On définit dans ce cadre la polarité d'une résine en fonction des zones qui seront dissoutes dans le bain du révélateur. Les zones illuminées seront dissoutes dans le cas d'une résine dite positive et inversement dans le cas d'une résine négative.

Les zones dissoutes permettront l'accès au silicium monocristallin de la plaquette pour traitement particulier (dépôt, gravure,...) alors que les zones restantes consolidées par le recuit serviront de masque physique pour protéger les zones de la plaque qui ne sont pas visées par l'opération technologique en préparation.

Une fois la forme des motifs d'alignement révélée, on procède à la gravure du silicium afin de transférer ces motifs sur la plaquette. La gravure s'effectue via un procédé de gravure utilisant un plasma d'ions afin de bombarder la surface et arracher la matière s'y trouvant. Cette technique appelée gravure par ions réactifs ou RIE en anglais, permet de graver la matière de manière anisotrope. Or, en alternant phases de gravure et phases de polymérisation des flancs de gravure sous atmosphère gazeuse, il est possible d'obtenir un effet de gravure global anisotrope suivant la direction verticale. On procède ainsi à la gravure du silicium sur 2 μm . En fin de processus, la résine photosensible polymérisée présente sur la plaquette est retirée grâce à une solution d'acétone. Restent alors sur la plaquette les motifs d'alignement gravés dans le silicium monocristallin.

La fabrication des piézorésistances est réalisée ensuite. Le silicium monocristallin exhibe naturellement des propriétés piézorésistives, liées à la modification de sa conductibilité lorsque sa structure cristalline subit une déformation élastique. Dans notre cadre, la fabrication des jauges piézorésistives consistera à fortement augmenter les propriétés piézorésistives du silicium *in situ* grâce à l'insertion d'ions Bore dans la matrice cristalline du silicium.

Nous avons vu à la section II.1.5.1, que pour assurer une efficacité optimale de la détection piézorésistive, les jauges devaient être confinées dans les zones exhibant les plus grandes contraintes mécaniques au cours du mouvement de la membrane. Ces zones sont localisées à l'encastrement de la

membrane et concentrées dans la partie supérieure de l'épaisseur de la membrane. Ainsi, nous avons défini un profil de piézorésistance s'étendant seulement sur 200 nm en profondeur afin de maximiser leur sensibilité.

Afin de créer le profil en profondeur des piézorésistances sur de faibles profondeurs, deux méthodes sont possibles pour réaliser le dopage du silicium : le dopage par diffusion d'impuretés [21][22] et le dopage par implantation ionique. Cette dernière technique consiste à bombarder la surface de silicium avec un faisceau d'ions accélérés. Elle est la plus employée dans le domaine des circuits à haute densité d'intégration. En effet, l'énergie du faisceau d'ions peut être facilement contrôlée, ce qui permet d'obtenir un grand contrôle de la distribution en profondeur des impuretés implantées tout en connaissant parfaitement la dose introduite. C'est cette technique que nous avons retenue dans le cadre de la fabrication des jauges piézorésistives équipant nos membranes.

Afin de déterminer les zones où l'on souhaite doper les propriétés piézorésistives du silicium, un masque physique est réalisé par une couche d'oxyde de 300 nm. Cet oxyde est obtenu par croissance thermique sous atmosphère sèche. Grâce à une seconde étape de photolithographie, on détermine les zones devant recevoir l'implantation et on grave l'oxyde aux endroits non protégés par la résine en immergeant la plaquette dans une solution d'acide fluorhydrique tamponnée. Cette solution permet d'ouvrir l'oxyde aux endroits souhaités, définissant ainsi le masque physique qui permettra la réalisation des piézorésistances par implantation.

Il est acquis que pour réaliser la formation du profil de distribution en jonction mince de la piézorésistance avec des ions légers tels que le Bore, il convient de réaliser avant l'implantation du dopant une préamorphisation du substrat en bombardant la surface de silicium avec des ions lourds (dans notre cas du Germanium). Cette préamorphisation permet d'éviter l'effet de canalisation des ions de Bore incidents, au travers de la structure cristalline du silicium. L'absence de ce phénomène de canalisation autorise un contrôle optimal du profil de distribution en profondeur du Bore au sein de la matrice de silicium. Nous réalisons cette préamorphisation grâce à un faisceau d'ions Germanium d'énergie 60 keV et avec une dose implantée de 5×10^{14} ions.cm⁻². Cependant, afin de limiter l'étendue en profondeur de cette zone préamorphisée, nous protégeons les zones visées grâce à la croissance d'un oxyde de 6 nm sur toute la plaque. La préamorphisation est réalisée puis, consécutivement, l'implantation des ions Bore avec une dose de 1×10^{16} ions.cm⁻² et une énergie de 15 keV.

Une fois l'implantation réalisée, l'immersion de la plaquette dans une solution d'acide fluorhydrique 30% tamponnée permet de retirer l'oxyde constitutif du masque de protection. Afin de conférer le maximum de piézorésistivité aux structures, on fait subir à la plaquette, une contrainte en température, appelée recuit thermique rapide qui permet de recristalliser la structure du silicium, rendue amorphe lors des étapes de préamorphisation et d'implantation [23]. Ce recuit thermique rapide consiste en l'application au sein d'un four halogène de rampes en température avec des dynamiques très rapides. Le procédé appliqué ici est détaillé en figure 2.10.

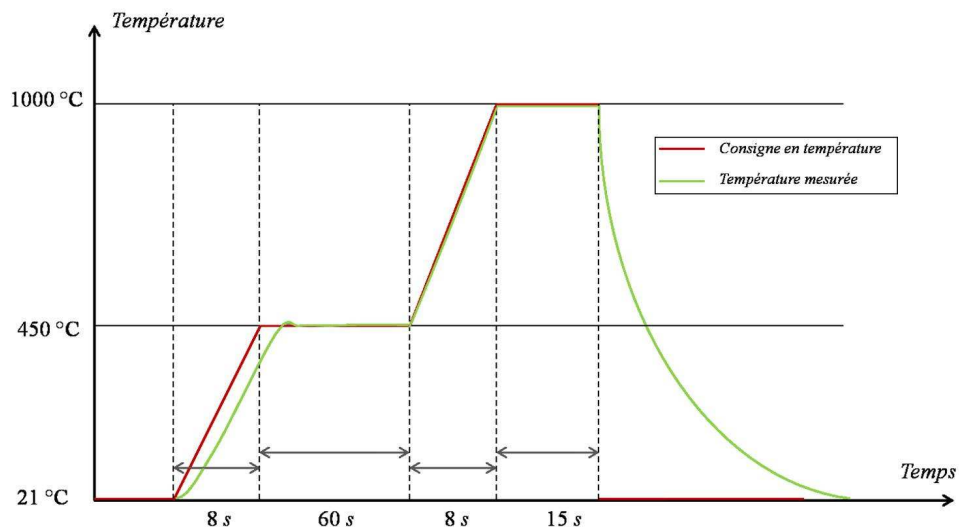


Figure 2.10 : Détail du procédé de recuit thermique rapide employé pour régénérer la structure cristalline du silicium après insertion des ions Bore, ce qui confère aux structures une piézorésistivité optimale. La courbe rouge représente la consigne appliquée en température et la courbe verte la mesure de la température effective de la plaque.

Dans le but de contrôler la profondeur d'implantation du bore au travers de la matrice de silicium monocristallin, nous avons procédé à une analyse par spectroscopie de masse par ions secondaires (SIMS). Cette étude permet d'obtenir, grâce à l'analyse des ions éjectés de l'échantillon lors de sa destruction contrôlée, un profil de concentration des divers éléments constitutifs des piézorésistances en fonction de la profondeur. Deux analyses SIMS sont menées sur des échantillons avant et après l'application du recuit thermique rapide afin de mesurer l'influence de celui-ci sur la diffusion des ions bore et sur la réorganisation des éléments au sein de la matrice silicium. En observant le profil de concentration du Bore, on détermine la profondeur effective de la piézorésistance comme la profondeur pour laquelle la concentration en Bore chute en deçà de 10^{19} atomes/cm³.

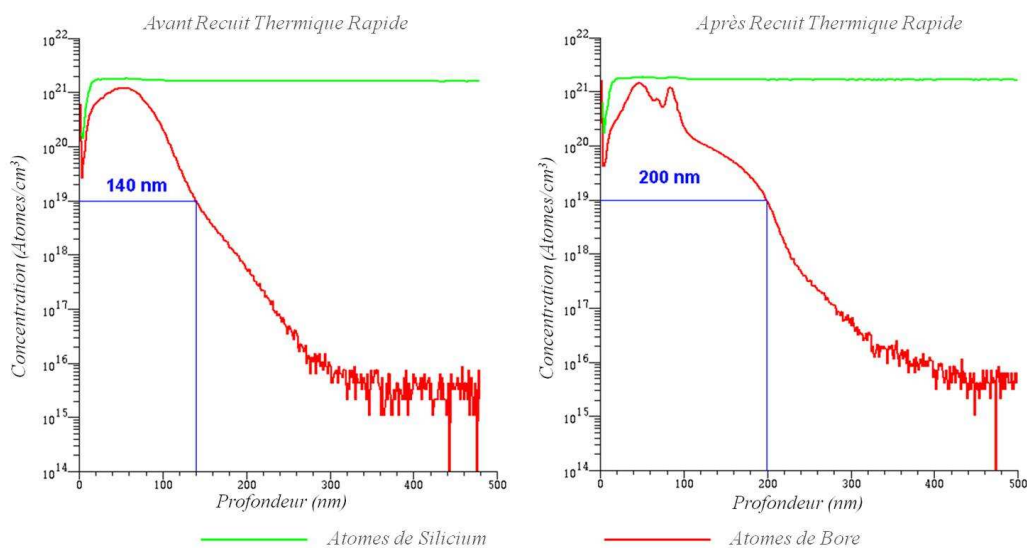


Figure 2.11: Comparaison de la distribution en profondeur de l'élément Bore au sein de la matrice de silicium avant recuit thermique rapide (graphe de gauche) et après recuit thermique rapide (graphe de droite)

Afin d'isoler électriquement les structures piézorésistives des pastilles de matériau piézoélectrique, l'étape suivante consiste à déposer une couche de matériau isolant, en l'occurrence une couche de dioxyde de silicium SiO_2 d'épaisseur 100 nm. La technique de dépôt retenue pour cette étape est le dépôt de dioxyde de silicium par voie chimique assistée par plasma (dépôt par PECVD). Cette technique permet de déposer des couches d'oxydes à partir d'un mélange gazeux de silane SiH_4 et d'oxygène O_2 sous l'action d'un plasma à une température de 300 °C. Si cette technique est parfaitement maîtrisée, les propriétés isolantes d'un oxyde de silicium déposé par PECVD sont cependant moins bonnes que celles d'un oxyde de silicium généré par croissance thermique à haute température. Cependant, nous ne pouvons nous reposer sur cette dernière, en effet, les températures en jeu (900°C-1200°C) sont inatteignables sans mettre en péril la concentration en bore qui chuterait au sein de la piézorésistance par diffusion des espèces vers le substrat.

Il convient enfin d'ouvrir des passages électriques à travers l'oxyde vers les structures piézorésistives. Cette ouverture est effectuée via une troisième étape de lithographie utilisant une résine positive permettant de définir des ouvertures dans la résine au-dessus des points de contacts des piézorésistances. Ce motif est ensuite transféré à la plaquette par une gravure humide à l'acide fluorhydrique HF tamponné. A la fin de cette étape, les plaques sont expédiées à l'IEMN pour la suite du processus de fabrication.

II.2.3. Module d'actionnement piézoélectrique

Le processus de fabrication du module d'actionnement piézoélectrique comprend le dépôt et la structuration de l'électrode inférieure, du matériau piézoélectrique et de l'électrode supérieure.

La première étape réalisée à l'IEMN est dédiée au dépôt d'une fine couche d'oxyde de zirconium ZrO_2 (d'épaisseur 80 nm) sur l'ensemble de la plaquette. L'oxyde de zirconium est un matériau isolant à la structure cristalline. La présence de la structure cristalline (que ne pourrait présenter l'oxyde de silicium amorphe) est importante pour la bonne conformation de la couche de Titane/Platine déposée ensuite. Le dépôt de l'électrode inférieure consiste en une couche d'accroche d'oxyde de titane d'épaisseur 10 nm suivi du dépôt de la couche de platine d'une épaisseur de 140 nm. Cette couche est structurée selon une forme circulaire définissant l'électrode inférieure avec un rayon inférieur de 5 μm au rayon de la pastille piézoélectrique (R_i). La couche est structurée grâce à la méthode dite de « lift-off » avec une résine positive PMGI SF19. Dans cette méthode, une étape de photolithographie avec une résine positive définit les zones où l'on souhaite déposer le métal, le dépôt est ensuite effectué sur toute la plaquette. L'immersion dans un bain d'acétone avec ultrasons permet le décollement (ou « lift-off ») de l'ensemble résine-métal ; restent alors les dépôts de métal ayant accroché le substrat aux endroits définis par la photolithographie. La couche de Titane/Platine ainsi déposée possède une configuration polycristalline d'orientation majoritaire $\langle 111 \rangle$, naturellement rencontrée pour du platine déposé dans ces conditions. Cette configuration a été montrée favorable à la cristallisation correcte du PZT afin que celui-ci présente des propriétés piézoélectriques [24].

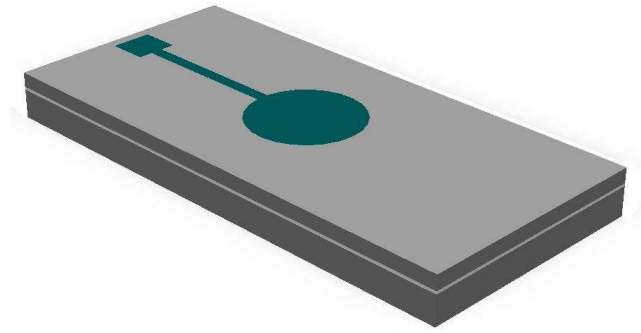


Figure 2.12 : Dépôt de l'électrode inférieure en titane/platine

Le dépôt de la structure piézoélectrique constitue l'étape suivante. La technique de dépôt proposée par l'équipe de Caroline Soyer et Denis Remiens propose la structuration de la couche piézoélectrique par « lift-off » ce qui est une approche originale pour le dépôt de matériau piézoélectrique. La mise au point d'un procédé de dépôt par pulvérisation magnétron RF ne dépassant jamais des températures de l'ordre de 130 °C a rendu possible l'intégration d'une résine photosensible réalisant la structuration par lift-off via une étape de photolithographie préliminaire. Cette structuration ne serait pas envisageable de cette manière avec des techniques à plus haute température, offrant une meilleure qualité de matériau piézoélectrique, notamment les techniques de dépôt de PZT par croissance épitaxiale [25][26]. Une épaisseur de 1 μm de matériau piézoélectrique est déposée. Différentes compositions du PZT sont réalisables, elles sont caractérisées par un paramètre x définissant la proportion relative de Zirconium et de Titane. La formule du PZT est la suivante : $\text{PbZr}_x\text{Ti}_{1-x}\text{O}_3$, dans le cadre de cette étude, le facteur x a été choisi égal à 0,54 ce qui correspond à la proportion Zirconium /Titane. Cette composition a été retenue pour sa proximité avec la phase morphotrope du PZT ($x=53$) pour laquelle les coefficients piézoélectriques du PZT sont les plus élevés [27]. La forme obtenue suite à la structuration de la pastille piézoélectrique correspond à un cercle de rayon R_1 . Le recouvrement volontaire de l'électrode inférieure constitue l'un des moyens employés permettant d'éviter la création de court-circuit entre les électrodes inférieures et supérieures. Un tel court-circuit interdirait la création d'un champ électrique au sein du matériau piézoélectrique qui, même s'il possède les propriétés correctes, ne pourrait remplir la fonction d'actionnement.

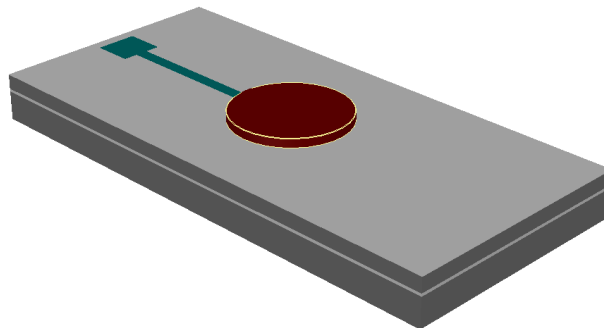


Figure 2.13: Dépôt de la pastille circulaire de PZT

Le second moyen mis en place pour éviter l'apparition de court-circuits entre les électrodes supérieures et inférieures est le dépôt d'une couche de protection des flancs de la pastille piézoélectrique. Cette couche d'oxyde de Zirconium d'épaisseur 100 nm est structurée en une couronne recouvrant la frontière de la pastille de PZT, augmentée d'une zone de protection rectangulaire à l'endroit de la piste d'adressage de l'électrode inférieure pour éviter un chevauchement des électrodes à cet endroit.

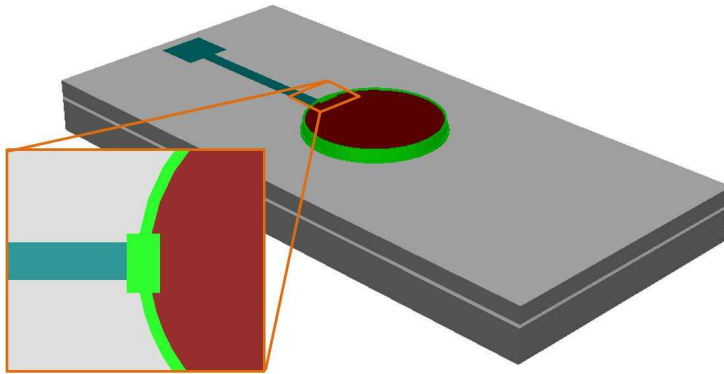


Figure 2.14 : Dépôt de la couronne et de la zone de protection en oxyde de zirconium

Enfin, la dernière étape du processus de fabrication du module d'actionnement est constituée du dépôt de l'électrode supérieure. La couche associée à cette électrode est déposée, là encore en deux temps, une couche d'accroche d'oxyde de titane de 10 nm et une couche de Platine d'épaisseur 140 nm. La structuration de la couche ainsi déposée se fait par lift-off, une étape préliminaire de photolithographie ayant défini des zones circulaires de rayon R_i majoré de 5 μm (par rapport à la pastille piézoélectrique circulaire). Ce dernier recouvrement par l'électrode supérieure de l'ensemble du module d'actionnement permettra de constituer un blindage électrique du matériau piézoélectrique. En effet, si l'on applique le potentiel d'actionnement sur l'électrode supérieure, celle-ci peut jouer le rôle d'une cage de Faraday, protégeant le matériau piézoélectrique de tout rayonnement électromagnétique extérieur de nature à perturber l'actionnement des membranes. A l'inverse, cette cage permet également d'isoler le matériau piézoélectrique qui ne rayonne pas vers l'extérieur (il faut penser ici aux jauges piézorésistives).

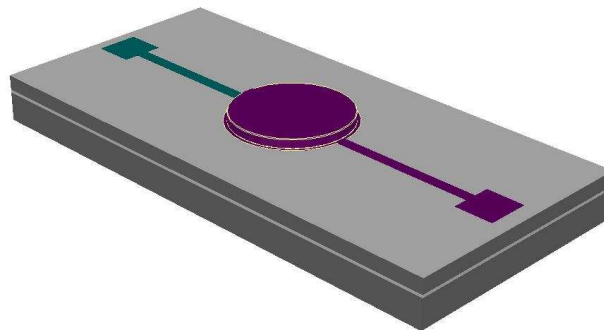


Figure 2.15 : Dépôt de l'électrode supérieure en titane/platine.

III.2.4. Fin du processus de fabrication face avant

De retour au LAAS, la résistivité du matériau piézoélectrique est testée via le relevé de leur caractéristique $I(V)$. Ceci permet de réaliser une première évaluation des membranes qui pourront être actionnables piézoélectriquement (celles dont les couches piézoélectrique sont résistives à hauteur du mégaOhm) de celles qui ne fonctionneront pas (pastilles piézoélectriques court-circuitées). Le fonctionnement correct des pastilles piézoélectriques constitue un des critères *sine qua non* de sélection des micromembranes qui seront intégrées au prototype final de plateforme de détection d'agents biologiques simulant la menace. La liste complète de ces critères ainsi que le taux de micromembranes utilisables pour les tests de détection biologiques (par rapport au total des micromembranes fabriquées) sera donné à la section IV.3.1 du chapitre IV.

Une fois les tests de diagnostic préliminaires de la couche piézoélectrique effectués, les plaquettes suivent la fin du procédé de fabrication de la face avant au sein de la centrale technologique du LAAS. Tout d'abord, un oxyde de silicium PECVD de 300 nm d'épaisseur est déposé (trois dépôts de 100 nm) sur l'ensemble de la plaquette pour réaliser la passivation des structures piézoélectriques. Le caractère isolant de cette couche est fondamental pour un fonctionnement des membranes au sein d'un fluide. En effet, la conductivité de l'eau autoriserait en son absence l'établissement d'importants courants parasites entre les électrodes ce qui perturberait l'actionnement des membranes. Une fois cet oxyde déposé, il convient de réaliser des accès aux pistes d'adressage des électrodes en réalisant des ouvertures de contacts au travers de l'oxyde de passivation. Ces accès serviront de point de soudure pour les fils de connexion reliant le microsystème au système électronique de détection. Cette étape est réalisée via une étape de photolithographie avec une résine positive définissant l'emplacement des ouvertures à réaliser puis est suivi d'une gravure humide isotrope de l'oxyde de passivation via une solution d'acide fluorhydrique tamponnée.

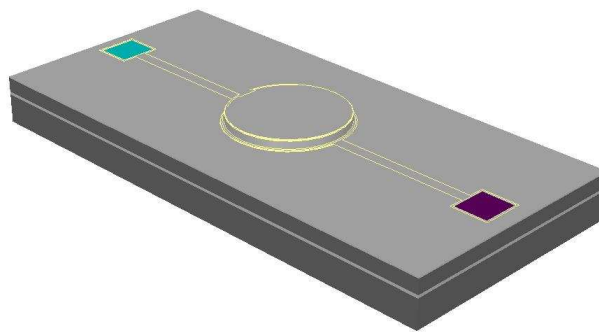


Figure 2.16 : Dépôt de la couche de dioxyde de silicium de passivation et ouverture des contacts. Les traits de couleur représentent la forme des structures électriques présentes sous la couche d'oxyde de passivation.

Afin de préserver l'intégrité des couches de platine et de favoriser l'attache des points de soudure à la surface de ces couches, l'étape suivante consiste à renforcer les zones ouvertes à travers l'oxyde en déposant une couche d'or de 700 nm. Ce dépôt est précédé d'une couche d'accroche d'oxyde de titane de 100 nm. Les deux couches sont structurées par lift-off grâce à l'utilisation d'une

résine réversible (résine initialement positive mais dont la polarité est inversée par une seconde insolation) et du négatif du masque utilisé pour l'ouverture de l'oxyde de passivation.

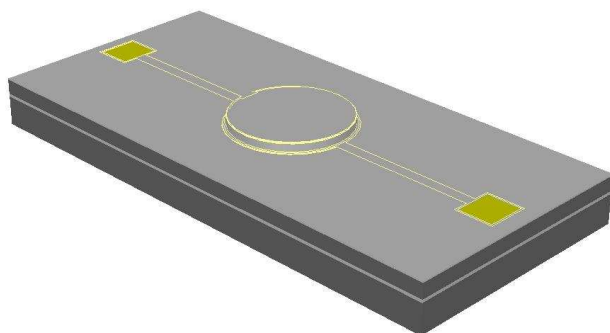


Figure 2.17 : Renforcement des plots de contacts des électrodes par une couche de titane/or. Les traits de couleur représentent la forme des structures électriques présentes sous la couche d'oxyde de passivation.

Enfin, la dernière étape du processus de fabrication concernant la face avant de la plaquette est réalisée en déposant une pastille d'or de rayon R_2 , centrée sur la pastille piézoélectrique, destinée à accueillir les chimies de greffages de type thiol pour l'immobilisation des biorécepteurs à la surface de la membrane. Cette couche est également structurée par lift-off. Une couche d'accroche d'oxyde de titane d'épaisseur 10 nm précède là encore le dépôt de la couche d'or dont l'épaisseur est de 100 nm.

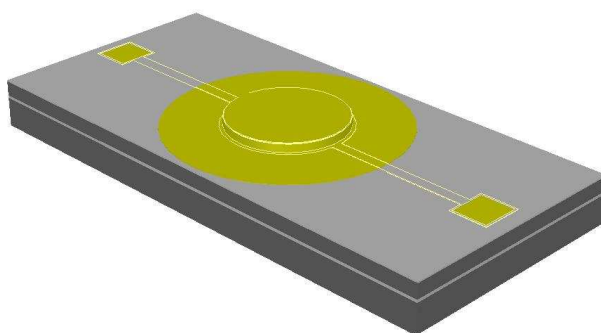


Figure 2.18 : Dépôt de la pastille circulaire d'or destinée à recevoir la fonctionnalisation chimique permettant l'immobilisation des biorécepteurs à la surface de la membrane. Cette étape constitue la dernière étape de microfabrication pour la face avant

II.2.4. Libération des membranes

La dernière étape du procédé de fabrication de notre biocapteur microgravimétrique consiste en la libération de la structure mécanique destinée à osciller. Cette libération s'effectue en réalisant une gravure quasi-traversante du substrat et de l'oxyde enterré à partir de la face arrière selon des motifs de gravure circulaires afin de donner leur forme finale aux micromembranes. Cette étape est cruciale pour deux raisons. Premièrement, de toutes les techniques de microfabrication employées dans le cadre de cette réalisation, celle-ci constitue la moins maîtrisée de toutes. Ensuite, le périmètre

circulaire obtenu en fin de gravure et définissant l'encastrement de la membrane peut ne pas satisfaire la condition pour laquelle la piézorésistance se situe au plus près de l'encastrement.

Le procédé technologique est le suivant : une résine photosensible est déposée sur la face arrière du wafer. Cette résine est insolée à travers un masque dont l'alignement est réalisé par rapport aux structures de la face avant. Après développement, la résine est recuite afin de présenter un masque de résine pouvant résister à la longueur de la gravure par plasma. La durée de la gravure plasma nécessaire pour traverser presque intégralement le substrat étant de l'ordre de 3 heures, l'épaisseur de la résine est sensiblement supérieure aux épaisseurs nécessaires aux procédés technologiques de surface. Ici, la résine employée est une résine AZ 4562 d'une épaisseur de 20 μm . A travers cette résine, sont définies des ouvertures de gravures circulaires et centrées sur le même axe vertical que celui des pastilles piézoélectriques. La réalisation des gravures de libération des membranes est effectuée selon deux procédés : la gravure du silicium du substrat est réalisée par gravure profonde par plasma (Deep Reactive Ion Etching, ou Deep-RIE), la gravure de l'oxyde enterré est assurée par un protocole de gravure chimique par vapeurs d'acide fluorhydrique.

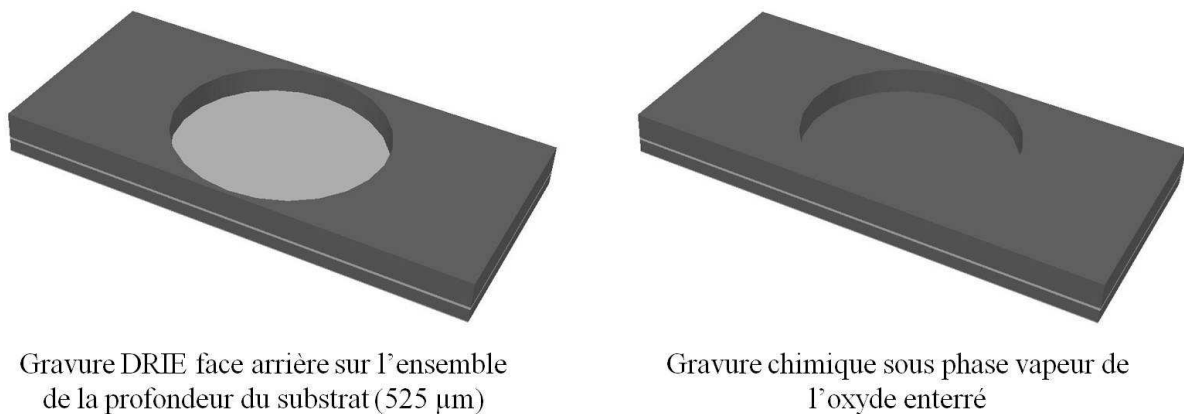


Figure 2.19 : A droite, représentation schématique de l'état de la plaquette face arrière après gravure profonde du silicium du substrat. A gauche, même représentation après la gravure de l'oxyde enterré par attaque chimique en phase vapeur

Un premier protocole de gravure plasma à haute vitesse de gravure est employé pour graver la majorité de l'épaisseur du substrat. Les travaux de thèse de Cédric Ayela [2] ont montré que l'emploi de ce protocole détériorait, sur de grandes profondeurs, le caractère anisotrope de la gravure selon l'axe z. Les flancs de gravure n'étant plus rigoureusement verticaux, le résultat de cette détérioration réside dans l'apparition de phénomènes de surgravure (le rayon de la membrane effective après libération étant alors surévalué par rapport au rayon attendu). Afin de compenser la sur-gravure liée au caractère non-anisotrope strict de ce protocole, un protocole utilisant un dispositif particulier appelé « kit anti-notching » est employé. Le notching est un phénomène de surgavure localisé lorsque la gravure atteint l'oxyde enterré. Le kit anti-notching permet de réduire la fréquence de la polarisation entre le plasma et le substrat et ainsi de réduire la vitesse de gravure du silicium. Ceci permet dans notre cas de prévenir l'accumulation de charges sur les flancs, responsable de la gravure latérale. Le protocole de gravure utilisant le kit anti-notching a été spécialement optimisé pour la gravure de substrat SOI et permet de déboucher rapidement sur la couche d'arrêt que constitue l'oxyde enterré. La combinaison des deux protocoles décrit ici, le premier pendant un temps de 3 heures 5 minutes et le second, optimisé pour la gravure SOI et utilisant le kit « anti-notching » pendant un temps de 25 min a

permis de graver le silicium du substrat sur des profondeurs respectives de 450 μm et 75 μm . La surgravure résultante obtenue est comprise entre +2,5 μm et +35 μm par rapport à la valeur du rayon de la membrane. La figure suivante présente un micrographe obtenu par microscopie électronique à balayage d'un profil en coupe d'une membrane piézoélectrique obtenue après application de ces deux protocoles de gravure. Le cas présenté en figure 2.20 montre un exemple de surgravure parmi les plus importantes obtenues, alors que la figure 2.21 montre l'exemple d'un des meilleurs profils de gravure obtenus (sur-gravure de 2,5 μm)

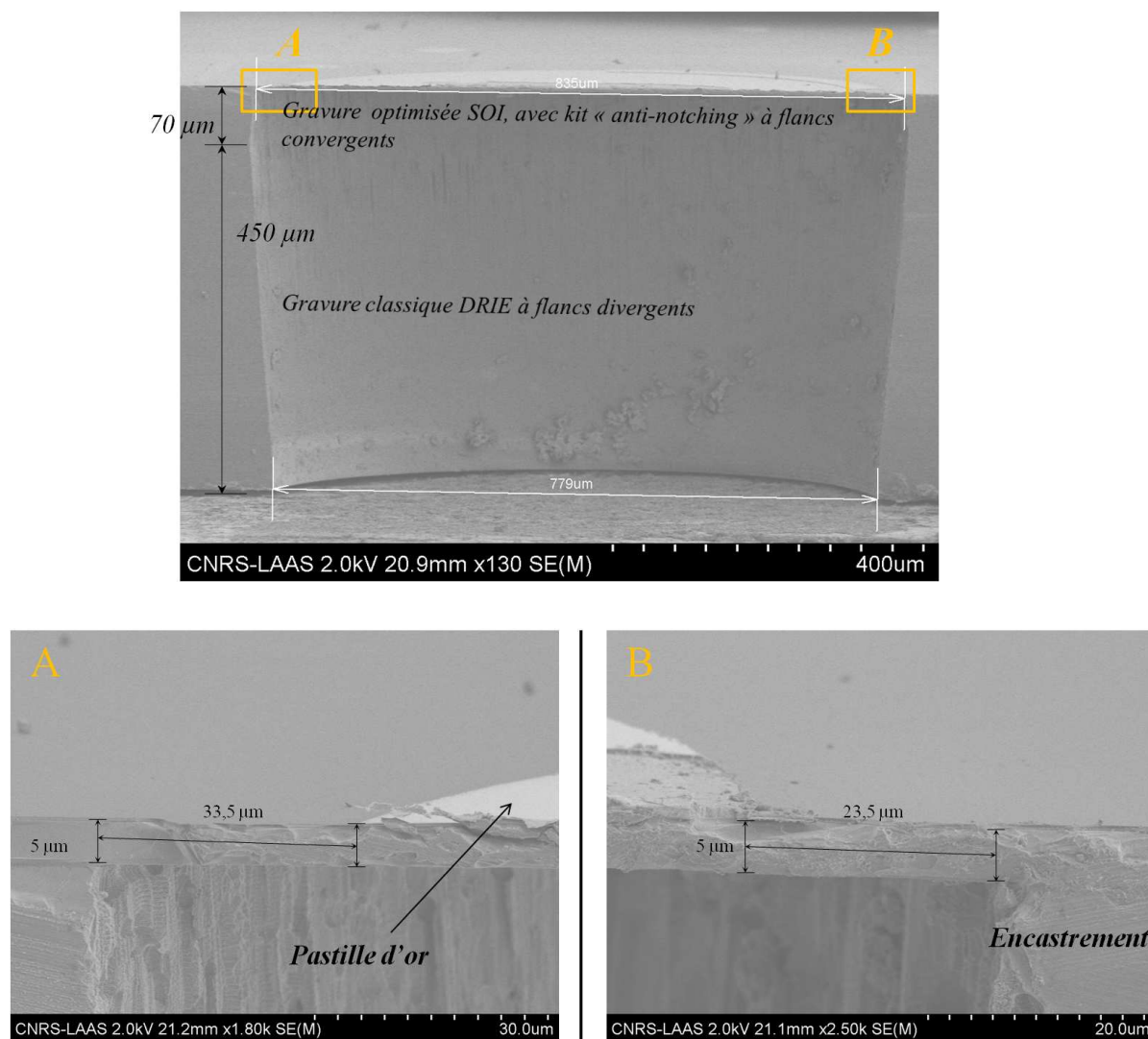


Figure 2.20: En haut, micrographe obtenu par microscopie électronique à balayage de la coupe d'une membrane après gravure face arrière par DRIE du silicium du substrat. En bas, détail de l'encastrement de la membrane. Est présentée ici, une des moins bonnes configurations rencontrées en termes de sur-gravure

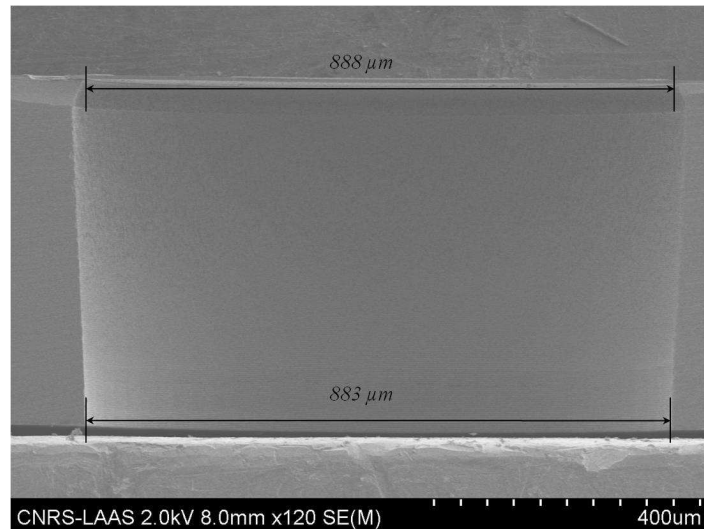


Figure 2.21 : micrographie obtenu par microscopie électronique à balayage de la coupe d'une membrane après gravure face arrière par DRIE du silicium du substrat. Est représentée ici, une des meilleures configurations obtenues (2,5 μm de sur-gravure latérale seulement)

Enfin, l'ultime étape achevant l'ensemble du processus de microfabrication des micromembranes à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive, correspond à la gravure de l'oxyde enterré. Cette étape termine la libération des micromembranes qui ont ensuite l'épaisseur de la couche de silicium monocristallin à savoir 5 μm . Afin de contrôler précisément la gravure de l'oxyde enterré à partir du canal de gravure ouvert par DRIE à travers le substrat, une méthode chimique est préférée à la gravure plasma afin de maîtriser les paramètres de gravures latérales. La méthode retenue repose sur une gravure chimique en phase vapeur de l'oxyde enterré. Une solution d'acide fluorhydrique est versée dans un bécher en téflon, lequel bécher est ensuite recouvert d'un film plastique parsemée d'une multitude de trous régulièrement aménagés afin de permettre la diffusion des vapeurs. L'acide fluorhydrique génère des vapeurs même à température ambiante, il n'est donc pas nécessaire de chauffer le bécher contenant l'acide. La plaquette est alors placée sur le film plastique, face arrière contre le film, pendant plusieurs intervalles de 15 secondes au début du processus puis de 5 secondes afin de ne pas réaliser de sur-gravure de l'oxyde enterré. Au bout de chaque intervalle, un contrôle optique permet d'évaluer l'avancée de la gravure de l'oxyde enterré (l'oxyde de silicium et le silicium ayant des colorations différentes). Pour la gravure de l'oxyde enterré des substrats SOI utilisés ici, un temps de 105 secondes à température ambiante s'est révélé nécessaire à la gravure complète de cet oxyde.

La microfabrication des membranes est ainsi achevée. Les micromembranes sont regroupées par puce de cinq membranes (quatre membranes de mesure et une membrane de référence ne possédant pas de pastille d'or supérieure) avec des rayons R_1 de la pastille et R_2 de la membrane donnés dans le tableau 2.3. La figure 2.22 montre une photo par microscopie optique de la face avant d'une puce en fin de fabrication.

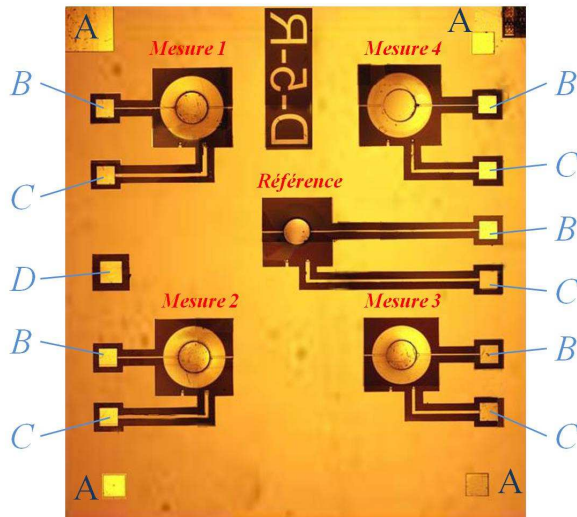


Figure 2.22 : Photo obtenue par microscopie optique d'une puce de cinq membranes.

Membrane	R_1	R_2
Mesure 1	220 μm	440 μm
Mesure 2	200 μm	400 μm
Mesure 3	210 μm	420 μm
Mesure 4	215 μm	430 μm
Référence	180 μm	360 μm

Table 2.3 : Table des différents rayons de membrane et de pastilles piézoélectriques pour les cinq membranes d'une puce.

Les plots de contact légendés A sur la figure permettent le contact à la masse commune de la puce. Les plots notés B et C permettent respectivement l'actionnement des pastilles piézoélectriques et l'entrée du courant de polarisation des piézorésistances.

Descriptif synthétique des étapes technologiques

Substrat initial : Silicon-On-Insulator 525 μm / 1 μm / 5 μm

0 : Définition des motifs d'alignement

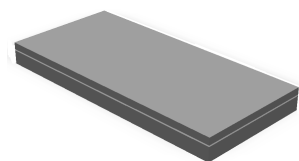
- 0a) Définition des motifs (Photolithographie, 1^{er} masque)
- 0b) Gravure physique par ion réactifs assistée par plasma (RIE : Réactive Ion Etching) du silicium monocristallin face avant, profondeur 2 μm .

1 : Implantation des piézorésistances

- 1a) Croissance d'un oxyde thermique de masquage (SiO_2 ; 300 nm)
- 1b) Définition des piézorésistances (2^{ème} masque)
- 1c) Ouverture des motifs (Gravure humide HF tamponné)
- 1d) Croissance de l'oxyde de protection (SiO_2 ; 6 nm)
- 1e) Pré-amorphisation Germanium ($5 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$, 60keV)
- 1f) Dopage Bore ($1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, 15keV)
- 1g) Gravure totale des oxydes implantation (Gravure humide HF tamponné)
- 1h) Recuit Thermique rapide

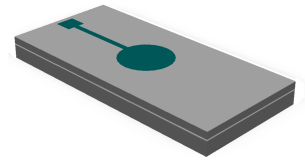
2 : Protection des piézorésistances et aménagement de contacts électriques

- 2a) Dépôt de dioxyde de silicium par voie chimique assistée par plasma, 100 nm
- 2b) Définition des ouvertures des contacts électriques vers les piézorésistances (photolithographie, 3^{ème} masque)
- 2c) Ouverture des contacts (Gravure humide, HF tamponné)



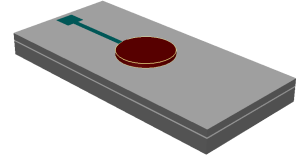
3 : Dépôt de l'électrode inférieure

- 3a) Dépôt d'une couche de dioxyde de zirconium ZrO_2 , 80 nm
- 3b) Définition des motifs (Photolithographie, 4^{ième} masque)
- 3c) Dépôt chimique assisté par plasma d'une couche d'accroche d'oxyde de titane, 10 nm
- 3c) Dépôt d'une couche de Platine, 140 nm
- 3d) Structuration par lift-off



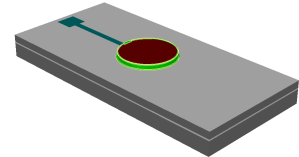
4 : Dépôt de la pastille de PZT

- 4a) Définition des motifs (Photolithographie, 5^{ième} masque)
- 4b) Dépôt d'une couche de PZT ($\text{PbZr}_{x-1}\text{Ti}_1-x\text{O}_3$), 1 μm
- 4c) Structuration par lift-off



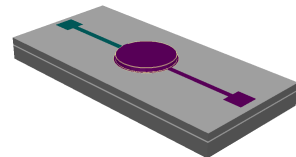
5 : Dépôt de la couronne de protection électrique

- 5a) Définition des motifs (Photolithographie, 6^{ième} masque)
- 5b) Dépôt d'une couche de dioxyde de zirconium ZrO_2 , 100 nm
- 5c) Structuration par lift-off



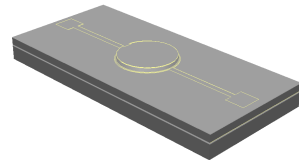
6 : Dépôt de l'électrode supérieure

- 6a) Définition des motifs (Photolithographie, 7^{ième} masque)
- 6b) Dépôt d'une couche d'accroche d'oxyde de titane, 10 nm
- 6c) Dépôt d'une couche de Platine, 140 nm
- 6d) Structuration par lift-off



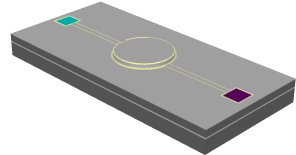
7 : Passivation des structures d'actionnement

Dépôt par voie chimique assisté par plasma d'une couche de dioxyde de silicium en trois étapes, épaisseur totale 300 nm



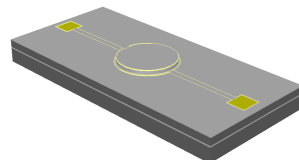
8 : Ouverture des contacts électriques vers les piézorésistances et les pastilles d'actionnement

- 8a) Définition des motifs (Photolithographie, 8^{ième} masque)
- 8b) Gravure de l'oxyde de passivation (Gravure chimique HF tamponné)



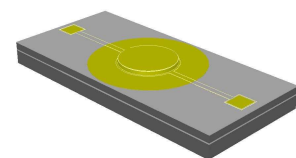
9 : Renforcement des plots de contact électriques

- 9a) Définition des motifs (Photolithographie, 9^{ième} masque, réplique du dernier masque mais polarité inversée)
- 9b) Dépôt d'une couche d'accroche d'oxyde de titane, 100 nm
- 9c) Dépôt d'une couche d'or, 700 nm
- 9d) Structuration par lift-off



10 : Dépôt de la pastille d'or pour la fonctionnalisation biologique des micromembranes.

- 10a) Définition des motifs (Photolithographie, 10^{ième} masque)
- 10b) Dépôt d'une couche d'accroche d'oxyde de titane, 10 nm
- 10c) Dépôt d'une couche d'or, 100 nm



11 : Libération des membranes

11a) Gravure de l'oxyde face arrière (Gravure humide Solution d'acide fluorhydrique HF)

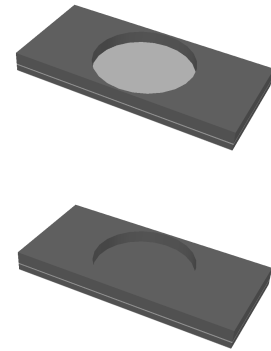
11b) Définition des motifs (Photolithographie face arrière avec alignement inversé, 11^{ème} masque)

11c) Gravure physique profonde par ions réactifs assistée par plasma (Deep-RIE : Deep Reactive Ion Etching) du silicium du substrat à partir de la face arrière :

Gravure du silicium classique : 3h 05 min

Gravure du silicium optimisée SOI+ kit « anti-notching » : 25 min.

11d) Gravure de l'oxyde enterré, gravure sous phase vapeur (vapeurs d'acide fluorhydrique, 105 min)



II.3. Intégration des microsystèmes

III.3.1. Packaging des microsystèmes

En fin de processus de microfabrication, afin d'éviter la découpe des puces à la scie diamantée qui provoque des microvibrations dans la plaquette susceptibles d'endommager les membranes, des lignes de découpes ont été aménagées sur le même masque que celui employé pour la gravure DRIE face arrière. Ces lignes de découpe, gravées sur 525 μm , permettent via une simple pression avec une pointe diamantée de séparer les puces les unes des autres. Les puces passent ensuite une série de tests électriques et électromécaniques (cf chapitre III) afin de déterminer leurs caractéristiques de vibration. Les puces considérées comme les plus intéressantes d'un point de vue de la dispersion des cinq valeurs de piézorésistances et du point de vue des résistivités des couches piézoélectriques sont sélectionnées pour être intégrées au prototype de plateforme de détection d'agents biologiques simulant la menace.

Le support retenu dans le cadre de cette étude pour le collage des puces est un support en époxy (Micro CI, Seysses). Les puces sont collées par leur face arrière sur la face appropriée du support époxy via une colle diélectrique. Ce support époxy FR4 a été conçu pour accueillir sur sa face inférieure la tête de mesure préliminaire du signal de détection issu des piézorésistances. Il a également été conçu afin que la connectivité du microsystème à l'interface extérieure soit la plus facile à réaliser. Cette mise en connexion s'effectue par microsoudure de fils d'or à la surface des plots de connexion de la puce. Les fils d'or sont ensuite soudés à des places spécifiques, directement reliées à la maille du réseau électrique assurant les étapes avancées d'amplification des signaux de sortie du microsystème.

Afin de préserver le fonctionnement de la puce dans un liquide, les fils d'or ne peuvent pas être laissés apparents sous peine de déclencher de nombreux court-circuits dans le fluide. Afin de les isoler électriquement et mécaniquement de toute sollicitation extérieure, ils sont recouverts intégralement d'une couche de matériau polymère appelé matériau d'enrobage. Les matériaux d'enrobage utilisables dans le cadre d'applications de biodétection sont principalement sélectionnés en fonction de leur biocompatibilité avec les molécules et réactifs employés. Deux types de matériau d'enrobage ont été envisagés. Le premier, souple, à base de silicone, présente l'avantage d'être translucide, ce qui permet un contrôle optique de l'intégrité des fils de connexion. De plus sa structure souple prévient tout arrachement des fils de soudure lors de sa réticulation. Ce matériau n'est cependant pas compatible avec certains solvants organiques nécessaires à l'application du protocole de

fonctionnalisation (notamment l'éthanol absolu utilisé pour la génération de la monocouche auto-assemblée) et ne peut satisfaire nos exigences. Le deuxième matériau d'enrobage utilisé est un matériau dérivé de colles époxy isolantes : le polymère H70 E-2 de la marque Epotek (Billerica, Massachussets). Ce polymère présente une très bonne tenue à l'ensemble des solvants et réactifs utilisés lors des protocoles biologiques de fonctionnalisation et de détection, de plus sa viscosité est suffisamment élevée pour faciliter son dépôt et sa structuration autour de la puce et des fils de soudure. La figure 2.23 montre la photographie d'une puce collée, soudée au support époxy FR4 et encapsulée par le matériau d'enrobage Epotek H70 E-2.

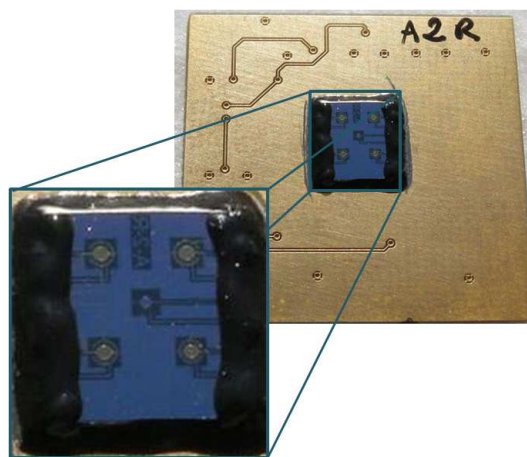


Figure 2.23 : Photographie d'une puce de cinq membranes montée sur un support époxy FR4 dédié, les fils de connexion reliant les plots de contacts au support étant encapsulés par le matériau d'enrobage H70 E-2.

II.3.2. Electronique de détection

II.3.2.1. Objectifs

La transduction du mouvement vibratoire des micromembranes par les jauges piézorésistives, se traduit par une variation périodique de la valeur de la piézorésistance. Afin d'exploiter, amplifier et traiter un tel signal, la solution retenue dans le cadre de cette étude consiste à générer une tension aux bornes de la piézorésistance via la polarisation de celle-ci par un courant électrique. Le signal résultant doit ensuite être amplifié.

Dans l'optique de pouvoir réaliser des tests de détection pour plusieurs types d'agents pathogènes simulant la menace en simultanés, nous avons intégré aux objectifs de l'électronique de détection la capacité de pouvoir assurer la mesure, l'amplification et le traitement de plusieurs signaux issus des piézorésistances en même temps.

Comme il a été vu à la section II.1, le cadre théorique d'augmentation des performances de notre microsystème en tant que biocapteur réside dans l'opération de membranes larges, opérées cependant selon des modes de vibrations supérieurs au mode de vibration fondamental. Afin de s'assurer que le facteur de qualité des micromembranes ainsi fabriquées et actionnées soit suffisamment élevé pour permettre un suivi de la fréquence de résonance dans le fluide avec des bons rapports signal/bruit, le choix a été fait d'intégrer à l'électronique un dispositif de rétroaction positive,

permettant d'augmenter l'amplitude du signal d'actionnement au moment précis de la résonance. Cette méthode, connue dans le cas de leviers résonants pour des microscopes à force atomique, a été utilisée dans le cas de biocapteurs initialement par Tamayo *et al* en 2001 [28]. Elle a pour principal effet d'augmenter physiquement l'amplitude des oscillations de la membrane à la résonance tout en laissant au même niveau les amplitudes de vibration des membranes hors résonance. Cette action tend logiquement à augmenter le facteur de qualité par rapport à une configuration où l'amplitude du signal d'actionnement reste constante.

Un ensemble de sources de bruits de différentes natures (électriques, optiques) sont susceptibles d'agir sur l'ensemble de la puce au cours de l'opération de la plateforme. Dans l'optique de s'affranchir de tous ces bruits de mode commun, une stratégie de mesure différentielle doit être appliquée. La mesure de la fréquence de résonance d'une membrane de mesure s'effectue alors grâce au signal obtenu par comparaison des signaux issus de la piézorésistance de la membrane de mesure et de la piézorésistance de la membrane de référence. Le fait que la membrane de référence ne possède pas de pastille d'or circulaire en son sommet implique qu'elle n'est pas sujette à des phénomènes de reconnaissance biologique, elle retranscrira donc uniquement l'influence des sources de bruits externes agissant sur la puce.

D'un point de vue plus général, la réduction de l'influence, sur la mesure de la fréquence de résonance, de diverses sources de bruit a été un objectif fort lié à la conception de l'électronique. Ces considérations nous ont poussés à envisager la conception et la fabrication d'une électronique d'actionnement/détection en deux parties distinctes :

- Une tête de mesure préliminaire au plus près du capteur, assemblée sur la face arrière du support époxy utilisé pour le collage de la puce. Son rôle est d'assurer la polarisation du microsystème et de réaliser les amplifications préliminaires.
- Une carte électronique globale, connectée à la tête mesure, dont le rôle est d'assurer la commande individuelle de chaque micromembrane à sa fréquence de résonance, la polarisation de la tête de détection, l'amplification des signaux de mesure ainsi qu'un traitement numérique et une stratégie de suivi de la fréquence d'oscillation de chaque membrane.

II.3.2.2. Principe et fabrication

Le principe retenu pour effectuer la mesure des variations de la piézorésistance est une structure dite en « demi-pont » [29]. Il s'agit d'une structure pont complète, dans laquelle des sources de courant remplacent les deux résistances supérieures. Le schéma descriptif de ce principe de mesure est donné à la figure 2.24.

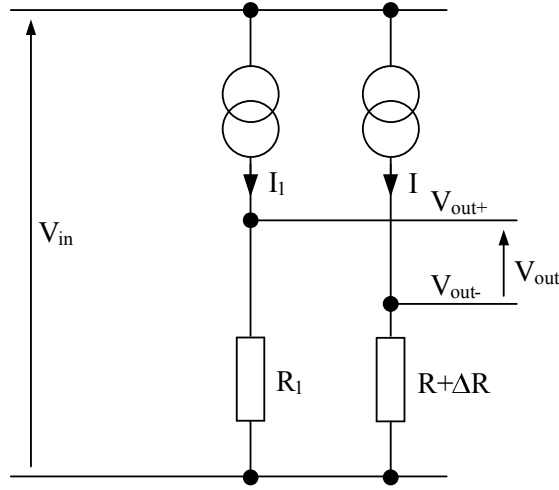


Figure 2.24 : schéma de principe de la mesure par demi-pont

Afin de suivre uniquement les variations de résistance relatives, il faut placer ce pont dans une position d'équilibre. Cet équilibre est atteint pour une tension différentielle de sortie nulle : $V_{out} = 0$, soit $V_{out+} = -V_{out-}$. Cette condition se traduit par :

$$V_{in} - I_1 R_1 = V_{in} - (R + \Delta R) I \quad \Rightarrow \quad I_1 R_1 = R I + \Delta R I \quad (2.34)$$

Ainsi, si l'on exprime la tension de sortie différentielle :

$$V_{out} = V_{out+} - V_{out-} = \Delta R I + R I - R_1 I_1, \quad (2.35)$$

ceci implique que dans la condition d'équilibre $I_1 R_1 = I R$, la tension de sortie soit uniquement liée à la variation de résistance relative soit :

$$V_{out} = \Delta R I \quad (2.36)$$

L'application de ce principe de mesure pour les micromembranes étudiées ici impose de travailler avec des niveaux de puissance injectée très faibles. En effet, la puissance mise en jeu a pour expression :

$$P = (R + \Delta R) I^2 \quad \text{et si } R \gg \Delta R \quad \Rightarrow \quad P \approx R I^2 \Rightarrow \quad I \approx \sqrt{\frac{P}{R}} \quad (2.37)$$

Afin de maintenir un état de fonctionnement stable, il est nécessaire de maîtriser parfaitement la puissance électrique injectée dans les microstructures et de la maintenir constante. Le gain de transduction de l'étage de détection peut donc être exprimé en fonction de la puissance injectée, selon :

$$V_{out} = \Delta R \cdot I \quad \Rightarrow \quad V_{out} \approx \frac{\Delta R}{R} \sqrt{P R} \quad (2.38)$$

Nous pouvons remarquer que la sensibilité du demi-pont augmente suivant une progression en racine carrée lorsque la valeur de la résistance de mesure augmente. De plus, à puissance constante, la réponse du système est deux fois meilleure que pour le pont de Wheatstone traditionnel.

Dans la pratique, le schéma permettant de réaliser la mesure différentielle (par rapport à la piézorésistance de référence) des variations relatives de résistance pour les membranes de mesure est représenté par la figure 2.25. I_c , représente le courant de consigne, I_M le courant de mesuré effectif à travers les piézorésistances, V_c représente la tension de commande, optimisée pour permettre la génération de I_c par les générateurs de courant.

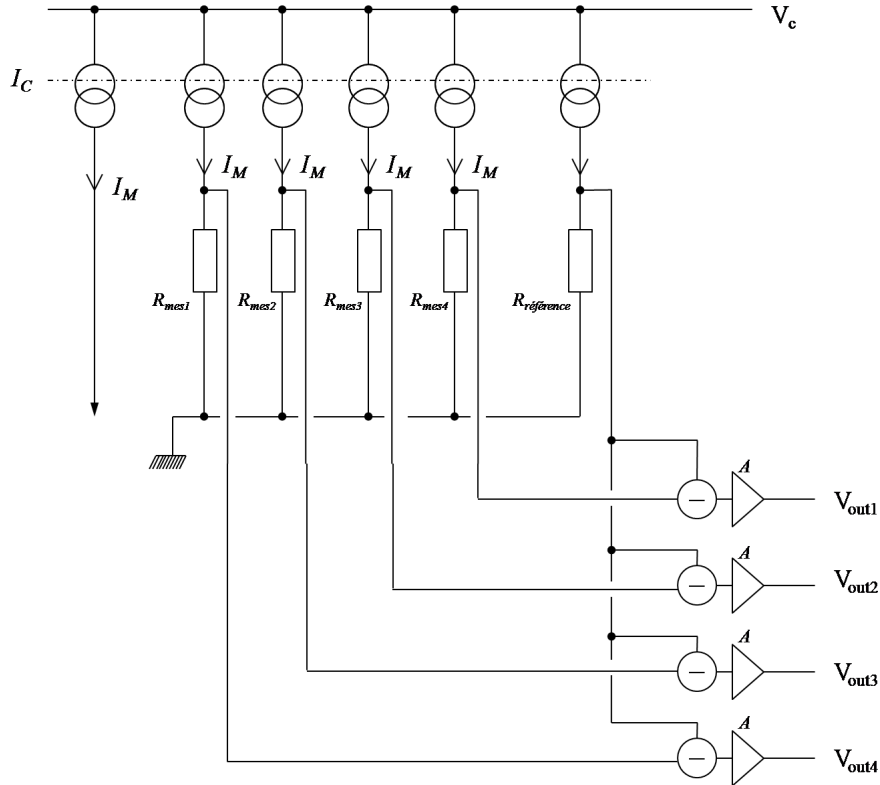


Figure 2.25: Schéma de principe des fonctions électriques contenues dans la tête de mesure préliminaire ; après le demi-pont se succèdent la réalisation de la mesure différentielle puis le premier étage d'amplification selon un gain A .

Considérons le cas d'une membrane de mesure i . La mesure différentielle est effectuée selon le schéma de la figure 2.25 puis le signal est amplifié par le gain A . Ces deux résistances sont susceptibles de vibrer avec leur membrane associée sous l'effet de l'actionnement piézoélectrique donc de présenter des variations au cours du temps ΔR_{ref} et ΔR_{mes} . La tension V_{out} s'exprime donc comme suit et vaut pour les quatre membranes de mesure:

$$V_{out} = V_{out+} - V_{out-} = A I_{pol} (\Delta R_{mes}(\omega) - \Delta R_{ref}(\omega)) + A I_{pol} (R_{mes} - R_{ref}) \quad (2.39)$$

La valeur de $R_{mes} - R_{ref}$ ne peut être connue à l'avance, car les piézorésistances appartiennent à des membranes différentes, réagissant différemment aux variations de température et de contraintes. Ainsi, afin de ne mesurer que les variations relatives, une étape dite de compensation est appliquée au

signal consécutivement à la mesure différentielle et l'amplification préliminaire. Cette étape de compensation est gérée par la carte électronique de commande.

En régime statique, $\Delta R(\omega)$ est égal à zéro pour la membrane de mesure et la membrane de référence. La valeur de la tension (liée aux résistances statiques) est alors mesurée. Une tension de compensation est déterminée égale à cette mesure, puis est soustraite à la valeur de la tension V_{out} en régime vibratoire. Une fois la compensation effectuée, on obtient un signal sinusoïdal (si la tension d'actionnement est sinusoïdale) et dont la valeur moyenne est nulle et traduisant la variation relative de résistance pour la piézorésistance de mesure et la piézorésistance de référence :

$$V_{out} = A I_{pol} (\Delta R_{mes}(\omega) - \Delta R_{ref}(\omega)) \quad (2.40)$$

La variation relative de résistance $\frac{\Delta R}{R}$ à mesurer est de l'ordre de 10^{-4} . Il faut comparer cette valeur à la différence de valeurs statiques des résistances qui est au plus de l'ordre de 20%.

Ainsi, sans l'étape de compensation, l'amplification de la composante statique du signal issu de la mesure différentielle provoquerait très rapidement la saturation du système électronique de détection, conçu pour fonctionner avec des signaux entre +5V et -5V. De même, il serait impossible d'envisager l'utilisation d'une boucle de rétroaction positive, puisqu'elle provoquerait indubitablement la divergence du signal, entraînant la saturation du système.

Une fois la compensation effectuée, plusieurs amplifications à gains réglables et traitements sont appliquées aux signaux sur la carte électronique « de commande ». Sont également inclus sur la carte les composants permettant de réaliser le fonctionnement de la micromembrane en utilisant la boucle de rétroaction positive. La structure globale des principales fonctions de la carte électronique de commande est synthétisée par la figure 2.26.

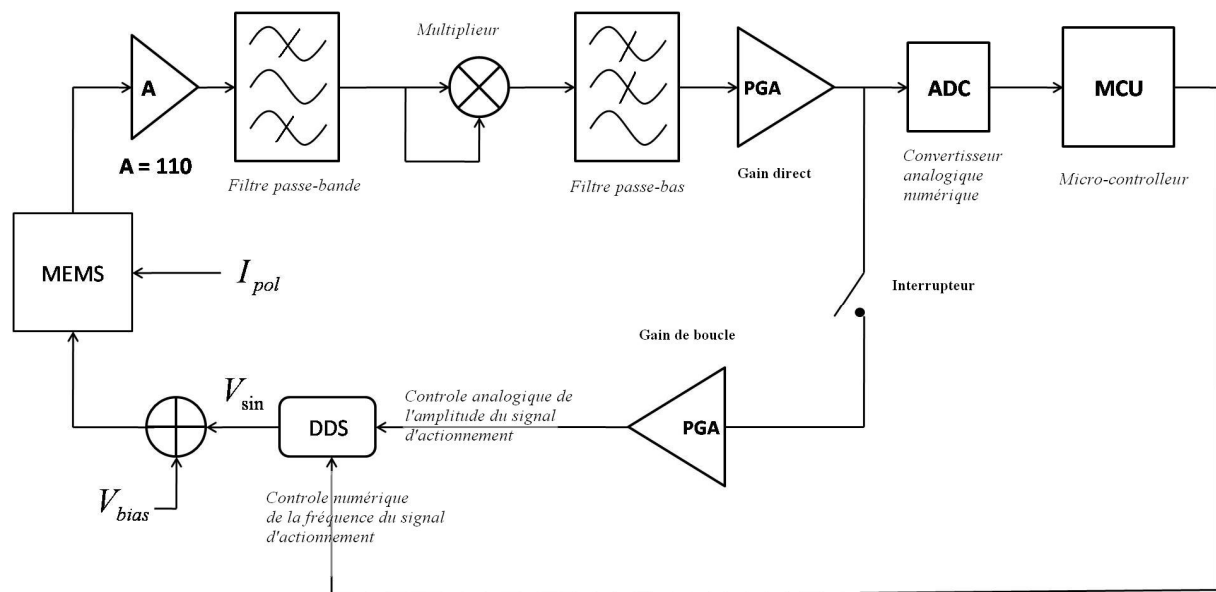


Figure 2.26 : Schéma décrivant les principales fonctions réalisées par la carte de commande.

Le filtre passe-bande permet d'exclure tout phénomène vibratoire parasite, n'appartenant pas à la bande-passante définie préalablement.

L'ensemble de fonctions comprenant l'élévation du signal au carré puis le filtrage du signal par un filtre passe-bas permet d'extraire l'enveloppe de l'amplitude du signal sinusoïdal selon l'opération suivante :

$$\begin{array}{ccccc}
 V(t) = V_o(t) \sin(\omega t) & & V(t) = V_o(t)^2 \sin(\omega t)^2 & & V(t) = \frac{1}{2} V_o(t)^2 \\
 & \nearrow & V(t) = \frac{1}{2} V_o(t)^2 - \frac{1}{2} \cos(2\omega t) & \nearrow & \\
 & X \rightarrow X^2 & & \text{Filtrage des hautes fréquences} &
 \end{array}$$

Une première étape d'amplification de l'enveloppe est alors appliquée, suivant un gain réglable dénommé **gain direct**.

Afin de synchroniser le traitement des différentes informations et l'exécution des différentes fonctions, un microcontrôleur (modèle 18F452, MicroChip, Chandler, Arizona) est implémenté sur la carte électronique de commande. Ce composant a pour rôle de traiter les informations envoyées par l'utilisateur via l'interface, d'effectuer l'exécution et le contrôle des mesures puis finalement de renvoyer les résultats vers l'interface.

Le composant utilisé pour assurer l'actionnement des membranes est un synthétiseur digital à commande numérique en fréquence et à commande analogique en amplitude. La commande numérique en fréquence permet au microcontrôleur d'effectuer les balayages en fréquences nécessaires à l'étude des résonances de la membrane, ainsi que le suivi en temps réel des fréquences de résonance. La commande analogique est primordiale lorsque la boucle de rétroaction positive est enclenchée (via l'interrupteur mécanique). Dans ce cas, le signal « enveloppe » représentant la variation de l'amplitude en fonction de la fréquence d'actionnement est amplifié selon un second gain réglable appelée **gain de boucle** puis ce signal est utilisé pour générer un nouveau profil d'amplitude pour la tension d'actionnement du synthétiseur digital.

L'interface informatique permet de contrôler les paramètres de polarisation des piézorésistances, les paramètres d'amplification du signal selon la chaîne directe et selon la boucle de rétroaction (gain direct et gain de boucle). Elle permet de paramétrer le balayage en fréquence de la membrane et d'en observer les résultats. Enfin, à partir de ces résultats, il est possible à l'utilisateur de paramétrer un suivi temporel de la fréquence de résonance de plusieurs membranes en simultané.

La figure 2.27 montre une photographie de la carte de commande et de la tête de mesure préliminaire.

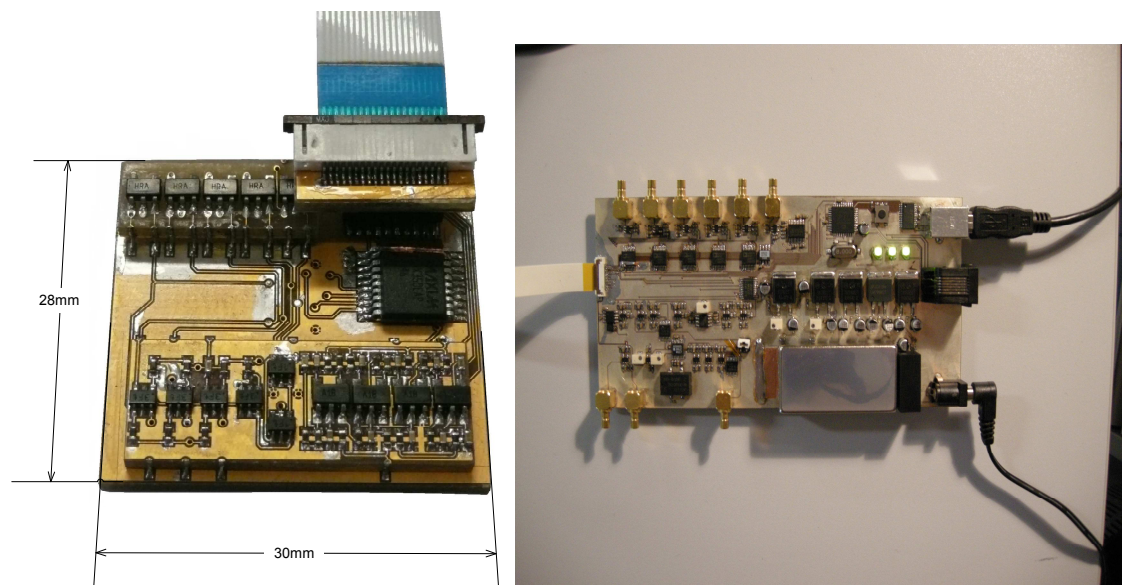


Figure 2.27 : A gauche, photographie de la tête de mesure préliminaire, connectée à la carte de commande via un câble en nappe. A droite, photographie de la carte de commande reliée à l'interface informatique via un technologie USB.

II.3.3 Cellule fluide associée

La cellule fluide destinée à recevoir le microsysteme et sa chambre de réaction est un bloc d'aluminium de longueur 40 mm, de largeur 30 mm et d'épaisseur 10 mm. Elle est composée de deux pièces assemblées qui sont le capot et le support fluide.

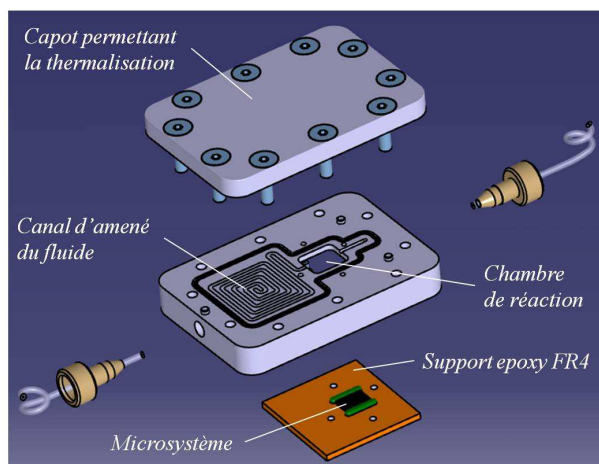


Figure 2.28 : Vue schématique éclatée de différentes composantes de la cellule fluide associée à la plateforme de détection

Cette cellule doit permettre une mise en température éventuelle du fluide de test ainsi que la mesure du fluide en temps réel à l'aide du microsysteme associé. Pour permettre une thermalisation de la cellule, il a été prévu la possibilité de lui adjoindre un module Peltier.

Pour effectuer la mise en température du fluide de mesure, la cellule dispose d'un canal d'amenée de section carrée de $500\mu\text{m}$ de coté avec une longueur d'environ 400mm . Le débit maximal de liquide dans le canal est de 1ml/min , la contenance du canal d'amenée de fluide est d'environ $100\mu\text{l}$.

La sortie de ce canal débouche sur la chambre de mesure. Cette chambre dispose d'une contenance à vide de $130\mu\text{l}$ dans laquelle est placé le microsystème de mesure. Le volume du microsystème est évalué à environ 50mm^3 (soit $50\mu\text{l}$). De ce fait, en fonctionnement normal, la quantité de liquide présente dans la chambre est de $80\mu\text{l}$.

Le microsystème de mesure est alors positionné dans la chambre de réaction. Le support du microsystème et de la tête de mesure préliminaire est placé en pression sur la chambre grâce à un joint en PDMS (Polydimethylsiloxane) et permet ainsi de fermer l'ensemble. Enfin, un canal de sortie de même section que le canal d'entrée permet l'évacuation du fluide, sa contenance étant d'environ $5\mu\text{l}$.

La fabrication de la cellule fluide a été réalisée à l'atelier mécanique du LAAS par Xavier Dollat (service 2I). L'intégrité et l'étanchéité du circuit fluide ont été testées avec succès en utilisant des puces tests non fonctionnelles, collées sur les supports Epoxy. Une amélioration a été apportée cependant, un capot transparent en Poly(méthyl méthacrylate) (PMMA) a été usiné afin de pouvoir observer la présence et l'évacuation de bulles d'air qui viendraient à se former dans la chambre de réaction. Enfin, une encoche de forme rectangulaire a été emménagée dans le capot à l'endroit où celui-ci réalise la fermeture de la chambre de réaction, afin de pouvoir intercaler de fines plaques de matériau divers et tester ainsi plusieurs matériaux pour la fermeture de la chambre de réaction. Nous verrons dans les prochains chapitres comment le choix de ce matériau a une influence sur la qualité du phénomène de résonance des membranes. La figure 2.29 présente une photographie de la partie intermédiaire de la cellule fluide abritant le canal d'amenée du fluide et la plaque époxy support du microsystème et de la tête de détection électronique préliminaire.

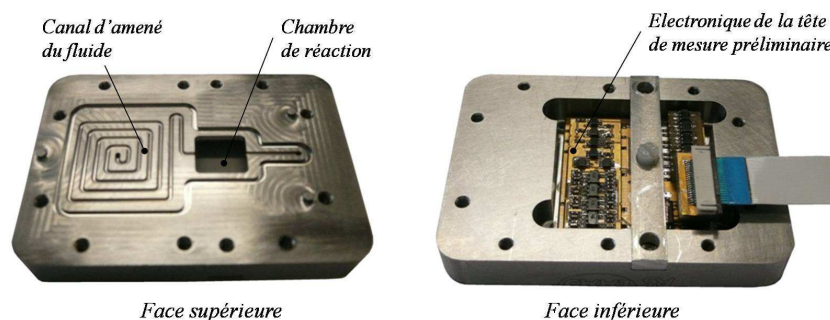


Figure 2.29 : Photographie des deux faces de la partie intermédiaire de la cellule fluide : on distingue sur la face supérieure le canal d'amenée du fluide et la chambre de réaction (vide ici). La face inférieure accueille le support époxy contenant le microsystème et l'électronique de la tête de mesure préliminaire.

II.4. Conclusion

Les différentes parties du système complet peuvent alors être assemblées pour constituer le prototype de la plateforme de détection d'agents biologiques simulant la menace. La configuration du

dispositif expérimental est présentée à la figure 2.30. Le capillaire entrant du fluide est relié à un système d'injection fluide, en l'occurrence une pompe péristaltique ou un pousse-seringue. Un oscilloscope est connecté à la carte de commande afin de pouvoir observer les signaux de mesure et leur traitement au niveau de la carte de commande. La figure 2.31 présente une capture d'écran de l'interface informatique ainsi qu'une capture d'écran d'une courbe de résonance telle qu'enregistrée et tracée par l'interface.

La caractérisation de l'ensemble des caractéristiques vibratoires des microsystèmes ainsi que de l'ensemble des performances de la plateforme est effectuée au cours des deux chapitres suivants.

Cependant il est possible d'aborder dès maintenant la température de fonctionnement de la plateforme, mesurée au niveau de la chambre de réaction. Le fonctionnement de l'électronique cause une élévation conséquente de la température par rapport à la température ambiante. La cause de cette élévation est liée aux caractéristiques des composants utilisés pour l'élaboration de la tête de mesure préliminaire. Les composants utilisés pour l'amplification ayant une bande passante de 10MHz, ils nécessitent une consommation énergétique relativement importante. Dans les conditions normales d'utilisation, avec une tension d'alimentation symétrique de 6 V, et un courant de polarisation dans le microsystème de 1 mA, la puissance consommée par la carte électronique est d'environ 550 mW. La densité d'intégration au niveau de la tête de mesure préliminaire étant importante, il en ressort une température de fonctionnement mesurée à 33°C au niveau de la chambre de réaction. Cette température est néanmoins jugée compatible avec les protocoles biologiques mis en jeu dans la suite de cette étude.

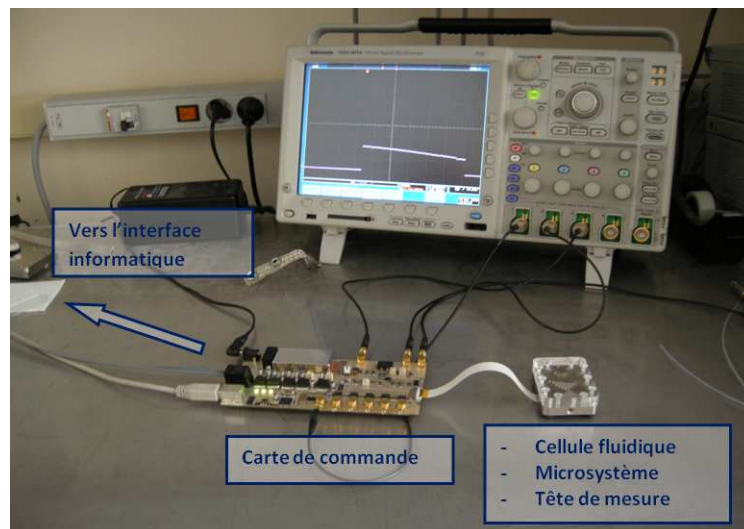


Figure 2.30 : Photographie du prototype de plate-forme de détection d'agents biologiques simulant la menace tenant lieu de dispositif expérimental dans le cadre de cette étude.

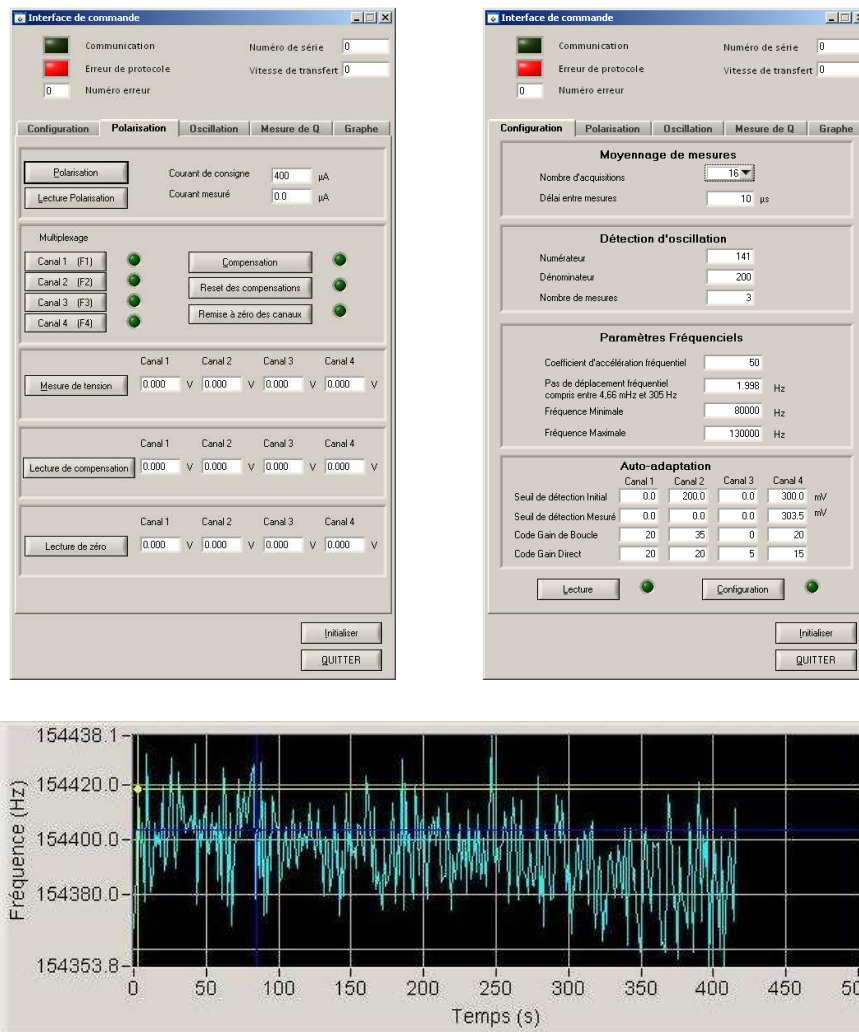


Figure 2.31 : En haut, deux captures d'écran représentatives de l'interface informatique associée à la carte électronique de commande. Les captures d'écran présentées montrent entre autres, la possibilité de réglage de la polarisation des piézorésistances mais également des paramètres d'amplification avec ou sans utilisation de la boucle de rétroaction positive. En bas, capture d'écran montrant un suivi en temps réel d'une micromembrane par détection piézorésistive, vibrant dans l'air et tel qu'affiché par l'interface informatique

Références

- [1] C. Bergaud, L.Nicu et A. Martinez, *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 38 (1999), 6521-6525.
- [2] C. Ayela, “Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel”, thèse, spécialité Conception des Circuits Microélectroniques et Microsystèmes, Université de Toulouse, 2007.
- [3] H. Lamb, “On the vibrations of an elastic plate in contact with water,” *Proceedings of the royal society of London*, vol. 98 (1920), 205-216.
- [4] R.D. Blevins, *Formulas for natural frequency and mode shape*, (1979), Kreiger Publishing Company, New York, NY.
- [5] L. Yao, L. Lu, Z. Wang, W. Zhu, Y. Dai et S.M. Alliance, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 50 (2003), 1262–1271.
- [6] V. Branger, V. Pelosin, K.F. Badawi et P. Goudeau, *Thin Solid Films*, vol. 275 (1996), 22-24.
- [7] P. Delobelle, O. Guillon, E. Fribourg-Blanc, C. Soyer, E. Cattán et D. Rèmeiens, *Applied Physics Letters*, vol. 85 (2004), 5185.
- [8] D.R. Southworth, L.M. Bellan, Y. Linzon, H.G. Craighead et J.M. Parpia, *Applied Physics Letters*, vol. 96 (2010), 163503.
- [9] D.L. DeVoe, “Thin Film Zinc Oxide Microsensors and Microactuators”, thèse, University of California, Berkeley, CA, 1997.
- [10] C. Ayela, T. Alava, D. Lagrange, D. Rèmeiens, C. Soyer, T. Ondarçuhu, A. Greve et L. Nicu, *IEEE Sensors Journal*, vol. 8 (2008), 210.
- [11] T. Alava, C. Ayela et L. Nicu, *Technical Proceedings of the 2007 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show*, vol. 3 (2007), 169-172, Santa Clara, CA.
- [12] P. Muralt, A. Kholkin, M. Kohli, T. Maeder, K.G. Brooks et R. Luthier, *Integrated Ferroelectrics*, vol. 11 (1995), 213–220.
- [13] C. Ayela, L. Nicu, C. Soyer, E. Cattán et C. Bergaud, *Journal of Applied Physics*, vol. 100 (2006), 54908–54908.
- [14] C.S. Smith, *Physical Review*, vol. 94 (1954), 42–49.
- [15] Y. Kanda, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 28 (1991), 83-91.
- [16] A.L. Window, *Strain gauge technology*, (1992) Springer, New York, NY.

- [17] M. Papila, R.T. Haftka, T. Nishida et M. Sheplak, *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 15 (**2006**), 1632-1643.
- [18] Y. Li, C. Vancura, D. Barrettino, M. Graf, C. Hagleitner, A. Kummer, M. Zimmermann, K.U. Kirstein et A. Hierlemann, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 126 (**2007**), 431–440.
- [19] M. Amabili et M.K. Kwak, *Journal of Fluids and Structures*, vol. 10 (**1996**), 743-761.
- [20] J.E. Sader, *Journal of applied physics*, vol. 84 (**1998**), 64.
- [21] W.J.M.J. Josquin, *Applied Physics Letters*, vol. 43 (**1983**), 960.
- [22] T. Inada, A. Kuranouchi, H. Hirano, T. Nakamura, Y. Kiyota et T. Onai, *Applied Physics Letters*, vol. 58 (**1991**), 1748.
- [23] A.Y. Messaoud, E. Scheid, G. Sarabayrouse, A. Claverie et A. Martinez, *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 32 (**1993**), 5805-5812.
- [24] R. Herdier, D. Jenkins, E. Dogheche, D. Rèmesiens et M. Sulc, *Review of Scientific Instruments*, vol. 77 (**2006**), 093905.
- [25] Y. Wang, C. Ganpule, B.T. Liu, H. Li, K. Mori, B. Hill, M. Wuttig, R. Ramesh, J. Finder et Z. Yu, *Applied Physics Letters*, vol. 80 (**2002**), 97.
- [26] S. Bühlmann, B. Dwir, J. Baborowski et P. Muralt, *Applied Physics Letters*, vol. 80 (**2002**), 3195.
- [27] B. Jaffe, W. R. Cook et H. Jaffe, *Piezoelectric Ceramics*, (**1971**) Academic Press, New York, NY.
- [28] J. Tamayo, A.D.L. Humphris, A.M. Malloy et M.J. Miles, *Ultramicroscopy*, vol. 86 (**2001**), 167–173.
- [29] T. Leichle, D. Saya, J.B. Pourciel, F. Mathieu, C. Bergaud et L. Nicu, *1st IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, (**2006**), 730–733.

CHAPITRE III :

Caractérisation dynamique des micromembranes résonantes dans l'air et dans le liquide

III.1. Comportement dynamique des membranes dans l'air

III.1.1. Caractérisation des modes de résonance des membranes dans l'air

Comme nous l'avons précisé au chapitre I, la possibilité de disposer d'un moyen d'actionnement intégré au biocapteur microgravimétrique rend possible l'utilisation de ce dernier dans un fluide. Cela sera essentiel pour des applications de reconnaissances biologiques basées sur la réaction d'association/dissociation antigène/anticorps. Si nous traitons le cas des membranes vibrant dans le fluide au cours de la section III.2, il est important de valider premièrement la capacité du film piézoélectrique d'assurer la mise en vibration à la fréquence de résonance des micromembranes selon différents modes vibratoires. C'est cette validation que nous présentons ici.

Afin d'attester la vibration ainsi que la résonance de la membrane, il convient de rendre compte du mouvement périodique de celle-ci et de mettre en évidence un maximum d'amplitude de vibration. Dans le cadre de ces travaux, cette validation a été obtenue par une étude de vibrométrie menée grâce à un interféromètre optique Zoomsurf 3D (Fogale Nanotech, Nîmes, France) équipé d'un dispositif d'éclairage stroboscopique. L'interférométrie optique est aujourd'hui une technique de caractérisation à la micro-échelle très répandue. De nombreux travaux pionniers ont été initiés et approfondis par Alain Bosseboeuf à l'IEF (Institut d'Electronique Fondamentale), notamment sur l'utilisation d'un éclairage stroboscopique pour la caractérisation de structures vibrantes [1]. Pour réaliser ce protocole, nous plaçons le support epoxy FR4 supportant les microsystèmes sous l'objectif du microscope de l'interféromètre, seule la partie actionnement de l'électronique associée est utilisée et la fréquence de l'éclairage stroboscopique est synchronisée avec la fréquence de la tension d'actionnement. Ce dernier point permettant de « figer » la structure de la membrane oscillante selon une déformée spatiale prise parmi l'ensemble des déformées spatiales composant le mouvement de vibration au cours du temps. Le dispositif d'éclairage du microscope permet alors d'effectuer un balayage de la phase de la lumière stroboscopique ce qui permet d'observer séquentiellement plusieurs déformées spatiales prises à intervalles réguliers au cours du mouvement de la micromembrane. L'observation de cette séquence de déformées traduites par la séquence de frange d'interférence à la surface de la membrane a permis de rendre compte de la vibration de cette dernière. En effectuant un balayage de la fréquence d'actionnement/d'éclairage, il a été possible d'observer plusieurs maxima d'amplitude de vibration attestant de la résonance de la membrane selon divers modes de vibration. Afin de déterminer pour chaque phénomène de résonance de la membrane la forme du mode décrivant la vibration, un algorithme présent dans le logiciel du microscope permet d'extrapoler le mouvement complet de la membrane à partir de la séquence de franges d'interférences correspondant au

différentes déformées spatiales de la membrane. Grâce à cet algorithme, nous avons pu identifier les formes de modes associées aux 15 premières fréquences de résonance.

Il nous a été possible de mettre en correspondance les fréquences de résonance relevées par cette détection optique et les fréquences de résonance obtenues par la simulation modale des membranes à l'aide d'un modèle à éléments finis. La table 3.1 synthétise la comparaison des fréquences de résonances obtenues par simulation éléments finis et par vibrométrie optique pour une membrane d'un rayon de 465 μm (initialement prévu sur le masque de photolithographie : 440 μm , plus une sur-gravure de 25 μm). L'influence de cette sur-gravure a été prise en compte dans les simulations éléments finis ayant aboutis aux résultats présentés ici. Les figures 3.1 (a), (b) et (c) précisent l'identification expérimentale du mode de vibration fondamental (0,0) du sixième mode (0,1) et du quinzième mode (0,2), que nous avons retenus comme modes de fonctionnement optimaux de la membrane à détection piézorésistive. Les images obtenues attestant de l'identification des autres modes (les modes dégénérés) sont présentées en annexe B afin d'illustrer la potentialité de l'actionnement piézoélectrique intégré à maintenir en oscillation la membrane selon chacun de modes de vibration possibles prédits théoriquement.

Modes observés	Notation (m,n)	Fréquence de résonance théorique	Fréquence de résonance expérimentale
1	(0,0)	88,2 kHz	87,7 kHz
2	(1,0)	237,0 kHz	173,9 kHz
3	(1,0) (rotation $\pi/2$)	241,2 kHz	175,3 kHz
4	(2,0)	419,1 kHz	280,6 kHz
5	(2,0) (rotation $\pi/4$)	420,9 kHz	290,0 kHz
6	(0,1)	502,2 kHz	330,4 kHz
7	(3,0)	738,9 kHz	412,7 kHz
8	(3,0) (rotation $5\pi/6$)	748,3 kHz	413,8 kHz
9	(1,1)	893,4 kHz	491,2 kHz
10	(1,1) (rotation $\pi/2$)	918,2 kHz	501,4 kHz
11	(4,0)	1215,1 kHz	561,8 kHz
12	(4,0) (rotation $\pi/8$)	1223,7 kHz	563,7 kHz
13	(2,1)	1512,5 kHz	662,5 kHz
14	(2,1) (rotation $\pi/4$)	1549,2 kHz	686,6 kHz
15	(0,2)	1597,2 kHz	713,0 kHz

Table 3.1 : Comparaison des fréquences de résonances d'une micromembrane de $465\text{ }\mu\text{m}$ de rayon ($440\text{ }\mu\text{m} + 25\text{ }\mu\text{m}$ de surgravure) obtenues par analyse modale numérique à partir d'un modèle à éléments finis et obtenues expérimentalement par vibrométrie stroboscopique à partir d'un interféromètre optique.

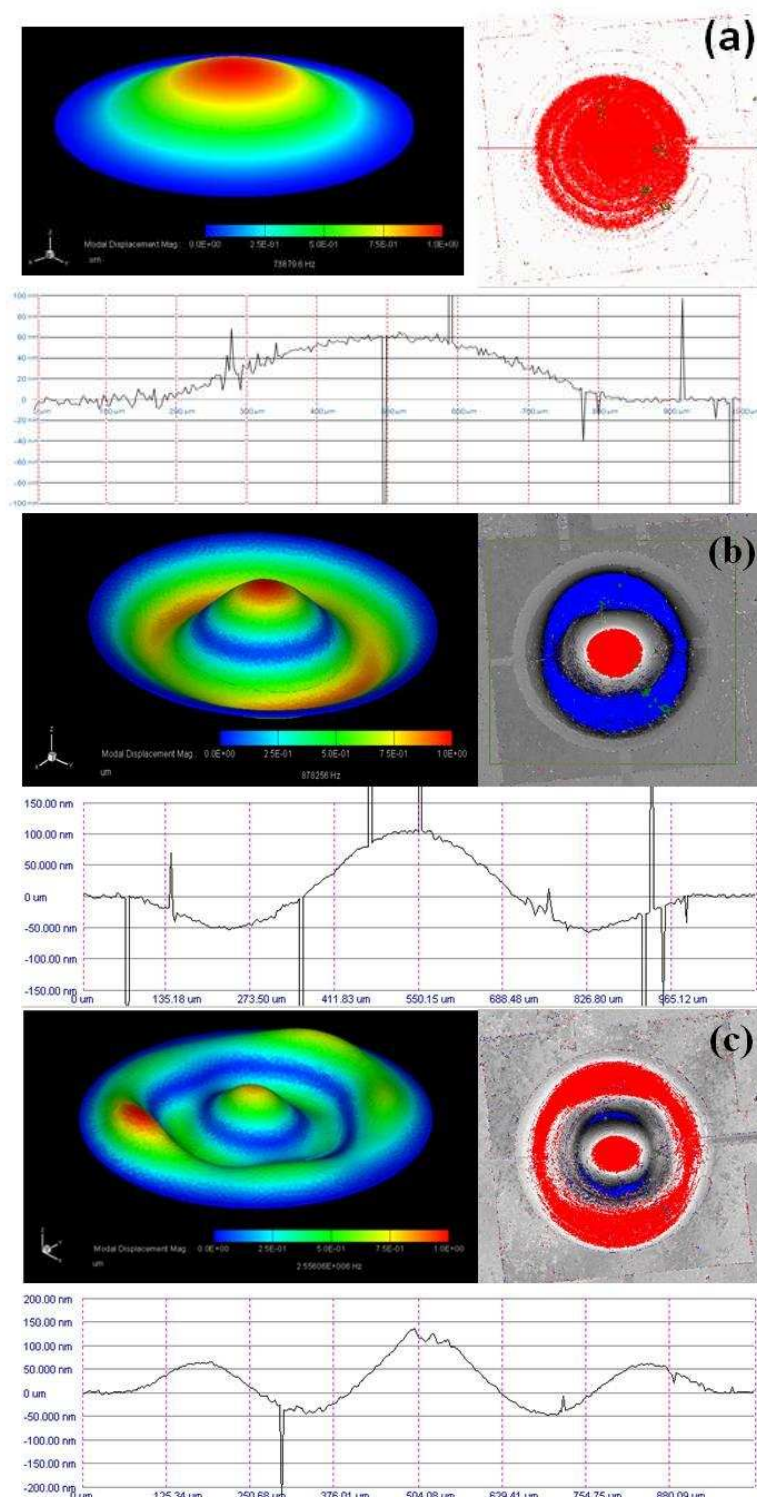


Figure 3.1 : (a) Forme du mode fondamental (0,0) d'une membrane de $465\text{ }\mu\text{m}$ de rayon, obtenu par simulation par éléments finis, comparé à l'image de surface et à la coupe de la déformée maximale au cours de la vibration obtenues par interférométrie optique. Les mêmes courbes sont présentées en (b) pour le mode (0,1) et en (c) pour le mode (0,2).

Nous constatons que la correspondance entre les fréquences de résonance théorique telles que prévues par la simulation et les fréquences de résonance expérimentales est correcte pour le premier

mode, mais se détériore pour les modes de vibration supérieurs. Globalement, si l'ordre d'apparition des modes est respecté entre l'expérience et les simulations, les écarts de fréquence entre deux modes successifs expérimentaux sont considérablement resserrés.

Ce dernier point ne peut être expliqué à ce jour. En effet, nos structures sont précontraintes, non-uniformes (pastille de matériau piézoélectrique d'un rayon inférieur à celui de la membrane) et non-homogènes (succession de différentes couches aux propriétés différentes), la cohérence d'une analogie avec une structure simple est donc fortement discutable. L'hypothèse émise pour expliquer le resserrement des fréquences est relative à la mésestimation des contraintes internes des couches ; en effet, les valeurs prises dans la littérature ont été calculées pour des structures de dimensions différentes. De même, les contraintes mesurées au LAAS, l'ont été en utilisant une méthode de mesure macroscopique. Nous préconisons à l'avenir de réaliser des structures tests permettant de mesurer les contraintes des matériaux au plus près des microstructures et ainsi estimer au mieux les contraintes intrinsèques des matériaux. De même, il serait souhaitable de poursuivre les investigations théoriques établies pour des membranes uniformes afin d'obtenir un modèle analytique global pour nos membranes non-uniformes, non-homogènes et précontraintes.

III.1.2. Détection piézorésistive et spectre de résonance dans l'air

Afin de valider la détection piézorésistive de la vibration de la membrane, le prototype de la plateforme de détection biologique est connecté via le microcontrôleur à l'interface informatique qui nous permettra de régler le courant de polarisation des piézorésistances, les gains d'amplification, et d'observer les signaux mesurés. Ici, l'amplitude de la tension d'actionnement est réglée à 100 mV crête à crête, le courant de polarisation est réglé à 500 μ A. Nous rappelons que l'interface couplée à l'électronique de détection permet d'enregistrer la valeur du carré de l'amplitude de vibration de la membrane en fonction de la fréquence du signal d'actionnement (donc de la fréquence de vibration de la membrane). La réalisation d'un balayage de la fréquence du signal d'actionnement permet d'obtenir le spectre dynamique de vibration de la membrane. L'électronique associée est utilisée dans ce cas en configuration de boucle ouverte. Dans un premier temps, afin de contrôler le bon fonctionnement de la plateforme, un oscilloscope Tektronix MSO4054 est équipé afin de tracer les principaux signaux électriques utiles à la mise en œuvre de la détection piézorésistive de la résonance de la membrane. La figure 3.2 présente le spectre de vibration d'une membrane de 430 μ m entre les fréquences d'actionnement 5 kHz et 1500 kHz.

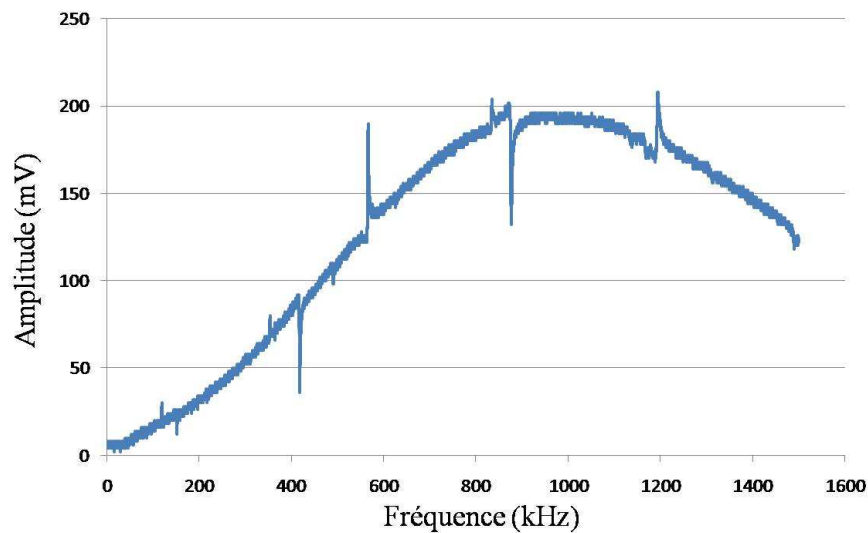


Figure 3.2. : Spectre en fréquence de l'amplitude du signal issu de la piézorésistance pour une membrane de 430 μm , entre 5 kHz et 1500 kHz

Les fréquences correspondant aux extrema locaux d'amplitude de vibration, correspondent aux fréquences de résonance relevées grâce à l'interféromètre optique lors des tests de validation de l'actionnement piézoélectrique intégré. Mais la preuve définitive que ces extrema correspondent à des phénomènes de résonance nous est apportée par l'observation du signal de la tension aux bornes de la piézorésistance via l'oscilloscope. En effet celui-ci subit une brusque variation de phase au passage des fréquences correspondant aux extrema locaux. Or ce brusque changement de phase est une des signatures de tout phénomène de résonance.

Afin d'interpréter la courbe présentée, précisons que chaque extrema local (minimum ou maximum d'amplitude de vibration) peut être mis en correspondance avec une fréquence de résonance relevée par détection optique lors de la validation de l'actionnement piézoélectrique interne. Nous déduisons alors que de nombreux phénomènes parasites viennent perturber le signal de résonance puisque certains pics rendent compte de minima de vibration ce qui correspondrait à une « antirésonance ». La compréhension de la nature de ces phénomènes parasites est très difficile dans le cas de systèmes micrométriques sensibles aussi bien aux variations thermiques qu'aux variations de luminosité ou de pression. Toutefois, l'expérience nous a induit sur la piste d'un couplage électrique entre les signaux issus des piézorésistances. Des simulations ont alors été conduites afin d'essayer d'appréhender la nature de ce couplage.

On suppose un couplage électrique lié à la l'influence de la pastille piézoélectrique, pouvant être modélisé par une capacité et une résistance en parallèle entre chaque piste d'adressage des piézorésistances et la masse commune de la puce (reliée à la pastille piézoélectrique). La valeur des capacités et des résistances est modulée par un coefficient de couplage que nous faisons varier afin de percevoir les effets de ce couplage sur le signal. Les simulations conduites montrent que la modification du coefficient de couplage tend à générer différentes dynamiques d'inversions des pics de résonances. Ce dernier point tend à confirmer l'explication des phénomènes d'inversion de courbes de résonance par la présence d'un couplage électrique entre la pastille piézoélectrique de la membrane de mesure et celle de la membrane de référence et leurs piézorésistances. Les résultats de cette simulation des dynamiques de couplage sont exposés en annexe C.

Rappelons ensuite, que la mesure de la tension aux bornes des piézorésistances s'effectue de manière différentielle entre le signal aux bornes de la piézorésistance d'une membrane de mesure et le signal aux bornes de la piézorésistance de la membrane de référence. Ainsi, une courbe d'acquisition obtenue pour une membrane de mesure comportera aussi la signature de la résonance de la membrane de référence. Les dimensions de la membrane de référence ayant été choisies plus petites que toutes les membranes de mesures, les phénomènes de résonance n'interviennent pas pour la même fréquence d'actionnement et sont donc observables séparément. Cependant, les spectres relevés comportant de nombreux phénomènes de résonance, il convient, afin de distinguer à coup sûr les phénomènes de résonance mécanique de la membrane de mesure des phénomènes de résonance mécanique de la membrane de référence, de comparer le spectre obtenu pour cette membrane de mesure au spectre obtenu pour une deuxième membrane de mesure. En effet, la mesure différentielle s'effectue pour chaque membrane de mesure par rapport à la membrane de référence. Ainsi, les phénomènes de résonance se répétant sur l'un et l'autre des spectres de résonance (obtenus pour deux membranes de mesure distinctes) seront ceux de la membrane de référence. A l'inverse, les phénomènes de résonance n'apparaissant que sur le spectre d'une seule membrane de mesure seront liés à la vibration de cette dernière.

Afin de réaliser l'identification formelle des modes de résonance, l'expérience d'identification visuelle par interférométrie optique (décrite à la section III.1.1.) est répétée. Ainsi, nous constatons une bonne correspondance entre les fréquences de résonance des trois modes étudiés, qu'elles soient relevées par détection piézorésistive ou par observation optique. La table 3.2 rassemble ces résultats pour les trois modes de vibration étudiés et sur la même membrane que celle étudiée en section III.1.1., à savoir une membrane de rayon $465\text{ }\mu\text{m}$ ($440\text{ }\mu\text{m}$ de rayon prévu plus $25\text{ }\mu\text{m}$ de sur-gravure). Les écarts entre les deux valeurs expérimentales sont liés à la méthode utilisée pour déterminer l'occurrence des résonances lors de la première expérience d'identification. En effet cette méthode d'identification visuelle souffre d'une grande incertitude quant à la détermination de la fréquence de résonance (difficile à apprécier visuellement).

Fréquence de résonance			
<i>Membrane vibrant dans l'air (Rayon= $440\text{ }\mu\text{m}$ + $25\text{ }\mu\text{m}$ sur-gravure)</i>			
- Valeurs théoriques-		- Valeurs expérimentales -	
Mode	<i>Obtenues grâce aux simulations éléments finis</i>	<i>Mesurées par détection piézorésistive</i>	<i>Mesurées par interférométrie optique</i>
(0,0)	88,2 kHz	87,420 kHz	87,7 kHz
(0,1)	502,2 kHz	331,145 kHz	330,4 kHz
(0,2)	1597,2 kHz	711,554 kHz	713,0 kHz

Table 3.2 : Comparaison des fréquences de résonance théoriques et expérimentales, obtenues par détection piézorésistive et par interférométrie optique.

Il est possible d'observer simultanément les spectres de résonance obtenus consécutivement pour les quatre membranes de mesure des puces. Ainsi la figure 3.3 présente une synthèse de ces quatre spectres en fréquence. Le balayage en fréquence effectué pour obtenir ces quatre courbes est compris entre 40 kHz et 1,5 MHz. La valeur minimale du balayage est choisie en fonction de la bande passante de l'électronique. En effet, celle-ci induit une forte atténuation du signal en dessous de 50 kHz.

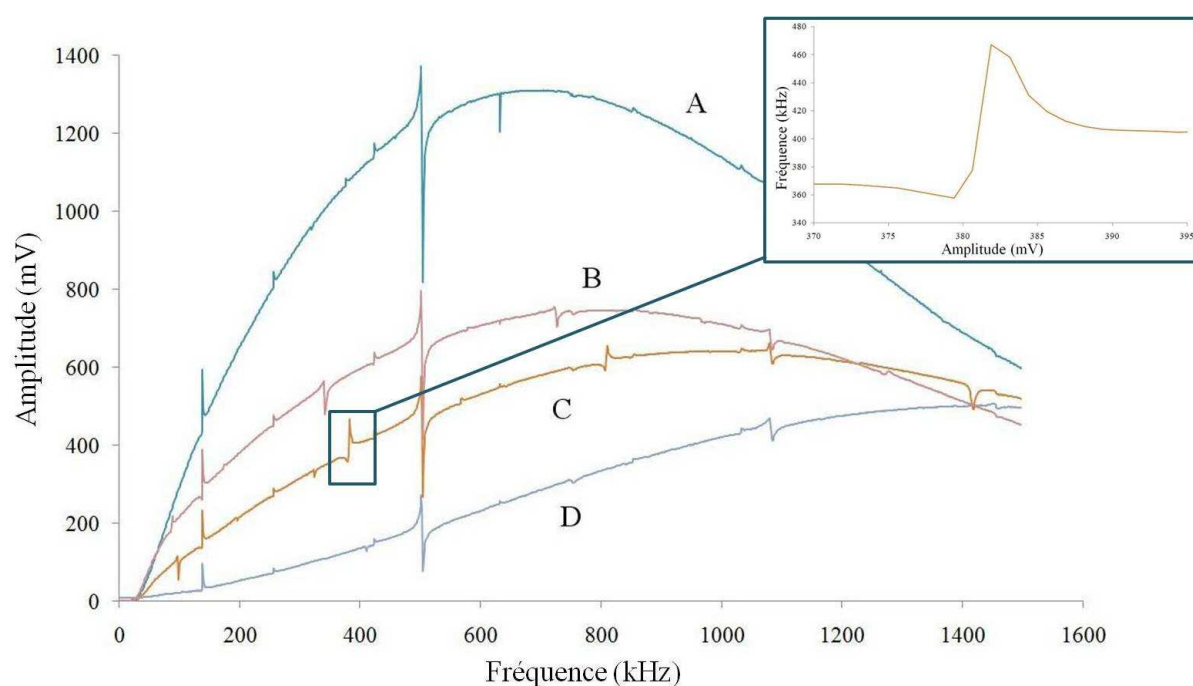


Figure 3.3 : Spectres en fréquence obtenus en réalisant un balayage en fréquence de 40 kHz à 1500 kHz pour les 4 membranes de mesure d'une puce. La courbe A est liée à la membrane de rayon 420 μm , la courbe B est liée à la membrane de rayon 440 μm , la courbe C est liée à la membrane de rayon 430 μm , enfin la courbe D est liée à la membrane de rayon 400 μm ,

Nous avons alors pu identifier les pics de résonance signatures de la vibration des membranes selon le mode fondamental (0,0), le mode (0,1) et le mode (0,2). Ces pics de résonance extraits des spectres des membranes sont présentés pour les 4 membranes de la puce pour le mode (0,0) à la figure 3.4 puis pour 3 membranes de la puce pour les modes (0,1), à la figure 3.5 et (0,2), à la figure 3.6.

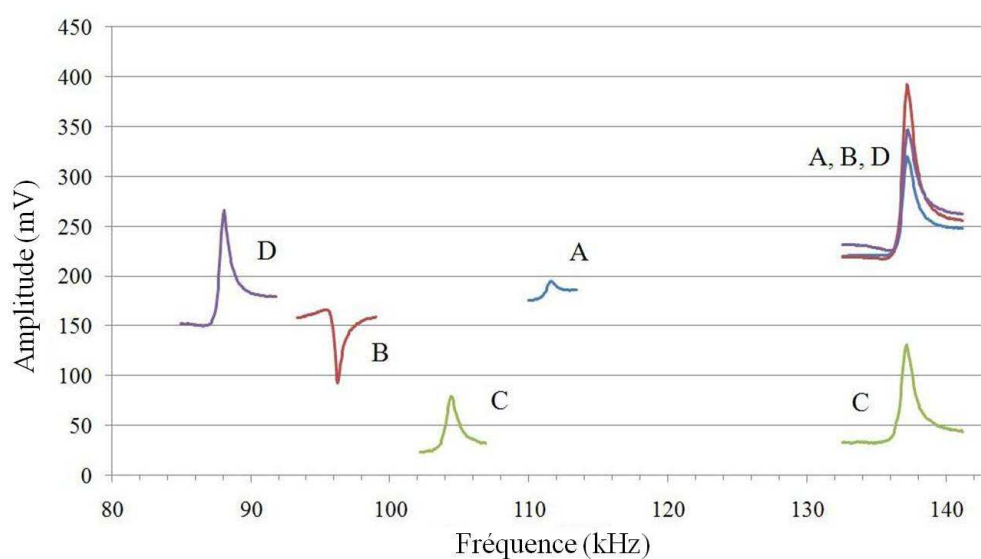


Figure 3.4 : Détail des spectres de résonances pour le mode de vibration fondamental de quatre membranes avec un rayon de 440 μm (courbe violette, D), avec un rayon de 430 μm (courbe rouge, B), avec un rayon de 420 μm (courbe verte, C) et avec un rayon de 400 μm (courbe bleue, A).

un rayon de 400 μm (courbe bleue, A). Le pic de résonance apparaissant sur les quatre spectres est caractéristique de la résonance de la membrane de référence vibrant également selon le mode de vibration fondamental (rayon de 360 μm , pic localisé à 137 kHz).

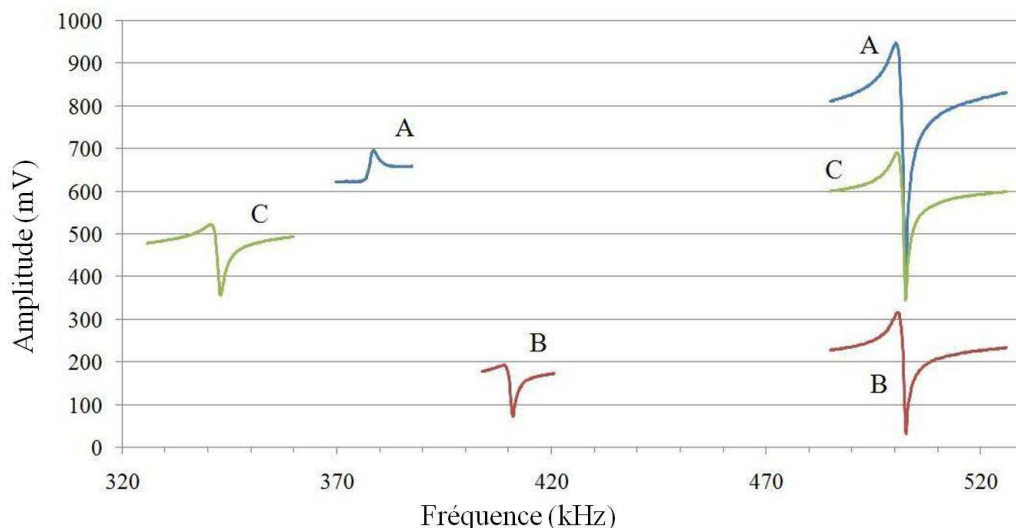


Figure 3.5 : Détail des spectres de résonances pour le mode de vibration (0,1) de trois membranes avec un rayon de 440 μm (courbe verte, C) avec un rayon de 430 μm (courbe bleue, A), avec un rayon de 420 μm (courbe rouge, B). Le pic de résonance apparaissant sur les trois spectres est caractéristique de la résonance de la membrane de référence vibrant également selon le mode de vibration (0,1) (rayon de 360 μm , pic localisé à 499 kHz).

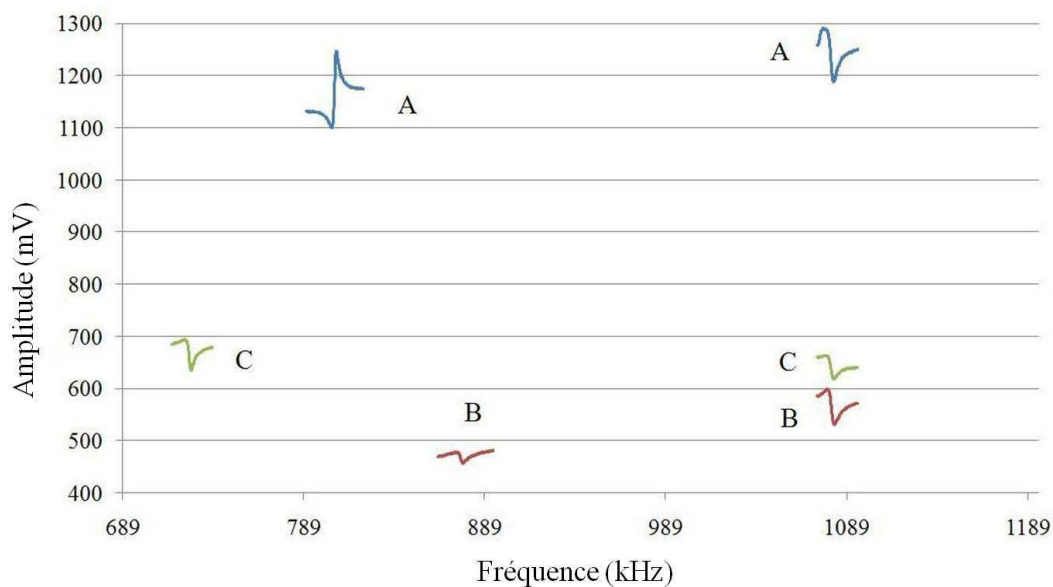


Figure 3.6 : Détail des spectres de résonances pour le mode de vibration (0,2) de trois membranes avec un rayon de 440 μm (courbe verte, C) avec un rayon de 430 μm (courbe bleue, A), avec un rayon de 420 μm (courbe rouge, B). Le pic de résonance apparaissant sur les trois spectres est caractéristique de la résonance de la membrane de référence vibrant également selon le mode de vibration (0,1) (rayon de 360 μm , pic localisé à 1077 kHz).

Ainsi, nous pouvons attester la faisabilité de la détection de la résonance de nos micromembranes oscillant dans l'air selon plusieurs modes de vibrations différents grâce au signal de la tension aux bornes des piézorésistances polarisées par un courant de 500 μ A. Le phénomène de résonance de nos micromembranes a été détecté par piézorésistivité et correctement identifié pour le mode de vibration fondamental mais également pour les modes de vibration supérieurs non-dégénérés, à savoir les modes de vibration notés (0,1) et (0,2). La co-intégration des moyens d'actionnements piézoélectriques intégrés et des moyens de détection piézorésistifs intégrés est ainsi démontrée pour des microstructures de type membrane oscillant dans l'air.

III. 1.3. Suivi multiplexé des fréquences de résonance dans l'air

Nous venons de rendre compte de la capacité de la plateforme à enregistrer un spectre de résonance via la détection piézorésistive intégrée aux membranes. Ceci a été réalisé grâce à l'électronique associée sans utiliser la boucle de rétroaction positive décrite au chapitre II. Lorsque le niveau d'amplitude maximal du pic de résonance d'une membrane (après optimisation des paramètres d'amplification) ainsi que le facteur de qualité de cette résonance sont suffisamment élevés, il est possible d'envisager le suivi en temps réel de la fréquence de résonance dans de bonnes conditions.

Dans cette partie, nous présentons la capacité de la plateforme à suivre de manière multiplexée et en temps réel la fréquence de résonance de plusieurs membranes. Il s'agit surtout de valider ici la capacité de suivi multiplexé de plusieurs membranes par l'électronique. En effet, le suivi de la fréquence de résonance dans l'air ne représente pas pour nos structures une avancée considérable. Il est pourtant nécessaire d'étudier ses performances afin de présager de notre capacité à réaliser ce suivi pour la vibration de la membrane dans le fluide, ce dernier étant indispensable au suivi en temps réel d'interactions biologiques de type antigène/anticorps.

Une fois que le mode de résonance dans l'air que l'on souhaite suivre dans le temps est sélectionné, l'utilisateur optimise la fenêtre de balayage en fréquence en réduisant et centrant celle-ci autour du pic que l'on souhaite étudier. Le principe utilisé par l'interface et l'électronique associée pour assurer le suivi précis de la fréquence de résonance est le suivant : la plate-forme effectue tout d'abord un balayage en fréquence dans les limites précisées par l'utilisateur. Ce premier balayage lui permet de relever un maximum d'amplitude. Ensuite, un balayage plus fin, resserré autour de la valeur de ce premier maximum, vers les fréquences supérieures puis vers les fréquences inférieures, permet d'affiner la mesure du maximum d'amplitude. La valeur de la fréquence correspondant à la nouvelle valeur plus précise du maximum d'amplitude, considérée comme étant la valeur de la fréquence de résonance selon ce mode, est stockée au sein de la mémoire du microcontrôleur (mémoire de type EEPROM). Le processus est ensuite répété un certain nombre de fois puis les différentes valeurs obtenues sont moyennées afin d'obtenir une seule valeur de la fréquence de résonance. Cette valeur peut être ensuite affichée sur un graphe représentant les variations de la fréquence de résonance au cours du temps.

L'ensemble des paramètres définissant la manière dont le microcontrôleur mesure et moyenne les fréquences de résonance des membranes peut être modifiées via l'interface informatique par l'utilisateur dans le but d'optimiser le suivi : le nombre de valeurs mesurées pour obtenir une seule

valeur moyenne, influe sur le niveau de bruit du signal et inversement sur la dynamique de la mesure (soit le temps entre deux points affichés sur le graphe).

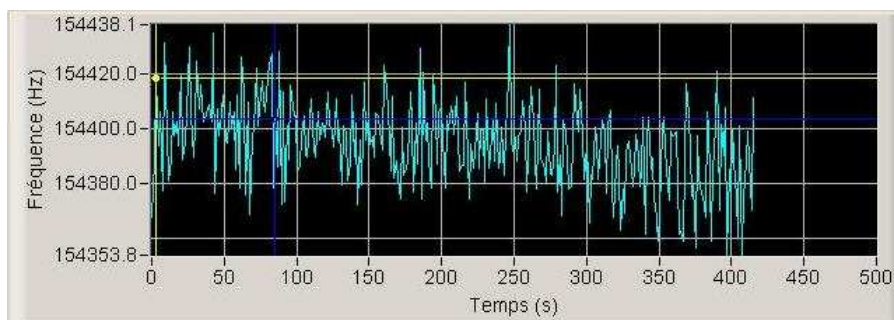


Figure 3.7 : Capture d'écran de l'interface informatique, présentant un graphe obtenu lors du suivi en temps réel de la fréquence de résonance d'une membrane vibrant dans l'air.

En ce qui concerne le suivi temps réel de la fréquence de résonance des membranes oscillant dans l'air, le fonctionnement de l'électronique en boucle ouverte évite toute divergence du signal qui entrainerait la saturation du système et consécutivement l'arrêt du suivi en temps réel. Le suivi peut être suffisamment stable sur de grandes périodes, ce qui nous a incités à étudier la stabilité du suivi à température constante. En effet, la fréquence de résonance des membranes est influencée par les variations des constantes d'élasticité (modules d'Young) des différents matériaux avec la variation de température. Cette influence a une conséquence sur l'interprétation des résultats obtenus lors du suivi de réaction biologique en temps réel. Afin d'estimer la stabilité intrinsèque du suivi de la fréquence de résonance, nous avons placé la plateforme au sein d'une enceinte thermique stabilisée à 38°C. Cette température a été retenue car elle excède la température du système en fonctionnement (35°C), cette température étant due à la chauffe des composants électroniques lors du fonctionnement de la tête de mesure. En se plaçant au dessus de cette température, on évite de percevoir l'influence de cette dissipation de chaleur interne (qu'il conviendra de garder en mémoire pour la suite des travaux). Enfin, cette température reste compatible avec les processus biologiques d'association/dissociation de couple antigène/anticorps.

La figure 3.8 présente les résultats obtenus. Nous pouvons y observer en premier lieu la stabilisation en température de la cellule fluidique et des divers composants qu'elle abrite. Elle atteste également du suivi multiplexé de la fréquence de résonance de deux membranes en simultanée. Le suivi multiplexé de plusieurs membranes est effectué comme suit : on procède à la mesure de la fréquence de résonance pour une membrane comme précisé plus haut dans cette section, puis la fréquence de résonance de la membrane suivante est mesurée et enfin, lorsque toutes les fréquences de résonances ont été mesurées, les points sont affichés simultanément sur le graphe. Ainsi, on déduit que le temps entre deux points du graphe pour le suivi multiplexé de la fréquence de résonance de deux, trois ou quatre membranes sera respectivement le double, le triple ou le quadruple du temps entre deux points du graphe lorsque la fréquence de résonance d'une seule membrane est suivie.

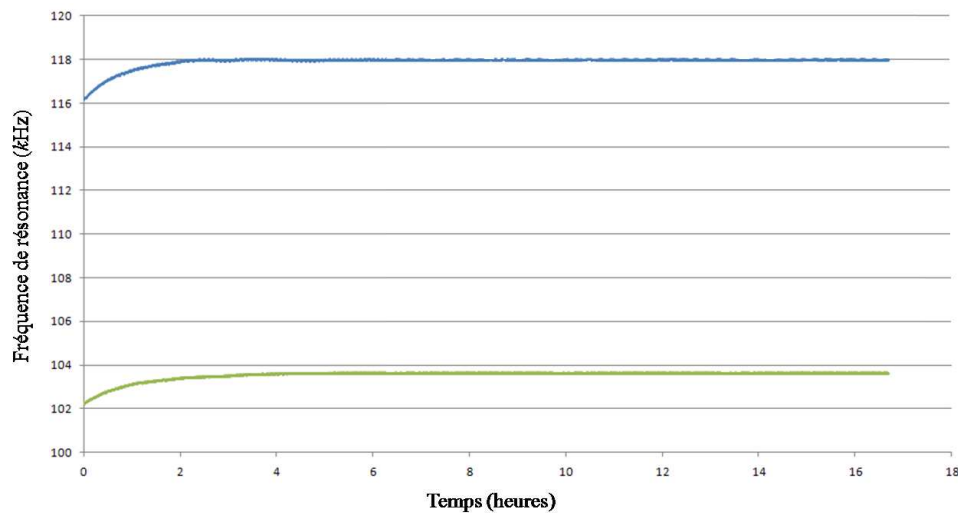


Figure 3.8 : Suivi multiplexé de la fréquence de résonance du mode de vibration fondamental de deux membranes de mesure (rayon 440 μm , courbe verte et rayon 420 μm , courbe bleue) placée dans une enceinte à température contrôlée ($T=38^{\circ}\text{C}$) sur une durée de 17 heures.

Après avoir validé la détection piézorésistive de la résonance des micromembranes fabriquées dans le cadre de cette étude, nous avons également identifié les modes de résonance détectés par cette méthode. Enfin, nous avons démontré la capacité de la plate-forme de pouvoir suivre de façon multiplexé et en temps réel la fréquence de résonance de plusieurs membranes de la même puce.

III. 2. Détection piézorésistive et suivi de la résonance du mode (0,1) dans le fluide

Afin d'achever la caractérisation électromécanique du BioMEMS résonnant étudié dans le cadre de ces travaux, il convient de valider la capacité de la plateforme de détecter la fréquence de résonance des micromembranes vibrant selon le mode fondamental, et selon l'un des deux modes supérieurs retenus, pour une opération de notre biocapteur en milieu liquide, qui est dans notre cas le cadre pratique de la reconnaissance biologique. Dans cette optique, de l'eau déionisée est injectée dans la cellule fluidique afin de remplir la chambre contenant les membranes.

III.2.1 Effet de la présence de fluide sur la résonance

Un balayage global des fréquences est tout d'abord effectué. Le spectre obtenu par cette opération ne correspond pas de prime abord à celui obtenu pour une vibration des membranes dans l'air. Les expériences de vibration de membranes en milieu liquide menées au sein du groupe Nanobiosystèmes nous enseignent que, dans le cadre d'une structure résonante linéaire (*i.e.* le cas de nos membranes hors flambement), les modes de vibration se succèdent pour une opération en milieu liquide dans le même ordre que pour une opération dans l'air. La modification principale réside dans le

fait que les fréquences de résonance de chaque mode sont diminuées d'un facteur 2 à 3 et que l'amplitude de maximale de vibration à la résonance est drastiquement réduite. Ainsi, plutôt que d'essayer d'identifier les modes de résonance dans le liquide sur un balayage global entre 0 Hz et 1,5 MHz, on procède à des analyses par tranche, jusqu'à 300 kHz afin de localiser les modes étudiés. L'électronique est d'abord utilisée sans boucle de rétroaction (configuration en boucle ouverte).

L'observation des spectres obtenus ne permet que de manière approximative de percevoir les occurrences des résonances des membranes vibrant dans le liquide selon le mode fondamental. En effet, comme présenté à la figure 3.9, on remarque que la résonance de la membrane de référence selon le mode fondamental intervient pour une fréquence d'actionnement de 41 kHz. Cette valeur de fréquence de résonance est située en dehors de la bande passante caractéristique de l'électronique de mesure. En conséquence, la sur-oscillation électrique de la tension aux bornes de la piézorésistance correspondant à la résonance de la membrane de référence selon le mode fondamental ne pourra donc pas être amplifiée correctement, elle subira même une atténuation conséquente. Sachant que les résonances selon le mode de vibration fondamental des membranes de mesure surviennent à des fréquences de résonance inférieures à celle de la membrane de référence, on comprend qu'elles seront encore plus atténuées et difficiles à amplifier. Ainsi, la figure 3.10 montre un exemple de ce qui peut être considéré comme l'occurrence de la résonance des membranes de mesures suivant le mode fondamental. Pour de telles valeurs de sur-oscillation à la résonance, il est inopportun d'envisager un suivi en temps réel de ces fréquences. Les considérations évoquées ici nous poussent à exclure le mode fondamental du cadre de la caractérisation de micromembranes en oscillation dans un milieu liquide.

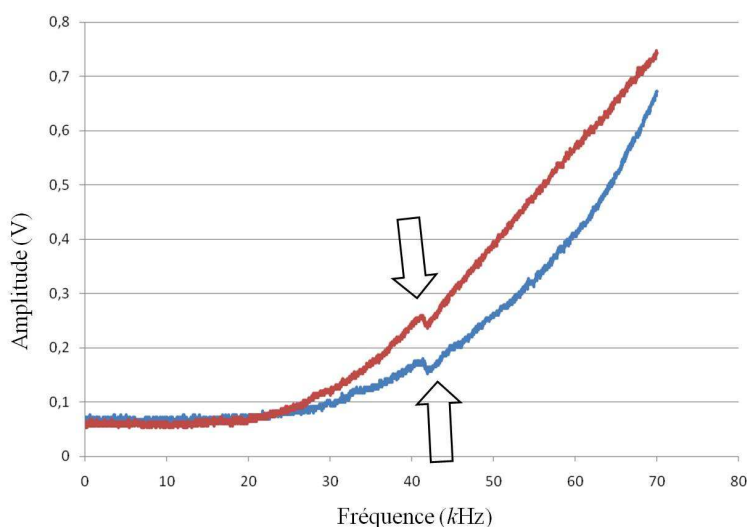


Figure 3.9 : Comparaison des spectres obtenus pour deux membranes de mesure vibrant dans le liquide, via un balayage en fréquence entre 0 Hz et 70 kHz, mettant en évidence l'occurrence de la résonance selon le mode fondamental pour la membrane de référence. Les membranes de mesure étudiées ici ont respectivement un rayon de 440 μm (courbe rouge) et de 420 μm (courbe bleue).

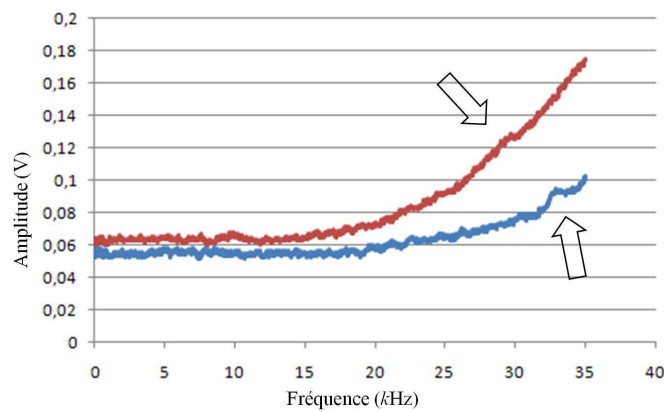


Figure 3.10 : Comparaison des spectres obtenus pour deux membranes de mesure vibrant dans le liquide, via un balayage en fréquence entre 0 Hz et 35 kHz, mettant en évidence ce qui s'apparente à l'occurrence de la résonance selon le mode fondamental pour ces membranes. Les membranes ont respectivement un rayon de 440 μm (courbe rouge) et de 420 μm (courbe bleue).

De part la plus grande amplitude de la sur-oscillation associée, la détection de la résonance dans le liquide des micromembranes oscillant selon les modes de vibration (0,1) a été réalisée avec des meilleures performances. La figure 3.11 montre un exemple de spectre de résonance de deux membranes vibrant dans le liquide, où l'on peut distinguer l'occurrence de la résonance selon le mode (0,1).

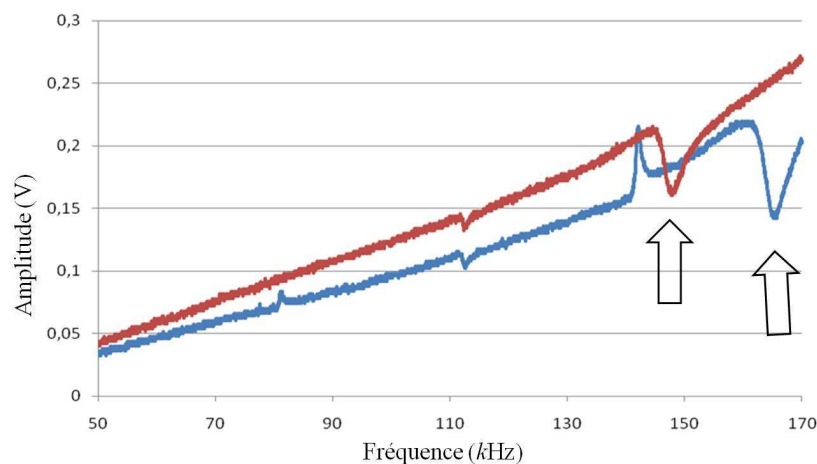


Figure 3.11 : Comparaison des spectres obtenus pour deux membranes de mesure vibrant dans le liquide, via un balayage en fréquence entre 50 kHz et 170 kHz, mettant en évidence l'occurrence de la résonance selon le mode (0,1) pour ces membranes. Les membranes ont respectivement un rayon de 440 μm (courbe rouge) et de 420 μm (courbe bleue).

Il convient de s'attarder sur les deux spectres exposés dans cette figure. Il est possible de remarquer tout d'abord que la forme des pics de résonance est inversée par rapport à ce que l'on attendrait. Cette inversion de la forme du pic pour une résonance dans le liquide selon le mode (0,1) est un problème fréquemment rencontré dans le cadre des micromembranes à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive étudiées ici. Cette inversion est problématique car elle empêche tout suivi de la fréquence de résonance en temps réel (celui-ci étant basé sur la recherche d'un maximum d'amplitude sur une fenêtre de fréquence donnée). Plusieurs expériences ont été

menées afin d'appréhender la nature de cette inversion et également de la contrecarrer. Étant donné que ce phénomène d'inversion intervient de manière différente pour chacune des membranes, nous ne pouvons pas tirer de conclusion générale sur la manière d'appréhender ce phénomène. Nous décrivons cependant les observations et les conclusions suivantes :

La forme du pic de résonance d'une membrane vibrant dans le liquide selon le mode (0,1) et détectée par piézorésistivité est influencée par le couplage mécanique avec le milieu environnant. En effet, la forme du pic de résonance s'est révélée influencée par la nature du matériau assurant la fermeture du sommet de la chambre fluidique. Dans de nombreux cas de membranes présentant des pics de résonance selon le mode (0,1) inversés lorsque la chambre fluidique était fermée par le capot en PMMA, il a été possible de réduire cette inversion en utilisant une lame de verre pour fermer la chambre fluidique. Les pics de résonance se sont même retrouvés avec une configuration correcte (i.e. correspondant à un maximum d'amplitude) lorsqu'une lame de verre borosilicate a été utilisée pour fermer la chambre fluidique (les différents matériaux ont été insérés dans la structure fluidique via l'encoche aménagée dans le capot de la chambre fluidique décrite au chapitre II section II.3).

La forme du pic de résonance d'une membrane vibrant dans le liquide selon le mode (0,1) et détectée par piézorésistivité, est influencée par le courant de polarisation de la piézorésistance assurant la détection du mouvement. Il est possible de générer une inversion du pic de résonance lorsque le courant passe en dessous d'une valeur seuil propre à chaque membrane.

Ainsi, nous recherchons pour chaque membrane utilisée, le point de fonctionnement idéal permettant d'obtenir la forme de pic offrant le plus grand maximum d'amplitude à la résonance. Lorsque ce point de fonctionnement existe, il est alors possible d'envisager le suivi de la fréquence de résonance en temps réel, ce que nous aborderons à la section III.2.3.

III.2.2. Amélioration du facteur de qualité grâce à la boucle de rétroaction

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre II, la limite de détection d'un capteur microgravimétrique résonant est liée au facteur de qualité de la sur-oscillation liée à la résonance. Le facteur de qualité influence directement le bruit du signal du suivi de la fréquence de résonance. En effet, le maximum d'amplitude à la résonance pour un facteur de qualité élevée sera plus facilement repérable que dans le cas d'une résonance à faible facteur de qualité. Partant de cette considération, il est facile de mener l'analogie entre le bruit du signal et le facteur de qualité de la membrane en termes de masse minimum détectable ou de limite de détection. Comme exposé au chapitre II, une manière d'estimer la masse minimum détectable de la micromembrane à un facteur près peut être obtenue via la relation de proportionnalité suivante, faisant intervenir le facteur de qualité de la résonance.

$$M_{\min_liq_mn} \propto \left| S_{liq_mn}^{-1} \right| \frac{f_{mn_liq}}{2Q_{mn_liq}} \quad (3.1)$$

En pratique, le calcul de la masse minimum détectable se fait à partir de la valeur du bruit du signal de suivi de la fréquence de résonance. En effet une variation de fréquence de résonance d'une amplitude inférieure à la valeur du bruit du signal de suivi ne sera pas détectée. Nous estimerons par la suite la limite de détection de nos membranes en fonction du bruit des signaux de suivi de la fréquence de résonance. Précisons dès maintenant cependant que la convention au sujet de la masse minimum détectable par un capteur microgravimétrique résonant précise que l'on considère détectable tout greffage de masse induisant un décalage de la fréquence de résonance supérieur à trois fois la valeur du bruit du signal de suivi de cette fréquence de résonance.

Comme cela a été exposé, le bruit du signal de suivi de la fréquence de résonance est lié au facteur de qualité associée. Or, il convient de préciser que ce dernier se trouve fortement affecté par la présence de fluide, ce qui tend à limiter la masse minimum détectable des capteurs micro gravimétriques résonants. C'est donc dans l'optique d'améliorer la limite de détection de nos capteurs et de bénéficier de conditions favorables au suivi de la fréquence de résonance en temps réel, que nous avons choisi d'implémenter un dispositif de rétroaction positive au sein de l'électronique de détection permettant l'augmentation du facteur de qualité.

Le principe de la boucle de rétroaction positive est décrit dans la section II.3 du chapitre II. Il s'agit de moduler le signal d'actionnement pour qu'il soit maximum au moment de la résonance et qu'il reste constant hors résonance. Ceci permet l'amplification précise de son pic de résonance tout en laissant relativement invariant le niveau du signal de sortie hors résonance. Pour ce faire, l'enveloppe du signal de sortie représentant l'amplitude de vibration de la membrane au carré est utilisée pour moduler le signal d'actionnement. Ceci est assuré par le générateur de signaux utilisé pour la délivrance de la tension d'actionnement et permettant le pilotage analogique de son amplitude (ici, par l'enveloppe du signal de sortie) et le pilotage numérique de sa fréquence (via le microcontrôleur).

Nous rappelons ici, que l'utilisation de la boucle de rétroaction nécessite le réglage coordonné de deux facteurs d'amplification introduits au chapitre II (section II.3), à savoir le gain d'amplification de la boucle ouverte appelée **gain direct** et le gain d'amplification de la boucle de rétroaction appelé **gain de rétroaction**. Le réglage du gain d'amplification direct de la boucle ouverte augmente à la fois le niveau du maximum d'amplitude à la résonance et le niveau de base du signal de sortie, sa variation n'a donc globalement que peu d'effet sur le facteur de qualité. A l'inverse, le réglage du gain de rétroaction permet des gains significatifs quant au facteur de qualité de la résonance. Les courbes suivantes montrent (pour deux membranes d'une même puce) le spectre en fréquence du mode (0,1) de résonance dans le liquide dans trois configurations d'amplification : sans boucle de rétroaction active avec un gain direct faible puis fort et enfin, lorsque la boucle de rétroaction est active.

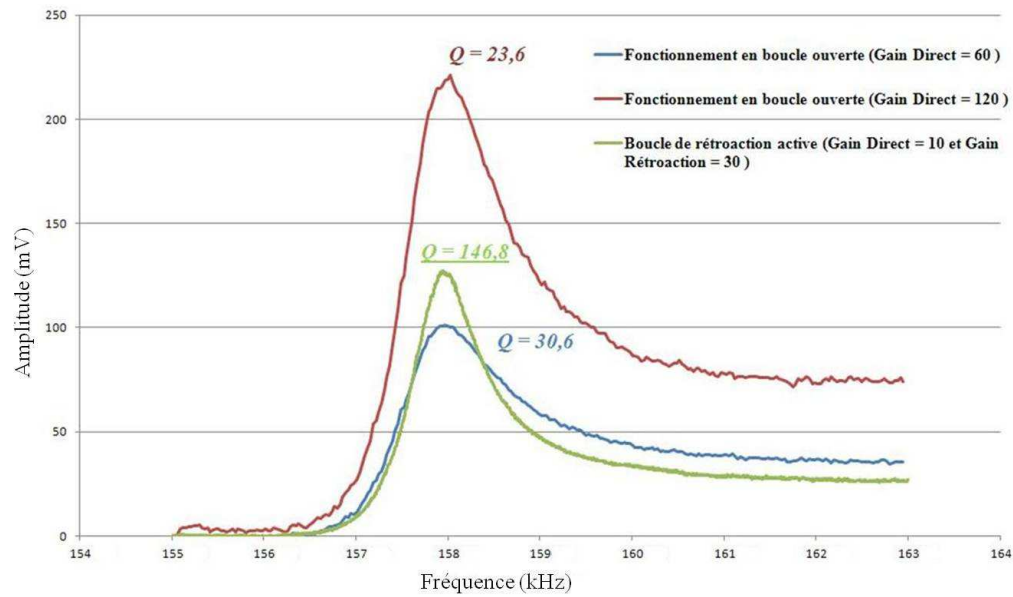


Figure 3.12 : Courbe des variations d'amplitude du signal issu de la piézorésistance après amplification selon diverses configurations, pour une membrane de 440 μm de rayon.

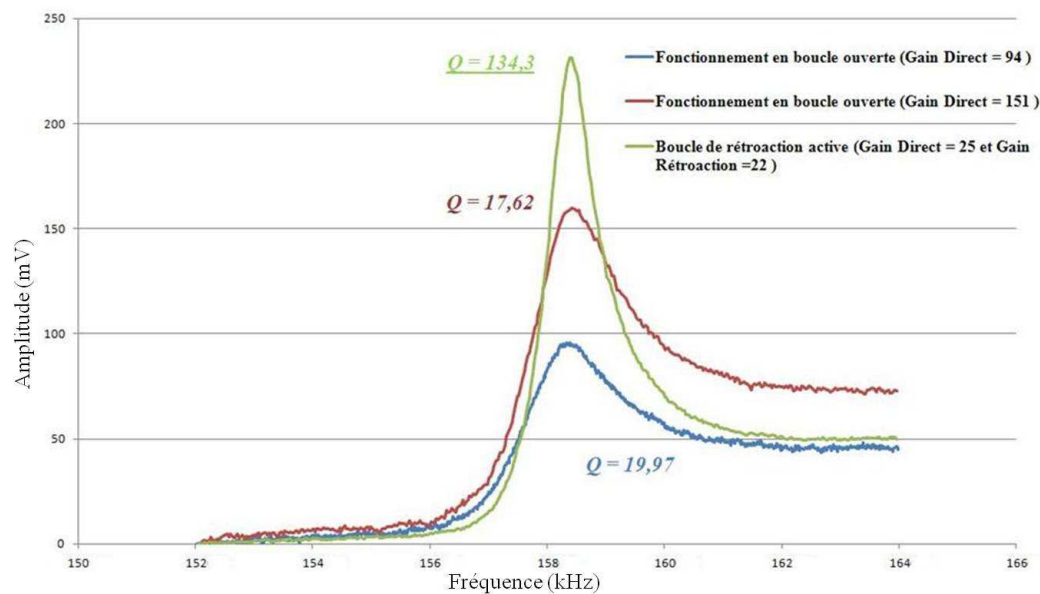


Figure 3.13 : Courbe des variations d'amplitude du signal issu de la piézorésistance après amplification selon diverses configurations, pour une membrane de 430 μm de rayon.

Les gains maximaux relevés en termes de facteur de qualité sur les membranes étudiées sont d'un facteur 11 par rapport au facteur de qualité en boucle ouverte. Ceci implique des facteurs de qualité allant jusqu'à 450-500 pour des membranes micrométriques vibrant dans le fluide ce qui est inégalé dans l'état de l'art pour des structures de forme et de taille comparables [2]. La figure 3.14 montre l'exemple d'une telle augmentation de facteur de qualité.

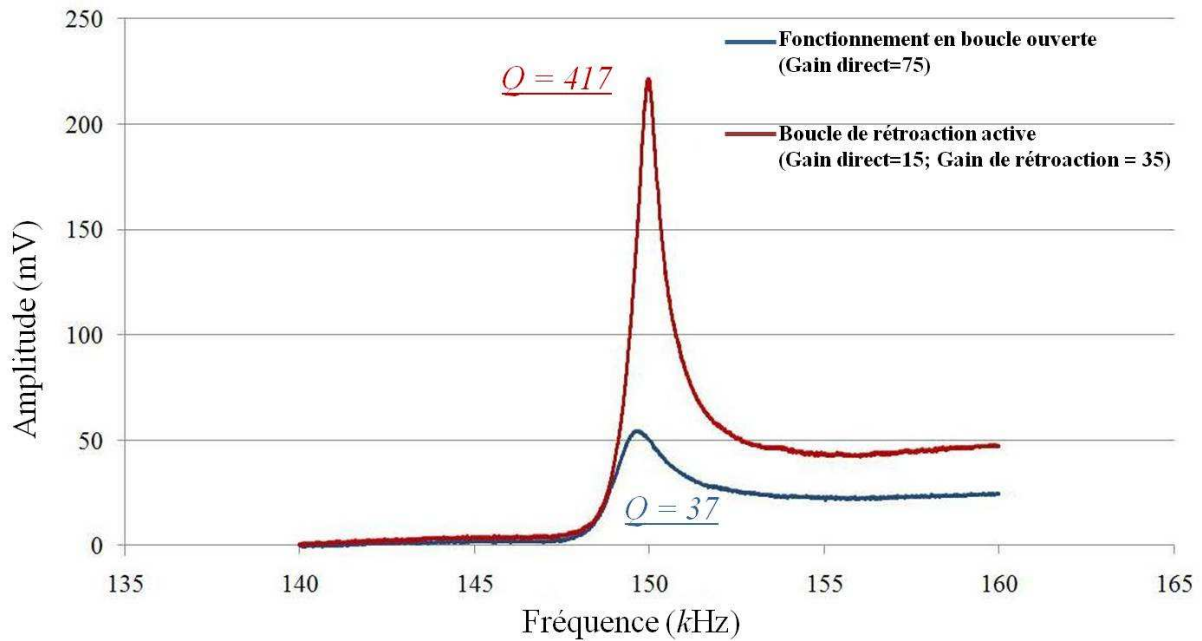


Figure 3.14 : Comparaison des courbes de résonances pour une membrane de rayon 420 μm vibrant dans le liquide selon le mode de vibration (0,1) selon que l'électronique associé fonctionne en boucle ouverte (courbe bleue) ou que la boucle de rétroaction soit activée (courbe rouge).

Il convient cependant de préciser que l'usage de la boucle de rétroaction induit une plus grande instabilité du système et un risque réel de divergence du signal jusqu'à atteindre la saturation de l'électronique associée. Ceci ne peut avoir lieu lors de l'usage de l'amplification directe sans passer par cette boucle. Une divergence du signal (impliquant une saturation du système) intervenant pendant la cinétique d'une réaction biologique induirait la perte totale de l'information temps-réel étant donné que l'interface électronique ne parviendrait plus à détecter le signal de la résonance des membranes. Afin de se prémunir contre ce risque, il convient, lors de l'usage de la boucle de rétroaction, de chercher la limite de divergence du système et de choisir de travailler à une marge de sécurité en deçà de cette limite. Le meilleur réglage des gains pour une utilisation de l'électronique avec boucle de rétroaction active constituera donc un optimum entre amélioration du facteur de qualité et stabilité du système.

III.2.3. Suivi multiplexé, de la fréquence de résonance des membranes oscillant dans le fluide en temps réel.

Lorsque l'optimum est trouvé entre stabilité du signal de résonance et amélioration du facteur de qualité, nous procédons au suivi en temps réel de la fréquence de résonance des membranes, indispensable à l'étude d'interactions biologiques.

Plus particulièrement, dans le cas de détection d'agents pathogènes liés à une menace biologique, il convient de faire en permanence la distinction entre un signal lié au greffage spécifique des antigènes cibles sur la surface du capteur et un signal lié à tout autre événement biologique parasite (greffage non spécifique) afin de prévenir l'occurrence de faux-positifs. Une stratégie possible pour diminuer l'occurrence de faux positifs peut être la réalisation de deux tests en simultané sur deux

membranes différentes, l'une fonctionnalisée avec le biorécepteur spécifique de l'antigène à détecter et la seconde servant de témoin biologique. Dans cette optique, la validation du suivi multiplexé de la fréquence de résonance de plusieurs membranes revêt un aspect important.

La procédure permettant à la plate-forme de suivre la fréquence de résonance des membranes dans le fluide est strictement la même que pour le suivi de la fréquence de résonance dans l'air. Il est cependant plus difficile à configurer. En effet, afin de compenser la diminution de l'amplitude des oscillations dans le liquide, le gain d'amplification direct est souvent augmentée par rapport au cas de l'air, ceci ayant pour effet d'amplifier les variations parasites de la ligne de base du spectre hors résonance (ligne de base dont l'aspect est visible sur la figure 3.3). Cette amplification entraîne un risque de saturation du système pour le balayage de larges plages de fréquences. La fenêtre de balayage étant réglée une fois pour les quatre membranes de mesure, ce point peut rendre impossible le suivi temps réel de plusieurs fréquences de résonance en simultané. En effet, si la fenêtre impose que la ligne de base dépasse au cours du balayage le niveau du maximum d'amplitude à la résonance d'une des membranes, celle-ci ne pourra être suivie.

Cependant, pour des membranes dont la ligne de base du spectre présente une dynamique modérée, il est possible de réaliser un suivi de la fréquence de résonance en temps réel, multiplexé sur plusieurs membranes.

La figure suivante expose le résultat d'un suivi multiplexé de la fréquence de résonance, sans optimisation particulière de la boucle de rétroaction (gain de rétroaction de 3), pour trois membranes oscillant selon le mode avec une emphase particulière sur le bruit du signal sur une courte période. Pour cette expérience, la chambre fluide est remplie d'eau déionisée grâce à une seringue connecté au canal d'amené du fluide de la cellule fluide. A deux reprises on exerce sur la seringue une pression manuelle.

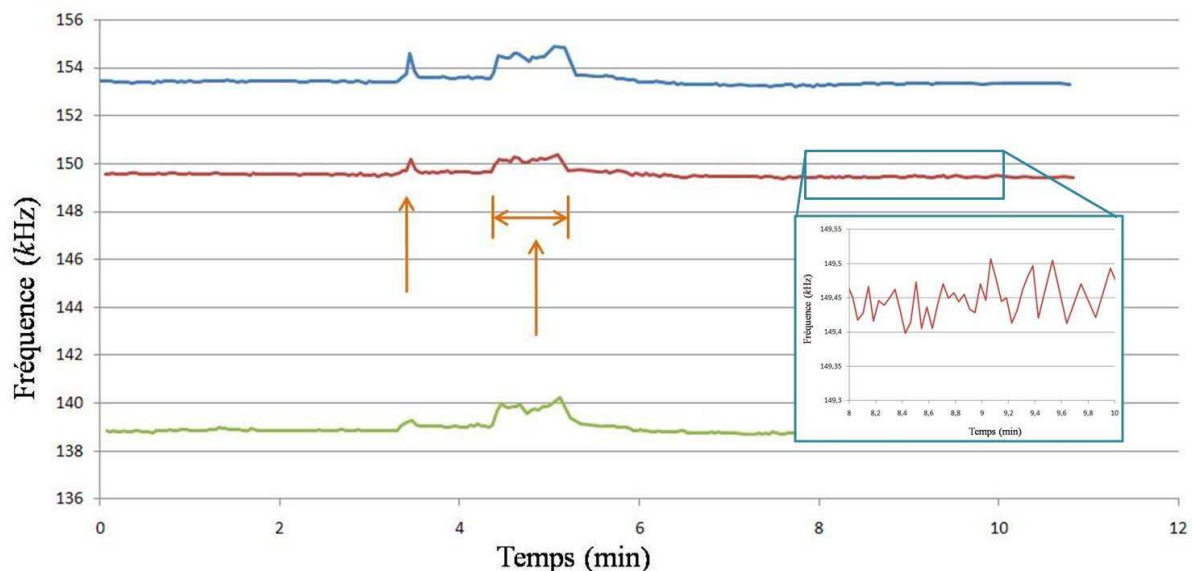


Figure 3.15 : Stabilité dans le temps du suivi de la fréquence de résonance de trois micromembranes résonant selon le mode (0,1) (micromembrane respectivement de rayon 420 μm , courbe bleue ; de rayon 430 μm , courbe rouge ; de rayon 440 μm , courbe verte).

Les flèches présentées à la figure 3.15, représentent les moments où une pression manuelle a été exercée sur la seringue. Ces courbes permettent donc également de montrer la dépendance de la fréquence de résonance des micromembranes de la puce par rapport à la pression dans la chambre fluide. Afin de se départir de ses effets parasites, il conviendra de réaliser l'injection des fluides lors des réactions biologiques à l'aide d'un pousse seringue ne générant qu'un débit limité, ou bien encore de réaliser l'injection des fluides et le suivi des fréquences de résonance de manière séquentielle.

Comme cela a été précisé plus avant, le bruit du signal de suivi de la fréquence de résonance d'une micromembrane est directement lié au facteur de qualité de celle-ci. L'intérêt de l'augmentation dynamique du facteur de qualité est alors crucial en vue de réduire le bruit du signal de mesure et donc de viser à la détection de faibles masses biologiques se greffant à la surface de la membrane. Lorsque les paramètres de la boucle de rétroaction sont réglés de manière optimale, il est possible de suivre la fréquence de résonance des membranes avec des valeurs de bruit faibles, en comparaison du fonctionnement en boucle ouverte. La figure 3.16 montre le suivi de la fréquence de résonance d'une membrane de $420\text{ }\mu\text{m}$ de rayon. Le facteur de qualité de cette membrane a été augmentée dynamiquement jusqu'à la valeur de 185. L'amplitude maximale décrite par la fréquence de résonance autour de sa valeur moyenne est de 55 Hz . Le bruit de la mesure est donc de 350 ppm . En comparaison, l'équipe de H.G. Craighead à l'université Cornell opérant la vibration dans l'air et selon un mode fondamental de ponts encastrés par les deux extrémités obtient des écarts de la fréquence de résonance par rapport à sa valeur moyenne de l'ordre du kiloHertz pour une fréquence de résonance de $1,25\text{ MHz}$, ce qui aboutit à un bruit de mesure 10 fois supérieur au notre [3].

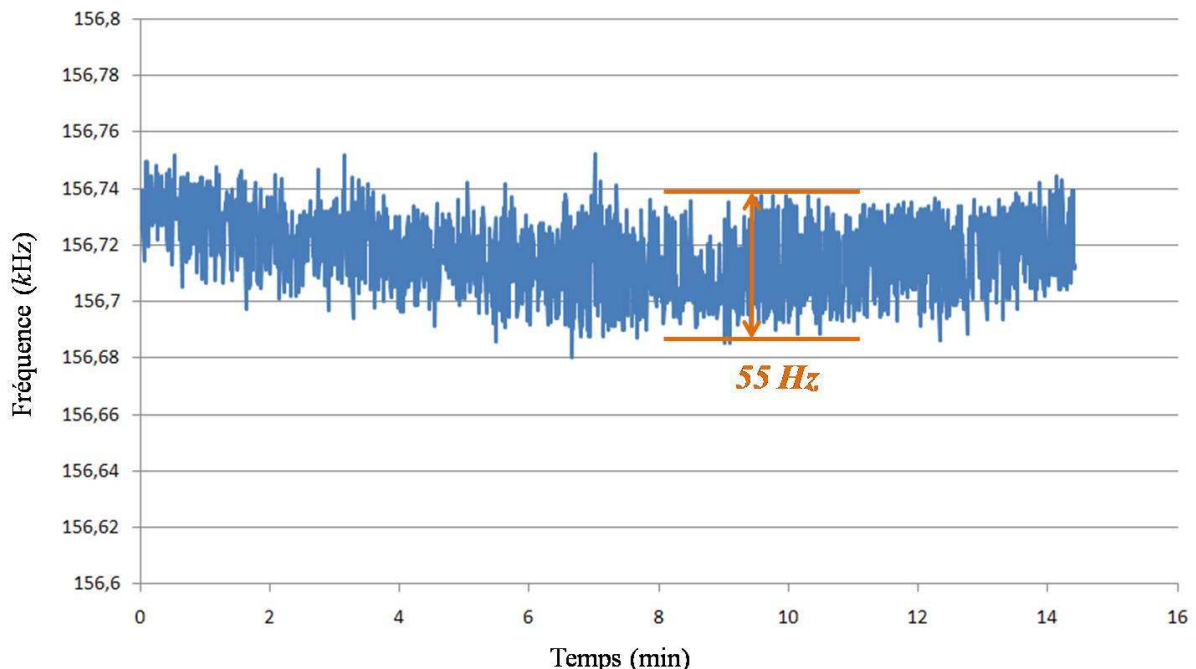


Figure 3.16 : Courbe représentative du suivi de la fréquence de résonance d'une membrane de rayon $420\text{ }\mu\text{m}$ vibrant dans le liquide suivant le mode (0,1).

III.2.4. Retour sur le modèle théorique : validation du modèle Lamb étendu au mode (0,1)

La caractérisation de nos membranes vibrant selon le mode (0,1) dans le liquide nous permet de valider le modèle de Lamb [4] étendu aux modes supérieurs. Cette validation a été accomplie pour le mode fondamental par Ayela et Nicu [5]. Comme nous l'avons explicité au chapitre II (section II.1.6), ce modèle a été étendu à la vibration de membranes selon des modes de vibration supérieurs grâce aux travaux d'Amabili et Kwak [6]. Selon l'extension de ce modèle, il est possible de prévoir les fréquences de résonance dans le liquide à partir de la connaissance des fréquences de résonance selon le mode (0,1) dans l'air et de la connaissance du facteur AVMI (pour *Added Virtual Mass Incremental factor*) pour le mode (0,1). Ce facteur est donné dans la littérature [6].

Afin de vérifier les prédictions de ce modèle, nous procédons à la mesure des fréquences de résonance de micromembranes vibrant dans l'eau selon le mode (0,1). La comparaison des résultats pour les différentes membranes est présentée à la table 3.3.

Rayon	$f_{air_{(0,1)}}$	$f_{liq_{(0,1)}}$	$f_{liq_{théorique_{(0,1)}}$	$\frac{f_{liq_{théorique_{(0,1)}}}{f_{liq_{exp_{(0,1)}}$
360 μm	524,50 kHz ($\pm 2,80$ kHz)	213,30 kHz ($\pm 1,4$ kHz)	194 kHz ($\pm 1,07$ kHz)	9,67%
400 μm	417,00 kHz (± 7 kHz)	168,43 kHz ($\pm 4,51$ kHz)	148,40 kHz ($\pm 1,47$ kHz)	13,33 %
420 μm	392,73 kHz ($\pm 6,56$ kHz)	156,41 kHz ($\pm 3,1$ kHz)	135,83 kHz ($\pm 2,29$ kHz)	14,57%
430 μm	377,23 kHz ($\pm 3,78$ kHz)	150,5 kHz ($\pm 2,87$ kHz)	129,17 kHz ($\pm 1,29$ kHz)	16%
440 μm	363,8 kHz ($\pm 1,87$ kHz)	143,2 kHz ($\pm 1,99$ kHz)	123,28 kHz ($\pm 0,62$ kHz)	15,67%

Table 3.3 : Comparaison des fréquences de résonance expérimentales et théoriques (prédites selon le modèle de Lamb étendu) des micromembranes vibrant dans le fluide selon le model (0,1)

Nous constatons que l'écart entre les fréquences de résonance selon le mode (0,1) dans le liquide mesurées expérimentalement et estimées grâce au modèle de Lamb étendu aux modes supérieurs varie entre 9% et 16%. Cet écart ne doit pas être imputé à l'inexactitude de l'extension du modèle de Lamb aux modes supérieurs : bien au contraire, Amabili et Kwak ont montré que le modèle étendu devait théoriquement être de plus en plus précis plus l'ordre du mode étudié augmente [6]. Des mesures sur la fréquence de résonance des micromembranes étudiées ici vibrant selon le mode (0,2) dans le liquide ont confirmé ce point puisque l'écart entre théorie et expérience était alors plus faible que pour le mode (0,1). L'explication la plus juste repose sur la différence entre le modèle de membrane circulaire considéré dans le modèle de Lamb et la structure réelle de nos micromembranes. En effet, la présence d'une pastille piézoélectrique n'occupant qu'une partie de la surface de la membrane en contact avec le fluide ôte une part de cohérence à la modélisation par une membrane uniforme. Les travaux d'Ayela et Nicu [5] sur la validation du modèle de Lamb pour des micromembranes à actionnement piézoélectrique vibrant selon le mode fondamental ont d'ailleurs montré une plus grande exactitude du modèle par rapport à l'expérience pour les micromembranes dont la pastille piézoélectrique possédait un rayon égal à 70% du rayon total de la membrane (50% du rayon total de la membrane dans notre cas).

Afin de préciser la validation de ce modèle et par là même attester la capacité des micromembranes à détecter un changement de masse, nous avons procédé à des expériences de vibration des membranes au sein de mélanges eau/éthanol en différentes proportions. Le mélange eau éthanol possède la caractéristique d'offrir des masses volumiques de plus en plus faibles à mesure que la quantité d'eau diminue dans le mélange, tout en ayant des viscosités assez proches d'un point de vue des effets sur la vibration de la membrane. En effet, la viscosité du mélange éthanol/eau décrit avec la proportion en éthanol une courbe en cloche dont le minimum est 1 cP (eau déionisée pure) et le maximum 2,5 cP. Ce faible écart de viscosité entre les différentes proportions eau/éthanol permet de négliger les effets liés au changement de viscosité à la surface de la membrane pour s'intéresser uniquement aux variations de masse volumique, donc de masse perçue par la membrane. Afin de réaliser ce protocole, la cellule fluidique a été remplie consécutivement des différents mélanges eau/éthanol et les mesures de fréquence de résonance ont été effectuées. En exemple, la figure 3.17, présente les résultats des mesures pour une membrane de 440 μm vibrant selon le mode (0,1) ainsi que la comparaison avec les prévisions théoriques pour cette même membrane selon le modèle de Lamb étendu au mode (0,1).

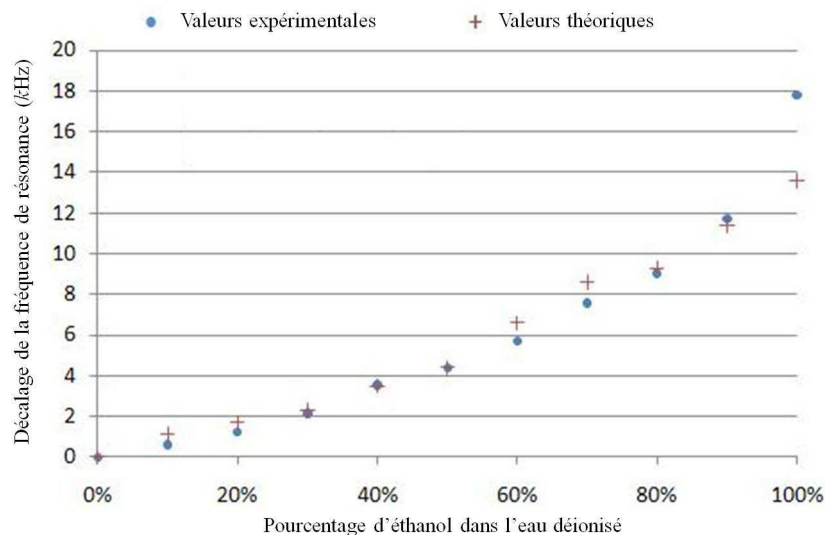


Figure 3.17 : Décalages de la fréquence de résonance, calculés (selon le modèle de Lamb étendu) et mesurées expérimentalement en fonction du pourcentage d'éthanol dans l'eau déionisée pour une membrane de rayon 440 μm vibrant selon le mode (0,1).

Le faible écart entre les résultats théoriques et expérimentaux montre que le modèle de Lamb étendu constitue un bon moyen d'appréhender la vibration des micromembranes en la présence d'un fluide newtonien de faible viscosité (cadre pratique de nombreuses applications de reconnaissance biologique) selon les modes de vibrations supérieurs. De plus, l'expérience menée atteste la capacité de la membrane vibrant selon le mode (0,1) à détecter un changement de masse. Nous avons vu que cette capacité peut être évaluée par le calcul de la sensibilité massique de la membrane. Or, le modèle de Lamb étendu nous permet de calculer cette valeur dans le liquide, toujours à partir de sa valeur dans l'air. Rappelons la formule permettant cette estimation (*cf chapitre II section II.1.6*) :

$$S_{liq_mn} = S_{air_mn} \frac{1}{\sqrt{1+\beta}}$$

Nous connaissons la sensibilité massique dans l'air pour en avoir calculé la formule en fonction de la masse modale de la membrane vibrant dans l'air et de sa fréquence de résonance. Ainsi, connaissant les valeurs expérimentales des fréquences de résonance dans l'air, nous pouvons estimer la sensibilité massique de nos membranes vibrant dans un liquide. L'estimation prévoit une **sensibilité massique** de **0,2 pg/Hz**. Nous pouvons alors estimer la valeur de la limite de détection de nos micromembranes. Pour cela et comme précisé à la section III.2.2, nous nous basons sur la mesure du bruit du signal de suivi de la fréquence de résonance (dépendant du facteur de qualité de la micromembrane). La convention impose qu'un décalage de la fréquence de résonance est détectable si sa valeur excède trois fois la valeur du bruit du signal de suivi. Cette condition se résume par :

$$\Delta f_{\text{détectable}} > 3\Delta f_{\text{bruit}}$$

Or $\Delta f_{\text{détectable}}$ est lié à la masse greffé à la surface de la micromembrane via la sensibilité massique que nous venons d'estimer. Ainsi nous pouvons écrire la relation suivante pour l'estimation de la limite de détection de nos micromembranes :

$$M_{\text{min_liq_mn}} = 3\Delta f_{\text{bruit}} S_{\text{liq_mn}}$$

Afin de calculer cette limite de détection dans un cas précis, nous considérons le cas du suivi de la fréquence de résonance exposé à la figure 3.16, pour lequel le bruit du signal de suivi de la fréquence de résonance est de 55 Hz. L'estimation de la masse minimum détectable donne alors une valeur de **masse minimum détectable** de **33 pg**.

Les valeurs de masse minimum détectable et de sensibilité estimées ici sont globalement meilleures d'un ordre de grandeur en comparaison de celles rencontrées dans la littérature pour des systèmes de reconnaissance biologique basés sur des capteurs microgravimétriques. A titre d'exemple, Braun *et al* [7], de l'université de Bâle, démontrent en 2005 la vibration de leviers dans le fluide selon le 13^{ème} mode de vibration avec un actionnement piézoélectrique et une détection optique pour la détection de billes de latex. Leurs travaux décrivent une sensibilité massique de 2,5 pg/Hz et une masse minimum détectable de 7 ng. Nuançons toutefois cette comparaison en rappelant qu'il s'agit d'une estimation comparée à une masse minimum détectable éprouvée par l'expérience. Il convient, afin d'approfondir notre étude, de valider ces performances estimées lors de la conduite d'expériences de détection biologique.

III.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons achevé la caractérisation complète du microsystème à la base de la plate-forme de détection biologique étudiée dans le cadre de ce manuscrit. Cette caractérisation mécanique a permis la validation du principe de détection piézorésistive du mouvement vibratoire des micromembranes à la fois dans l'air et dans le liquide. Ce dernier point constitue une avancée essentielle, une telle co-intégration n'ayant pas, à ce jour et à la connaissance de l'auteur, été rapportée pour des applications de détection biologique. La détection et l'identification de modes de résonances supérieurs au fondamental a été validée dans l'air. Parmi les modes de résonance sélectionnés lors de l'analyse modale menée au chapitre II, le mode de résonance (0,1) a pu être détecté dans le fluide et le suivi en temps réel de la fréquence de résonance associée a été attesté. L'amélioration du facteur de

qualité de la résonance de membrane vibrant dans le fluide à été réalisée et des taux d'améliorations allant jusqu'à 11 fois la valeur du facteur de qualité en boucle ouverte ont été reportés. Enfin, les données expérimentales relevées pour le mode de vibration (0,1) dans le liquide ont permis de valider un modèle permettant d'appréhender les modifications du comportement dynamique des membranes vibrant dans un fluide newtonien de faible viscosité. Sans toutefois constituer une réelle calibration en masse de nos capteurs, ce modèle a permis d'estimer la sensibilité massique des micromembranes ainsi que la masse minimum détectable.

Références :

- [1] S. Petitgrand, R. Yahiaoui, K. Danaie, A. Bosseboeuf et J.P. Gilles, *Optics and Lasers in Engineering*, vol. 36 (**2001**), 77-101.
- [2] C. Ayela, “Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel”, thèse, spécialité Conception des Circuits Microélectroniques et Microsystèmes, Université de Toulouse, 2007
- [3] D.R. Southworth, L.M. Bellan, Y. Linzon, H.G. Craighead et J.M. Parpia, *Applied Physics Letters*, vol. 96 (**2010**), 163503.
- [4] H. Lamb, “On the vibrations of an elastic plate in contact with water,” *Proceedings of the royal society of London*, vol. 98 (**1920**), 205-216.
- [5] C. Ayela et L. Nicu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 123 (**2007**), 860–868.
- [6] M. Amabili et M.K. Kwak, *Journal of Fluids and Structures*, vol. 10 (**1996**), 743-761.
- [7] T. Braun, V. Barwich, M. Ghatkesar, A. Bredekamp, C. Gerber, M. Hegner et H. Lang, *Physical Review E*, vol. 72 (**2005**).

CHAPITRE IV :

Détection d'agents pathogènes simulant la menace biologique par une matrice de micromembranes

IV.1. Objectifs

Comme nous l'avons vu au chapitre I, un biocapteur complet se définit par l'association d'un transducteur et d'une couche biologique sensible. Lors du dernier chapitre, nous avons achevé la caractérisation électromécanique complète du transducteur constitué par notre microsystème. Au cours de ce chapitre, nous aborderons tout d'abord les travaux réalisés afin d'optimiser la couche biologique sensible. Ensuite, nous détaillerons les expériences conduites en vue de réaliser la détection d'agents pathogènes simulant la menace grâce au prototype de plate-forme de détection biologique dont la conception, fabrication et caractérisation sont au cœur de cette thèse.

Les agents biologiques pathogènes simulant la menace utilisés dans le cadre de ce manuscrit ont été choisis pour deux raisons : d'une part pour leur innocuité envers l'homme et d'autre part pour le mimétisme de leur comportement biologique avec le comportement biologique d'espèces pathogènes de catégorie A et B. Ces agents biologiques simulant la menace ainsi que les anticorps spécifiques de ces espèces ont été fournis par le service lié au risque biologique du Centre d'Etudes du Bouchet de la Délégation Générale de l'Armement (Vert-le-Petit, Essonne). La préparation des échantillons a été confiée à Pascal Rameil (CEB, DGA).

Nous détaillons ici la liste des quatre agents pathogènes simulant la menace utilisés dans le cadre de ces travaux de thèse, chaque agent simulant peut être rapproché de par son comportement biologique d'un certain type d'espèces présentes dans la catégorie A ou B comme suit :

- L'espèce *Bacillus atrophaeus* est une bactérie de type Gram+ utilisé pour simuler le comportement biologique du *Bacillus anthracis* (arme biologique de catégorie A) causant la maladie du charbon. Ce type de bactérie possède la caractéristique de former une enveloppe protectrice appelée endospore lui permettant de résister à des conditions extrêmes tout en gardant sa capacité de proliférer lors d'un retour à des conditions favorables.
- L'ovalbumine est une protéine constituant plus de la moitié de la population protéique du blanc d'œuf. Elle est utilisée dans le cadre de ces travaux pour simuler la détection de toxalbumines (comme la ricine)
- La souche MRE162 d'*Escherichia coli* est une bactérie de type Gram+ utilisée ici pour simuler la détection de la souche O157 :H7 d'*Escherichia coli* qui représente entre autres un contaminant très toxique des sources d'eau potable.

- L'espèce *Cydia pomonella granulosus* est un baculovirus granulovirus du ver parasite de la pomme. Cet insecticide est utilisé dans notre cas pour mimer le comportement de divers virus de la catégorie A.

Les biorécepteurs associés à nos biocapteurs sont les immunoglobulines G spécifiques aux espèces exposées ici. Ainsi, il convient de disposer d'un moyen d'immobiliser à la surface de nos capteurs les anticorps spécifiques des quatre espèces simulant la menace. Les critères que nous souhaitons voir satisfaits par la couche biologique sensible sont exposés ici. Ils sont liés à l'exigence de la fabrication d'un capteur destiné à la détection d'agents simulant la menace, de type « détecter-pour-protéger ».

Premièrement, il convient que la méthode de fonctionnalisation retenue permette le greffage des anticorps de manière permanente. Ce greffage doit pouvoir résister à des variations brusques de pH. Il doit être également résistant sur une durée de stockage de quelques jours. Deuxièmement, la méthode de fonctionnalisation retenue doit garantir l'intégrité de la structure et le bon fonctionnement des anticorps spécifiques de l'espèce à détecter. Enfin et plus globalement, la méthode de fonctionnalisation doit permettre de minimiser le taux d'interactions non-spécifiques et maximiser le taux d'interactions spécifiques de l'espèce à détecter.

Afin d'obtenir le protocole de fonctionnalisation le plus adapté au cadre applicatif décrit dans cette thèse, nous avons réalisé deux séries de tests en parallèle afin d'évaluer les performances de deux méthodes chimiques différentes construites à partir de types de surfaces. La première est basée sur le dépôt et la fonctionnalisation d'une couche de poly-L-lysine-grafted-Poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG) à partir d'une surface de dioxyde de silicium. La seconde réside dans la génération d'une monocouche auto-assemblée, composée de molécules « thiols », à partir d'une surface d'or.

Dans l'optique d'attester la faisabilité d'une biodétection spécifique des agents simulant la menace à partir des diverses chimies de fonctionnalisation élaborées ainsi que d'en évaluer les performances, nous effectuerons le suivi et l'étude des différentes étapes biochimiques grâce à 4 microbalances à quartz multiplexées avec suivi de la dissipation. Le choix de la meilleure chimie de fonctionnalisation possible sera alors effectué. Il convient de préciser que le résultat de cette optimisation a permis de déterminer la nature du matériau qui équiperait la surface des micromembranes, lors du processus de conception des microsystèmes résonants.

Le fonctionnement de la microbalance à quartz avec suivi de la dissipation (QCM-D) est décrit à la section I.2.1.4.C du chapitre I. Nous rappelons ici que les deux signaux utiles issus de la QCM-D sont l'évolution de la fréquence de résonance des résonateurs en quartz et l'évolution de la dissipation de l'onde de vibration au niveau de la couche biologique. Une diminution de la fréquence de résonance correspond à l'ajout d'une masse à la surface du quartz, l'augmentation de la dissipation liée à cet ajout renseigne sur le caractère viscoélastique de l'espèce déposée. Il est possible de suivre pour chaque quartz plusieurs fréquences de résonance correspondant aux différentes harmoniques impaires (de la 1^{ère}, harmonique correspondant au mode fondamental de la vibration en cisaillement du quartz, à la 15^{ième}). Afin de pouvoir comparer les différents résultats obtenus entre eux, il convient de se rapporter toujours à une même harmonique. Pour des raisons de stabilité du signal, nous étudierons toujours ici, le signal issu de la vibration du quartz selon la 7^{ième} harmonique. De plus,

précisons que le système employé ici permet de réaliser quatre expériences en simultanée (QCM-D E4)

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous décrirons les principales étapes ayant permis la mise en place du protocole de fonctionnalisation biochimique au niveau des micromembranes. Nous décrirons alors brièvement la mise en place d'un protocole de passivation biologique des surfaces de la puce hors membranes. Enfin nous nous attacherons à décrire les résultats des tests de détection biologique des antigènes simulant la menace menés à l'aide des micromembranes résonantes fonctionnalisées.

IV.2. Optimisation d'un protocole biochimique de détection d'agents pathogènes simulant la menace

IV.2.1. Greffage d'anticorps sur des surfaces de dioxyde de silicium

IV.2.1.1. Objectifs et description du protocole

Afin de greffer les anticorps spécifiques aux agents simulant la menace sur une surface de dioxyde de silicium, le choix a été fait d'exploiter la grande variété de fonctions offertes par les molécules de PLL-g-PEG. Premièrement, l'adsorption de manière ordonnée de ces molécules à la surface peut être réalisée par un protocole simple, via l'activation de la surface de dioxyde de silicium par action d'un plasma de dioxygène. Ensuite, ces molécules peuvent être modifiées afin de disposer de groupements terminaux aux différentes fonctions. Si aucune modification n'est apportée, une couche de molécules PLL-g-PEG aura un pouvoir de diminution des interactions non-spécifiques (cf *chapitre I section I.2.1.3*). Si l'on modifie la structure moléculaire pour ajouter un groupement terminal particulier, de nombreuses fonctionnalités sont disponibles.

Dans notre cas, nous avons opté pour des molécules PLL-g-PEG modifiées pour supporter une molécule de biotine à leur extrémité. Ces molécules forment avec les molécules d'avidine, de streptavidine ou bien encore neutravidine, des couples d'une très grande affinité et forment des liaisons très robustes sous des conditions normales de température et de pH. L'utilisation de PLL-g-PEG biotinylés combinés avec des molécules de neutravidine a été rapportée récemment par l'équipe de Scott R. Manalis [1] pour fonctionnaliser leur biocapteur d'étude à savoir les micro-canaux suspendus résonants. L'empilement mis en place dans le cadre de cette thèse pour assurer le greffage des anticorps spécifiques aux agents simulant la menace sur une surface de dioxyde de silicium est présenté à la figure 4.1. Les solutions et les réactifs biologiques nécessaires ont été achetés chez divers fournisseurs dont la liste est exposée en Annexe D.

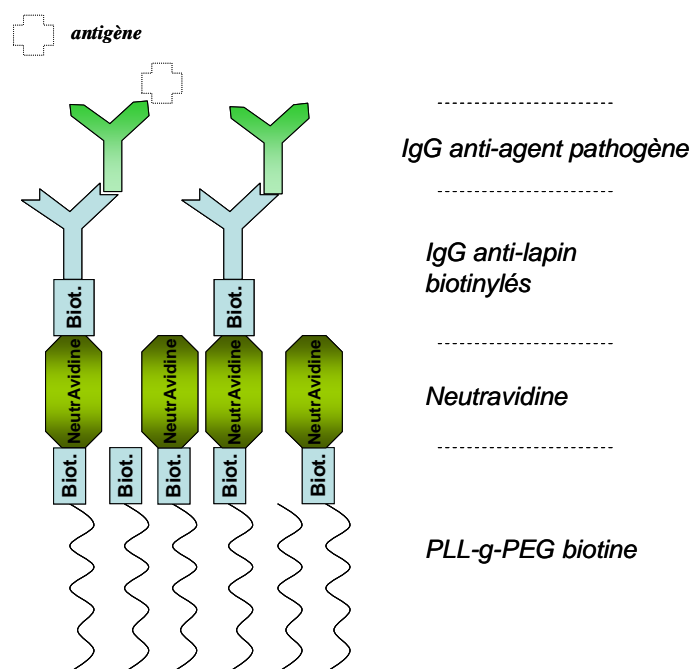


Figure 4.1 : Schéma descriptif de l'empilement biochimique permettant le greffage de manière robuste et permanente des anticorps spécifiques aux agents simulant la menace étudiés dans le cadre de cette thèse.

Les molécules de Neutravidine sont à même d'engager des liaisons de grande solidité avec quatre molécules de biotine. Disposer d'immunoglobulines modifiées pour incorporer une molécule de biotine sur leur fragment constant F_c , permet alors de les greffer au sommet de l'empilement. Dans notre cas, nous ne disposons pas d'anticorps spécifiques aux agents simulant la menace possédant une molécule de biotine liée à leur fragment constant. Cependant, les anticorps spécifiques aux agents simulant la menace biologique étant tous produits à partir de lymphocytes de lapins, nous pouvons nous procurer des anticorps biotinylés spécifiques au fragment constant F_c des anticorps produits par des lapins. Cette étape permet alors de capturer les anticorps spécifiques aux agents à détecter sur la surface de dioxyde de silicium.

Le nombre élevé d'étages biochimiques constituant ce protocole permet d'éloigner de la surface les anticorps spécifiques à l'espèce à détecter ce qui doit avoir pour effet de limiter le nombre d'interactions spécifiques (celles-ci ayant lieu directement sur la surface). Le principal inconvénient du nombre élevé d'étapes est lié à l'encombrement apporté par les différentes espèces biologiques. En effet, l'encombrement des espèces déposées sur la surface limite le taux d'occupation des sites de chaque couche par les éléments de la couche suivante. Ainsi, pour chaque couche déposée, le nombre de sites disponibles diminue toujours. Il s'agira donc de maximiser la quantité d'espèces déposées afin de garantir en fin de protocole la disponibilité d'un nombre suffisant de sites pour les agents biologiques simulant la menace.

IV.2.1.2 Optimisation expérimentale

Avant d'être placés au sein des quatre chambres fluidiques de la QCM-D E4, les quartzs, dont la surface de dioxyde de silicium est le siège de la fonctionnalisation, sont activés par passage durant cinq minutes au sein d'un générateur de plasma O_2 . Le débit du fluide au sein des chambres fluidiques

de la QCM-D E4 est assuré par une pompe péristaltique et sera fixé (sauf mention du contraire) à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. La régulation en température est fixée une fois pour l'ensemble des chambres fluidiques à 25 °C. Au début de l'expérience, une solution « tampon » HEPES 10 mM circule dans les tuyaux et à travers la chambre.

Afin de déterminer quelle concentration (des différentes espèces utilisées) optimise le dépôt de chaque couche, on procède à une injection par gamme de concentrations, en partant de la plus faible concentration vers la plus élevée. Une fois injectée la solution d'une concentration donnée, le signal des variations de la fréquence de résonance est observé. La stabilisation du signal en un « plateau », correspondant à l'état stable entre la quantité d'une espèce déposée et la quantité désorbée de cette même espèce, est attendue avant toute autre injection. Cette méthode permet de déterminer la concentration qui permettra d'arriver à la saturation de la surface du quartz en espèce déposée. La première concentration pour laquelle une chute de fréquence synonyme d'un accrochage de matière n'est plus observée fixe *a posteriori* comme concentration optimale celle injectée juste avant celle-ci.

PLL-g-PEG biotine et Neutravidine

La longue de chaîne carbonée des PLL-g-PEG s'accroche à la surface de SiO_2 via une interaction électrostatique entre cette dernière et la tête de Poly-L-lysine. En accord avec de nombreuses références dans la littérature, la concentration de 1mg/ml retient notre choix. Les résultats des variations de fréquence obtenue pour une telle concentration sont présentés à la figure 4.2 et attestent d'un remplissage complet de la surface du quartz. La légère désorption observée après le dépôt est le fait des molécules de PLL-g-PEG qui n'ont pas été fixées à la surface et qui sont partiellement retenues par les molécules immobilisées. Ce phénomène tend à créer des amas perturbant l'uniformité de la couche. On procède alors à une brève injection de glycine (100 mM, pH 1,8, $t = 1$ min) afin de nettoyer ces amas. Une fois cette injection terminée, on fait circuler du tampon biologique PBS 1X dans la chambre fluidique. La stabilisation de la fréquence de résonance à un niveau supérieur à celui observé avant l'injection de glycine atteste qu'une partie des molécules de PLL-g-PEG a été évacuée.

Les variations obtenues pour l'adsorption des molécules de PLL-g-PEG biotine sont très reproductibles. Tout au long des expériences, une fixation pendant 30 min induira une variation de fréquence de -30 Hz puis une lente désorption de +3 Hz durant 40-50 min.

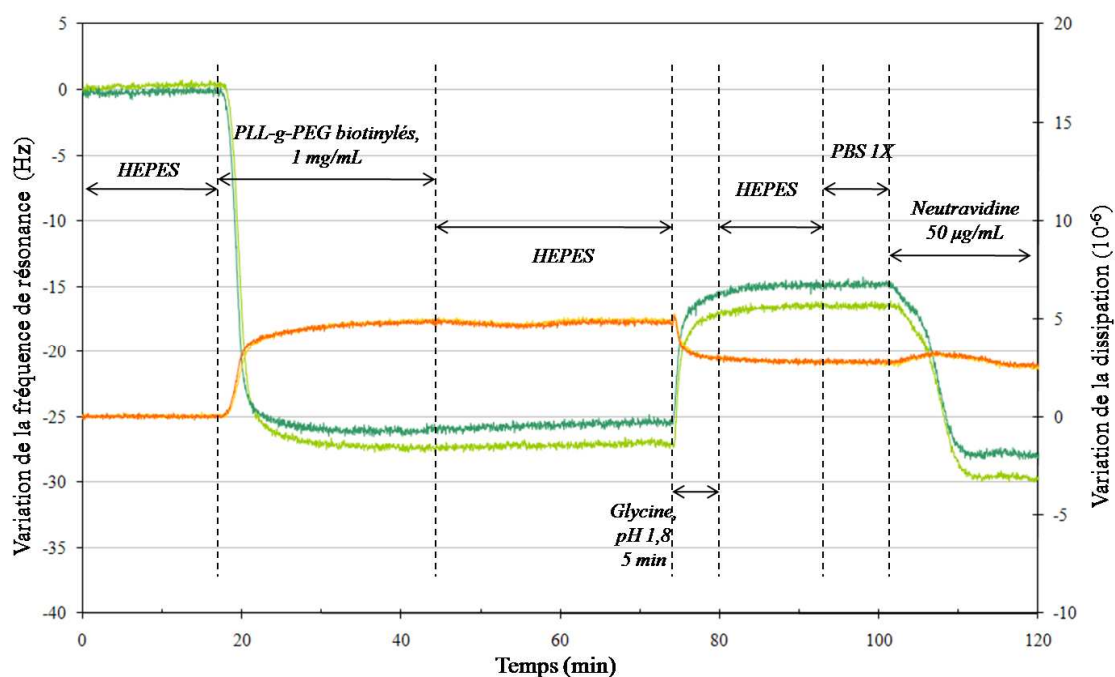


Figure 4.2: Graphique des variations de la fréquence de résonance et de la dissipation de la 7^{ème} harmonique en fonction du temps pour deux quartzs en parallèle, lors de la fixation sur la surface des quartzs des PLL-g-PEG biotinylés à une concentration de 1 mg/ml. Ce graphique montre également le changement de tampon ainsi que la fixation de la Neutravidine concentrée à 50 µg/ml, traité plus loin.

Les PLL-g-PEG étant surmontés d'une tête biotine, la liaison conformationnelle avec la neutravidine sera très stable dans le temps. Deux concentrations de neutravidine ont été testées : 50 µg/ml et 500 µg/ml. L'expérience reproduite trois fois a montré le même niveau de variation de la fréquence pour les deux concentrations, à savoir -30 Hz, ce qui tendrait à prouver que la saturation de la couche de PLL-g-PEG biotine en neutravidine est déjà atteinte pour une concentration de 50 µg/mL. Ce point est en cohérence avec ce qui est rapporté dans la littérature [2]

Il convient également de noter qu'au regard de la taille des anticorps par rapport aux molécules de neutravidine, une concentration trop élevée de neutravidine serait inutile. En effet, les anticorps sont assez volumineux pour se gêner au voisinage de sites de fixation trop proches. Ce phénomène est appelé encombrement stérique [3] et incite à une densité maîtrisée de neutravidine sur la surface [4].

Afin d'optimiser le protocole, il a été choisi de limiter à 30 min le temps de fixation de la neutravidine. En effet, au bout de 30 min, 95% de la diminution totale de la fréquence de résonance observée est atteinte.

Anticorps « anti-lapin » biotinylés

Les anticorps spécifiques au fragment constant des immunoglobulines produites par le lapin ont été modifiés afin d'incorporer dans leur structure un élément biotine. La liaison de ceux-ci avec la neutravidine sera donc également très robuste et stable dans le temps. Les solutions d'anticorps sont

préparées à partir d'aliquotes conservées à -4°C . Des solutions de 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ sont préparées. Plusieurs expériences sont menées afin de déterminer la concentration optimale permettant de fixer le plus d'anticorps « anti-lapin » biotinylés.

Il convient de préciser ici qu'un trop grand nombre d'anticorps au voisinage des sites d'interactions induit la formation d'agrégats piégeant les anticorps entre eux. Ces agrégats dégradent la qualité et l'homogénéité de la couche fixée en bloquant des espèces qui restent à la surface mais sans être liées de manière spécifique à la neutravidine. L'observation de la figure 4.3 permet d'observer d'abord d'une accroche conséquente d'anticorps résultant de l'injection de la concentration 50 $\mu\text{g/mL}$. Cette accroche est suivie d'une lente désorption que l'on peut associer à la désorption de certains anticorps pris dans des agrégats initiaux. Ensuite, on observe un greffage d'anticorps lié à la concentration 100 $\mu\text{g/mL}$ qui est totalement annulé par la désorption liée à l'injection de la concentration 200 $\mu\text{g/mL}$. Deux hypothèses sont avancées par l'auteur pour expliquer cet effet, l'une des hypothèses est que la couche biologique étant supposée saturée par l'accroche liée à la concentration 50 $\mu\text{g/mL}$, les anticorps de la solution suivante ne peuvent plus se greffer de manière optimale et forment des agrégats, ces agrégats seraient alors évacués lors de l'injection de la concentration supérieure. Une autre hypothèse que nous ne pouvons pas exclure réside dans une erreur de préparation de la solution concentrée à 100 $\mu\text{g/mL}$. En effet, en la variation initiale et finale des signaux associée à la présence de la solution concentrée à 100 $\mu\text{g/mL}$ pourrait être associée à un effet tampon provenant d'une erreur de préparation des solutions, ceci peut être confirmé par le fait que l'allure de la dérive de la courbe reste inchangée entre les deux variations brusques liées à l'arrivée puis au départ de la cellule fluidique de cette solution incriminée. La figure 4.4 montre quant à elle, que la concentration 20 $\mu\text{g/mL}$ ne permet pas d'atteindre la saturation en un temps court puisque c'est l'injection de PBS 1X qui coupe la dynamique de greffage.

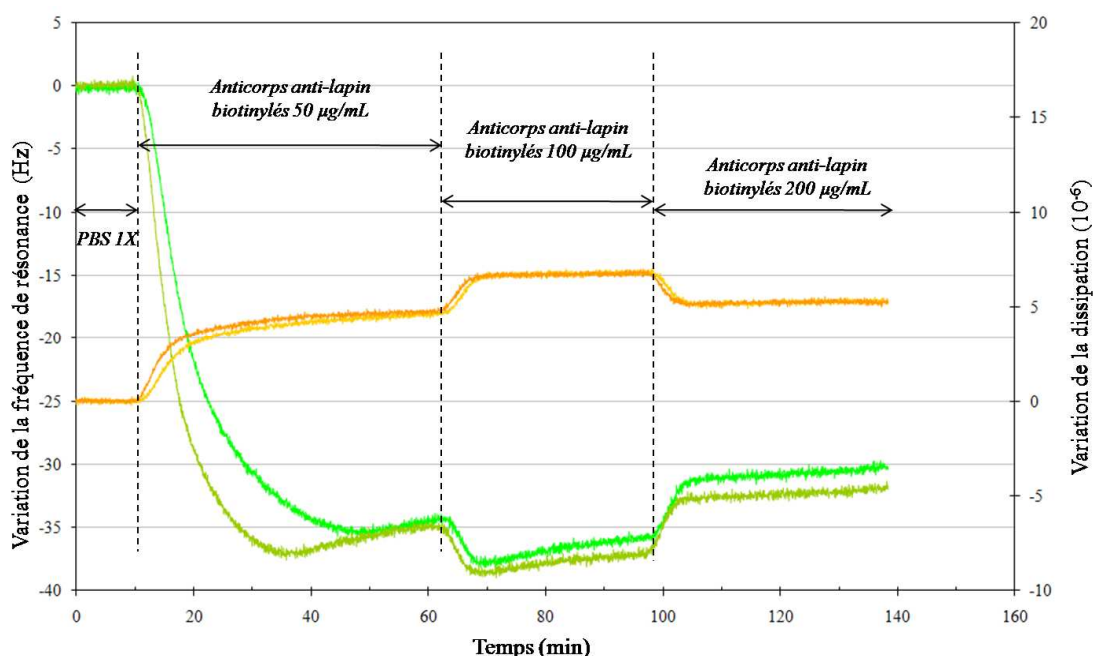


Figure 4.3: Graphique des variations des fréquences de résonance et des dissipations pour la 7ème harmonique de 2 quartzs SiO₂ en parallèle, pour l'injection d'une gamme de solution d'anticorps anti-lapin biotinylés de concentrations 50, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$.

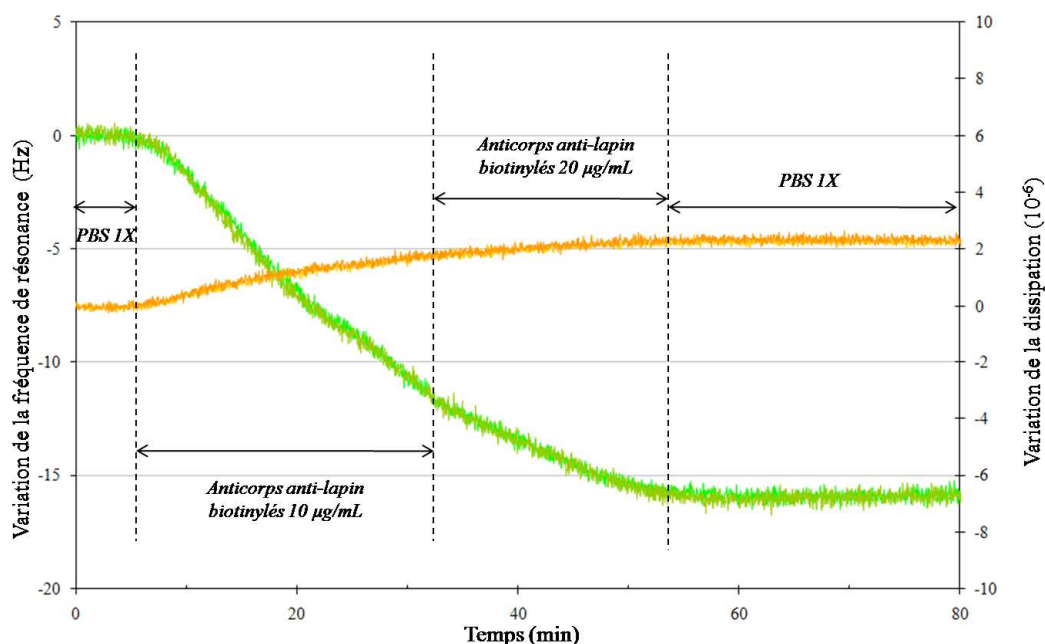


Figure 4.4: Graphique des variations des fréquences de résonance et des dissipations pour la 7^{ème} harmonique de 2 quartzs SiO₂ en parallèle, pour l'injection d'une gamme de solution d'anticorps anti-lapin biotinylés de concentrations 10 et 20 µg/mL.

Ces expériences montrent que la concentration permettant la saturation optimale de la couche précédente se situe entre 20 µg/mL et 50 µg/mL. Afin d'éviter que la durée du protocole total ne soit trop grande, le choix est fait de retenir 50 µg/mL comme concentration optimale pour les anticorps biotinylés spécifiques du fragment constant des anticorps du lapin.

Anticorps spécifiques aux agents simulant la menace

Lors de la réalisation d'empilements de deux couches d'anticorps, la littérature [5] indique le plus souvent un ratio anticorps/anticorps de 1. Ainsi, étant donné que la concentration de 50 µg/mL a été choisie comme concentration optimisée pour la fixation des anticorps anti-lapin biotinylés, on peut raisonnablement penser que cette même concentration fournira une fixation homogène et régulière pour les anticorps spécifiques aux antigènes étudiés.

Une étude sur une gamme d'anticorps a été menée afin de vérifier que la concentration 50 µg/mL permet d'atteindre la saturation de la couche précédente. Le graphique associé à cette expérience est donné à la figure 4.5. Les variations de fréquence de résonance pour chaque anticorps sont reportées au tableau 4.1. Tous les anticorps spécifiques ne sont pas représentés ici car au moment de l'expérience les *Escherichia coli* étaient lysées ; les anticorps spécifiques à cette bactérie n'ont donc pas été immobilisés. Les résultats obtenus ont toutefois été utilisés *a posteriori* pour valider la détection de nouvelles souches vivantes d'*Escherichia coli* grâce au protocole étudié.

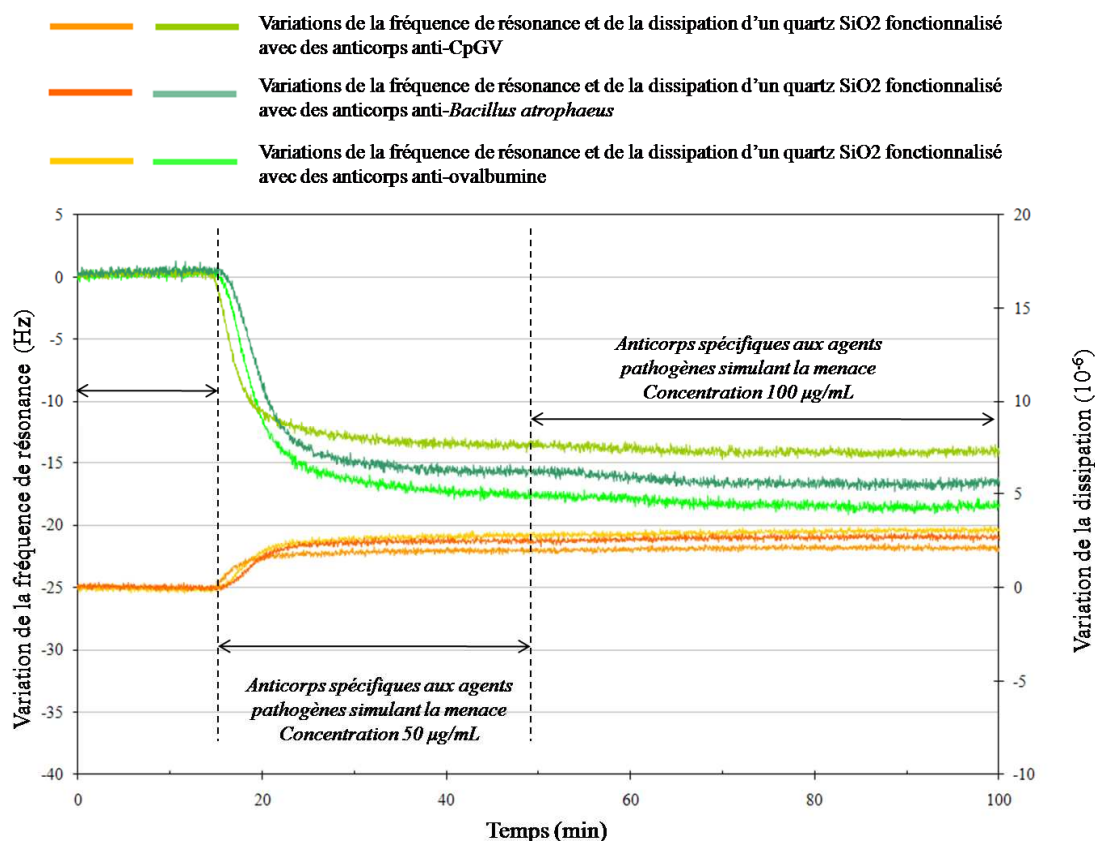


Figure 4.5 : Graphique des variations de la fréquence de résonance et de la dissipation pour la 7^{ème} harmonique de 3 quartz SiO₂ en parallèle, pour l'injection d'une gamme de solution d'anticorps anti-ovalbumine, anti-*Bacillus atrophaeus* et anti-granules CpGV et de concentrations 50 et 100 µg/ml.

Anticorps spécifiques de l'espèce...	Concentrations	
	50 µg/mL	100 µg/mL
ovalbumine	-17,7 Hz en 40 min	-0,6 Hz en 40 min
<i>Bacillus atrophaeus</i>	-15,9 Hz en 40 min	-0,6 Hz en 40 min
<i>Cydia pomonella granulosus</i> virus (CpGV)	-13,7 Hz en 40 min	-0,8 Hz en 40 min

Tableau 4.1 : Résultats en termes de variations de fréquence de résonance pour la fixation d'anticorps anti-ovalbumine, anti-*Bacillus atrophaeus*, anti-granules CpGV.

Ainsi, il est possible de confirmer la concentration optimale à sélectionner pour le processus complet. En effet, le passage de la concentration de 50 µg/ml à celle de 100 µg/ml n'induit quasiment pas de variation de fréquence supplémentaire. La concentration de 50 µg/mL est donc retenue pour les anticorps spécifiques aux agents biologiques à détecter, confirmant par là même ce qu'il nous a été donné d'observer dans la littérature pour des doubles couches d'anticorps.

Conclusion

Nous avons validé le greffage d'anticorps sur des surfaces de dioxyde de silicium SiO₂ et optimisé les concentrations afin de maximiser le nombre de sites de réaction disponibles pour la reconnaissance des antigènes simulant la menace. Le processus complet peut être résumé à la table 4.2.

Espèces biologiques et chimiques	Concentration optimale	Temps de greffage
PLL-g-PEG biotine	1 mg/mL	30 min
Glycine	100 mM ; pH 1,8	1 min
Neutravidine	50 µg/mL	30 min
Anticorps anti-lapin biotinylés	50 µg/mL	40 min
Anticorps spécifiques des antigènes simulant la menace	50 µg/mL	40 min
Temps total		2 h 21 min

Tableau 4.2 : Détail du protocole biochimique permettant l'immobilisation optimale des anticorps spécifiques aux agents simulant la menace sur une surface de SiO₂

IV.2.2. Greffage d'anticorps sur des surfaces d'or

IV.2.2.1. Objectifs et description du protocole

De nombreuses solutions existent dans la littérature pour la fonctionnalisation de surfaces d'or et cette tâche s'avère plus simple à réaliser que pour des surfaces de SiO₂. Le processus que nous avons retenu est basé sur l'utilisation d'une monocouche auto-assemblée (SAM : self-assembled monolayer) d'acide 11-mercapto-undecanoïque (MUA) qui vient se structurer directement sur la surface d'or lorsque placé à l'abri de l'air et de la lumière.

L'étape suivante consiste à venir remplacer les groupements carboxyliques des chaînes carbonées de cet acide par des fonctions succinimides, qui constituent des bons groupements partants en vue de la réaction entre la monocouche assemblée et les fonctions amines des anticorps, favorisant ainsi le greffage de ces derniers. Cette étape est dite d'activation de la monocouche. Enfin, l'injection des anticorps spécifiques aux espèces biologiques à détecter viendra terminer la structure biochimique ainsi mise en place.

Notons toutefois que, à la fin de l'accrochage des anticorps, une brève injection d'éthanolamine viendra désactiver les groupements succinimides encore actifs qui n'auraient pas fixé un anticorps, ceci afin d'éviter les interactions non-spécifiques entre les espèces biologiques à détecter et la monocouche assemblée. La figure ci-dessous donne une représentation schématique du protocole de fonctionnalisation des quartzs or.

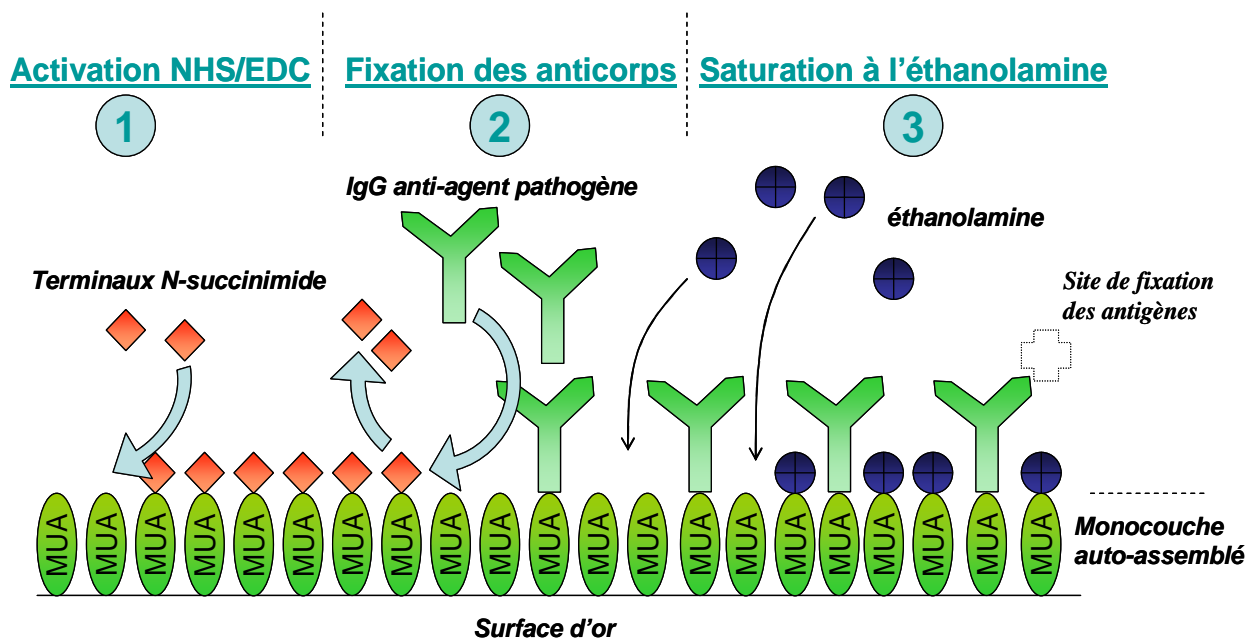


Figure 4.6 : Représentation schématique du processus de greffage des anticorps sur une monocouche d'acide 11-mercaptopundécanoïque (MUA) auto-assemblée sur une surface d'or.

Ce protocole présente l'avantage de lier les anticorps spécifiques aux agents pathogènes simulant la menace de manière covalente à la monocouche auto-assemblée. De ce point découlera une grande stabilité de l'accroche des anticorps pour différentes conditions de pH et de température ainsi qu'une relative robustesse de l'accroche à travers le temps.

IV.2.2.2 Mise en place expérimentale et optimisation

Le protocole expérimental associé est le suivant. Premièrement, les quartzs possédant une surface d'or sont lavés de tous déchets organiques ou impuretés sur leur surface en appliquant un processus basé sur un traitement par plasma O₂ et une immersion dans un mélange fumant d'eau oxygénée et d'acide sulfurique. L'assemblage de la monocouche se fait par immersion des quartzs dans une solution d'acide 11-Mercapto-Undecanoïque à la concentration 5 mM pendant 12 h. Le milieu réactionnel est constamment protégé de la lumière. Les molécules d'acide viennent se structurer, lors d'une réaction à la cinétique lente, en une couche de densité uniforme de molécules liées aux atomes d'or de la surface.

Les quartzs sont alors rincés et introduits dans les chambres fluidiques de la QCM-D E4. Le débit de travail reste 10 µl/min.

L'activation est réalisée par injection d'une solution basée sur un mélange à parts égales d'une solution à 100 mM de NHS (N-HydroxySuccinimide) et d'une solution de 400 mM d'EDC (N-Ethyl-N'-(3-Diméthylaminopropyl)Carbodiimide), toutes deux préparées dans du tampon HEPES. Cette solution (appelé mélange NHS/EDC) est injectée pendant 30 min dans la chambre fluidique des quartzs.

Les terminaux succinimides ayant remplacé les terminaux organiques d'origine de la monocouche, on fait circuler du tampon HEPES 10 mM afin de stabiliser le signal. On injecte ensuite du tampon PBS 1X car les anticorps sont préparés dans des solutions diluées au PBS 1X et il est nécessaire de discriminer les variations de fréquence de résonance du quartz dues au changement de tampon de celles dues à la fixation des anticorps.

Après stabilisation du signal, les anticorps spécifiques aux espèces biologiques à détecter sont injectés. Une fois la stabilisation consécutive du signal atteinte, il ne reste qu'à saturer les sites de la monocouche auto-assemblée n'ayant pu recevoir d'anticorps (de par l'existence du phénomène d'encombrement stérique) avec un groupement passivant. Cette saturation est assurée avec l'injection d'une solution très concentrée d'éthanolamine à 1M pendant 30 min.

Afin de déterminer la concentration optimale de la solution d'anticorps spécifiques permettant le greffage covalent d'une couche d'anticorps à la fois dense et homogène, plusieurs tentatives sont réalisées avec une gamme de concentrations allant de 25 $\mu\text{g/mL}$ à 100 $\mu\text{g/mL}$. Les différentes variations de la fréquence de résonance observées (dans le cas des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus*) entre le niveau du signal avant l'injection et le niveau du signal après stabilisation sont synthétisées à la table 4.3. Les courbes associées sont représentées à la figure 4.7.

Concentration de la solution d'anticorps	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Variation de la fréquence de résonance	-19 Hz	-40 Hz	-42 Hz

Table 4.3 : Variations de la fréquence de résonance de la 7^{ième} harmonique des quartzs or, observées lors du greffage des anticorps spécifiques anti-*Bacillus atrophaeus* sur une monocouche auto-assemblée activée, pour trois concentrations différentes.

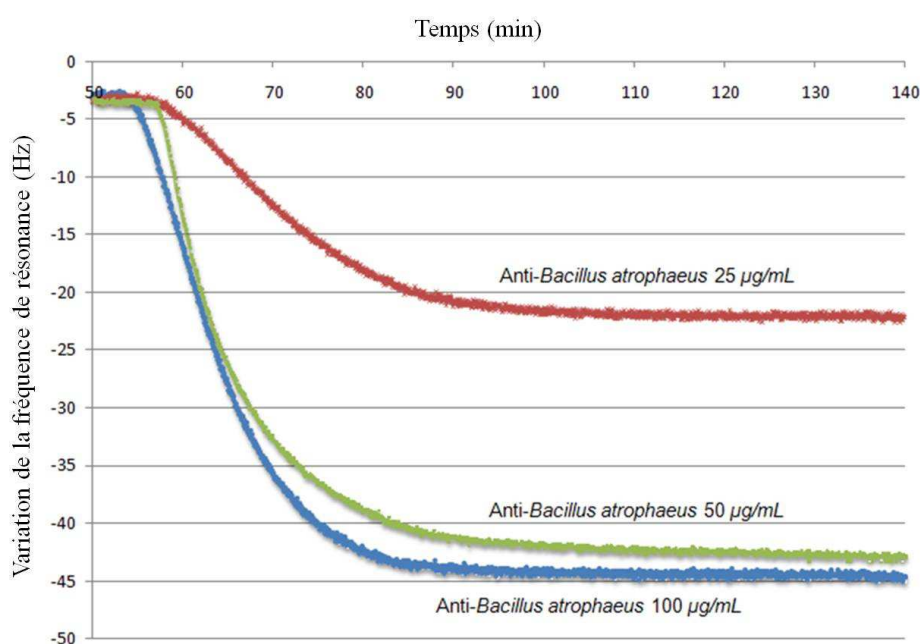


Figure 4.7 : Variations de la fréquence de résonance de la 7^{ième} harmonique d'un quartz avec une surface or, observées lors du greffage des anticorps spécifiques anti-*Bacillus atrophaeus* sur une monocouche auto-assemblée activée, pour trois concentrations différentes.

Nous constatons que la solution de concentration 100 µg/mL n'apporte que très peu de greffage supplémentaire par rapport à la solution de concentration 50 µg/mL. A l'inverse, le greffage apporté grâce à cette concentration est bien supérieur à celui apporté par la solution de concentration 25 µg/mL. Nous pouvons déduire que la saturation de la couche est atteinte grâce à la concentration 50 µg/mL, concentration que nous retenons comme optimale pour le greffage des anticorps. Le même protocole est appliqué aux anticorps spécifiques aux trois autres espèces, les résultats en termes d'amplitude du greffage sont donnés à la table 4.4.

Greffage des anticorps :	anti-ovalbumine,	anti- <i>Escherichia coli</i> ,	anti- <i>Bacillus atrophaeus</i>
Décalage de la fréquence de résonance (7 ^{ième} harmonique) du quartz	17,3 Hz \pm 3,2 Hz (180 min)	39,7 Hz \pm 8,3 Hz (100 min)	10,4 Hz \pm 2,8 Hz (180 min)

Table 4.4 : Résultats du décalage total de la fréquence de résonance la 7^{ième} harmonique d'un quartz or dans le cas du greffage de différents anticorps polyclonaux à la concentration 50 µg/mL.

Les décalages de la fréquence de résonance du quartz observés diffèrent selon les espèces pour une même concentration de la solution d'anticorps. Cette différence peut s'interpréter comme une différence des forces de liaison des anticorps des différentes solutions. Les anticorps étant polyclonaux (de différentes natures et ciblant divers épitopes sur l'antigène) cette hypothèse semble cohérente pour expliquer le greffage massif plus important au moins pour *Escherichia coli* et *Bacillus atrophaeus* par rapport à l'ovalbumine.

La figure 4.8 représente l'évolution de la fréquence de résonance de la 7^{ième} harmonique d'un quartz or au long du protocole complet dans le cas d'une fonctionnalisation par des anticorps anti-*Escherichia coli*. Les effets d'augmentation brusque du signal de dissipation et de diminution brusque de la fréquence de résonance lors de l'injection du mélange NHS/EDC puis de l'éthanolamine ne sont pas reliés à un greffage mais témoignent de la perte d'un effet tampon pour ces solutions puis d'un retour à cet effet tampon avec l'injection de tampon HEPES 10 mM puis PBS 1X. Durant la phase de greffage des anticorps, l'augmentation du signal de la dissipation est très légère en comparaison de l'amplitude de la diminution de la fréquence de résonance. Ceci est cohérent dans le cas d'immobilisation de protéines à la surface du quartz ; en effet, celles-ci ne sont pas suffisamment larges pour induire un piégeage d'eau aux interstices, leur immobilisation n'augmente donc que très faiblement la dissipation viscoélastique d'énergie à la surface du quartz.

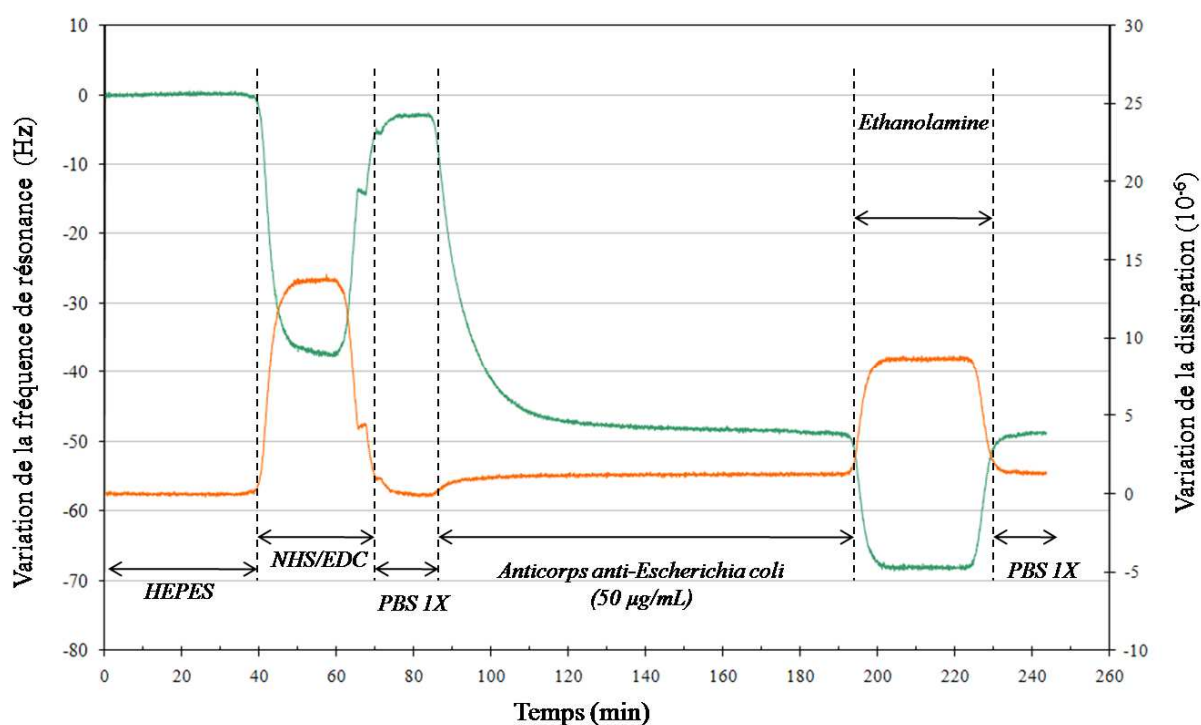


Figure 4.8 : Graphique des variations des fréquences de résonance et des dissipations pour la 7ème harmonique d'un quartz or, pendant le processus de fonctionnalisation biologique représenté schématiquement à la figure 4.6. Les anticorps fixés ici sont les anticorps anti-*Escherichia coli*.

Enfin, nous pouvons synthétiser les étapes du protocole biochimique permettant d'optimiser le greffage d'anticorps spécifiques aux agents simulant la menace sur une surface d'or via l'activation d'une monocouche auto-assemblée d'acide 11-mercapto-undécanoïque :

Espèces biologiques et chimiques	Concentration optimale	Temps de greffage
Acide 11-mercapto-undécanoïque	5 mM	12 h (Auto-assemblage de la monocouche)
N-HydroxySuccinimide / N-Ethyl-N'-(3-Diméthylaminopropyl)Carbodiimide (NHS/EDC)	100 mM / 400 mM	30 min
Anticorps spécifiques des antigènes simulant la menace	50 µg/mL	100 à 180 min
Ethanolamine	50 µg/mL	40 min
Temps total minimum		2 h 50 min (+12 h)

Table 4.5 : Détail du protocole biochimique permettant l'immobilisation optimale des anticorps spécifiques aux agents simulant la menace sur une surface d'or

IV.2.3. Détection spécifique d'agents pathogènes grâce à la microbalance à quartz

Après avoir optimisé le greffage des anticorps spécifiques aux agents simulant la menace pour deux types de surface et dans l'optique d'attester la capacité des couches biologiques sensibles à reconnaître de manière spécifique les agents simulant la menace, nous effectuons des tests de biodétection.

Le protocole est le suivant : deux quartzs recouverts d'un même matériau de surface sont fonctionnalisés, selon l'un des deux protocoles de fonctionnalisation décrit dans ce chapitre, le premier avec un anticorps spécifique à l'espèce à détecter et le deuxième avec un anticorps non-spécifique de l'espèce à détecter. En fin de processus de fonctionnalisation, du PBS 1X circule dans la chambre fluide et la stabilisation du signal de la fréquence de résonance est attendue puis l'agent simulant concerné dilué dans une solution de tampon biologique (PBS 1X) est injecté. Le greffage d'espèces biologiques observé uniquement sur le quartz fonctionnalisé avec l'anticorps spécifique est associé à une reconnaissance spécifique de l'antigène par la formation de complexes antigènes-anticorps. En revanche, le greffage observé sur le second quartz est identifié comme une occurrence de phénomène d'adsorption non-spécifique.

Plusieurs solutions d'antigènes sont préparées à des dilutions par puissance de dix de la concentration initiale. On rappelle les concentrations des solutions mères :

- La solution d'*Escherichia coli* est concentrée à hauteur de $2,4 \cdot 10^9$ UFC/ml
- La solution de *Bacillus atrophaeus* est concentrée à hauteur de $1,4 \cdot 10^9$ spores/ml
- La solution de spores de CpGV est concentrée à hauteur de $1,1 \cdot 10^9$ granules/ml
- La solution d'ovalbumine est concentrée à hauteur de 1 mg/ml

Le processus expérimental est le suivant : une fois la vibration des quartzs stabilisée, on injecte la dilution au $10000^{\text{ième}}$ dans les chambres fluidiques, si aucune variation n'est observée, on passe à l'injection de la solution concentrée dix fois plus. Si une variation témoignant d'une reconnaissance de l'antigène par l'anticorps est observée, alors la stabilisation du signal est attendue avant d'injecter la concentration suivante.

Les performances des deux protocoles (décrits pour une surface d'or et de dioxyde de silicium) en termes de quantité de la reconnaissance biologique et de limitation de l'occurrence d'interactions non-spécifiques sont utilisées alors comme critère discriminant pour sélectionner la surface permettant le protocole optimal.

Enfin, une fois le choix du matériau et du protocole effectué, nous cherchons à évaluer la réponse du protocole aux exigences du cadre applicatif de nos biocapteurs, à savoir l'utilisation dans des zones naturelles possédant leur propre milieu biologique au milieu duquel il convient de réaliser la biodétection. Dans cette optique, nous réalisons une série de nouveaux tests de reconnaissance spécifique pour des antigènes cette fois dilués au sein d'échantillons de « bruit de fond biologique » fournis par le Centre d'Etudes du Bouchet de la DGA. Cette solution contient un ensemble d'espèces biologiques endémiques de l'environnement naturel en des proportions aléatoires.

IV.2.3.1. Cas d'agents pathogènes au sein d'un tampon biologique

Les solutions permettant la réalisation des gammes de concentrations des différents antigènes simulant la menace sont préparées à partir du tampon biologique PBS 1X.

Par souci de synthèse, nous ne pouvons exposer tous les graphes liés aux différents tests de détection, nous présentons néanmoins avec la figure 4.9 le cas de la détection de l'ovalbumine. Ensuite, le tableau 4.6 synthétise les décalages des fréquences de résonance observées pour les différentes concentrations injectées lors des tests de détection pour les quatre espèces biologiques simulant la menace dans le cas du protocole de fonctionnalisation de surface d'or.

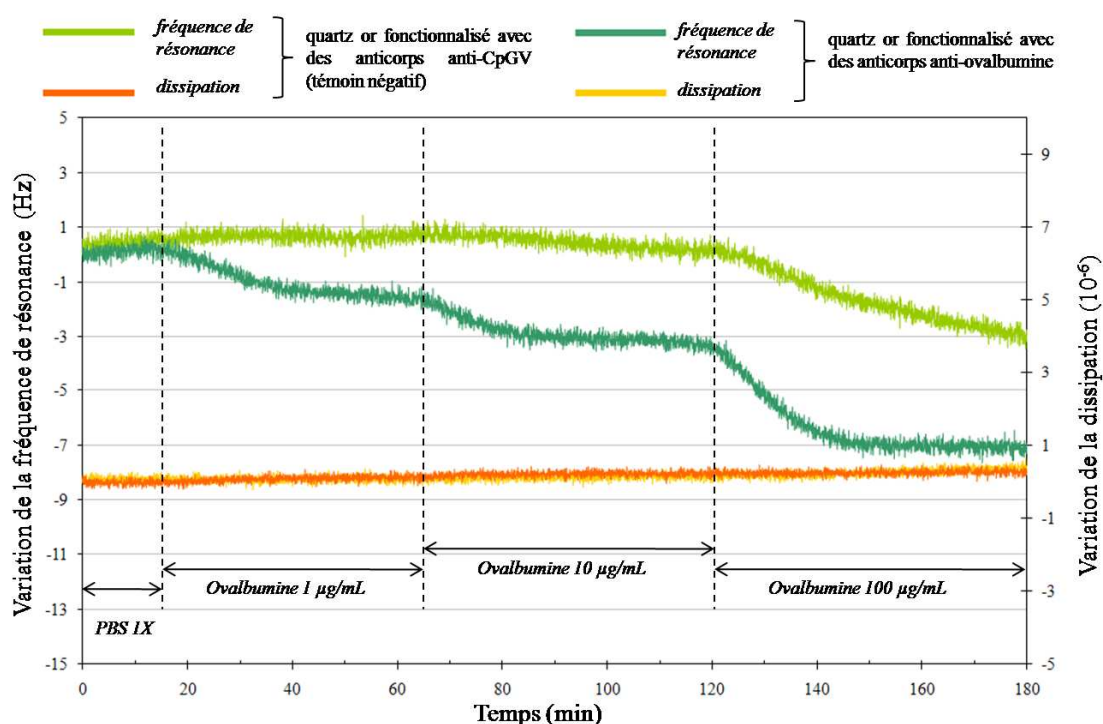


Figure 4.9 : Graphique des variations des fréquences de résonance et des dissipations pour la 7ème harmonique de 2 quartz or en parallèle, pendant l'injection d'ovalbumine à différentes concentrations. Un des quartz est fonctionnalisé avec un anticorps anti-ovalbumine, l'autre avec un anticorps anti-CpGV (témoin négatif).

Nous voyons sur ce graphe que la fixation non spécifique intervient pour l'injection de l'ovalbumine concentrée à 10 µg/mL. Si l'on observe les signaux de dissipation, on n'observe aucune variation. Ceci est cohérent pour un greffage d'ovalbumine, dont l'immobilisation sur la couche augmente la masse mais n'a peu ou pas d'effet sur la dissipation viscoélastique au niveau de la couche biologique sensible

Détection sur quartz or		<i>Bacillus atropheus</i>	<i>Escherichia coli</i>	CpGV	Ovalbumine
Dilution 1/10000 ^{ème}	Détection	0 Hz	0 Hz	0 Hz	0 Hz
	témoin négatif	0 Hz	0 Hz	0 Hz	0 Hz
Dilution	Détection	-1 Hz	0 Hz	0 Hz	-1,4 Hz

1/1000 ^{ième}	témoign négatif	0 Hz	0 Hz	0 Hz	0 Hz
Dilution 1/100 ^{ième}	Détection	-7,5 Hz	-2,8 Hz	0 Hz	-6,3 Hz
	témoign négatif	0 Hz	0 Hz	0 Hz	-1,7 Hz
Dilution 1/10 ^{ième}	Détection	-10,7 Hz	-12,6 Hz	-1,1 Hz	-11,5 Hz
	témoign négatif	-1,2 Hz	-1.2 Hz	0 Hz	-4 Hz

Table 4.6 : Synthèse des variations de fréquence de résonance pour les expériences de détection sur quartz or

Les résultats présentés à la table 4.6 (ainsi que plus tard à la table 4.7) sont calculés pour chaque dilution à partir du niveau de référence de la fréquence de résonance au tout début de l'expérience. Il s'agit donc de variations de fréquence cumulées par rapport aux précédentes concentrations.

Il convient de remarquer tout d'abord que nous pouvons attester de la détection de manière spécifique des quatre agents simulant la menace pour différentes concentrations seuils grâce au protocole de fonctionnalisation des surfaces d'or. Les valeurs seuils sont les suivantes :

- Le bacille *Bacillus atrophaeus* est détecté de manière spécifique pour une concentration seuil de **1,4 10⁶ spores/mL**
- La bactérie *Escherichia coli* est détectée de manière spécifique pour une concentration seuil de **2,4 10⁷ UFC/mL**
- Le virus Cydia Pomonella Granulosis est détecté de manière spécifique pour une concentration seuil de **1,1 10⁸ granules/mL**
- L'ovalbumine est détectée de manière spécifique pour une concentration seuil de **1 µg/mL**

Nous pouvons attester que les concentrations seuils permettant la détection spécifique de *Bacillus atrophaeus* et de l'ovalbumine sont inférieures de un à deux ordres de grandeur aux concentrations seuils permettant la détection spécifique du CpGV et d'*Escherichia coli*. L'explication de cette différence nous a été donnée par le personnel du Centre d'Etudes Biologique de la DGA ; les constantes d'affinité de la réaction anticorps-antigène différent selon l'espèce considérée. La donnée de ces constantes d'affinité est connue au sein du CEB pour avoir été mesurée avec des méthodes de biologies classiques. La confirmation nous a été faite que les constantes d'affinité les plus élevées concernaient le couple anticorps anti-*Bacillus atrophaeus*/ *Bacillus atrophaeus* et le couple anticorps anti-ovalbumine/ovalbumine.

Nous pouvons remarquer ensuite que pour ces deux espèces formant avec leur anticorps spécifiques des couples à haute affinité, l'injection de concentrations proches de la concentration de la solution mère provoque assez facilement des phénomènes de fixation non-spécifique ce qu'il convient d'éviter absolument dans le cadre d'une biodétection d'alerte. Enfin, étant donné la simplicité du protocole de fonctionnalisation des quartzs or, par rapport aux multiples étapes de celui sur SiO₂, on peut penser que le seuil de la détection du *Bacillus atrophaeus* et de l'ovalbumine s'approche du seuil de détection intrinsèque de la QCM.

Afin de synthétiser les résultats des mêmes expériences de biodétection dans le cas du protocole de fonctionnalisation de surface de SiO₂, nous présentons à la figure 4.10 le graphe des variations de la fréquence de résonance du quartz associé à la détection spécifique d'*Escherichia coli*. Précisons que dans le cas de ce protocole de fonctionnalisation, la détection spécifique du virus CpGV

n'a pu être attestée. Les résultats concernant les expériences de détection des autres agents simulant la menace sont exposés au tableau 4.7.

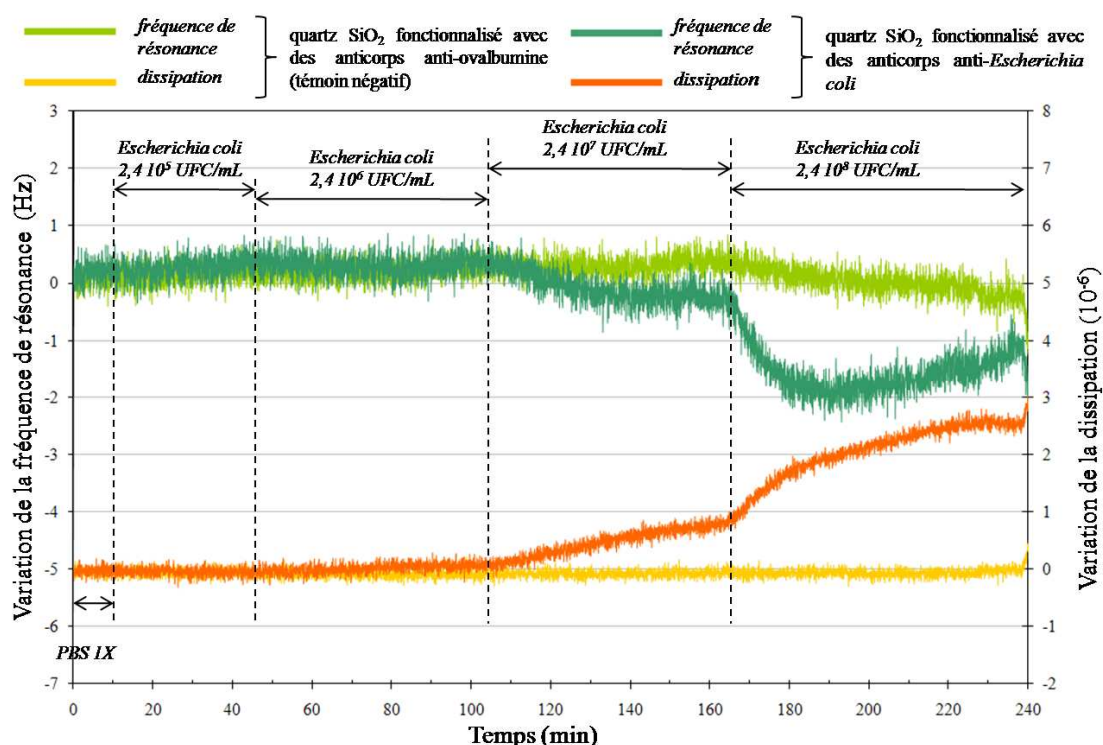


Figure 4.10 : Graphique des variations des fréquences de résonance et des dissipations pour la 7ème harmonique de 2 quartzs SiO₂ en parallèle, pendant l'injection d'*Escherichia coli* à différentes concentrations. Un des quartzs est fonctionnalisé avec un anticorps anti-*Escherichia coli*, l'autre avec un anticorps anti-ovalbumine (témoin négatif).

Cette courbe permet d'attester la détection spécifique d'*Escherichia coli* uniquement à partir de la concentration $2,4 \cdot 10^7$ UFC/mL. L'apparition d'interactions non spécifiques intervient pour la concentration supérieure. Contrairement à ce qu'on a observé dans le cas de la détection de l'ovalbumine, le signal de dissipation du quartz fonctionnalisé avec les anticorps anti-*Escherichia coli* augmente significativement, ce qui est effectivement cohérent avec l'immobilisation de bactéries à la surface du quartz. En effet, les bactéries ont des dimensions de l'ordre du micromètre et représentent donc un volume de fluide non négligeable vibrant avec le quartz. La présence de ces bactéries chargées de fluide biologique à la surface du quartz provoque une augmentation de la dissipation viscoélastique de l'énergie vibratoire du quartz au niveau de la couche biologique.

Détection sur quartz SiO₂		<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Escherichia coli</i>	CpGV	Ovalbumine
Dilution 1/10000 ^{ième}	Détection	0 Hz	0 Hz	0 Hz	0 Hz
	témoin négatif	0 Hz	0 Hz	0 Hz	0 Hz
Dilution	Détection	0 Hz	0 Hz	0 Hz	-2.8Hz

1/1000 ^{ième}	témoïn négatif	0 Hz	0 Hz	0 Hz	0 Hz
Dilution 1/100 ^{ième}	Détection	-2.2 Hz	-0.6 Hz	0 Hz	-3.4 Hz
	témoïn négatif	0 Hz	0 Hz	0 Hz	0 Hz
Dilution 1/10 ^{ième}	Détection	-4.9 Hz	-2.4 Hz	0 Hz	-3.6 Hz
	témoïn négatif	0 Hz	-0.7Hz	0 Hz	0 Hz

Table 4.7: Synthèse des variations de fréquence de résonance pour les expériences de détection sur quartz SiO₂

Nous pouvons attester de la détection spécifique grâce au protocole de fonctionnalisation de surface SiO₂ de trois espèces simulant la menace à partir des concentrations seuils suivantes :

- Le bacille *Bacillus atrophaeus* est détecté de manière spécifique pour une concentration seuil de **1,4 10⁷ spores/mL**
- La bactérie *Escherichia coli* est détectée de manière spécifique pour une concentration seuil de **2,4 10⁷ UFC/mL**
- L'ovalbumine est détectée de manière spécifique pour une concentration seuil de **1 µg/mL**

Les seuils de détection sont les mêmes que dans le cas du protocole de fonctionnalisation de surfaces or pour *Escherichia coli* et pour l'ovalbumine, ils sont moins précis d'un ordre de grandeur pour *Bacillus atrophaeus*. Il convient d'analyser deux choses à partir des résultats présentés à la table 4.7. Premièrement, on constate la très faible importance des phénomènes d'interactions non-spécifiques y compris pour des concentrations proches de la solution mère, confirmant ainsi l'effet d'éloignement de la surface des sites de réaction induit par la succession des étages biologiques. Deuxièmement, nous remarquons que pour les espèces détectées par ce protocole aux mêmes concentrations seuils que dans le cas du protocole de fonctionnalisation des surfaces or, les décalages en fréquence de résonance cumulés sont moins importants que dans le premier cas. On peut donc déduire que le nombre d'espèces greffées en fin d'expérience de manière spécifique sur la surface est moins important. Ceci tend à confirmer l'hypothèse de la diminution du nombre de sites de réaction disponibles pour chaque couche successive liée à l'occupation partielle des sites disponibles à la couche précédente.

Si le protocole de fonctionnalisation des surfaces de SiO₂ présente des avantages en termes de réduction des interactions non-spécifiques et de temps total d'application du protocole, deux raisons nous poussent à le disqualifier comme protocole optimal de fonctionnalisation des micromembranes. Premièrement, il ne permet pas de détecter le virus CpGV. Deuxièmement, il ne permet pas (même lorsque optimisé) de maximiser le nombre de sites de réaction antigénique (paratopes) présentés au milieu réactionnel par rapport au protocole de fonctionnalisation des surfaces or.

Ainsi, à ce stade, nous faisons le choix de retenir ce dernier protocole pour assurer la fonctionnalisation biologique de nos micromembranes. Nous décidons donc d'équiper nos micromembranes de pastilles d'or afin de pouvoir accueillir cette fonctionnalisation.

Ce sont donc les performances de ce protocole or que nous allons étudier en ce qui concerne la reconnaissance spécifique des agents simulant la menace au sein d'un environnement biologique extérieur riche en espèces biologiques de toutes sortes.

IV.2.3.2. Cas d'agents pathogènes en présence d'un bruit de fond biologique

Il existe plusieurs méthodes permettant d'évaluer la spécificité d'un protocole de détection d'une espèce biologique au sein d'un milieu biologique riche en différentes espèces susceptibles de parasiter la bioreconnaissance de l'espèce ciblée. On peut citer parmi ces méthodes la dilution de l'espèce à détecter au sein d'une concentration supérieure d'une espèce proche de celle à détecter [6], il s'agit d'un moyen artificiel de recréer un environnement pouvant induire en erreur le biocapteur (via l'occurrence d'interactions non-spécifiques). La méthode retenue ici consiste à diluer les antigènes à détecter au sein d'un échantillon dit de « bruit de fond biologique » contenant diverses espèces biologiques présentes naturellement en diverses proportions dans l'air.

Le bruit de fond biologique (noté Bdf) a été généré au Centre d'Etudes Biologiques de la DGA grâce à la machine d'échantillonnage d'air cyclone MK1 (Biotrace International, Villeneuve-la-Garenne, France). Le tampon de collecte utilisé pour la génération des échantillons liquides de Bdf est une solution de PBS à 0.15M contenant 0,01% de Tween. La concentration de l'air extrait en bactéries cultivables a été évaluée par la DGA à 0,07 UFC/litre d'air, mais il contient également de nombreuses poussières et particules de taille micrométrique.

Le protocole de détection est le même que celui proposé à la section précédente. Juste après la fin de la fonctionnalisation (i.e. l'injection de l'éthanolamine), le tampon de collecte est injecté, puis la stabilisation du signal est attendue. Ensuite, et afin de différencier les différents effets, le bruit de fond seul est injecté et la stabilisation consécutive du signal est de nouveau attendue. Les résultats pour les différents antigènes sont présentés dans la série de tables suivantes alors que la figure 4.11 montre le graphe associé à la détection de *Bacillus atrophaeus* en présence de bruit de fond. Les résultats concernant le virus CpGV ne sont pas présentés car il n'a pas été possible de détecter de manière spécifique cette espèce en présence de bruit de fond.

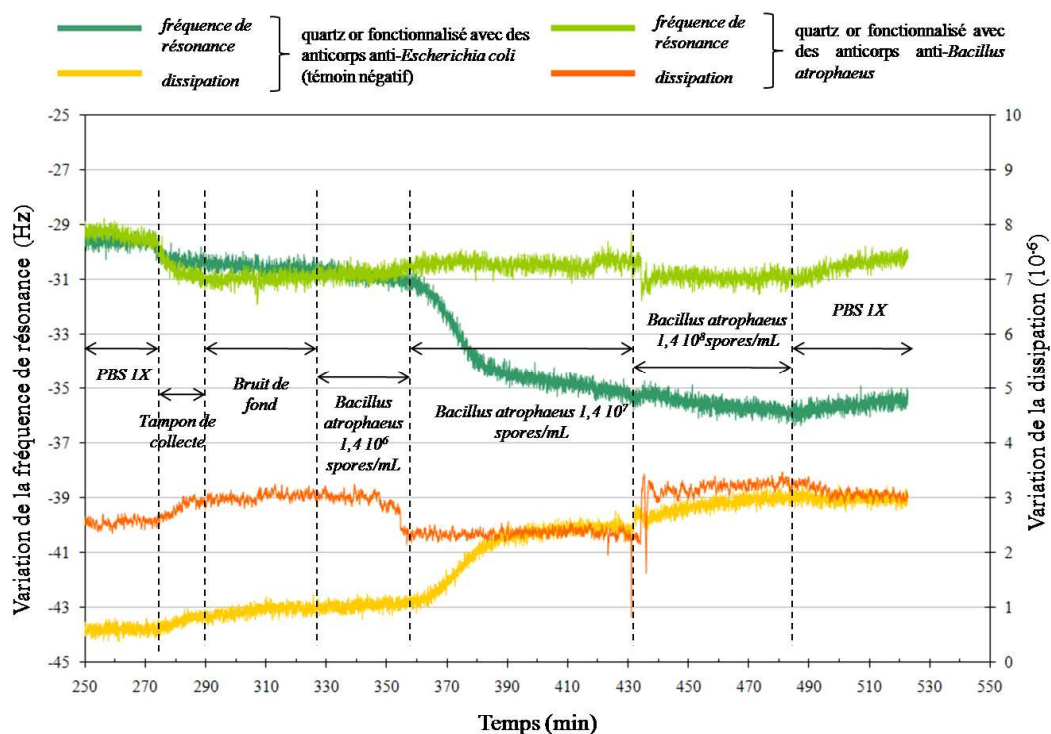


Figure 4.11 : Graphique des variations des fréquences de résonance et des dissipations pour la 7^{ème} harmonique de 2 quartzs en parallèle, pendant l'injection de *Bacillus atrophaeus* à différentes concentrations en présence de bruit de fond atmosphérique. Un des quartzs est fonctionnalisé avec un anticorps anti- *Bacillus atrophaeus*, l'autre avec un anticorps anti- *Escherichia coli* (témoin négatif).

Agents simulant la menace :	Ovalbumine	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Dilution 1/1000 ^{ème}	-2,5 Hz	-0,5 Hz	0 Hz
Dilution 1/100 ^{ème}	-4 Hz (-0,5 Hz)	-2,5 Hz	-1,7 Hz
Dilution 1/10 ^{ème}	-10,5 Hz (-6,5 Hz)	-3 Hz (-0,2 Hz)	-7 Hz (-4 Hz)
Injection de bruit de fond biologique seul (décalage maximum observé)			-1 Hz
Injection de tampon de collecte seul (décalage maximum observé)			-2Hz

Table 4.8 : Décalages de la fréquence de résonance de la 7^{ème} harmonique de quartzs d'or, observés pour la détection des agents simulant la menace dilués dans du bruit de fond biologique. Les données des décalages de la fréquence observés pour les témoins négatifs sont affichées entre parenthèse

Nous constatons que la détection spécifique des agents simulant la menace intervient pour les mêmes concentrations seuils que dans le cas d'agents biologiques simulant la menace dilués dans du tampon biologique. De même, là encore, nous observons que les concentrations seuils de la détection spécifique sont les plus faibles pour les espèces constituant les couples antigènes/anticorps avec les meilleures constantes d'affinité (ovalbumine et *Bacillus atrophaeus*)

Etant donnée la nature complexe et riche en microparticules et micro-organismes du Bruit de fond biologique, nous pouvions nous attendre à une plus grande importance des fixations non-spécifiques. Si cela est le cas pour la détection de l'ovalbumine et d'*Escherichia coli*, cela n'est pas vrai pour la détection de *Bacillus atrophaeus*. L'effet de la présence de bruit de fond biologique observé pour toutes les espèces lors de ces expériences de détection semble être plutôt une diminution de l'intensité du greffage total (spécifique puis spécifique et non-spécifique) [7].

IV.2.3.3. Régénération de la détection

Afin de permettre plusieurs utilisations de nos biocapteurs sans maintenance ce qui est d'un grand intérêt dans la réalisation de biocapteurs autonomes de surveillance, nous avons cherché à valider un protocole de régénération de la couche biologique après la détection des antigènes simulant la menace. La régénération de la couche biologique sensible consiste à forcer la réaction de dissociation des couples antigènes/anticorps. Il est possible de réaliser ceci par l'injection pendant 2 min (à un débit accéléré de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$) d'une solution d'hydroxyde de sodium concentré à 100 mM. Les variations de la fréquence de résonance induites sont observées. Une fois le signal stabilisé, on procède de nouveau à l'injection de l'agent simulant la menace concernée. Si, une nouvelle fois, une reconnaissance spécifique de l'antigène est observée, cela confirme à posteriori que la perte de masse liée à l'injection de la solution NaOH était bien liée à la dissociation de la réaction antigène/anticorps sans perte de fonctionnalité biologique de ces derniers. La figure suivante présente le graphe associé au protocole de régénération appliqué à un quartz ayant été fonctionnalisé par des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus* et ayant réalisé la détection spécifique de cet agent simulant la menace.

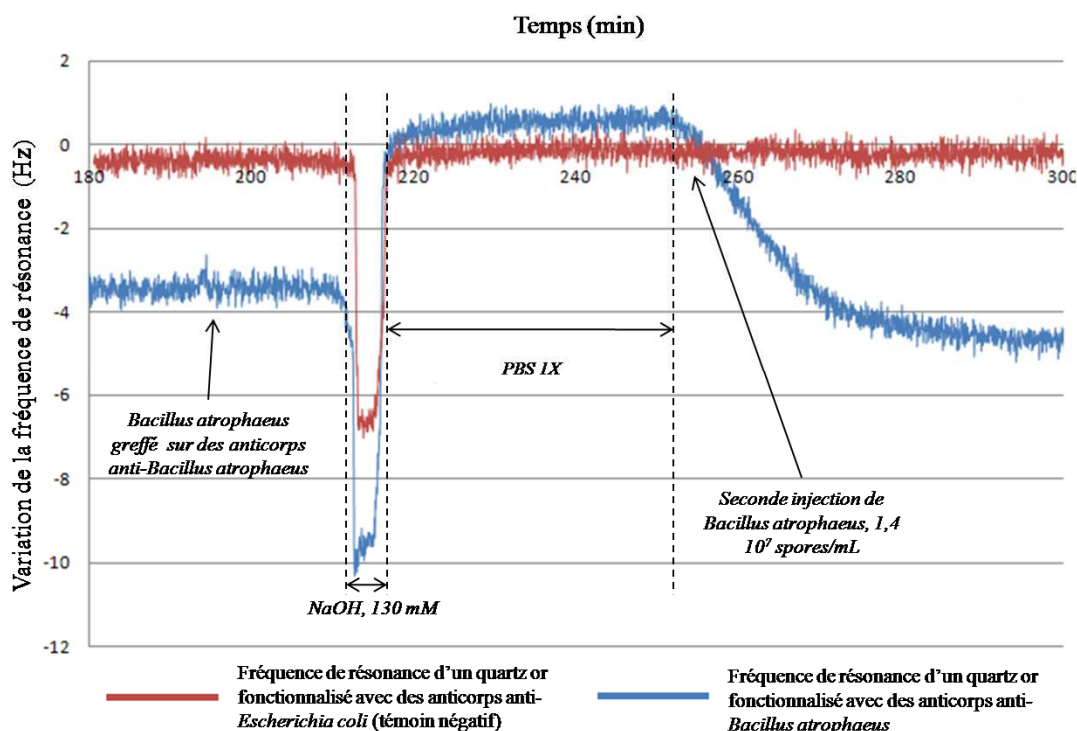


Figure 4.12 : Graphique des variations de la fréquence de résonance de deux quartz or lors du protocole de régénération de la couche biologique sensible. La courbe bleue est associée au quartz fonctionnalisé avec des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus* et ayant réalisé la détection spécifique de cet agent simulant la menace. La courbe rouge est quant à elle associée à un quartz fonctionnalisé avec un autre anticorps et servant ici de témoin négatif.

Nous observons sur cette figure que le niveau du signal de la fréquence de résonance après la régénération est légèrement plus haut que le niveau initial (avant la première détection de *Bacillus atrophaeus* le signal était stabilisé à -0,2 Hz). Une raison possible de cela peut être le nettoyage d'amas d'anticorps présents sur la couche biologique sensible à cause l'effet de brusque changement de pH lors de l'injection de l'hydroxyde de sodium. Ces amas peuvent se former lors du protocole de fonctionnalisation et dégradent la capacité de reconnaissance spécifique de la couche en bloquant l'accès aux sites de reconnaissance des anticorps correctement fixés à la surface. Ainsi, ce « nettoyage » permettrait d'expliquer l'amélioration de la reconnaissance spécifique lors de la deuxième injection de *Bacillus atrophaeus*.

Nous avons donc validé un protocole de régénération de la couche biologique sensible basé sur une brève injection d'hydroxyde de sodium NaOH 100 mM. Il faut néanmoins préciser que ce protocole de régénération ne peut fonctionner qu'à trois ou quatre reprises car l'exposition répétée à l'hydroxyde de sodium à ces concentrations détériorent le bon fonctionnement des anticorps.

IV.3. Détection spécifique d'agents pathogènes simulant la menace par une matrice de micromembranes à détection piézorésistive

IV.3.1. Contexte, objectifs et sélection des puces

L'optimisation du protocole de fonctionnalisation biochimique et du choix de la surface de travail dont nous venons d'achever la description a été conduite durant la phase de conception et de dimensionnement des micromembranes (dont la majorité des étapes est traitée au chapitre II). Ainsi, après avoir achevé la fabrication et le conditionnement des micromembranes à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive intégrés, puis assemblée et caractérisé le prototype de plateforme de détection d'agents biologiques simulant la menace, nous pouvons procéder aux tests finaux de biodétection grâce aux micromembranes.

Dans cette optique, nous avons procédé au repérage des puces possédant les caractéristiques minimales nécessaires à leur intégration au sein du prototype de plateforme de détection d'agents biologiques simulant la menace. Ces caractéristiques sont les suivantes :

- 1- La pastille piézoélectrique de la membrane de référence n'est pas court-circuitée
- 2- Il existe au moins une micromembrane de mesure dont la pastille piézoélectrique n'est pas court-circuitée et dont le spectre en fréquence présente un pic de résonance lors d'analyses spectrales menées grâce à un analyseur d'impédance Agilent 4294A (Agilent, Technologies, Santa Clara, CA, USA). On rappelle que ce type d'analyse de l'impédance de la couche piézoélectrique en vibration fait intervenir une détection du mouvement des membranes par effet piézoélectrique direct.
- 3- La piézorésistance de cette micromembrane possède une valeur statique stable et comprise entre 800 Ω et 9 k Ω .

- 4- La valeur de la piézorésistance de la membrane de mesure n'excède pas une différence de 20 % avec la valeur de la piézorésistance de la membrane de référence.

La dernière caractéristique représente la condition *sine qua non* de la compensation électronique de la partie statique du signal issu de la mesure différentielle de la tension aux bornes des piézorésistances.

Les tests destinés à attester de ces caractéristiques électriques ont été menés grâce à une station sous pointe Karl Suss PA200 (Suss MicroTec, Garching, Allemagne) permettant l'adressage des plots de contacts des micromembranes et la mesure des caractéristiques $I(V)$ des pastilles et des piézorésistances via un testeur Agilent 4142B. Nous avons sélectionné 30 puces parmi l'ensemble des puces fabriquées (336 puces), soit un taux de rejet de 91%. Sur l'ensemble des puces sélectionnées étaient réparties 28 micromembranes de référence et 43 micromembranes de mesure pleinement fonctionnelles.

Les puces sélectionnées au cours de ce premier protocole de tests électriques sont alors collées sur le support époxy FR4 puis connectées via la microsoudure de fils d'or qui sont ensuite enrobés afin de les isoler physiquement et électriquement du milieu réactionnel. Les composants de la tête électronique préliminaire sont alors assemblés au dos du support époxy. Enfin, chaque ensemble {micro-système-tête préliminaire de mesure} est inséré à la cellule fluidique remplie d'air dans un premier temps et la tête électronique préliminaire est connectée à la carte de traitement, elle-même reliée à l'interface informatique (Soit l'ensemble des étapes décrites au chapitre II).

Pour chaque microsystème dûment intégré à la plateforme de détection biologique, nous cherchons en premier lieu à attester sa capacité à suivre en temps réel et avec des bruits de mesure corrects l'évolution de la fréquence de résonance selon le mode (0,1) d'une ou plusieurs membranes en vibration au sein d'une chambre fluidique remplie d'eau distillée. Attester cette capacité revient à procéder à la validation des étapes suivantes, selon la méthodologie décrite au chapitre III :

- Validation de la détection piézorésistive de la résonance des membranes fonctionnelles dans l'air (désigné **VA1**)
- Validation de la détection piézorésistive de la résonance des membranes au sein de la chambre fluidique immergée d'eau déionisée. (désigné **VA2**)
- Validation du suivi en temps réel de la fréquence de résonance de la membrane vibrant au sein de la chambre fluidique immergée d'eau déionisée. Attestation d'un rapport signal sur bruit acceptable. Attestation d'une stabilité dans le temps du suivi. (désigné **VA3**).

Les puces « positives » à ces trois validations, quels que soient les réglages de polarisation et d'amplification requis, sont destinées à la réalisation des différentes expériences de détection des agents biologiques simulant la menace.

IV.3.2. Fonctionnalisation des micromembranes et protocole de biodétection d'agents simulant la menace

La première étape consiste à réaliser la fonctionnalisation biochimique des pastilles d'or recouvrant les micromembranes afin de greffer à la surface des micromembranes fonctionnelles une couche d'anticorps spécifique à l'espèce à détecter. Afin d'appliquer le protocole de fonctionnalisation d'une surface d'or aux cas des micromembranes, nous procédons de deux manières : d'abord par remplissage de la chambre de réaction de la cellule fluidique pour les étapes concernant l'ensemble des membranes de mesure fonctionnelles de la puce, puis par dépôt de gouttes de 70 μL avec une micropipette calibrée sur chacune des membranes de mesures fonctionnelles afin de greffer différents types d'anticorps sur les différentes pastilles d'or.

Tout au long de la réalisation de ce protocole de fonctionnalisation, nous effectuons à divers moments plusieurs tests afin de s'enquérir du fonctionnement normal de la puce, soit via l'interface informatique de la carte de commande, soit grâce à un multimètre connecté aux contacts électriques de la tête de mesure préliminaire (à l'arrière de la puce). La succession de ces tests intégrés à un bref rappel des étapes du protocole de fonctionnalisation est décrite ici :

Tests	Etapes du protocole biochimique de fonctionnalisation des micromembranes et de biodétection des antigènes simulant la menace
	<ul style="list-style-type: none"> → Immersion de la puce dans une solution éthylique d'acide mercapto-undecanoïque à 5 mM pendant 12 heures (1 nuit). Réalisé par remplissage de la chambre fluidique. → Séchage de la puce sous jet de N_2.
#1 (TA1) : A ce niveau du protocole, la mesure de la résistance électrique des pastilles de PZT et des piézorésistances de la puce est effectuée.	
	<ul style="list-style-type: none"> → La puce est placée de nouveau au sein de la cellule fluidique qui est immergée d'une solution tampon : HEPES 10 mM.
#2 (TA2) : A ce niveau, la résonance des membranes fonctionnelles est testée de nouveau et un test de suivi de la fréquence de résonance de chacune (de manière multiplexée si plusieurs membranes fonctionnelles) au sein de la solution est réalisé pendant 10 min.	
	<ul style="list-style-type: none"> → Immersion de la chambre fluidique par le mélange NHS/EDC pendant 30 min. → Dépôt sur la membrane de mesure concernée d'une goutte de 70 μL d'une solution d'immunoglobulines spécifiques à l'antigène étudié à la concentration 50 $\mu\text{g/mL}$, pendant 1h. → Immersion de la chambre fluidique par une solution d'éthanolamine à 1M, pendant 30 min. → Immersion de la chambre fluidique par une solution tampon de PBS 1X.
#3 (TA3): A ce niveau, la résonance des membranes fonctionnelles est testée ainsi que la capacité du système global de suivre en temps réel la fréquence de résonance.	
	<ul style="list-style-type: none"> → Observation des variations de la(des) fréquence(s) de résonance de la (des) membrane de mesure vibrant dans le PBS 1X. Attente de la stabilisation des différents signaux. → La chambre fluidique est immergée des différentes solutions d'antigènes destinées à être détectées et les variations de la fréquence de résonance de la (des) membranes de mesure sont enregistrées. → D'éventuels protocoles de régénération de la liaison anticorps/antigènes sont appliqués.
#4 (TA4) : En fin d'expérience, la résonance des membranes fonctionnelles est testée ainsi que la capacité	

du système global de suivre en temps réel la fréquence de résonance.

- La chambre fluide est remplie de PBS 1X et mise au frigo pour la nuit afin de conserver fonctionnels les anticorps greffés à la surface des membranes.

#5 (TA5) : Le lendemain matin, la résonance des membranes fonctionnelles est testée ainsi que la capacité du système global de suivre en temps réel la fréquence de résonance.

Table 4.9 : Détail des étapes du protocole de fonctionnalisation des micromembranes et de détection des agents biologiques simulant la menace ainsi que descriptifs des tests de suivi destinés à vérifier l'intégrité de la capacité de la plateforme à suivre la fréquence de résonance en temps réel des micromembranes en oscillation dans le fluide

IV.3.3. Résultats et discussion

En préambule de la présentation des résultats obtenus pour les expériences de détection d'agents biologiques simulant la menace, il est très important d'informer le lecteur du nombre d'expériences effectivement menées jusqu'à leur terme et donc susceptibles d'être interprétables. En effet parmi les 43 micromembranes de mesure sélectionnées (réparties sur 30 puces) seules trois expériences de détection d'agents biologiques simulant la menace ont pu être effectivement menées à leur terme en faisant intervenir 5 micromembranes de mesure et 2 micromembranes de référence. Tout au long du protocole de fonctionnalisation et de détection des antigènes, différents scénarii de mises hors-service sont intervenus pour les 35 micromembranes de mesure restantes. Ces mises hors fonction sont observées lors des différents tests de contrôle conduits avant et pendant le protocole de fonctionnalisation et de détection. Nous avons pu identifier 6 scénarii de mises hors fonction des micromembranes (i.e. soit de la capacité d'actionnement soit de la capacité de détection) faisant intervenir différents phénomènes physiques et chimiques dont nous avons pu attester l'influence néfaste sur les microsystèmes étudiés. Pour chaque scénario, nous exposons les effets et émettons des hypothèses (dont certaines ont pu être confirmées lors de tests supplémentaires) sur la nature de la cause du dysfonctionnement. Nous précisons également le nombre de puces et de membranes ayant été effectivement mises hors fonction suivant le scénario décrit. Enfin et lorsque c'est possible, nous proposons des solutions à court, moyen ou long terme. Certaines ont été d'ailleurs mises en place au cours de cette session de tests sur les puces sélectionnées.

1- *Premier scénario : Piézorésistances non libérés* (Hors-fonction décelée lors de VA1)

Pour certaines micromembranes, si une résonance est avérée lors des tests à l'analyseur d'impédance (détection piézoélectrique) mais qu'elle ne peut être avérée par la détection piézorésistive alors même que les caractéristiques de résistances des pastilles de PZT ainsi que les valeurs des piézorésistances sont correctes, l'impossibilité de détection piézorésistive de la résonance est liée au fait que la piézorésistance ne fait pas partie de la partie de substrat libérée en tant que structure vibrante. Cela se traduit par une insensibilité de la piézorésistance à toute sollicitation mécanique de la membrane. 4 membranes de mesure sont concernées, réparties sur 4 puces.

2- *Second scénario : Surgravure de la structure de la membrane résonante* (Hors-fonction décelée lors de VA2 ou VA3)

Pour certaines micromembranes, comme noté à la section II.2.4 du chapitre II, le rayon de la membrane défini par l'étape de libération par gravure plasma profonde (DRIE) est supérieur au rayon

nominal prévu lors de la phase de design. Il résulte de ceci que la piézorésistance, bien que faisant partie de la structure vibrante, se situe en dehors des zones où les contraintes générées par le mouvement sont les plus grandes (l'encastrement). Les conséquences de cette surgravure sont un pic de résonance, très faible dans l'air, difficilement observable dans l'eau déionisée et une impossibilité (totale ou partielle : grande instabilité) du système global à réaliser le suivi de la fréquence de résonance dans un liquide. 6 micromembranes de mesure sont concernées, réparties sur 5 puces.

3- *Troisième scénario* : **Instabilité de la piézorésistance** (Hors-fonction décelée lors de VA3, TA2 ou TA4)

Lors des tests de suivi en temps réel de la fréquence de résonance dans l'eau déionisée ou dans une solution d'HEPES, il a été observé sur certaines puces au bout d'un temps pouvant aller de 5min à 30 min, un phénomène de « fatigue de la piézorésistance ». Le suivi de la valeur de la piézorésistance révèle une instabilité croissante jusqu'à rendre impossible tout processus de compensation de l'écart entre la piézorésistance de mesure et la piézorésistance de référence. Ceci rend impossible le suivi en temps réel de la fréquence de résonance. Si la fatigue intervient sur la piézorésistance de référence, l'ensemble des membranes de mesure fonctionnelles seront mises hors fonction de fait. Les effets sont irréversibles pour les puces affectées. 7 puces sont concernées empêchant l'utilisation de 9 micromembranes de mesure.

4- *Quatrième scénario* : **Résistance de l'enrobage aux produits biologiques du protocole de fonctionnalisation** (Hors-fonction décelée lors de TA3)

Les premières puces sélectionnées qui ont été assemblées avec un matériau d'enrobage en silicone, se sont révélées incapables de passer l'étape TA3. Ceci est dû à l'attaque de ce matériau d'enrobage par les produits biologiques liés à la fonctionnalisation des surfaces d'or des membranes. Les produits biochimiques incriminés sont : le mélange NHS/EDC et la solution d'éthanolamine. Cette attaque a pour conséquence l'apparition de circuits ouverts aux bornes des piézorésistances et des pastilles de PZT. La solution du choix d'un matériau compatible avec les solutions biologiques en jeu lors du protocole de fonctionnalisation a été appliquée ; ainsi les puces assemblées avec le matériau d'enrobage Epotek H70-E2 ne subissent pas cette défaillance. Par contre, pour les puces ayant vu leur enrobage en silicone se détériorer, il n'est pas possible techniquement de réaliser un nouvel enrobage avec un nouveau matériau. Ainsi, 2 puces sont concernées pour un total de 5 micromembranes mises hors-fonction.

5- *Cinquième scénario* : **Contraction du matériau d'enrobage et perte de connexion électrique lors du stockage des puces à +4°C** (Hors-fonction décelée à lors de TA1)

Lors des premières applications du protocole de fonctionnalisation, la génération de la monocouche d'acide mercapto-undécanoïque nécessitait le stockage de la puce à +4°C pendant une nuit. Cette étape était requise afin de limiter par un séjour en température plus basse l'évaporation de la solution éthylique d'acide mercapto-undécanoïque déposée sur les membranes pendant une nuit.

Une évaporation de la goutte d'acide mercapto-undécanoïque pendant la nuit aurait mis en péril l'auto-organisation de la monocouche. Après estimation de la contraction du matériau d'enrobage sous l'effet du changement de température induit par le stockage à +4°C, celle-ci s'est révélée suffisante pour contraindre les fils inclus dans la matrice du matériau jusqu'à arrachement pour certains d'entre eux. Afin de palier ce problème, une solution de limitation de l'évaporation par remplissage de la chambre fluide est retenue. Pour la mise en place de cette alternative, deux seringues remplies de solution d'acide mercapto-undécanoïque sont placées à l'extrémité du tube d'amené du fluide et du tube d'évacuation tous deux remplis de cette même solution, ceci ayant pour but d'empêcher la formation d'un quelconque front d'évaporation. 2 puces sont concernées pour un total de 3 micromembranes de mesure mises hors-fonction.

6- Sixième scénario : Défaillance de l'intégrité de l'oxyde de passivation induisant le court-circuit de la pastille de PZT de la membrane de mesure en présence de PBS 1X (Hors fonction décelée lors de VA3, TA2 ou TA5)

La capacité des membranes à séjourner toute une nuit dans le milieu tampon PBS 1X a été dès le début mise en doute. En effet, afin de conserver d'une journée à l'autre les anticorps déposés à la surface des pastilles d'or des membranes, la puce insérée dans sa cellule fluide était stockée, baignant dans le PBS, durant la nuit. Lors de leur utilisation pour la réalisation du protocole de détection, les puces ainsi conservées se révélaient hors d'état de fonctionnement du point de vue de l'actionnement piézoélectrique. Après avoir mené plusieurs vérifications sur des structures tests dans les mêmes conditions puis une deuxième fois dans la cellule fluide remplie d'eau déionisée, il nous a été possible de conclure quant à la présence d'un phénomène d'oxydoréduction entre les métaux composant la pastille d'actionnement piézoélectrique des membranes et l'inox non anodisé constitutif de la cellule fluide¹. Cet effet dit « *de pile* » est rendu possible par la conjonction de plusieurs éléments : tout d'abord la présence de chlorures divers dans le PBS 1X (*NaCl* et *KCl*) permet d'envisager la corrosion de métaux usuellement non oxydables tels que l'or ou le platine. La connexion électrochimique se fait à travers le bain de solution. La mise au même potentiel flottant se fait par contact entre les pistes du PCB, support du capteur, et l'inox de la cellule fluide. Enfin, le facteur clé réside dans la porosité relative de l'oxyde de silicium constituant la couche de passivation des membranes. Cet oxyde, étant donné sa technique de déposition par PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition), possède des capacités isolantes inférieures à celles d'un oxyde généré par croissance thermique. Ces capacités se sont révélées dans notre cas peu homogènes sur l'ensemble des plaques de silicium utilisées pour la fabrication et peu homogènes sur la surface d'une même plaque. Ainsi sur certaines puces il est hautement probable que l'oxyde de silicium ne remplisse pas son rôle de passivant en quelques zones restreintes mais suffisantes pour connecter électrochimiquement les matériaux placés dans le bain de solution (Or de la pastille de fonctionnalisation) et les matériaux censés être isolés électriquement par cet oxyde. Pour conclure l'analyse, ce processus dit « effet de pile » expose le matériau piézoélectrique sensible à des variations de potentiels à ses bornes, responsables de la dégradation de sa conformation optimale nécessaire à la manifestation de phénomènes piézoélectriques, dégradation pouvant aller jusqu'au court-circuit de la pastille. Précisons que ce phénomène peut produire ces effets sur les pastilles de PZT pour des temps supérieurs à la demi-heure et le plus souvent durant une nuit de stockage en présence de PBS 1X.

¹ Scénario confirmé par expertise en électrochimie de la part de Pascal Mailley du service SPrAM (Structures et Propriétés d'Architectures Moléculaires) de l'INAC (Institut Nanosciences et Cryogénie) au sein du CEA.

Face à ce problème, l'unique solution envisagée a été de procéder aux expériences de détection consécutivement à la fin du procédé de fonctionnalisation des pastilles d'or des membranes. L'ensemble du processus devant se dérouler sur une seule journée, la fonctionnalisation des pastilles d'or est achevée, ainsi que l'injection de plusieurs concentrations en antigène croissantes ; enfin, des tentatives de régénération de la couche d'anticorps sont menées avec une solution de soude de concentration 130 mM et une solution d'antigène est déposée à nouveau sur le capteur afin de valider la régénération effectuée. Une fois ce protocole suivi, les puces sont rincées et séchées et devront subir une opération de nettoyage de la couche d'or via le dépôt d'une goutte de solution dite « piranha » (H_2O_2 50% + H_2SO_4 30% à 1 volume pour 1 volume) afin d'être éventuellement utilisées une seconde fois.

Enfin, dans le cas de certaines pastilles piézoélectriques qui montraient la plus grande efficacité d'actionnement pour un signal sinusoïdal centré autour d'une tension *d'offset* de -2V à -4V, la détérioration des pastilles due à l'effet « de pile » décrit ici est amplifiée. En effet, en présence de liquide, la coexistence de cinq électrodes à un potentiel stable non nul et conséquent sollicite électriquement les capacités d'isolation de l'oxyde de silicium de passivation des structures. Or cet oxyde présente par endroits des lacunes résistives qui, sous l'influence de la tension d'offset, se transforment en connexions électriques entre l'électrode supérieure et le milieu réactionnel induisant la cessation du fonctionnement normal de la plate-forme de détection bien avant la fin du protocole (lors des tests VA3 et TA2).

Pour les dispositifs concernés par ce problème, les effets négatifs sont malheureusement irréversibles. La solution efficace reviendrait à envisager un autre matériau isolant pour la couche de passivation. En effet, la solution directe qui reviendrait à utiliser le même matériau mais déposé par d'autres méthodes (en l'occurrence par croissance thermique) est inenvisageable pour les raisons exposées à la section II.2.2 (chapitre II). Pour la poursuite des tests de validation de la plateforme de détection biologique, il serait donc nécessaire de tester dans l'eau la résistance de l'oxyde supérieur par différentes sollicitations électriques. Ce procédé reste cependant aléatoire, l'oxyde supérieur restant isolant jusqu'à qu'il soit ouvert et une fois ouvert la puce entière est inutilisable.

Au total, 16 micromembranes de mesure réparties sur 10 puces ont été mises hors fonction selon le scénario décrit.

Nous pouvons alors aborder l'interprétation des résultats obtenus pour les trois expériences de détection des agents biologiques simulant la menace pour les 5 membranes (réparties sur 3 puces). Afin d'analyser les résultats présentés il faut préciser que pour toutes les expériences aucune technologie de thermalisation n'a été appliquée à la puce dans la cellule fluide. Ainsi le milieu réactionnel sera chauffé uniquement par la puissance électrique dissipée par l'électronique de la tête de mesure. Les mesures de température du milieu réactionnel arrivées à l'équilibre thermique donnent des températures quasi-constantes autour de 29°C.

Expérience A :

Une première expérience de détection biologique a été menée à son terme sur une puce comportant une membrane unique fonctionnelle (d'un rayon de 430 μm). Le suivi en fréquence du greffage des anticorps a été effectué mais n'a pas fourni de courbes exploitables. Une fois le processus

de fonctionnalisation réalisé, trois solutions de *Bacillus atrophaeus* de concentrations croissantes (10^7 spores/mL, 10^8 spores/mL et $0,33 \cdot 10^9$ spores/mL) sont injectées successives au sein de la cellule fluide. Le suivi des variations de la fréquence de résonance n'a pas permis de révéler de signaux spécifiques de détection biologique. Cependant, sachant que le protocole biologique de fonctionnalisation et de détection a très probablement permis la formation de complexe antigènes/anticorps à la surface (cf. section IV.2.1), un protocole de régénération de la couche d'anticorps a été tout de même mis en place grâce à une solution de NaOH à 130 mM pendant 10 min. Suite à cette régénération, un volume de solution de *Bacillus atrophaeus* à 10^8 spores/mL est redéposé. Les courbes résultant du suivi de la fréquence de résonance pour un volume de PBS 1X (courbe verte) puis pour un volume de *Bacillus atrophaeus* à 10^8 spores/mL (courbe violette) déposé sur la membrane sont illustrées à la figure 4.13.

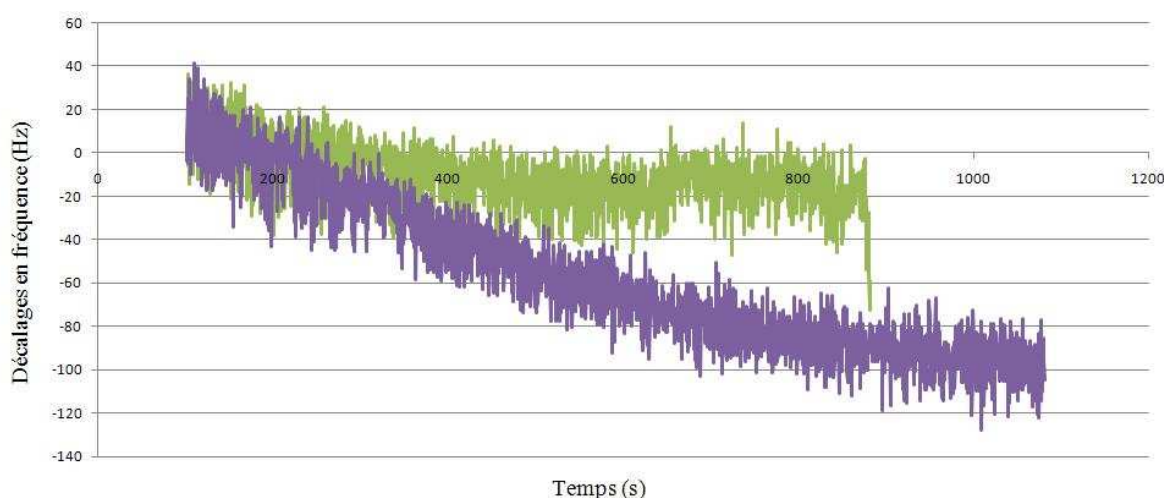


Figure 4.13: Courbe de suivi de la fréquence de résonance d'une micromembrane de 420 µm de rayon, vibrant selon le mode (0,1) et fonctionnalisée avec des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus*. La courbe verte représente l'évolution de la fréquence de résonance pour la solution de PBS 1X et la courbe violette pour la solution de *Bacillus atrophaeus*.

Les solutions de PBS 1X et de *Bacillus atrophaeus* 10^8 spores/mL ont été injectées dans les mêmes conditions de température. Ainsi, il est possible de concevoir que, pour les deux injections, la fréquence de résonance retranscrira la même évolution thermique. Il est intéressant alors de noter l'évolution identique des deux courbes pendant les 200 premières secondes bien que représentant des réactions à deux instants différents. Autour de 400 secondes, on constate que la fréquence de résonance s'est stabilisée dans le cas de la goutte de PBS 1X, mais continue de décroître pour la solution de *Bacillus atrophaeus* alors qu'il s'agit de la même membrane (donc la stabilisation thermique doit être la même). Ainsi nous émettons l'hypothèse que nous avons pu observer la détection du *Bacillus atrophaeus* avec impossibilité de déterminer si cette détection est spécifique ou non.

Expérience B :

Dans cette expérience, une membrane de 440 µm a été fonctionnalisée avec des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus* et le suivi de la fréquence de résonance de cette membrane a été effectué pour

l'injection d'une solution de *Bacillus atrophaeus* de concentration 10^8 spores/mL puis $0,33 \cdot 10^9$ spores/mL. Là encore, l'absence d'une membrane témoin fonctionnalisée avec d'autres anticorps nous empêchera de conclure quant à la spécificité d'une éventuelle réaction détectée. La figure suivante présente les variations de fréquences observées pendant le dépôt des diverses solutions de *Bacillus atrophaeus*.

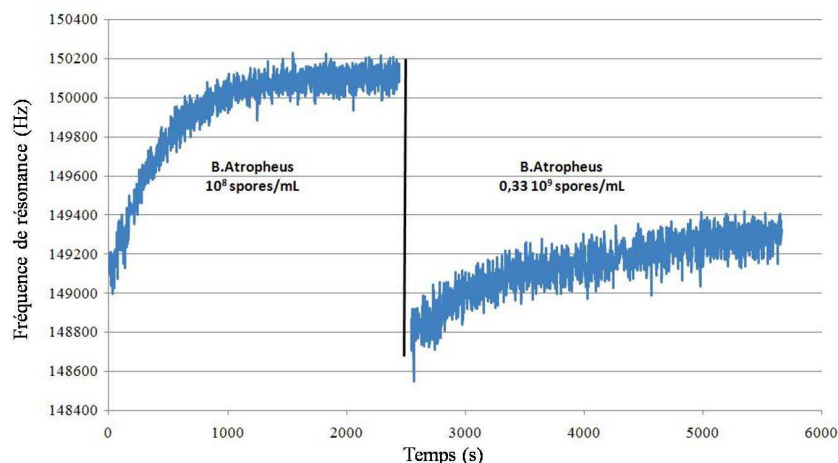


Figure 4.13 : Courbes de suivi en temps réel de la fréquence de résonance d'une micromembrane de 440 µm de rayon vibrant selon le mode (0,1) et fonctionnalisée avec des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus*. Les deux signaux correspondent à l'injection, juste après la fonctionnalisation, de deux solutions de *Bacillus atrophaeus* concentrées à 10^8 spores/mL puis à $0,33 \cdot 10^9$ spores/mL

Comme cela a été précisé plus haut, les dynamiques observées sont liées à la thermalisation de la solution déposée. Dans le cas de l'expérience les conditions en température étaient telles que la différence entre la température à l'équilibre du milieu réactionnel et la température des solutions stockées ont provoquées des fortes dynamiques de retour à l'équilibre. Malgré cela, on remarque toujours que le niveau final de stabilisation de la fréquence de résonance pour la solution concentrée à $0,33 \cdot 10^9$ spores/mL est plus bas que le niveau final de stabilisation pour la solution concentrée à 10^8 spores/mL. Cela reste cependant une simple observation n'ayant aucune valeur démonstrative en elle-même.

Si l'on applique à cette micromembrane un protocole de régénération basé sur l'injection d'une solution d'hydroxyde de sodium à 130 mM, et que l'on recommence l'injection consécutive de deux solutions de *Bacillus atrophaeus* concentré à 10^8 spores/mL puis à $0,33 \cdot 10^9$ spores/mL, on observe les variations de la fréquence de résonance suivantes pour la micromembrane vibrante selon le mode (0,1).

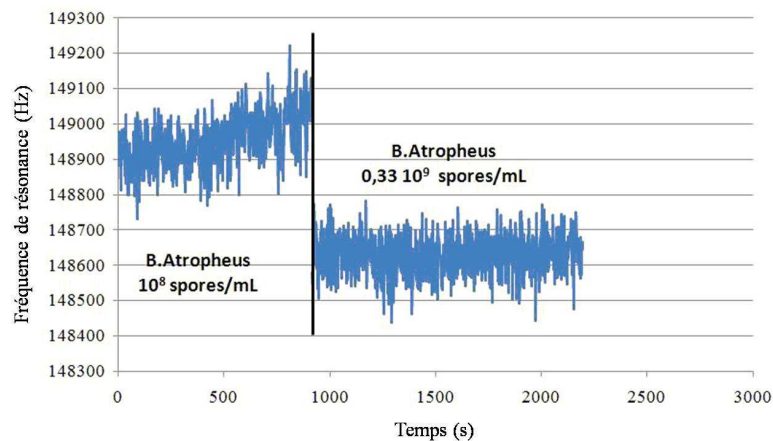


Figure 4.14 : Courbes de suivi en temps réel de la fréquence de résonance d'une micromembrane de 440 μm de rayon vibrant selon le mode (0,1) et fonctionnalisé avec des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus*. Les deux signaux correspondent à l'injection, après application d'un protocole de régénération, de deux solutions de *Bacillus atrophaeus* concentrées à 10^8 spores/mL puis à $0,33 \cdot 10^9$ spores/mL

Là encore, après traitement à l'hydroxyde de sodium, nous observons que le niveau de stabilisation atteint pour la solution concentrée à $0,33 \cdot 10^9$ spores/mL est inférieur au niveau de stabilisation atteint pour la solution concentrée à 10^8 spores/mL que pour la concentration $0,33 \cdot 10^9$ spores/mL. L'observation faite plus haut semble donc ici être confirmée.

Expérience C :

Dans cette expérience, nous présentons une tentative de détection de *Bacillus atrophaeus* par deux membranes de 430 μm et 440 μm de rayon. L'une des membranes est fonctionnalisée avec des anticorps anti-ovalbumine et la seconde avec des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus*. Nous présentons le suivi de la fréquence de résonance des deux membranes lorsqu'on dépose un faible volume de solution de *Bacillus atrophaeus* à 10^8 spores/mL. Dans le déroulement de cette expérience, les solutions à déposer sur le capteur sont pré-stockées dans un premier temps dans une cuve en aluminium recouvrant la cellule fluide, ceci afin que la solution à déposer se mette à la température d'équilibre du milieu réactionnel (déterminée par la puissance électrique dissipée par la tête de mesure au niveau du microsysteme). Ainsi, nous évitons l'observation de phénomènes de dérive thermique de la fréquence de résonance.

Il faut préciser que le suivi des fréquences de résonance n'a pas été possible tel qu'effectué par l'électronique de détection et l'interface informatique. En effet, à cause de la faiblesse du pic de résonance de la membrane 430 μm (fonctionnalisée avec les anticorps anti-ovalbumine) il est impossible de réaliser ce suivi. Nous avons opté alors pour un suivi de la fréquence de résonance « manuel », c'est-à-dire que, pour chaque fréquence relevée, nous avons réalisé un balayage en fréquence sur une certaine plage et nous avons relevé le maxima du pic de résonance. Or, la faiblesse du facteur de qualité et de l'amplitude du pic de résonance de la membrane de 430 μm est telle qu'il s'est avéré très difficile de relever le maximum de ce pic avec précision. Il résulte de cela un signal

très bruité pour cette membrane censé réaliser le témoin non-spécifique de la détection de *Bacillus atrophaeus*.

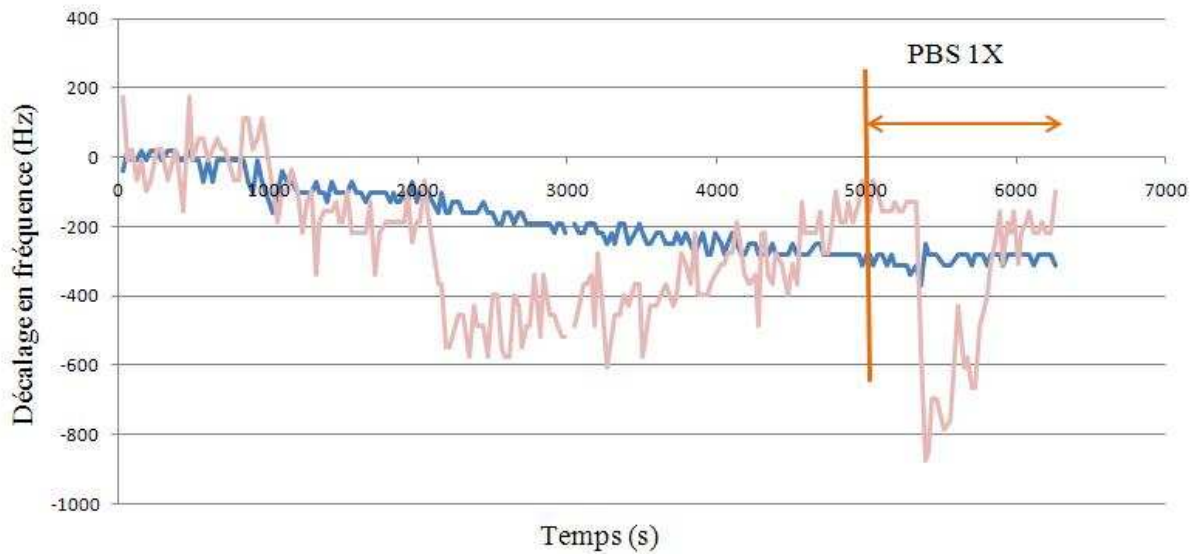


Figure 4.15: Courbes des variations de fréquences de résonance de deux membranes (430 μm et 440 μm de rayon) en présence d'un volume de solution de *Bacillus atrophaeus*. La courbe rose représente le suivi de la membrane de 430 μm fonctionnalisée avec des anticorps anti-CpGV et la courbe bleue représente celui de la membrane de 440 μm fonctionnalisée avec des anticorps anti-*Bacillus atrophaeus*.

A l'observation des évolutions de la fréquence de résonance, on constate que la courbe bleue suit une dynamique de greffage effective, dynamique qui se stabilise vers 4500 secondes. Enfin, après 5000 secondes, le signal est complètement stable en présence de PBS 1X. Cependant, nous ne pouvons conclure quant à un greffage spécifique compte tenu de l'imprécision des informations fournies par le témoin négatif.

IV.3.4. Conclusion

En raison de plusieurs défaillances techniques liées à différentes composantes des puces, nombres d'entre elles ont été mise hors-service de manière irréversible. En dépit de cet état de fait, nous avons procédé à l'analyse des différents scénarii de mises hors-fonction des micromembranes, à la description des phénomènes physico-chimiques en jeu lors de ces mises hors-fonction et à la prévision de solutions futures permettant de ne pas reproduire ces anomalies. Enfin, nous avons pu mener à leur terme trois expériences de détection spécifique d'agents biologiques simulant la menace grâce au prototype de plateforme de détection pour la reconnaissance spécifique de *Bacillus atrophaeus*. Les informations qu'il a été possible d'extraire lors de ces trois expériences sont trop peu nombreuses pour pouvoir conclure quant à la reproductibilité et la stricte spécificité du processus de reconnaissance biologique des agents simulant la menace par une plateforme de détection basé sur des micromembranes résonantes à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive intégrés et vibrant selon le mode (0,1) de vibration. Néanmoins, nous achevons cette étude en présentant des preuves cohérentes de la validation du potentiel de notre microsysteme en tant qu'élément central d'une plate-forme de détection biologique pouvant opérer plusieurs types de détection (i.e. plusieurs suivis en fréquence multiplexés pour plusieurs membranes fonctionnalisées avec des anticorps

différents) selon les différentes membranes ou bien encore grâce à la régénération de la couche biologique sensible.

Références :

- [1] T.P. Burg, M. Godin, S.M. Knudsen, W. Shen, G. Carlson, J.S. Foster, K. Babcock et S.R. Manalis, *Nature*, vol. 446 (**2007**), 1066-1069.
- [2] F. Rossetti, M. Textor, N.D. Spencer, “ETH - SURFACE - Quartz Crystal Microbalance Technique (QCM) with Dissipation Monitoring Changes of both Adsorbed Mass and of Viscoelastic Properties of Adlayer.”,
www.surface.mat.ethz.ch/research/biointerfaces/instrumental_developments/quartz_crystal/
- [3] L.M. Bonanno et L.A. DeLouise, *Langmuir*, vol. 23 (**2007**), 5817-5823.
- [4] V.H. Perez-Luna, M.J. O'Brien, K.A. Opperman, P.D. Hampton, G.P. López, L.A. Klumb et P.S. Stayton, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 121 (**1999**), 6469–6478.
- [5] N. Huang, J. Vörös, S.M. De Paul, M. Textor et N.D. Spencer, *Langmuir*, vol. 18 (**2002**), 220-230.
- [6] G.A. Campbell et R. Mutharasan, *Analytical Chemistry*, vol. 79 (**2007**), 1145-1152.
- [7] T. Alava, N. Berthet-Duroire, C. Ayela, E. Trévisiol, M. Pugnère, Y. Morel, P. Rameil et L. Nicu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 138 (**2009**), 532-538.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES :

Les avantages des BioMEMS au sein des biocapteurs en termes de sensibilité, de spécificité, de temps de réponse et de faible coût permettent d'envisager une solution de détection d'agent de guerre biologique de type « détecter-pour-protéger » aux performances intéressantes. La très bonne combinaison des BioMEMS résonants avec les anticorps permet d'envisager un multiplexage poussé pour la détection simultanée de plusieurs agents de guerre biologiques. De part leur principe de fonctionnement, les BioMEMS résonants permettent d'accéder à des informations quantitatives sur la masse des espèces greffées à leur surface.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons analysé en détail le potentiel de micromembranes résonantes à actionnement piézoélectrique et détection piézorésistive intégrés pour des applications de détection d'agents biologiques simulant la menace.

Dans un premier temps, nous avons tracé le contexte de la détection d'agent de guerre biologique et ses exigences pour un cadre applicatif de type « détecter-pour-protéger ». Parallèlement, nous avons montré que, parmi les technologies employées pour les biocapteurs, nombreuses pouvaient être adaptées à la détection d'agents de guerre biologique dans ces conditions. Plus précisément, parmi l'ensemble des biocapteurs disponibles, les BioMEMS résonants de type micromembranes vibrantes ont révélé d'excellentes promesses en terme de sensibilité, de robustesse de la structure et de capacité à osciller en présence de liquide.

Une fois exposées les promesses de ces structures, nous avons procédé au dimensionnement des micromembranes en recherchant une augmentation de la sensibilité via l'utilisation de membranes plus larges mais vibrant selon des modes de vibration supérieurs. Cette approche, en rupture avec la philosophie classique d'augmentation de la sensibilité des micromembranes par réduction de leur taille, a été étudiée et optimisée. Les modes de vibration (0,1) et (0,2) ont été identifiés comme mode de fonctionnement optimum. La forme de la jauge piézorésistive devant assurer la détection du mouvement a été optimisée grâce aux résultats de simulation harmonique à éléments finis. D'autres simulations par éléments finis ont permis d'estimer les fréquences de résonance attendues des micromembranes en prenant en compte les contraintes internes des différentes couches.

La fabrication des micromembranes par puce comportant 4 membranes de mesure et une mesure de référence a été détaillée. La réalisation du processus complet de microfabrication a nécessité d'optimiser certaines étapes, notamment le protocole de gravure face arrière du silicium du substrat afin d'éviter la présence de phénomènes trop importants de sur-gravure du rayon des membranes. Puis, la conception et la fabrication d'une électronique de mesure permettant l'élimination des bruits parasites de mode commun par opération d'une mesure différentielle entre le signal issu de la piézorésistance de mesure et de la piézorésistance de référence puis réalisant un filtrage et une amplification dédiée ont été exposées. Nous avons également détaillé l'implémentation au sein de la carte électronique d'un circuit permettant l'utilisation d'une boucle de rétroaction positive conçue pour augmenter le signal d'actionnement au moment précis de la résonance ce qui doit augmenter le facteur de qualité de la résonance de la membrane.

Suite à la fabrication, le conditionnement des puces, les divers éléments constituant un prototype de plateforme de détection d'agents biologiques simulant la menace ont été assemblés et plusieurs étapes de validation et de caractérisation du microsystème seul et de la plateforme ont été réalisées. Tout d'abord, les mesures des fréquences de résonance et l'identification des modes de résonance ont été réalisées lors d'une étude en vibrométrie conduite grâce à un interféromètre optique. Les formes de modes relevées par ordre d'apparition correspondaient bien à l'ordre obtenu par simulation mais les fréquences de résonance expérimentales mesurées étaient inférieures aux valeurs déterminées numériquement. L'hypothèse émise a été une mésestimation des contraintes internes des matériaux. A l'avenir, afin de contrer les effets de cette imprécision dans le choix des paramètres de contraintes des matériaux nous suggérons de réaliser pour chaque matériau, à plusieurs endroits de la plaquette de silicium, des structures tests permettant l'évaluation des contraintes internes telles qu'effectives sur la plaquette. Par exemple, la mesure de la déformation de leviers en silicium recouvert d'une couche précontrainte peut être un moyen d'y parvenir. Plus généralement, il serait capital de disposer d'un modèle analytique prenant en compte les précontraintes internes des différentes couches et leur influence sur le comportement statique et dynamique des membranes.

Ensuite la validation de la détection piézorésistive de la résonance des membranes selon les modes (0,0), (0,1), (0,2) a été réalisée pour une vibration dans l'air. Les fréquences relevées expérimentalement par cette méthode correspondent aux fréquences mesurées par interférométrie optique. La détection piézorésistive de la résonance des membranes vibrant selon le mode (0,1) au sein d'un fluide visqueux a été établie. Les facteurs de qualités relevés pour la résonance des micromembranes vibrant selon le mode (0,1) sont de l'ordre de 40, pour un fonctionnement en boucle ouverte. Nous avons alors effectué la validation du fonctionnement de la boucle fermée et de son rôle d'augmentation du facteur de qualité. Des améliorations de facteur de qualité jusqu'à 11 fois celui de la vibration en boucle ouverte ont été relevées. Les facteurs de qualité résultant ont été relevés pour des valeurs autour de 400. De tels niveaux de facteur de qualité pour une microstructure vibrant dans le fluide sont observés pour la première fois dans le cadre de biocapteurs opérant le suivi de réaction biologique en temps réel dans le fluide.

Le relevé des fréquences de résonance expérimentales pour une vibration des membranes selon le mode (0,1) dans l'air a permis, grâce au modèle de Lamb étendu aux modes de vibration supérieurs, d'estimer les fréquences de résonance selon le mode (0,1) dans le liquide. La comparaison de ces valeurs avec les valeurs expérimentales a montré un bon accord permettant de valider ce modèle de Lamb « étendu » pour le mode (0,1). Cette étape a également permis d'estimer une sensibilité moyenne pour nos membranes vibrant dans le liquide de 0,2 pg/Hz ainsi qu'une masse minimum détectable de 33 pg. Ces valeurs sont globalement meilleures d'un ordre de grandeur des valeurs rencontrées dans l'état de l'art pour des structures similaires (BioMEMS résonants).

L'étape suivante a consisté à valider le suivi en temps réel et multiplexé des fréquences de résonance des micromembranes vibrant au sein d'un fluide. Le suivi des fréquences de résonance a été validé indépendamment de l'utilisation de la boucle de rétroaction positive. Cependant, lorsque celle-ci est employée pour augmenter le facteur de qualité de la résonance dans le liquide, les niveaux de bruits en comparaison aux signaux utiles sont en bonne compétition avec l'état de l'art pour les résonateurs destinés à des applications biologiques.

Afin de procéder aux tests de détection d'agents simulant la menace, nous avons procédé à des études grâce à la microbalance à quartz avec suivi de la dissipation sur deux types de protocole de fonctionnalisation pour des surfaces d'or et de dioxyde de silicium. Une fois les deux protocoles

optimisés, les performances en termes de quantité de greffage spécifique et non spécifique et de concentrations seuils de la détection des antigènes dilués dans du tampon biologique ont été comparées et le choix a été fait de retenir le protocole de greffage des anticorps spécifiques sur surface d'or via l'activation des molécules d'une monocouche auto-assemblée de molécule « thiols ». Toujours grâce à la microbalance à quartz et afin de s'approcher au plus près des conditions de détection d'agents de guerre biologique sur le terrain, la capacité de ce protocole de fonctionnalisation à permettre la reconnaissance spécifique des antigènes lorsque dilués dans une solution de « bruit de fond » biologique a été validée.

Nous avons pu constater le potentiel de la microbalance à quartz comme outil de validation de protocole biochimique de fonctionnalisation. Afin d'aller plus loin dans l'optimisation des protocoles de fonctionnalisation des micromembranes, il conviendrait de comparer plusieurs types de protocole de passivation de la surface de dioxyde de silicium afin que l'immobilisation d'antigènes de manière non-spécifique sur le dioxyde de silicium soit minimale. Il conviendrait aussi d'étudier la coexistence des divers protocoles de fonctionnalisation, de régénération et de passivation grâce à des tests croisés à la microbalance à quartz. De premières expériences ont été menées afin d'étudier le pouvoir de passivation des PLL-g-PEG dextran et les premiers résultats tendent à valider une compatibilité de ce protocole avec celui permettant la réalisation de la fonctionnalisation des pastilles d'or.

Enfin, les tests finaux de détection d'agents simulant la menace ont pu être mis en place grâce au prototype de la plateforme de détection. Compte tenu des rendements de fabrication, peu de puces ont pu être sélectionnées pour intégration au sein de la plateforme de détection. Or, parmi ces puces, de nombreuses mises hors-fonction ont été observées selon divers scénarios. Si pour certaines défaillances observées, il a été possible de mettre en place des solutions alternatives, d'autres ont engendrées des modifications irréversibles des caractéristiques électriques des pastilles piézoélectriques. C'est notamment le cas de l'effet « pile » causé, en la présence de tampons biologiques chargés en sels par la fermeture d'un circuit électrochimique au travers de zones d'isolation électrique défaillant de l'oxyde de passivation.

Plusieurs solutions sont envisageables dans le futur afin de ne plus rencontrer ce problème. Si le changement du matériau constituant la couche de passivation peut en être une, le changement de face active des micromembranes peut en être une autre. En effet, en procédant à une fonctionnalisation de la face arrière des micromembranes, nous imposerions une séparation totale entre le milieu de réaction biologique et les structures piézoélectriques destinées à l'actionnement. Plus généralement, et même si la considération de l'application de nos micromembranes a été constante durant les travaux conduits, nous pouvons préconiser une approche plus intégrative des différentes facettes de ce projet hautement pluridisciplinaire. En effet, la pluridisciplinarité inhérente aux applications de BioMEMS ne peut se résumer à l'assemblage final de plusieurs pièces optimisées séparément. La confrontation des techniques de microfabrication et d'électronique aux étapes biologiques révèle souvent une sous-estimation de la complexité du monde des réactions biologiques qui entraînent souvent des problèmes inattendus. Gageons que ceux-ci auraient pu potentiellement être anticipés par une prise en compte dès le début de la conception des BioMEMS de la spécificité du travail avec des solutions biologiques complexes.

Toutefois, nous avons pu mener à bien trois expériences de détection d'agents simulant la menace grâce au prototype de plateforme de détection. Des protocoles de régénération ont pu être menés par deux fois. Les résultats obtenus n'attestent pas d'une biodétection de haute sensibilité et

hautement reproductible mais ils fournissent des preuves permettant de valider la plateforme comme système d'études biologiques miniaturisé et multiplexé.

Glossaire des abréviations utilisées.

Abréviations en langue française :

ADN	Acide Desoxyribo-Nucléique
AGB	Agent de Guerre Biologique
APTES	3-aminopropyltriethoxysilane
ARN	Acide Ribo-Nucléique
Bdf	Bruit de fond biologique
CABT	Convention sur l'interdiction des Armes Biologiques et Toxicologiques
CDNBC	Centre de Défense Nucléaire Biologique et Chimique
CEB	Centre d'Etudes du Bouchet
CpGV	virus Cydia pomonella Granulosis
DGA/MRIS	Délégation Générale de l'Armement / Mission pour la Recherche et l'Innovation Scientifique
EABPT	Ensemble Provisoire d'Alerte Biologique de Théâtre
EDC	N-Ethyl-N'-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimide
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IgG	Immunoglobulines G
NHS	N-HydroxySuccinimide
risque NRBC	risque Nucléaire, Radiologique, Biologique et Chimique
OTS	octadecyltrichlorosilane
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEG	Poly(Ethylene)Glycol
PMMA	Poly(methyl methacrylate)
PZT	Titano-Zirconate de Plomb ($PbZr_xTi_{1-x}O_3$)
risque NRBC	risque Nucléaire, Radiologique, Biologique et Chimique
UFC	Unité Formant Colonie

Abréviations en langue anglaise :

ADC	Analog-to-Digital Converter	<i>Convertisseur Analogique-Numérique</i>
AFM	Atomic Force Microscopy	<i>Microscopie à Force Atomique</i>
APDS	Autonomous Pathogen Detection System	<i>Système Autonome de Détection de Pathogènes</i>
BAWS	Biological Agent Warning Sensor	<i>Capteur d'Alerte d'Agents Biologiques</i>
BIDS	Biological Integrated Detection System	<i>Système de Détection Biologique Intégré</i>
BOD	Biochemical Oxygen Demand	<i>Demande Biochimique en Oxygène</i>
BSA	Bovin Serum Albumin	<i>Albumine Sérique de Bovin</i>
CBDP	Chemical and Biological Defense Program	<i>Programme de Défense Biologique et Chimique</i>
CCD	Charge-Coupled Device	<i>Capteur photographique</i>
CDC	Center for Disease Control	<i>Centre de Contrôle des Maladies (USA)</i>
DARPA	Defense Advanced Research Projects Agency	<i>Agence pour les Projets de Recherche Avancée de Défense</i>
DDS	Direct Digital Synthesizer	<i>Synthétiseur Digital Direct</i>
DRIE	Deep Reactive Ion Etching	<i>Gravure profonde par ions réactifs</i>
DTRA	Defense Threat Reduction Agency	<i>Centre de Réductions des Menaces sur la Défense</i>
EEPROM	Electrically-Erasable Programmable Read-Only Memory	<i>Mémoire Morte Effaçable Electriquement et Programmable</i>
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	<i>dosage immunoenzymatique sur support</i>

		<i>solide</i>
facteur AVMI	Added Virtual Mass Incremental factor	<i>Facteur Incrémental de la Masse Virtuelle Ajoutée</i>
facteur NAVMI	Nondimensionnal Added Virtual Mass Incremental factor	<i>Facteur Incrémental Non-dimensionnel de la Masse Virtuelle Ajoutée</i>
ISFET	Ion-Selective Field-Effect-Transistor	<i>Transistor à Effet de Champ à Ion Sélectifs</i>
JBPDS	Joint Biological Point Detection System	<i>Système Joint de Détection Biologique Avancée</i>
JPEO-CBD	Joint Program Executive Office for Chemical and Biological Defense	<i>Bureau Exécutif du Programme Joint pour la Défense Biologique et Chimique</i>
LAPS	Light Addressable Potentiometric Sensor	<i>Capteur Potentiométrique Addressable Optiquement</i>
LOD	Limit Of Detection	<i>Limite de détection</i>
MCU	MicroController Unit	<i>Unité Micro-Contrôleur</i>
MUA	11-Mercapto-Undecanoic Acid	<i>Acide 11-Mercapto-Undecanoïque</i>
OBD	Optical Beam Deflection	<i>Deflection d'un Faisceau Optique</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction	<i>Réaction en Chaîne par Polymérase</i>
PECVD	Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition	<i>Dépôt Chimique en phase Vapeur Assisté par Plasma</i>
PGA	Programmable Gate Array	<i>Circuit Logique Programmable</i>
Poly(OEGMA)	Poly (Oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylates)	<i>idem</i>
PSA	Prostate Seric Antigène	<i>Antigène Sérique de la Prostate</i>
QCM-D	Quartz-Crystal-Microbalance with Dissipation monitoring	<i>Microbalance à Quartz avec Suivi de la Dissipation</i>
RAPTOR	Rapid, Automatic and Portable Fluorometer Assay System	<i>Système de Fluorométrie Rapide Automatique et Portable</i>
RTA	Rapid Thermal Annealing	<i>Recuit Thermique Rapide</i>
SAM	Self-Assembled-Monolayer	<i>Monocouche Auto-Assemblée</i>
SAW	Surface Acoustic Wave	<i>Onde Acoustique de Surface</i>
SH-SAW	Shear-Horizontal Surface Acoustic Wave	<i>Onde Acoustique de Surface à Cisaillement Horizontal</i>
SIMS	Secondary Ion Mass Spectroscopy	<i>Spectroscopie de Masse des Ions secondaires</i>
SOI	Silicon-On-Insulator	<i>Silicium-Sur-Isolant</i>
SPR	Surface Plasmon Resonance	<i>Résonance des Plasmons de Surface</i>
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence	<i>Fluorescence par Réflexion Interne Totale</i>
TSM	Thickness-Shear Mode	<i>Mode de cisaillement longitudinal</i>
USB	Universal Serial Bus	<i>Bus informatique universel en transmission série</i>
US-STRATCOM-CWMD	United States-STRATegic COMmand for Combating Weapons of Mass Destruction	<i>Commande Stratégique des Etats Unis pour le Combat des Armes de Destruction Massive</i>
μTAS	Micro-Total Analysis System	<i>microSystèmes d'Analyses Totales</i>

Annexe A

Détermination de la limite de flambement des micromembranes

Au cours du dimensionnement des micromembranes, il est préférable de se situer en dehors de du flambement car la dynamique des résonateurs se trouve fortement affectée par cet état mécanique. De plus, les simulations modales menées par éléments finis ne tiennent pas compte d'un éventuel flambement.

Afin de déterminer la limite de flambement de nos micromembranes, nous appliquons au cas de nos membranes un modèle statique pré-existant pour des micromembranes soumises à une résultante de contraintes [1]. Le point de départ d'un tel modèle considère les équations classiques de la mécanique appliquées à un élément de la membrane conformément aux hypothèses de Timoshenko sur la modélisation de membranes circulaires encastrees, soumise à une contrainte plane [2]. Ces équations sont :

$$\frac{dN_r}{dr} + \frac{N_r - N_\theta}{r} = 0 \quad \text{et} \quad \frac{dM_r}{dr} + \frac{M_r - M_\theta}{r} = -N_r\theta,$$

Avec N_r et N_θ les forces résultantes respectivement selon l'axe \vec{u}_r et l'axe \vec{u}_θ , M_r et M_θ les moments correspondants et $-N_r\theta$ la force de cisaillement résultante.

La résolution de ce problème en intégrant l'ensemble des contraintes internes des différentes couches constituant l'empilement de nos micromembranes nécessite d'introduire trois matrices spatiales [A], [B] et [C] caractéristiques des propriétés mécaniques des micromembranes, soit respectivement la matrice équivalente de rigidité en extension plan, la matrice équivalente de couplage flexion-extension et la matrice équivalente de rigidité en flexion. Cette résolution met en évidence dans notre cas que pour la partie centrale circulaire, la contrainte résultante de l'empilement des cinq couches est en tension alors que celle de la partie annulaire est en compression. Or, une contrainte en compression peut induire un comportement mécanique de flambement. Dans le cas de micromembranes, le flambement des structures apparaît si la force radiale compressive résultante à l'encastrement est supérieure à une certaine force critique. L'expression de cette force a été déterminée par Timoshenko pour une plaque circulaire monocouche encastree avec un trou au milieu [3]. Nous considérons pour cette étude en flambement, l'analogie entre ce modèle et nos micromembranes multicouches cohérente.

Les calculs de la contrainte à l'encastrement et de la contrainte critique provoquant le flambement, ont été menés pour plusieurs valeurs du rayon R_2 et en considérant une épaisseur de la membrane de 5 μm , la figure A.1 présente le résultat :

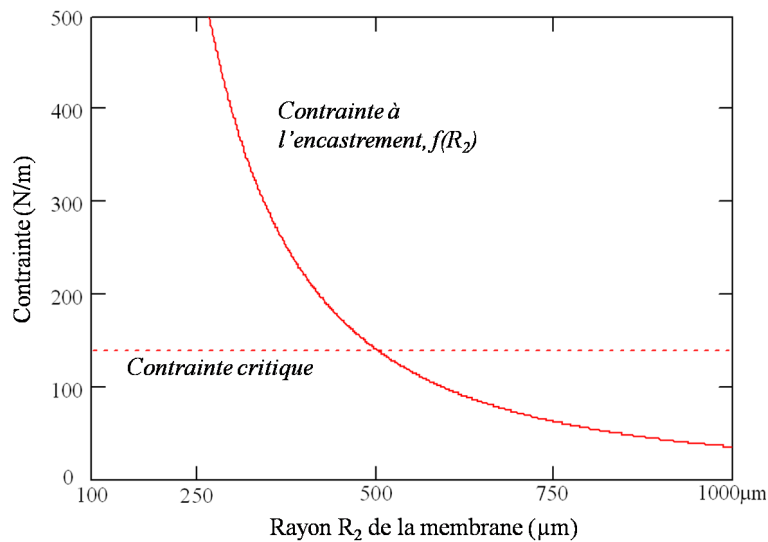


Figure A.1 : Graphe du bilan des forces à l'encastrement de la membrane pour un rayon global donné (trait plein) comparé au seuil critique de flambement de la structure (trait discontinu) pour une épaisseur constante du substrat de silicium, égale à $5\mu\text{m}$

On peut ainsi conclure d'après ce graphe que les micromembranes ne seront pas flambées tant que $R_2 > 499\mu\text{m}$

En conclusion, si l'épaisseur du substrat d'origine de silicium (de type Silicon-On-Insulator) doit être égale à 5 microns, le rayon global des membranes ne devra pas dépasser 500 microns afin d'éviter le flambement des structures après libération par gravure face arrière.

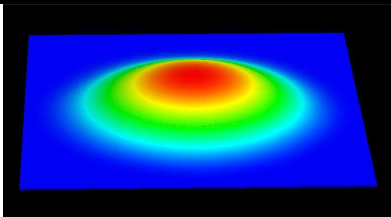
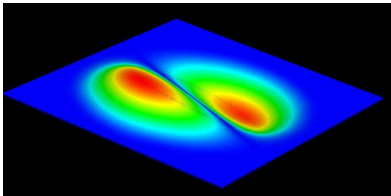
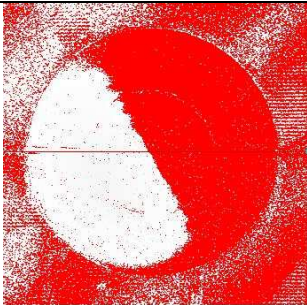
Références :

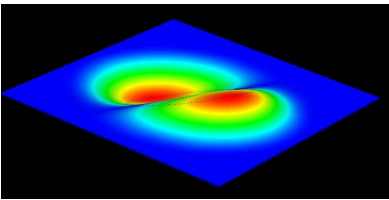
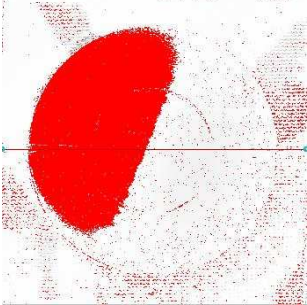
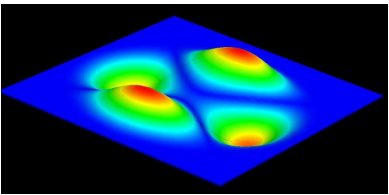
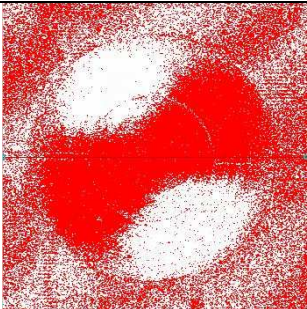
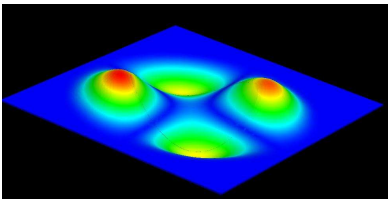
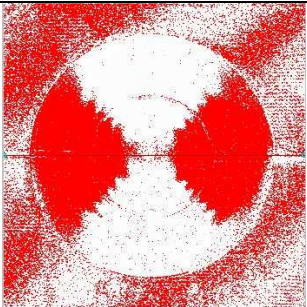
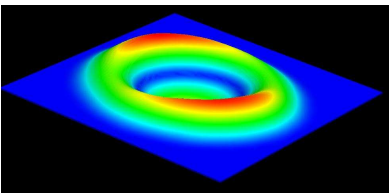
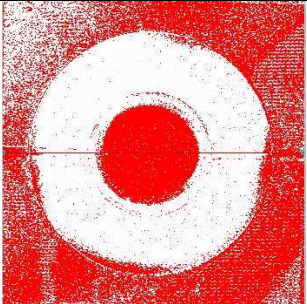
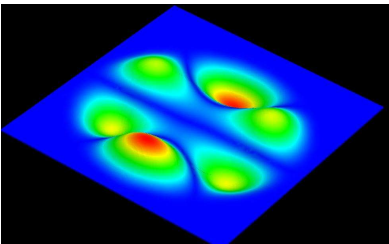
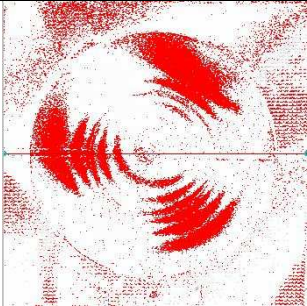
- [1] C. Ayela, "Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel", thèse, spécialité Conception des Circuits Microélectroniques et Microsystèmes, Université de Toulouse, **2007**
- [2] S. Timoshenko, S. Woinowsky-Krieger et S. Woinowsky-Krieger, *Theory of plates and shells*, (**1959**) McGraw-Hill New York, NY
- [3] S.P. Timoshenko et J.M. Gere, *Theory of elastic stability*, (**1961**), McGraw-Hill, New York, NY.

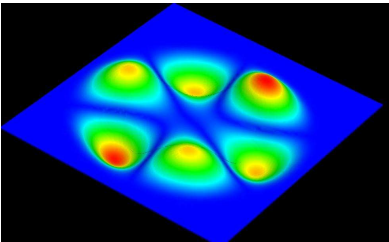

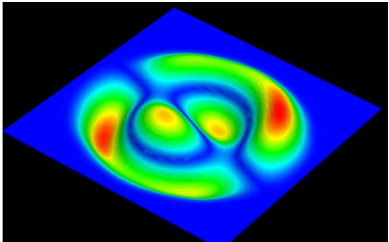
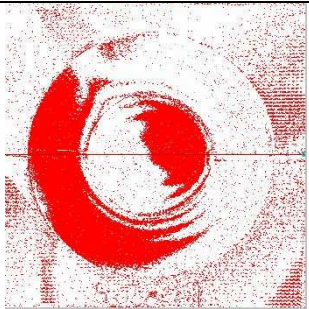
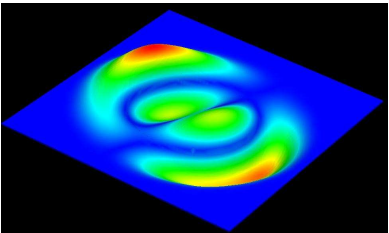
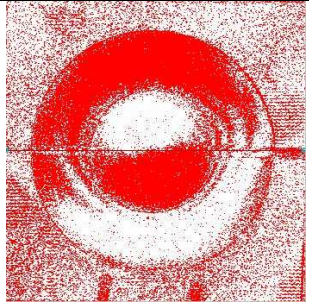
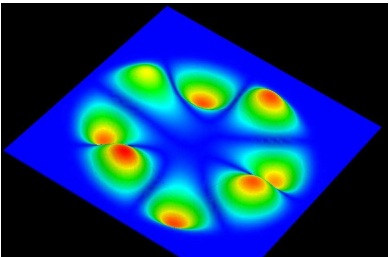

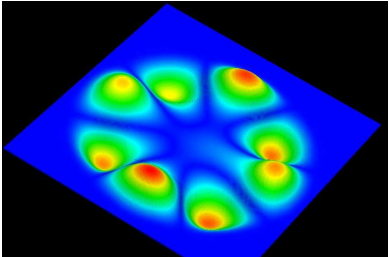
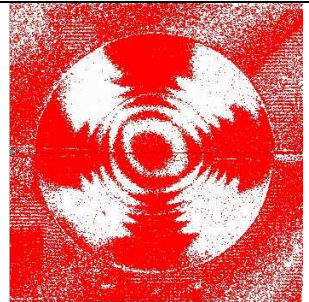
Annexe B

Identification des 15 premiers modes de résonance des micromembranes

Nous présentons ici, l'identification des différents modes de résonance des micromembranes grâce à l'interféromètre optique utilisé en mode vibrométrie (grâce à un éclairage stroboscopique dont la fréquence est synchronisée sur la fréquence de la tension d'actionnement des pastilles piézoélectriques). L'actionnement est géré ici grâce à la carte électronique de commande. La micromembrane étudiée ici possède un rayon réel de 465 μm (440 μm de rayon nominal + 25 μm de sur-gravure). Nous rappelons que les fréquences de résonances théoriques obtenues par simulation éléments finis présentées à la Table B.1, ont été simulées en prenant en compte la sur-gravure de la membrane étudiée.

Mode	Fréquence de résonance théorique obtenue par simulation par éléments finis	Forme du mode théorique	Forme expérimentale du mode	Fréquence de résonance expérimentale
1	88,2 kHz			87.7 kHz
2	237,0 kHz			173,9 kHz

3	241,2 kHz			175,3 kHz
4	419,1 kHz			280,6 kHz
5	420,9 kHz			290,0 kHz
6	502,2 kHz			330,4 kHz
7	738,9 kHz			412,7 kHz

8	748,3 kHz			413,8 kHz
9	893,4 kHz			491,2 kHz
10	918,2 kHz			501,4 kHz
11	1215,1 kHz			561,8 kHz
12	1223,7 kHz			563,7 kHz

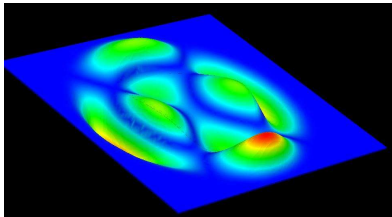
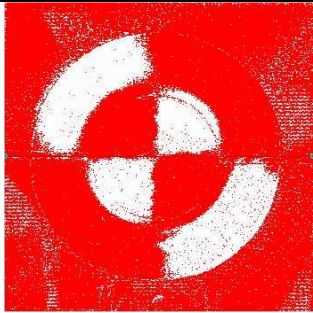
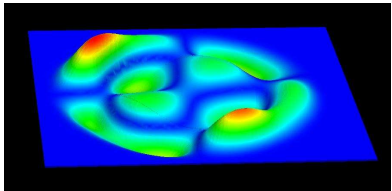
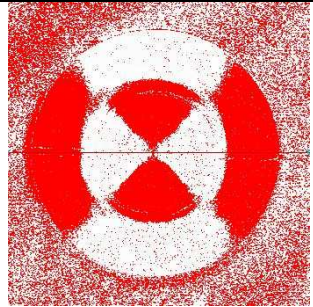
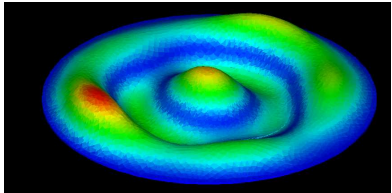
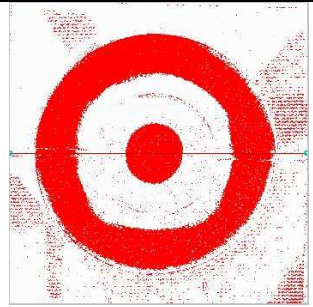
13	1512,5 kHz			662,5 kHz
14	1549,2 kHz			686,6 kHz
15	1597,2 kHz			713,0 kHz

Table B.1 : Comparaison des fréquences de résonance et des formes de mode obtenues grâce à l'analyse modale par simulation éléments finis et obtenus expérimentalement grâce à l'interféromètre optique équipé d'un éclairage stroboscopique et utilisé en mode vibrométrie, pour une micromembrane de rayon 465 μm (440 μm de rayon nominal + 25 μm de surgravure).

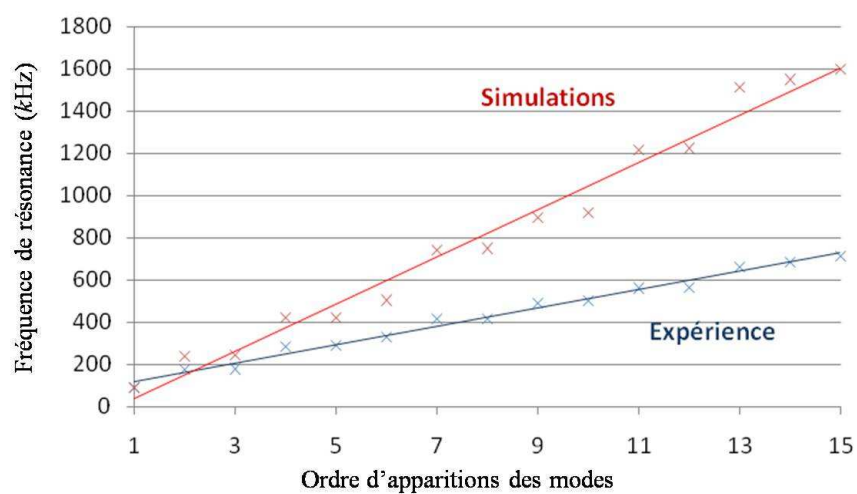


Figure B.1 : Comparaison des fréquences de résonances des 15 premiers modes de vibration, obtenues expérimentalement grâce à l'interféromètre optique en mode vibrométrie et obtenues par simulation éléments finis.

Annexe C

Simulations de la nature des effets parasites de la pastille piézoélectrique sur les piézorésistances de mesure et de référence.

Comme nous l'avons précisé dans le corps du manuscrit, nous émettons l'hypothèse d'un couplage parasite dû à l'influence de la pastille piézoélectrique sur les signaux issus des piézorésistances de mesure et de référence. Cet effet peut être modélisé par une capacité parasite en parallèle avec une résistance parasite. La capacité parasite est liée principalement à la capacité statique constituée par l'empilement matériel du module d'actionnement, alors que la résistance parasite est à relier au courant de fuite existant au travers du PZT dû à une résistivité non-infinie. Ces deux composants sont dépendants de la forme et de la taille de la cellule (paramètres qui varient d'une micromembrane à l'autre) mais également de la qualité du matériau piézoélectrique (non-uniforme d'une membrane à l'autre). Ces deux éléments parasites induisant des effets sur les variations de courant et de tension aux bornes de la piézorésistance, ils modifient donc la mesure du phénomène de résonance mécanique. Des simulations électriques du comportement des résonateurs sous l'influence de ces éléments parasites. Ces simulations ont confirmé de manière qualitative l'influence de la valeur de la capacité parasite sur la forme des pics de résonance.

Ces simulations ont été réalisées grâce à une interface P-Spice. Le circuit électrique équivalent correspondant à deux membranes (une membrane de mesure, une membrane de référence) est décrit à la figure C.1.

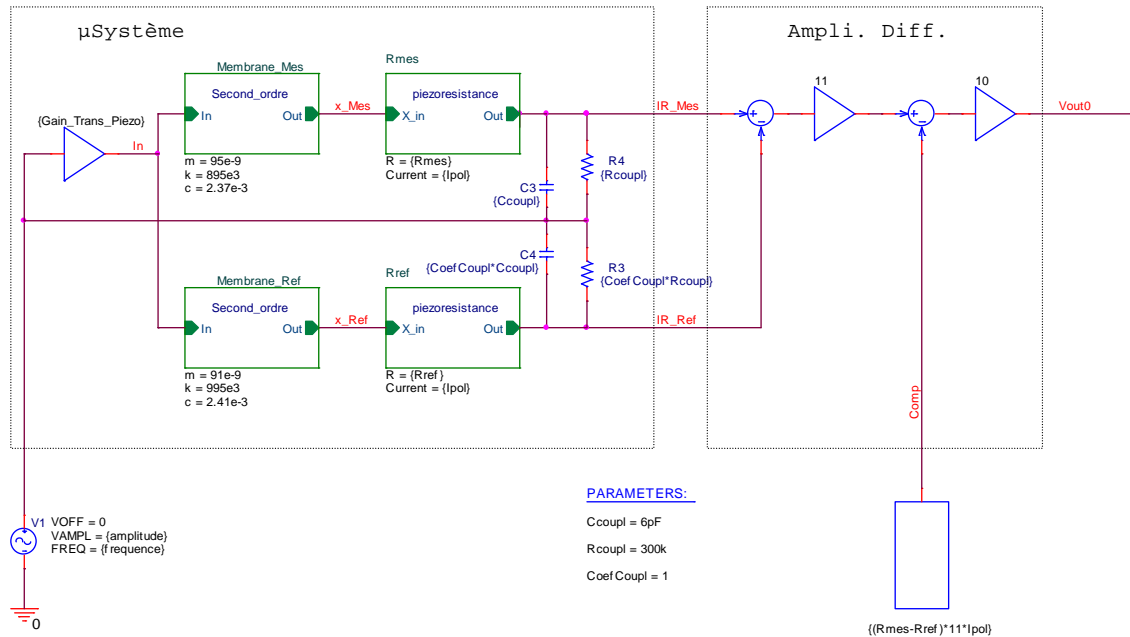
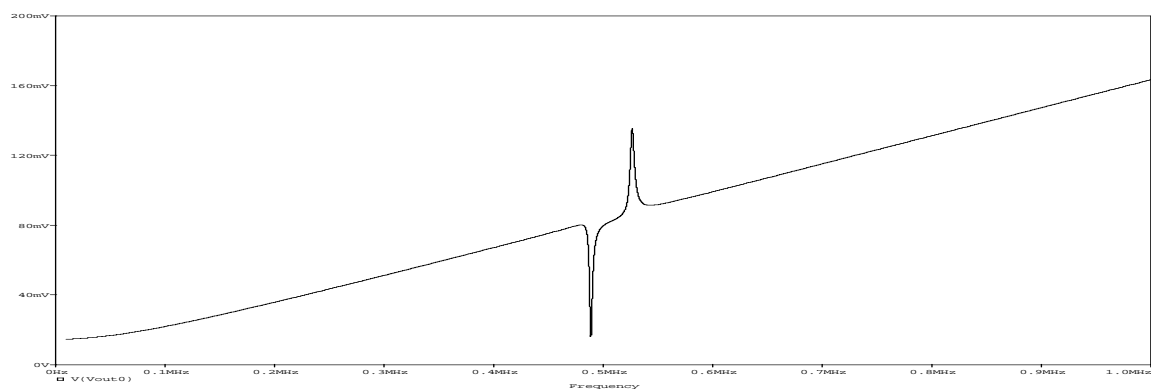


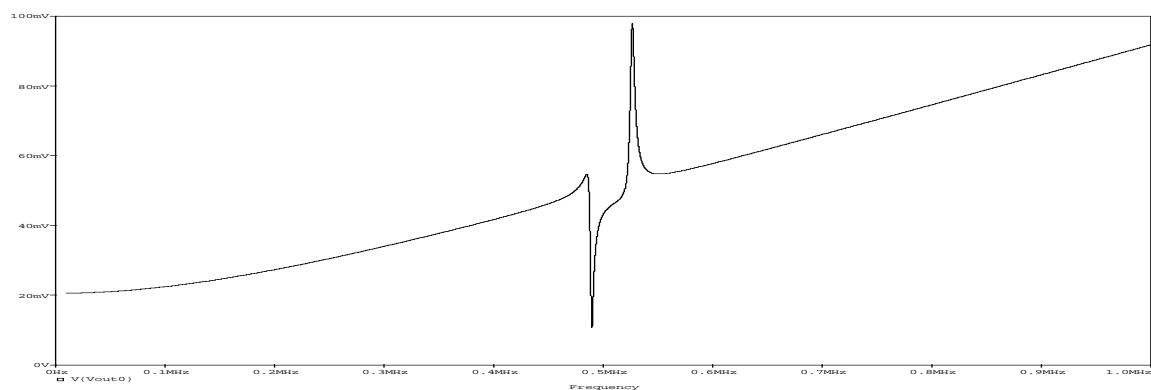
Figure C.1 : Circuit électrique équivalent modélisant l'influence des capacités et des résistances parasites de la pastille piézoélectrique sur la mesure de la résonance mécanique par les piézorésistances de la membrane de mesure et de la membrane de référence.

Le point important de ce circuit équivalent sont les composants C3, C4, R3 et R4 qui sont respectivement les capacités parasites et les résistances parasites correspondant à chaque module d'actionnement piézoélectrique. De plus, le couplage électrique entre ces éléments est caractérisé par un coefficient de couplage (noté CoefCoupl) tel que $C4 = \text{CoefCoupl} \times C3$ et $R4 = \text{CoefCoupl} \times R3$. Les courbes suivantes représentent les fréquences de résonance à la fois de la membrane de mesure et de la membrane de référence oscillant selon le mode fondamental, pour différentes valeurs du coefficient de couplage :

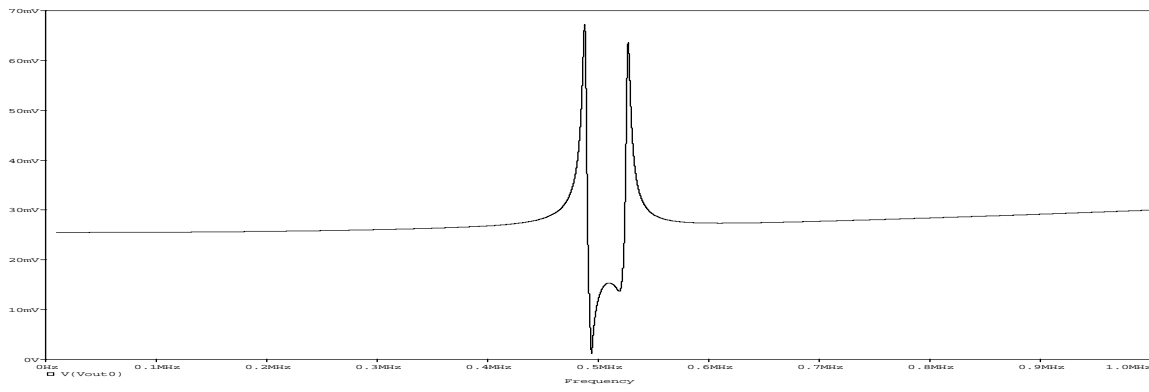
CoefCoupl=1



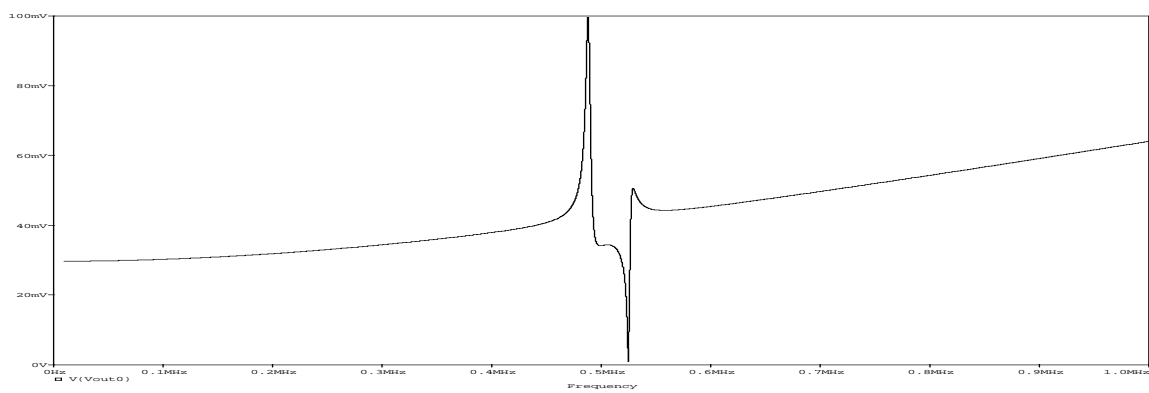
CoefCoupl=1.1



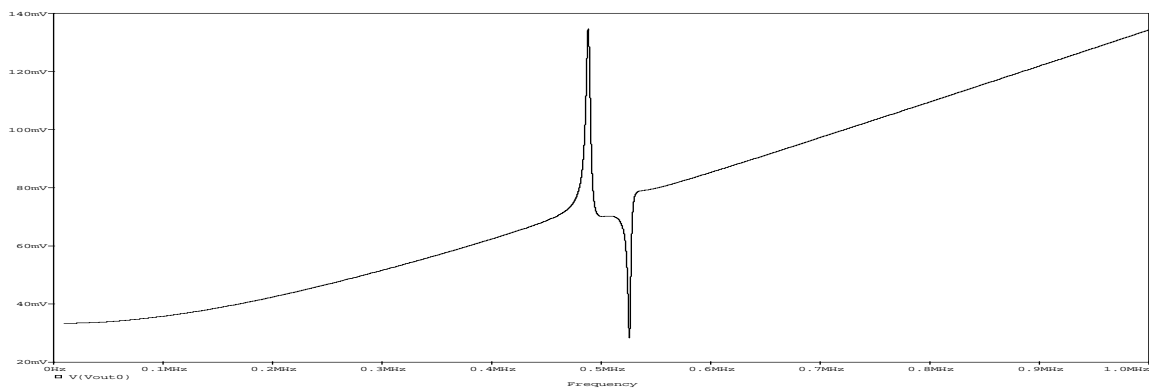
CoefCoupl=1.2



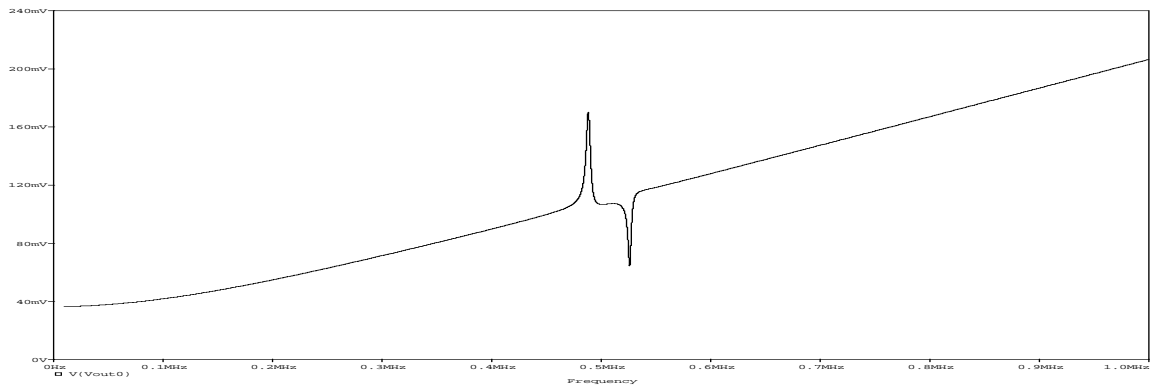
$\text{CoefCoupl} = 1.3$



$\text{CoefCoupl} = 1.4$



$\text{CoefCoupl} = 1.5$



Nous pouvons alors observer que la forme des pics de résonance s'inverse progressivement avec l'augmentation du coefficient de couplage, ce qui tend à confirmer notre hypothèse quant à la nature du couplage provoquant l'occurrence de pics de résonance inversés.

Annexe D

Liste du matériel biologique et des fournisseurs.

Pour faciliter la lecture de la partie consacrée aux protocoles biologiques, la liste des fournisseurs des différents produits et réactifs biochimiques utilisés à été regroupée ici :

Antigènes simulant la menace :

L'ensemble des solutions contenant les antigènes simulant la menace à été fourni par le CEB de la DGA, soit :

- Une solution de bactéries *Escherichia coli* concentrée à $2.4 \cdot 10^9$ UFC/ml
- Une solution de spores de *Bacillus atrophaeus* concentrée à $1.4 \cdot 10^9$ spores/ml
- Une solution d'ovalbumine concentrée à 1 mg/ml
- Une solution de granules de *Cydia pomonella* granulosus concentrée à $1.1 \cdot 10^9$ granules/ml

Immunoglobulines :

- Solution d'anticorps dirigés contre *Cydia pomonella* granulosus, concentré à 6 mg/mL, préparés par immunisation de lapins et purifiés. CEB, DGA (L030.06059.1)
- Solution d'anticorps dirigés contre *Escherichia coli*, concentré à 1.3 mg/mL, préparés par immunisation de lapins et purifiés. CEB, DGA (L030.920a.1)
- Solution d'anticorps dirigés contre l'ovalbumine, concentré à 1.3 mg/mL, préparés par immunisation de lapins et purifiés. CEB, DGA (L030.475.1)
- Solution d'anticorps dirigés contre *Bacillus atrophaeus*, concentré à 1.3 mg/mL, préparés par immunisation de lapins et purifiés. CEB, DGA (L030.496.1)
- Solution d'anticorps incorporant une molécule de biotine à leur structure, dirigés contre le fragment constant des anticorps issus du lapin, préparés par immunisation de chèvres, purifiés par affinité. Sigma-Aldrich.

Produits et réactifs :

- PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salé), composition : NaCl 137 mM ; KCl 3 mM ; KH_2PO_4 1,5 mM ; NaHPO_4 8 mM ; pH=7,2. Fluka

- Tampon HEPES: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl. *Fluka*
- Tampon de collecte: PBS contenant 0,1% de v/v de Tween, *CEB-DGA*.
- H_2SO_4 : acide sulfurique 96 %. *OM Group*
- H_2O_2 : eau oxygénée 30 %. *OM Group*
- HF : acide fluorhydrique 50%. *Rockwood*
- Neutravidine : *Sigma-Aldrich*.
- Acide 11-mercapto-undécanoïque ($\text{SH}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$). *Sigma-Aldrich*
- NaOH: Hydroxide de sodium, 130 mM, *Sigma-Aldrich*
- Ethanolamine-HCl : solution à 1M, pH 8,5. *Biacore AB*
- Acétone, *Rockwood*
- NHS : N-HydroxySuccinimide. *Fluka*
- EDC : N-Ethyl-N'-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide. *Fluka*

Annexe E

Liste des publications.

Journaux internationaux:

1. Electronic scheme for multiplexed dynamic behavior excitation and detection of piezoelectric silicon-based micromembranes, C. Ayela, T. Alava, D. Lagrange, D. Remiens, C. Soyer, T. Ondarçuhu, A. Greve, L. Nicu, *IEEE of Sensors Journal*, 8, 210 (2007)
2. Parallel acoustic detection of biological warfare agents surrogates by means of piezoelectric immunochips, T. Alava, N. Berthet-Duroure, C. Ayela, M. Pugnière, Y. Morel, P. Rameil, E. Trévisiol, L. Nicu, *Sens. Act. Chemical: B*, 138, 532 (2009)
3. Silicon-based micromembranes with piezoelectric actuation and piezoresistive detection for sensing purposes in liquid media, T. Alava, F. Mathieu, L. Mazenq, C. Soyer, D. Remiens and L. Nicu, *J. Micromech. Microeng.*, 20, 7 (2010)
4. Piezoelectric-actuated, piezoresistive-sensed circular micromembranes for label-free biosensing application, T. Alava, F. Mathieu, P. Rameil, Y. Morel, C. Soyer, D. Remiens and L. Nicu, *Applied Physics Letters*, accepted for publication

Conférences internationales à comité de lecture:

1. Electrical equivalent circuit for air and liquid characterization of a multilayer micromembrane with piezoelectric actuation and read-out capabilities, T. Alava, C. Ayela and L. Nicu, *2007 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show*, Santa Clara, California, U.S.A, (May 20-24, 2007)
2. Investigation of molecularly imprinted polymers to detect proteins by an integrated, autonomous piezoelectric micromembrane platform, C. Ayela, T. Alava, K. Haupt, L. Nicu, *2009 MicroTAS Conference*, Jeju, Korea, (November 1-5, 2009)
3. MEMS-based multisensors platform with piezoelectric actuation and piezoresistive read-out capabilities for biosensing applications, T. Alava, F. Mathieu, D. Remiens, C. Soyer and L. Nicu, *Biosensors 2010*, Glasgow, U. K. (May 26-28, 2010)
4. Actuation and sensing integration challenges at the micro-scale: the Gordian Knot of the resonant bioMEMS realm, T. Alava, F. Mathieu, C. Ayela, C. Soyer, D. Remiens, L. Nicu,

IEEE of Ferroelectrics and Frequency Control 2010, Newport Beach USA (June 1-4, 2010)

5. Extended Lamb's Model Application to High-Order Resonances of Micromachined Circular Membranes with Integrated Actuation and Sensing Capabilities, L. Nicu, T. Alava, F. Mathieu, C. Soyer, D. Remiens, *IEEE of Sensors 2010*, Hawaii USA (November 1-4, 2010)

Conférences nationales :

1. Resonating BioMEMS with integrated actuation and sensing for Biodefense applications, T. Alava, F. Mathieu, L. Nicu, Journées Nationales du GDR Micro et Nano structures 2009, Besançon, France, (November 18-20, 2009)