



**HAL**  
open science

# BioMEMS pour l'Analyse Biomoléculaire : de l'intérêt du confinement et de la réduction d'échelle pour la quantification directe de biomarqueurs

Thierry Leichle

## ► To cite this version:

Thierry Leichle. BioMEMS pour l'Analyse Biomoléculaire : de l'intérêt du confinement et de la réduction d'échelle pour la quantification directe de biomarqueurs. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 2019. tel-02385708

**HAL Id: tel-02385708**

**<https://laas.hal.science/tel-02385708v1>**

Submitted on 29 Nov 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université  
de Toulouse

UNIVERSITE DE TOULOUSE III

MEMOIRE

D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

---

## BioMEMS pour L'Analyse Biomoléculaire

DE L'INTÉRÊT DU CONFINEMENT ET DE LA RÉDUCTION D'ÉCHELLE POUR LA QUANTIFICATION DIRECTE DE BIOMARQUEURS

---

Soutenue le 4 juin 2019 par

Thierry Leïchlé

Devant le jury composé de :

Pr. Élisabeth DUFOUR-GERGAM, Université Paris-Saclay	Rapporteur
Pr. Bruno LE PIOUFLE, École Normale Supérieure de Paris-Saclay	Rapporteur
Pr. Philippe RENAUD, École Polytechnique Fédérale de Lausanne	Rapporteur
Dr. Pierre CORDELIER, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse	Examineur
Pr. Isabelle DUFOUR, Université de Bordeaux	Examineur
Dr. Thierry LIVACHE, Aryballe Technologies	Examineur
Dr. Liviu NICU, Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes – CNRS	Examineur
Dr. Martine PUGNIERE, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier	Examineur



## Table des Matières

Avant-propos .....	5
<b>1 Introduction : l'analyse moléculaire .....</b>	<b>9</b>
1.1 L'impact de l'analyse moléculaire et la révolution des sciences « omiques » .....	9
1.2 Processus d'analyse moléculaire.....	11
1.3 Cas spécifique du dosage de biomarqueurs en cancérologie .....	12
1.4 Les nouvelles technologies au service de l'analyse moléculaire .....	14
1.4.1 <i>Quel rôle pour le biocapteur : dépistage / diagnostic / gestion des maladies ?</i> .....	15
1.4.2 <i>Caractéristiques recherchées pour les analyses de biopsies liquides au chevet du patient</i>	16
1.4.3 <i>Rôle et importance des étapes pré-analytiques</i> .....	20
1.4.4 <i>Du manque de standardisation</i> .....	21
1.5 Conclusions .....	21
<b>2 De l'intérêt du confinement fluide pour l'analyse moléculaire .....</b>	<b>25</b>
2.1 Introduction .....	25
2.1.1 <i>De la micro- à la nanofluidique, la réduction d'échelle</i> .....	25
2.1.2 <i>Nanofluidique et biocapteurs</i> .....	26
2.2 Présentation de la plateforme nanofluidique .....	28
2.2.1 <i>Caractéristiques et avantages du confinement fluide</i> .....	28
2.2.2 <i>Mise en œuvre technologique</i> .....	30
2.3 Mesures d'interactions moléculaires .....	31
2.4 Intégration d'un générateur de concentrations pour des mesures cinétiques multiples en une seule injection .....	36
2.5 Analyse spatiale du biocapteur .....	38
2.6 Perspective applicative : Test compagnon pour évaluer l'efficacité d'un anticorps thérapeutique .....	40
<b>3 Vers une préparation d'échantillon minimale sur puce à l'aide de membranes de silicium poreux pour fluide planaire.....</b>	<b>43</b>
3.1 Introduction .....	43
3.1.1 <i>Importance de la préparation d'échantillon pré-analytique</i> .....	43
3.1.2 <i>Solutions sur puce : intérêt des membranes poreuses</i> .....	43
3.1.3 <i>Silicium poreux et microfluidique</i> .....	44
3.1.4 <i>Membranes à pores latéraux pour la fluide planaire</i> .....	45
3.2 Mise en œuvre technologique des membranes poreuses latérales .....	46
3.3 Membranes poreuses pour la filtration d'échantillon .....	50
3.4 Membranes poreuses pour la pré-concentration .....	52
3.5 De la préparation d'échantillon à la biodétection : Membranes poreuses et transduction interférométrique .....	54
<b>4 Vers une détection ultra-sensible sans marquage à l'aide de résonateurs MEMS.....</b>	<b>57</b>
4.1 Introduction .....	57
4.1.1 <i>La promesse des biocapteurs issus des nouvelles technologies</i> .....	57
4.1.2 <i>Les biocapteurs MEMS</i> .....	57
4.1.3 <i>Vers des capteurs à faible couplage : les membranes/plaques</i> .....	58

4.2	Nouvelle approche de réalisation de plaques résonantes .....	58
4.2.1	<i>Techniques de fabrication de microstructures suspendues</i> .....	58
4.2.2	<i>Réalisation de nanoplaques par micro-maçonnerie</i> .....	60
4.2.3	<i>Résonateurs à transduction électrostatique intégrée</i> .....	63
4.3	Stratégies de biofonctionnalisation .....	65
4.3.1	<i>La biofonctionnalisation localisée et multiplexe de MEMS</i> .....	65
4.3.2	<i>Dépôt de microgouttes par contact direct : de l'outil Bioplume tout silicium à une version polymère réalisée en impression 3D</i> .....	65
4.3.3	<i>Diminution en taille, fonctionnalisation d'objets fragiles : le <math>\mu</math>CP</i> .....	68
4.3.4	<i>Solution alternative intégrée au procédé : MIP</i> .....	70
4.4	Remarques conclusives .....	72
<b>5</b>	<b>Prospective de recherche</b> .....	<b>75</b>
5.1	Prospectives de recherche à court et moyen terme .....	75
5.1.1	<i>Système nanofluidique : Implémentation de la détection sans marquage</i> .....	75
5.1.2	<i>Membranes de silicium poreux : Une brique technologique générique pour les laboratoires sur puce ?</i> .....	77
5.1.3	<i>MEMS électromagnétiques à transduction intégrée</i> .....	78
5.2	Prospectives de recherche à moyen et long terme.....	80
5.2.1	<i>Biocapteurs à hautes performances : GaN inside</i> .....	80
5.2.2	<i>Biocapteurs intégrés par impression 3D : MEMS inside</i> .....	81
5.2.3	<i>Vers une convergence des technologies ?</i> .....	83
<b>6</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>Bibliographie</b> .....	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Annexes</b> .....	<b>105</b>
8.1	Curriculum Vitae .....	105
8.2	Production scientifique .....	111
8.3	Publications représentatives .....	121
	<b>Résumé</b> .....	<b>185</b>

## Avant-propos

J'ai rejoint le monde de la recherche académique finalement assez tard, après un parcours plutôt atypique. J'ai pourtant découvert cet univers dès le deuxième cycle de mes études d'ingénieur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse : ainsi, le premier laboratoire dans lequel je suis entré a été le CEMES à Toulouse dans le cadre d'un projet d'étude se déroulant tout au long de la troisième année (après mon entrée dans le département de Physique, suivant les deux années préparatoires), et ensuite lors d'un stage d'été effectué en quatrième année au Trinity College de Dublin sous la responsabilité de Michael Coey, pendant lequel je suis surtout tombé sous le charme d'un pays, de ses gens et de sa culture, à défaut de trouver ma vocation ! Il faut dire que dans les deux cas, j'ai été un peu tenu à l'écart des grandes questions scientifiques, le but des tâches confiées étant purement lié à l'instrumentation des bancs de mesure. Et puis et surtout, je présume que je me destinais à être ingénieur dans un grand groupe industriel de la microélectronique et je n'imaginai absolument pas faire une carrière de chercheur, difficile donc de s'y intéresser...

Le déclic est venu graduellement à partir de la dernière année d'école alors que j'étais également inscrit en DEA. J'ai eu la chance de croiser Jean-Claude Portal, Professeur à l'INSA Toulouse qui m'a offert la possibilité de partir aux États-Unis non seulement pour réaliser mon stage de fin d'études, mais aussi pour effectuer mon service national en tant que coopérant scientifique. Autre chance, celle d'avoir été affecté dans le laboratoire de Mark Allen au Georgia Institute of Technology qui m'a fait découvrir le monde des microsystèmes et m'a offert un environnement de travail à la fois riche, stimulant, international et empreint de liberté. Une fois le service national achevé, j'ai décidé de rester à Georgia Tech et de m'inscrire en Master of Science (en génie électrique). Pendant mon séjour dans l'équipe de Mark Allen, j'ai réalisé un microcapteur de champ magnétique destiné à être utilisé comme boussole, et reposant sur l'utilisation d'un résonateur MEMS organique réalisé en SU8. Avant de rentrer en France, j'ai souhaité aborder des applications tournées vers la biologie, une matière qui m'avait toujours captivé, et pour ce faire, j'ai passé 6 mois dans l'équipe de William Hunt, pour développer des biocapteurs à partir de dispositifs à ondes acoustiques.

A mon retour, la volonté de faire une thèse devenait enfin clair, j'ai donc cherché un laboratoire qui pouvait m'accueillir. Parmi les différentes options, c'est un sujet proposé par Christian Bergaud au LAAS qui a particulièrement retenu mon attention. J'avais eu l'occasion de visiter le LAAS auparavant et j'avais été accueilli par Liviu Nicu, alors en thèse, qui m'avait fait découvrir sa manip logée dans une petite pièce au sous-sol du laboratoire : je ne me doutais pas que plus tard, j'y travaillerai aussi, que nos chemins se recroiseraient et que nous ferions un beau et long bout de route ensemble, me menant à présenter cette habilitation à diriger des recherches sous son parrainage (merci !) ... Pendant ma thèse, encadrée au jour le jour par Liviu, alors que Christian qui avait pris la direction du LIMMS à Tokyo, nous soufflait des idées et conseils lors de ses passages en France, j'ai développé un microsystème de dépôt de gouttes par contact direct pour la fonctionnalisation de surfaces, sorte de stylo à plume miniaturisé. Le contexte de la thèse était

favorable puisque je suis arrivé à un moment où le projet, basé sur une idée déjà bien dégrossie par Pascal Belaubre lors de sa thèse, se déroulait dans un cadre Européen : ainsi, j'ai découvert les réunions aux quatre coins de l'Europe, j'ai rencontré et travaillé avec des chercheurs qui m'ont fortement marqué, mais surtout, j'ai pu assez publier et me construire un dossier pour prétendre candidater au CNRS.

Mon séjour post-doctoral est le fruit d'une énième rencontre, celle de Chia-Fu Chou. J'ai décidé de rejoindre son laboratoire à l'Academia Sinica à Taipei, Taiwan, alors qu'il venait tout juste de s'installer. J'avais choisi une immersion dans un laboratoire de biophysique pour y apprendre la manipulation et l'observation de molécules à l'aide de systèmes fluidiques, et c'est au cours de ce séjour que j'ai mis au point la plateforme nanofluidique pour l'analyse cinétique présentée dans ce manuscrit. Pendant ces deux années, j'ai également mûri le projet de recherche, basé sur l'utilisation de silicium poreux dans des microsystèmes pour la réalisation d'étapes pré-analytiques, que j'ai présenté au concours de chargé de recherche au CNRS.

Alors pourquoi raconter mon parcours de cette manière ? Eh bien, et c'est la seule raison qui intéressera vraiment le lecteur de ce manuscrit, parce qu'en décrivant mes errements, mes choix, et mes expériences, cet avant-propos donne quelques indices sur le contenu de ce mémoire qui résume mes travaux de recherche conduits depuis mon entrée au CNRS, en Janvier 2010, tout d'abord au sein de l'équipe Nanobiosystèmes, puis de l'équipe MEMS.

Le résultat est que les 3 grands axes de recherche présentés ici découlent de mes expériences passées : j'ai abordé le travail sur les MEMS, sous forme de résonateurs ou statiques, en polymère ou en silicium, à Georgia Tech puis au LAAS, j'ai travaillé sur des méthodes de fonctionnalisation de surface au LAAS, je me suis initié à la fluidique à l'Academia Sinica et enfin, j'ai commencé à toucher au silicium poreux lors de mon entrée au CNRS. Pour le coup, j'ai essayé de donner une ligne directrice à mes travaux, mais je dois avouer que ce mémoire dévoile mon plus grand défaut qui est celui d'aimer toucher à tout sans pour autant et malheureusement parfois rentrer en profondeur, et d'explorer une multitude de voies de recherches, quitte à les laisser en friche. Ce qu'il ressort enfin de ce travail est que j'ai toujours eu la chance d'être entouré et de collaborer avec des personnes de grand talent.

Ce manuscrit est composé de 5 chapitres : dans le premier chapitre, je discute de l'importance de l'analyse moléculaire pour le domaine médical et de l'apport attendu des micro- et nanotechnologies dans le domaine, vraie motivation de mon travail.

Dans les trois chapitres qui suivent, je détaille mes travaux de recherche effectués au LAAS ces 10 dernières années : tout d'abord le développement d'une plateforme nanofluidique pour l'analyse moléculaire, l'intégration de membranes en silicium poreux dans des systèmes fluidiques comme solutions technologiques pour les étapes pré-analytiques, et le recours aux MEMS résonants et leur biofonctionnalisation en vue de proposer des systèmes d'analyse sans marquage, en temps réel.

Enfin, dans le dernier chapitre, j'expose mon projet de recherche qui s'inscrit dans la lignée de mes activités courantes avec un double objectif : tirer parti de la technologie GaN pour fournir des biocapteurs à haute performance en environnement extrêmes et des technologies additives pour proposer des solutions analytiques flexibles et in-vivo.





## 1 Introduction : l'analyse moléculaire

### 1.1 L'impact de l'analyse moléculaire et la révolution des sciences « omiques »

L'apparition de la biologie médicale et de la biochimie clinique à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et le développement des techniques d'analyse moléculaire ont révolutionné et modernisé la médecine. Historiquement, les médecins se basaient sur l'anamnèse, l'observation de signes cliniques (symptômes), et des examens physiques (puis, plus tard sur l'imagerie) pour diagnostiquer une maladie puis choisir les traitements en conséquence. Le dosage précis de certains analytes permet depuis de compléter le bilan de santé et offre un outil précieux tant pour l'aide au diagnostic que pour le suivi de l'état du patient au cours du traitement.

Les tests conduits dans les laboratoires d'analyse permettent de déterminer la concentration de molécules aussi variées que des minéraux, des glucides, des lipides, des protéines, des métabolites ou des acides nucléiques dans les fluides corporels ou dans des extraits de tissus à l'aide d'automates de biochimie (qui utilisent réactions chimiques, enzymatiques ou immunologiques) et de biologie moléculaire (qui permettent l'accès à l'information génétique). Si les analyses classiques de routine permettent le suivi métabolique des patients ; en dosant des marqueurs moléculaires spécifiques (dits biomarqueurs<sup>1</sup>), les analyses ont maintenant aussi pour but de permettre de caractériser l'origine physiopathologique de maladies aussi diverses que les maladies infectieuses, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, le diabète, et les cancers par l'interprétation médicale de leurs résultats [2].

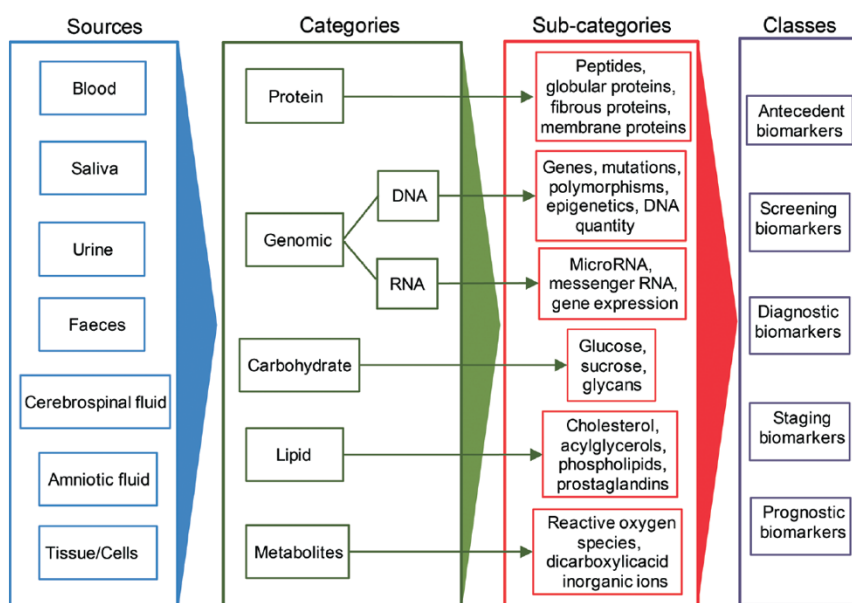


Figure 1.1 Aperçu des biomarqueurs, leurs principales sources, catégories et classes (*i.e.* buts : dépistage, diagnostic précoce, diagnostic, stadification et pronostic) [2].

<sup>1</sup>La définition générale établie par le National Institutes for Health d'un biomarqueur est [1] : une caractéristique objectivement mesurée et évaluée comme indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathogènes ou des réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique.

Plus important encore est l'utilité avérée du dosage de ces biomarqueurs moléculaires, tant dans un but de dépistage sur des populations à risques, que de diagnostic précoce (avant apparition des symptômes), d'évaluation du stade de la maladie et de son pronostic (Figure 1.1). Ainsi, l'utilisation des données issues de l'analyse des biomarqueurs moléculaires a un impact grandissant non seulement sur le bien-être des patients et sur le coût global du système de santé (de par une meilleure prise en charge et l'évaluation de l'efficacité des traitements thérapeutiques), mais aussi sur la recherche biomédicale en autorisant la compréhension de mécanismes fondamentaux et la mise au point de nouvelles thérapies.

La puissance grandissante des systèmes d'analyse, leur robotisation et la taylorisation des processus, ainsi que la diminution des coûts associés<sup>2</sup> [4], conduit à l'accumulation d'un nombre gigantesque d'informations sur les « omiques » : génome, transcriptome, protéome et métabolome (Figure 1.2). Grâce aux progrès réalisés en bioinformatique, l'analyse de ces informations permet d'appréhender la complexité du vivant dans son ensemble, un vrai changement de paradigme dans le domaine biomédical se traduisant par le développement de la biologie intégrative [5]. La révolution des « multi-omiques » conduit non seulement à grouper les individus en sous-populations qui diffèrent dans leur sensibilité à une maladie particulière ou dans leur réponse à un traitement spécifique, mais aussi à détailler plus finement les états pathologiques en classant par exemple les tumeurs en sous catégories et en prenant en compte leurs hétérogénéités, posant ainsi les fondements de la médecine personnalisée ou médecine de précision [6].

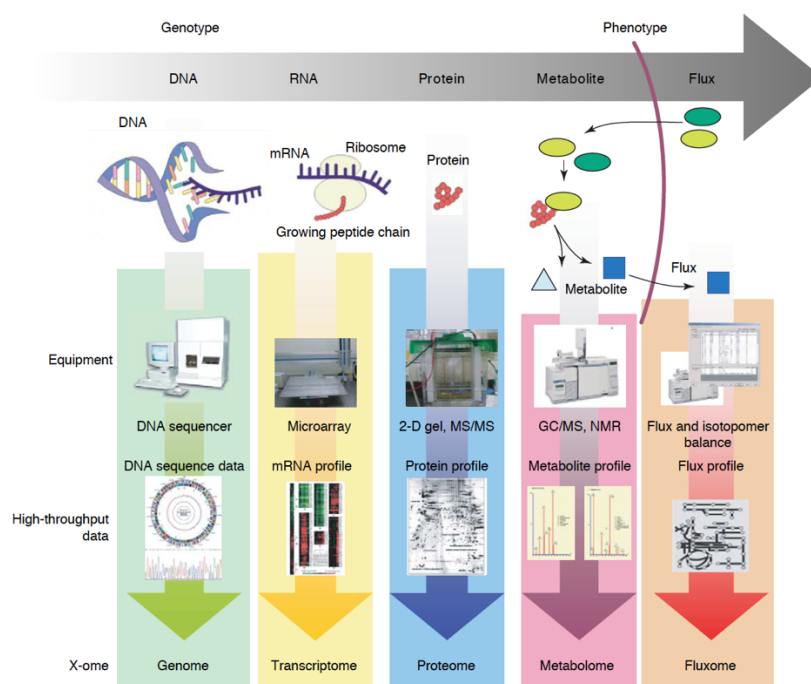


Figure 1.2 Analyses haut débit sur les omiques, support de la bioinformatique [5].

<sup>2</sup>Illustrés par l'évolution des méthodes de séquençage : de la première machine automatisée présentée en 1986 par Leroy Hood et Lloyd Smith et utilisée dans le cadre du Human Genome Project qui a coûté 3 G\$ sur 13 ans, aux séquenceurs dernière génération permettant le séquençage complet du génome humain en quelques jours pour un coût avoisinant les 1000 \$ [3].

## 1.2 Processus d'analyse moléculaire

En biologie médicale, une analyse se déroule en plusieurs étapes, depuis le prélèvement de l'échantillon jusqu'à l'interprétation des résultats. On distingue 3 niveaux dans le processus d'analyse [7]. Tout d'abord le principe analytique qui concerne le moyen de mesure, de détection, ce que dans notre domaine de la physique appliquée et des technologies de l'électronique, nous appelons le biocapteur. Ensuite, la méthode analytique qui comprend des étapes de préparation d'échantillon (qui servent à optimiser les conditions adaptées au moyen de mesure), ainsi que les moyens technologiques mis en œuvres pour la bonne opération du capteur (*e.g.* circuits fluidiques, contrôle en température, électronique de mesure, interface avec l'utilisateur), ce qui correspond à l'instrument. Enfin, la procédure analytique complète qui couvre toute la chaîne de mesure, du prélèvement à l'information finale.

On peut considérer que les étapes de prélèvement et d'interprétation des résultats relèvent du corps médical : ainsi, le personnel qualifié prélève l'échantillon en suivant des protocoles bien précis pour s'assurer de sa validité et de sa conformité et un médecin est seul habilité à faire un diagnostic à partir des résultats de l'analyse. C'est la procédure suivie en laboratoire d'analyses médicales dotés d'instruments de mesures performants (Figure 1.3, gauche). Mais ce n'est pourtant pas toujours le cas : par exemples, les diabétiques ont maintenant à disposition des outils d'analyse pour le suivi de leur taux de glycémie et dans ce cadre, prélèvent eux-mêmes leur échantillon (une goutte de sang obtenue en se piquant le doigt [8]). Ils sont ensuite à même d'interpréter les résultats de la mesure et de prendre des décisions. Bien entendu, cet exemple ne saurait être pour l'heure transposé à des pathologies plus complexes, mais c'est le cas le plus emblématique de l'outil d'analyse au chevet du patient, opposé aux plateformes d'analyse centralisées. Ces dernières ont bénéficié d'avancées technologiques importantes depuis les années 60 et offrent aujourd'hui la possibilité de réaliser des analyses précises et exhaustives sur un grand nombre d'échantillons avec une approche qualité qui conduit à des erreurs minimisées [9]. La principale raison qui motive le recours à des outils au chevet du patient est la rapidité du délai d'exécution et de la réponse, ce qui est crucial dans les services d'urgences pour, par exemple, déterminer par le dosage de biomarqueurs cardiaques si un patient souffrant de douleurs thoracique aiguës est victime d'un infarctus du myocarde. Les dispositifs au chevet du patient sont classés en deux sous-catégories [10] : les appareils d'analyse sur paillasse qui sont finalement des versions miniaturisées des systèmes conventionnels et les appareils portatifs, tels que les tests immuno-chromatographique sur bandelettes ou les capteurs *in-vivo* (Figure 1.3, droite). Ce sont ces derniers outils qui sont appelés à être le plus impactés par les micro- et nanotechnologies comme en témoignent les idées récentes d'effectuer des analyses sur lentilles de contact ou à l'aide de tatouages électroniques.



Figure 1.3 A gauche, un exemple d'automate produit par Roche qui fournit plus de 80 tests prêts à l'emploi [11], à droite, le système Freestyle qui utilise un capteur *in-vivo*, commercialisé par Abbott [12].

### 1.3 Cas spécifique du dosage de biomarqueurs en cancérologie

Alors que le dosage moléculaire permet déjà d'évaluer la fonction de certains organes (fonction hépatique ou rénale), la découverte plus récente de biomarqueurs spécifiques liés au développement de cancers offre une promesse en vue du diagnostic et du traitement de ces maladies. Le prélèvement cellulaire sur les tumeurs et leur analyse fournissent des informations exhaustives et cruciales sur l'état de la maladie, et nombre de biomarqueurs dans ces biopsies sont bien identifiés [2]. Cependant, le recours au prélèvement de biopsies solides est lourd, parfois compliqué à mettre en œuvre et ne peut donc être utilisé de manière routinière. Ceci devient envisageable si l'analyse est réalisée sur des échantillons facilement accessibles, comme les fluides corporels. Seulement, la concentration des biomarqueurs dans les biopsies liquides est bien en deçà des niveaux obtenus dans les tissus (Figure 1.4).

L'antigène spécifique de la prostate (PSA), dosé par ELISA (technique de référence de dosage protéique) est le biomarqueur cancéreux historique le plus emblématique utilisé en clinique. La recherche de nouveaux biomarqueurs en biopsie liquide est extrêmement active et les marqueurs génomiques, comme l'ADN tumoral circulant (libérés dans la circulation suite à la nécrose des cellules d'une tumeur) font maintenant l'objet d'une grande attention [13]. L'analyse de l'ADN circulant qui consiste à déterminer sa concentration totale, sa distribution en taille et à identifier certaines séquences [14], est effectuée à l'aide de plusieurs techniques comme la spectrophotométrie, la séparation électrophorétique, le séquençage ou la PCR digitale (on se doit de mentionner également la technologie  $\mu$ LAS développée par Aurélien Bancaud au LAAS, avec qui j'ai collaboré sur ce sujet dans le cadre de la thèse de Rémi Malbec [15]).

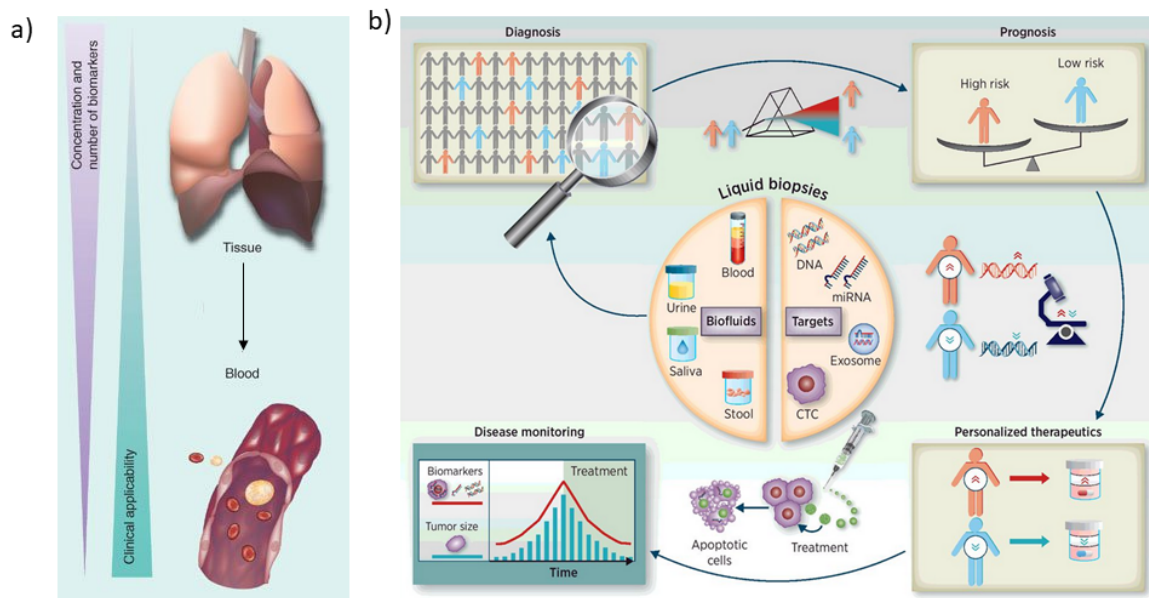


Figure 1.4 a) les biomarqueurs sont présents dans les tissus et les fluides biologiques (sang, urine, salive, etc.). L'intérêt clinique est très fort dans le cas des biopsies liquides car l'étape de collection est moins intrusive, cependant les concentrations de biomarqueurs chutent drastiquement [16]. b) La présence de biomarqueurs cancéreux (ADN, miARNs, exosome, CTCs, etc.) dans les différents biofluides permet d'utiliser l'analyse de biopsies liquides comme outil de diagnostic, de pronostic et de suivi d'évolution de la maladie [17].

Le cancer du pancréas est un excellent exemple illustrant l'importance du recours au dosage de biomarqueurs dans les biopsies liquides et le développement de technologies associées. L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ACP) qui représente 90% des cancers du pancréas diagnostiqués (PDAC) représente la troisième cause de mortalité liée au cancer dans les pays occidentaux et le taux de survie à cinq ans pour tous les stades tumoraux est de seulement 3,5 % [18]. Le seul traitement curatif de l'ACP demeure la chirurgie. Après résection chirurgicale, le pronostic des patients dépend de la récurrence de la maladie, mais même après résection complète de la tumeur qui est un facteur de pronostic très favorable, le taux de survie à 5 ans ne dépasse pas 30% [19]. Heureusement, il a été récemment démontré que l'utilisation d'une chimiothérapie adjuvante (e.g. Folfirinox) après résection du cancer améliore grandement le taux de survie des patients [20]. Cependant, il est souhaitable de déterminer la meilleure chimiothérapie à utiliser, compte tenu des effets secondaires, et de juger la pertinence de traiter un patient à qui l'on souhaite éviter un traitement excessif. Cette stratégie nécessite certainement la caractérisation routinière et régulière de la tumeur tout au long du traitement, préférentiellement de manière non invasive, pour mieux gérer les patients atteints de cancer pancréatique.

Les marqueurs moléculaires pour les patients atteints de cancer du pancréas sont peu nombreux. Le Ca19-9 est le seul biomarqueur circulant approuvé mais il peut être élevé chez les patients atteints d'insuffisance hépatique grave. Les microARNs (miARNs) sont des petits ARNs endogènes qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel et dont l'expression est altérée dans de nombreuses pathologies, y compris cancéreuses [21]. Les miARNs sont largement présents dans les fluides corporels dont le sang [22], sous une forme remarquablement stable et protégées de l'activité endogène des ribonucléases (RNases). Les travaux menés par l'équipe de Pierre Cordelier du CRCT (Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse), avec qui je collabore depuis 5 ans et qui a été l'une des premières équipes à signaler la modification de l'expression des miARN dans la carcinogenèse pancréatique [23], ont démontré que les miARNs peuvent distinguer les maladies inflammatoires pancréatiques des cancers, et qu'il est possible de quantifier les niveaux de miARN dans le plasma de patients atteints de cancers [24]. Ainsi, le miARN miR-21 est surexprimé aux premiers stades du développement du cancer, au contraire, l'expression des miR-148a et des miARN de la famille Let-7 se perd dans les tumeurs avancées. Plus récemment, l'équipe de Pierre Cordelier a également étudié le niveau d'expression de plusieurs séquences d'ARN miR dans la salive de patients malades, démontrant la corrélation entre la régulation à la hausse de séquences miR spécifiques et l'état pathologique [25]. Ainsi, les miARNs circulants sont considérés comme une nouvelle classe de biomarqueurs pour le diagnostic non invasif de cancers [26], et en particulier du cancer du pancréas.

Cependant, comme illustré en Figure 1.5, les niveaux de miARNs dans les biopsies liquides (sérum) sont très faibles. La RT-qPCR et la technologie NanoString sont les techniques les plus utilisées actuellement pour détecter les miARNs en clinique [27]. Cependant, ces méthodes nécessitent des étapes complexes de préparation d'échantillon (extraction de l'ARN, marquage). De plus, l'amplification ne fournit que des valeurs relatives de miARNs plutôt que des concentrations réelles, et la variabilité associée à l'étape de transcription inverse demeure critique. Ces techniques sont difficilement transportables et nécessitent un personnel qualifié pour leur bon fonctionnement, de sorte que les échantillons à analyser sont envoyés à des laboratoires spécialisés et que les résultats de l'analyse ne sont pas immédiats. Enfin, même si elle est très efficace, NanoString reste

très onéreuse. Ainsi, il y a un réel besoin de proposer des solutions alternatives pour l'analyse systématique des miARNs dans les biopsies liquides afin d'évaluer leur valeur pronostique après un traitement tumoral dans le but de faciliter une prise en charge de la maladie.

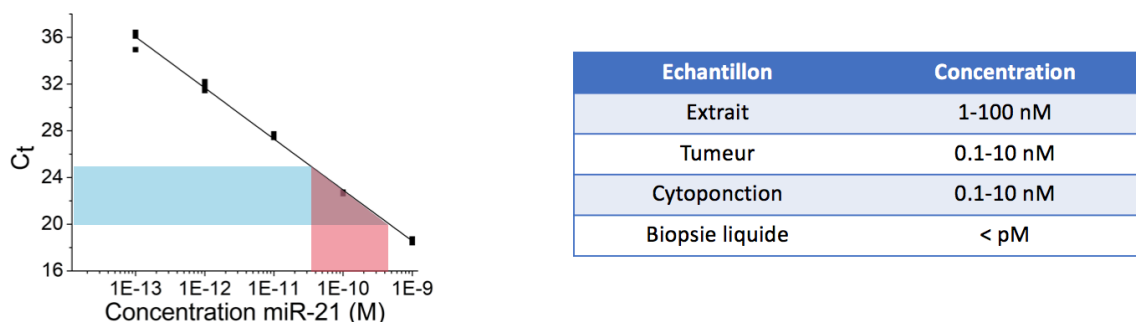


Figure 1.5 Nombre relatif de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre un signal de seuil ( $C_t$ ) par RT-qPCR en fonction de la concentration de miR-21 synthétique en solution (courbe d'étalonnage, gauche). Concentrations de miR-21 dans divers échantillons estimées à partir d'un dosage par RT-qPCR et de la courbe d'étalonnage (droite). Données non publiées [28].

#### 1.4 Les nouvelles technologies au service de l'analyse moléculaire

L'apport des technologies dérivées de la microélectronique (*i.e.* microsystèmes, microfluidique, nanotechnologies) aux outils pour l'analyse moléculaire est double : d'une part, la miniaturisation des systèmes et la possible diminution des coûts des dispositifs, d'autre part la mise au point de nouveaux principes de détection permettant d'améliorer les sensibilités et d'abaisser les seuils de détection.

La grande majorité des biocapteurs, qui transforment une reconnaissance biologique en un signal physique mesurable, reposent sur les transductions électrochimiques et optiques [29], mais de nombreuses autres approches sont également proposées (Figure 1.6). Ainsi, la littérature à ce sujet est très riche et même si peu de produits ont vu le jour au regard du volume de recherche (on peut tout de même citer par exemple les technologies SPR, QCM, NanoString ou la PCR digitale), l'impact attendu de ces technologies sur le monde de l'analyse moléculaire est immense. Cependant, afin d'avoir une réelle utilité médicale dans des domaines comme la cancérologie, le cahier des charges à respecter est très exigeant et les verrous à lever sont encore nombreux.

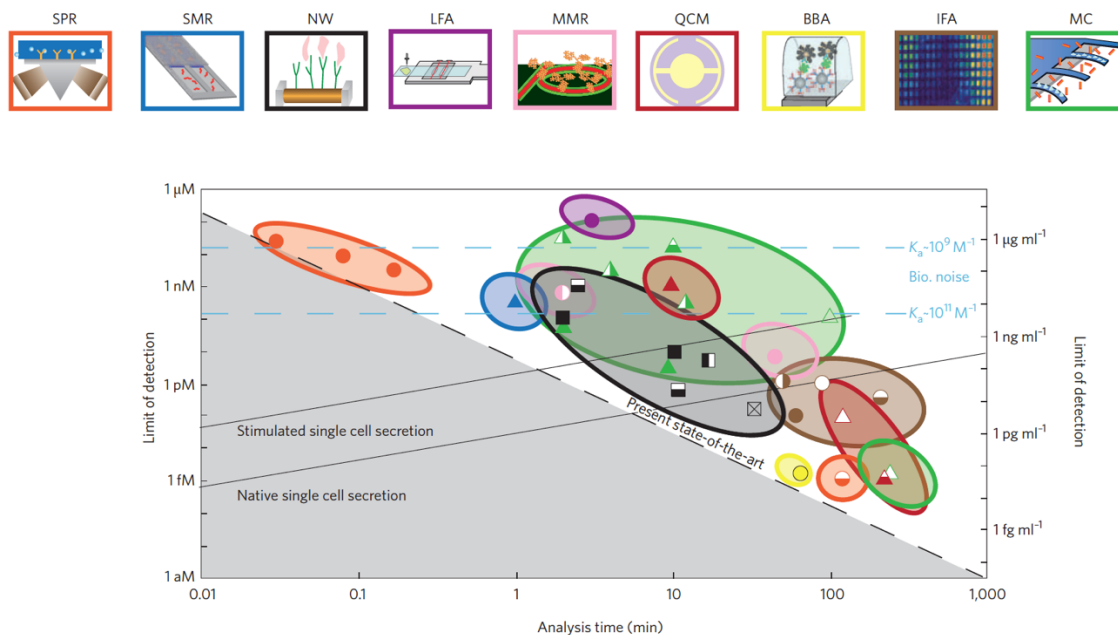


Figure 1.6 Exemples de biocapteurs dont certains sont basés sur les nouvelles technologies et limites de détection associées pour la détection de protéines. SPR : Résonance plasmonique de surface ; SMR : Levier résonant avec microcanal intégré ; NW : Nanofil ; LFA : Test immuno-chromatographique ; MRR : Résonateur optique ; QCM : Microbalance à quartz ; BBA : Biobarcode ; IFA : Immunofluorescence ; MC : MEMS (microlevier) [30].

#### 1.4.1 Quel rôle pour le biocapteur : dépistage / diagnostic / gestion des maladies ?

Comme nous l'avons vu, le dosage de biomarqueurs peut avoir plusieurs utilités cliniques. Ainsi, la première question qu'il convient de se poser quand on développe ou souhaite avoir recours à un biocapteur dans le domaine biomédical est : à quelles fins et dans quel cas les utiliser ? En effet, même si dans les introductions de publications qui présentent des plateformes de détection, l'application est souvent assez bien ciblée en terme de biomarqueurs à doser et de pathologies à traiter, le rôle du biocapteur est souvent moins bien défini.

Pendley et Linder ont dernièrement parfaitement discuté le rôle que pouvait avoir le biocapteur en prenant le point de vue de l'utilisateur (le médecin) [31]. Ce qu'il ressort de leur étude est que la pertinence du recours à un biocapteur dépend moins de ses performances que de la prévalence de la maladie ciblée. En effet, parce que la sensibilité et la spécificité d'un capteur (*i.e.* la capacité à fournir des résultats positifs et négatifs valides) ne peuvent pas être parfaites, l'utilisation d'un capteur pour diagnostiquer une maladie de faible prévalence sur une large population semble inutile (les auteurs prennent l'exemple du diagnostic de la grippe pendant et hors période d'épidémie). Pire encore concernant le dépistage : il est par exemple vain d'imaginer pouvoir conduire un test routinier de dépistage du cancer du pancréas, faute d'avoir de multiples faux positifs à traiter (et dans ce cas, que communiquer au patient ?). Si par contre, on restreint le test à une population à risque, alors, l'analyse obtenue par le capteur aura plus d'utilité.

Dans le cas d'un biocapteur utilisé à des fins de suivi et de gestion de maladies, pour lequel on souhaite utiliser la valeur pronostic de l'analyse, il est capital de prendre en compte les performances de l'instrument tout autant que le contexte de l'analyse. Dans le cas de biomarqueurs extrêmement



dilués dans les échantillons à analyser, comme l'ADN circulant en oncologie, l'analyse sera probablement plus limitée par la méthode de prélèvement de l'échantillon que par les performances de la méthode de détection. De même, alors qu'il est évident que la limite de détection d'un capteur est une de ses caractéristiques principales qui est souvent la première mise en avant, tant que cette limite de détection est suffisante pour détecter le plus faible niveau d'analyte nécessaire à une décision clinique avec une incertitude minimale, il n'est pas nécessaire de l'optimiser. De plus pour que cette caractéristique soit pertinente, il faut qu'elle ait été mesurée en conditions réelles, c'est à dire sur l'échantillon final (*e.g.* détection dans du sérum et non dans un tampon). Malheureusement, les articles qui présentent des méthodes de détection rapportent souvent des valeurs de limites de détection sans justification de la méthode et du calcul utilisés pour leur détermination.

#### 1.4.2 Caractéristiques recherchées pour les analyses de biopsies liquides au chevet du patient

Le terme biopsie liquide est utilisé en cancérologie pour désigner un test effectué sur un fluide corporel en opposition à la biopsie classique qui consiste en un prélèvement d'un petit morceau d'organe ou de tissu. La biopsie liquide, et particulièrement la prise de sang, peut finalement être considérée comme le format d'échantillon le plus utilisé en analyse moléculaire. Le dosage de biomarqueurs dans les biopsies liquides à l'aide de capteurs au chevet du patient est particulièrement exigeant : le capteur idéal aurait ainsi pour caractéristiques d'être à la fois portable, bon marché, robuste, rapide, sensible, spécifique, multiplexe (*i.e.* permettant le dosage multi-analytes) et requérant un très faible volume pour l'analyse [11] ; l'ordre d'importance de ces critères variant bien entendu en fonction de l'application [32]. Nous allons discuter rapidement de l'importance de certains de ces critères ci-dessous.

##### 1.4.2.1 Une double nécessité : sensibilité et spécificité

Considérant le niveau de concentration des biomarqueurs cancéreux dans les biopsies liquides, qui est en dessous de  $\sim 100$  pM pour diagnostic positif du cancer de la prostate par dosage de la PSA et en dessous du pM pour les marqueurs miANRs du cancer du pancréas, il est évident qu'il est nécessaire de disposer de capteurs de grande sensibilité pour les applications en oncologie (à titre de comparaison, le taux de glucose dans le sang est au-dessus du mM). Les capteurs issus des nouvelles technologies affichent des sensibilités tout à fait appropriées (Figure 1.6), même si la diminution en taille des surface actives et la baisse des concentrations s'accompagnent également d'un temps d'analyse plus important [33]. Il convient également de noter que la mesure de très faibles concentrations rime avec un besoin d'analyser des volumes suffisamment grands pour minimiser les erreurs statistiques dues à l'échantillonnage et travailler dans un intervalle de confiance confortable, comme montré en Figure 1.7 [34].

La spécificité d'un biocapteur détermine sa faculté à éviter de délivrer des faux positifs. C'est donc une caractéristique cruciale. C'est la couche bioréceptrice, de par l'affinité des molécules sondes utilisées pour les cibles recherchées, qui fournit au biocapteur sa spécificité. Dans les échantillons complexes que sont les biopsies liquides, la présence de nombreuses molécules peut interférer sur la mesure par interactions non-spécifiques avec le capteur. La concentration de nombreuses protéines plasmatiques est de plusieurs ordres de grandeurs supérieure à celle des

biomarqueurs protéiques [35]. Aussi, même si l'affinité des molécules interférentes est très faible, elles sont source d'un bruit de fond biologique important, qui peut, comme indiqué sur la Figure 1.6 dépasser le nM [30]. La conséquence de ce bruit de fond est qu'il fait drastiquement chuter la sensibilité effective du capteur, comme cela a été montré lors du dosage de miARNs par hybridation réalisées à l'aide de microleviers en présence d'ARN totaux [36]. Il est donc important de minimiser l'influence de ce bruit de fond biologique, soit par mesure différentielle, soit par une préparation d'échantillon adaptée.

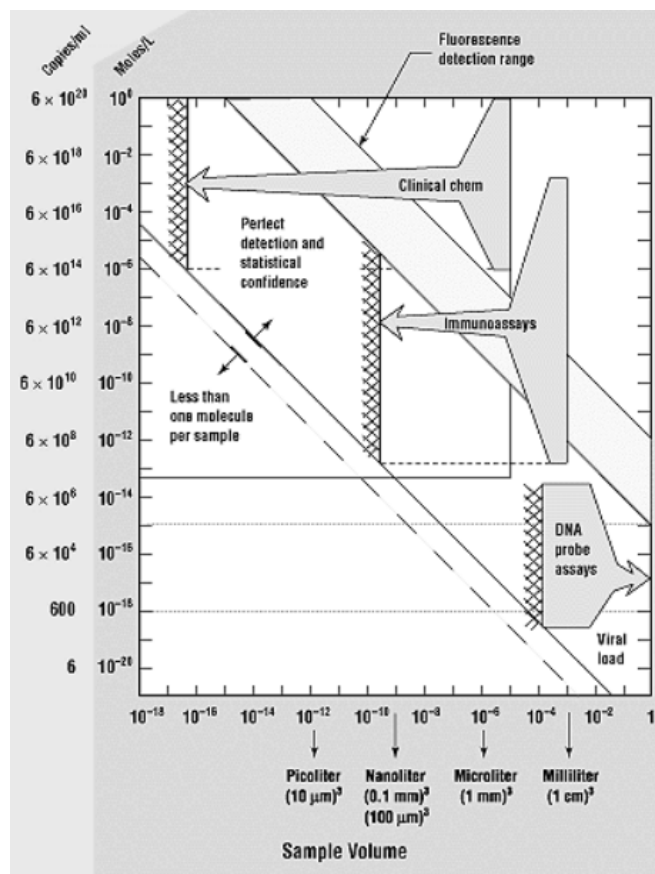


Figure 1.7 Augmentation du volume d'échantillon nécessaire à l'analyse lorsque la concentration des biomarqueurs diminue [34].

#### 1.4.2.2 Quid de la portabilité et du coût ?

Les travaux qui présentent des biocapteurs basés sur les micro- et nanotechnologies mettent toujours en avant les avantages que sont l'intégration et la réduction des coûts. Si le premier point peut en effet mener à des solutions portables, il convient de noter que contrairement au capteur lui-même, l'instrument est bien plus compliqué à miniaturiser [37]. Heureusement, la microfluidique apporte maintenant de nombreuses réponses à la miniaturisation par une approche type laboratoire sur puce [38]. Bien entendu, un capteur implantable doit obligatoirement être fortement miniaturisé, mais bien d'autres verrous limitent encore le déploiement de capteurs *in-vivo* pour le dosage de

biomarqueurs en cancérologie, comme la biocompatibilité et la robustesse du dispositif ou la fiabilité et la stabilité de la mesure.

Par ailleurs, il est important de s'accorder sur le fait que l'importance de ces critères est toute relative et dépend seulement de l'application visée. Ainsi, le coût d'un capteur jetable pour le diagnostic de maladies infectieuses dans des zones à risques est un critère déterminant et doit évidemment être le plus faible possible, ce qui n'est pas forcément le cas d'un capteur utilisé en milieu hospitalier pour accompagner un traitement anticancéreux [39]. A partir de cet exemple, d'autres caractéristiques et choix technologique peuvent être discutés en fonction du contexte applicatif, comme montré en Figure 1.8.

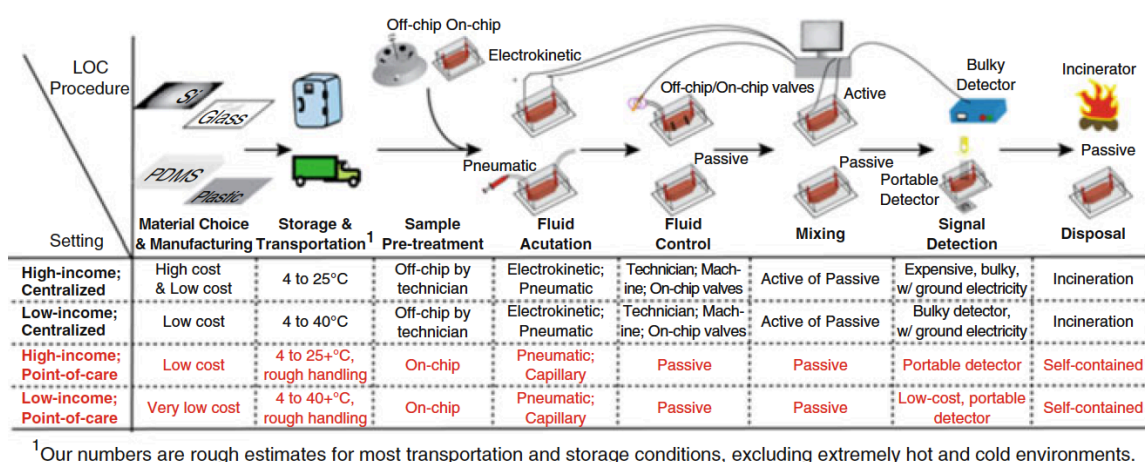


Figure 1.8 Pertinence des technologies d'analyse selon le contexte (centralisé ou au chevet du patient) et le niveau de ressources (revenu élevé ou faible revenu) [40].

#### 1.4.2.3 De l'importance de la mesure sans marquage et directe

La notion d'analyse sans marquage est un critère fort mis en avant par les outils issus des nouvelles technologies : l'idée ici est de n'avoir recours ni au marquage des molécules à détecter (modification de la cible, le plus communément par l'intermédiaire d'un marqueur fluorescent), ni à une amplification préliminaire ou à une révélation subsidiaire. Le premier avantage évident de la mesure directe est un gain de temps et une simplification de l'étape de préparation d'échantillon. Le deuxième avantage de la quantification directe est d'éviter tout biais de mesure qui peut être engendré par le marquage ou l'amplification. A noter que tout marquage peut affecter l'accessibilité de certains sites et donc changer la signature d'une molécule (son affinité avec des ligands). Le dernier avantage de la mesure directe est de permettre également de faire du temps réel, nous en discutons des avantages ci-dessous.

#### 1.4.2.4 Les avantages de la mesure en temps réel

Le premier avantage évident de la mesure en temps réel est la réponse rapide à la question analytique. Attention toutefois, cette remarque n'est valable que si le temps gagné pendant l'analyse ne se fait pas au détriment du temps nécessaire à la préparation d'échantillon. Le deuxième

avantage est d'avoir un accès direct à l'affinité de la cible pour la sonde par l'intermédiaire des constantes cinétiques déterminées lors de l'association et de la dissociation du couple. Cela permet par exemple de discriminer des séquences d'oligonucléotides qui diffèrent seulement d'une paire de base et qui ont donc des affinités très proches pour la sonde complémentaire. Enfin, par rapport à une détection en point final (« endpoint »), le temps réel permet également d'augmenter la plage dynamique de la mesure (en passant par la vitesse de réaction qui dépend de la concentration et non par le signal de saturation à l'équilibre) et la sensibilité (par l'intégration d'un grand nombre de points de mesure).

#### 1.4.2.5 De l'importance du dosage multiplexe

Le dosage du taux de PSA dans le sang est utilisé depuis les années 80 pour réaliser le dépistage précoce du cancer de la prostate avant apparition de signes cliniques. Seulement, un niveau de PSA élevé n'est pas spécifique du cancer mais marque simplement la présence d'une anomalie de la prostate. Ainsi, le diagnostic doit être confirmé ou infirmé par le biais d'autres analyses ou examens cliniques. Si ce test est d'une grande utilité vu la prévalence du cancer de la prostate et l'évolution lente de cette maladie, il apparaît maintenant évident que le recours à de multiples biomarqueurs permet d'avoir des informations plus précises sur la présence et le stade d'un cancer. Le test CancerSEEK introduit en 2018 [41], illustre parfaitement ce propos : un dosage de 8 protéines circulantes et la recherche de mutations sur l'ADN tumoral circulant à partir de 61 amplicons (tout de même !) s'est révélé pouvoir diagnostiquer la présence d'un cancer (parmi 8 types de cancers) avec une sensibilité au-dessus de 70% et une spécificité supérieure à 99% (sur un échantillon de 1005 patients).

A plus long terme, il paraît maintenant évident que le futur de l'analyse des biopsies liquides pour des fins médicales passera par l'application de l'apprentissage automatique, rendue possible par l'explosion de la puissance de calcul, aux plateformes de biodétection [42]. La mesure et l'analyse par corrélation plutôt que par causalité d'une signature obtenue par dosage couplé d'un nombre important de molécules, qui plus est de nature différente, permettra de s'affranchir des hétérogénéités pathologiques et des différences entre individus, ouvrant la voie à la démocratisation de la médecine personnalisée et à la découverte de nouveaux marqueurs.

En attendant, pouvoir détecter plusieurs molécules sur une même plateforme est une nécessité absolue en pratique afin de fournir au moins une référence et pouvoir s'affranchir du bruit de fond biologique évoqué plus haut. Idéalement, il serait également opportun d'avoir un moyen d'étalonner le capteur par dosage de molécules présentent à concentrations stables dans les échantillons analysés (ce qu'en anglais, on nomme « housekeeping molecules », comme le gène codant pour la protéine structurale  $\beta$ -Actin utilisé comme contrôle en RT-PCR). Le multiplexage pose de réels défis technologiques : au-delà de fabriquer des capteurs multiples sur une même puce, il faut pouvoir les interroger individuellement, et traiter la disparité des sensibilités de réponse. De plus, cela nécessite de fournir des solutions de biofonctionnalisation permettant le greffage de plusieurs sondes sur une même surface.

### 1.4.3 Rôle et importance des étapes pré-analytiques

La préparation d'échantillon consiste à rendre un échantillon biologique compatible avec la technique d'analyse ciblée par l'intermédiaire d'étapes de purification, de resuspension, et de modifications biochimiques (digestion enzymatique, marquage, *etc.*). Ces étapes font couramment appel à la centrifugation, la séparation de phases et des kits d'extraction. Elles entraînent généralement une dilution de l'échantillon ce qui n'est évidemment pas favorable lorsque l'on souhaite doser des biomarqueurs de faible concentration. La plupart des étapes de préparation d'échantillon ne sont pas automatisées et les résultats obtenus dépendent fortement de l'expérimentateur et du protocole suivi. De plus, il est maintenant démontré que malgré le recours à des solutions commerciales, la grande variabilité de leurs performances – comme par exemple le taux de rendement des kits d'extraction de miARNs [43] – a une grande influence sur le résultat des analyses. Ainsi, les étapes pré-analytiques, dont la préparation d'échantillon, sont reconnues comme la source prédominante d'erreurs en médecine de laboratoire [9]. De ce fait, la nécessité d'améliorer les procédures pré-analytiques a été soulignée dans un certain nombre d'études sur les méthodes de diagnostic [44].

Du point de vue du biocapteur, il est primordial de détailler et de prendre en compte les procédés de préparation d'échantillon pour évaluer correctement les performances d'une technique d'analyse, en particulier si on se réfère au temps d'analyse et à la sensibilité. Il y a un intérêt avéré à minimiser/simplifier la préparation d'échantillon et à effectuer un maximum d'étapes au plus près du biocapteur. Les protocoles de purification classiques, comme celui décrit par Kim *et al.* pour l'extraction d'acides nucléiques sont longs et utilisent de larges volumes, ils sont donc tels quels peu adaptés à une miniaturisation et une intégration sur puce [45]. Comme nous le verrons dans le chapitre 3, on trouve maintenant dans la littérature de nombreuses solutions technologiques permettant d'intégrer des fonctions pré-analytiques spécifiques sur puce, même si on peut encore considérer que la préparation d'échantillon est un vrai frein au déploiement des biocapteurs au chevet du patient [46].

Enfin, il est évident que la préparation doit être adaptée à la technique d'analyse. Ainsi celle-ci impose un cahier des charges bien spécifique, plus ou moins contraignant, en terme de format et de composition d'échantillon. Par exemple, l'amplification d'acides nucléiques par PCR exige la présence de nombreuses biomolécules en solution (amorces, polymérase, mélange des quatre désoxyribonucléotides), la détection électrique directe sur nanofils de silicium ne peut s'effectuer que dans des tampons de faible force ionique qui offrent une longueur de Debye assez grande [47], et le dosage par microrésonateurs mécaniques est largement influencé par la viscosité de la solution [48]. A cet égard, vu que les liquides physiologiques présentent des viscosités proches de celle de l'eau, cette dernière technologie est particulièrement adaptée à l'analyse de biopsies liquides avec une préparation d'échantillon minimale, comme démontré par l'équipe de Raj Mutharasan pour le dosage direct de miARN dans du sérum [49]. Ainsi, parmi les solutions offertes par les nouvelles technologies, certains biocapteurs offrent des avantages indéniables au regard des exigences pré-analytiques et de ce fait sont plus ou moins susceptibles de fournir des instruments d'analyses réellement nomades.

Il est important de mentionner ici que dans le cadre de la thèse de Jean Cacheux, codirigée par Pierre Cordelier du CRCT, qui visait à développer une plateforme de dosage direct de miARNs pour

la prise en charge du cancer du pancréas (plateforme que nous présenterons dans le prochain chapitre), nous avons exploré des pistes pour simplifier l'extraction de miARNs endogènes (résultats décrits dans le manuscrit de thèse [28]). En faisant le constat que les miARNs circulants sont en interaction avec des protéines et présents dans les exosomes [50], ce qui leur permet d'être protégés et de ne pas être dégradés par les RNases présentes dans les fluides corporels, nous avons mis en place un protocole minimaliste de préparation de plasma sanguin afin de rendre disponible les miARNs pour analyse. Notre protocole repose sur un choc thermique qui permet de libérer les miARNs présents dans les exosomes. Plus spécifiquement, nous traitons tout d'abord le plasma à la protéinase K pour digérer les protéines présentes dans le plasma, puis nous ajoutons du DTT à 10 mM pour inhiber de manière irréversible les RNases. L'échantillon est ensuite monté à 95°C pour dégrader les exosomes et une centrifugation est effectuée pour supprimer les agrégats protéiques. L'avantage principal de ce protocole est d'éviter toute dilution ou perte d'oligonucléotides qui sont inhérentes à une préparation d'échantillon impliquant des étapes de séparation chimique ou de purification sur colonne [51]. Mais il faut bien l'avouer, même si ce protocole est simple, il reste chronophage et peu adapté à l'intégration sur puce.

#### 1.4.4 Du manque de standardisation

La littérature concernant les biocapteurs basés sur les micro- et nanotechnologies pour l'analyse moléculaire est maintenant extrêmement riche. Cependant, il est parfois difficile de s'y retrouver tant les configurations expérimentales de dosage sont variées pour chaque moyen de transduction. Par exemple, dans une publication parue en 2014 faisant l'état des lieux des différentes techniques de dosage de miARN sans amplification, les résultats des différentes études présentées sont énumérés et commentés [32]. Seulement, à part dissenter sur les avantages et inconvénients de chaque plateforme (ce qui est déjà tout de même très informatif), il est difficile de faire une comparaison quantitative de leurs performances (sensibilité, limite de détection, temps d'analyse, volumes requis, *etc.*). Cela vient en grande partie du manque d'uniformisation et de normalisation des échantillons testés qui concerne tout autant la source et la préparation des échantillons que le choix des molécules recherchées. Bien qu'il y ait eu des tentatives d'organiser des tests comparatifs de biocapteurs, comme le EILATox-Oregon Biomonitoring Workshop qui s'est tenu en 2004 [52], cette solution semble compliquée à rendre systématique et à appliquer à l'échelle du nombre de groupes de recherches qui proposent des solutions analytiques. Une alternative consiste alors à réaliser des analyses comparatives avec des techniques standards, même si cette approche se heurte justement aux limites (notamment de détection) des appareils utilisés actuellement. Pourrait-on alors imaginer avoir recours à des échantillons étalons mis à disposition des différents laboratoires de recherche ?

## 1.5 Conclusions

Afin de permettre l'avènement de la médecine personnalisée et les promesses qui l'accompagnent en terme d'amélioration du bien-être du patient et de la baisse des coûts des soins médicaux, il est nécessaire de développer des nouveaux dispositifs de dosage et de reconnaissance moléculaire performants, portables et bas coût permettant de démocratiser les analyses biomoléculaires à partir de prélèvements non-invasifs.

Alors que la communauté scientifique avait prédit que les micro- et nanotechnologies allaient modifier notre approche de la biologie [53], force est de constater que nous sommes encore loin de la révolution annoncée : peu de nouveaux dispositifs médicaux sont aujourd'hui issus des nouvelles technologies. Pire encore, on se rend compte de l'impossibilité de proposer une réponse technologique standard et générique, contrairement à ce qui a fait le succès de la microélectronique, ce qui rend le parallèle entre les deux mondes compliqué, même si il y a une filiation technologique. Ce constat pourrait donner l'impression d'avoir survécu l'impact de ces technologies dans le domaine de l'aide au diagnostic et de ne pas avoir tenu nos promesses – cela pourrait déstabiliser le grand public et influencer les politiques qui contrôlent les sources de financement, ce qui est d'autant plus préjudiciable à l'heure où les projecteurs se braquent sur les tissus et organes sur puce dans le but de répondre à des questions fondamentales en biologie et de développer de nouveaux traitements, avec le rêve à peine voilé de pouvoir un jour s'affranchir du modèle animal.

Il est important toutefois de tempérer cette analyse. En effet, le succès retentissant du capteur de glucose *in-vivo* a changé la vie de nombreux diabétiques à travers le monde et montre l'exemple à suivre : quelle avancée incroyable qui était confinée dans le domaine de l'abstrait il y a quelques décennies ! Toujours est-il que dans son excellent éditorial paru en août 2013 dans *Angewandte Chemie International Edition*, Otto Wolfbeis se demande pourquoi le développement de nouvelles sondes moléculaires ne s'accompagne pas du déploiement généralisé de biocapteurs si, comme certains le pensent, ce n'est seulement qu'une question d'ingénierie. Il note que les chercheurs qui proposent de nouveaux capteurs doivent se poser les bonnes questions : « 1) Sera-t-il possible de surveiller l'évolution du paramètre biochimique dans le temps, par exemple dans la circulation sanguine (...) ? 2) Est-ce que le capteur fonctionnera en continu jusqu'à 12 heures pour une utilisation en chirurgie, jusqu'à 2 semaines pour la surveillance dans un bioréacteur (...) ? 3) Répondra-t-il de façon réversible comme un capteur de température, d'oxygène ou de pH ? » [54].

Alors, quels sont les points bloquants, pourquoi un tel décalage entre les promesses et la réalité ? Pendant de nombreuses années, la tendance bibliographique sur les biocapteurs issus des nouvelles technologies suivait une course à la limite de détection, sans toujours être en lien avec les besoins applicatifs concrets et les problèmes posés par la composition des échantillons et l'environnement de détection. Ce n'est heureusement plus le cas : en témoigne le bel exemple d'un capteur HEMT qui fait appel à une configuration de grille spécifique pour s'affranchir des limites de la détection électrique qui nécessite usuellement de travailler à faible force ionique et qui permet ainsi de doser la troponine I, un marqueur cardiaque, directement dans des solutions physiologiques sous un format réellement intégré avec validation des résultats sur échantillons cliniques à l'aide d'un instrument commercial [55].

Ainsi, pour fournir des outils qui puissent assister la décision médicale au plus près du patient, d'autres critères que la sensibilité doivent être respectés : portabilité, bas coût, préparation d'échantillon minimale et générique, approche multiplexe permettant d'accéder à une signature précise avec référence et étalonnage intégrés. Afin de répondre à ces critères, il est important de concevoir les outils dans leur ensemble au-delà du capteur et de sa sensibilité : comment intégrer, fonctionnaliser, passiver et stocker le capteur, comment multiplexer la mesure, quelle préparation d'échantillon utiliser ou adapter, comment standardiser les protocoles de mesure? Même si les pistes avancées dans ce manuscrit sont loin de fournir des solutions d'analyse clé en main, et de

répondre aux questions formulées ci-dessus, ces aspects motivent l'orientation des recherches présentées dans les chapitres suivants.





## 2 De l'intérêt du confinement fluide pour l'analyse moléculaire

### 2.1 Introduction

#### 2.1.1 De la micro- à la nanofluidique, la réduction d'échelle

La microfluidique est apparue dans les années 80 à partir de l'héritage technologique de la microélectronique, se distinguant néanmoins de celle-ci par le fait que ce ne sont pas des charges électriques mais des fluides qui sont traités : George Whitesides l'a en effet définie comme « la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides ( $10^{-9}$  à  $10^{-8}$  litres), en utilisant des canaux de la dimension de quelques dizaines de micromètres » [56]. Plus d'une décennie après la réalisation du premier système microfluidique sur silicium pour la chromatographie en phase gazeuse [57], Andrea Manz a proposé en 1990 le concept de microsystème d'analyse totale (« micro total analysis system »,  $\mu$ TAS) ou laboratoire sur puce (« lab-on-a-chip ») qui vise à intégrer des étapes pré-analytiques et analytiques, *e.g.* séparation, réactions biochimiques, biodétection, sur une même puce pour des applications dans des secteurs aussi variés que l'environnement, l'énergie, la pharmacologie, et la médecine [58]. L'idée est de profiter des avantages liés à la réduction d'échelle offerts par la microfluidique : efficacité et vitesses de réactions accrues dans les petits volumes, faible consommation de réactifs, contrôle précis de la localisation dans l'espace et le temps des particules/entités diluées à l'aide des flux laminaires caractéristiques des canaux micrométriques, mais aussi faible coût et taille réduite des dispositifs. En particulier, l'utilisation de la microfluidique couplée à des systèmes de biodétection a conduit à l'augmentation des performances des biocapteurs en s'affranchissant des limites imposées par la diffusion des espèces à analyser vers les surfaces sensibles, permettant notamment de diminuer les temps d'analyse [59]. La boîte à outil microfluidique est maintenant très étoffée avec l'utilisation de nouveaux matériaux (polymères) pour la réalisation des systèmes fluidiques, l'intégration de multiples fonctions à l'aide de capteurs et d'actionneurs (*e.g.* micro-valves, micro-pompes, mixeurs), et le développement de nouveaux concepts comme la microfluidique digitale [60], permettant ainsi la concrétisation de modules opératoires qui peuvent être combinées sur une même plateforme pour répondre à une application analytique précise [61].

Les progrès réalisés en nanofabrication ont plus récemment permis la réalisation de systèmes fluidiques aux dimensions réduites et bien définies. La nanofluidique est généralement définie comme l'étude et l'application des écoulements de fluides dans des dispositifs nanométriques dont la taille varie de 1 à quelques 100 nm dans au moins une dimension [62], échelle comparable aux macromolécules (Figure 2.1). La nanofluidique ne se présente pas seulement comme une simple miniaturisation des systèmes microfluidiques existants, mais aussi comme un outil pour l'étude et la mise à profit de phénomènes particuliers amplifiés ou apparaissant à l'échelle nanométrique [63], ou dans les nano-espaces étendus (dont la taille est comprise entre celle des systèmes nano- et microfluidiques [64]). En effet, la combinaison de mécanismes divers, comme le tamisage d'Ogston, le piégeage entropique et les effets de répulsion électrostatique sont par exemple utilisés dans les canaux nanofluidiques pour séparer des macromolécules en fonction de leur taille en s'affranchissant des gels [65], [66]. Il est aussi possible de concentrer localement des biomolécules à l'aide des effets d'exclusion ionique dus au recouvrement des doubles couches électriques observé dans les

nanocanaux [67], [68]. Les systèmes nanofluidiques permettent également la manipulation de molécules uniques pour réaliser des études biophysiques de manière contrôlée et reproductible et de ce fait, la dynamique des polymères dans des environnements confinés a largement été étudié à l'aide de molécules d'ADN.

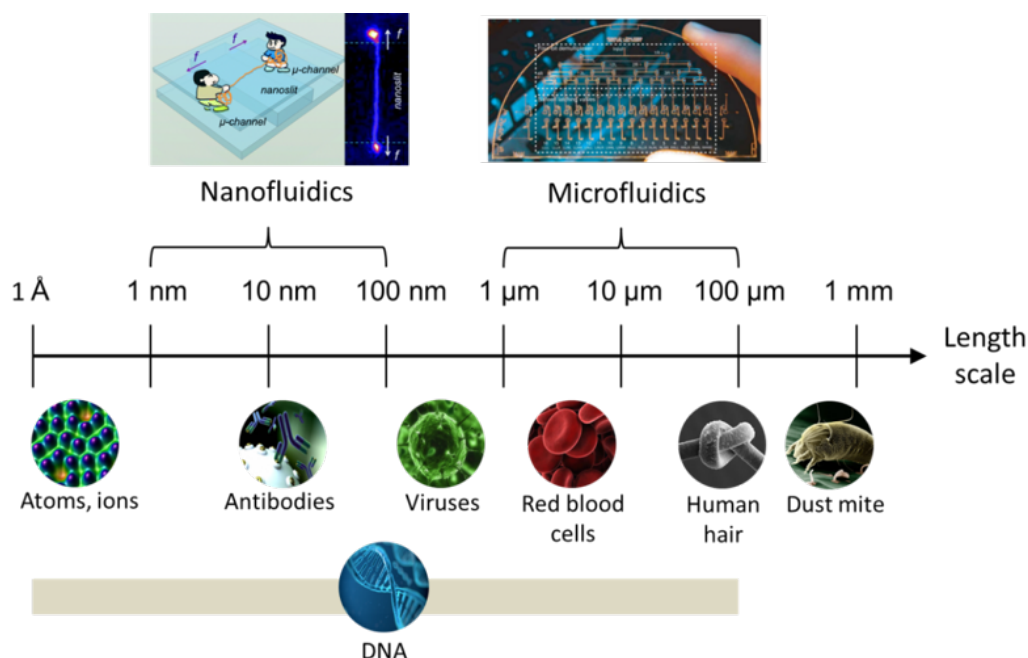


Figure 2.1 Schéma représentant la taille typique des systèmes fluidiques ainsi que celles d'objets biologiques (adapté de [60], [69], [70]).

### 2.1.2 Nanofluidique et biocapteurs

Au-delà des systèmes d'analyse par séparation en taille mentionnés dans la section précédente, la nanofluidique a aussi été utilisée pour développer des systèmes d'analyse moléculaires spécifiques. Deux attributs particulièrement avantageux sont mis à profit : d'une part, la diminution du volume et du nombre de molécules observés conduit à l'augmentation de la résolution spatiale et du rapport signal sur bruit de l'imagerie par fluorescence, permettant ainsi de visualiser jusqu'à la molécule unique [71]. D'autre part, le confinement spatial et la diminution des longueurs de diffusion entraînent une augmentation de la probabilité d'interactions entre les objets dilués, pouvant conduire à des perturbations observées dans les équilibres de réactions [72], [73]. En effet, les effets de confinement spatial sur les interactions moléculaires montrent explicitement un décalage de l'équilibre de réaction vers la formation de produits [74]. Le mode de transduction le plus utilisé en biodétection est la mesure de fluorescence : ainsi, l'étirement de brins d'ADN dans les nanocanaux couplé à des techniques de marquage permettent de localiser précisément des interactions moléculaires mais aussi de déterminer la position et la séquence spécifique de certains gènes [75]–[78]. L'autre mode de transduction utilisé dans les systèmes nanofluidiques est la mesure électrique qui, contrairement à la fluorescence, autorise une détection sans marquage. Par exemple, la mesure du temps de résidence d'une molécule qui engendre pendant son passage une

modification du courant ionique à travers un nanopore synthétique (inspiré des pores transmembranaires [79]) permet de déduire des informations sur sa taille ou la présence de complexes en solution [80], [81]. Il est même possible de séquencer l'ADN en mesurant le courant tunnel qui passe par la molécule en translocation à travers le nanopore [82]. Enfin, après fonctionnalisation adéquate des parois du nanopore, il est aussi possible de faire de la détection spécifique de molécules [83], [84] (une approche utilisant la mesure par fluorescence existe également pour la détection de polymorphisme nucléotidiques [85]). Des travaux ont également exploité l'intégration de biocapteurs dans des nanocanaux pour s'affranchir des limites imposées par la diffusion. Parmi les exemples les plus probants, on peut citer les travaux de l'équipe de Takehiko Kitamori de l'Université de Tokyo qui a développé un capteur immunologique à lecture par fluorescence [86], ainsi que ceux de Philippe Renaud à l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne et de Jongyoon Han au Massachusetts Institute of Technology qui, profitant du fait que la conductance de nanocanaux dépend des charges de surface et donc de réactions sur les parois [87], ont utilisé la mesure d'impédance pour détecter l'adsorption de BSA dans des nanocanaux et la capture de streptavidine à l'aide de molécules de biotine préalablement immobilisées [88], [89]. Il est important de noter que certaines de ces technologies ont déjà donné lieu à des transferts industriels chez Bionano [90], Oxford Nanopore Technology [91], ou encore Abionic [92].

La réalisation de biocapteurs intégrés au sein de dispositifs nanofluidiques pose de vrais défis technologiques, parmi lesquels l'étape de scellement est particulièrement critique en raison des risques de déformation ou de bouchage des canaux [93]. Il existe plusieurs méthodes d'encapsulation de nanocanaux basées soit sur l'évaporation, la pulvérisation ou la fusion d'une couche pour réaliser l'étanchéité [94]–[97], soit par collage (assisté par température, plasma ou UV) de dispositifs polymères obtenus par moulage [98]–[100]. Cependant, aucune de ces méthodes d'encapsulation n'est compatible avec l'utilisation de surfaces préalablement biofonctionnalisées. L'étape de greffage des biomolécules peut, quant à elle, être réalisée avant ou après le procédé de scellement. La fonctionnalisation *in situ*, effectuée une fois les nanocanaux scellés, peut être conduite soit en faisant circuler des molécules modifiées avec des groupes chimiques fonctionnels qui réagissent avec la surface du canal [88], soit en induisant des réactions chimiques *in situ* [101], ou encore par l'intermédiaire de petits objets fonctionnalisés pouvant être ensuite acheminés dans des endroits spécifiques des nanocanaux [102]. Cependant, l'incapacité à induire des flux importants alors que la taille des systèmes fluidiques diminue empêche l'utilisation efficace de protocoles de greffage qui requièrent de nombreuses étapes de lavage. Il est également compliqué de fonctionnaliser de manière isolée plusieurs zones pouvant comporter différents types de molécules en vue d'une détection multiplexe. Pour ces raisons, il est préférable de greffer les molécules avant de sceller les canaux. Cependant, cette stratégie impose des contraintes sur le procédé de collage qui ne peut faire appel à l'utilisation de hautes températures, de plasma oxygène ou d'irradiation UV sous risque de provoquer la dénaturation irréversible des molécules, en particulier des protéines [103]. Ainsi, on trouve maintenant des exemples de procédés basse température [104], [105], dont certains permettent de réaliser une partie du protocole de greffage avant scellement [86].

Au cours de mon séjour post-doctoral dans le Nanobioscience lab à l'Institut de Physique de l'Academia Sinica, j'ai adapté une technique de scellement de nanocanaux fluidique, préalablement développée par Chia-Fu Chou [106], pour la rendre compatible avec l'intégration de molécules biologiques [107]. Ces travaux ont permis de réaliser des biocapteurs intégrés dans des canaux

nanométriques et sub-microniques se rapprochant plus du format puces à ADN ou protéines couplé à de la fluidiques que les systèmes nanofluidiques présentés ci-dessus qui sont finalement plutôt adaptés à l'analyse de molécules uniques présents dans de très faibles volumes. Les effets typiques liés au confinement fluide qui seront décrit en détails ci-après, *e.g.* réduction du bruit de fond de fluorescence dans un système fortement limité par la convection des espèces à analyser, ont été observés lors d'expériences préliminaires de détection de courtes séquences d'oligonucléotides conduites lors de mon post-doc [108]. Suite à ces premiers résultats, j'ai exploité la possibilité d'utiliser cette plateforme nanofluidique pour l'étude d'interactions moléculaires. Ces travaux, qui sont détaillés dans la suite de ce chapitre, ont été réalisés dans le cadre d'un projet ANR blanc international France-Taiwan (ANR-13-IS10-0001 2014-2017) en étroite collaboration avec l'équipe de Chia-Fu Chou à l'Academia Sinica et de Martine Pugnère de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM) et ont fait l'objet d'un brevet publié en Europe, en Chine et aux Etats-Unis. Les résultats présentés ici ont été obtenus dans le cadre des thèses de doctorat de Pattamon Teerapanich (2011-2015, [109]) et de Jean Cacheux (2014-2018, [28]).

## 2.2 Présentation de la plateforme nanofluidique

### 2.2.1 Caractéristiques et avantages du confinement fluide

Quand on considère le cas d'un biocapteur, *e.g.* une surface biofonctionnalisée, intégré dans un canal fluide (Figure 2.2), il est important d'avoir une idée des flux qui régissent la réponse du capteur et de connaître le régime dans lequel s'opère la reconnaissance biologique. Pour ce faire, il est utile de définir plusieurs grandeurs sans dimensions caractéristiques du système fluide : le nombre de Péclet ( $Pe_H$ ) qui permet de comparer la vitesse de transport des molécules par convection le long du canal à la diffusion des molécules dans l'épaisseur du canal, le nombre de Damköhler ( $Da$ ) qui relie taux de convection et vitesse de réaction en surface entre les molécules immobilisées sur le capteur et les cibles injectées, ainsi que la taille relative du capteur par rapport aux dimensions du canal. Ces grandeurs sont définies ci-dessous :

$$Pe_H = \frac{U_m h}{D} \quad (2.1)$$

$$Da = \frac{k_{on} b_m h}{D} \quad (2.2)$$

$$\lambda = \frac{l}{h} \quad (2.3)$$

où  $U_m$  est la vitesse moyenne du flux (induit soit par la différence de pression établie entre l'entrée et la sortie du canal soit par un actionnement électrophorétique ou électroosmotique),  $D$  est la constante de diffusion des molécules,  $k_{on}$  est la constante d'association des molécules cibles/sondes,  $b_m$  est la densité de molécules sondes greffées sur le capteur,  $l$  est la longueur du capteur et  $h$  est la hauteur du canal.

Ainsi, suivant les dimensions du canal et du capteur, des valeurs du flux induit ainsi que de la force de l'interaction moléculaire étudiée, la réponse du capteur peut être limitée soit par la diffusion, la convection ou la réaction. Les différents cas de figure ont été très bien traités théoriquement et décrits en détails par Squires [110], et en général, dans les systèmes microfluidiques, les flux engendrés sont importants et  $Pe_H \gg 1$  ce qui permet, comme montré en Figure 2.2a, d'avoir une concentration d'analytes homogène au-dessus du capteur et ainsi de limiter la diffusion des espèces en surface du capteur et de travailler en limite de réaction. Cependant, cela implique également que nombre de molécules cibles passent sur le capteur sans interagir et donc sans être interrogées. Quelles sont maintenant les implications qu'engendrent une diminution drastique de la hauteur du canal fluidique ?

Dans un canal nanofluidique, dans lequel il est difficile d'engendrer des flux importants et les temps de diffusion des espèces à travers le canal sont négligeables, on travaille à nombre de Péclet faible. Par ailleurs, dans le cas où la taille du capteur reste importante en regard de la taille du canal ( $\lambda \gg 1$ ), alors, les molécules sont toutes collectées par le capteur. Cela engendre une zone de déplétion qui se forme sur toute la hauteur du nanocanal lorsque l'analyte réagit avec son récepteur sur la surface (Figure 2.2b). En comparaison, cette zone de déplétion se forme sur toute la surface proche du capteur dans le cas de systèmes microfluidiques. Ainsi, dans ce régime fortement limité par le transfert de masse, il est possible d'observer un front d'analyte qui se déplace le long du capteur dans le sens du flux convectif mais à une vitesse bien moindre [111]. Cet effet peut bien entendu être observé dans des systèmes microfluidiques, mais dans des conditions particulières de très faible flux [112]. Par contre, dès que les dimensions du capteur approchent de celles du canal, nous retrouvons un régime plutôt dominé par la réaction en surface du capteur.

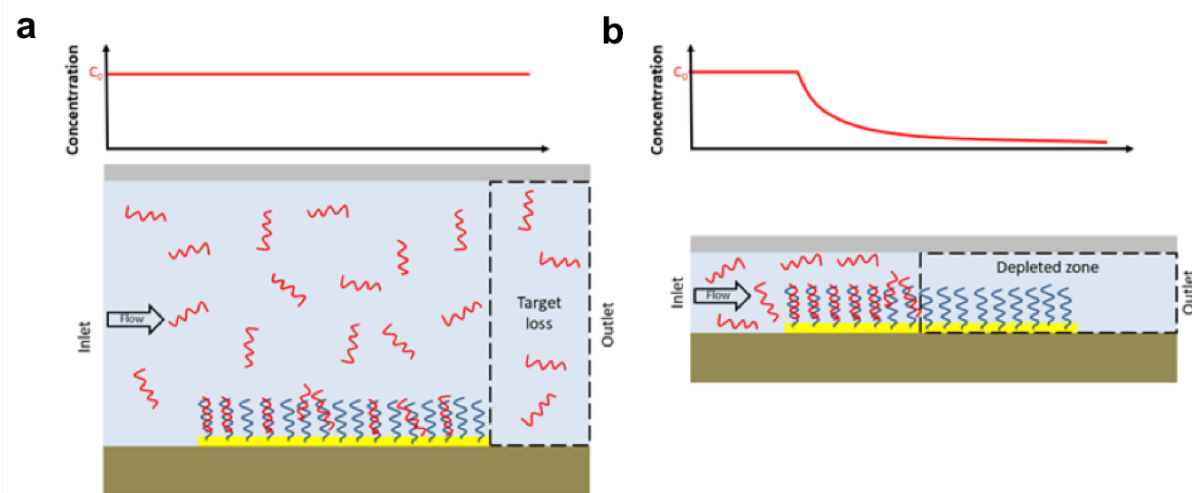


Figure 2.2 Différences et implications de la réduction de la hauteur de canal sur la capture de biomolécules dans (a) un système microfluidique et (b) une plateforme nanofluidique. Au-dessus du canal est tracé le profil de concentration d'analytes le long du capteur.

L'originalité de notre approche est d'intégrer un capteur de dimensions importantes par rapport à la taille du canal mais spatialement résolu ce qui permet de se placer dans les deux régimes limites à la fois lors d'une seule et même mesure. Le biocapteur est constitué d'une surface

biofonctionnalisée de grandes dimensions intégrée au nanocanal couplée à une lecture en fluorescence des cibles marquées : ainsi, en utilisant un microscope et une caméra CMOS ou CCD, on peut obtenir une résolution spatiale très importante, de l'ordre de la taille du nanocanal. L'utilisation d'une fluide miniaturisée confère ainsi à notre plateforme de détection, les caractéristiques spécifiques suivantes :

- **Réponse du capteur en temps réel** - puisque le signal de fluorescence des molécules cibles marquées en solution (et donc le bruit de fond) diminue avec la hauteur du canal fluide, la fluorescence mesurée au niveau du capteur peut être directement corrélée au nombre de molécules cibles capturées.
- **Procédure de rinçage simplifiée** - le phénomène de déplétion de la solution dû à la collecte des cibles sur le capteur permet d'avoir un front bien défini et peu rapide entre la solution contenant les analytes et la solution appauvrie (tampon). Ainsi, pour effectuer le rinçage du capteur, il suffit d'inverser le flux dans le nanocanal pour faire passer le tampon présent dans le canal de sortie sur le capteur.
- **Capteur résolu pour la mesure cinétique** - en opérant en régime limité par la vitesse de réaction il est aisé de dériver à partir de la réponse locale du capteur, *i.e.* au niveau du pixel, les constantes d'interaction cinétiques avec un simple modèle analytique (isotherme de Langmuir appliqué à une réaction du pseudo-premier ou second ordre) qui ne tient pas compte des effets de diffusion et de convection. De plus, la multiplication des points de mesure offerts par l'image permet de diminuer le bruit de mesure.
- **Collection totale de cibles sur la totalité du capteur** - le régime opératoire du transfert de masse est particulièrement adapté à l'analyse de faibles volumes et d'échantillons pauvres en analytes. Par ailleurs, la déplétion de la solution engendre une concentration en molécules cibles non-homogène sur la surface totale du capteur et donc des conditions de réactions variables : comme je le décrirai en section 2.5, cet effet peut être avantageusement mis à profit pour améliorer les temps d'analyse.

### 2.2.2 Mise en œuvre technologique

La réalisation des dispositifs nanofluidiques repose sur une méthode de scellement par collage effectué à partir d'une fine couche de polymère appliquée sur un support solide et activée par plasma oxygène (Figure 2.3a). Le procédé que j'ai proposé diffère du protocole classique par le fait que seule la pièce qui permet de sceller les canaux est activée par plasma (traitement asymétrique), ce qui permet de rendre la méthode compatible avec l'utilisation de surfaces biofonctionnalisées. Ce protocole a été utilisé avec deux polymères à fort module d'Young relativement au polydiméthylsiloxane (PDMS) classiquement utilisé en microfluidique, donc adaptés à la nanofluidique : le polysilsesquioxane (PSQ) et le hard-polydiméthylsiloxane (h-PDMS).

Les dispositifs nanofluidiques ont été réalisés sur substrat verre ou silicium permettant un grand contrôle des dimensions des nanocanaux avec un large éventail de rapports de forme sans risque de déformations. Pour pouvoir visualiser les interactions par microscopie à fluorescence, la puce contenant les nanocanaux a été encapsulée avec une lamelle en verre recouverte de la couche de polymère servant d'adhésif (Figure 2.3b). Par ailleurs, afin de définir les capteurs, des plots d'or ont été déposés dans les nanocanaux en vue d'un greffage localisé des biorécepteurs. La fabrication

des puces nanofluidiques, détaillée en Figure 2.3c, est principalement basée sur les procédés classiques de micro-fabrication : lithographie optique pour définir les dimensions des canaux, gravure sèche pour réaliser les nano- puis microcanaux, oxydation thermique pour rendre les puces hydrophiles, dépôt d'or pour définir les capteurs, et enfin perçage des entrées/sorties fluidiques par sablage. Dans le cadre de ces travaux, nous avons fabriqué des nanocanaux dont une seule dimension (la hauteur du canal) est cantonnée à l'échelle nanométrique/sub-micrométrique (ces canaux peuvent donc être nommés nanofentes). Un dispositif typique se compose de plusieurs nanocanaux en parallèle (450 nm de hauteur, 500  $\mu\text{m}$  de longueur et 50  $\mu\text{m}$  de largeur), connectés à deux microcanaux (hauts de 5  $\mu\text{m}$  et larges de 400  $\mu\text{m}$ ) qui permettent de transporter l'analyte et les réactifs d'une manière rapide et facile au cours des expériences. Quatre capteurs (plots d'or fonctionnalisés de 50  $\mu\text{m}$  par 50  $\mu\text{m}$ ) sont arbitrairement intégrés dans chaque nanocanal.

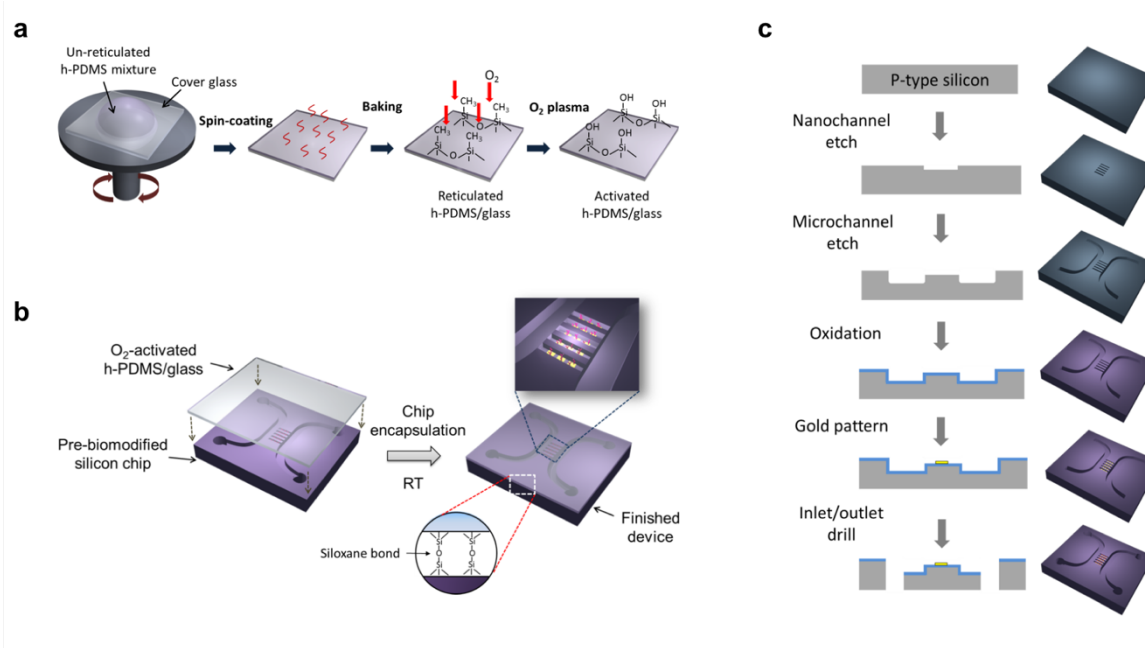
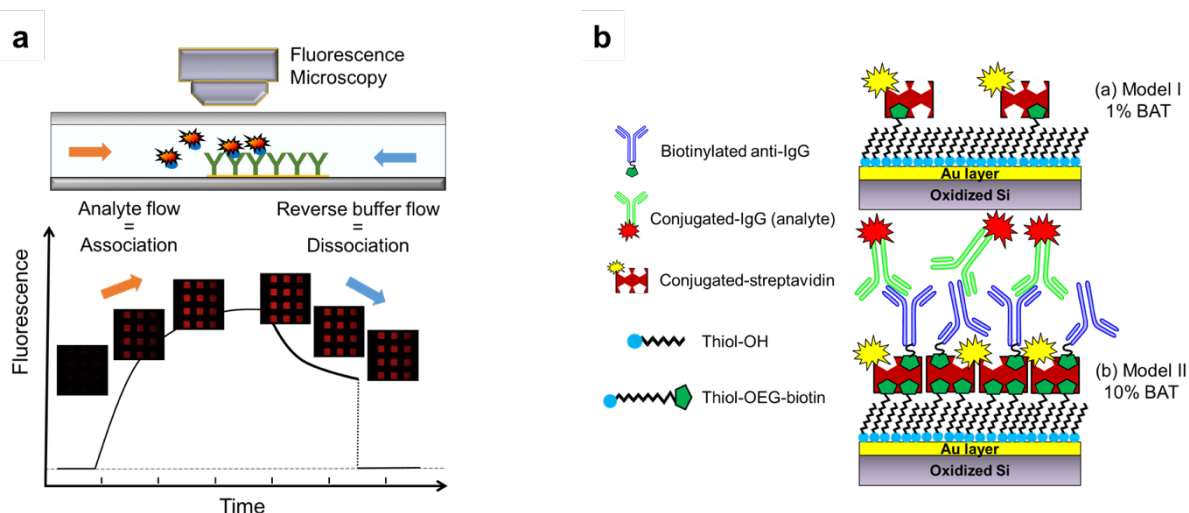


Figure 2.3 Schémas du procédé de fabrication de la pièce de scellement (a) et de la méthode d'encapsulation (b). (c) Illustration des étapes de micro-usinage utilisées pour fabriquer la puce fluidique en silicium.

## 2.3 Mesures d'interactions moléculaires

A l'aide de modèles biologiques simples, nous avons évalué la faculté de mesurer des affinités d'interaction avec notre biocapteur nanofluidique. L'association cibles/sondes est observée optiquement en temps réel après injection d'une solution contenant une concentration donnée de molécules cibles marquées en fluorescence où l'écoulement de la solution dans le nanocanal est obtenu par différence de pression. La phase de dissociation est conduite en rinçant le capteur avec une solution tampon par inversion de flux à travers le nanocanal. La mesure locale de fluorescence en fonction du temps produit un sensorgramme (Figure 2.4a) qui, une fois analysé, permet de remonter aux constantes cinétiques de réaction.





**Figure 2.4** (a) Sensorgramme typique d'analyse cinétique effectuée dans un dispositif nanofluidique où la phase de dissociation est simplement induite par l'inversion du flux de fluide afin de remplacer la solution d'analyte par le tampon de rinçage. (b) Stratégie de fonctionnalisation de surface choisie pour immobiliser des molécules de biotine ou des anticorps sur le capteur.

Le capteur est préalablement localement fonctionnalisé en utilisant une stratégie de greffage générique basée sur une couche auto-assemblée biotinylée immobilisée sur les plots d'or par liaison thiolate (Figure 2.4b). Cette approche permet ainsi, en passant par une couche de streptavidine, d'immobiliser toute molécule biotinylée avec un taux de greffage contrôlé (par le taux de molécules modifiées utilisé pour créer la couche auto-assemblée). L'autre avantage de cette approche est d'éloigner les molécules fluorescentes à analyser de la surface d'or pour éviter toute désactivation de la fluorescence par transfert d'énergie [113]. Dans cette étude, conduite par ma première étudiante en thèse, Pattamon Teerapanich et dont les résultats ont été publiés dans la revue *Biosensors & Bioelectronics* [114], nous avons mesuré deux interactions moléculaires d'affinités variables : une liaison forte type anticorps immunoglobuline G (IgG) primaire / IgG secondaire, et une affinité très forte type biotine/streptavidine. Pour éviter toute adsorption non spécifique dans les canaux, la réactivité des surfaces d'oxyde et de polymère a été bloquée par une couche d'albumine de sérum bovin (BSA).

La Figure 2.5b montre des exemples de sensorgrammes obtenus dans le cas de l'étude d'interaction d'IgG primaire de souris/IgG secondaire anti-souris de lapin à partir des images de fluorescence capturées en temps réel pendant les processus d'association et de dissociation (Figure 2.5a). L'analyse de ces sensorgrammes, qui permet d'obtenir les constantes cinétiques, peut s'effectuer par des méthodes analytiques et numériques.

Dans des conditions expérimentales bien spécifiques, un modèle analytique très simple permet de décrire la réponse de notre biocapteur. En supposant une simple réaction d'ordre 2, l'interaction des molécules cibles de concentration volumique  $C_0$ , injectées dans le canal, avec les molécules sondes de concentration surfacique  $C_s$ , immobilisées en surface du capteur obéit à :



où  $b_m$  est la densité de sondes immobilisées sur le biocapteur et  $b$  est la densité de complexes cibles/sondes formés, et  $k_{on}$  et  $k_{off}$  sont les constantes d'association et de dissociation de la réaction. L'évolution du nombre de complexes cibles/sondes est alors obtenue par résolution de l'équation suivante :

$$\frac{\partial b}{\partial t} = k_{on} b_m C_s - k_{off} b \quad (2.5)$$

Ainsi, dans le cas où l'interaction est de pseudo-premier ordre, où l'apport de cibles en surface du capteur n'est limité ni par la convection, ni par la diffusion (*i.e.*  $C_s = C_0$ ), en supposant une concentration de cibles homogène et constante sur le capteur (ce qui est le cas pour une analyse localisée), nous obtenons :

$$b(t) = \frac{k_{on} C_0 b_m}{k_{on} C_0 + k_{off}} \left( 1 - e^{-(k_{on} C_0 + k_{off})t} \right) \quad (2.6)$$

La constante d'association  $k_{on}$  est obtenue en ajustant le modèle aux données expérimentales à l'aide de la constante apparente  $K_{app} = k_{on} C_0 + k_{off}$  pour différentes valeurs de concentrations  $C_0$  (Figure 2.5c). La phase de dissociation permet traditionnellement de déterminer  $k_{off}$ , à l'aide d'un ajustement de la décroissance, où  $b_{eq}$  est le nombre de sondes complexées à l'équilibre :

$$b(t) = b_{eq} e^{-k_{off} t} \quad (2.7)$$

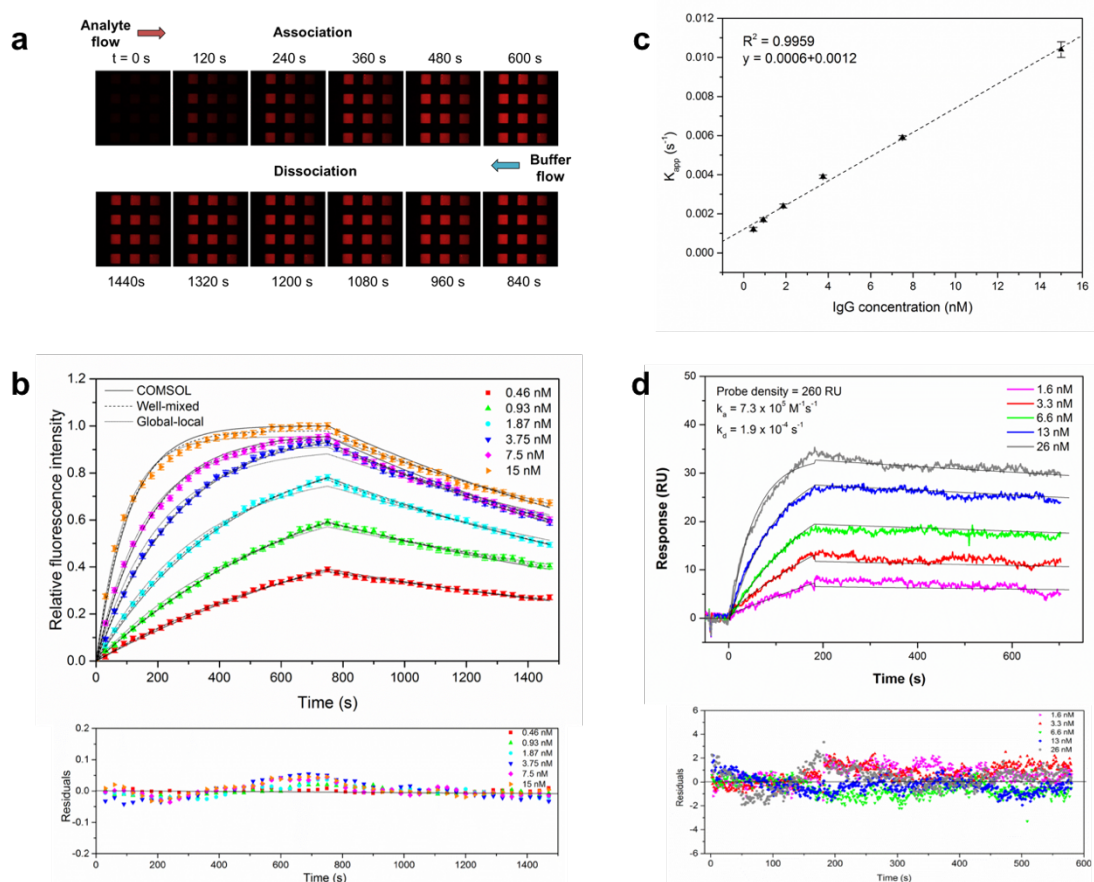
Dans le cas limité par la convection et la réaction, le flux des molécules vers le capteur doit être pris en compte, en résolvant l'équation différentielle partielle de convection-diffusion (avec  $\vec{u}$  la vitesse du flux de solution obéissant à l'équation de Navier-Stokes) :

$$\frac{\partial C_0}{\partial t} + \nabla \cdot (-D \nabla C_0 + C_0 \vec{u}) = 0 \quad (2.8)$$

La résolution numérique de ces équations peut être effectuée à l'aide d'un outil de simulation par éléments finis (FEM) comme COMSOL. Dans les cas qui impliquent des réactions plus complexes que la simple interaction directe 1:1 et pour améliorer la précision des ajustements, nous pouvons utiliser des outils numériques plus élaborés, comme le logiciel BIAevaluation proposé par Biacore pour l'analyse des données produites par ses équipements SPR (résonance plasmon de surface), faisant appel à des modèles plus fins et qui réalisent l'ajustement en prenant en compte les phases d'association et de dissociation de sensorgrammes obtenus pour différentes concentrations.

Ces méthodes ont été utilisées pour analyser les sensorgrammes obtenus pour les deux modèles biologiques. Les constantes d'association et de dissociation déduites sont renseignées dans le Tableau 2.1, tout comme des valeurs trouvées dans la littérature. Il est important de noter qu'en

parallèle à ces mesures, Martine Pugnère a réalisé l'étude du modèle IgG/anti-IgG sur un système SPR commercial (Figure 2.5d). L'interaction streptavidine-biotine s'est avérée trop forte pour être mesurée par cette technique, ce qui démontre la supériorité de notre plateforme pour les cas de très hautes affinités et pour de faibles volumes de réactif (les volumes d'analyse utilisés avec la puce fluïdique sont  $\sim 1000$  fois plus faibles que ceux nécessaires à une mesure SPR). Une analyse du Tableau 2.1 nous permet de conclure que les constantes dérivées par notre système sont en accord avec les valeurs rapportées dans la littérature et mesurées par SPR, démontrant ainsi la capacité de notre système à mesurer une cinétique adéquate d'un couple très affiné sans avoir recours à des technologies complexes et onéreuses comme la SPR, la microbalance à quartz (QCM) ou la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFM).



**Figure 2.5** a) Images séquentielles de fluorescence des processus d'association et de dissociation lors de l'injection d'IgG de souris marqués en Alexa Fluor-647 (à 1,87 nM) dans un nanocanal modifié par l'IgG anti-souris. b) Réponses du capteur en temps réel du lors de l'interaction IgG de souris/IgG anti-souris pour des concentrations d'analyte allant de 0,46 nM à 15 nM. Les données ont été normalisées en fonction de l'intensité relative de fluorescence et ajustées par trois modèles différents : simulation par éléments finis (COMSOL), modèle analytique (Well-mixed) et logiciel BIAevaluation (Global-local), en supposant une interaction type Langmuir 1:1. (c) Valeur de la constantes de vitesse apparente ( $K_{app}$ ) en fonction de la concentration d'IgG de souris. (d) Sensorgrammes du même modèle obtenus par SPR. Les courbes cinétiques ont été ajustées à l'aide d'un modèle d'analyse globale 1:1 du logiciel BIAevaluation. Les courbes résiduelles sont données pour toutes les concentrations.

**Tableau 2.1** Constantes cinétiques mesurées à l'aide de la plateforme nanofluidique et par SPR pour deux les modèles biologiques étudiés et comparaison avec des valeurs trouvées dans la littérature.

Modèle 1 : Biotine/Streptavidine	Constante d'association ( $k_{on}$ , $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	Constante de dissociation ( $k_{off}$ , $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ )	Constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ , $10^{-12} \text{ M}$ )
<b>Capteur Nanofluidique</b>			
-Analyse par FEM	7.1±2.5	8.0±1.2	≤ 1.1
-Modèle analytique	3.0±0.3	N/A	
<b>Littérature</b> [115]–[119]	4.4–450	0.2	~ 0.1
Modèle 2 : IgG/anti-IgG	Constante d'association ( $k_{on}$ , $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	Constante de dissociation ( $k_{off}$ , $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )	Constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ , $10^{-10} \text{ M}$ )
<b>Capteur Nanofluidique</b>			
-Analyse par FEM	8.0±1.2	6.2±0.3	7.7
-Modèle analytique	6.0±0.3	5.5±0.4	9.2
-BIAevaluation	12±0.2	5.0±0.2	4.2
<b>SPR</b>			
(BIAevaluation)	7.3±0.1	1.9±0.1	2.6
<b>Littérature</b> [120], [121]	2.5–13	3.0	1.5-12

La détermination précise des constantes d'association et de dissociation pour les deux couples de ligands présentés ici (streptavidine/biotine et IgG souris/IgG anti-souris) illustre les différentes forces d'affinité qui peuvent être étudiées avec notre système. Les études d'affinité nécessitent habituellement des sensorgrammes enregistrés pour plusieurs concentrations d'analyte allant typiquement de  $1/10$  à  $10 K_D$ , où  $K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$  est la constante de dissociation à l'équilibre, afin d'extraire adéquatement les constantes cinétiques. La limitation de notre technique en termes de concentrations de travail est donnée par le rapport signal de fluorescence sur bruit ( $S/N$ ), c'est à dire la fluorescence émise par les analytes qui interagissent spécifiquement à la surface du capteur par rapport à la fluorescence due à l'écoulement des molécules dans le canal fluidique. En régime limité par la réaction et à l'équilibre, pour les solutions concentrées ( $C \ll K_D$ ) et diluées ( $C \gg K_D$ ), où les molécules d'analyte se lient à toutes ou à une fraction des molécules réceptrices, nous avons respectivement :

$$S/N = \frac{b_m}{hC_0} \quad (2.9)$$

$$S/N = \frac{b_m}{hK_D} \quad (2.10)$$

Ainsi, la réduction du volume d'échantillonnage pendant l'observation se traduit par une diminution du bruit de fond avec un rapport signal sur bruit inversement proportionnel à la hauteur du canal. En utilisant la densité de la sonde greffée,  $b_m$ , obtenue avec le protocole de fonctionnalisation de surface des IgG, les équations précédentes démontrent que le rapport  $S/N$  peut être obtenu avec des canaux sub-micrométriques ( $h < 1 \mu\text{m}$ ) même pour des molécules d'affinités moyennes à faibles. Par

exemple, on peut s'attendre à un rapport  $S/N$  de  $\sim 100$  dans des canaux de 100 nm de profondeur pour un  $K_D$  de 0,1 mM.

La limite de détection (LOD) du biocapteur nanofluidique a été évaluée en dessous du pM à l'aide du modèle IgG/anti-IgG (équivalent à une LOD de 10 zeptomole pour un volume analysé de 10,5 nL): en effet, l'injection d'une solution à 1 pM s'est traduite par une augmentation significative de l'intensité de fluorescence après 30 min ( $S/N \sim 3$ ), même si il convient de noter que la LOD obtenue dépend fortement de la sensibilité du système optique et pourrait être optimisée. Anisi, en prenant en compte les valeurs de  $S/N$  obtenus plus haut, nous pouvons conclure que la gamme du pM au sub-mM, qui concerne la plupart des molécules d'intérêt, peut être traitée avec la technique présentée.

## 2.4 Intégration d'un générateur de concentrations pour des mesures cinétiques multiples en une seule injection

Dans les études cinétiques classiques, une concentration donnée d'analyte est injectée dans le biocapteur et le signal associé est mesuré en temps réel. La surface du capteur est ensuite régénérée afin de préparer une surface libre pour le prochain cycle de mesure. Ces procédés sont généralement répétés jusqu'à ce que la série complète de concentrations d'analyte soit obtenue. Les constantes cinétiques sont alors déterminées en ajustant les courbes expérimentales. Toutefois, cette approche présente plusieurs inconvénients. D'une part, le temps total d'analyse associé à des échanges multiples de réactifs biologiques peut être très long. En outre, la régénération de la surface peut être compliquée pour les couches greffées très sensibles à des variations brusques de pH ou des interactions difficiles à dissocier. Des stratégies ont récemment été proposées afin de diminuer le nombre d'étapes de régénération et le temps d'analyse. Ainsi la cinétique de titrage à cycle unique a été implémentée sur les systèmes SPR : les systèmes à injections dynamiques FastStep [122] et diSPR® [123] sont maintenant commercialisés sur l'instrument PIONEER FE SPR. Plus rapide encore, l'utilisation de puces fluidiques à plusieurs canaux, comme celle intégrée au système de dosage commercial à flux croisés ProteOn XPR 36 (BioRad) [124], permet de paralléliser les mesures cinétiques à plusieurs concentrations d'analyte.

Dans le même esprit, nous avons donc développé un dispositif fluidique combinant un générateur de gradient de concentrations à nos capteurs nanofluidiques. Ce système intégré permet ainsi la mesure simultanée des cinétiques d'interaction pour une série de titrage complet d'analyte en utilisant une seule injection. Cette approche permet, en plus d'une analyse haut débit, une limitation de la consommation des réactifs biologiques et une réduction des temps d'analyse, une diminution des risques inhérents à réalisation manuelle des gammes de concentrations par un technicien ou un expérimentateur. Les résultats présentés ci-dessous et obtenus par Pattamon Teerapanich pendant sa thèse ont fait l'objet d'une publication dans *Sensors and Actuators B : Chemical* [125].

Parmi les nombreuses stratégies fluidiques maintenant à disposition pour réaliser une gamme de concentrations dans des systèmes à bas nombre de Reynolds [126], nous avons opté pour l'utilisation d'un générateur de gradient de concentrations basé sur la diffusion des analytes le long d'un flux laminaire, pour des raisons évidentes de simplicité mais aussi d'encombrement. Ainsi, la

puce fluïdique est composée de trois éléments principaux (Figure 2.6a) : (i) le générateur de gradients microfluidique en Y placé en amont des nanofentes, (ii) les nanofentes biofonctionnalisées, et (iii) un microcanal en aval des nanofentes utilisé pour la fonctionnalisation *in-situ* et le protocole de dissociation par inversion de flux. Lorsque la concentration maximale d'analyte est injectée dans l'une des deux entrées fluidiques du générateur de gradient et le solvant dans l'autre, un profil de concentration sigmoïdal se forme dans la largeur du canal (suivant  $y$ ) :

$$C(y, t) = \frac{1}{2} C_0 \operatorname{erfc} \frac{y}{2\sqrt{Dt}} \quad (2.11)$$

La vitesse de l'écoulement du flux et la longueur du microcanal déterminent alors le profil exact de la sigmoïde en sortie de mixeur. Cette sortie est alors séparée en dix microcanaux identiques afin de discrétiser et d'homogénéiser les différentes concentrations d'analyte. En sortie des microcanaux, nous retrouvons les nanofentes pour réaliser les mesures cinétiques simultanées : le travail de conception du dilueur consiste à s'assurer d'avoir en sortie des différents microcanaux un éventail de concentrations qui recouvre les deux ordres de grandeur de la gamme d'étude avec des vitesses de flux en sortie qui soient exactement les mêmes afin d'avoir des cinétiques comparables (ce qui est assuré par une pression identique sur les deux entrées du mixeur, Figure 2.6b).

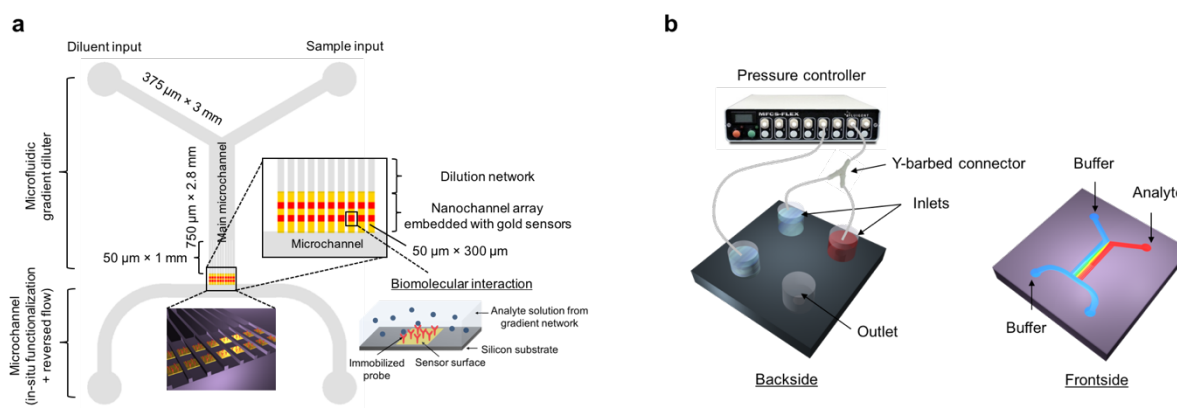


Figure 2.6 (a) Schéma de la puce comprenant un générateur de gradient de concentration par diffusion associé aux capteurs nanofluidiques. (b) Schéma de principe de la connexion fluïdique de la puce.

Après avoir validé le fonctionnement du générateur de gradient et calibré les concentrations d'analyte obtenues dans les microcanaux par microscopie de fluorescence (Figure 2.7a, b), nous avons réalisé l'étude cinétique simultanée d'interactions d'IgG de souris/IgG anti-souris à différentes concentrations d'analyte au sein du dispositif fluïdique en une seule injection. Une gamme de 10 concentrations variant de 0.57 nM à 20 nM au niveau des sorties permet d'envisager une étude cinétique fiable (Figure 2.7c). La Figure 2.7d montre les courbes cinétiques ainsi produites. Les constantes cinétiques obtenues par ajustement du modèle analytique, *i.e.*  $k_{on} = 5.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  et  $k_{off} = 7.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , ont des valeurs cohérentes avec les constantes cinétiques données en Tableau 2.1 et

mesurées à l'aide des dispositifs nanofluidiques en utilisant une analyse cinétique classique, mais en seulement 20 minutes.

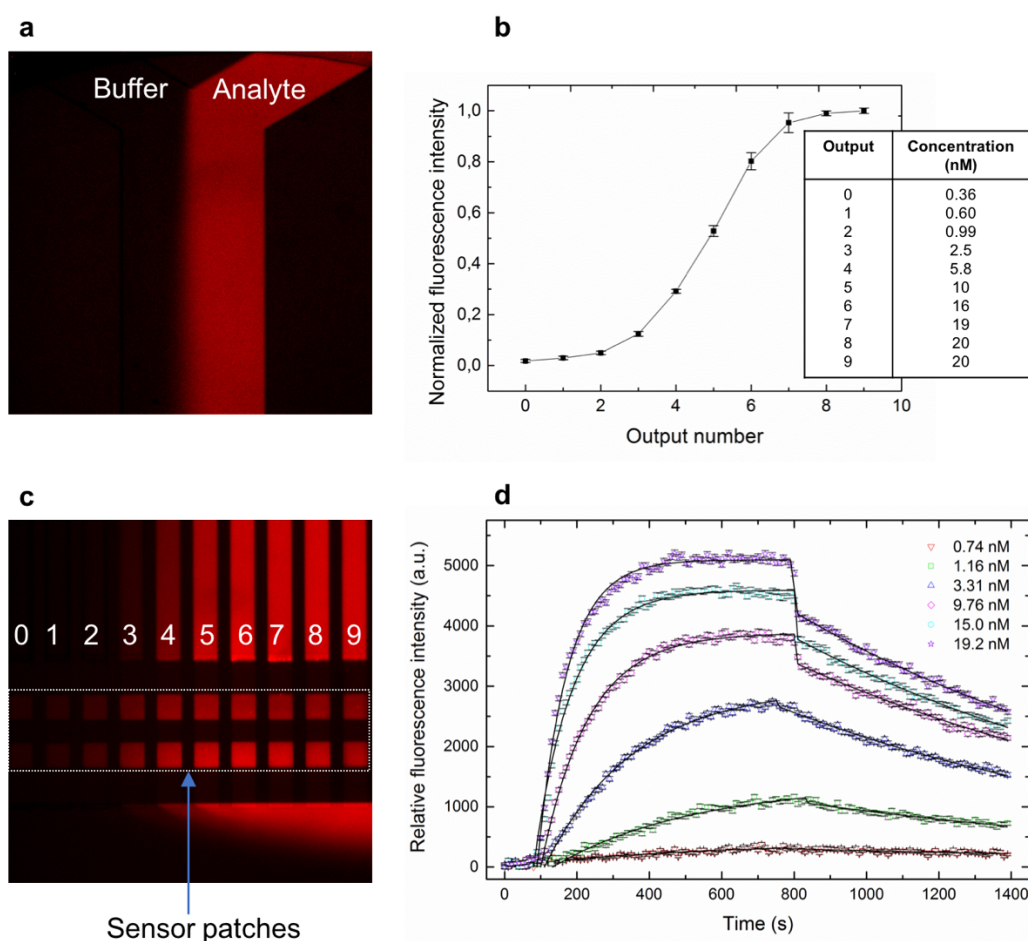
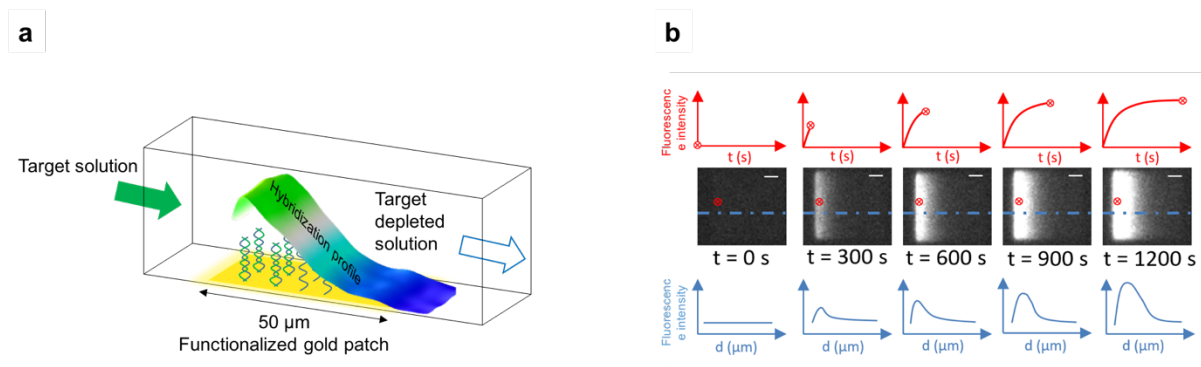


Figure 2.7 (a) Image en fluorescence du gradient de concentrations d'analytes marqués obtenu par diffusion le long du canal microfluidique. (b) Exemple de gradient et de gamme de concentrations obtenu dans les 10 canaux fluidiques de sortie. (c) Image de fluorescence présentant les solutions d'analyte à différentes concentrations dans les canaux microfluidiques et sur les capteurs nanofluidiques. (d) Sensorgramme de l'interaction obtenu en une seule injection.

## 2.5 Analyse spatiale du biocapteur

L'intégration d'un capteur de grande taille relativement au canal nanofluidique mais spatialement résolu confère à notre dispositif la particularité de présenter à la fois des conditions expérimentales pour lesquelles les interactions moléculaires sont limitées par la réaction et par la convection suivant la position sur laquelle on se trouve le long du capteur. Les effets de déplétion de la solution engendrent une concentration d'analyte variable le long du capteur et donc un taux de formation de complexes non-uniforme conduisant à un profil spatial de réponse caractéristique de l'affinité cible-sonde (Figure 2.8a). En effet, plus la constante d'association du couple est grande, plus le nombre de cibles capturées en début de capteur est important ; en parallèle, plus la constante de dissociation est grande, plus les cibles capturées sont rapidement libérées et disponibles pour interagir en aval. Ainsi, nous avons proposé une analyse alternative des données issues de notre

capteur reposant sur le profil spatial de fluorescence plutôt que sur la mesure temporelle localisée, analyse présentée plus haut et classiquement utilisée pour les capteurs d'affinité (Figure 2.8b).

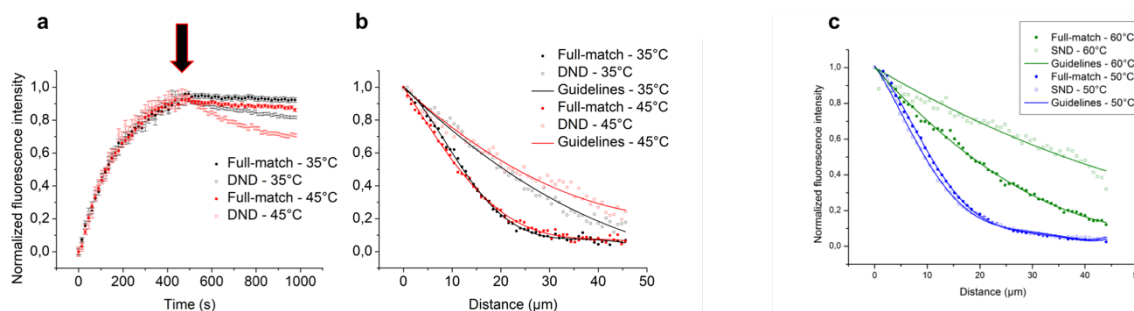


**Figure 2.8 (a) Schéma des nanofentes biofonctionnalisées illustrant la concentration non-uniforme de cibles au-dessus du capteur due au phénomène de déplétion et conduisant à des régimes de réaction variés. (b) Analyse des images séquentielles de fluorescence obtenues avec les capteurs (échelle = 10 µm) : sensorgramme classique obtenu en traçant la fluorescence en fonction du temps (en haut, rouge) vs. analyse proposée qui repose sur le tracé du profil de fluorescence le long du capteur (bas, bleu).**

Cette méthode d'analyse a été explorée par Jean Cacheux pendant sa thèse, dans le cadre du projet collaboratif Oncodevice (financement IDEX) entre le LAAS et le Centre de recherches en cancérologie de Toulouse (CRCT). Cette thèse, en cotutelle avec Pierre Cordelier du CRCT visait à utiliser nos technologies d'analyses moléculaires pour le dosage de microARNs (miARNs), des petites molécules d'ARN non codant comprenant une vingtaine de paires de bases identifiées par l'équipe du CRCT comme de nouveaux biomarqueurs moléculaires non invasifs du cancer du pancréas [127]. A l'aide de cibles miARNs de la famille Let-7, dont les séquences varient d'une ou de deux paires de bases nucléiques seulement, et de sondes de type LNA (pour « Locked Nucleic Acid », soit acide nucléique bloqué) à haute spécificité, nous avons étudié l'influence d'une faible variation d'énergie d'interaction sur les sensorgrammes et les profils d'hybridation. Les résultats présentés ci-dessous ont été publiés dans la revue ACS Sensors en 2018 [128].

Nous avons observé que pour des couples dont les énergies d'interaction sont très proches, les sensorgrammes enregistrés (Figure 2.9a) sont semblables : comme décrit dans la littérature [129], l'analyse de l'accroche lors de l'étape d'association ne permet pas une différenciation claire des deux séquences qui ne peut se faire que pendant l'étape de rinçage pour mesurer la dissociation des molécules. Les profils d'hybridation enregistrés pendant l'association, bien avant d'atteindre l'équilibre, sont quant à eux clairement distincts (Figure 2.9b) : la pente des profils est d'autant plus importante que l'affinité des couples est grande. A titre de démonstration, cette approche a été utilisée pour discriminer deux oligonucléotides qui ne diffèrent que par une seule paire de bases (Figure 2.9c). Ainsi, cette approche présente l'avantage de pouvoir identifier une molécule cible avec une grande spécificité pendant l'interaction, donc en une seule étape d'injection de solution et sans lavage. De plus, il est important de noter que cette approche, dans le cas d'interactions très fortement limitées par la convection, permet de différencier la reconnaissance spécifique mesurée en début de capteur du signal non-spécifique obtenu en fin de capteur.





**Figure 2.9** (a) Sensorgrammes classiques obtenus à deux températures d'hybridation (35°C et 45°C) pour une cible miARN complémentaire et une cible différent de 2 paires de bases de la sonde (solutions d'analyte à 100 nM injectées dans le nanocanal avec une pression de 10 mbar) après normalisation de chaque ensemble de données avec la valeur à l'état d'équilibre. (b) Pour le même couple de cibles : profil normalisé de l'hybridation enregistrée le long du capteur après 300 s d'interaction à 45 °C et 360 s d'interaction à 35 °C. (c) Profil d'hybridation enregistré après 1200 s d'interaction à 50 et 60 °C pour la cible complémentaire et celle différente d'une paire de base (pression appliquée : 5 mbar). L'augmentation de température d'hybridation sous la température de fusion permet d'augmenter les écarts d'énergies de liaison entre les couples cible-sonde.

## 2.6 Perspective applicative : Test compagnon pour évaluer l'efficacité d'un anticorps thérapeutique

La technologie nanofluidique présentée ci-dessus a fait l'objet d'un dépôt de brevet aux Etats-Unis, en Europe et en Chine [130]–[132], brevet publié aux Etats-Unis et en Europe en 2018. Il était donc tout naturel de chercher une application concrète de nos dispositifs en vue d'un éventuel transfert industriel.

L'intérêt d'un système d'analyse pour la détermination de constantes cinétiques entre une molécule (ligand) et un récepteur est évident pour des applications liées à l'industrie pharmaceutique qui cherche à développer des molécules avec des affinités bien maîtrisées pour la production de nouveaux médicaments – le degré d'association et de dissociation indiquant l'efficacité de la molécule et son temps de résidence [133]. Seulement, la recherche de cette molécule cible se fait parmi une population très importante de candidats potentiels, ce qui implique de conduire des tests d'affinité à grande échelle de manière parallèle et multiplexe. Une telle tâche est pratiquement irréalisable avec notre plateforme, qui peut raisonnablement intégrer au maximum une poignée de sondes (nos partenaires Taïwanais ont réalisé un simple test immunologique à 2 sondes par fonctionnalisation localisée des nanocanaux à l'aide d'un robot de dépôt [134]). Par contre la capacité de notre dispositif à discriminer des affinités très proches, comme présenté plus haut, nous permet d'envisager d'autres applications liées à l'évaluation de perturbations d'interactions moléculaires.

Ainsi, dans le cadre d'un projet pré-maturation financé par la région Occitanie qui a débuté en Novembre 2018, nous souhaitons étudier la possibilité de réaliser un test compagnon permettant de mesurer la perturbation de la cinétique d'interaction entre un anticorps thérapeutique (ou à visée thérapeutique) et sa cible, induite par la présence de molécules interférentes dans le sérum d'un patient. Le rôle du test compagnon, qui est d'estimer l'efficacité d'un traitement sur un patient est donc primordial lors de tests précliniques en oncologie pour la sélection de candidats médicamenteux efficaces, mais il offre bien entendu à plus long terme de réelles perspectives pour la

médecine personnalisée et une aide à la prise de décision dans le cadre d'une prise en charge par thérapie ciblée [135]. Ce test permettra d'évaluer globalement l'influence du sérum du patient sur la cinétique de l'interaction anticorps/antigène.

Pour mettre en place cette étude, nous prévoyons d'immobiliser les molécules réceptrices de l'anticorps thérapeutique dans les nanocanaux. Dans un premier temps, les anticorps thérapeutiques dilués dans un sérum connu seront injectés pour réaliser une mesure de l'affinité du couple. Dans un deuxième temps, les anticorps thérapeutiques seront mélangés au sérum du patient à tester et la solution sera injectée dans la puce pour réaliser une mesure cinétique : la modification de la cinétique du couple indiquerait alors la présence dans le sérum du patient de molécules interférentes (présence d'un gène sérique avec ligand sérique du récepteur) ou de parties extracellulaires des récepteurs coupées et libérées dans la circulation (« shedding »).

Nous envisageons de développer ce test compagnon en collaboration avec l'équipe d'Isabelle Teulon et avec Martine Pugnère de l'IRCM afin de mesurer la cinétiques d'anticorps thérapeutiques développés à l'IRCM, dont certains sont en cours de validation clinique. Afin de se pencher sur un cas concret, nous souhaitons tester notre plateforme avec l'anticorps 16F12 en cours d'humanisation et dirigé contre le récepteur AMHR2 (encore appelé MISRII) qui est une cible candidate pour le diagnostic et le traitement du cancer des ovaires. Le récepteur AMRHII possède un ligand naturel anti-Mullérien Hormone AMH dont la présence dans le sérum peut inhiber l'activité de l'anticorps anti-AMRHII par simple compétition ou gène stérique avec le récepteur et donc par voie de conséquence perturber fortement l'affinité et la cinétique de l'anticorps pour son récepteur. Le sérum testé nous renseignera aussi sur la présence d'autres facteurs interférents connus ou inconnus et notamment sur un clivage possible du récepteur.



### 3 Vers une préparation d'échantillon minimale sur puce à l'aide de membranes de silicium poreux pour fluide planaire

#### 3.1 Introduction

##### 3.1.1 Importance de la préparation d'échantillon pré-analytique

Comme nous l'avons abordé dans la première partie de ce manuscrit, la préparation d'échantillon est une étape essentielle du processus d'analyse biologique, étape qui permet de rendre compatible et d'optimiser l'échantillon pour une technique de mesure donnée. Ainsi les fonctions communément utilisées pour réaliser la préparation d'échantillon sont [136] :

- *La purification et la suspension de l'échantillon* qui permet à la fois d'éliminer les espèces interférentes et de dissoudre l'échantillon dans un solvant adapté à la méthode de mesure par des techniques de séparation par filtration et extraction
- *La pré-concentration* qui permet, en augmentant la concentration locale des analytes dans un petit volume, d'abaisser le seuil de détection de la technique d'analyse
- *La modification de l'échantillon* qui permet d'assister la technique d'analyse en utilisant par exemple la dérivation, l'amplification, la lyse cellulaire, ou la digestion enzymatique

Pour qu'une technique d'analyse miniaturisée soit la plus efficace possible – dans le sens où elle doit apporter des améliorations significatives par rapport aux techniques existantes (et ici de manière évidente en terme de portabilité), il est important de minimiser les étapes de préparation d'échantillon sur puce : car d'une part ces étapes impliquent la manipulation des échantillons par du personnel qualifié, ce qui a un coût et peut engendrer des variabilités ou même des erreurs dans le résultat, et d'autre part elles sont souvent chronophages. Si une stratégie consiste à développer des techniques d'analyse qui ne requièrent qu'un minimum de préparation d'échantillon, une autre stratégie vise à intégrer un maximum de ces étapes sur puce en amont du capteur. Alors que la grande majorité des efforts de recherche et développement se sont portés sur la miniaturisation des moyens d'analyse (capteurs), les travaux qui traitent de l'intégration des fonctions pour la préparation d'échantillons sont bien moins nombreux. La préparation est ainsi et à juste titre considérée comme le maillon faible des systèmes d'analyse miniaturisés [46].

##### 3.1.2 Solutions sur puce : intérêt des membranes poreuses

Le volume d'activité concernant la préparation d'échantillon est certes plus faible que celui des biocapteurs miniaturisés, il n'en reste pas moins qu'un grand nombre de techniques a récemment été mis au point pour effectuer cette tâche sur puce et que la littérature à ce sujet est vaste et variée. Nombre de dispositifs permettent ainsi une modification de l'échantillon avant analyse en intégrant par exemple l'amplification par PCR sur puce [137] ou en goutte [138], la lyse cellulaire afin de récupérer le matériel génomique [45], et même le marquage en fluorescence [139]. Il existe également une multitude de techniques de pré-concentration intégrées sur puce [140] basées sur la diélectrophorèse [141], [142], sur la polarisation de concentration ionique [143], [144], ou sur l'isotachophorèse [145], qui permettent non seulement d'augmenter la limite de détection des capteurs associés ou de diminuer leur temps de réponse, mais aussi d'effectuer en même temps une

étape de séparation par propriétés électriques. La purification d'échantillon est très souvent effectuée à l'aide de particules fonctionnalisées qui permettent de capturer les analytes à détecter et de les convoyer à travers une série d'étages préparatifs vers la zone d'analyse [146]. Le format type laboratoires sur disque est également très attractif puisque l'utilisation des forces centrifuges permet de réaliser de manière efficace plusieurs fonctions liées à la préparation d'échantillons [147]. Des approches existent également pour extraire le sérum du sang complet [148], [149], même si il est important d'évaluer l'inconvénient de travailler directement avec du sang car cette étape de purification peut s'avérer compliquée à mettre en place sur puce et nécessite la manipulation de larges volumes [44]. Ainsi, nous avons à disposition plusieurs briques, solutions technologiques, qui peuvent traiter une ou plusieurs fonctions nécessaires à la préparation d'échantillon, et il est important de garder à l'esprit que le choix de la technologie la plus adaptée est lié au type d'échantillon, à ses caractéristiques, au volume à traiter, et au résultat attendu : mais, même si cela est évident, il est important de souligner qu'il n'existe pas de solution générique, miracle. Toujours est-il que l'on trouve maintenant des dispositifs qui intègrent différentes technologies qui permettent d'effectuer la chaîne complète d'analyse automatisée sur une même puce [150] (même si ce type d'instrument reste encore assez volumineux).

Parmi les briques technologiques utiles pour réaliser les fonctions impliquées dans le prétraitement des échantillons, les membranes poreuses constituent une solution de choix compte tenu de leur utilisation historique dans le domaine de la séparation [136]. Ainsi, on a dernièrement constaté un engouement pour l'intégration de membranes poreuses dans les systèmes microfluidiques à diverses fins, par exemple pour la filtration [151]–[153] et la concentration d'échantillons [154]–[156]. En conséquence, il existe maintenant de nombreuses méthodes disponibles pour fabriquer et intégrer des membranes sur puce [157]. Parmi les diverses stratégies d'intégration, on peut citer l'incorporation directe de membranes dans des canaux effectuée lors de l'assemblage des puces [158], [159], la fabrication *in situ* de membranes dans des canaux fermés préexistants [160], [161], la réalisation des membranes au cours du processus de fabrication des puces [162], [163] et l'utilisation directe des propriétés poreuses du matériau utilisé pour la fluidique [164], [165]. En plus de la diversité des méthodes d'intégration, on peut compter sur une grande variété de matériaux constituant ces membranes, comme les polymères, les hydrogels, les céramiques et le silicium, qui comme on va en discuter ci-après est un matériau particulièrement attractif pour la réalisation de membranes.

### 3.1.3 Silicium poreux et microfluidique

Le silicium poreux a été découvert par inadvertance à la fin des années 1950 aux Bell Labs lors de la mise au point d'un procédé de polissage du silicium par voie électrochimique. Dans des conditions spécifiques d'attaque (dissolution) dans un bain électrolytique à base de HF, *e.g.* pour de faibles densités de courant, la gravure du silicium est fortement anisotrope et conduit à la formation de pores et d'une structure spongieuse. La découverte de la photoluminescence du silicium poreux dans les années 90 par Leigh Canham a engendré un intérêt applicatif pour ce matériau en optoélectronique. Quelque peu délaissé au cours de cette décennie, nous avons ensuite assisté à un regain d'intérêt pour le silicium poreux lié à ses propriétés remarquables, *e.g.* sa grande surface spécifique, sa très faible conductivité thermique, son caractère biodégradable ainsi qu'à la facilité à

contrôler la taille des pores et la porosité du matériau. Ainsi, le champ applicatif du silicium poreux intégré dans des dispositifs ou utilisé sous forme de particules s'est depuis considérablement élargi, visant aussi bien la microélectronique, le domaine médical, que la cosmétique [166].

Le silicium poreux est aujourd'hui considéré comme un matériau de choix en microfluidique [167] : en effet, s'il a d'abord été utilisé comme couche sacrificielle pour la fabrication de microcanaux fluidiques [162], [168], rapidement, sa porosité élevée, sa biocompatibilité et ses propriétés optiques ont été exploitées pour la réalisation d'éléments fonctionnels intégrés dans les laboratoires sur puces. Le silicium poreux, sous forme membranaire (en configuration frontale ou tangentielle) ou en couche tapissant les parois de canaux fluidiques, peut en effet assurer des fonctions très diverses. Par exemple, profitant de leur grand rapport surface/volume, les membranes en silicium poreux se révèlent très prometteuses pour la réalisation de pompes électro-osmotiques efficaces [169]. Ces pompes, qui permettent d'obtenir des débits élevés sans avoir recours à l'utilisation de pièces mobiles, ont été fabriquées à partir de silicium macroporeux [170] et de membranes ultrafines en silicium nanocristallin [171]. Le grand rapport surface/volume du silicium poreux a également été mis à profit pour la réalisation de microréacteurs, soit en combinaison avec la spectrométrie de masse pour effectuer des analyses de protéines et de cinétiques enzymatiques [172], [173], mais aussi pour la précombustion et la préconcentration de gaz [174], [175]. Il est intéressant de noter qu'en rendant poreuses les parois internes de chambres de culture cellulaire réalisées en silicium, il est possible d'améliorer l'adhésion cellulaire et la biocompatibilité des dispositifs fluidiques [176]. Une autre utilisation du silicium poreux sur puce concerne également la science de la séparation [177]. En effet, la présence de silicium poreux sur les parois des microcanaux permet d'augmenter la capacité de rétention de la phase stationnaire en chromatographie par cisaillement [178], [179], de créer une matrice à haute surface spécifique pour l'extraction en phase solide [180], et d'isoler efficacement les parois pour l'électrophorèse sur puce [181]. Le silicium poreux peut aussi être utilisé dans des systèmes fluidiques de dessalement comme électrode poreuse immergée dans l'eau salée afin de retenir sur sa surface le sel dissous [182]. Enfin, l'utilisation principale du silicium poreux en microfluidique est probablement la réalisation de membranes poreuses pour la filtration frontale [183], ce type de membranes ayant entre autre été utilisé pour réaliser un système de dialyse [184].

#### 3.1.4 Membranes à pores latéraux pour la fluidique planaire

La manière classique de réaliser des membranes en silicium consiste à créer une couche de silicium poreux à la surface d'un wafer par anodisation électrochimique en injectant le courant en face arrière de la plaquette. Ainsi, les pores sont orientés perpendiculairement à la surface du substrat de silicium. Les membranes appelées à être utilisées en configuration frontale (vs. en configuration transverse, comme montré en Figure 3.1a) sont ensuite libérées en gravant la face arrière du wafer [185]. Moins fréquemment, on peut avoir recours à une deuxième étape électrochimique pour créer une cavité sous la membrane [186], [187]. Si des techniques de transfert ont été mises au point pour intégrer les membranes fabriquées à des puces de polymère afin d'offrir des alternatives peu coûteuses aux dispositifs en silicium [188], l'intégration de membranes frontales dans des dispositifs microfluidiques s'effectue principalement en les intercalant entre deux couches micro-usinées qui comportent des canaux fluidiques (Figure 3.1b). Ainsi, ces procédés hybrides

conduisent à des systèmes tri-dimensionnels (3D) qui n'offrent pas la flexibilité de conception, la simplicité de packaging, ou la possibilité d'observation visuelle directe proposées par les dispositifs microfluidiques planaires.

Ainsi, afin de s'attaquer à ces limites et par là même d'offrir des solutions pour effectuer des étapes de préparation d'échantillon sur puce en amont du biocapteur, je développe une approche technologique permettant l'intégration de membranes poreuses dans des systèmes fluidiques planaires qui repose sur la formation de pores parallèles à la surface du substrat reliant ainsi des microcanaux qui se trouvent dans le même plan (Figure 3.1c). Cette approche, au cœur de mon projet CNRS présenté au concours de chargé de recherche en section 08 en 2009 et à l'origine d'une nouvelle activité scientifique au LAAS, a été explorée dès mon arrivée dans le laboratoire et lors des thèses de Yingning He (2012-2016, [189]) et de Douglas Silva de Vasconcellos (depuis 2016). Mon équipe a ainsi proposé deux protocoles de fabrications distincts pour la réalisation de membranes à pores latéraux détaillés ci-dessous et a démontré le pouvoir sélectif de ces membranes permettant le tri par taille et la concentration assistée par polarisation de concentration ionique, fonctions utiles à la préparation d'échantillons.

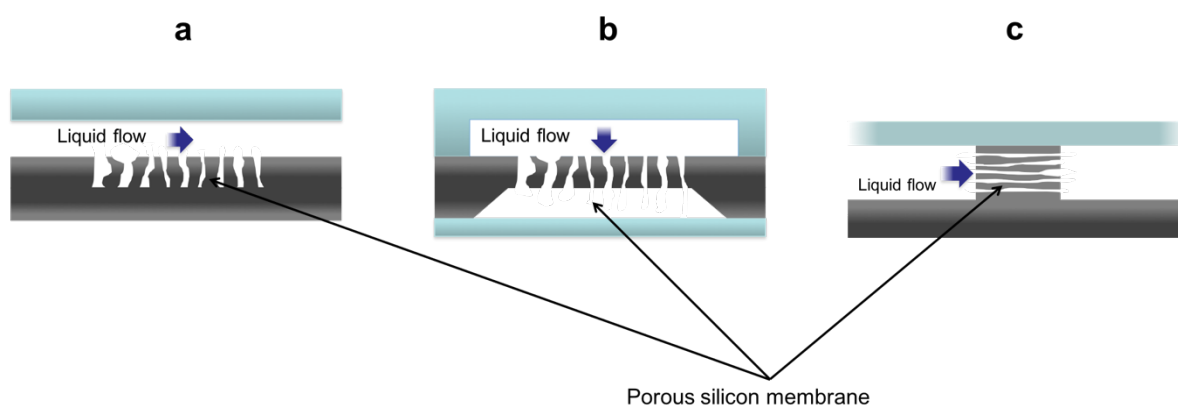


Figure 3.1 Schéma indiquant les différentes stratégies d'intégration de membranes en silicium poreux dans des dispositifs microfluidiques. (a) Membrane à pores perpendiculaires au substrat en configuration tangentielle, (b) membrane à pores perpendiculaires au substrat en configuration frontale intégrée dans un système fluidique 3D et (c) membrane poreuse latérale intégrée dans un système fluidique planaire.

### 3.2 Mise en œuvre technologique des membranes poreuses latérales

Dans une configuration d'anodisation classique, le courant est injecté en face arrière d'une plaquette de silicium et circule dans la direction perpendiculaire à sa surface. Comme la formation de pores par anodisation tend à suivre les lignes de courant [190], cette configuration conduit à la formation de pores verticaux dans l'épaisseur de la plaquette (Figure 3.2a). Ainsi, afin de créer du silicium poreux avec des pores latéraux qui se propagent parallèlement à la surface du substrat, le flux de courant doit être distribué à l'horizontale, de manière analogue à celle proposée pour fabriquer des pièces d'alumine poreuses latérales [191], [192]. Pour ce faire, et afin de permettre de surcroît l'intégration monolithique de membranes poreuses dans une fluidique planaire, notre approche repose sur l'utilisation d'une électrode déposée sur la paroi d'une brique de silicium séparant deux microcanaux afin d'injecter le courant à travers cette paroi (Figure 3.2b). La réaction électrochimique se produit sur la paroi opposée à l'électrode et les pores se propagent de manière

latérale jusqu'à ce qu'ils atteignent l'électrode, ce qui se traduit par la formation de la membrane poreuse.

Suivant cette idée, nous avons proposé deux procédés de fabrication de membranes latérales : le premier procédé (procédé SOI) repose sur la structuration d'électrodes pour guider la propagation des pores dans la membrane et sur l'utilisation de substrat type SOI (silicon on insulator) dopé p++ pour isoler électriquement la membrane du substrat à l'aide de la couche d'oxyde enterrée (ce qui assure la formation de pores uniquement dans la membrane). Le deuxième procédé (procédé par implantation) repose sur le fait que la formation de silicium poreux par anodisation dépend fortement du dopage (type et concentration) [193]. Bien que nous utilisons encore des électrodes structurées sur la marche pour injecter le courant d'anodisation, le dopage par implantation permet le confinement spatial de la membrane : une couche p fortement dopée est créée par implantation ionique dans un substrat de type n pour former la membrane et une fine couche de type n est ensuite réalisée en surface de la plaquette afin de limiter la formation de pores verticaux.

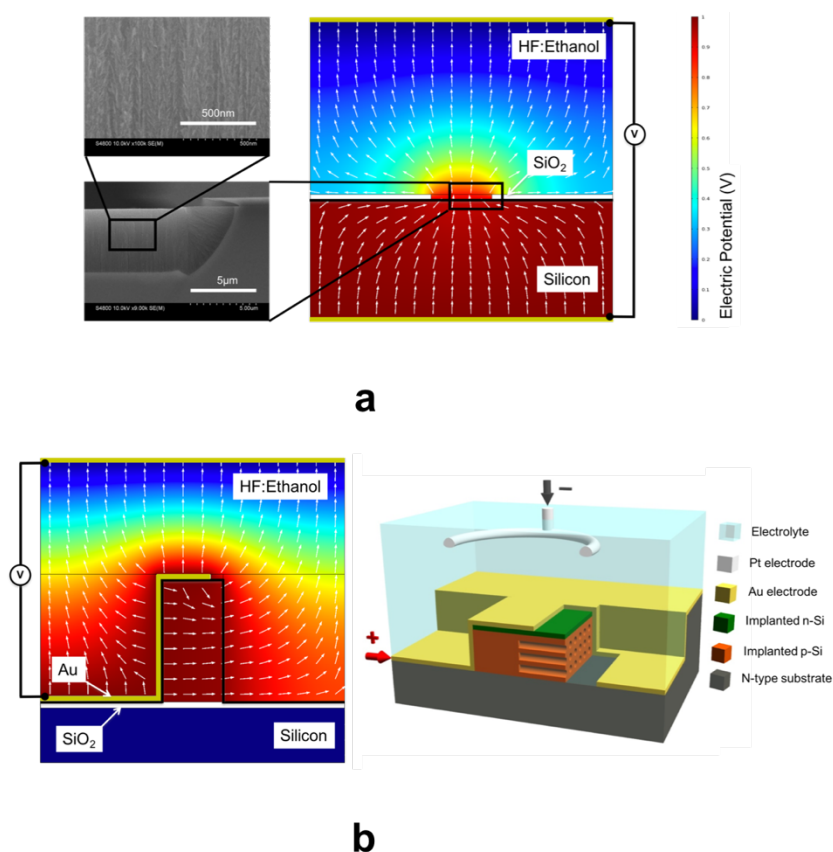


Figure 3.2 Montages expérimentaux utilisés pour la formation de silicium poreux par anodisation du silicium. (a) Configuration classique conduisant à la formation de pores horizontaux dans la plaquette de silicium : résultats de simulations COMSOL à droite et images MEB de la couche poreuse à gauche. (b) Configuration permettant de réaliser des membranes à pores latéraux : résultats de simulation COMSOL qui présente les lignes de courant (en blanc) qui traversent la membrane de manière latérale dans le procédé SOI à gauche et schéma présentant la formation de pores horizontaux dans le procédé par implantation à droite.



Ces deux procédés, qui ont été présentés en détails dans deux articles publiés en 2015 et 2017 [194], [195], sont illustrés en Figure 3.3 et Figure 3.4. Dans le premier procédé (SOI), une plaquette SOI est utilisé comme substrat de départ (type p,  $t = 20/2/450 \mu\text{m}$ ,  $\rho = 0.01-0.02/0.015 \Omega\cdot\text{cm}$ ). Le procédé de fabrication commence par la création des microcanaux par gravure ionique réactive (RIE) profonde en utilisant l'oxyde enterré comme couche d'arrêt. Une couche métallique Cr/Au (100 nm/500 nm) est ensuite déposée par pulvérisation cathodique et une résine photosensible épaisse (AZ 40XT 20 $\mu\text{m}$ ) est structurée afin d'ouvrir une fenêtre sur une des parois de la marche qui sépare les canaux. Le métal non protégé est ensuite éliminé par gravure humide dans des bains appropriés. L'anodisation du silicium est alors effectuée dans un bain électrolytique (48% HF:Ethanol = 1:1) à 200 mA/cm<sup>2</sup> pendant 2 minutes. Il est important de noter que l'oxyde enterré est exposé à la solution de HF, ce qui limite la durée d'anodisation. Après création du silicium poreux, le métal est totalement éliminé par gravure humide et les entrées/sorties fluidiques permettant de connecter la puce à des réservoirs externes sont réalisées à travers la puce de silicium par sablage. Les canaux sont finalement encapsulés par collage anodique d'une pièce de verre borofloat 33.

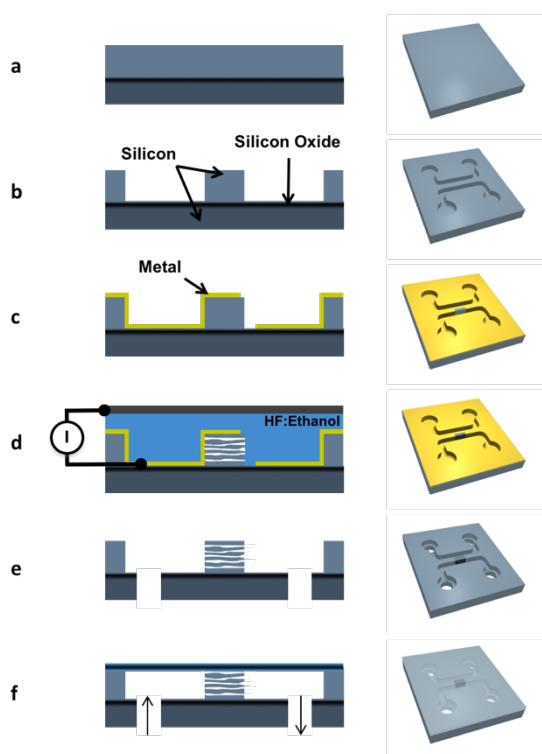


Figure 3.3 Procédé de fabrication SOI (gauche: vue en coupe; droite: représentation en trois dimensions). (a) Le substrat de départ est constitué d'une plaquette SOI. (b) Une gravure sèche de la couche supérieure du silicium jusqu'à l'oxyde enterré est utilisée pour créer des microcanaux. (c) Dépôt d'une couche métallique utilisée comme électrode de travail. (d) Anodisation du silicium effectuée dans un bain de HF:éthanol. (e) Entrées et sorties fluidiques réalisées par sablage. (f) Scellement des canaux.

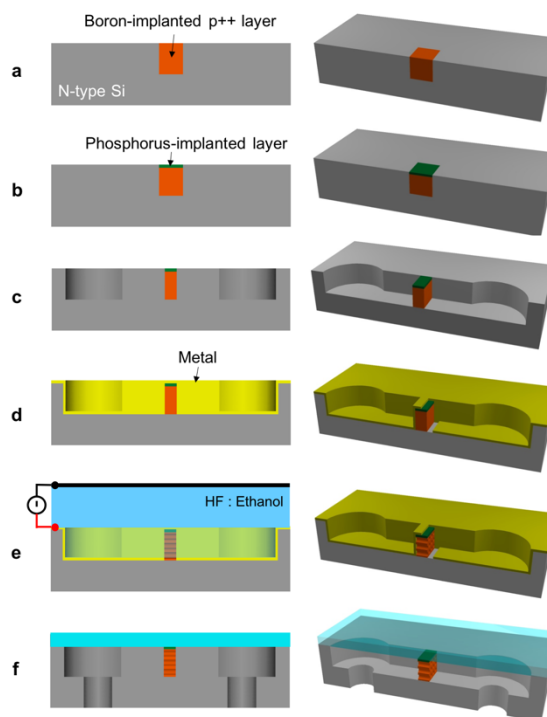


Figure 3.4 Procédé par implantation ionique. (a) Implantation de bore dans un substrat de type n pour créer une couche p fortement dopée pour la formation de pores par anodisation. (b) Implantation de phosphore pour créer une couche n sur la surface de la plaquette. (c) Gravure sèche pour former les microcanaux. (d) Dépôt de la couche métallique et gravure pour créer l'électrode de travail. (e) Anodisation du silicium dans un bain de HF:éthanol. (f) Entrées/sorties fluidiques réalisées par sablage et encapsulation de la puce.

Le deuxième procédé de fabrication de membranes poreuses latérales réalisé au moyen de l'implantation ionique est en beaucoup de points similaire au premier. Le procédé commence par la création d'une couche p fortement dopée par implantation de bore (dose =  $2 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ , énergie = 150 KeV) dans une plaquette silicium de type n ( $\rho = 7 \Omega \cdot \text{cm}$ ), suivi d'un recuit thermique à 1150 °C pendant 8 h. Une implantation de phosphore (dose =  $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ , énergie = 50 KeV) et un recuit thermique rapide (1000 °C, 5 min) sont ensuite réalisés pour former une couche de type n épaisse de 150 nm. Le reste du procédé suit ensuite les mêmes étapes que celles détaillées plus haut: les microcanaux de 5  $\mu\text{m}$  de profondeur sont gravés par RIE et l'électrode est formée par pulvérisation cathodique puis structurée par photolithographie en utilisant une résine épaisse (AZ 4562, 5  $\mu\text{m}$ ) suivie d'une gravure humide. La dissolution anodique du silicium est effectuée dans un mélange 3:1 de HF:éthanol en injectant le courant sur les électrodes en face avant de la puce (qui circule alors au sein de la couche p implantée, prise en sandwich entre la couche n implantée et le substrat de type n). Enfin, le métal est gravé, les entrées/sorties fluidiques réalisées et la puce fluidique encapsulée.

Les dispositifs fabriqués suivant ces deux procédés sont montrés en Figure 3.5 et Figure 3.6: chaque puce de 16 mm×16 mm comporte deux microcanaux de 20  $\mu\text{m}$  ou de 5  $\mu\text{m}$  de profondeur, en fonction du procédé utilisé, séparés par une membrane en silicium poreux de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (longueur). Les vues en coupe des membranes montrent que les pores horizontaux relient de manière adéquate les microcanaux. La dimension des pores et la porosité des membranes fabriquées sont de l'ordre de 15-25 nm et de 40-50 % (estimations à partir des images MEB). Il est important de noter que chaque procédé a ses limites. Pour le procédé SOI, le temps d'anodisation est limité car l'oxyde enterré est exposé à la solution de HF pendant l'attaque électrochimique, ce qui limite donc l'épaisseur des membranes fabriquées. Concernant le procédé par implantation, la profondeur (hauteur) de la membrane est limitée par l'épaisseur de la couche implantée qui est dictée par la profondeur d'implantation et la distance de diffusion permise par le temps de recuit.

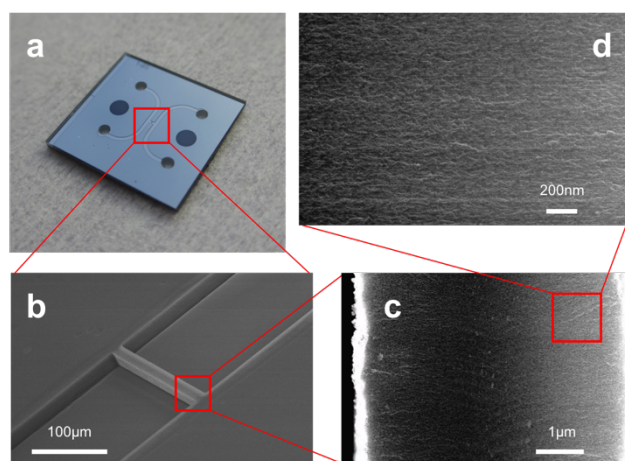


Figure 3.5 (a) Photographie optique d'une puce fluidique intégrant une membrane de silicium poreux fabriquée par procédé SOI. (b) Image MEB de la membrane poreuse entre deux microcanaux fluidiques. (c), (d) Vues en coupe de la membrane fabriquée.

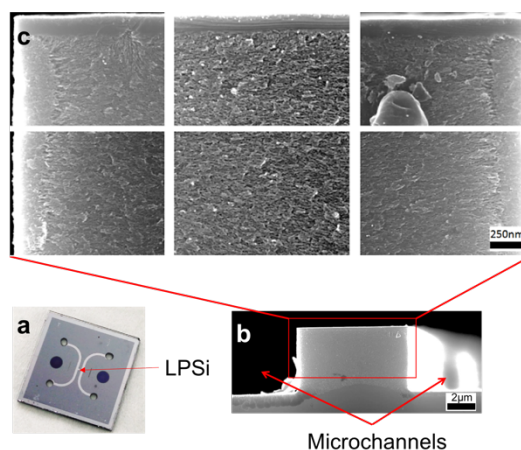


Figure 3.6 (a) Photographie d'une puce fluidique intégrant une membrane poreuse réalisée par implantation. (b), (c) Image MEB de la membrane poreuse incluant la couche protectrice supérieure de type n de 150 nm d'épaisseur.

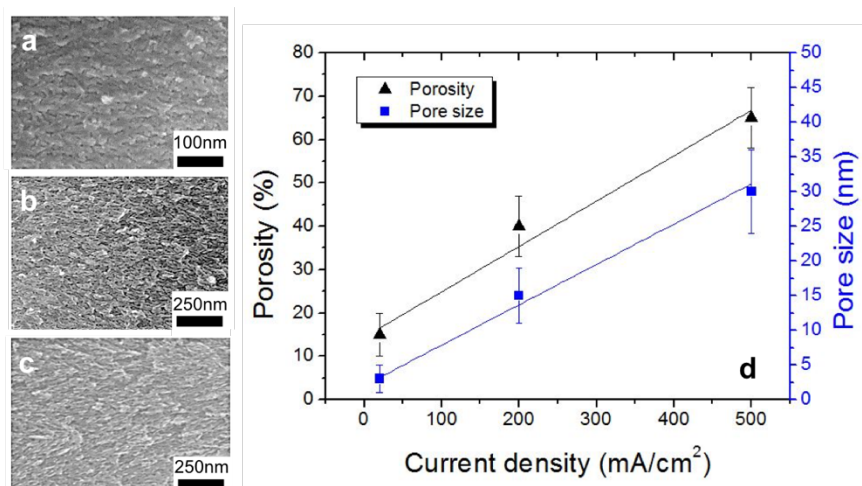


Figure 3.7 Membranes de silicium poreux fabriquées en utilisant des densités de courant différentes: (a) 20 mA.cm<sup>-2</sup> pendant 10 min; (b) 200 mA.cm<sup>-2</sup> pendant 1 min; (c) 500 mA.cm<sup>-2</sup> pendant 30 s. (d) Taille des pores et porosité en fonction de la densité de courant.

Il est également intéressant de mentionner que la fabrication de membranes poreuse par anodisation électrochimique du silicium offre la possibilité de contrôler la taille des pores et la porosité des membranes en ajustant simplement la densité de courant, qui représente le débit d'alimentation des trous en surface du silicium, lors de l'anodisation. La Figure 3.7 montre des images MEB de coupes de membranes de silicium poreux réalisées avec le procédé par implantation avec des densités de courant comprises entre 20 mA.cm<sup>-2</sup> et 500 mA.cm<sup>-2</sup>. La taille des pores et la porosité des membranes, estimées à partir des images MEB (estimations qui pourraient être affinées à l'aide de modèles dédiés [196]), varient alors de ~3 à ~30 nm et de ~15% à ~65%.

### 3.3 Membranes poreuses pour la filtration d'échantillon

La capacité de filtration des membranes fabriquées par procédé SOI a été évaluée à l'aide de solutions contenant des billes de 300 nm de diamètre et des molécules d'ADN simple brin (40 mers) diluées dans de l'eau DI, ainsi que de l'immunoglobuline G (IgG) dans du PBS 1×. La Figure 3.8 présente les images de fluorescence enregistrées au cours d'expériences d'injection des solutions à travers les membranes. Les résultats de ces expériences montrent la rétention complète des billes de 300 nm, tandis que les petites molécules (ADN et IgG) passent à travers la membrane poreuse. Ces résultats indiquent que la taille de coupure de la membrane fabriquée est supérieure à ~10 nm (l'ADN simple brin affiche un rayon de giration minimum de 4 nm et les IgG, un rayon hydrodynamique de 5.29 nm), ce qui est compatible avec la taille moyenne des pores de la membrane fabriquée (~25 nm). Des expériences similaires ont été conduites avec les membranes réalisées par le procédé par implantation en utilisant des solutions contenant de la fluorescéine, des microARN (26 bases) dilués dans du PBS 1×, et des billes de 300 nm de diamètre dans de l'eau DI. Les images séquentielles enregistrées montrent que la fluorescéine et les molécules de miARN passent à travers la membrane tandis que les billes sont arrêtées, ce qui démontre le pouvoir de séparation des membranes réalisées avec une taille de coupure >10 nm (les rayons hydrodynamiques de la

fluorescéine et des miARN sont de  $\sim 1$  nm et  $\sim 5$  nm). Ces résultats sont ainsi en accord avec la taille moyenne des pores ( $\sim 15$  nm) de la puce utilisée pour ces expériences.

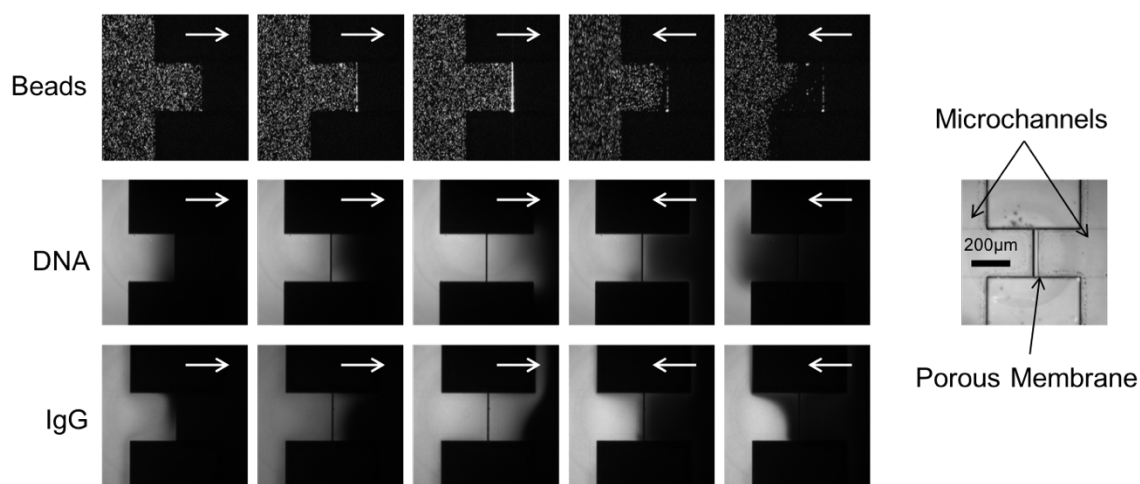


Figure 3.8 Capacité de rétention de la membrane poreuse latérale fabriquée par procédé SOI testée à l'aide de solutions contenant des nanoparticules, des molécules d'ADN simple brin 40 mers et des immunoglobulines. Les flèches blanches indiquent la direction de l'écoulement du fluide. La membrane de silicium poreux est située au centre de chaque image.

Par ailleurs, lors des mêmes sessions expérimentales, nous avons estimé la résistance hydrodynamique des membranes fabriquées, caractéristique essentielle utilisée lors de la conception des dispositifs fluidiques. Pour ce faire, la vitesse d'écoulement induite par la différence de pression appliquée aux entrées/sorties fluidiques de la puce a été mesurée dans les microcanaux en suivant la position des nanoparticules fluorescentes de 300 nm de diamètre. L'augmentation de la vitesse mesurée en fonction de la pression appliquée est donnée en Figure 3.9.

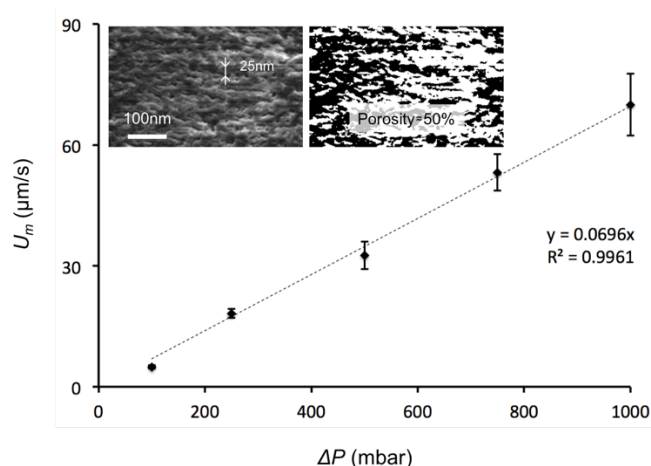


Figure 3.9 Graphique montrant la vitesse d'écoulement mesurée en fonction de la pression appliquée à travers une membrane poreuse latérale. De la relation linéaire, on peut déduire la résistance hydrodynamique de la membrane. Les deux inserts montrent des images MEB de la membrane poreuse utilisée pour estimer la taille moyenne des pores et la porosité de la couche (l'insert droit montre une image binaire après conversion de l'image de gauche).

La résistance hydrodynamique de la membrane fabriquée,  $R_h$ , qui relie le débit  $Q$  à la pression appliquée  $\Delta P$ , a ainsi été évalué à  $2.9 \times 10^{-1} \text{ Pa.s.}\mu\text{m}^{-3}$  à partir de la régression linéaire des données expérimentales, en négligeant l'apport de résistance des canaux microfluidiques. Théoriquement, la résistance hydrodynamique d'une membrane idéale à pores cylindriques de même rayon peut être obtenue à partir de l'équation de Hagen-Poiseuille :

$$R_h = \frac{\Delta P}{Q} = \frac{8\eta l}{r_p^2 w h \Phi} \quad (3.1)$$

où  $\eta$ ,  $l$ ,  $w$ ,  $h$ ,  $\Phi$  et  $r_p$  sont la viscosité dynamique du fluide, la longueur de membrane (*i.e.* son épaisseur), sa largeur, sa hauteur, sa porosité et le rayon des pores. En négligeant la tortuosité des pores et en utilisant les valeurs géométriques des membranes fabriquées on obtient une résistance hydrodynamique théorique de  $2 \times 10^{-1} \text{ Pa.s.}\mu\text{m}^{-3}$ . Cette valeur, qui est 6 ordres de grandeur supérieure à la résistance d'un microcanal de taille similaire sans membrane intégrée, est proche de la valeur expérimentale et démontre ainsi que le fluide injecté s'écoule à travers la membrane poreuse sur toute la section du microcanal.

### 3.4 Membranes poreuses pour la pré-concentration

La surface des membranes de silicium poreux à pores latéraux est chargée négativement au contact de solutions physiologiques ( $\text{pH} \geq 7$ ) en raison de la présence d'oxyde de silicium natif ( $\sim 1 \text{ nm}$ ) formé sur la paroi des pores en conditions atmosphériques. De ce fait, pour des tailles de pores suffisamment petits, *i.e.* approchant la taille de la double couche électrique, ces membranes présentent une sélectivité ionique : elles laissent passer de manière préférentielle un type d'ions, en l'occurrence, les cations [197]. Ainsi, sous l'application d'un champ électrique à travers la membranes, une zone d'enrichissement ionique se forme du côté de la cathode, tandis qu'une zone d'appauvrissement apparaît côté anode, comme illustré en Figure 3.10a (effet de polarisation de concentration ionique). Lorsque la membrane poreuse est intégrée entre deux microcanaux parallèles, la zone d'appauvrissement qui se développe dans l'entière section du canal connecté à la cathode peut ainsi agir comme un barrage électrostatique qui repousse les particules chargées. En induisant un flux dans ce même canal, *e.g.* par électroosmose, les molécules chargées vont ainsi s'accumuler et conduire à une augmentation locale de concentration (Figure 3.10b).

Un concentrateur électrocinétique a été réalisé sur ce principe dans le cadre des travaux de thèse de Yingning He, à partir des membranes de silicium à pores latéraux reliant deux canaux microfluidiques planaires. Vu qu'elles affichent une plus grande section efficace, les membranes fabriquées par le procédé SOI ont été utilisées pour concentrer des molécules de fluorescéine diluées dans du tampon PBS. Par l'intermédiaire d'électrodes de platine plongées dans les réservoirs d'entrées/sorties fluidiques des puces, une différence de potentiel ( $V_H - V_L$ ) appliquée aux bornes du canal dans lequel l'échantillon est injecté génère un champ électrique tangentiel ( $E_T$ ) qui transporte les molécules dans la zone d'appauvrissement par électroosmose, alors que l'autre canal est relié à la masse (GND) afin de créer un champ électrique ( $E_N$ ) à travers la membrane poreuse pour créer la zone d'appauvrissement ionique, comme indiqué en Figure 3.10a.

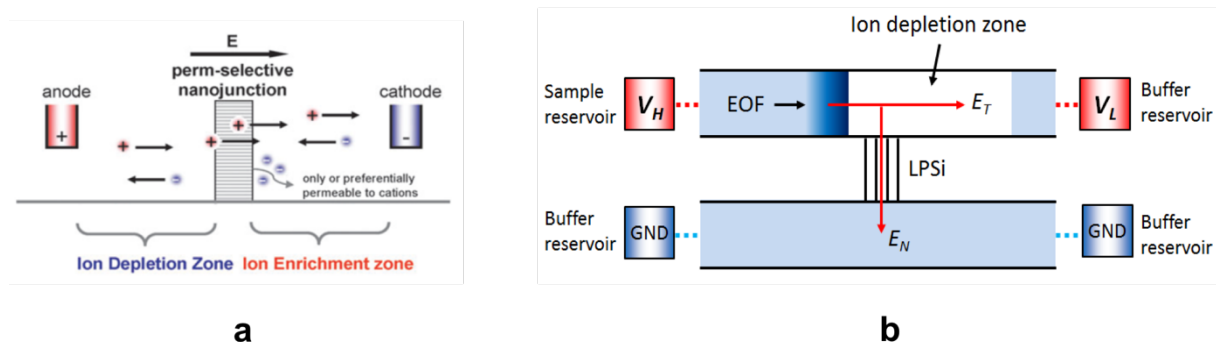


Figure 3.10 (a) Schéma illustrant la sélectivité ionique de la membrane poreuse qui laisse passer préférentiellement les cations, ce qui entraîne l'apparition de zones d'appauvrissement et d'enrichissement ioniques de part et d'autre de la membrane [68]. (b) Schéma d'un concentrateur électrocinétique dans un système de canaux reliés par une membrane poreuse à sélectivité ionique sous polarisation continue. L'augmentation de concentration est localisée dans la zone bleu foncé.

Des expériences réalisées avec des solutions de 100 nM et de 1  $\mu$ M de fluorescéine dans du PBS 0.1 $\times$  montrent que la fluorescence augmente au cours du temps à proximité de la membrane lorsque  $V_H = 7$  V et  $V_L = 2$  V (Figure 3.11a). L'évolution de l'intensité de fluorescence mesurée sur des régions de 10  $\mu$ m $\times$ 10  $\mu$ m centrées sur la zone de concentration maximale en fonction du temps est représentée sur la Figure 3.11b. Les facteurs de préconcentration sont estimés à plus de 100 et 50 pour les solutions de fluorescéine à 100 nM et 1  $\mu$ M après 90 s d'accumulation. Afin d'obtenir des facteurs plus élevés, nous avons modifié les valeurs de  $V_H$  et  $V_L$  au cours du processus de concentration. En utilisant des solutions de miARNs diluées dans du PBS 0.1 $\times$ , des facteurs de préconcentration de 5000 et 1000 ont été obtenus en 10 min pour des solutions à 1 nM et 10 nM. Même si les performances de notre dispositif n'atteignent pas les plus grands facteurs publiés dans la littérature [68], ces résultats placent notre dispositif à l'état de l'art au regard de la durée d'accumulation et surtout des faibles niveaux de tension utilisées, ce qui est primordial si une application nomade est considérée.

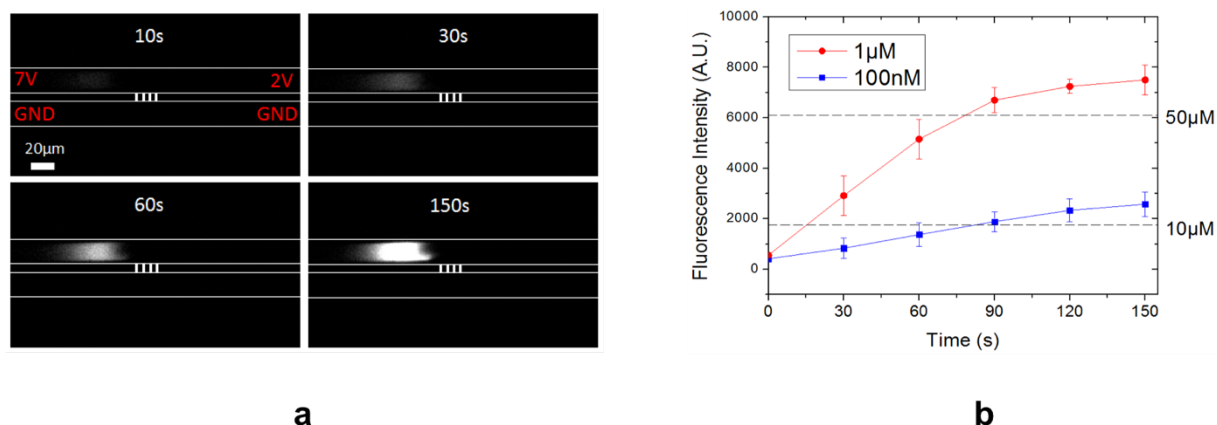


Figure 3.11 (a) Séquence d'images de microscopie de fluorescence lors de la préconcentration d'une solution à 100 nM de fluorescéine. (b) Variation de la concentration locale de fluorescéine en fonction du temps pour les solutions à 100 nM et 1  $\mu$ M.

Enfin, afin de se placer dans les conditions physiologiques en vue de réaliser le traitement d'un échantillon biologique brut type sérum, nous avons étudié l'efficacité du concentrateur avec un tampon de force ionique ~150 mM (PBS 1×). Dans ces conditions, un facteur maximum d'environ 500 a été obtenu pour une solution de 1 nM de miARNs. S'il est tout à fait logique que les facteurs de concentration obtenus soient plus faibles lorsqu'on augmente la force ionique du tampon puisque la longueur de Debye diminue, il est important de noter que le niveau de préconcentration atteint en conditions physiologiques est très prometteur d'un point de vue applicatif.

### 3.5 De la préparation d'échantillon à la biodétection : Membranes poreuses et transduction interférométrique

Si les membranes de silicium poreux présentent un intérêt indéniable pour réaliser des étapes de préparation d'échantillon sur puce, ce qui justifie le choix de l'intégration de ce matériau dans mes activités de recherche, le silicium poreux offre un avantage supplémentaire de taille : celui de pouvoir être utilisé pour la biodétection, à condition qu'il soit correctement biofonctionnalisé et couplé à une méthode de transduction, *e.g.* électrochimique [198], [199] ou optique [200].

Les travaux de l'équipe de Mike Sailor de l'University of California San Diego à la fin des années 90 sur la réalisation d'un biocapteur interférométrique en silicium poreux ont été pionniers dans le domaine, suscitant un véritablement engouement scientifique pour l'utilisation du silicium poreux en biodétection [201]. Dans une configuration Fabry-Pérot, illustrée en Figure 3.12, les interférences entre les rayons lumineux réfléchis à la surface de la couche poreuse et à l'interface silicium poreux/silicium résultent en un spectre dont la position des franges d'amplitude maximale (interférences constructives),  $\lambda_{max}$ , dépend de l'indice optique de la couche poreuse  $n_{layer}$  via l'épaisseur optique effective (EOT) :

$$2n_{layer}L \cos \theta = m\lambda_{max} \quad (3.2)$$

où  $m$  est l'ordre spectral des interférences,  $L$  est l'épaisseur de la membrane et  $\theta$  est l'angle d'incidence des rayons lumineux. L'indice de réfraction de la couche poreuse dépend du contenu des pores, comme décrit par théorie des milieux effectifs de Bruggeman [190] :

$$P \frac{n_{fill}^2 - n_{layer}^2}{n_{fill}^2 + n_{layer}^2} + (1 - P) \frac{n_{skeleton}^2 - n_{layer}^2}{n_{skeleton}^2 + 2n_{layer}^2} = 0 \quad (3.3)$$

où  $P$  est la porosité du silicium poreux,  $n_{fill}$  est l'indice de réfraction du milieu remplissant les pores, et  $n_{skeleton}$  est l'indice de réfraction du squelette qui constitue le matériau poreux.

Ainsi, en greffant des molécules sondes à la surface des pores, la couche poreuse peut être utilisée pour détecter la présence de molécules cibles dans un milieu. La littérature qui traite de ces biocapteurs est foisonnante, ces structures ayant été utilisées pour la détection d'ADN, de protéines et de bactéries, aussi bien que pour la mesure de réactivité enzymatique [200]. De plus, il est possible d'intégrer ces biocapteurs en silicium poreux dans des systèmes fluides afin d'autoriser une mesure en temps réel : soit en reportant la puce de silicium poreux dans une cellule fluide usinée

[202], [203], soit en scellant l'élément de silicium poreux à l'aide d'une fluidique en verre [204] ou en PDMS [205].

A partir de ces considérations, nous avons conduit une étude préliminaire (débutée à la fin de la thèse de Yingning He et poursuivie par Douglas Silva de Vasconcellos avec l'aide de Véronique Bardinal, chercheur au laboratoire), dans le but de réaliser un capteur interférométrique à partir de notre silicium poreux à pores latéraux. Au-delà de l'intérêt évident de pouvoir utiliser notre membrane filtrante directement comme biocapteur, l'idée était également d'offrir une configuration de détection différente de celle obtenue à l'aide de membranes à pores verticaux dans des systèmes microfluidiques : à savoir une configuration à écoulement frontal plutôt que tangentiel (voir Figure 3.1). En effet, des travaux théoriques ont montré que pour une empreinte de capteur similaire, la configuration frontale permet de diminuer de près de 20 fois le temps de réponse du capteur [206]. En outre, la comparaison expérimentale entre les deux configurations a confirmé cette tendance et a de plus révélé que l'écoulement frontal peut engendrer le piégeage des analytes dans les pores fermés, entraînant ainsi une surestimation de la sensibilité du capteur [207]–[209].

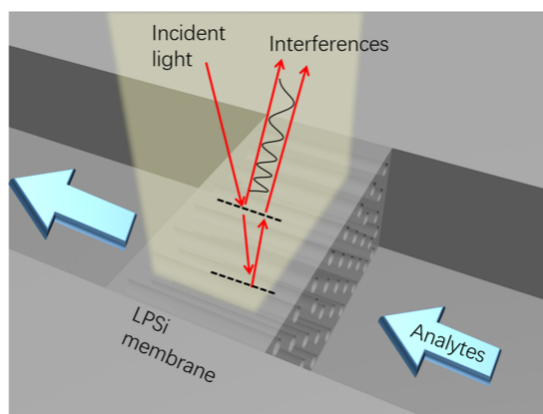


Figure 3.12 Schéma de principe de l'interféromètre optique constitué d'une membrane de silicium à pores latéraux avec écoulement frontal.

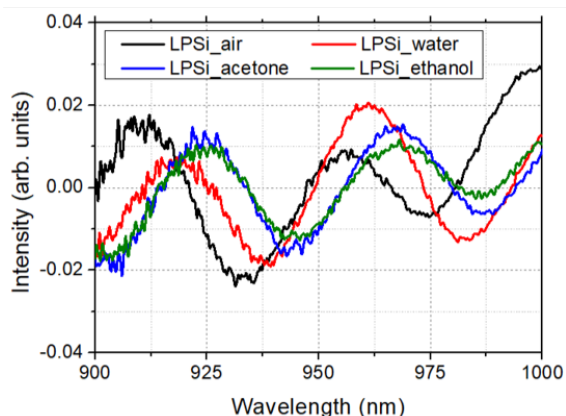


Figure 3.13 Spectres d'interférences obtenus à l'aide d'une membrane poreuse latérale chargée avec différents liquides (eau, acétone et éthanol).

Nous avons donc réalisé des mesures d'interférométrie à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (spectroscopie IRTF) sur les membranes poreuses latérales fabriquées par implantation, intégrées sur puce et encapsulées (échantillon type montré en Figure 3.6). A cause de la faible taille des membranes, nous avons utilisé un objectif à fort grossissement et réduit considérablement la fenêtre de mesure. Les expériences ont été réalisées tout simplement en injectant différents liquides dans les membranes afin de voir s'il était possible de remonter à leur propriété optique à partir de la mesure d'indice de réfraction de la couche poreuse. L'eau, l'acétone et l'éthanol ont été choisis pour leur propension à pénétrer facilement la membrane et à s'évaporer rapidement. La Figure 3.13 présente les spectres de réflexion obtenus suite à l'injection des différents solvants. Nous pouvons noter que par rapport au silicium poreux sec, la présence des liquides induit clairement un décalage du spectre vers le rouge, dans l'ordre eau-acétone-éthanol, ce qui est logique vu les indices associés (Tableau 3.1). Il est important de mentionner que des mesures



effectuées sur des échantillons de silicium poreux vertical ont montré que le rapport signal sur bruit des spectres était proportionnel à la surface de mesure, donc indépendant de la configuration de la porosité, mais que par contre, le signal obtenu avec les échantillons à pores latéraux était de moindre intensité : ceci étant probablement dû à une interface silicium poreux/substrat moins bien définie.

Tableau 3.1 Indices de réfraction théoriques et expérimentaux des membranes poreuses contenant divers solvants.

METHODE \ SOLVANT		AIR	EAU	ACETONE	ETHANOL
APPROXIMATION THEORIQUE	$n_{fill}$	1	1.328	1.354	1.357
	$n_{layer}$	2.56	2.69	2.70	2.70
VALEUR EXPERIMENTALE (RIFTS)	EOT (nm)	20255±158	21679±158	21679±158	21679±158
	$n_{layer}$	2.56±0.020	2.74±0.020	2.74±0.020	2.74±0.020
VALEUR EXPERIMENTALE (REGRESSION)	EOT (nm)	20273±459	21293±216	21386±156	21394±392
	$n_{layer}$	2.54±0.058	2.67±0.027	2.68±0.020	2.68±0.049

L'analyse des spectres a été effectuée par deux méthodes : par régression linéaire et par transformée de Fourier (Reflectometric Interference Fourier Transform Spectroscopy, RIFTS). Les valeurs expérimentales obtenues par les deux méthodes d'analyse, ainsi que les valeurs théoriques attendues sont renseignées dans le Tableau 3.1. Nous pouvons constater que malgré un bon accord entre les valeurs expérimentales et théoriques, les deux techniques d'analyse des spectres ne permettent pas de distinguer l'acétone de l'éthanol. Par contre, une méthode récemment proposée par le groupe de Giuseppe Barillaro (Interferogram Average over Wavelength [210]), permet de différencier les deux spectres sans passer par l'estimation de l'indice optique, ce qui constitue une preuve de concept de l'interféromètre basé sur la membrane poreuse latérale.

Ces résultats préliminaires s'avèrent donc prometteurs en vue de l'utilisation de notre membrane comme biocapteur, et comme nous le verrons dans le chapitre 5 qui présente mes perspectives de recherche, pourraient conduire à une solution générique monolithique pour la préparation d'échantillon couplée à l'analyse pour les laboratoires sur puce.

## 4 Vers une détection ultra-sensible sans marquage à l'aide de résonateurs MEMS

### 4.1 Introduction

#### 4.1.1 La promesse des biocapteurs issus des nouvelles technologies

Un biocapteur est un dispositif analytique combinant un élément de reconnaissance biologique couplé à un transducteur permettant de convertir les événements de reconnaissance biochimique en un signal physique mesurable. L'avènement de la microélectronique et des microtechnologies a fait naître une grande variété de biocapteurs basés sur des moyens de transduction aussi divers que la transduction optique [211], électrochimique [212], électrique [213], acoustique ou mécanique [214], [215], sous la forme de dispositifs à haut degré d'intégration offrant des sensibilités accrues par rapport aux techniques moléculaires classiques. De plus, certains de ces biocapteurs réalisent la détection sans marquage, c'est à dire sans avoir besoin ni de marquer la molécule cible, ni d'effectuer des étapes d'amplification, permettant ainsi une quantification directe des biomolécules. La détection sans marquage procure de réels avantages que sont la détection en temps réel et donc l'accès aux constantes cinétiques d'interaction, une préparation d'échantillon minimale, un protocole de mesure simplifié et un rendu des résultats accéléré : ce sont précisément ces avantages, liés à une technologies potentiellement bas coût, multiplexe, et portable qui entretiennent la promesse d'avoir accès à des analyses routinières au chevet du patient voire même chez soi, calquée sur le modèle de réussite des appareils de mesure du glucose pour les personnes diabétiques.

#### 4.1.2 Les biocapteurs MEMS

Parmi les moyens de transduction miniaturisés, la transduction mécanique offre tous les avantages mentionnés plus haut. Pour ce type de transduction, la reconnaissance biologique engendre une perturbation mécanique, sous forme de contraintes ou d'ajout de masse, qui peut se traduire par plusieurs effets suivant le mode opératoire du dispositif. En mode statique, la mesure de déformation de la structure renseigne sur l'événement de reconnaissance [216]. En mode dynamique, la variation de fréquence de résonance de la structure permet de remonter à la masse ajoutée sur le résonateur (l'analyse de l'amortissement du signal de vibration permet également d'évaluer les propriétés viscoélastiques du film adsorbé), avec la sensibilité massique théorique suivante :

$$S_n = -\frac{1}{2} \frac{f_n}{m_{eff,n}} \quad (4.1)$$

où  $f_n$  est la fréquence de résonance et  $m_{eff,n}$  est la masse effective de la structure pour le mode de vibration d'ordre  $n$ . La sensibilité augmente donc en diminuant la taille des systèmes, de sorte que des performances ultimes permettant la détection de molécules uniques ont été obtenues avec les NEMS (« NanoElectroMechanical Systems ») [217], même si la réduction d'échelle et donc de surface de capture peut entraîner des temps de réponse rédhibitoires [218]. Ces performances

impressionnantes sont obtenues dans des conditions de vide poussé pour lesquelles les facteurs de qualité des structures sont les facteurs de qualité intrinsèques, donc très élevés. Dès que ces systèmes vibrent en milieu liquide, condition *sine qua non* d'une mesure en temps réel sans dégrader les couches biologiques, les facteurs de qualité dégradés par les pertes et l'amortissement dus à l'environnement ne permettent plus d'atteindre des niveaux de masse minimum détectable aussi faibles. Une approche permettant de limiter l'interaction avec l'environnement est de placer le système fluide sur/dans le résonateur, et non l'inverse [219], [220]. Cependant, cette approche engendre des complications technologiques et n'est pas compatible avec de larges volumes de liquide à analyser. Une autre voie consiste à utiliser des modes de vibration supérieurs qui minimisent les pertes en milieu liquide, comme les modes de torsion des leviers [221], ou à opérer en mouillage partiel [222]. Cependant, et en règle générale les géométries classiques utilisées pour les MEMS résonants (ponts ou poutres), sont à bannir pour des applications en biodétection. On préférera ainsi l'utilisation de structures membranaires qui sont moins sujettes à la chute du facteur de qualité en milieu liquide [48].

#### 4.1.3 Vers des capteurs à faible couplage : les membranes/plaques

Bien que moins utilisés et répandus que les microleviers, les résonateurs type membranes et plaques ont tout de même démontré leur potentiel pour des applications en biodétection [223]–[226]. L'avantage d'utiliser des plaques vibrantes par rapport aux autres géométries est multiple. En effet, du point de vue purement mécanique, une plaque est plus rigide qu'un levier de même taille. Ainsi, pour une masse effective constante, l'augmentation de la rigidité se traduit par des fréquences de résonance et facteurs de qualité plus élevés, ce qui conduit à des sensibilités massique plus grandes [227]. De plus, ce type d'objet est plus robuste et peut donc non seulement subir des étapes de fabrication subsidiaires après libération, mais les plaques et membranes s'avèrent surtout compatibles avec plusieurs techniques de biofonctionnalisation. Enfin, en terme de moyen de transduction, les géométries types plaques sont particulièrement adaptées à l'actionnement électrostatique et la détection capacitive en environnement liquide. Par rapport à la transduction piézoélectrique, par exemple, la transduction électrostatique est plus simple à mettre en œuvre et offre plus de stabilité [228]. Cette méthode de transduction est plus difficile à implémenter sur des leviers et des poutres en raison de la présence de liquide entre les électrodes, ce qui nécessite des étapes supplémentaires pour les isoler [229]. En revanche, un système de plaques à cavité scellée permet de protéger le système d'électrodes. De plus, cet espace scellé permet de minimiser l'effet d'amortissement du au mouvement de la couche d'air [230].

## 4.2 Nouvelle approche de réalisation de plaques résonantes

### 4.2.1 Techniques de fabrication de microstructures suspendues

Il existe plusieurs techniques pour fabriquer des structures suspendues type plaques et membranes basées sur le micro-usinage de volume ou de surface et sur le report, chacune ayant ses avantages et ses limites. La technique la plus simple consiste à graver la face arrière d'un wafer pour libérer la structure réalisée en face avant : soit en faisant appel à la gravure ionique réactive profonde d'un wafer SOI afin d'utiliser l'oxyde enterré comme couche d'arrêt [223], soit par gravure

humide du silicium, dans d'un bain d'hydroxyde de potassium (KOH) par exemple [224]. Bien que cette technique soit parfaitement adaptée à la transduction piézoélectrique ou électromagnétique, l'actionnement électrostatique de ces structures est plus difficile à mettre en œuvre [225]. La méthode sacrificielle, telle qu'utilisée pour la fabrication des transducteurs ultrasoniques micro-usinés capacitifs (CMUTs), est une technique de fabrication de plaques à actionnement électrostatique éprouvée [231]. La libération de structures suspendues par gravure humide de la couche sacrificielle est une étape critique car les forces capillaires peuvent provoquer l'effondrement et le collage des plaques au substrat (phénomène de « stiction » en anglais), entraînant la défaillance du dispositif [232]. Toutefois, il existe des stratégies comme le séchage supercritique qui permettent de s'affranchir de ce problème. Enfin, une approche alternative au micro-usinage de surface qui conduit à un procédé plus simple et rapide, est la technique de report qui consiste à coller deux plaquettes dont l'une comporte la structure suspendue et l'autre une cavité micro-usinée [233]. La libération de la structure s'effectue alors simplement en éliminant le substrat reporté.

Dans la famille des méthode de fabrication par report, on trouve également la micro-maçonnerie, une technique additive d'impression par transfert qui permet de gagner en simplicité et en flexibilité car il est possible de réaliser rapidement sur un même substrat qui peut avoir une topographie complexe ou être souple, des structures suspendues d'épaisseurs variables avec accès à une plus grande gamme de matériaux [234]. L'impression par transfert fait appel à l'utilisation d'un tampon en élastomère (PDMS) pour transférer une structure (appelée encre) d'un substrat donneur sur un autre substrat (dit substrat accepteur). Ainsi, cette méthode est une variante de la technique bien connue d'impression par microcontact pour laquelle l'encre est un matériau solide. L'impression par transfert a été utilisée pour le report d'objets aussi divers que des lignes métalliques [235], des nanofils semi-conducteurs [236], ou même des motifs de résine photosensible [237]. Le processus d'impression peut être divisé en deux étapes : l'étape de prélèvement où l'encre est transférée du substrat donneur vers le timbre, et l'étape de dépôt où l'encre est transférée du timbre sur le substrat accepteur. Ainsi, le principal défi posé à l'impression par transfert est le contrôle de l'adhérence entre l'encre et le tampon, le substrat donneur et le substrat accepteur. En effet, pour que l'étape de prélèvement soit réussie, l'adhérence entre l'encre et le timbre doit être supérieure à celle entre l'encre et le support donneur. Inversement, pour effectuer l'étape de dépôt, l'adhérence entre l'encre et le timbre doit être inférieure à celle entre l'encre et le support accepteur. Un problème se pose quand l'adhérence timbre-encre permettant l'étape de prélèvement est supérieure à l'adhérence encre-substrat accepteur nécessaire au transfert : ce problème se pose par exemple quand la surface des substrats accepteurs et donneurs sont du même type. La micro-maçonnerie est une version avancée de l'impression par transfert qui apporte une solution à ce problème [238], et qui a démontré son utilité pour la réalisation d'actionneurs et de résonateurs à peignes interdigités [239]. La réponse se trouve dans la géométrie du tampon lui-même, qui comporte en surface des extrusions ou picots de forme pyramidale permettant de moduler la force d'adhésion (Figure 4.1a). Ainsi, au cours de l'étape de collecte de l'encre, la pression appliquée sur le timbre déforme les picots et la surface du timbre entre en contact avec l'encre, garantissant une adhérence suffisante pour séparer l'encre du substrat donneur. Ensuite, lors du retrait du tampon, son élasticité lui permet de reprendre forme et l'encre n'est alors plus maintenue que par la petite zone de contact formée par les picots du tampon. Ceci assure une faible adhérence entre le tampon et l'encre qui permet ensuite de déposer l'encre sur le substrat accepteur. En plus de cette astuce de

conception, il est important de noter que la force d'adhérence peut être modulée par les vitesses d'approche et de retrait du tampon.

#### 4.2.2 Réalisation de nanoplaques par micro-maçonnerie

Dans le cadre de la thèse d'Adhitya Bhaswara (2012-2015, [240]), nous avons exploré la possibilité d'utiliser la micro-maçonnerie pour fabriquer des nanoplaques résonantes en silicium en étudiant l'influence de cette méthode de fabrication sur les performances des dispositifs réalisés. Les travaux présentés ci-après ont été effectués en étroite collaboration avec l'équipe de Seok Kim, professeur à l'University of Illinois Urbana Champaign et spécialiste de l'impression par transfert : les étapes de report ont été réalisées dans son laboratoire (le reste du procédé de fabrication s'est déroulé au LAAS-CNRS). Les résultats de ces travaux ont donné lieu à deux articles parus en 2014 et 2016 dans des revues scientifiques [241], [242].

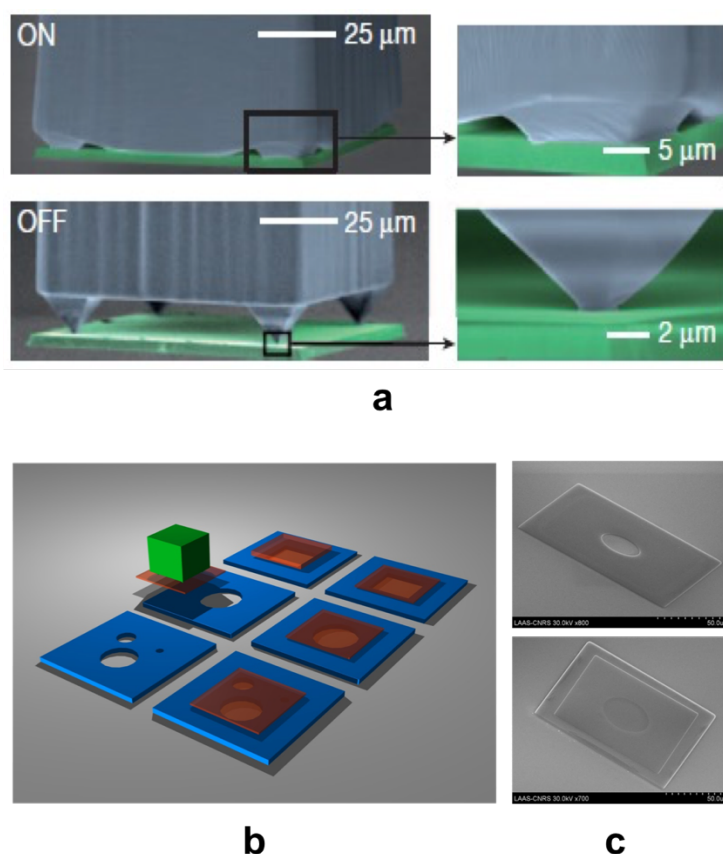


Figure 4.1 (a) Image MEB du tampon à micropointes utilisé dans la technique de micro-maçonnerie et d'une plaque de silicium utilisée comme encre [243]. Lorsque le tampon est pressé sur l'encre lors de l'étape de récupération (ON), il se déforme et augmente sa surface de contact avec l'encre, ce qui engendre une grande adhérence. Lorsque le tampon se rétracte (OFF), il reprend sa forme et la surface de contact, tout comme l'adhérence, redevient faible. (b) Illustration de l'application de la technique de micro-maçonnerie à la fabrication de dispositifs types plaques suspendues. L'encre (rouge), une nanoplaque de silicium fabriqué sur un substrat SOI donneur est transférée sur des structures de base (bleu) contenant des cavités et placées sur un substrat accepteur à l'aide de tampons à micropointes. (c) Image MEB des nanoplaques réalisées par micro-maçonnerie : substrat accepteur comportant une structure de base avec une cavité 20  $\mu\text{m}$  de rayon (haut), et même structure après transfert d'une nanoplaque de 340 nm d'épaisseur (bas).

Le procédé de réalisation des nanoplaques est illustrée en Figure 4.1b, et détaillé plus loin (Figure 4.3). Des structures de base carrées (de 120  $\mu\text{m}$  de côté) comportant une ou plusieurs cavités (de rayon variant de 8 à 30  $\mu\text{m}$ ) sont fabriquées sur un substrat de silicium accepteur à l'aide de techniques standards : dépôt PECVD d'une couche d'oxyde de silicium d'épaisseur variant de 0.66 à 2.5  $\mu\text{m}$  en fonction du lot, puis structuration par photolithographie et gravure RIE. Les nanoplaques de silicium (encre) sont fabriquées sur un substrat donneur, à partir de la couche supérieure d'une plaquette SOI dont l'épaisseur (340 nm) définit celle de la plaque. Pour ce faire, les encres de 100  $\mu\text{m}$   $\times$  100  $\mu\text{m}$  sont définies par photolithographie et RIE, puis désolidarisées du substrat donneur par attaque partielle de l'oxyde enterré, remplissage des cavités créées sous les plaques avec de la résine photosensible puis élimination complète de la couche d'oxyde. Le transfert des encres de silicium est alors réalisé au moyen de timbres en PDMS, après alignement et en utilisant des vitesses de mise en contact et rétraction précises pour obtenir les profils de force appropriés. Les structures sont finalement recuites à 950  $^{\circ}\text{C}$  pour lier de manière permanente les nanoplaques à leur base. La Figure 4.1c présente des images MEB d'une structure typique avant et après le processus d'impression par transfert.

Le comportement mécanique des structures réalisées par micro-maçonnerie a été étudié en dynamique par actionnement thermomécanique à l'aide d'un interféromètre Fabry-Pérot. Nous avons observé que la fréquence fondamentale d'une structure représentative (*i.e.* rayon = 20  $\mu\text{m}$ , épaisseur de plaque = 0.34  $\mu\text{m}$  et hauteur de cavité = 1.25  $\mu\text{m}$ ) mesurée dans le vide était bien en deçà de la fréquence de résonance théorique d'une plaque circulaire idéalement encastrée sur les bords (comme validé par microscopie infrarouge), *e.g.* 2.798 MHz contre 3.455 MHz, où [244] :

$$f_{analytique} = \sqrt{\frac{3}{5} \frac{1}{\pi r \sqrt{\rho}}} \sqrt{\frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \frac{t^2}{r^2} + \sigma_0} \quad (4.2)$$

avec  $r$ ,  $t$ ,  $\rho$ , rayon, épaisseur et densité de la plaque,  $\nu$ , coefficient de Poisson,  $E$ , module d'Young, et  $\sigma_0$ , contrainte dans le plan de la plaque. Ce large écart conduit à la conclusion que la nanoplaque fabriquée comporte des contraintes internes en compression (estimées dans l'exemple présent à -15 MPa) induites lors à l'étape de recuit thermique à cause de la différence de coefficient de dilatation thermique entre le silicium et le dioxyde de silicium. La variation de la fréquence de résonance des dispositifs en fonction du rayon des résonateurs a montré que celle-ci variait en  $1/r^2$  plutôt qu'en  $1/r$ , confortant ainsi le fait que ces dispositifs se comportent plutôt comme des plaques et non des membranes. Nous avons également mesuré la variation du facteur de qualité des résonateurs,  $Q$ , en fonction de la pression environnante (Figure 4.2a), et comme attendu, différents régimes ont été observés : à très basses pressions, un régime intrinsèque pour lequel le facteur de qualité est invariable car dépendant des mécanismes de dissipation intrinsèques (*e.g.* diffusion phonon-phonon et phonon-électron, amortissement thermoélastique, la dissipation du support) et donc des caractéristiques du résonateur, puis à plus fortes pressions, le régime moléculaire pour lequel la dissipation d'énergie est dominée par l'amortissement dû à l'environnement, et le facteur de qualité est alors inversement proportionnelle à la pression de l'air [245] :

$$Q_{mol} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} \sqrt{\frac{RT}{M_{air}}} \frac{t\rho f}{P} \quad (4.3)$$

où  $R$  est la constante des gaz parfaits,  $T$  la température,  $M_{air}$  la masse molaire de l'air,  $P$  la pression,  $t$  l'épaisseur de la plaque,  $\rho$  la masse volumique du résonateur, et  $f$  sa fréquence de résonance. La ligne rouge tracée sur la Figure 4.2a correspond au facteur théorique obtenu en utilisant la valeur expérimentale en vide poussé comme valeur intrinsèque et à partir de l'équation (4.3) en régime moléculaire : ce modèle décrit de manière adéquat les résultats expérimentaux, et ce même en régime visqueux jusqu'à la pression atmosphérique. Les dispositifs réalisés par micro-maçonnerie présentent typiquement des facteurs intrinsèques compris entre 3 000 et 14 000, et des facteurs de qualité à pression atmosphérique dans la gamme de 10 à 100. Le décalage de fréquence de résonance par rapport à la fréquence de résonance sous vide a également été mesuré en fonction de la pression environnante : ce décalage est négligeable jusqu'à ce que le dispositif entre dans le régime moléculaire et la fréquence augmente alors avec la pression. Cette augmentation peut être attribuée à la présence d'air en dessous de la nanoplaque, qui agit comme un facteur de rigidité supplémentaire et augmente la constante de raideur efficace  $k_{eff}$  du dispositif. Ainsi, ces structures présentent des comportements cohérents avec les prédictions théoriques et offrent de plus des sensibilités massiques, estimées à partir de la masse effective du résonateur et de sa fréquence propre, de l'ordre de la centaine d'ag/Hz.

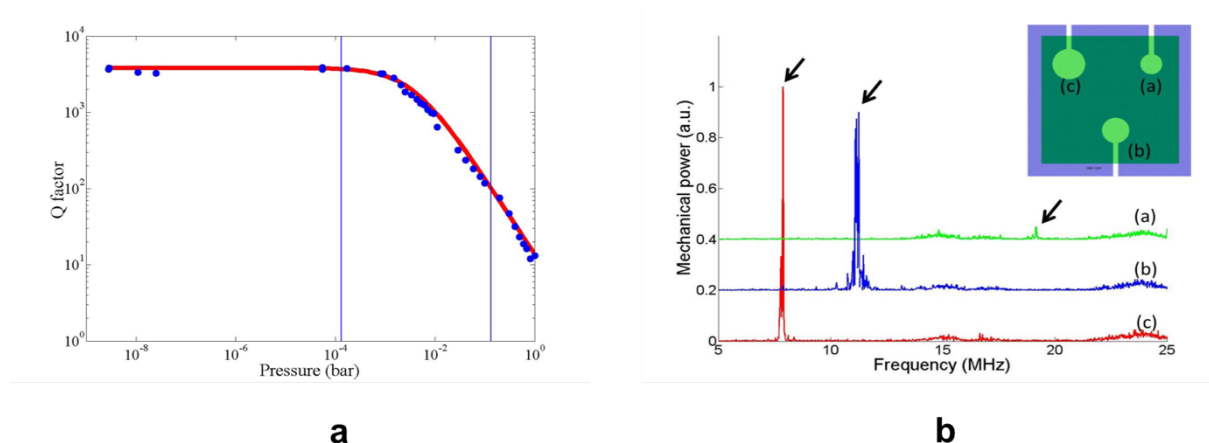


Figure 4.2 (a) Variation du facteur de qualité en fonction de la pression pour une nanoplaque de rayon 20  $\mu\text{m}$  et d'épaisseur 340 nm (épaisseur de la cavité = 1.25  $\mu\text{m}$ ). Les marqueurs bleus indiquent les données expérimentales, et le tracé rouge correspond au facteur  $Q$  théorique. Les lignes verticales bleues indiquent les frontières entre les différents régimes d'amortissement (intrinsèque, moléculaire puis visqueux). (b) Réponse fréquentielle à pression atmosphérique d'un dispositif à cavités multiples de rayon :  $r = 8 \mu\text{m}$  (a, vert,  $f_r = 18.8 \text{ MHz}$ ),  $r = 10 \mu\text{m}$  (b, bleu,  $f_r = 10,9 \text{ MHz}$ ), et  $r = 12 \mu\text{m}$  (c, rouge,  $f_r = 7.7 \text{ MHz}$ ). En médaillon : vue schématique du dispositif.

Nous avons également transféré des nanoplaques sur des structures de base comportant de multiples cavités. Un résultat typique de caractérisation dynamique d'une structure à cavités multiples réalisée à pression atmosphérique à l'aide d'une pastille piézo-électrique, utilisée pour induire des amplitudes de vibration élevées, est représenté sur la Figure 4.2b. Aucun pic de résonance correspondant aux cavités voisines n'est observé lorsqu'une seule des cavités est

mesurée, ce qui suggère qu'il n'y a pas de diaphonie mécanique entre les structures suspendues. Ce résultat montre ainsi que la technique de micro-maçonnerie permet la fabrication de plusieurs résonateurs à l'aide d'une seule structure reportée en une seule étape, permettant ainsi une fabrication parallèle.

#### 4.2.3 Résonateurs à transduction électrostatique intégrée

L'avantage du procédé de fabrication des nanoplaques résonantes présenté dans la section précédente est qu'en le modifiant légèrement, il permet d'intégrer simplement une méthode de transduction par actionnement électrostatique et détection capacitive (Figure 4.3). Il suffit pour cela d'utiliser un substrat accepteur et une encre fortement dopés (ou de les doper, par exemple, par implantation, comme c'est le cas ici pour le substrat donneur) et d'ajouter un jeu d'électrodes pour prendre contact sur le substrat et sur la structure suspendue. En outre, deux autres étapes de lithographie et de gravure ionique supplémentaires sont réalisées sur le substrat accepteur afin d'une part de séparer les électrodes inférieures présentes sous chaque structure de base et permettre l'adressage électrique des dispositifs, et d'autre part, pour graver la couche d'oxyde enterrée et réaliser un contact afin de mettre le substrat à la masse. Après le processus de report par micro-maçonnerie et le recuit thermique, les interconnexions sont formées en utilisant la technique de dépôt métallique par pulvérisation suivie d'un lift-off. Les dispositifs sont alors configurés par paires afin de faciliter la mesure capacitive par compensation (élimination des capacités parasites), comme montré en Figure 4.4a.

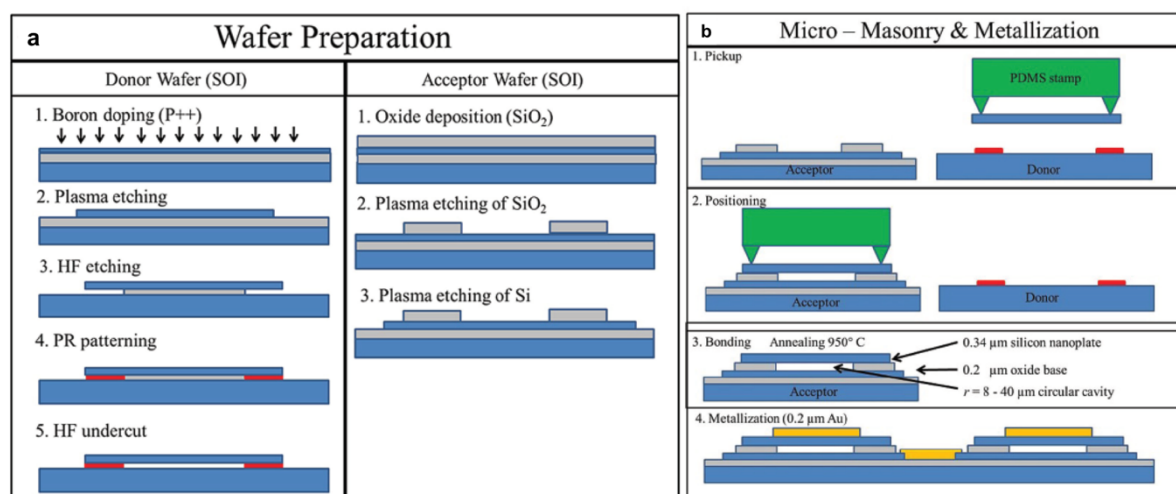
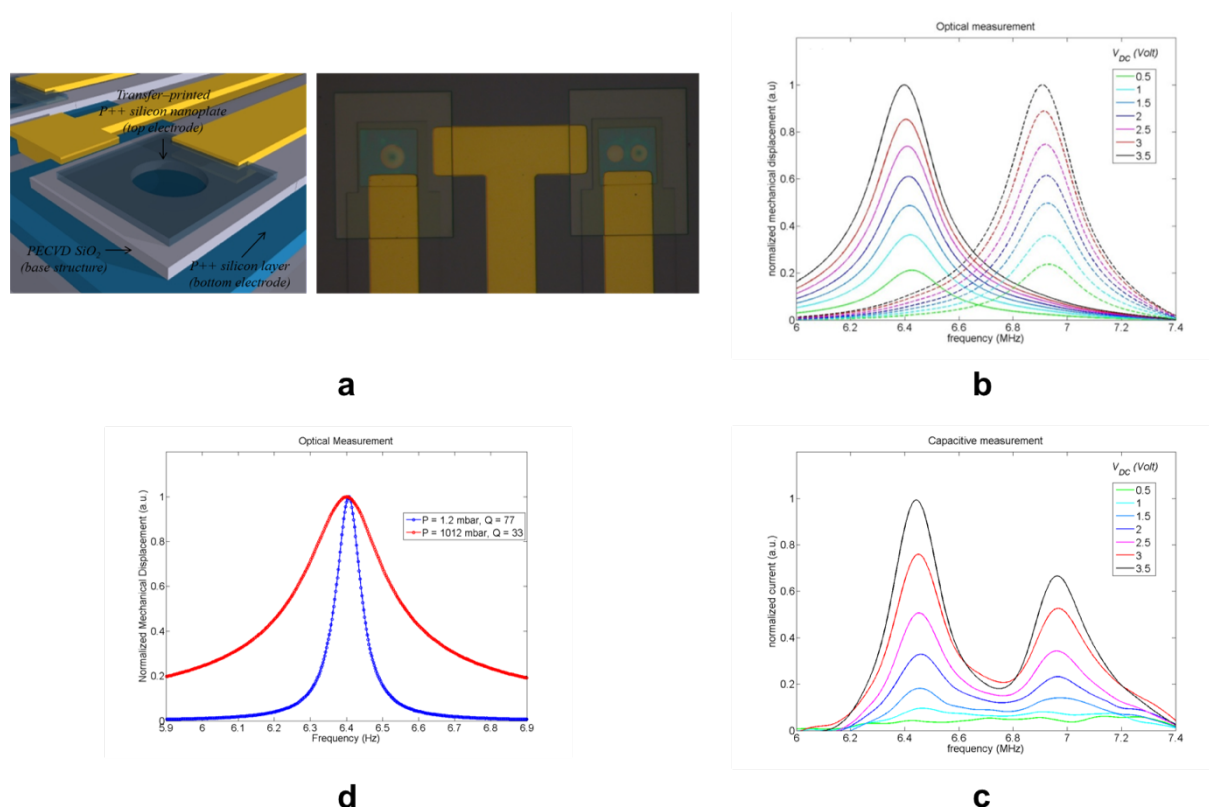


Figure 4.3 Détail du procédé de fabrication des nanoplaques à transduction électrostatique intégrée. (a) Traitement du substrat donneur (gauche) et accepteur (droite). (b) Report par micro-maçonnerie et prises de contact électrique.

La caractérisation des dispositifs actifs a tout d'abord été effectuée par mesure optique et en utilisant l'actionnement électrostatique intégré, sur deux résonateurs d'une même nanoplaque (montrés en Figure 4.4a) : la réponse fréquentielle à pression atmosphérique, donnée en Figure 4.4b, montre comme on pouvait s'y attendre que les deux cavités, en théorie parfaitement similaires ( $r = 14 \mu\text{m}$ ), produisent des pics de résonance à des fréquences légèrement différentes et que les hauteurs de pics, qui sont proportionnelles au déplacement de la plaque, varient linéairement avec  $V_{DC}$ . Nous retrouvons ces mêmes pics mesurés cette fois simultanément lors d'une même acquisition



en utilisant la détection capacitive intégrée (Figure 4.4c), avec une variation d'amplitude en  $V_{DC}^2$ , ce qui est attendu pour une capacité à plaques parallèles. Le facteur de qualité d'un des deux résonateurs a été évalué à 33 à pression atmosphérique mais à seulement 77 sous vide (Figure 4.4d), valeur bien inférieure à celles obtenues pour les structures passives. Ce faible facteur de qualité mesuré dans le vide s'explique par la présence d'une cavité d'air étanche entre la plaque et le substrat (alors que la base des structures passives présente des événements, permettant à la pression au sein de la cavité de s'équilibrer avec la pression de travail). Cependant, cela ne modifie pas significativement le fonctionnement du dispositif dans l'air et l'étanchéité de la cavité peut se révéler avantageuse en environnement liquide.



**Figure 4.4** (a) Illustration d'un dispositif à transduction électrostatique intégré (gauche) et image optique de nanoplaques suspendues comportant le dispositif actif à droite à double cavité ( $r = 14 \mu\text{m}$ ) et le dispositif référence à gauche (droite). Réponse fréquentielle du dispositif à double cavité obtenu par actionnement électrostatique et (b) détection optique (interférométrie Fabry-Pérot) ou (c) détection capacitive intégrée. (d) Réponse fréquentielle d'une nanoplaque à cavité scellée sous vide (ligne bleue,  $Q_{vide} = 77$ ) et à pression atmosphérique (ligne rouge,  $Q_{air} = 33$ ).

Ainsi, la soudure entre la nanoplaque de silicium et la base de dioxyde de silicium offre plusieurs avantages. Aucune diaphonie mécanique n'est observée entre les différentes cavités d'une seule plaque suspendue, ce qui permet la fabrication de réseaux de dispositifs à l'aide d'une seule plaque. Cette soudure est également assez solide pour résister à des étapes additionnelles de fabrication (photolithographie, métallisation), leur biofonctionnalisation devrait ainsi être aisée. Enfin, le caractère hermétique de la cavité des résonateurs permet d'envisager, une fois passivés, leur fonctionnement en milieu liquide pour la biodétection en temps réel.

## 4.3 Stratégies de biofonctionnalisation

### 4.3.1 La biofonctionnalisation localisée et multiplexe de MEMS

L'étape de biofonctionnalisation permet de convertir un résonateurs MEMS en biocapteur. Cette étape consiste d'une part à immobiliser au moins un type de molécule sonde (de préférence plusieurs pour permettre une détection multiplexe avec référence ou contrôle), sur la surface de la partie sensible du dispositif sans l'endommager et d'autre part, à passiver le reste du dispositif afin d'éviter toute adsorption non-spécifique rédhibitoire pour l'utilisation d'échantillons fortement dilués et pouvant engendrer le dysfonctionnement à terme du capteur. Il est important de mentionner que l'étape de fonctionnalisation doit également préserver l'intégrité des molécules biologiques.

Il existe plusieurs approches physico-chimiques pour réaliser une couche bioactive par greffage de biomolécules en surface d'un capteur et pour effectuer la passivation de surface [246]. La méthode de biofonctionnalisation la plus couramment utilisée car la plus facile à mettre en œuvre, repose sur l'immersion de l'échantillon dans une solution biochimique dédiée : cependant, même si à l'aide d'une différence de matériaux et des chimies correspondantes (*e.g.* l'intégration d'or en surface des capteurs et le recours à des molécules thiolées), on peut en effet circonscrire la fonctionnalisation à la zone sensible et passiver le reste du dispositif dans la foulée, cette stratégie ne répond pas à proprement parler à la localisation de la fonctionnalisation permettant le multiplexage. Ainsi, il existe des outils qui permettent de localiser la fonctionnalisation de surface, dont certaines ont déjà été utilisées pour la biofonctionnalisation de MEMS, comme l'impression par jet d'encre [247], ou l'utilisation de microcapillaires [248]. D'autres techniques utilisées pour la biofonctionnalisation de différents objets, comme des systèmes microfluidiques ou des puces à ADN, pourraient être également appliquées aux MEMS : ces techniques incluent la synthèse chimique photo-induite [249], le greffage électrochimique localisé à la surface d'électrodes adressables [250], l'adressage par systèmes fluidiques [251], mais aussi les techniques de dépôt par transfert de liquide ou par transfert moléculaire à l'aide de pointes [252]–[254].

Motivé par le besoin spécifique de biofonctionnaliser les capteurs MEMS puis NEMS réalisés au LAAS dans l'équipe de Christian Bergaud et Liviu Nicu, j'ai commencé à travailler sur des solutions de dépôt localisé de goutte pendant ma thèse. Depuis, je développe d'autres techniques complémentaires qui sont présentées ci-dessous.

### 4.3.2 Dépôt de microgouttes par contact direct : de l'outil Bioplume tout silicium à une version polymère réalisée en impression 3D

Pendant ma thèse, réalisée au LAAS-CNRS de 2003 à 2006 sous la direction de Christian Bergaud et Liviu Nicu, j'ai développé un système automatisé de dépôt de gouttes basé sur l'utilisation de microleviers de silicium [255]. Chaque levier comporte un canal fluidique dont le remplissage est simplement effectué en plongeant le levier dans la solution à déposer, et le dépôt de goutte s'opère ensuite par contact direct de la pointe du levier sur la surface à fonctionnaliser. L'originalité de ce système, nommé Bioplume, repose sur l'intégration de capteurs de forces et sur l'utilisation de méthodes de dépôt assistées par champ ou par auto-assemblage afin de contrôler *in*

*situ* la taille, l'uniformité et la composition des motifs réalisés. Le système qui fonctionne en boucle fermée afin d'automatiser la réalisation de matrices de gouttes, permet la correction des erreurs d'alignement et le contrôle de la force exercée pendant le dépôt, garantissant ainsi une certaine homogénéité entre gouttes déposées. Ce système s'est montré compatible avec plusieurs voies de fonctionnalisation, permettant non seulement de déposer directement des biomolécules en solution [256] ou des gouttes de polymères [257], [258], de former des assemblages auto-organisés de nanoparticules fonctionnalisées [259], [260], mais aussi de réaliser des couches biofonctionnelles de polypyrroles par électropolymérisation à l'aide d'électrodes incorporées directement dans le système fluide des leviers [261], [262]. En couplant ce système de dépôt avec des biorécepteurs synthétiques, les polymères à empreinte moléculaires (voir plus bas, en section 4.3.4), nous avons fonctionnalisé des matrices de capteurs MEMS résonants pour la biodétection de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), substance active utilisées dans les herbicides [48], [263].

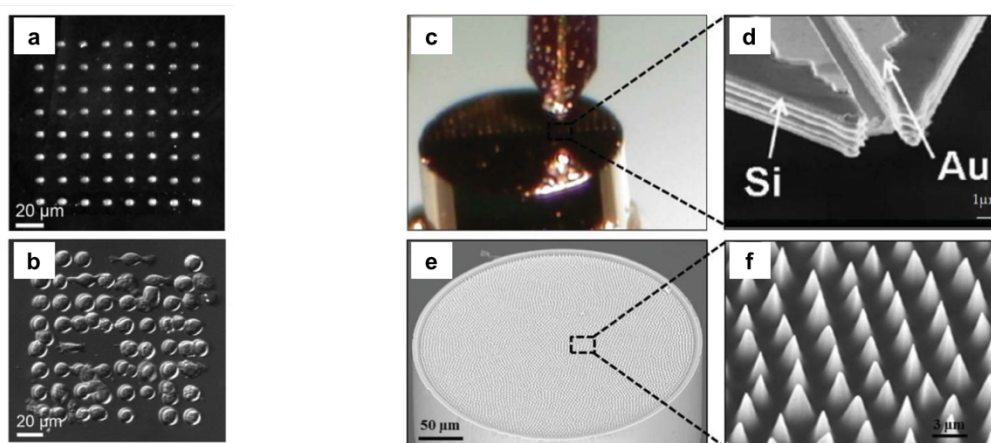


Figure 4.5 (a) Image de fluorescence d'une matrice de plots d'IgG de lapin avec un pas de 20  $\mu\text{m}$ . Après blocage de la surface, l'échantillon est tout d'abord incubé dans une solution d'IgG anti-lapin de chèvre biotinylé, puis dans une solution de streptavidine-phycoérythrine fluorescente. (b) Image à contraste interférentiel des anticorps anti-IgG enregistrés après incubation de lymphocytes B. (c) Image optique montrant un microlevier et les plots générés par électropolymérisation de pyrrole sur l'extrémité dorée d'un faisceau de fibres optiques. (d) Image MEB de la pointe du microlevier avec électrode d'or intégrée au canal fluide. (e-f) Images MEB d'un faisceau de fibres optiques nanostructurées.

Depuis mon entrée au CNRS et mon retour au laboratoire en 2010, j'ai réutilisé la technologie Bioplume dans le cadre de deux projets ANR. Le premier, intitulé Mult-I-Cell-S (pour Imagerie parallélisée de sécrétions cellulaires), qui s'est déroulé entre 2011 et 2014 en collaboration entre l'équipe de Thierry Livache au CEA (UMR 5819 SPrAM) et de Patrice Marche à l'IAB (Institute for Advanced Biosciences) toutes deux localisées à Grenoble, visait à réaliser des biopuces à anticorps permettant non seulement d'identifier différentes familles et sous-familles de cellules immunitaires (e.g. lymphocytes B et T, lymphocytes T CD4+ et CD8+) dans un même échantillon ainsi que les facteurs solubles (cytokines) sécrétés par chacune dans le milieu extracellulaire et initiant en aval différentes étapes de la réponse immunitaire. A l'aide de motifs définis par Bioplume et dont la taille avoisine celle de cellules (Figure 4.5a), une cellule individuelle peut être capturée sur un plot d'anticorps [264], et les molécules libérées dans son environnement proche sont détectées par

fluorescence ou SPR. Dans le cadre du deuxième projet ANR, le projet MOLY( MOLEcular endocopy), toujours en cours et qui concerne le même consortium plus l'équipe de Neso Sojic de l'Institut des Sciences Moléculaires à Bordeaux, nous mettons à profit la capacité de la technique de dépôt Bioplume à fonctionnaliser des objets de typologie complexe : nous avons en effet démontré le dépôt multiple de gouttes sur l'extrémité d'un faisceau de fibres nanostructurées, comme montré sur la Figure 4.5c [265]. L'objectif du projet MOLY est de développer, sous le format d'un endoscope, un laboratoire d'analyses moléculaires multiplexées sur fibre optique par détection plasmonique fonctionnant à distance, sans marquage, *in situ* et *in vivo*.

Cependant, au cours du projet, la nécessité d'avoir des profils d'extrémité de fibres très effilées à géométrie en cône tronqué (diamètre de cœur de 2-3  $\mu\text{m}$ , hauteur du cône de 7-10  $\mu\text{m}$ , et épaisseur d'or de 50 nm) et des surfaces fonctionnalisées assez larges (quelques dizaines de micromètres) pour optimiser les signaux SPR ont rapidement posé des problèmes à la technologie Bioplume actuelle. En effet, d'une part, les gouttes déposées étaient trop petites, d'autre part, la force d'appui nécessaire au dépôt engendrait irrémédiablement l'endommagement des fibres et de la couche d'or. Par ailleurs, il est important de noter que même si des essais prometteurs ont été conduits à l'aide de la technique d'impression jet d'encre, ces mêmes essais ont clairement démontré les limites de cette approche : bouchage régulier des buses, difficulté de mettre en place le multiplexage, ou volumes morts trop importants pour l'utilisation de matériel biologique onéreux, même si nous admettons que la machine utilisée n'était pas optimisée pour cette application.

Dans le but de remédier aux défauts de l'actuelle génération Bioplume, je me suis rapproché de Laurent Malaquin, expert au LAAS en techniques d'impression 3D pour les applications biologiques, afin d'étudier la réalisation de dispositifs Bioplume en polymère. Il est très vite apparu que l'impression 3D permettrait de réaliser des leviers plus souples (le module d'Young de la résine utilisée est deux ordres de grandeur inférieur à celui du silicium), de baisser les coûts et les temps de prototypage des dispositifs, et de facilement changer de géométries sans avoir à fabriquer de nouveaux masques de photolithographie. Après quelques essais, la fabrication s'est rapidement montrée concluante : la Figure 4.6 présente un dessin du levier Bioplume obtenu à l'aide du logiciel de CAO 3D Freecad (génération d'un fichier stl) et des photographies du levier correspondant réalisé en polymère par la Dilase 3D en un peu plus d'une heure seulement. La résolution actuelle permet de reproduire parfaitement un levier avec un canal microfluidique central faisant 20  $\mu\text{m}$  de large, ce qui est finalement assez proche de la taille de leviers fabriqués en silicium. Des premiers dépôts de solution d'eau DI/glycérol ont également été effectués avec succès par ces objets 3D qui offrent ainsi une solution hautement flexible puisque l'outil de dépôt peut rapidement être fabriqué avec des dimensions et géométries adaptées au motif souhaité. Cette technique nous permet donc maintenant et facilement de lancer une étude d'optimisation de la forme du levier mais également, puisque l'objet est complètement transparent, une étude des effets de mouillabilité et de géométrie sur l'efficacité du remplissage du levier : la technologie Bioplume s'offre donc maintenant une deuxième vie avec l'impression 3D et je pense que sous cette forme, elle pourra devenir une solution générique pour la fonctionnalisation de biocapteurs.

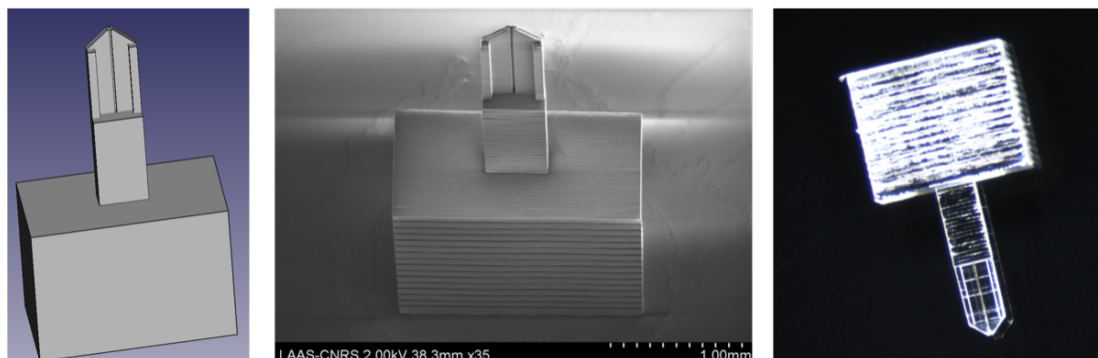


Figure 4.6 Réalisation du dispositif Bioplume par impression 3D : fichier .stl réalisé à l'aide d'un logiciel de CAO (à gauche), photographie MEB et optique du levier correspondant fabriqué avec la Dilase 3D (au centre et à droite).

#### 4.3.3 Diminution en taille, fonctionnalisation d'objets fragiles : le $\mu$ CP

Avec la volonté de gagner en sensibilité et robustesse par la réduction d'échelle et le matriçage des dispositifs, l'équipe de Liviu Nicu a amorcé une descente vers les nanosystèmes électromécanique (NEMS) à la fin des années 2000. Cette réduction en taille accompagnée d'un accroissement du nombre de dispositifs s'est avérée poser de nouveaux problèmes technologiques liés à la fonctionnalisation de ces structures suspendues et fragiles, auxquels Bioplume ne répondait plus. Ainsi, dans le cadre de la thèse de Denis Dezest [266], entre 2011 et 2015 (et à la suite de travaux préliminaires effectués par Sven Salomon à la fin de sa thèse), nous avons modifié la technique de tamponnage moléculaire afin de l'adapter à la fonctionnalisation à grande échelle de nanostructures suspendues tout en passivant le reste de la puce et en préservant l'intégrité mécanique des nanosystèmes. Ces travaux, résumés ci-dessous ont fait l'objet de deux publications dans des journaux internationaux [267], [268].

Le tamponnage moléculaire (impression par microcontact,  $\mu$ CP) est une technique de lithographie douce qui consiste à transférer une encre depuis les protrusions d'un timbre (tampon) élastomère par contact avec la surface d'un substrat [269]. Cette technologie bas coût permet de générer de manière parallèle des réseaux de motifs de dimensions nanométriques à l'échelle de grandes surfaces tout en étant compatible avec l'utilisation de molécules biologiques [270]. Afin de fonctionnaliser des structures nanométriques suspendues, dans l'exemple précis donné ici, des nanoleviers, nous avons utilisé une version simplifiée de la technique d'OSM- $\mu$ CP (pour One-Step-Multiple- $\mu$ CP) développée au laboratoire par l'équipe de Christophe Vieu [271]. Cette approche modifiée du  $\mu$ CP classique repose sur l'utilisation d'un timbre dit double-niveau où à la fois les protrusions et les régions en creux du timbre sont impliquées dans le transfert. Le timbre est conçu de manière à ce que, une fois aligné et mis en contact avec la surface du substrat, les protrusions du timbre soient en appui au niveau des zones inactives de la puce (entre les leviers) tandis que les tranchées sont suspendues au-dessus des leviers. Dans notre cas, cette approche double-niveau présente deux avantages. Le premier est de pouvoir contacter les structures fragiles à fonctionnaliser en contrôlant l'effondrement des creux du timbre, la pression nécessaire étant grandement limitée par les protrusions servant de support mécanique. Le second est la possibilité de pouvoir encrer les deux niveaux du timbre avec deux molécules différentes, et donc notamment de pouvoir réaliser en une seule étape la fonctionnalisation et la passivation de la puce. L'approche est illustrée sur la Figure 4.7. Après encrage du timbre avec la solution de molécules sondes, des dépôts sacrificiels

successifs sont réalisés afin de localiser les molécules uniquement au niveau des motifs en creux du timbre. Pour cela, le timbre est placé simplement en contact avec la surface d'un substrat sacrificiel afin de transférer les molécules présentes au niveau des protrusions. Le timbre est ensuite encre avec une seconde solution comportant l'agent passivant, puis mis en contact avec le substrat pour le dépôt du passivant au niveau des régions non actives. Les molécules sondes sont finalement transférées à la surface des nanoleviers par effondrement des creux du timbre grâce à l'application d'une pression extérieure.

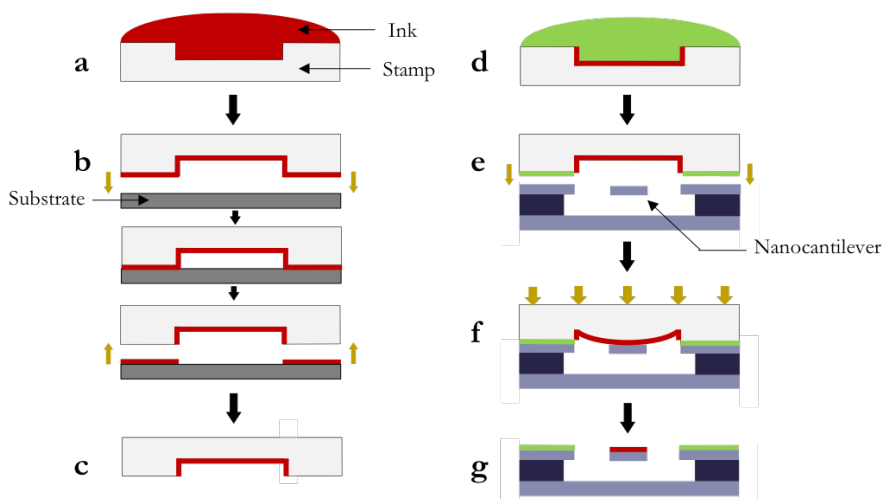


Figure 4.7 Schéma de principe (vue en coupe) de la technique de  $\mu$ CP double-niveau utilisée pour la fonctionnalisation de nanoleviers libérés. (a) Premier encreage du timbre avec la solution de molécules sondes suivi de (b) dépôts sacrificiels successifs sur un substrat permettant de (c) confiner les molécules sondes au niveau des creux du timbre. (d) Second encreage du timbre avec la solution comportant l'agent passivant. (e) Mise en contact du timbre et du substrat avant (f) l'application d'une pression extérieure pour effondrer les creux du timbre et (g) réaliser en un seul dépôt la fonctionnalisation et la passivation des nanoleviers.

Cette approche a ainsi été utilisée pour fonctionnaliser un réseau de nanoleviers montré en Figure 4.8a avec un anticorps polyclonal IgG1 Alexa Fluor® 660 àne anti-chèvre, en utilisant la BSA comme agent passivant pour le reste de la puce. Suite à l'étape d'impression, une observation par microscopie de fluorescences a bien attesté de la présence des biomolécules aux endroits désirés (Figure 4.8b). L'activité biologique des molécules déposées a ensuite été validée par un essai immunologique en incubant la puce dans une solution d'anticorps cibles spécifiques IgG2 (Alexa Fluor® 488 chèvre anti-souris) et non spécifiques IgG3 (Alexa Fluor® 488 âne anti-souris). Cette expérience a également confirmé le pouvoir passivant de la couche de BSA prévenant toute adsorption non-spécifique. Enfin, l'intégrité mécanique des nanoleviers a été évaluée en réalisant des caractérisations gravimétriques sur plusieurs nanoleviers choisis aléatoirement au sein du réseau. La Figure 4.8c correspond aux réponses dynamiques typiques d'un des leviers, après interaction (dépôts des sondes IgG1, passivation BSA et interaction IgG2) et après élimination du matériel biologique réalisée par immersion de la puce dans un bain Piranha. Ces mesures de fréquence de résonance attestent indéniablement de la préservation de l'intégrité mécanique des structures, qui ont résisté à l'ensemble du protocole mis à œuvre sans dommage apparent. La présence de la masse ajoutée à la surface des nanoleviers se traduit par une chute de la fréquence

de résonance ainsi qu'une diminution du facteur de qualité, attribuée à un effet dissipatif lié à la présence du matériel biologique. La valeur moyenne de masse ajoutée sur 16 leviers et ramenée à la surface d'un levier a été estimée à  $22 \text{ fg}/\mu\text{m}^2$  et est significativement plus importante que celle juste après dépôt des sondes IgG1, à savoir  $11.9 \text{ fg}/\mu\text{m}^2$ . Ainsi, cet écart est en accord avec la présence supplémentaire des cibles ayant interagi spécifiquement avec les sondes immobilisées à la surface des nanoleviers.

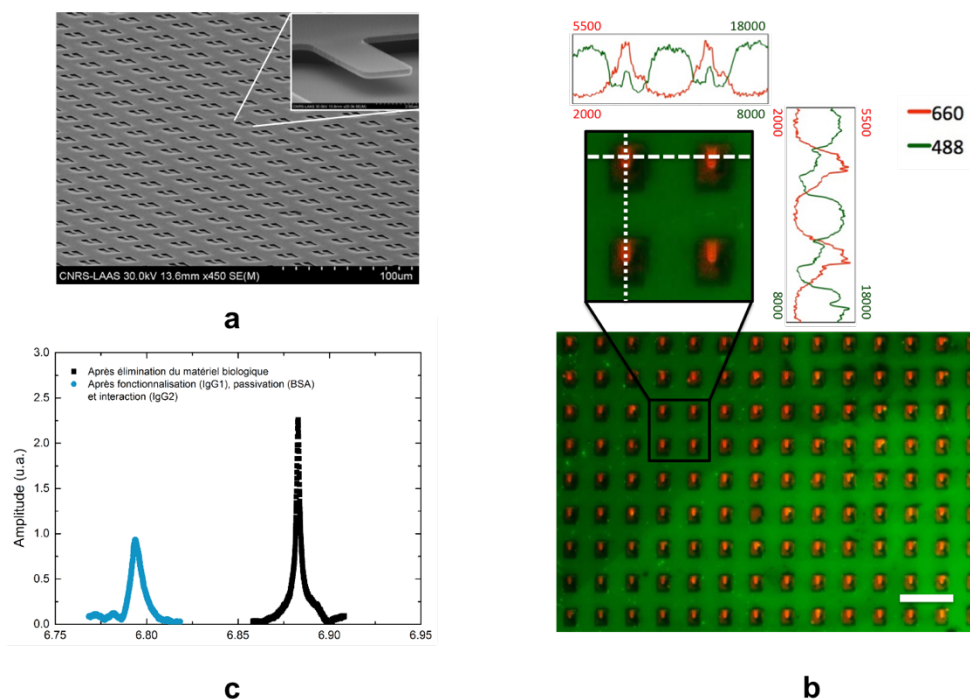


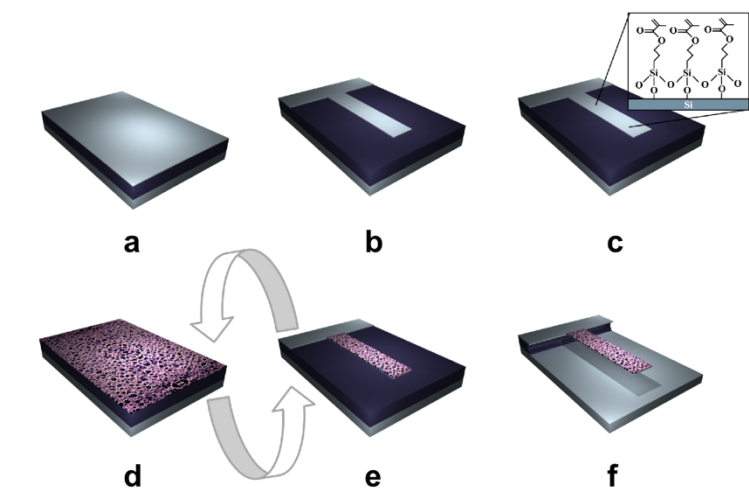
Figure 4.8 (a) Images MEB du réseau de leviers NEMS en silicium à fonctionnaliser. (b) Réseau de nanoleviers biofonctionnalisés et passivés par la technique  $\mu\text{CP}$  double-niveau. L'image est le résultat de la superposition de deux images obtenues en microscopie à fluorescence correspondant respectivement à l'observation des molécules sondes Alexa fluor 660 IgG1 (couleur rouge) et de l'agent passivant BSA conjuguée avec de la fluorescéine (couleur verte). La barre d'échelle correspond à une distance réelle de  $50 \mu\text{m}$ . L'encart montre un agrandissement au niveau d'une zone particulière du réseau ainsi que les profils d'intensité de fluorescence mesurés dans les deux filtres. (c) Fréquences de résonance mesurées pour un nanolevier particulier après dépôt des sondes IgG1, passivation à la BSA et incubation avec les cibles spécifiques IgG2 (bleu clair) et suite à l'élimination du matériel biologique (bleu foncé).

#### 4.3.4 Solution alternative intégrée au procédé : MIP

La dernière stratégie de fonctionnalisation développée également pendant la thèse de Denis Dezest en collaboration avec Karsten Haupt de l'Université de Technologie de Compiègne [266], visait cette fois à proposer une solution robuste et directement intégrable au procédé de fabrication des structures, donc compatible avec les étapes réalisées en salle blanche. La robustesse provient de la nature de la couche bioactive, un polymère à empreinte moléculaire (MIP), donc bien plus stable que les biomolécules, et la compatibilité provient à la fois de la nature de cette couche et de la possibilité de la structurer par photolithographie. Un polymère à empreinte moléculaire, est obtenu par une technique de synthèse qui permet de générer au sein d'un polymère artificiel des cavités, dont la conformation spatiale et chimique est complémentaire d'une molécule imprimée. Ces sites

constituent l'empreinte de la molécule avec laquelle ils sont capables d'interagir selon une spécificité et une affinité comparables à celles de récepteurs biologiques [272]. Nous avons donc utilisé un MIP photopolymérisable pour fonctionnaliser un réseau de nanoleviers avant d'effectuer leur libération par attaque humide de la couche sacrificielle, afin de simplifier l'étape de structuration de la couche sensible en évitant de manipuler des structures mécaniques libérées et de permettre le multiplexage de l'approche par étapes de photolithographie successives. Les travaux rapidement décrits ici ont fait l'objet d'une publication qui vient de paraître dans laquelle les détails relatifs aux matériaux et procédés peuvent être retrouvés [273].

Le succès de l'approche envisagée repose étroitement sur la compatibilité du polymère avec la méthode de libération par gravure humide. Si la grande stabilité physico-chimique des MIPs est l'un des atouts principalement mis en avant dans la littérature pour promouvoir l'utilisation de ces polymères, la résistance des MIPs à une exposition à l'acide fluorhydrique (HF), réactif chimique utilisé pour la libération des structures, n'avait jamais été rapportée.



**Figure 4.9** Principales étapes de l'approche de fonctionnalisation de nanoleviers avec une couche de MIP. (a) Wafer SOI de départ. (b) Définition du profil des leviers par gravure RIE. (c) Dépôt de couche d'accroche du MIP (silanisation). (d) Dépôt de la couche de MIP. (e) Structuration du MIP par photolithographie. (f) Libération des structures par gravure humide de l'oxyde sacrificiel.

Ainsi, après avoir démontré la préservation de la capacité de reconnaissance spécifique d'une couche soumise à un traitement dans un bain HF pendant 30 minutes, nous avons proposé un protocole permettant d'intégrer à la fois un MIP D-L-Phe (dirigé contre l'analyte D-L-Phe) et un polymère contrôle non imprimé (NIP) sur des leviers d'un même réseau, illustré sur la Figure 4.9. Très brièvement, après avoir défini la forme des leviers à partir d'un wafer SOI par gravure ionique réactive, deux étapes séquentielles de photolithographie sont ensuite réalisées afin d'intégrer les couches de MIP D-L-Phe et de NIP à la surface des nanoleviers, sachant que ces étapes pourraient être répétées pour intégrer d'autres types de MIPs. Les leviers sont ensuite libérés par gravure chimique de l'oxyde sacrificiel dans un bain d'HF et un séchage par CO<sub>2</sub> supercritique est réalisé afin d'éviter le collage des poutres au substrat. Avant de procéder à l'extraction du template (molécules



qui réalise l’empreinte au sein du MIP), il est important d’effectuer une silanisation FDS (perfluorododecyltrichlorosilane) en phase vapeur destinée à réduire l’énergie de surface du silicium et ainsi empêcher le collage des nanostructures même en cas de contact avec le substrat.

Des résultats d’intégration de couches de MIP et de NIP à la surface de nanoleviers sont présentés Figure 4.10a. Les images MEB montrent la qualité d’alignement des couches de polymères à l’échelle de plusieurs leviers au sein d’une même puce et attestent de l’intégrité physique des structures mécaniques. Une morphologie poreuse est clairement visible sur les caractérisations AFM (cf. Figure 4.10b) en dépit des petites dimensions des motifs. Des mesures de fréquence de résonance sous vide primaire et à température ambiante ont été réalisées sur différents leviers à l’issue du procédé de fabrication et de l’extraction du template. Ces mesures témoignent de l’intégrité mécanique des structures fonctionnalisées après l’intégration de la couche sensible et les décalages de fréquence de résonance induits, ainsi que la chute du facteur de qualité associée, sont en accord avec la présence d’une couche de polymère. Même s’il reste maintenant à démontrer la sélectivité de reconnaissance biologique MIP/NIP, ces premiers travaux présentent une voie intéressante de fonctionnalisation robuste compatible avec les procédés MEMS.

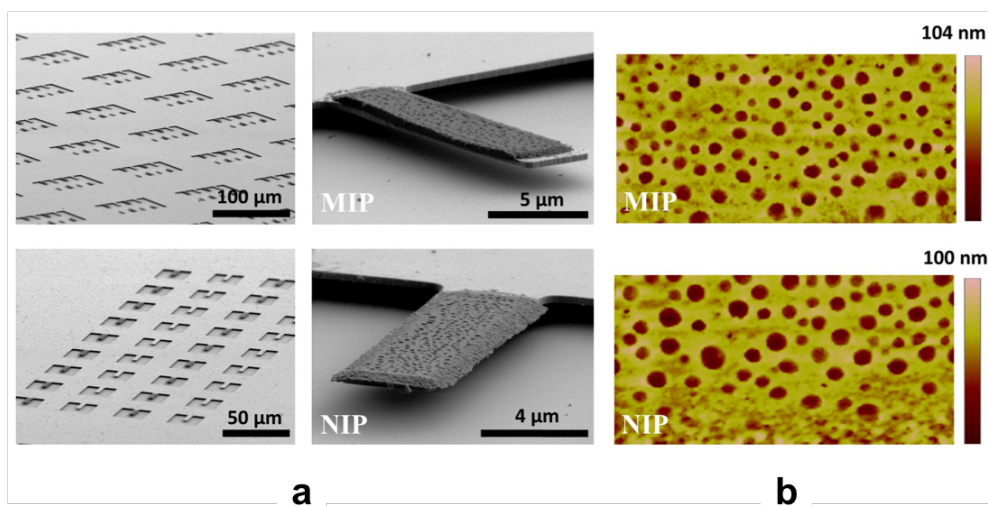


Figure 4.10 (a) Images MEB de couches de MIP et de NIP co-intégrées à la surface de nanoleviers. (b) Images AFM montrant la morphologie poreuse des films de MIP et de NIP structurés.

#### 4.4 Remarques conclusives

Les travaux présentés dans ce chapitre, contrairement à ceux exposés dans les deux chapitres précédents, semblent être en décalage avec le titre choisi pour ce manuscrit : en effet, nous sommes encore loin d’avoir démontré, comme bien d’autres équipes de recherche l’ont déjà fait, le dosage de biomolécules à l’aide de résonateurs MEMS. Cependant, l’approche suivie est délibérément axée sur le développement conjoint des différentes composantes du biocapteur – non seulement le moyen de transduction, mais aussi les techniques de fonctionnalisation (car l’un ne va pas sans l’autre) – voire même de l’instrument de mesure puisque notre équipe travaille en étroite collaboration avec les services techniques du laboratoire sur l’électronique de mesure, développée par Fabrice Mathieu, et

la fluidique associée (travaux non présentés ici). Le but *in fine*, est de fournir à terme un dispositif qui tienne les promesses avancées par les capteurs issus des microtechnologies, non seulement en terme de sensibilité, de spécificité et de portabilité, mais aussi de détection temps réel et multiplexe. Cette dernière caractéristique, est, il me semble, tout aussi importante à atteindre pour répondre aux futurs besoins analytiques liés à l'émergence de la médecine personnalisée.



## 5 Prospective de recherche

Ma prospective de recherche s'articule à court et moyen terme autour de projets qui s'inscrivent dans la continuité des travaux exposés dans les chapitres précédents, mais aussi à plus long terme, autour d'un recours à de nouveaux matériaux et de nouvelles technologies pour développer des dispositifs d'analyse se voulant soit plus performants soit plus intégrables.

Les projets de recherche à court terme liés à mes trois activités courantes concernent tout d'abord l'implémentation de méthodes de transduction intégrées à la plateforme nanofluidique permettant d'effectuer une analyse sans marquage préalable des cibles, ensuite l'utilisation des membranes de silicium à pores latéraux comme brique générique pour la préparation d'échantillon et la biodétection intégrées par approche monolithique sur une même puce, et enfin le développement et l'intégration de nouvelles sources magnétiques pour la transduction électromagnétique de MEMS.

A plus long terme, je souhaite suivre deux pistes de recherche qui concernent bien entendu le développement de techniques d'analyse miniaturisées, fil conducteur de mes recherches, suivant deux objectifs diamétralement opposés : la réalisation d'une plateforme de biodétection ultrasensible à l'aide de la technologie GaN et l'intégration de capteurs souples à l'aide de technologies de fabrication alternatives (additives). Il n'est pas illusoire d'envisager ensuite faire converger ces deux technologies pour la réalisation de biocapteurs implantés à haute performance.

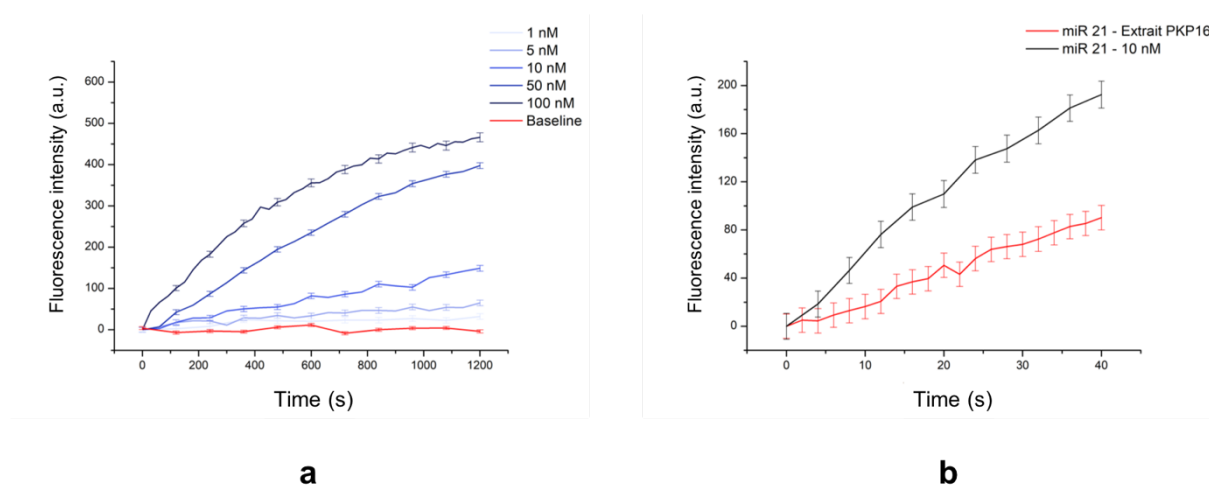
### 5.1 Prospectives de recherche à court et moyen terme

#### 5.1.1 Système nanofluidique : Implémentation de la détection sans marquage

Même si, en l'état, nous pouvons envisager pouvoir répondre à un certain nombre d'applications (comme l'exemple mentionné en section 2.6), il est indéniable que la lecture en fluorescence qui nécessite le marquage des molécules à détecter est un vrai frein à la démocratisation de la plateforme nanofluidique présentée en chapitre 2. Ainsi, nous étudions maintenant plusieurs pistes qui permettraient une détection sans marquage.

La première piste qui a été explorée pendant la thèse de Jean Cacheux a été celle de l'utilisation de balises moléculaire pour la détection de miARNs. Nous utilisons toujours une lecture en fluorescence, cependant, c'est la molécule sonde qui est marquée et qui permet de s'affranchir de l'étape de marquage des cibles. Les balises moléculaires sont des oligonucléotides synthétiques qui forment une structure en tête d'épingle à l'aide de deux extrémités complémentaires qui comportent également un fluorophore et un désactivateur de fluorescence de sorte que, quand la boucle est fermée, la sonde n'émet pas de fluorescence. La séquence présente dans la boucle étant complémentaire de la séquence de la cible à détecter, l'hybridation cible-sonde entraîne l'ouverture de la boucle, l'éloignement du fluorophore du désactivateur et l'émission de lumière sous excitation [274]. L'intérêt supplémentaire d'utiliser ce type de molécule sonde dans notre cas est que la surface d'or peut directement être utilisée pour désactiver le fluorophore [275]. Les résultats préliminaires

obtenus dans le cadre de la thèse ont montré la pertinence de cette approche parfaitement adaptée à la détection de cibles à des concentrations supérieures au nM (Figure 5.1a). De plus, nous avons démontré la compatibilité de ce format de détection avec l'utilisation de milieux complexes (*e.g.* salive diluée à 50%) et il a été possible de détecter la présence de miARNs endogènes (plus spécifiquement, le miR-21 surexprimé dans le cas du cancer du pancréas) dans des échantillons biologiques d'extraits cellulaires (Figure 5.1b), et même plus récemment dans des tumeurs de patients atteints du cancer du pancréas fournis par le CRCT. Cependant, il est difficile d'imaginer gagner plusieurs ordres de grandeurs sur cette limite de détection à cause du compromis à trouver sur l'affinité des séquences aux extrémité de la balise moléculaire qui permettent sa fermeture par rapport à l'affinité des séquences de la boucle et de la cible qui permettent la reconnaissance. En effet, une boucle peu stable engendrera un bruit de fond important, alors qu'une boucle trop stable ne permettra pas une capture efficace des cibles. La deuxième limitation de cette approche est qu'elle semble cantonnée à la détection d'oligonucléotides et ne constitue donc pas une solution générique.



**Figure 5.1** (a) Gamme étalon de détection de miR-21 synthétiques dilués dans du tampon (TE 1X, 500 mM NaCl) à des concentrations comprises entre 1 nM et 100 nM, avec des balises moléculaires immobilisées sur le capteur nanofluidique. (b) Détection de la séquence miR-21 endogène dans un extrait provenant de la lignée PKP16 (et comparaison avec la réponse obtenue pour le miR-21 synthétique dilué dans du tampon à une concentration de 5 nM). Données non publiées.

L'autre piste, plus prometteuse, est bien entendu de s'affranchir de la fluorescence. Cependant, même s'il existe un nombre conséquent de méthodes de transductions sans marquage qui convertissent une reconnaissance biologique en un signal physique mesurable (*e.g.* transduction électrochimique, électrique, mécanique), peu d'entre elles conduisent à un capteur à la fois résolu et matriciel qui permette ainsi de profiter des avantages discutés précédemment et liés à notre plateforme fluidique. La technologies SPR, qui utilise les plasmons de surface (oscillation des électrons libres à la surface d'un métal par couplage avec des photons incidents) pour mesurer des changements d'indice optique au voisinage d'un métal, se décline sous forme d'imagerie SPR [276]. Les systèmes typiques d'imagerie SPR font appel à une instrumentation particulière qui nécessite

l'utilisation d'un prisme pour coupler la source lumineuse quasi monochromatique à la surface métallique. Une configuration plus simple basée une mesure en transmission sur microscope optique a récemment été proposée par Pei-Kuen Wei du Centre de Recherche pour les Sciences Appliquées à l'Academia Sinica [277], [278]. Cette configuration fait appel à des couches métalliques nanostructurées pour permettre un couplage Fano entre la résonance plasmonique de surface et la résonance des cavités créées par les nanostructures. L'équipe de Pei-Kuen Wei a par ailleurs dernièrement proposé une méthode d'analyse de spectre de résonance compatible avec une lecture à l'aide de systèmes nomades (type smartphone), permettant d'envisager le développement d'un biocapteur miniaturisé portatif [279]. Ainsi, dans la continuité de ma collaboration historique avec le Nanobioscience lab de Chia-Fu Chou à l'Academia Sinica et en faisant appel à l'expertise de Pei-Kuen Wei, nous souhaitons maintenant intégrer des nanostructures métalliques au sein des nanofentes afin d'implémenter la détection par effet Fano sur notre plateforme.

### 5.1.2 Membranes de silicium poreux : Une brique technologique générique pour les laboratoires sur puce ?

Au vu des résultats présentés dans le chapitre 3, il est possible d'envisager l'utilisation de membranes de silicium poreux à la fois pour réaliser des étapes pré-analytique (séparation par filtration et pré-concentration), mais aussi pour effectuer la biodétection : d'ailleurs, des travaux ont déjà mis à profit les propriétés filtrantes de biocapteurs en silicium poreux [280], [281]. Ce constat ouvre la voie à une réponse technologique générique et unique en vue du dosage sur puce au plus près de l'échantillon brut : sorte d'approche tout-en-un similaire à la plateforme développée par l'équipe de Fernando Patolsky qui fait appel à une forêt dense de nanofils de silicium en entrée de puce pour la filtration, la séparation moléculaire et la pré-concentration, ainsi que des transistors à nanofils en aval pour la détection de biomarqueurs protéiques directement dans un échantillon sanguin [282].

Ainsi, dans le cadre du projet ANR jeune chercheur LabPsi, débuté en février 2018, je m'attache à démontrer, à partir des travaux déjà réalisés, que les membranes de silicium à pores latéraux intégrées en fluide planaire peuvent remplir cette double tâche sur une même puce : préparation d'échantillon par filtration et enrichissement, puis détection par interférométrie. Cependant, de nombreux verrous doivent être levés afin d'arriver à cet objectif, notamment :

- **La réalisation de membranes poreuses latérales à larges pores (>50 nm)** afin d'autoriser non seulement le greffage moléculaire en surface des membranes destinées à être utilisées pour la biodétection, mais aussi pour permettre de déposer (par ALD, technique de dépôt de couche atomique) ou de faire croître (par oxydation thermique) une couche de passivation sur les membranes destinées à l'étape de concentration d'échantillon afin de permettre l'utilisation de tensions de polarisation plus importantes et donc d'augmenter les facteurs de pré-concentration. De plus, il est absolument nécessaire d'abaisser les résistances fluidiques des membranes filtrantes utilisées en configuration frontale afin que le temps d'analyse d'échantillons de quelques microlitres (volume typique d'une goutte de sang), ne soit pas rédhibitoire pour les applications ciblées.
- **L'intégration de plusieurs membranes aux propriétés variées et contrôlées sur une même puce** afin de répondre au cahier des charges imposé par chaque brique technologique

(filtration, pré-concentration, biodétection), notamment en terme de taille de pores et de porosité. Comme cela a été discuté dans le chapitre 3, ces propriétés peuvent être contrôlées par l'intermédiaire du type et du niveau de dopage du silicium et des conditions d'anodisation. Ainsi, il y a deux manières d'imaginer répondre à ce verrou technologique : soit en réalisant les membranes de manière séquentielle en prenant soin de protéger les membranes après chaque réalisation, ou de manière plus élégante en modifiant localement les niveaux de dopage pour obtenir lors d'une même anodisation des membranes aux caractéristiques différentes.

- **La fonctionnalisation localisée et multiplexée des membranes de détection**, condition *sine qua non* pour réaliser la biodétection sur puce. A cet effet, la technique proposée par l'équipe de Mike Sailor qui permet la modification chimique sélective de l'extérieur et de l'intérieur des pores en utilisant un masquage en voie liquide semble la plus appropriée [283].

Bien que les verrous technologiques à lever pour implémenter l'idée d'utiliser les membranes de silicium poreux pour réaliser à la fois les étapes pré-analytique et analytique soient complexes, cette stratégie apporterait une solution prometteuse pour la réalisation d'outils de diagnostic pour lesquels les procédés de fabrication monolithiques pourraient remplacer les méthodes d'intégration hybrides utilisées actuellement.

### 5.1.3 MEMS électromagnétiques à transduction intégrée

Historiquement, les résonateurs MEMS réalisés au LAAS dans l'équipe de Liviu Nicu pour la biodétection font appel à la transduction piézoélectrique qui permet, à l'aide d'une seule et même couche, de mettre la structure en mouvement par effet piézoélectrique inverse et de mesurer sa fréquence de résonance à l'aide de l'effet direct. L'inconvénient de cette approche est qu'il faut maîtriser les techniques de dépôt et de structuration du matériau en couche mince qui garantissent ses propriétés piézoélectriques. Ainsi, les premières couches piézoélectriques utilisées dans l'équipe étaient de couches de Titano-Zirconate de Plomb (PZT) déposées par pulvérisation cathodique à l'IEMN [284], avant de passer à du PZT sous forme sol-gel [285], directement imprimé sur les structures par l'équipe de Susan Trolier-McKinstry à Pennsylvania State University [286]. Afin de s'affranchir de la dépendance technologique liée à l'intégration du moyen de transduction, les biocapteurs MEMS développés maintenant au sein de l'équipe utilisent l'actionnement électromagnétique couplé à la détection piézorésistive (piézorésistances réalisées par implantation de bore dans du silicium, procédé maîtrisée depuis de nombreuses années au LAAS) [287].

L'actionnement électromagnétique, qui repose sur l'utilisation de la force de Lorentz/Laplace générée par un courant alternatif parcourant une ligne métallique déposée sur la structure immergée dans un champ magnétique, est très facile à mettre en œuvre. Même si la diminution en taille n'est pas favorable à l'actionnement électromagnétique [288], ce moyen de transduction à large bande-passante permet d'envisager la détection de la fréquence de résonance à travers le courant induit [289]. De plus et surtout, cette méthode est tout à fait compatible avec une utilisation en milieu liquide [290], voire même plus adaptée que la transduction électrostatique mentionnée plus haut qui nécessite de protéger les électrodes du liquide environnant, ce qui complexifie le procédé de fabrication et limite les géométries réalisables [291]. Cependant, dans la configuration

actuelle, le champ magnétique est produit par des aimants permanents macroscopiques à base de NdFeB placés au voisinage de la puce, limitant ainsi fortement la miniaturisation et la portabilité du dispositif, deux avantages pourtant régulièrement mis en avant pour le choix de la technologie MEMS. Ainsi, l'élaboration d'aimants sub-millimétriques et leur intégration sur des microsystèmes sont deux verrous technologiques majeurs à relever. En effet, les procédés métallurgiques classiques ne peuvent répondre aux problématiques d'intégration sur des circuits microélectroniques prédéfinis. Depuis de nombreuses années, motivé par l'intérêt applicatif grandissant des MEMS électromagnétiques (*e.g.* pour la récupération d'énergie ou la commutation), des efforts de recherche conséquents sont consacrés au développement de source magnétiques permanentes intégrables [292]. Parmi les procédés compatibles CMOS et MEMS, on retrouve l'électrodéposition [293], la pulvérisation cathodique [294], [295], l'ablation laser pulsé [296], et la sérigraphie de poudres magnétiques mélangées à un polymère [297], mais aucune d'entre elles n'offre à la fois de hautes performances, la possibilité de réaliser des couches de fortes épaisseurs et une bonne capacité d'intégration dans les procédés de fabrication des MEMS.

Lise-Marie Lacroix et Guillaume Viau du LPCNO (Laboratoire de physique et chimie de nano-objets) ont acquis une expertise de synthèse chimique de nanobâtonnets de cobalt qui une fois auto-assemblés permettent de réaliser des aimants millimétriques. Ainsi, nous avons récemment initié une collaboration, se traduisant par la thèse codirigée de Pierre Moritz (débutée en 2016), qui vise à intégrer la réalisation d'aimants nanostructurés à un procédé de fabrication MEMS (Figure 5.2a). Pour cela, nous adressons les problématiques de dépôt localisé, d'alignement sous champ magnétique et de compactage en faisant appel à la magnétophorèse.

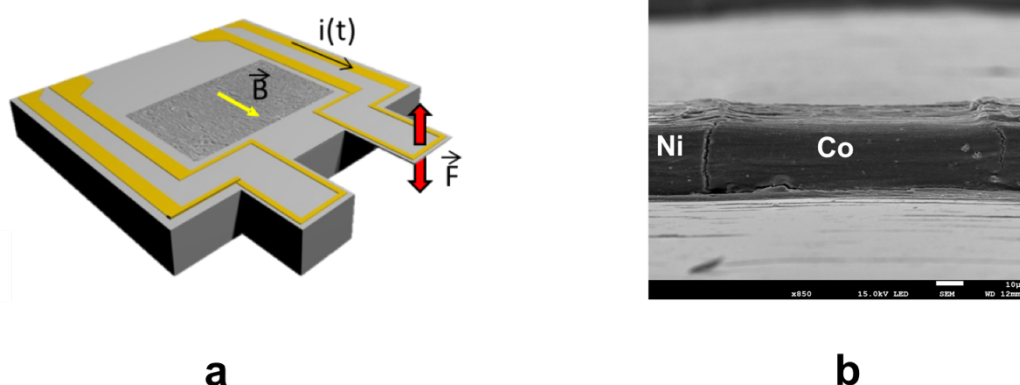


Figure 5.2 (a) Vue schématique d'un MEMS comprenant un aimant permanent à base de nanobâtonnets de cobalt intégré à la base du microsystème. (b) Image MEB d'un aimant de cobalt structuré entre deux plots de nickel.

Les premiers résultats d'aimants réalisés par notre méthode sont montrés en Figure 5.2b. Les nanobâtonnets de cobalt, de structure hexagonale compacte, sont des particules à domaine unique qui présentent une coercivité élevée grâce à la contribution de la magnéto-cristallinité et de l'anisotropie de forme. Les nanobâtonnets sont synthétisés par une réaction de polyols [298], conduisant à des morphologies de particules bien définies (longueur de 150 nm et diamètre inférieur à 20 nm). Afin d'obtenir des assemblages parallèles, une suspension colloïdale de nanobâtonnets est



déposée sur un substrat de silicium qui comporte des plots de matériau paramagnétique (nickel) induisant la magnétophorèse et le solvant est évaporé sous champ magnétique (1 T) généré par un électro-aimant. Les premiers aimants réalisés ont été caractérisés par des mesures magnétométriques et présentent un champ coercitif élevé (jusqu'à 440 kA/m) et un rapport de magnétisation rémanente sur magnétisation de saturation égal à 0,93. De plus ces aimants submillimétriques de 50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur produisent une induction magnétique de presque 10 mT à 200  $\mu\text{m}$  de distance, ce qui permet d'envisager sereinement leur utilisation pour l'actionnement de MEMS (à titre de comparaison un aimant centimétrique de NdFeB produit une induction de l'ordre de 100 mT à la distance de travail de 5 mm utilisée dans le porte échantillon actuel). Ces travaux préliminaires viennent de faire l'objet d'un dépôt de brevet, et nous envisageons maintenant l'utilisation de ces aimants nanostructurés dans des dispositifs MEMS pour la récupération d'énergie [299], [300].

## 5.2 Perspectives de recherche à moyen et long terme

### 5.2.1 Biocapteurs à hautes performances : GaN inside

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, la sensibilité des biocapteurs MEMS résonants augmente en diminuant la masse efficace des systèmes ou en augmentant leur fréquence de résonance et le facteur qualité, d'où l'intérêt de la réduction d'échelle des MEMS vers les NEMS, ce qui pose néanmoins d'autres inconvénients liés à la diminution de la surface de capture, ou de travailler avec des modes de résonance supérieurs qui offrent moins de pertes en milieu liquide.

Pour travailler à plus haute fréquence et afin de proposer des biocapteurs d'une grande robustesse, le nitrure de gallium (GaN) est un matériau idéal en raison de ses propriétés optiques et électriques uniques ainsi que de sa biocompatibilité et sa stabilité en milieu aqueux. Le nitrure de gallium est un semi-conducteur à large bande interdite qui est parvenu à maturité en grande partie grâce aux efforts industriels dans le domaine de l'optoélectronique, offrant de plus des applications prometteuses en électronique de puissance et haute fréquence. Actuellement, il existe plusieurs fonderies de GaN aux États-Unis, dont Qorvo (Richardson, TX) et Wolf Speed (Raleigh, NC). Ces deux fonderies font croître du GaN sur des substrats SiC 200 mm et 150 mm. En France, il existe des groupes de recherche au CRHEA (Centre de recherche sur l'hétéro-épitaxie et ses applications) et à Georgia Tech Lorraine (GT-Lorraine) qui ont développé une expertise dans la croissance du GaN et une société, Exagan, qui est spécialisée dans la croissance de couches de GaN sur wafers de Si. De plus, certains travaux issus de laboratoires de recherche actifs dans le domaine comme le groupe NAM6 à l'IEMN (Institut d'électronique de microélectronique et de nanotechnologie), ont dernièrement démontré l'intérêt du GaN pour la réalisation de dispositifs MEMS [301]. Ainsi, toute une filière de micro-usinage de GaN sur Si et sur SiC a récemment vu le jour [302]–[310], conduisant à la réalisation et à l'utilisation de microleviers de GaN [307], [311], et au développement de résonateurs haute fréquence qui utilisent les propriétés piézoélectriques du GaN [312]–[314]. La grande force des résonateurs MEMS en GaN est qu'ils sont conçus pour fonctionner dans la gamme GHz avec l'électronique haute fréquence GaN directement intégrée. Du point de vue applicatif, on trouve quelques travaux qui font appel au GaN pour la biodétection : la majorité des biocapteurs à base de GaN sont des dispositifs HEMT (transistors à haute mobilité d'électrons) dont la grille est

modifiée avec des éléments de reconnaissance moléculaire [315]–[320], même s'il existe quelques exemples de biocapteurs GaN sous d'autres configurations [321], [322]. Mais à notre connaissance, ces biocapteurs sont purement électroniques et il n'y a pas encore eu de développement de biocapteurs électromécaniques, ce qui est surprenant étant donné les attributs physiques du GaN qui pourraient être exploités pour les biocapteurs MEMS :

- **Effet piézoélectrique** qui permet la production d'ondes acoustiques et la mise en mouvement de structures mécaniques mais aussi la détection indirecte de vibrations (et donc de résonance) par les charges électriques générées.
- **Grande mobilité des électrons** qui permet un fonctionnement à des fréquences allant jusqu'à 330GHz. Cela rend possible la conception de circuits intégrés RF analogiques dans la gamme GHz capables de faire fonctionner des résonateurs mécaniques à haute fréquence pour lesquels les résonances plus élevées entraînent des sensibilités accrues.
- **Haute stabilité** car le GaN est connu pour sa faible sensibilité aux radiations ionisantes, pour sa faible réactivité chimique et pour sa biocompatibilité.

Ainsi, dans les années à venir, je souhaite participer au développement de biocapteurs MEMS GaN haute fréquence à transduction piézoélectrique intégrée qui tirent parti des propriétés du GaN mentionnées ci-dessus. Pour ce faire, je me suis récemment rapproché de l'équipe d'Abdallah Ougazzaden à Georgia Tech Lorraine, spécialiste de la croissance de GaN, avec qui nous souhaitons commencer à collaborer dès cette année. Compte tenu du fait que les HEMT sont déjà utilisés comme biocapteurs et que le GaN est adapté à la réalisation de capteurs à ondes acoustiques de surfaces mais aussi de capteurs photoniques ou interférométriques intégrés (car les sources lumineuses, les guides d'ondes optiques et les détecteurs peuvent tous être créés sur le même substrat), nous pouvons envisager d'intégrer à l'avenir des systèmes multi-transducteurs sur une seule et même puce. Ces plateformes de biocapteurs ultra-sensibles combinant à la fois des moyens de détection mécanique (MEMS/SAW), électrique (HEMT) et éventuellement optique (SPR) permettraient de tirer parti des caractéristiques et particularités de chaque technologie. Cette technologie devrait permettre le développement de biocapteurs ultra-performants *in vitro* mais aussi d'offrir des solutions de biodétection pour des applications en milieu extrême, je pense notamment à la quête de traces biologiques dans le spatial.

### 5.2.2 Biocapteurs intégrés par impression 3D : MEMS inside

La cicatrisation osseuse – lors de la réparation de fractures ou dans le cas d'allongements osseux – est le résultat de processus biologiques complexes qui dépendent de sollicitations mécaniques extérieures. Accélérer cette cicatrisation avec un biomatériau réceptif à la stimulation ultrasonore et en assurant la qualité mécanique et biologique du tissu régénéré est un enjeu clinique majeur. Dans le cadre du projet REPOUSSE (REParation Osseuse stimulée par UltraSons et à partir d'un Substitut Elastique), porté par l'Institut des sciences du mouvement à Marseille, et financé entre 2016 et 2018 par le défi Mécanobio initié par la Mission pour l'Interdisciplinarité du CNRS, l'objectif de l'équipe collaboratrice du LAAS formée par Laurent Malaquin, Liviu Nicu et moi-même était de créer un modèle de matrice osseuse, mimant les caractéristiques mécaniques et structurales de la matrice osseuse à l'aide d'un biomatériau actif. Au-delà de ses propriétés mécaniques bien connues, il se trouve que l'os possède des propriétés piézo-électriques [323], c'est à dire qu'il se polarise suite

à des déformations mécaniques. Ainsi, afin d'étudier l'impact des ultrasons dans l'amélioration de la consolidation osseuse, il est souhaitable de réaliser des matrices osseuses biomimétiques qui affichent un niveau de piézoélectricité similaire à la matrice biologique [324]. A partir de ce constat, et après un stage prometteur réalisé par Frédéric Véron en 2017, nous avons proposé un sujet de thèse, porté par Roberto Riesco, afin d'explorer le potentiel de l'impression 3D pour relever ce défi.

Le domaine de la fabrication additive (impression 3D) connaît depuis quelques années un essor considérable et on arrive aujourd'hui à imprimer des objets en 3D aux formes complexes à partir de divers matériaux (métaux, céramiques, plastiques, hydrogels ...) pour des applications très diverses et innovantes autour, par exemple, de la biomédecine (prothèses, dents), ou de la mécanique (aéronautique notamment) [325]. L'impression 3D a en particulier le potentiel de transformer les méthodes actuelles de fabrication dans le domaine de l'ingénierie des tissus. Des travaux très récents ont commencé à explorer l'intérêt de matrices composites comportant des particules piézoélectriques et/ou d'hydroxyapatite [326], pour stimuler la prolifération cellulaire et la régénération osseuse, dont certains font appel à des techniques d'impression 3D [327], [328]. Les méthodes de mise en formes par stéréolithographie disponibles au LAAS ont déjà permis la fabrication de structure osseuses trabéculaires dans des résines rigides avec une résolution de 5  $\mu\text{m}$ . Elle doit être adaptée à la mise en forme d'hydrogels de rigidité et de porosité contrôlées. Nous souhaitons maintenant pouvoir prendre en compte les propriétés piézoélectriques de la matrice osseuse et étudier son influence sur la reconstruction assistée par stimuli ultrasonore en réalisant des supports polymères composites contenant des particules piézoélectriques, type titanate de barium [329]. Parallèlement, nous souhaitons aussi explorer l'opportunité d'intégrer d'autres types d'objets permettant d'augmenter les fonctionnalités de la matrice, comme des particules de silicium poreux, matériau connu pour promouvoir l'adhésion cellulaire [330], et pouvant aussi être chargées de molécules d'intérêts comme des facteurs de croissance, avec l'avantage d'être biorésorbables donc particulièrement adaptées à l'ingénierie tissulaire [331]. Et au-delà de rendre le modèle plus fidèle au système biologique en terme de propriétés mécano-physico-chimiques, on peut imaginer l'équiper de capteurs, comme cela a été fait avec des capteurs de contraintes macroscopique, pour mesurer l'évolution de la repousse osseuse [332], voire même sonder l'intérieur même des cellules du modèle pour étudier des mécanismes plus fondamentaux [333].

A partir de ce projet et de l'arsenal technologique présents au laboratoire, nous souhaitons ainsi construire une librairie de matériaux et de procédés qui permette de réaliser de nouveaux actionneurs et capteurs MEMS par impression 3D, dont un premier exemple très simple, un outil MEMS de dépôt de gouttes, a été présenté dans le sous-chapitre 4.3.2. Le nombre d'équipes de recherche qui travaillent activement maintenant dans le domaine et les exemples de réalisations par impression 3D ne manquent pas : conception de capteurs et actionneurs à partir de matériaux piézoélectriques [334], avec possibilité de reproduire un certain degré d'anisotropie et d'engendrer une réponse directionnelle [335], de jauges de contraintes intégrées à des puces à tissus [336], réalisation de pièces mobiles pour valves et micromoteurs [337], positionnement précis de cellules dans des architectures 3D [338], impression de composites d'hydrogels chargés en cellules et de polymères biodégradables [339], et même fabrication d'implants fonctionnels tels que les oreilles bioniques [340]. Cependant, le défi majeur qui se posera à cette technologie sera la fabrication multi-matériaux et multi-échelles pour lui conférer un caractère générique.

Une fois ces verrous levés, le champ applicatif d'une telle technologie ne se limitera pas aux implants intelligents, mais pourra fournir des solutions aux capteurs flexibles et portables pour les vêtements ou la peau intelligente [341], plus traditionnellement issus des technologies sur substrats souples dont John Rogers a été un précurseur, ou même aux capteurs *in-vivo* pour le contrôle de la santé. Cependant, le chemin est encore long avant de pouvoir imaginer avoir à disposition de tels dispositifs. La preuve en est du temps qu'a nécessité l'implantation sur patients et la mise sur le marché du tout premiers capteur MEMS biomédical, CardioMEMS, un capteur de surveillance de la pression artérielle pulmonaire, développé par Mark Allen à Georgia Tech au tout début des années 2000, et qui est désormais un traitement recommandé par les directives pour les patients atteints d'insuffisance cardiaque en Europe [342]. Les nouveaux défis posés à ces capteurs implantés traitent de leur durée de vie dans l'hôte et de leurs effets sur les tissus environnants : d'où une nouvelles version biodégradable du capteur de pression dont le choix judicieux des matériaux le constituant permettant de contrôler précisément sa durée de fonctionnement mais aussi durée de vie [343], ou le développement d'électronique résorbables pour les implants cérébraux [344]. D'autres verrous typiquement liés à l'utilisation *in vivo* vont au-delà des aspects de biocompatibilité, comme l'indépendance énergétique des dispositifs et la communication avec le monde extérieur. Si plusieurs voies sont maintenant envisagées pour traiter le premier problème, comme le développement de sources d'énergies sous forme de récupérateurs d'énergie [345], ou de piles biocompatibles et biodégradables [346], ou l'actionnement électromagnétique sans fil à distance [347], [348], le deuxième défi semble plus difficile à relever, malgré les progrès de la technologie RFID [349].

Quoiqu'il en soit, étant donné qu'il est maintenant possible d'intégrer des fonctions de reconnaissance biologique par impression 3D [350], il nous est permis de rêver pouvoir fournir bientôt une nouvelle classe de biocapteurs imprimés pour l'analyse biomoléculaire *in vivo*.

### 5.2.3 Vers une convergence des technologies ?

Les deux pistes décrites ci-dessus conduisent dans un cas à des capteurs haute performance et dans l'autre à des capteurs flexibles à structure 3D adaptés à l'*in-vivo*. Serait-il possible de profiter des avantages de ces deux technologies ? Il se trouve que l'équipe d'Abdallah Ougazzaden à GT-Lorraine vient récemment de mettre au point une filière de fabrication de dispositifs GaN qui peuvent être reportés sur substrat flexible : la croissance du GaN et la réalisation du dispositif s'effectuent sur une fine couche sacrificielle de nitrure de bore (BN) et le dispositif est ensuite libéré par délamination en appliquant des contraintes mécaniques pour provoquer la rupture des liaisons Van der Waals dans la couche de BN [351]. Ce dispositif une fois libéré peut être alors transféré sur un autre substrat : il est ainsi possible d'imaginer l'intégrer directement sur un objet fabriqué par impression 3D pour bénéficier des avantages de la technologie GaN, ouvrant donc la voie à une convergence technologique entre ces deux mondes pour la réalisation de biocapteurs implantés à haute performance.



## 6 Conclusion

Dans ce manuscrit, j'ai présenté les travaux de recherche effectués depuis mon arrivée au CNRS en 2010 et les pistes que je souhaite explorer dans l'avenir. La ligne directrice de mes activités consiste à tirer parti de la miniaturisation des systèmes et du confinement fluide pour développer des dispositifs novateurs pour l'analyse moléculaire.

J'ai tout d'abord profité de la diminution du bruit de fluorescence et du temps de diffusion liée à la réduction d'échelles dans les systèmes fluidiques pour proposer une plateforme d'analyse cinétique d'interactions moléculaires. Si l'avantage de cette technologie réside dans sa simplicité et son efficacité – car elle permet de déterminer rapidement à partir d'un échantillon de très faible volume les constantes cinétiques de couples moléculaires de moyenne et forte affinité – et offre ainsi une alternative bas coût aux technologies plus complexes utilisées actuellement (*e.g.* la SPR), le principe de détection qui exige le marquage préalable des molécules à analyser conduit à de fortes restrictions applicatives.

Une solution est alors de faire appel aux technologies de détection sans marquage, tels que les microsystèmes résonants utilisés comme capteurs gravimétriques. Afin de s'affranchir des fortes pertes énergétiques et de la difficulté d'implémenter la transduction électrostatique en milieu liquide, j'ai développé un procédé de fabrication basé sur la technique de report pour réaliser des plaques résonantes scellées à actionnement électrostatique et détection capacitive intégrés. En parallèle, en vue de convertir ces dispositifs en biocapteurs, j'ai également implémenté plusieurs approches technologiques pour la biofonctionnalisation localisée et multiplexe de microstructures suspendues ou à géométries complexes.

Enfin, dans le souci de proposer des solutions de préparation d'échantillon sur puce à associer aux techniques d'analyse en vue du dosage de biomarqueurs dans des fluides corporels, j'ai développé un système fluide basé sur l'utilisation de silicium poreux : l'originalité de mon approche est de produire des membranes à pores latéraux pour leur intégration dans des systèmes planaires. Ces éléments poreux qui se sont avérés permettre de réaliser les fonctions de filtration et de pré-concentration sur puce, pourraient à terme aussi fournir une solution analytique monolithique complète en implémentant la biodétection par interférométrie.

Dans la continuité de ces travaux et toujours dans le but d'explorer le potentiel des nouvelles technologies pour l'analyse moléculaire, je souhaite maintenant suivre deux voies de recherche apparemment diamétralement opposées : le recours à la filière GaN qui promet, de par les propriétés uniques de ce matériau, de fournir des dispositifs robustes à haute performance, particulièrement prometteurs pour des applications en environnement extrême; et la réalisation de capteurs polymères flexibles par fabrication additive adaptés à la mesure sur systèmes modèles ou au plus près du patient, que ce soit *in-vivo*, directement intégrés sur des implants ou *ex-vivo*, par exemple sur la peau. Le point de convergence de ces deux projets pourrait être trouvé par l'utilisation d'une filière de fabrication de composants GaN compatible avec le report sur substrat souple qui permettrait l'intégration de biocapteurs à haute performance dans des systèmes imprimés en 3D.

Quels que soient les projets de recherche explorés, je souhaite continuer à suivre l'approche pragmatique qui consiste à s'intéresser aussi bien aux moyens de transduction et à leur mise en

œuvre, qu'aux verrous liés à la fonctionnalisation, à l'intégration des dispositifs et à leur opération dans un contexte applicatif donné, en gardant une question en tête : quelle sera le cahier des charges des futurs biocapteurs ? Bien au-delà des exigences minimales de haute sensibilité et spécificité, en plus de répondre aux impératifs de rapidité, de portabilité (pourquoi pas d'implantabilité), et de faible cout, c'est la mesure multi-analytes à grande échelle, tant en terme de fonctionnement des capteurs que de leur fonctionnalisation, qui pourrait poser des défis incroyablement complexes aux biocapteurs de demain.

## 7 Bibliographie

- [1] K. Strimbu and J. A. Tavel, "What are biomarkers?," *Curr. Opin. HIV AIDS*, vol. 5, no. 6, pp. 463–466, Nov. 2010.
- [2] S. Nahavandi *et al.*, "Microfluidic platforms for biomarker analysis," *Lab Chip*, vol. 14, no. 9, pp. 1496–1514, 2014.
- [3] J. M. Heather and B. Chain, "The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA," *Genomics*, vol. 107, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2016.
- [4] R. C. McGlennen, "Miniaturization Technologies for Molecular Diagnostics," *Clin. Chem.*, no. 3, p. 10, 2001.
- [5] S. Y. Lee, D.-Y. Lee, and T. Y. Kim, "Systems biotechnology for strain improvement," *Trends Biotechnol.*, vol. 23, no. 7, pp. 349–358, Jul. 2005.
- [6] L. Hood, R. Balling, and C. Auffray, "Revolutionizing medicine in the 21st century through systems approaches," *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 8, pp. 992–1001, Aug. 2012.
- [7] A. J. de Mello and N. Beard, "Focus. Dealing with 'real' samples: sample pre-treatment in microfluidic systems," *Lab Chip*, vol. 3, no. 1, pp. 11N–20N, 2003.
- [8] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, and R. Zengerle, "Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 3, p. 1153, 2010.
- [9] I. Schimke, "Quality and timeliness in medical laboratory testing," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, no. 5, pp. 1499–1504, Mar. 2009.
- [10] A. St John and C. P. Price, "Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing," *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 35, no. 3, pp. 155–167, Aug. 2014.
- [11] L. Gervais, N. de Rooij, and E. Delamarche, "Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 24, pp. H151–H176, Jun. 2011.
- [12] "Freestyle." [Online]. Available: <https://www.freestylelibre.fr/libre/>.
- [13] L. Benesova *et al.*, "Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients," *Anal. Biochem.*, vol. 433, no. 2, pp. 227–234, Feb. 2013.
- [14] C. Kohler, Z. Barekati, R. Radpour, and X. Y. Zhong, "Cell-free DNA in the Circulation as a Potential Cancer Biomarker," *ANTICANCER Res.*, p. 6, 2011.
- [15] R. Malbec, "Microfluidic system  $\mu$ LAS for the analysis of residual DNA : Application to the diagnostic of Huntington's disease and the analysis of circulating DNA," INSA de Toulouse, 2018.
- [16] J.-Y. Cho and H.-J. Sung, "Proteomic approaches in lung cancer biomarker development," *Expert Rev. Proteomics*, vol. 6, no. 1, pp. 27–42, Feb. 2009.
- [17] K. Shigeyasu, S. Toden, T. J. Zumwalt, Y. Okugawa, and A. Goel, "Emerging Role of MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Gastrointestinal Cancers," *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, no. 10, pp. 2391–2399, May 2017.
- [18] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2016: Cancer Statistics, 2016," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 66, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2016.
- [19] V. Moutardier, M. Giovannini, V. Magnin, F. Viret, B. Lelong, and J.-R. Delpero, "Comment améliorer le traitement des adénocarcinomes de la tête du pancréas résécables?," *Gastroentérologie Clin. Biol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1083–1091, Nov. 2004.
- [20] J. P. Neoptolemos *et al.*, "ESPAC-4: A multicenter, international, open-label randomized controlled phase III trial of adjuvant combination chemotherapy of gemcitabine (GEM) and capecitabine (CAP) versus monotherapy gemcitabine in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, no. 18\_suppl, pp. LBA4006–LBA4006, Jun. 2016.
- [21] C. C. Pritchard, H. H. Cheng, and M. Tewari, "MicroRNA profiling: approaches and considerations," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 5, pp. 358–369, May 2012.



- [22] J. A. Weber *et al.*, "The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids," *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 11, pp. 1733–1741, Nov. 2010.
- [23] M. C. du Rieu *et al.*, "MicroRNA-21 Is Induced Early in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Precursor Lesions," *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 4, pp. 603–612, Apr. 2010.
- [24] L. Buscail *et al.*, "First-in-man Phase 1 Clinical Trial of Gene Therapy for Advanced Pancreatic Cancer: Safety, Biodistribution, and Preliminary Clinical Findings," *Mol. Ther.*, vol. 23, no. 4, pp. 779–789, Apr. 2015.
- [25] M. Humeau *et al.*, "Salivary MicroRNA in Pancreatic Cancer Patients," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 6, p. e0130996, Jun. 2015.
- [26] P. S. Mitchell *et al.*, "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 30, pp. 10513–10518, Jul. 2008.
- [27] K. A. Cissell and S. K. Deo, "Trends in microRNA detection," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 394, no. 4, pp. 1109–1116, Jun. 2009.
- [28] J. Cacheux, "Development of an autonomous system for the detection and quantification of microRNAs with a nanofluidic platform for the management of pancreatic cancer," Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 2018.
- [29] A. P. F. Turner, "Biosensors: sense and sensibility," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 8, p. 3184, 2013.
- [30] J. L. Arlett, E. B. Myers, and M. L. Roukes, "Comparative advantages of mechanical biosensors," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 4, pp. 203–215, Apr. 2011.
- [31] B. D. Pendley and E. Lindner, "Medical Sensors for the Diagnosis and Management of Disease: The Physician Perspective," *ACS Sens.*, vol. 2, no. 11, pp. 1549–1552, Nov. 2017.
- [32] B. N. Johnson and R. Mutharasan, "Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges," *The Analyst*, vol. 139, no. 7, p. 1576, 2014.
- [33] S. Das, H. Vikalo, and A. Hassibi, "On scaling laws of biosensors: A stochastic approach," *J. Appl. Phys.*, vol. 105, no. 10, p. 102021, May 2009.
- [34] M. J. Madou and R. Cubicciotti, "Scaling issues in chemical and biological sensors," *Proc. IEEE*, vol. 91, no. 6, pp. 830–838, Jun. 2003.
- [35] N. L. Anderson and N. G. Anderson, "The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 1, no. 11, pp. 845–867, Nov. 2002.
- [36] R. Mishra and M. Hegner, "Effect of non-specific species competition from total RNA on the static mode hybridization response of nanomechanical assays of oligonucleotides," *Nanotechnology*, vol. 25, no. 22, p. 225501, Jun. 2014.
- [37] S. Nie *et al.*, "An automated integrated platform for rapid and sensitive multiplexed protein profiling using human saliva samples," *Lab. Chip*, vol. 14, no. 6, p. 1087, 2014.
- [38] G. Luka *et al.*, "Microfluidics Integrated Biosensors: A Leading Technology towards Lab-on-a-Chip and Sensing Applications," *Sensors*, vol. 15, no. 12, pp. 30011–30031, Dec. 2015.
- [39] P. Yager *et al.*, "Microfluidic diagnostic technologies for global public health," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 412–418, Jul. 2006.
- [40] C. D. Chin, V. Linder, and S. K. Sia, "Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities," *Lab Chip*, vol. 7, no. 1, pp. 41–57, 2007.
- [41] J. D. Cohen *et al.*, "Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test," *Science*, vol. 359, no. 6378, pp. 926–930, Feb. 2018.
- [42] J. Ko, S. N. Baldassano, P.-L. Loh, K. Kording, B. Litt, and D. Issadore, "Machine learning to detect signatures of disease in liquid biopsies – a user's guide," *Lab. Chip*, vol. 18, no. 3, pp. 395–405, 2018.
- [43] X. Li, M. Mauro, and Z. Williams, "Comparison of plasma extracellular RNA isolation kits reveals kit-dependent biases," *BioTechniques*, vol. 59, no. 1, Jul. 2015.
- [44] W. S. Mielczarek, E. A. Obaje, T. T. Bachmann, and M. Kersaudy-Kerhoas, "Microfluidic blood plasma separation for medical diagnostics: is it worth it?," *Lab. Chip*, vol. 16, no. 18, pp. 3441–3448, 2016.

- [45] J. Kim, M. Johnson, P. Hill, and B. K. Gale, "Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification," *Integr. Biol.*, vol. 1, no. 10, p. 574, 2009.
- [46] R. Mariella, "Sample preparation: the weak link in microfluidics-based biodetection," *Biomed. Microdevices*, vol. 10, no. 6, pp. 777–784, Dec. 2008.
- [47] X. Duan, Y. Li, N. K. Rajan, D. A. Routenberg, Y. Modis, and M. A. Reed, "Quantification of the affinities and kinetics of protein interactions using silicon nanowire biosensors," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 6, pp. 401–407, Jun. 2012.
- [48] C. Ayela and L. Nicu, "Micromachined piezoelectric membranes with high nominal quality factors in newtonian liquid media: A Lamb's model validation at the microscale," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 123, no. 2, pp. 860–868, May 2007.
- [49] B. N. Johnson and R. Mutharasan, "Sample Preparation-Free, Real-Time Detection of microRNA in Human Serum Using Piezoelectric Cantilever Biosensors at Attomole Level," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 23, pp. 10426–10436, Dec. 2012.
- [50] I. A. Zaporozhchenko *et al.*, "A phenol-free method for isolation of microRNA from biological fluids," *Anal. Biochem.*, vol. 479, pp. 43–47, Jun. 2015.
- [51] L. Moldovan, K. E. Batte, J. Trgovcich, J. Wisler, C. B. Marsh, and M. Piper, "Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 18, no. 3, pp. 371–390, Mar. 2014.
- [52] L. Nicu and T. Leïchlé, "Biosensors and tools for surface functionalization from the macro- to the nanoscale: The way forward," *J. Appl. Phys.*, vol. 104, no. 11, p. 111101, Dec. 2008.
- [53] E. K. Sackmann, A. L. Fulton, and D. J. Beebe, "The present and future role of microfluidics in biomedical research," *Nature*, vol. 507, no. 7491, pp. 181–189, Mar. 2014.
- [54] O. S. Wolfbeis, "Editorial: Probes, Sensors, and Labels: Why is Real Progress Slow?," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, no. 38, pp. 9864–9865, Sep. 2013.
- [55] I. Sarangadharan *et al.*, "High sensitivity cardiac troponin I detection in physiological environment using AlGaIn/GaN High Electron Mobility Transistor (HEMT) Biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 100, pp. 282–289, Feb. 2018.
- [56] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, Jul. 2006.
- [57] S. C. Terry, J. H. Jerman, and J. B. Angell, "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer," *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, Dec. 1979.
- [58] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, and A. Manz, "Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 12, pp. 2623–2636, Jun. 2002.
- [59] C.-W. Wei, "Using a microfluidic device for 1 I DNA microarray hybridization in 500 s," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 8, pp. e78–e78, Apr. 2005.
- [60] C. Rivet, H. Lee, A. Hirsch, S. Hamilton, and H. Lu, "Microfluidics for medical diagnostics and biosensors," *Microfluid. Eng.*, vol. 66, no. 7, pp. 1490–1507, Apr. 2011.
- [61] S. Haeberle and R. Zengerle, "Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications," *Lab. Chip*, vol. 7, no. 9, p. 1094, 2007.
- [62] G. M. Whitesides, "What Comes Next?," *Lab Chip*, vol. 11, no. 2, pp. 191–193, 2011.
- [63] J. Edel, A. deMello, and P. O'Brien, *Nanofluidics*. The Royal Society of Chemistry, 2009.
- [64] T. Tsukahara, K. Mawatari, and T. Kitamori, "Integrated extended-nano chemical systems on a chip," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 3, p. 1000, 2010.
- [65] C.-F. Chou *et al.*, "Sorting biomolecules with microdevices," *ELECTROPHORESIS*, vol. 21, no. 1, pp. 81–90, Dec. 1999.
- [66] J. Fu, R. B. Schoch, A. L. Stevens, S. R. Tannenbaum, and J. Han, "A patterned anisotropic nanofluidic sieving structure for continuous-flow separation of DNA and proteins," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 2, pp. 121–128, Feb. 2007.
- [67] Y.-C. Wang, A. L. Stevens, and J. Han, "Million-fold Preconcentration of Proteins and Peptides by Nanofluidic Filter," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 14, pp. 4293–4299, Jul. 2005.

- [68] S. J. Kim, Y.-A. Song, and J. Han, "Nanofluidic concentration devices for biomolecules utilizing ion concentration polarization: theory, fabrication, and applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 3, p. 912, 2010.
- [69] J. O. Tegenfeldt *et al.*, "Micro- and nanofluidics for DNA analysis," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 378, no. 7, pp. 1678–1692, Apr. 2004.
- [70] J.-W. Yeh, A. Taloni, Y.-L. Chen, and C.-F. Chou, "Entropy-Driven Single Molecule Tug-of-War of DNA at Micro–Nanofluidic Interfaces," *Nano Lett.*, vol. 12, no. 3, pp. 1597–1602, Mar. 2012.
- [71] M. Foquet, J. Korfach, W. R. Zipfel, W. W. Webb, and H. G. Craighead, "Focal Volume Confinement by Submicrometer-Sized Fluidic Channels," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 6, pp. 1618–1626, Mar. 2004.
- [72] M. J. Shon and A. E. Cohen, "Mass Action at the Single-Molecule Level," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 35, pp. 14618–14623, Sep. 2012.
- [73] L. Rubinovich and M. Polak, "The Intrinsic Role of Nanoconfinement in Chemical Equilibrium: Evidence from DNA Hybridization," *Nano Lett.*, vol. 13, no. 5, pp. 2247–2251, May 2013.
- [74] C. J. Galvin, K. Shirai, A. Rahmani, K. Masaya, and A. Q. Shen, "Total Capture, Convection-Limited Nanofluidic Immunoassays Exhibiting Nanoconfinement Effects," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 5, pp. 3211–3219, Mar. 2018.
- [75] R. Riehn, M. Lu, Y.-M. Wang, S. F. Lim, E. C. Cox, and R. H. Austin, "Restriction mapping in nanofluidic devices," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 29, pp. 10012–10016, Jul. 2005.
- [76] Y. M. Wang *et al.*, "Single-molecule studies of repressor-DNA interactions show long-range interactions," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 28, pp. 9796–9801, Jul. 2005.
- [77] W. Reisner *et al.*, "Single-molecule denaturation mapping of DNA in nanofluidic channels," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 30, pp. 13294–13299, Jul. 2010.
- [78] E. T. Lam *et al.*, "Genome mapping on nanochannel arrays for structural variation analysis and sequence assembly," *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, no. 8, pp. 771–776, Aug. 2012.
- [79] T. Osaki, H. Suzuki, B. Le Pioufle, and S. Takeuchi, "Multichannel Simultaneous Measurements of Single-Molecule Translocation in  $\alpha$ -Hemolysin Nanopore Array," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 24, pp. 9866–9870, Dec. 2009.
- [80] A. Han *et al.*, "Label-free detection of single protein molecules and protein–protein interactions using synthetic nanopores," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 12, pp. 4651–4658, 2008.
- [81] M. van den Hout, G. M. Skinner, S. Klijnhout, V. Krudde, and N. H. Dekker, "The Passage of Homopolymeric RNA through Small Solid-State Nanopores," *Small*, vol. 7, no. 15, pp. 2217–2224, Aug. 2011.
- [82] A. P. Ivanov *et al.*, "DNA tunneling detector embedded in a nanopore," *Nano Lett.*, vol. 11, no. 1, pp. 279–285, 2010.
- [83] S. M. Iqbal, D. Akin, and R. Bashir, "Solid-state nanopore channels with DNA selectivity," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 4, pp. 243–248, Apr. 2007.
- [84] R. Wei, V. Gatterdam, R. Wieneke, R. Tampé, and U. Rant, "Stochastic sensing of proteins with receptor-modified solid-state nanopores," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 4, pp. 257–263, Apr. 2012.
- [85] S. Y. Yang *et al.*, "DNA-Functionalized Nanochannels for SNP Detection," *Nano Lett.*, vol. 11, no. 3, pp. 1032–1035, Mar. 2011.
- [86] K. Shirai, K. Mawatari, and T. Kitamori, "Extended Nanofluidic Immunochemical Reaction with Femtoliter Sample Volumes," *Small*, vol. 10, no. 8, pp. 1514–1522, Apr. 2014.
- [87] R. Karnik, K. Castelino, R. Fan, P. Yang, and A. Majumdar, "Effects of Biological Reactions and Modifications on Conductance of Nanofluidic Channels," *Nano Lett.*, vol. 5, no. 9, pp. 1638–1642, Sep. 2005.
- [88] R. B. Schoch, L. F. Cheow, and J. Han, "Electrical Detection of Fast Reaction Kinetics in Nanochannels with an Induced Flow," *Nano Lett.*, vol. 7, no. 12, pp. 3895–3900, Dec. 2007.
- [89] N. F. Y. Durand and P. Renaud, "Label-free determination of protein–surface interaction kinetics by ionic conductance inside a nanochannel," *Lab Chip*, vol. 9, no. 2, pp. 319–324, 2009.

- [90] "Bionano Genomics | Genome Mapping Reveals True Genome Structure." [Online]. Available: <https://bionanogenomics.com/>. [Accessed: 08-Aug-2018].
- [91] "Oxford Nanopore Technologies." [Online]. Available: <https://nanoporetech.com/>. [Accessed: 08-Aug-2018].
- [92] "Abionic plateforme de dépistage biomédical - Abionic." [Online]. Available: <https://abionic.com/>. [Accessed: 08-Aug-2018].
- [93] R. B. Schoch, J. Han, and P. Renaud, "Transport phenomena in nanofluidics," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 80, no. 3, pp. 839–883, Jul. 2008.
- [94] Q. Xia, K. J. Morton, R. H. Austin, and S. Y. Chou, "Sub-10 nm Self-Enclosed Self-Limited Nanofluidic Channel Arrays," *Nano Lett.*, vol. 8, no. 11, pp. 3830–3833, Nov. 2008.
- [95] Y. H. Cho, S. W. Lee, B. J. Kim, and T. Fujii, "Fabrication of silicon dioxide submicron channels without nanolithography for single biomolecule detection," *Nanotechnology*, vol. 18, no. 46, p. 465303, Nov. 2007.
- [96] C. Lee, E.-H. (E. H.) Yang, N. V. Myung, and T. George, "A Nanochannel Fabrication Technique without Nanolithography," *Nano Lett.*, vol. 3, no. 10, pp. 1339–1340, Oct. 2003.
- [97] H. Cao *et al.*, "Fabrication of 10 nm enclosed nanofluidic channels," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 81, no. 1, pp. 174–176, Jul. 2002.
- [98] B. Yang and S. W. Pang, "Multiple level nanochannels fabricated using reversal UV nanoimprint," *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanometer Struct.*, vol. 24, no. 6, p. 2984, 2006.
- [99] J. J. Dumond, H. Y. Low, and I. Rodriguez, "Isolated, sealed nanofluidic channels formed by combinatorial-mould nanoimprint lithography," *Nanotechnology*, vol. 17, no. 8, pp. 1975–1980, Apr. 2006.
- [100] L. J. Guo, X. Cheng, and C.-F. Chou, "Fabrication of Size-Controllable Nanofluidic Channels by Nanoimprinting and Its Application for DNA Stretching," *Nano Lett.*, vol. 4, no. 1, pp. 69–73, Jan. 2004.
- [101] M. Y. Balakirev *et al.*, "Photochemical Patterning of Biological Molecules Inside a Glass Capillary," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 17, pp. 5474–5479, Sep. 2005.
- [102] B. He, T. J. Morrow, and C. D. Keating, "Nanowire sensors for multiplexed detection of biomolecules," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 12, no. 5, pp. 522–528, Oct. 2008.
- [103] J. R. Lepock, "Protein denaturation in intact hepatocytes and isolated cellular organelles during heat shock," *J. Cell Biol.*, vol. 122, no. 6, pp. 1267–1276, Sep. 1993.
- [104] T. Ito, K. Sobue, and S. Ohya, "Water glass bonding for micro-total analysis system," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 81, no. 2–3, pp. 187–195, Jan. 2002.
- [105] L. Chen *et al.*, "Bonding of glass-based microfluidic chips at low- or room-temperature in routine laboratory," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 119, no. 1, pp. 335–344, Nov. 2006.
- [106] J. Gu, R. Gupta, C.-F. Chou, Q. Wei, and F. Zenhausern, "A simple polysilsesquioxane sealing of nanofluidic channels below 10 nm at room temperature," *Lab. Chip*, vol. 7, no. 9, p. 1198, 2007.
- [107] T. Leichlé, Y.-L. Lin, P.-C. Chiang, S.-M. Hu, K.-T. Liao, and C.-F. Chou, "Biosensor-compatible encapsulation for pre-functionalized nanofluidic channels using asymmetric plasma treatment," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 161, no. 1, pp. 805–810, Jan. 2012.
- [108] T. Leichlé and C.-F. Chou, "Biofunctionalized nanoslits for wash-free and spatially resolved real-time sensing with full target capture," *Biomicrofluidics*, vol. 9, no. 3, p. 034103, May 2015.
- [109] P. Teerapanich, "Fluorescence-based nanofluidic biosensor platform for real-time measurement of protein binding kinetics," PhD Thesis, 2015.
- [110] T. M. Squires, R. J. Messinger, and S. R. Manalis, "Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 4, pp. 417–426, Apr. 2008.
- [111] T. Gervais and K. F. Jensen, "Mass transport and surface reactions in microfluidic systems," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 61, no. 4, pp. 1102–1121, Feb. 2006.
- [112] M. Zimmermann, E. Delamarche, M. Wolf, and P. Hunziker, "Modeling and Optimization of High-Sensitivity, Low-Volume Microfluidic-Based Surface Immunoassays," *Biomed. Microdevices*, vol. 7, no. 2, pp. 99–110, Jun. 2005.

- [113] G. P. Acuna *et al.*, "Distance Dependence of Single-Fluorophore Quenching by Gold Nanoparticles Studied on DNA Origami," *ACS Nano*, vol. 6, no. 4, pp. 3189–3195, Apr. 2012.
- [114] P. Teerapanich, M. Pugnère, C. Henriquet, Y.-L. Lin, C.-F. Chou, and T. Leïchlé, "Nanofluidic Fluorescence Microscopy (NFM) for real-time monitoring of protein binding kinetics and affinity studies," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 88, pp. 25–33, Feb. 2017.
- [115] U. Piran and W. J. Riordan, "Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex," *J. Immunol. Methods*, vol. 133, no. 1, pp. 141–143, Oct. 1990.
- [116] W. K. T. Coltro, R. de S. Neves, A. de J. Motheo, J. A. F. da Silva, and E. Carrilho, "Microfluidic devices with integrated dual-capacitively coupled contactless conductivity detection to monitor binding events in real time," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 192, pp. 239–246, Mar. 2014.
- [117] R. D'Agata, G. Grasso, and G. Spoto, "Real-Time Binding Kinetics Monitored with Surface Plasmon Resonance Imaging in a Diffusion-Free Environment," *Open Spectrosc. J.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–9, May 2008.
- [118] M. Srisa-Art, E. C. Dyson, A. J. deMello, and J. B. Edel, "Monitoring of Real-Time Streptavidin–Biotin Binding Kinetics Using Droplet Microfluidics," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 18, pp. 7063–7067, Sep. 2008.
- [119] K. Hosokawa, M. Omata, K. Sato, and M. Maeda, "Power-free sequential injection for microchip immunoassay toward point-of-care testing," *Lab Chip*, vol. 6, no. 2, pp. 236–241, 2006.
- [120] K.-H. Lee, Y.-D. Su, S.-J. Chen, F.-G. Tseng, and G.-B. Lee, "Microfluidic systems integrated with two-dimensional surface plasmon resonance phase imaging systems for microarray immunoassay," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 4, pp. 466–472, Nov. 2007.
- [121] A. T. Pereira, P. Novo, D. M. F. Prazeres, V. Chu, and J. P. Conde, "Heterogeneous immunoassays in microfluidic format using fluorescence detection with integrated amorphous silicon photodiodes," *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 1, p. 014102, Mar. 2011.
- [122] R. L. Rich, J. G. Quinn, T. Morton, J. D. Stepp, and D. G. Myszka, "Biosensor-based fragment screening using FastStep injections," *Anal. Biochem.*, vol. 407, no. 2, pp. 270–277, Dec. 2010.
- [123] J. G. Quinn, "Modeling Taylor dispersion injections: Determination of kinetic/affinity interaction constants and diffusion coefficients in label-free biosensing," *Anal. Biochem.*, vol. 421, no. 2, pp. 391–400, Feb. 2012.
- [124] O. Nahshol, V. Bronner, A. Notcovich, L. Rubrecht, D. Laune, and T. Bravman, "Parallel kinetic analysis and affinity determination of hundreds of monoclonal antibodies using the ProteOn XPR36," *Anal. Biochem.*, vol. 383, no. 1, pp. 52–60, Dec. 2008.
- [125] P. Teerapanich *et al.*, "Nanofluidic fluorescence microscopy with integrated concentration gradient generation for one-shot parallel kinetic assays," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 274, pp. 338–342, Nov. 2018.
- [126] S. Kim, H. J. Kim, and N. L. Jeon, "Biological applications of microfluidic gradient devices," *Integr. Biol.*, vol. 2, no. 11–12, p. 584, 2010.
- [127] M. Humeau, J. Torrisani, and P. Cordelier, "miRNA in clinical practice: Pancreatic cancer," *Clin. Biochem.*, vol. 46, no. 10–11, pp. 933–936, Jul. 2013.
- [128] J. Cacheux, M. Brut, A. Bancaud, P. Cordelier, and T. Leïchlé, "Spatial Analysis of Nanofluidic-Embedded Biosensors for Wash-Free Single-Nucleotide Difference Discrimination," *ACS Sens.*, vol. 3, no. 3, pp. 606–611, Mar. 2018.
- [129] H. R. Yoon, J. M. Lee, J. Jung, C.-S. Lee, B. H. Chung, and Y. Jung, "Highly improved specificity for hybridization-based microRNA detection by controlled surface dissociation," *The Analyst*, vol. 139, no. 1, pp. 259–265, 2014.
- [130] C.-F. Chou, T. LEICHLÉ, Y.-L. LIN, and P. TEERAPANICH, "Sensing device, and sensing system and sensing method using the same," US9958396B2, 01-May-2018.
- [131] C.-F. Chou, T. Leichle, Y.-L. Lin, and P. Teerapanich, "Sensing device, and sensing system and sensing method using the same," EP2950096A3, 16-Dec-2015.
- [132] 周家复, 席瑞, 林以立, and 派特马·蒂拉佩尼屈, "感测装置及应用其的感测系统及感测方法," CN105181658A, 23-Dec-2015.

- [133] S. Núñez, J. Venhorst, and C. G. Kruse, "Target–drug interactions: first principles and their application to drug discovery," *Drug Discov. Today*, vol. 17, no. 1–2, pp. 10–22, Jan. 2012.
- [134] Y.-L. Lin, Y.-J. Huang, P. Teerapanich, T. Leichlé, and C.-F. Chou, "Multiplexed immunosensing and kinetics monitoring in nanofluidic devices with highly enhanced target capture efficiency," *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 3, p. 034114, May 2016.
- [135] A. Agarwal, G. Snyder, and D. Ressler, "The current and future state of companion diagnostics," *Pharmacogenomics Pers. Med.*, p. 99, Mar. 2015.
- [136] J. Lichtenberg, "Sample pretreatment on microfabricated devices," *Talanta*, vol. 56, no. 2, pp. 233–266, Feb. 2002.
- [137] R. H. Liu, J. Yang, R. Lenigk, J. Bonanno, and P. Grodzinski, "Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 7, pp. 1824–1831, Apr. 2004.
- [138] E. Zonta *et al.*, "Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations," *PLOS ONE*, vol. 11, no. 7, p. e0159094, Jul. 2016.
- [139] J. Yang *et al.*, "A microfluidic device for rapid quantification of cell-free DNA in patients with severe sepsis," *Lab. Chip*, vol. 15, no. 19, pp. 3925–3933, 2015.
- [140] B. C. Giordano, D. S. Burgi, S. J. Hart, and A. Terray, "On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 718, pp. 11–24, Mar. 2012.
- [141] B. J. Sanghavi *et al.*, "Ultrafast immunoassays by coupling dielectrophoretic biomarker enrichment in nanoslit channel with electrochemical detection on graphene," *Lab. Chip*, vol. 15, no. 24, pp. 4563–4570, 2015.
- [142] E. Bisceglia *et al.*, "A generic and label free method based on dielectrophoresis for the continuous separation of microorganism from whole blood samples," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 212, pp. 335–343, Jun. 2015.
- [143] Y.-C. Wang and J. Han, "Pre-binding dynamic range and sensitivity enhancement for immunosensors using nanofluidic preconcentrator," *Lab. Chip*, vol. 8, no. 3, p. 392, 2008.
- [144] R. Kwak, S. J. Kim, and J. Han, "Continuous-Flow Biomolecule and Cell Concentrator by Ion Concentration Polarization," *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 19, pp. 7348–7355, Oct. 2011.
- [145] A. Persat, L. A. Marshall, and J. G. Santiago, "Purification of Nucleic Acids from Whole Blood Using Isotachopheresis," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 22, pp. 9507–9511, Nov. 2009.
- [146] J. Pipper, Y. Zhang, P. Neuzil, and T.-M. Hsieh, "Clockwork PCR Including Sample Preparation," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47, no. 21, pp. 3900–3904, May 2008.
- [147] J. Ducreé, S. Haeberle, S. Lutz, S. Pausch, F. von Stetten, and R. Zengerle, "The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 17, no. 7, pp. S103–S115, Jul. 2007.
- [148] C.-C. Chen, P.-H. Lin, and C.-K. Chung, "Microfluidic chip for plasma separation from undiluted human whole blood samples using low voltage contactless dielectrophoresis and capillary force," *Lab. Chip*, vol. 14, no. 12, p. 1996, 2014.
- [149] C. Szydzik, K. Khoshmanesh, A. Mitchell, and C. Karnutsch, "Microfluidic platform for separation and extraction of plasma from whole blood using dielectrophoresis," *Biomicrofluidics*, vol. 9, no. 6, p. 064120, Nov. 2015.
- [150] L. Van Heirstraeten *et al.*, "Integrated DNA and RNA extraction and purification on an automated microfluidic cassette from bacterial and viral pathogens causing community-acquired lower respiratory tract infections," *Lab Chip*, vol. 14, no. 9, pp. 1519–1526, 2014.
- [151] J.-E. Kim, J.-H. Cho, and S.-H. Paek, "Functional Membrane-Implanted Lab-on-a-Chip for Analysis of Percent HDL Cholesterol," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 24, pp. 7901–7907, Dec. 2005.
- [152] C. C. Striemer, T. R. Gaborski, J. L. McGrath, and P. M. Fauchet, "Charge- and size-based separation of macromolecules using ultrathin silicon membranes," *Nature*, vol. 445, no. 7129, pp. 749–753, Feb. 2007.
- [153] H. Wei *et al.*, "Particle sorting using a porous membrane in a microfluidic device," *Lab Chip*, vol. 11, no. 2, pp. 238–245, 2011.

- [154] R. S. Foote, J. Khandurina, S. C. Jacobson, and J. M. Ramsey, "Preconcentration of Proteins on Microfluidic Devices Using Porous Silica Membranes," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 1, pp. 57–63, Jan. 2005.
- [155] R. T. Kelly, Y. Li, and A. T. Woolley, "Phase-Changing Sacrificial Materials for Interfacing Microfluidics with Ion-Permeable Membranes To Create On-Chip Preconcentrators and Electric Field Gradient Focusing Microchips," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 8, pp. 2565–2570, Apr. 2006.
- [156] J. H. Lee, Y.-A. Song, and J. Han, "Multiplexed proteomic sample preconcentration device using surface-patterned ion-selective membrane," *Lab. Chip*, vol. 8, no. 4, p. 596, 2008.
- [157] J. de Jong, R. G. H. Lammertink, and M. Wessling, "Membranes and microfluidics: a review," *Lab. Chip*, vol. 6, no. 9, p. 1125, 2006.
- [158] B. Chueh, D. Huh, C. R. Kyrtsos, T. Houssin, N. Futai, and S. Takayama, "Leakage-Free Bonding of Porous Membranes into Layered Microfluidic Array Systems," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 9, pp. 3504–3508, May 2007.
- [159] J. Ou *et al.*, "Integration of Dialysis Membranes into a Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Chip for Isoelectric Focusing of Proteins Using Whole-Channel Imaging Detection," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 19, pp. 7401–7407, Oct. 2008.
- [160] J. Moorthy and D. J. Beebe, "In situ fabricated porous filters for microsystems," *Lab. Chip*, vol. 3, no. 2, p. 62, 2003.
- [161] S. Song, A. K. Singh, and B. J. Kirby, "Electrophoretic Concentration of Proteins at Laser-Patterned Nanoporous Membranes in Microchips," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 15, pp. 4589–4592, Aug. 2004.
- [162] R. W. Tjerkstra, J. G. E. Gardeniers, and J. J. Kelly, "Multi-Walled Microchannels: Free-Standing Porous Silicon Membranes for Use in  $\mu$ TAS," *J. MICROELECTROMECHANICAL Syst.*, vol. 9, no. 4, p. 7, 2000.
- [163] L. J. Heyderman *et al.*, "High volume fabrication of customised nanopore membrane chips," *Microelectron. Eng.*, vol. 67–68, pp. 208–213, Jun. 2003.
- [164] E. Leclerc, Y. Sakai, and T. Fujii, "Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane)," p. 6.
- [165] J. Leng, B. Lonetti, P. Tabeling, M. Joanicot, and A. Ajdari, "Microevaporators for Kinetic Exploration of Phase Diagrams," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 96, no. 8, Mar. 2006.
- [166] L. Canham, "Porous Silicon Application Survey," in *Handbook of Porous Silicon*, L. Canham, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–10.
- [167] T. Leichlé, "Porous Silicon and Microfluidics," in *Handbook of Porous Silicon*, L. Canham, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 1–12.
- [168] P. Steiner and W. Lang, "Micromachining applications of porous silicon," *Thin Solid Films*, vol. 255, no. 1–2, pp. 52–58, Jan. 1995.
- [169] S. Yao, A. M. Myers, J. D. Posner, K. A. Rose, and J. G. Santiago, "Electroosmotic Pumps Fabricated From Porous Silicon Membranes," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 15, no. 3, pp. 717–728, Jun. 2006.
- [170] J. Z. Wallner, N. Nagar, C. R. Friedrich, and P. L. Bergstrom, "Macro porous silicon as pump media for electro-osmotic pumps," *Phys. Status Solidi A*, vol. 204, no. 5, pp. 1327–1331, May 2007.
- [171] J. L. Snyder *et al.*, "High-performance, low-voltage electroosmotic pumps with molecularly thin silicon nanomembranes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 46, pp. 18425–18430, Nov. 2013.
- [172] T. Laurell, G. Marko-Varga, S. Ekström, M. Bengtsson, and J. Nilsson, "Microfluidic components for protein characterization," *Rev. Mol. Biotechnol.*, vol. 82, no. 2, pp. 161–175, Dec. 2001.
- [173] K. P. Nichols, S. Azoz, and H. J. G. E. Gardeniers, "Enzyme Kinetics by Directly Imaging a Porous Silicon Microfluidic Reactor Using Desorption/Ionization on Silicon Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 21, pp. 8314–8319, Nov. 2008.
- [174] A. Splinter, J. Stürmann, O. Bartels, and W. Benecke, "Micro membrane reactor: a flow-through membrane for gas pre-combustion," p. 6, 2002.

- [175] E. H. M. Camara, C. Pijolat, J. Courbat, P. Breuil, D. Briand, and N. F. de Rooij, "Microfluidic Channels in Porous Silicon Filled with a Carbon Absorbent for GAS Preconcentration," in *TRANSDUCERS 2007 - 2007 International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference*, Lyon, France, 2007, pp. 249–252.
- [176] M. Miu *et al.*, "Development of a new microfluidic analysis system based on porous silicon as sensitive element," *Phys. Status Solidi C*, vol. 4, no. 6, pp. 2093–2097, May 2007.
- [177] Y. Fintschenko and A. van den Berg, "Silicon microtechnology and microstructures in separation science," *J. Chromatogr. A*, vol. 819, no. 1–2, pp. 3–12, Sep. 1998.
- [178] D. Clicq, R. W. Tjerkstra, J. G. E. Gardeniers, A. van den Berg, G. V. Baron, and G. Desmet, "Porous silicon as a stationary phase for shear-driven chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1032, no. 1–2, pp. 185–191, Apr. 2004.
- [179] V. Lehmann, "Porous silicon matrix for chemical synthesis and chromatography," *Phys. Status Solidi A*, vol. 202, no. 8, pp. 1365–1368, Jun. 2005.
- [180] X. Chen, D.-F. Cui, and C.-C. Liu, "Porous Matrix based Microfluidic Chip for DNA Extraction," in *2006 1st IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, Zhuhai, 2006, pp. 739–742.
- [181] E. Méry, C. Malhaire, B. Remaki, and D. Barbier, "Electrical study of microfluidic channels isolated with chemically modified porous silicon," *Phys. Status Solidi C*, vol. 4, no. 6, pp. 2098–2102, May 2007.
- [182] T. Metke, A. S. Westover, R. Carter, L. Oakes, A. Douglas, and C. L. Pint, "Particulate-free porous silicon networks for efficient capacitive deionization water desalination," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, Jul. 2016.
- [183] J. Z. Wallner and P. L. Bergstrom, "A porous silicon based particle filter for microsystems," *Phys. Status Solidi A*, vol. 204, no. 5, pp. 1469–1473, May 2007.
- [184] D. G. Johnson *et al.*, "Ultrathin Silicon Membranes for Wearable Dialysis," *Adv. Chronic Kidney Dis.*, vol. 20, no. 6, pp. 508–515, Nov. 2013.
- [185] K. Grigoras, S. Franssila, T. Sikanen, T. Kotiaho, and R. Kostianen, "Fabrication of porous membrane filter from p-type silicon," *Phys. Status Solidi A*, vol. 202, no. 8, pp. 1624–1628, Jun. 2005.
- [186] G. Lammel and P. Renaud, "Free-standing, mobile 3D porous silicon microstructures," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 85, no. 1–3, pp. 356–360, Aug. 2000.
- [187] D. N. Pagonis and A. G. Nassiopoulou, "Free-standing macroporous silicon membranes over a large cavity for filtering and lab-on-chip applications," *Microelectron. Eng.*, vol. 83, no. 4–9, pp. 1421–1425, Apr. 2006.
- [188] F. Saharil *et al.*, "Dry adhesive bonding of nanoporous inorganic membranes to microfluidic devices using the OSTE(+) dual-cure polymer," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 23, no. 2, p. 025021, Feb. 2013.
- [189] Y. He, "Lateral porous silicon membranes for planar microfluidic applications," PhD Thesis, 2016.
- [190] M. J. Sailor, *Porous silicon in practice: preparation, characterization and applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.
- [191] C. S. Cojocar *et al.*, "Conformal Anodic Oxidation of Aluminum Thin Films," *Nano Lett.*, vol. 5, no. 4, pp. 675–680, Apr. 2005.
- [192] M. Gowtham *et al.*, "Controlled fabrication of patterned lateral porous alumina membranes," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 3, p. 035303, Jan. 2008.
- [193] C. J. M. Eijkel, J. Branebjerg, M. Elwenspoek, and F. C. M. Van de Pol, "A new technology for micromachining of silicon: dopant selective HF anodic etching for the realization of low-doped monocrystalline silicon structures," *IEEE Electron Device Lett.*, vol. 11, no. 12, pp. 588–589, Dec. 1990.
- [194] T. Leichlé and D. Bourrier, "Integration of lateral porous silicon membranes into planar microfluidics," *Lab. Chip*, vol. 15, no. 3, pp. 833–838, 2015.



- [195] Y. He and T. Leïchlé, "Fabrication of lateral porous silicon membranes for planar microfluidics by means of ion implantation," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 239, pp. 628–634, Feb. 2017.
- [196] W. Ludurczak *et al.*, "Image processing for the characterization of porous silicon nanostructure," *Phys. Status Solidi C*, vol. 6, no. 7, pp. 1675–1679, Jul. 2009.
- [197] A. Plecis, R. B. Schoch, and P. Renaud, "Ionic Transport Phenomena in Nanofluidics: Experimental and Theoretical Study of the Exclusion-Enrichment Effect on a Chip," *Nano Lett.*, vol. 5, no. 6, pp. 1147–1155, Jun. 2005.
- [198] A. A. Ensafi, M. M. Abarghoui, and N. Ahmadi, "Porous Silicon Electrochemical Biosensors: Basic Principles and Detection Strategies," in *Handbook of Porous Silicon*, L. Canham, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 1–17.
- [199] C. RoyChaudhuri and N. Das, "Porous Silicon Electrochemical Biosensors: Performance and Commercial Prospects," in *Handbook of Porous Silicon*, L. Canham, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 1–21.
- [200] G. Shtenberg and E. Segal, "Porous Silicon Optical Biosensors," in *Handbook of Porous Silicon*, L. Canham, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2014, pp. 1–11.
- [201] V. S. Lin, "A Porous Silicon-Based Optical Interferometric Biosensor," *Science*, vol. 278, no. 5339, pp. 840–843, Oct. 1997.
- [202] A. Janshoff *et al.*, "Macroporous p-Type Silicon Fabry–Perot Layers. Fabrication, Characterization, and Applications in Biosensing," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 46, pp. 12108–12116, Nov. 1998.
- [203] J. Yakovleva *et al.*, "Microfluidic Enzyme Immunoassay Using Silicon Microchip with Immobilized Antibodies and Chemiluminescence Detection," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 13, pp. 2994–3004, Jul. 2002.
- [204] L. De Stefano *et al.*, "Integrated silicon-glass opto-chemical sensors for lab-on-chip applications," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 114, no. 2, pp. 625–630, Apr. 2006.
- [205] L. De Stefano, E. Orabona, A. Lamberti, I. Rea, and I. Rendina, "Microfluidics assisted biosensors for label-free optical monitoring of molecular interactions," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 179, pp. 157–162, Mar. 2013.
- [206] C. Escobedo, A. G. Brolo, R. Gordon, and D. Sinton, "Flow-Through vs Flow-Over: Analysis of Transport and Binding in Nanohole Array Plasmonic Biosensors," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 24, pp. 10015–10020, Dec. 2010.
- [207] N. Kumar, E. Froner, R. Guider, M. Scarpa, and P. Bettotti, "Investigation of non-specific signals in nanoporous flow-through and flow-over based sensors," *The Analyst*, vol. 139, no. 6, p. 1345, 2014.
- [208] Y. Zhao, G. Gaur, R. L. Mernaugh, P. E. Laibinis, and S. M. Weiss, "Comparative Kinetic Analysis of Closed-Ended and Open-Ended Porous Sensors," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2016.
- [209] Y. Zhao, G. Gaur, S. T. Retterer, P. E. Laibinis, and S. M. Weiss, "Flow-Through Porous Silicon Membranes for Real-Time Label-Free Biosensing," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 22, pp. 10940–10948, Nov. 2016.
- [210] S. Mariani, L. Pino, L. M. Strambini, L. Tedeschi, and G. Barillaro, "10 000-Fold Improvement in Protein Detection Using Nanostructured Porous Silicon Interferometric Aptasensors," *ACS Sens.*, vol. 1, no. 12, pp. 1471–1479, Dec. 2016.
- [211] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 620, no. 1–2, pp. 8–26, Jul. 2008.
- [212] J. Wang, "Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 10, pp. 1887–1892, Apr. 2006.
- [213] G.-J. Zhang and Y. Ning, "Silicon nanowire biosensor and its applications in disease diagnostics: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 749, pp. 1–15, Oct. 2012.
- [214] K. Länge, B. E. Rapp, and M. Rapp, "Surface acoustic wave biosensors: a review," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, no. 5, pp. 1509–1519, Jul. 2008.

- [215] J. Tamayo, P. M. Kosaka, J. J. Ruz, Á. San Paulo, and M. Calleja, "Biosensors based on nanomechanical systems," *Chem Soc Rev*, vol. 42, no. 3, pp. 1287–1311, 2013.
- [216] J. W. Ndieyira *et al.*, "Surface-stress sensors for rapid and ultrasensitive detection of active free drugs in human serum," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 3, pp. 225–232, Mar. 2014.
- [217] A. K. Naik, M. S. Hanay, W. K. Hiebert, X. L. Feng, and M. L. Roukes, "Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 7, pp. 445–450, Jul. 2009.
- [218] P. E. Sheehan and L. J. Whitman, "Detection Limits for Nanoscale Biosensors," *Nano Lett.*, vol. 5, no. 4, pp. 803–807, Apr. 2005.
- [219] T. P. Burg *et al.*, "Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid," *Nature*, vol. 446, no. 7139, pp. 1066–1069, Apr. 2007.
- [220] V. Agache, G. Blanco-Gomez, F. Baleras, and P. Caillat, "An embedded microchannel in a MEMS plate resonator for ultrasensitive mass sensing in liquid," *Lab. Chip*, vol. 11, no. 15, p. 2598, 2011.
- [221] B. N. Johnson, H. Sharma, and R. Mutharasan, "Torsional and Lateral Resonant Modes of Cantilevers as Biosensors: Alternatives to Bending Modes," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 3, pp. 1760–1766, Feb. 2013.
- [222] J. Linden, A. Thyssen, and E. Oesterschulze, "Suspended plate microresonators with high quality factor for the operation in liquids," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 104, no. 19, p. 191906, May 2014.
- [223] T. Alava, F. Mathieu, L. Mazon, C. Soyer, D. Remiens, and L. Nicu, "Silicon-based micromembranes with piezoelectric actuation and piezoresistive detection for sensing purposes in liquid media," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 20, no. 7, p. 075014, Jul. 2010.
- [224] T. Xu, Z. Wang, J. Miao, L. Yu, and C. M. Li, "Micro-machined piezoelectric membrane-based immunosensor array," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 4, pp. 638–643, Dec. 2008.
- [225] M. Cha *et al.*, "Biomolecular detection with a thin membrane transducer," *Lab. Chip*, vol. 8, no. 6, p. 932, 2008.
- [226] X. Lu, Q. Guo, Z. Xu, W. Ren, and Z.-Y. Cheng, "Biosensor platform based on stress-improved piezoelectric membrane," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 179, pp. 32–38, Jun. 2012.
- [227] K. L. Ekinci and M. L. Roukes, "Nanoelectromechanical systems," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 76, no. 6, p. 061101, Jun. 2005.
- [228] R. Puers, "Capacitive sensors: When and how to use them," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 37–38, pp. 93–105, Jun. 1993.
- [229] A.-S. Rollier, B. Legrand, D. Collard, and L. Buchaillet, "The stability and pull-in voltage of electrostatic parallel-plate actuators in liquid solutions," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 16, no. 4, pp. 794–801, Apr. 2006.
- [230] M. Bao and H. Yang, "Squeeze film air damping in MEMS," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 136, no. 1, pp. 3–27, May 2007.
- [231] A. S. Ergun, G. G. Yaralioglu, and B. T. Khuri-Yakub, "Capacitive Micromachined Ultrasonic Transducers: Theory and Technology," *J. Aerosp. Eng.*, vol. 16, no. 2, pp. 76–84, Apr. 2003.
- [232] N. Tas, T. Sonnenberg, H. Jansen, R. Legtenberg, and M. Elwenspoek, "Stiction in surface micromachining," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 6, no. 4, pp. 385–397, Dec. 1996.
- [233] A. S. Erguri, Yongli Huang, Xuefeng Zhuang, O. Oralkan, G. G. Yarahoglu, and B. T. Khuri-Yakub, "Capacitive micromachined ultrasonic transducers: fabrication technology," *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 52, no. 12, pp. 2242–2258, Dec. 2005.
- [234] A. Carlson, A. M. Bowen, Y. Huang, R. G. Nuzzo, and J. A. Rogers, "Transfer Printing Techniques for Materials Assembly and Micro/Nanodevice Fabrication," *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 39, pp. 5284–5318, Oct. 2012.
- [235] J. Zaumseil *et al.*, "Three-Dimensional and Multilayer Nanostructures Formed by Nanotransfer Printing," *Nano Lett.*, vol. 3, no. 9, pp. 1223–1227, Sep. 2003.

- [236] A. Javey, Nam, R. S. Friedman, H. Yan, and C. M. Lieber, "Layer-by-Layer Assembly of Nanowires for Three-Dimensional, Multifunctional Electronics," *Nano Lett.*, vol. 7, no. 3, pp. 773–777, Mar. 2007.
- [237] J. Yeom and M. A. Shannon, "Detachment Lithography of Photosensitive Polymers: A Route to Fabricating Three-Dimensional Structures," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 20, no. 2, pp. 289–295, Jan. 2010.
- [238] S. Kim *et al.*, "Microstructured elastomeric surfaces with reversible adhesion and examples of their use in deterministic assembly by transfer printing," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 40, pp. 17095–17100, Oct. 2010.
- [239] Y. Zhang, H. Keum, K. Park, R. Bashir, and S. Kim, "Micro-Masonry of MEMS Sensors and Actuators," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 23, no. 2, pp. 308–314, Apr. 2014.
- [240] A. Bhaswara, "Fabrication of suspended plate MEMS resonator by micro-masonry," PhD Thesis, 2015.
- [241] A. Bhaswara *et al.*, "Fabrication of nanoplate resonating structures via micro-masonry," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 24, no. 11, p. 115012, Nov. 2014.
- [242] A. Bhaswara *et al.*, "A Simple Fabrication Process Based on Micro-masonry for the Realization of Nanoplate Resonators with Integrated Actuation and Detection Schemes," *Front. Mech. Eng.*, vol. 2, Mar. 2016.
- [243] J. A. Rogers, M. G. Lagally, and R. G. Nuzzo, "Synthesis, assembly and applications of semiconductor nanomembranes," *Nature*, vol. 477, no. 7362, pp. 45–53, Sep. 2011.
- [244] W. K. Schomburg, *Introduction to microsystem design*. New York: Springer, 2011.
- [245] M. Bao, H. Yang, H. Yin, and Y. Sun, "Energy transfer model for squeeze-film air damping in low vacuum," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 12, no. 3, pp. 341–346, May 2002.
- [246] L. Nicu, *Micro- and nanoelectromechanical biosensors*. Hoboken, NJ: ISTE Ltd/John Wiley and Sons Inc, 2013.
- [247] A. Bietsch, J. Zhang, M. Hegner, H. P. Lang, and C. Gerber, "Rapid functionalization of cantilever array sensors by inkjet printing," *Nanotechnology*, vol. 15, no. 8, pp. 873–880, Aug. 2004.
- [248] R. McKendry *et al.*, "Multiple Label-Free Biodetection and Quantitative DNA-Binding Assays on a Nanomechanical Cantilever Array," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 15, pp. 9783–9788, 2002.
- [249] A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes, and S. P. A. Fodor, "Light-Generated Oligonucleotide Arrays for Rapid DNA Sequence Analysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 11, pp. 5022–5026, 1994.
- [250] J. C. Harper, R. Polsky, S. M. Dirk, D. R. Wheeler, and S. M. Brozik, "Electroaddressable Selective Functionalization of Electrode Arrays: Catalytic NADH Detection Using Aryl Diazonium Modified Gold Electrodes," *Electroanalysis*, vol. 19, no. 12, pp. 1268–1274, Jun. 2007.
- [251] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, A. Bietsch, B. Michel, and H. Biebuyck, "Microfluidic Networks for Chemical Patterning of Substrates: Design and Application to Bioassays," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 3, pp. 500–508, Jan. 1998.
- [252] "Arrayit Corporation." [Online]. Available: [http://www.arrayit.com/Products/Microarrayers/Microarrayer\\_SpotBot\\_Titan/microarrayer\\_spotbot\\_titan.html](http://www.arrayit.com/Products/Microarrayers/Microarrayer_SpotBot_Titan/microarrayer_spotbot_titan.html).
- [253] A. Meister, M. Liley, J. Brugger, R. Pugin, and H. Heinzelmann, "Nanodispenser for attoliter volume deposition using atomic force microscopy probes modified by focused-ion-beam milling," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 85, no. 25, pp. 6260–6262, Dec. 2004.
- [254] D. S. Ginger, H. Zhang, and C. A. Mirkin, "The Evolution of Dip-Pen Nanolithography," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 43, no. 1, pp. 30–45, Jan. 2004.
- [255] T. Leichle, M. Lishchynska, F. Mathieu, J.-B. Pourciel, D. Saya, and L. Nicu, "A Microcantilever-Based Picoliter Droplet Dispenser With Integrated Force Sensors and Electroassisted Deposition Means," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 17, no. 5, pp. 1239–1253, Oct. 2008.

- [256] N. Berthet-Duroure *et al.*, "Interaction of biomolecules sequentially deposited at the same location using a microcantilever-based spotter," *Biomed. Microdevices*, vol. 10, no. 4, pp. 479–487, Aug. 2008.
- [257] V. Bardinal *et al.*, "Fabrication and characterization of microlens arrays using a cantilever-based spotter," *Opt. Express*, vol. 15, no. 11, p. 6900, 2007.
- [258] V. Bardinal *et al.*, "Spotted Custom Lenses to Tailor the Divergence of Vertical-Cavity Surface-Emitting Lasers," *IEEE Photonics Technol. Lett.*, vol. 22, no. 21, pp. 1592–1594, Nov. 2010.
- [259] T. Leïchlé *et al.*, "Nanostructuring surfaces with conjugated silica colloids deposited using silicon-based microcantilevers," *Nanotechnology*, vol. 16, no. 4, pp. 525–531, Apr. 2005.
- [260] A. Valsesia *et al.*, "Deposition of Nanobead Hexagonal Crystals Using Silicon Microcantilevers," *Small*, vol. 2, no. 12, pp. 1444–1447, Dec. 2006.
- [261] T. Leïchlé *et al.*, "Copper electrodeposition localized in picoliter droplets using microcantilever arrays," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 88, no. 25, p. 254108, Jun. 2006.
- [262] E. Descamps *et al.*, "Fabrication of Oligonucleotide Chips by Using Parallel Cantilever-Based Electrochemical Deposition in Picoliter Volumes," *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 14, pp. 1816–1821, Jul. 2007.
- [263] F. Vandevelde, T. Leïchlé, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, and K. Haupt, "Direct Patterning of Molecularly Imprinted Microdot Arrays for Sensors and Biochips," *Langmuir*, vol. 23, no. 12, pp. 6490–6493, Jun. 2007.
- [264] Y. Roupioz *et al.*, "Individual Blood-Cell Capture and 2D Organization on Microarrays," *Small*, vol. 5, no. 13, pp. 1493–1497, Jul. 2009.
- [265] E. Descamps *et al.*, "Functionalization of optical nanotip arrays with an electrochemical microcantilever for multiplexed DNA detection," *Lab. Chip*, vol. 13, no. 15, p. 2956, 2013.
- [266] D. Dezest, "Nanosyst emes électromécaniques pour la biodétection : intégration d'un moyen de transduction et stratégies de biofonctionnalisation," PhD Thesis, 2015.
- [267] S. Guillon *et al.*, "Biological functionalization of massively parallel arrays of nanocantilevers using microcontact printing," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 161, no. 1, pp. 1135–1138, Jan. 2012.
- [268] S. Salomon *et al.*, "Arrays of nanoelectromechanical biosensors functionalized by microcontact printing," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 49, p. 495501, Dec. 2012.
- [269] Y. Xia and G. M. Whitesides, "Soft Lithography," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 37, no. 5, pp. 550–575, Mar. 1998.
- [270] A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard, and E. Delamarche, "Microcontact Printing of Proteins," *Adv. Mater.*, vol. 12, no. 14, pp. 1067–1070, Jul. 2000.
- [271] J. Chalmeau, C. Thibault, F. Carcenac, and C. Vieu, "Self-aligned patterns of multiple biomolecules printed in one step," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 93, no. 13, p. 133901, Sep. 2008.
- [272] K. Haupt, "Peer Reviewed: Molecularly Imprinted Polymers: The Next Generation," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 17, pp. 376 A-383 A, Sep. 2003.
- [273] D. Dezest *et al.*, "Multiplexed functionalization of nanoelectromechanical systems with photopatterned molecularly imprinted polymers," *J. Micromechanics Microengineering*, Dec. 2018.
- [274] W. Tan, K. Wang, and T. J. Drake, "Molecular beacons," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 547–553, Oct. 2004.
- [275] H. Du, M. D. Disney, B. L. Miller, and T. D. Krauss, "Hybridization-Based Unquenching of DNA Hairpins on Au Surfaces: Prototypical 'Molecular Beacon' Biosensors," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 14, pp. 4012–4013, Apr. 2003.
- [276] M. Boulade, J. Moreau, and T. Livache, "Imagerie par résonance des plasmons de surface : application en microbiologie," *Photoniques*, no. 81, pp. 24–27, Apr. 2016.
- [277] K.-L. Lee and P.-K. Wei, "Enhancing Surface Plasmon Detection Using Ultrasmall Nanoslits and a Multispectral Integration Method," *Small*, vol. 6, no. 17, pp. 1900–1907, Sep. 2010.

- [278] K.-L. Lee, J.-B. Huang, J.-W. Chang, S.-H. Wu, and P.-K. Wei, "Ultrasensitive Biosensors Using Enhanced Fano Resonances in Capped Gold Nanoslit Arrays," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, Jul. 2015.
- [279] M.-Y. Pan, K.-L. Lee, S.-C. Lo, and P.-K. Wei, "Resonant position tracking method for smartphone-based surface plasmon sensor," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1032, pp. 99–106, Nov. 2018.
- [280] C. Pacholski, M. Sartor, M. J. Sailor, F. Cunin, and G. M. Miskelly, "Biosensing Using Porous Silicon Double-Layer Interferometers: Reflective Interferometric Fourier Transform Spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 33, pp. 11636–11645, Aug. 2005.
- [281] L. M. Bonanno and L. A. DeLouise, "Whole blood optical biosensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 3, pp. 444–448, Oct. 2007.
- [282] V. Krivitsky *et al.*, "Si Nanowires Forest-Based On-Chip Biomolecular Filtering, Separation and Preconcentration Devices: Nanowires Do it All," *Nano Lett.*, vol. 12, no. 9, pp. 4748–4756, Sep. 2012.
- [283] C.-C. Wu and M. J. Sailor, "Selective Functionalization of the Internal and the External Surfaces of Mesoporous Silicon by Liquid Masking," *ACS Nano*, vol. 7, no. 4, pp. 3158–3167, Apr. 2013.
- [284] C. Ayela *et al.*, "High quality factors of silicon membranes with piezoelectric actuation and detection scheme for biosensing purpose in liquid media," in *2006 IEEE International Frequency Control Symposium and Exposition*, Miami, FL, USA, 2006, pp. 123–128.
- [285] P. Luginbuhl' and N. Setter, "PIEZOELECTRIC CANTILEVER BEAMS ACTUATED BY PZT SOL-GEL THIN FILM," p. 4.
- [286] D. Saya *et al.*, "Fabrication and characterization of mechanical resonators integrating microcontact printed PZT films," in *2017 Joint IEEE International Symposium on the Applications of Ferroelectric (ISAF)/International Workshop on Acoustic Transduction Materials and Devices (IWATMD)/Piezoresponse Force Microscopy (PFM)*, Atlanta, GA, USA, 2017, pp. 89–92.
- [287] M. T. Boudjiet *et al.*, "Geometry optimization of uncoated silicon microcantilever-based gas density sensors," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 208, pp. 600–607, Mar. 2015.
- [288] D. J. Bell, T. J. Lu, N. A. Fleck, and S. M. Spearing, "MEMS actuators and sensors: observations on their performance and selection for purpose," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 15, no. 7, pp. S153–S164, Jul. 2005.
- [289] R. E. Hetrick, "A vibrating cantilever magnetic-field sensor," *Sens. Actuators*, vol. 16, no. 3, pp. 197–207, Mar. 1989.
- [290] C. Vančura, Y. Li, J. Lichtenberg, K.-U. Kirstein, A. Hierlemann, and F. Josse, "Liquid-Phase Chemical and Biochemical Detection Using Fully Integrated Magnetically Actuated Complementary Metal Oxide Semiconductor Resonant Cantilever Sensor Systems," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 4, pp. 1646–1654, Feb. 2007.
- [291] B. Legrand, A.-S. Rollier, D. Collard, and L. Buchailot, "Suppression of the pull-in instability for parallel-plate electrostatic actuators operated in dielectric liquids," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 88, no. 3, p. 034105, Jan. 2006.
- [292] D. P. Arnold and Naigang Wang, "Permanent Magnets for MEMS," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 18, no. 6, pp. 1255–1266, Dec. 2009.
- [293] Y. Li, J. Kim, M. Kim, A. Armutlulu, and M. G. Allen, "Thick Multilayered Micromachined Permanent Magnets With Preserved Magnetic Properties," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 25, no. 3, pp. 498–507, Jun. 2016.
- [294] T. Budde and H. H. Gatzel, "Thin film SmCo magnets for use in electromagnetic microactuators," *J. Appl. Phys.*, vol. 99, no. 8, p. 08N304, Apr. 2006.
- [295] D. L. Roy *et al.*, "Fabrication and characterization of polymer membranes with integrated arrays of high performance micro-magnets," *Mater. Today Commun.*, vol. 6, pp. 50–55, Mar. 2016.
- [296] Y. Chikuba, M. Oryoshi, A. Yamashita, M. Nakano, T. Yanai, and H. Fukunaga, "Nd-Fe-B film magnets with the thickness above 100  $\mu\text{m}$  deposited on Si substrates," in *2015 IEEE Magnetics Conference (INTERMAG)*, Beijing, 2015, pp. 1–1.

- [297] N. Jackson, F. J. Pedrosa, A. Bollero, A. Mathewson, and O. Z. Olszewski, "Integration of Thick-Film Permanent Magnets for MEMS Applications," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 25, no. 4, pp. 716–724, Aug. 2016.
- [298] Y. Soumare *et al.*, "Kinetically Controlled Synthesis of Hexagonally Close-Packed Cobalt Nanorods with High Magnetic Coercivity," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 12, pp. 1971–1977, Jun. 2009.
- [299] M. Han, Z. Li, X. Sun, and H. Zhang, "Analysis of an in-plane electromagnetic energy harvester with integrated magnet array," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 219, pp. 38–46, Nov. 2014.
- [300] Y. Tan, Y. Dong, and X. Wang, "Review of MEMS Electromagnetic Vibration Energy Harvester," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–16, Feb. 2017.
- [301] M. Rais-Zadeh *et al.*, "Gallium Nitride as an Electromechanical Material," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 23, no. 6, pp. 1252–1271, Dec. 2014.
- [302] A. Ansari, V. J. Gokhale, J. Roberts, and M. Rais-Zadeh, "Monolithic integration of GaN-based micromechanical resonators and HEMTs for timing applications," in *2012 International Electron Devices Meeting*, San Francisco, CA, USA, 2012, pp. 15.5.1-15.5.4.
- [303] B. W. Bahr, L. C. Popa, and D. Weinstein, "16.8 GHz GaN-MMIC monolithically integrated MEMS-based oscillators," in *2015 IEEE International Solid-State Circuits Conference - (ISSCC) Digest of Technical Papers*, San Francisco, CA, USA, 2015, pp. 1–3.
- [304] V. Cimalla, J. Pezoldt, and O. Ambacher, "Group III nitride and SiC based MEMS and NEMS: materials properties, technology and applications," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 20, pp. 6386–6434, Oct. 2007.
- [305] F. Crispoldi *et al.*, "New Fabrication Process to Manufacture RF-MEMS and HEMT on GaN/Si Substrate," p. 4.
- [306] F. Crispoldi *et al.*, "Full integrated process to manufacture RF-MEMS and MMICs on GaN/Si substrate," *Int. J. Microw. Wirel. Technol.*, vol. 2, no. 3–4, pp. 333–339, Aug. 2010.
- [307] S. Davies, T. S. Huang, M. H. Gass, A. J. Papworth, T. B. Joyce, and P. R. Chalker, "Fabrication of GaN cantilevers on silicon substrates for microelectromechanical devices," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 84, no. 14, pp. 2566–2568, Apr. 2004.
- [308] G. Fischer, W. Eckl, and G. Kaminski, "RF-MEMS and SiC/GaN as enabling technologies for a reconfigurable multi-band/multi-standard radio," *Bell Labs Tech. J.*, vol. 7, no. 3, pp. 169–189, Mar. 2003.
- [309] G. Vanko *et al.*, "Bulk micromachining of SiC substrate for MEMS sensor applications," *Microelectron. Eng.*, vol. 110, pp. 260–264, Oct. 2013.
- [310] Y. Wang, T. Sasaki, T. Wu, F. Hu, and K. Hane, "Comb-drive GaN micro-mirror on a GaN-on-silicon platform," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 21, no. 3, p. 035012, Mar. 2011.
- [311] S. Davies *et al.*, "Fabrication of epitaxial III-nitride cantilevers on silicon (1 1 1) substrates," *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 15, no. 11, pp. 705–710, Nov. 2004.
- [312] K. Brueckner *et al.*, "Two-dimensional electron gas based actuation of piezoelectric AlGaIn/GaN microelectromechanical resonators," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 93, no. 17, p. 173504, Oct. 2008.
- [313] K. Brueckner *et al.*, "Resonant Piezoelectric AlGaIn/GaN MEMS Sensors in Longitudinal Mode Operation," in *2009 IEEE 22nd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, Sorrento, Italy, 2009, pp. 927–930.
- [314] L. C. Popa and D. Weinstein, "Switchable piezoelectric transduction in AlGaIn/GaN MEMS resonators," in *2013 Transducers & Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXVII)*, Barcelona, Spain, 2013, pp. 2461–2464.
- [315] B. S. Kang *et al.*, "Electrical detection of immobilized proteins with ungated AlGaIn/ GaN high-electron-mobility Transistors," *Appl Phys Lett*, p. 4.
- [316] M. S. Makowski and A. Ivanisevic, "Molecular Analysis of Blood with Micro-/Nanoscale Field-Effect-Transistor Biosensors," *Small*, vol. 7, no. 14, pp. 1863–1875, Jul. 2011.

- [317] Y.-L. Wang *et al.*, "Botulinum toxin detection using AlGaN / GaN high electron mobility transistors," *Appl Phys Lett*, p. 4.
- [318] X. Xu, V. Jindal, F. Shahedipour-Sandvik, M. Bergkvist, and N. C. Cady, "Direct immobilization and hybridization of DNA on group III nitride semiconductors," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 11, pp. 5905–5909, Mar. 2009.
- [319] I. Cimalla *et al.*, "AlGaN/GaN biosensor—effect of device processing steps on the surface properties and biocompatibility," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 123, no. 2, pp. 740–748, May 2007.
- [320] A. Podolska *et al.*, "Biocompatibility of semiconducting AlGaN/GaN material with living cells," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 169, pp. 401–406, Jul. 2012.
- [321] P. Sahoo, S. Suresh, S. Dhara, G. Saini, S. Rangarajan, and A. K. Tyagi, "Direct label free ultrasensitive impedimetric DNA biosensor using dendrimer functionalized GaN nanowires," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 44, pp. 164–170, Jun. 2013.
- [322] G. Steinhoff, O. Purruicker, M. Tanaka, M. Stutzmann, and M. Eickhoff, "Al<sub>x</sub>Ga<sub>1-x</sub>N—A New Material System for Biosensors," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 13, no. 11, pp. 841–846, Nov. 2003.
- [323] A. H. Rajabi, M. Jaffe, and T. L. Arinzeh, "Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review," *Acta Biomater.*, vol. 24, pp. 12–23, Sep. 2015.
- [324] Y. Tang, C. Wu, Z. Wu, L. Hu, W. Zhang, and K. Zhao, "Fabrication and in vitro biological properties of piezoelectric bioceramics for bone regeneration," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017.
- [325] M. Vaezi, H. Seitz, and S. Yang, "A review on 3D micro-additive manufacturing technologies," *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 67, no. 5–8, pp. 1721–1754, Jul. 2013.
- [326] Y. Zhang, L. Chen, J. Zeng, K. Zhou, and D. Zhang, "Aligned porous barium titanate/hydroxyapatite composites with high piezoelectric coefficients for bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 39, pp. 143–149, Jun. 2014.
- [327] A. Marino *et al.*, "Two-Photon Lithography of 3D Nanocomposite Piezoelectric Scaffolds for Cell Stimulation," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 46, pp. 25574–25579, Nov. 2015.
- [328] O. Guillaume *et al.*, "Surface-enrichment with hydroxyapatite nanoparticles in stereolithography-fabricated composite polymer scaffolds promotes bone repair," *Acta Biomater.*, vol. 54, pp. 386–398, May 2017.
- [329] K. Kim *et al.*, "3D Optical Printing of Piezoelectric Nanoparticle–Polymer Composite Materials," *ACS Nano*, vol. 8, no. 10, pp. 9799–9806, Oct. 2014.
- [330] N. Voelcker and S. P. Low, "Cell Culture on Porous Silicon," in *Handbook of Porous Silicon*, L. Canham, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2014, pp. 1–15.
- [331] J. L. Coffey, "Porous Silicon and Tissue Engineering Scaffolds," in *Handbook of Porous Silicon*, L. Canham, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2014, pp. 1–7.
- [332] K. C. McGilvray *et al.*, "Implantable microelectromechanical sensors for diagnostic monitoring and post-surgical prediction of bone fracture healing: IMPLANTABLE MICROELECTROMECHANICAL SENSORS FOR DIAGNOSTIC MONITORING," *J. Orthop. Res.*, vol. 33, no. 10, pp. 1439–1446, Oct. 2015.
- [333] J. Liu, J. Wen, Z. Zhang, H. Liu, and Y. Sun, "Voyage inside the cell: Microsystems and nanoengineering for intracellular measurement and manipulation," *Microsyst. Nanoeng.*, vol. 1, no. 1, Dec. 2015.
- [334] M. T. Chorsi *et al.*, "Piezoelectric Biomaterials for Sensors and Actuators," *Adv. Mater.*, vol. 31, no. 1, p. 1802084, Jan. 2019.
- [335] H. Cui *et al.*, "Three-dimensional printing of piezoelectric materials with designed anisotropy and directional response," *Nat. Mater.*, vol. 18, no. 3, pp. 234–241, Mar. 2019.
- [336] J. U. Lind *et al.*, "Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing," *Nat. Mater.*, vol. 16, no. 3, pp. 303–308, Mar. 2017.
- [337] S. Y. Chin *et al.*, "Additive manufacturing of hydrogel-based materials for next-generation implantable medical devices," *Sci. Robot.*, vol. 2, no. 2, p. eaah6451, Jan. 2017.

- [338] W. Hynes *et al.*, "Micropatterning of 3D Microenvironments for Living Biosensor Applications," *Biosensors*, vol. 4, no. 1, pp. 28–44, Feb. 2014.
- [339] H.-W. Kang, S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo, and A. Atala, "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity," *Nat. Biotechnol.*, vol. 34, no. 3, pp. 312–319, Mar. 2016.
- [340] M. S. Mannoer *et al.*, "3D Printed Bionic Ears," *Nano Lett.*, vol. 13, no. 6, pp. 2634–2639, Jun. 2013.
- [341] Kenry, J. C. Yeo, and C. T. Lim, "Emerging flexible and wearable physical sensing platforms for healthcare and biomedical applications," *Microsyst. Nanoeng.*, vol. 2, no. 1, Dec. 2016.
- [342] D. Moe, "Evaluation of CardioMEMS Heart Failure Device," p. 42.
- [343] M. Luo, W. Shen, and M. G. Allen, "Microfabricated PLGA/PVA-based completely biodegradable passive RF pressure sensors," in *2015 Transducers - 2015 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS)*, Anchorage, AK, USA, 2015, pp. 101–104.
- [344] K. J. Yu *et al.*, "Bioresorbable silicon electronics for transient spatiotemporal mapping of electrical activity from the cerebral cortex," *Nat. Mater.*, vol. 15, no. 7, pp. 782–791, Jul. 2016.
- [345] M. Deterre *et al.*, "Energy Harvesting System for Cardiac Implant Applications," p. 5, 2011.
- [346] M. Tsang, A. Armutlulu, A. W. Martinez, S. A. B. Allen, and M. G. Allen, "Biodegradable magnesium/iron batteries with polycaprolactone encapsulation: A microfabricated power source for transient implantable devices," *Microsyst. Nanoeng.*, vol. 1, no. 1, Dec. 2015.
- [347] J. S. Ho *et al.*, "Wireless power transfer to deep-tissue microimplants," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 22, pp. 7974–7979, Jun. 2014.
- [348] F. Mateen, C. Maedler, S. Erramilli, and P. Mohanty, "Wireless actuation of micromechanical resonators," *Microsyst. Nanoeng.*, vol. 2, no. 1, Dec. 2016.
- [349] H. Aubert, "RFID technology for human implant devices," *Comptes Rendus Phys.*, vol. 12, no. 7, pp. 675–683, Sep. 2011.
- [350] C. A. Mandon, L. J. Blum, and C. A. Marquette, "Adding Biomolecular Recognition Capability to 3D Printed Objects," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 21, pp. 10767–10772, Nov. 2016.
- [351] T. Ayari *et al.*, "Gas sensors boosted by two-dimensional h-BN enabled transfer on thin substrate foils: towards wearable and portable applications," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017.





## 8 Annexes

### 8.1 Curriculum Vitae

---

#### FORMATION

Décembre 2006	<b>Doctorat d'Université</b> en Matériaux, Technologies et Composants de l'Electronique, Université Paul Sabatier, Toulouse III.
Août 2002	<b>Master of Science in Electrical and Computer Engineering, minor in Bioengineering</b> , Georgia Institute of Technology (USA).
Septembre 1999	<b>DEA</b> Matériaux, Technologies et Composants de l'Electronique, INSA Toulouse.
Juin 1999	<b>Diplôme d'Ingénieur Génie Physique</b> , INSA Toulouse.

---

#### EXPERIENCES DE RECHERCHE

Janvier 2010-A ce jour	<u>Chercheur CNRS / Responsable d'équipe (depuis mai 2016) : Equipe MEMS, LAAS-CNRS (Toulouse).</u> <i>Développement d'outils de biodétection basés sur les micro- et nanotechnologies : activités liées aux méthodes de transduction électromécanique, à la biofonctionnalisation de bioMEMS et à la fluidique associée.</i>
Septembre 2007-Décembre 2009	<u>Post-doctorant : Nanobioscience Lab, Institute of Physics, Academia Sinica (Taipei, Taïwan),</u> sous la direction du professeur Chia-Fu Chou. <i>Manipulation de biomolécules et étude d'interactions moléculaires à l'aide de systèmes nanofluidiques et réalisation de pièges à molécules par diélectrophorèse.</i> Obtention d'un <b>fellowship de l'Academia Sinica</b> (Décembre 2007).
Novembre 2003-Juillet 2007	<u>Doctorant et Post-doctorant : Groupe Nanobiosystèmes, LAAS-CNRS (Toulouse),</u> sous la direction de Dr. Liviu Nicu et Dr. Christian Bergaud. <i>Conception et réalisation d'un microsysteme de dépôt de gouttes pour la fonctionnalisation localisée de surfaces en vue de la miniaturisation des biopuces. Intégration de capteurs de force piézorésistifs et utilisation des phénomènes d'électromouillage et d'électrochimie pour le contrôle du dépôt.</i>
Août 2002-Février 2003	<u>Assistant de Recherche : Microelectronic Acoustics Group, Georgia Institute of Technology (Atlanta, USA),</u> sous la direction du professeur William Hunt. <i>Conception et test de capteurs acoustiques pour détections immunologiques en phase liquide.</i>
Mars 1999-Août 2002	<u>Assistant de Recherche, étudiant en Master : MicroSensors and MicroActuators Group, Georgia Institute of Technology (Atlanta, USA),</u> sous la direction du professeur Mark Allen. <i>Conception, fabrication et test d'une micro-boussole résonante à faible consommation. Intégration de matériaux magnétiques et réalisation du capteur par micro-usinage de surface.</i>

**Congé Parental** : Juillet 2014-Janvier 2015.

**Service National** : Coopérant Scientifique, Georgia Institute of Technology, Octobre 1999-Février 2001.

## Activité scientifique dans le laboratoire

### *Production scientifique*

<b>PRODUCTION :</b>	<b>TOTALE</b>	<b>DEPUIS ENTREE AU CNRS (2010)</b>
<b>RICL</b>	45	26
<b>BREVETS</b>	4	3
<b>LIVRES ET CHAPITRES DE LIVRE</b>	2	2
<b>CONFERENCES INTERNATIONALES</b>	59	34
<b>CONFERENCES INVITEES</b>	3	3

### *Contrats et valorisation en support de l'activité scientifique*

#### Coordination de projets scientifiques

- Projet ANR JCJC LabPSi (2018-) :
  - Aide allouée : 183k€
  - Sujet : Membranes de silicium poreux latérales comme solution générique de préparation d'échantillon et biodétection pour les laboratoires sur puce
- Projet ANR blanc International DEPSLIT (2014-2017) :
  - Aide allouée : 220k€ pour les partenaires Français
  - 4 partenaires (LAAS, INSERM, Academia Sinica, National Tsing Hua University)
  - Sujet : Développement d'un système nanofluidique biofonctionnalisé avec pré-concentrateur moléculaire pour la détection ultra-rapide et l'analyse cinétique
- Projet Pré-maturation Région Occitanie Fluitec (2018-) :
  - Aide allouée : 96k€
  - Sujet : Test compagnon nanofluidique sur sérum pour la cancérologie
- Projet Partenariat Hubert Curien Orchid (2011-2012) :
  - Aide allouée : 7k€
  - 2 partenaires (LAAS, Academia Sinica)
  - Sujet : Etude de l'assemblage de nano-objets dans des microgouttes par diélectrophorèse
- Projet exploratoire PEPS CNRS INSIS NanoBioD 2013 :
  - Aide allouée : 15k€
  - Sujet : Développement de matrices de nanomembranes résonantes en silicium pour la biodétection

#### Participation à des projets scientifiques

- Projet ANDRA Investissements d'avenir H2MEMS (2017-) :
  - Rôle : Responsable de tâches
  - Aide allouée : 535k€
  - 4 participants (IMS, LAAS-CNRS, GREMAN, CRHEA)
  - Sujet : Microsystèmes résonants pour la détection d'hydrogène dans les ouvrages de stockage de déchets radioactifs
- Projet ANR Astrid Biopulse (2017-) :
  - Rôle : Participant
  - Aide allouée : 298k€

- 3 participants (CEA-LETI, LAAS-CNRS, LI2D)
  - Sujet : Dispositif de détection biologique ultrasensible de pathogènes prélevés par air pulsé
8. Projet ANR Planarpore (2015-) :
    - Rôle : Responsable de tâches
    - Aide allouée : 363k€
    - 3 participants (CEA, INSERM, LAAS-CNRS)
    - Sujet : Plateforme analytique fluïdique multi-échelle sur réseaux de pores 2D
  9. Projet ANR MOLY (2015-) :
    - Rôle : Responsable de tâches
    - Aide allouée : 417k€
    - 4 partenaires (CEA, ISM, INSERM, LAAS-CNRS)
    - Sujet : Endoscopie moléculaire in vivo pour le diagnostic à distance
  10. Projet ANR MultiCells (2011-2014) :
    - Rôle : Responsable de tâches
    - Aide allouée : 527k€
    - 3 partenaires (CEA, INSERM, LAAS-CNRS)
    - Sujet : Imagerie parallélisée de sécrétions cellulaires
  11. Projet IDEX NanoBIOMAG (2016-) :
    - Rôle : Participant
    - Aide allouée : 108k€
    - 2 partenaires (LPCNO, LAAS)
    - Sujet : Développement de nano-aimants pour l'actionnement magnétique intégré de biocapteurs MEMS résonants
  12. Projet IDEX Emergence NEMSCOOP (2015-2016) :
    - Rôle : Participant
    - Aide allouée : 110k€
    - 2 partenaires (LCC, LAAS)
    - Sujet : Développement de nanosystèmes électromécaniques à partir de molécules bistables coopératives

## Encadrement de la recherche

### *Doctorants, post-doc*

1. Thèse de Pattamon Teerapanich (2011-2015) :
  - Financement : Ambassade de France en Thaïlande (MAE) / Taux d'encadrement : 100%
  - Sujet : Développement de nanocanaux biofonctionnalisés pour l'étude d'interactions biomoléculaires
  - Devenir : Ingénieure chez Serma Technologies
2. Thèse de Denis Dezest (2011-2015) :
  - Financement : DGA / Taux d'encadrement : 50%
  - Sujet : Utilisation de la lithographie douce pour la réalisation de biocapteurs NEMS
  - Devenir : Ingénieur CDI CEA-LETI
3. Thèse de Adhitya Bhaswara (2012-2015) :
  - Financement : Bourse ministérielle / Taux d'encadrement : 50%
  - Sujet : Développement de nanomembranes résonantes à l'aide de technologies de fabrication alternatives
  - Devenir : Ingénieur chez Dattabot (Indonésie)
4. Thèse de Yingning He (2012-2016) :
  - Financement : China Scholarship Council / Taux d'encadrement : 100%

- Sujet : Développement et intégration de membranes en silicium poreux dans des systèmes fluidiques  
Devenir : Post-doc à l'Université de Fudan (Chine)
5. Thèse de Rémi Malbec (2014-2017) :  
Financement : Bourse LAAS-Carnot / Taux d'encadrement : 30%  
Sujet : Séparation et concentration de molécules circulantes sous champ électrique dans des nanocanaux  
Devenir : Ingénieur chez Gene Diffusion
  6. Thèse de Jean Cacheux (2014-2018) :  
Financement : IDEX et INCA / Taux d'encadrement : 50%  
Sujet : Biocapteurs MEMS pour la détection de micro-ARN circulants  
Devenir : Post-doc à IMDEA Nanoscience (Madrid, Espagne)
  7. Thèse de Pierre Moritz (2016-) :  
Financement : IDEX / Taux d'encadrement : 30%  
Sujet : Développement de Nano-Aimants pour l'Actionnement Magnétique Intégré de Biocapteurs MEMS Résonants
  8. Thèse de Douglas Silva de Vasconcellos (2016-) :  
Financement : Bourse ministérielle / Taux d'encadrement : 100%  
Sujet : Membranes de silicium poreux latérales comme solution générique de préparation d'échantillon et biodétection pour les laboratoires sur puce
  9. Thèse de Roberto Riesco (2017-) :  
Financement : CNRS / Taux d'encadrement : 30%  
Sujet : Développement de matrices polymériques piézo-électriques par impression 3D pour la stimulation et l'étude de la régénération osseuse
  10. Post-doctorat de Ali Maziz (2018) :  
Financement : ANR / Taux d'encadrement : 100%  
Sujet : Développement d'une plateforme fluide multi-échelle sur réseaux de pores 2D  
Devenir : CR CNRS LAAS-CNRS
  11. Post-doctorat de Dolores Manrique Juarez (2018-) :  
Financement : Investissements d'avenir / Taux d'encadrement : 100%  
Sujet : Développement de MEMS résonants pour la détection d'hydrogène
  12. Post-doctorat de Kata Hajdu (2018-) :  
Financement : ANR / Taux d'encadrement : 100%  
Sujet : Membranes de silicium poreux latérales pour la biodétection

#### *CDDs, stagiaires*

13. Eirini Apazoglou, CDD ingénieur de recherche sur le projet Fluitec
14. Stage M2 de Frédéric Véron (2017) : Réalisation de matrices polymériques piézo-électriques par impression 3D pour la stimulation et l'étude de la régénération osseuse
15. Stage M2 de Pierre Moritz (2016) : Caractérisation et optimisation de résonateurs MEMS à actionnement magnétique et détection piézorésistive en milieu liquide
16. Stage M2 de Jean Cacheux (2014) : Nanocanaux pour la détection ultra-sensible de miARN circulants
17. Stage M2 de Fabrice Dubosc (2011) : Réalisation de membranes pour la fluide planaire
18. Stage M1 de Priscilia Gazulès (2015) : Dosage de micro-ARNs dans des dispositifs nanofluidiques
19. Stage M1 de Thibaut Rageade (2014) : Fonctionnalisation de pores 2D
20. Stage M1 de Mariem Nefzi (2012) : Modélisation d'un capteur biologique à nanofentes

## Management de la recherche

D'octobre 2012 à mai 2016, j'ai été **responsable adjoint de l'équipe NanoBioSystèmes** du LAAS-CNRS. Cette équipe comportait 35 membres, dont 11 chercheurs permanents. Mon rôle consistait à prendre en charge les affaires internes de l'équipe : accueil du personnel, organisation de séminaires scientifiques, gestion du site web, et interface avec les services techniques du laboratoire.

En mai 2016, j'ai créé l'**équipe MEMS que je dirige maintenant** et qui regroupe 18 personnes dont 7 chercheurs CNRS permanents. L'équipe MEMS travaille sur des stratégies qui visent à augmenter les performances, la fiabilité et l'intégrabilité des dispositifs MEMS mais aussi à permettre de nouvelles fonctionnalités et de nouveaux mécanismes de transduction. Dans ce but, les projets développés dans l'équipe se concentrent sur trois thèmes de recherche : l'exploration de nouveaux matériaux et procédés de fabrication alternatifs ; l'intégration et la mise en œuvre de nouvelles fonctions au niveau système ; et enfin le développement d'instrumentation dédiée et l'application des MEMS en particulier au domaine biomédical.

## Animation et administration de la recherche, responsabilités d'intérêt collectif

### *Animation dans la communauté*

- Membre du comité de programme technique (technical program committee) de la conférence internationale **Transducers/Euroensors 2019**
- Membre du comité scientifique local et du comité de programme technique (local scientific committee & technical program committee) de la conférence internationale **Euroensors 2017**
- Membre du comité de programme technique (technical program committee) de la conférence internationale **IEEE NEMS** (IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems) en 2016, 2017, 2018 et 2019
- Membre du comité de programme (program committee) des conférences internationales **MNE 2017** et **MNE 2018** (International Conference on Micro- and Nano- Engineering)
- Participation à l'organisation des LAAS Research and Technology Events, cycle de conférences de prestiges lancé au LAAS en Octobre 2013 (<https://laasrt-events.sciencesconf.org/>)

### *Administration/Orientation/évaluation de la recherche*

## Participation à des jurys de thèse en tant qu'examinateur

- Kun Jia, "Détection Optique de Biomolécules", 10/12/2013, Université de Technologie de Troyes
- Naiara Klein, "Nanofils Magnétiques et Semiconducteurs: Adressage, Caractérisations Electriques et Magnétiques et Applications", 9/07/2015, UPS-Centro Brasileiro de Pesquisas Fisicas
- Yii-Lih Lin, "Biosensors in Extended Nanofluidic Device", 29/6/2016, National Taiwan University

## Rapporteur pour des journaux internationaux

ACS Nano, Lab on a Chip, Biosensors & Bioelectronics, Analytical Chemistry, Sensors and Actuators B, Applied Physics Letters, Journal of Micromechanics and Microengineering, Electrophoresis, Nanoscale research letters, Microfluidics Nanofluidics,...

## Rapporteur d'appels à projets

- ANR : 1 projet SVSE-5 évalué en 2012, 1 projet SIMI-10 évalué en 2013
- Kentucky Science and Engineering Foundation: 1 projet évalué en 2012

- Erdyn consultants: 1 projet évalué en 2013 pour la Région Champagne Ardenne

## Enseignement et diffusion de la culture scientifique

### *Enseignements annuels (depuis 2015)*

#### **Cours magistraux**

- Technologies de fabrication des composants VLSI, INSA Toulouse - Niveau **Master1 - 10h/an**
- Introduction aux Nanobiotechnologies, Université de Toulouse - Niveau **Master2 - 10hx2/an**

#### **Travaux pratiques** (dispensés à l'Atelier Interuniversitaire de Micro-nano-Electronique du Sud-Ouest)

- Enseignement des techniques de microfabrication par réalisation de composants Photovoltaïques, INSA Toulouse - Niveau **Premier cycle - 14h/an**
- Enseignement des techniques de microfabrication par réalisation de composants MOS, INSA Toulouse - Niveau **Master1 - 14h/an**

### *Diffusion de la culture scientifique/vulgarisation*

- Participation à un reportage pour l'émission « Allo Docteurs - Cancer du pancréas : quels progrès ? », diffusé sur France 5 le 23 Janvier 2017
- Article « Cancer du pancréas : Des micropuces à l'assaut des tumeurs », paru dans le numéro 32 (Septembre-Octobre 2016) du magazine Science & Santé de l'INSERM
- Intervention sous forme de conférence et participation à une table ronde lors du congrès Biotrace (9<sup>ème</sup> édition), Les biocateurs: Défis technologiques pour le diagnostic de demain, Montpellier, France, 6-7 février 2014
- Directeur de la rédaction des documents Focus 2017 et 2018 qui présentent les faits marquants du laboratoire de l'année écoulée

## 8.2 Production scientifique

## Revues Internationales à Comité de Lecture :

1. R. Malbec, B. Chami, L. Aeschbach, G. A. Ruiz Buendia, M. Socol, P. Joseph, **T. Leïchlé**, E. Trofimenko, A. Bancaud, and V. Dion, "μLAS: Sizing of expanded trinucleotide repeats with femtomolar sensitivity in less than 5 minutes", *Scientific Reports*, 9:23, (2019). DOI:10.1038/s41598-018-36632-5
2. D. Dezest, **T. Leichle**, P. Teerapanich, F. Mathieu, J.-B. Tse Sum Bui, K. Haupt, and L. Nicu, "Multiplexed functionalization of nanoelectromechanical systems with photopatterned molecularly imprinted polymers", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, (2018). DOI: 10.1088/1361-6439/aaf84e
3. R. Malbec, J. Cacheux, P. Cordelier, **T. Leïchlé**, P. Joseph, and A. Bancaud, "Microfluidics for minute DNA sample analysis: open challenges for genetic testing of cell-free circulating DNA in blood plasma", *Micro and Nano Engineering*, 1, pp. 25-32 (2018).
4. P. Teerapanich, M. Pugnière, C. Henriquet, Y.-L. Lin, A. Naillon, P. Joseph, C.-F. Chou, and **T. Leïchlé**, "Nanofluidic fluorescence microscopy with integrated concentration gradient generation for one-shot parallel kinetic assays", *Sensors and Actuators B*, 274, pp. 338-342 (2018).
5. M. Mikolasek, M. Manrique-Juarez, H. Shepherd, K. Ridier, S. Rat, V. Shalabaeva, A.-C. Bas, I. Collings, F. Mathieu, J. Cacheux, **T. Leïchlé**, L. Nicu, W. Nicolazzi, L. Salmon, G. Molnár, and A. Bousseksou, "Complete Set of Elastic Moduli of a Spin-Crossover Solid: Spin-State Dependence and Mechanical Actuation", *Journal of the American Chemical Society*, 140(28), pp. 8970-8979 (2018).
6. M. Manrique-Juárez, F. Mathieu, A. Laborde, S. Rat, V. Shalabaeva, P. Demont, O. Thomas, L. Salmon, **T. Leichle**, L. Nicu, G. Molnár, and A. Bousseksou, "Micromachining-Compatible, Facile Fabrication of Polymer Nanocomposite Spin Crossover Actuators", *Advanced Functional Materials*, 28(29), 1801970 (2018).
7. J. Cacheux, M. Brut, A. Bancaud, P. Cordelier, and **T. Leïchlé**, "Spatial Analysis of Nanofluidic-Embedded Biosensors for Wash-Free Single-Nucleotide Difference Discrimination", *ACS Sensors*, 3 (3), pp 606-611 (2018).
8. H. Ranchon, J. Cacheux, B. Reig, O. Liot, P. Teerapanich, **T. Leïchlé**, P. Joseph, and A. Bancaud, "Accelerated Transport of Particles in Confined Channels with a High Roughness Amplitude", *Langmuir*, 34 (4), pp 1394-1399 (2018).
9. M. D. Manrique-Juarez, F. Mathieu, V. Shalabaeva, J. Cacheux, S. Rat, L. Nicu, **T. Leïchlé**, L. Salmon, G. Molnár, and A. Bousseksou, "A Bistable Microelectromechanical System Actuated by Spin Crossover Molecules", *Angewandte Chemie International Edition*, 56, pp. 8074-8078 (2017).
10. P. Teerapanich, M. Pugnière, C. Henriquet, Y.-L. Lin, C.-F. Chou, and **T. Leïchlé**, "Nanofluidic Fluorescence Microscopy (NFM) for real-time monitoring of protein binding kinetics and affinity studies", *Biosensors & Bioelectronics*, 88, pp. 25-33 (2017).
11. Y. He, and **T. Leïchlé**, "Fabrication of lateral porous silicon membranes for planar microfluidics by means of ion implantation", *Sensors and Actuators B*, 239, pp. 628-634 (2017).
12. M. D. Manrique-Juarez, S. Rat, F. Mathieu, D. Saya, I. Séguy, **T. Leïchlé**, L. Nicu, L. Salmon, G. Molnár, and A. Bousseksou, "Microelectromechanical systems integrating molecular spin crossover actuators", *Applied Physics Letters*, 109, 061903 (2016).
13. C. Lefter, S. Rat, J. Sánchez Costa, M. D. Manrique-Juárez, C. M. Quintero, L. Salmon, I. Séguy, **T. Leichle**, L. Nicu, P. Demont, A. Rotaru, G. Molnár, and A. Bousseksou, "Current switching coupled to molecular spin-states in large-area junctions", *Advanced Materials*, 28 (34), pp. 7508-7514 (2016).



14. Y.-L. Lin, Y.-J. Huang, P. Teerapanich, **T. Leïchlé**, and C.-F. Chou, "Multiplexed immunosensing and kinetics monitoring in nanofluidic devices with highly enhanced target capture efficiency", *Biomicrofluidics*, 10, 034114 (2016). BMF Editor's pick
15. H. Ranchon, R. Malbec, V. Picot, A. Boutonnet, P. Teerapanich, P. Joseph, **T. Leichle**, and A. Bancaud, "DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids", *Lab on a Chip*, 15 (7), pp. 1243-1253 (2016).
16. A. Bhaswara, H. Keum, F. Mathieu, B. Legrand, S. Kim, L. Nicu, and **T. Leïchlé**, "A simple fabrication process based on micro-masonry for the realization of nanoplate resonators with integrated actuation and detection schemes", *Frontiers in Mechanical Engineering*, 2, pp. 1-7 (2016).
17. **T. Leïchlé**, and C.-F. Chou, "Biofunctionalized nanoslits for wash-free and spatially resolved real-time sensing with full target capture", *Biomicrofluidics*, 9, 034103 (2015). BMF Editor's pick
18. **T. Leïchlé**, and D. Bourrier, "Integration of lateral porous silicon membranes into planar microfluidics", *Lab on a Chip*, 15, pp. 833-838 (2015).
19. M. T. Boudjiet, J. Bertrand, F. Mathieu, L. Nicu, L. Mazonq, **T. Leichle**, M. Heinrich, C. Pellet, and I. Dufour, "Geometry optimization of uncoated silicon microcantilever-based gas density sensors", *Sensors and Actuators B*, 208, pp. 600-607 (2015).
20. A. Bhaswara, H. Keum, S. Rhee, B. Legrand, F. Mathieu, S. Kim, L. Nicu, and **T. Leïchlé**, "Fabrication of nanoplate resonating structures via micro-masonry", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 24 (11), 115012 (2014). IOP Select - 2014 Highlights of Journal of Micromechanics and Microengineering
21. E. Descamps, N. Duroure, F. Deiss, **T. Leïchlé**, C. Adam, P. Mailley, A. Aït-Ikhlef, T. Livache, L. Nicu, and N. Sojic, "Functionalization of optical nanotip arrays with and electrochemical microcantilever for multiplexed DNA detection", *Lab on a Chip*, pp. 13, 2956-2962 (2013).
22. S. Salomon, **T. Leïchlé**, D. Dezest, F. Seichepine, S. Guillon, C. Thibault, C. Vieu, and L. Nicu, "Arrays of nanoelectromechanical biosensors functionalized by microcontact printing", *Nanotechnology*, 23 (49), 495501 (2012).
23. S. Guillon, S. Salomon, F. Seichepine, D. Dezest, F. Mathieu, A. Bouchier, L. Mazonq, C. Thibault, C. Vieu, **T. Leïchlé**, and L. Nicu, "Biological functionalization of massively parallel arrays of nanocantilevers using microcontact printing", *Sensors and Actuators B*, 161 (1), pp. 1135-1138 (2012).
24. **T. Leïchlé**, Y.-L. Lin, P.-C. Chiang, S.-M. Hu, K.-T. Liao, and C.-F. Chou, "Biosensor-compatible encapsulation for pre-functionalized nanofluidic channels using asymmetric plasma treatment", *Sensors and Actuators B*, 161 (1), pp. 805-810 (2012).
25. S. Salomon, **T. Leïchlé**, and L. Nicu, "A dielectrophoretic continuous flow sorter using integrated microelectrodes coupled to a channel constriction", *Electrophoresis*, 32, pp. 1508-1514 (2011).
26. V. Bardinal, B. Reig, T. Camps, C. Levallois, E. Daran, C. Vergnenegre, **T. Leïchlé**, G. Almuneau, and J.-B. Doucet, "Spotted custom lenses to tailor the divergence of vertical-cavity surface-emitting lasers", *IEEE Photonics Technology Letters*, 22 (21), pp. 1592-1594 (2010).
27. Y. Roupioz, N. Berthet-Durore, **T. Leïchlé**, J.-B. Pourciel, P. Mailley, S. Cortes, M.-B. Villiers, P. N. Marche, T. Livache, and L. Nicu, "Individual blood-cell capture and 2D organization on microarrays", *Small*, 5 (13), pp. 1493-1497 (2009).
28. L. Nicu, and **T. Leïchlé**, "Biosensors and tools for surface functionalization from the macro- to the nanoscale: the way forward", *Journal of Applied Physics*, 104, 111101 (2008).
29. **T. Leïchlé**, M. Lishchynska, F. Mathieu, J.-B. Pourciel, D. Saya, and L. Nicu, "A microcantilever-based picoliter droplet dispenser with integrated force sensors and electroassisted deposition means", *Journal of Microelectromechanical Systems*, 17 (5), pp. 1239-1253 (2008).
30. N. Berthet-Durore, **T. Leïchlé**, J.-B. Pourciel, C. Martin, J. Bausells, E. Lora-Tamayo, F. Perez-Murano, J.-M. François, E. Trévisiol, and L. Nicu, "Interaction of biomolecules sequentially deposited at the same location using a microcantilever-based spotter", *Biomedical Microdevices*, 10 (4), pp. 479-487 (2008).

31. D. Saya, **T. Leïchlé**, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, C. Bergaud, and L. Nicu, "Contact force control of piezoresistive cantilevers with in-plane nanotips for femtoliter droplet deposition", *Microelectronic Engineering*, 85 (5-6), pp. 1341-1345 (2008).
32. M. Lishchynska, **T. Leïchlé**, and L. Nicu, "Semi-empirical model for longitudinal piezoresistive sensitivity of microcantilevers", *Microelectronic Engineering*, 85 (5-6), pp. 1321-1325 (2008).
33. C. Martin, A. Llobera, **T. Leïchlé**, G. Villanueva, A. Voigt, V. Fakhfour, J.Y. Kim, N. Berthet, J. Bausells, G. Gruetzner, L. Nicu, J. Brugger, and F. Perez-Murano, "Novel methods to pattern polymers for microfluidics", *Microelectronic Engineering*, 85 (5-6), pp. 972-975 (2008).
34. M. Lishchynska, **T. Leïchlé**, and L. Nicu, "FEM assisted calibration of a MEMS-based dispensing system with integrated piezoresistive force sensors", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 18, 015010 (2008).
35. **T. Leïchlé**, L. Tanguy, and L. Nicu, "Electrowetting-assisted drop deposition for controlled spotting", *Applied Physics Letters*, 91, 224102 (2007).
36. E. Descamps, **T. Leïchlé**, B. Corso, S. Laurent, P. Mailley, L. Nicu, T. Livache, and C. Bergaud, "Fabrication of oligonucleotide chips by using parallel cantilever-based electrochemical deposition in picoliter volumes", *Advanced Materials*, 19 (14), pp. 1816-1821 (2007).
37. F. Vandeveld, **T. Leïchlé**, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, and K. Haupt, "Direct patterning of molecularly imprinted microdot arrays for sensors and biochips", *Langmuir*, 23 (12), pp. 6490-6493 (2007).
38. V. Bardinal, E. Daran, **T. Leïchlé**, C. Vergnenègre, C. Levallois, T. Camps, V. Conedera, J.-B. Doucet, F. Carcenac, H. Ottevaere, and H. Thienpont, "Fabrication and characterization of microlens arrays using a cantilever-based spotter", *Optics Express*, 15 (11), pp. 6900-6907 (2007).
39. L. Tanguy, **T. Leïchlé**, and L. Nicu, "Dynamic spreading of a liquid finger driven by electrowetting: theory and experimental validation", *Journal of Applied Physics*, 101, 044907 (2007).
40. D. Saya, **T. Leïchlé**, J.-B. Pourciel, C. Bergaud, and L. Nicu, "Collective fabrication of an in-plane silicon nanotip for parallel femtoliter droplet deposition", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17 (1), N1-N5 (2007).
41. A. Valsesia, **T. Leïchlé**, L.-M. Lacroix, L. Nicu, F. Bretagnol, P. Colpo, F. Rossi, and C. Bergaud, "Deposition of nanobead hexagonal crystals using silicon microcantilevers", *Small*, 2 (12), pp. 1444-1447 (2006).
42. **T. Leïchlé**, D. Saya, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, L. Nicu, and C. Bergaud, "Liquid loading of silicon-based cantilevers using electrowetting actuation for microspotting applications", *Sensors and Actuators A*, 132, pp. 590-596 (2006).
43. **T. Leïchlé**, L. Nicu, E. Descamps, B. Corso, P. Mailley, T. Livache, and C. Bergaud, "Copper electrodeposition localized in picoliter droplets using microcantilever arrays", *Applied Physics Letters*, 88, 254108 (2006).
44. **T. Leïchlé**, M. Manso Silvan, P. Belaubre, A. Valsesia, G. Ceccone, F. Rossi, D. Saya, J.-B. Pourciel, L. Nicu, and C. Bergaud, "Nanostructuring surfaces with conjugated silica colloids deposited using silicon-based microcantilevers", *Nanotechnology*, 16 (4), pp. 525-531 (2005).
45. **T. C. Leïchlé**, M. von Arx, S. Reiman, I. Zana, W. Ye, and M. G. Allen, "A low-power resonant micromachined compass", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14 (4), pp. 462-470 (2004).

#### Conférences Internationales :

1. Y. He, D. Silva de Vasconcellos, V. Bardinal, D. Bourrier, E. Imbernon, L. Salvagnac, A. Laborde, X. Dollat, and **T. Leïchlé**, "Lateral porous silicon interferometric transducer for sensing applications", *IEEE Sensors 2018, New Delhi, India, October 28-31, 2018*.
2. P. Teerapanich, M. Pugnère, C. Henriquet, P. Joseph, C.-F. Chou, and **T. Leïchlé**, "Nanofluidic fluorescence microscopy with integrated concentration diluter for parallel kinetic assay", *XIV*

- Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (Europtrode 2018), Naples, Italy, March 25-28, 2018, P72-165.*
3. Y. He, D. Silva de Vasconcellos, V. Bardinal, D. Bourrier, E. Imbernon, X. Dollat, and **T. Leichle**, "Optical interferometry on lateral porous silicon", *Porous Semiconductors-Science and Technology 2018, La Grande Motte, France, March 11-16, 2018, 08-P1-04/138.*
  4. J. Cacheux, P. Cordelier, and **T. Leichle**, "Towards circulating microRNA detection using fluorescence-based nanofluidic platform for the early diagnosis of pancreatic cancer", *49<sup>st</sup> Meeting of European Pancreatic Club, Budapest, Hungary, June 28 - July 01, 2017, p. S15.*
  5. J. Cacheux, M. Brut, A. Bancaud, P. Cordelier, and **T. Leichlé**, "Rapid discrimination of single-nucleotide differences through spatial analysis of a nanofluidic-embedded biosensor", *Proceeding of the 21<sup>st</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS), Savannah, USA, October 22-26, 2017, pp. 541-542.*
  6. M. Manrique-Juarez, S. Rat, L. Mazonq, F. Mathieu, I. Séguy, **T. Leichlé**, L. Nicu, L. Salmon, G. Molnár, and A. Bousseksou, "Spin crossover materials for MEMS actuation: Film integration and characterization" *Proceedings of the 19<sup>th</sup> International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2017), Kaohsiung, Taiwan, June 18-22, 2017, pp. 1300-1303.*
  7. D. Saya, D. Dezest, **T. Leichlé**, F. Mathieu, L. Nicu, O. Thomas, A. Welsh, and S. Trolier-McKinstry, "Fabrication and characterization of mechanical resonators integrating microcontact printed PZT films", *Joint IEEE International Symposium on the Applications of Ferroelectric (ISAF)/International Workshop on Acoustic Transduction Materials and Devices (IWATMD)/Piezoresponse Force Microscopy (PFM), Atlanta, USA, May 7-11, 2017, pp. 89-92.*
  8. Y. He, D. Bourrier, E. Imbernon, and **T. Leichlé**, "Lateral porous silicon membranes with size and charge selectivity", *Proceedings of the 12<sup>th</sup> IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2017), Los Angeles, USA, April 9-12, 2017, 4p.*
  9. J. Cacheux, A. Bancaud, P. Cordelier, and **T. Leichlé**, "Fast single-nucleotide polymorphism (SNP) discrimination using a fluorescence-based nanofluidic platform", *Proceedings of the 20<sup>th</sup> Annual European Conference on Micro & Nanoscale Technologies for the Life Science (NanoBioTech Montreux), Montreux, Switzerland, November 7-9, 2016, pp. 27-28.*
  10. R. Malbec, P. Joseph, **T. Leichlé**, E. Trofimenko, L. Aeschbach, V. Dion, and A. Bancaud, "Enrichment, separation and characterization of CAG repeats for Huntington's disease diagnosis", *Proceedings of the 20<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS), Dublin, Ireland, October 9-13, 2016, 2p., 16313.*
  11. A. Bhaswaraa, H. Keum, F. Mathieu, B. Legrand, S. Kim, L. Nicu, and **T. Leichle**, "Micro-masonry for the simple fabrication of nanoplate resonators with integrated electrostatic transduction", *Proceedings of the 42<sup>nd</sup> International Conference on Micro- and Nano- Engineering (MNE2016), Vienna, Austria, September 19-23, 2016, 1p., N° 15401.a017.*
  12. P. Teerapanich, M. Pugnère, Y.L. Lin, C.F. Chou, and **T. Leichlé**, "A real-time affinity biosensor based on nanofluidic fluorescence microscopy for the determination of protein binding kinetics", *Biosensors 2016, Gothenburg, Sweden, May 25-27, 2016.*
  13. Y. He, and **T. Leichlé**, "Lateral porous silicon membranes integrated to planar microfluidics for filtering applications", *Proceedings of the 10<sup>th</sup> Conference on Porous Semiconductors - Science and Technology (PSST 2016), Tarragona, Spain, March 6-11, 2016, 08-O-02, pp. 316-317.*
  14. C. Fuinel, K. Daffe, A. Laborde, O. Thomas, L. Mazonq, L. Nicu, **T. Leichlé**, and B. Legrand, "High-K thin films as dielectric transducers for flexural M/NEMS resonators", *Proceedings of the 29<sup>th</sup> IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2016), Shanghai, China, January 24-28, 2016, 4p., N° 16029.*
  15. Y. He, D. Bourrier, E. Imbernon, A. Bhaswara, X. Dollat, F. Cristiano, and **T. Leichlé**, "Lateral porous silicon membranes with tunable pore size for on-chip separation", *Proceedings of the 29<sup>th</sup> IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2016), Shanghai, China, January 24-28, 2016, 4p., N° 497.*

16. Y. He, D. Bourrier, and **T. Leïchlé**, "Lateral porous silicon membranes fabricated within 2D microchannels through local ion implantation", *Proceedings of the 41<sup>st</sup> International Conference on Micro- and Nano- Engineering (MNE2015), The Hague, The Netherlands, September 21-24, 2015*, 1p., N° 15401.
17. A. Bhaswara, D. Dezest, L. Nicu, **T. Leichle**, and B. Legrand, "Determination of the effective mass and stiffness of a micro resonator from a single optical characterization", *Proceedings of the 18<sup>th</sup> International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2015), Anchorage (Alaska), USA, June 21-25, 2015*, pp. 2200-2203.
18. D. Bourrier, Y. He, and **T. Leichle**, "Porous silicon membranes integrated into planar microfluidics for on-chip sample filtration", *Biosensors 2014, Melbourne, Australia, May 27-30, 2014*.
19. P. Teerapanich, M. Pugniere, Y. L. Lin, C. F. Chou, and **T. Leichle**, "Determination of protein binding kinetics using a simple slit-like nanofluidic biosensor", *Biosensors 2014, Melbourne, Australia, May 27-30, 2014*.
20. M.-T. Boudjiet, J. Bertrand, L. Mazonq, **T. Leïchlé**, L. Nicu, C. Pellet, and I. Dufour, "Sensitivity optimization of silicon microcantilever-based density sensor for hydrogen detection", *11<sup>th</sup> Annual International Workshop on Nanomechanical Sensing, Madrid, Spain, April 30 - May 2, 2014*.
21. P. Teerapanich, M. Pugniere, Y.L. Lin, C.F. Chou, and **T. Leichle**, "Biofunctionalized nanoslits for fluorescence monitoring of protein binding kinetics", *XII Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (Europtrode 2014), Athens, Greece, April 13-16, 2014*.
22. H. Keum, Y. Zhang, D. Dezest, Z. Yang, F. Mathieu, L. Nicu, **T. Leïchlé**, and S. Kim, "Micro-Masonry for small batch processing of suspended MEMS structures", *Workshop on Enabling Nanofabrication for Rapid Innovation, Napa (California), USA, August 18-21, 2013*.
23. S. Salomon, **T. Leïchlé**, D. Dezest, F. Seichepine, and L. Nicu, "A Modified Microcontact Printing Method for the Biofunctionalization of Nanocantilever Arrays", *7<sup>th</sup> International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT 2013), Singapore, June 30 – July 5, 2013*.
24. L. Laplatine, L. Leroy, R. Calemczuk, Y. Roupioz, **T. Leïchlé**, and T. Livache, "High resolution prism-coupled-SRPi for single cell studies", *Nanobio Europe 2013, Toulouse, France, June 10–12, 2013*, p. 108.
25. F. Dubosc, D. Bourrier, and **T. Leïchlé**, "Fabrication of lateral porous silicon membranes for planar microfluidic devices", *Eurosensors XXVI, Krakow, Poland, September 9-12, 2012*, published in *Procedia Engineering*, 47, pp. 801-804.
26. L. Nicu, T. Alava, **T. Leïchlé**, D. Saya, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, C. Soyer, D. Remiens, C. Ayela, and K. Haupt, "Integrative technology-based approach of microelectromechanical systems (MEMS) for biosensing applications", *34<sup>th</sup> Annual International IEEE EMBC Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, San Diego, USA, August 28 - September 1, 2012*.
27. S. Guillon, S. Salomon, F. Seichepine, D. Dezest, F. Mathieu, A. Bouchier, L. Mazonq, C. Thibault, C. Vieu, **T. Leïchlé**, and L. Nicu, "Single-Step, high-throughput biofunctionalization of nanoelectromechanical systems by means of nanocontact printing method", *Proceedings of the 25<sup>th</sup> IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2012), Paris, France, January 29 - February 2, 2012*, pp. 1348-1351.
28. Y.-L. Lin, **T. Leïchlé**, and C.-F. Chou, "Nanofluidics-based antibody microarray for application of single cell immunoassay", *Annual Meeting of the American-Society-for-Cell-Biology (ASCB), Denver, USA, December 3-7, 2011*, abstract published in *Molecular Biology of the Cell*, vol. 2, 1935.
29. **T. Leïchlé**, and C.-F. Chou, "Nanoslit biosensor with single-pixel resolved kinetics capability: finite element method and experimental results", *Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers'11), Beijing, China, June 5-9, 2011*, pp. 2263-2266.
30. **T. Leïchlé**, and C.-F. Chou, "Real-time sensing with single-pixel resolved kinetics using room-temperature bonded biofunctional nanoslits", *Proceedings of the 6<sup>th</sup> IEEE International*

- Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2011), Kaohsiung, Taiwan, February 20-23, 2011*, pp. 729-732.
31. S. Salomon, **T. Leïchlé**, R. Fulcrand, D. Bourrier, A Boukabache, A.-M. Gué, and L. Nicu, "A simple fabrication process for an efficient constriction-based dielectrophoretic continuous flow sorter", *Proceedings of the 6<sup>th</sup> IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2011), Kaohsiung, Taiwan, February 20-23, 2011*, pp. 84-87.
  32. S. Salomon, **T. Leïchlé**, R. Fulcrand, D. Bourrier, A Boukabache, A.-M. Gué, and L. Nicu, "A simple fabrication process for an efficient constriction-based dielectrophoretic continuous flow sorter", *The Second Conference on Advances in Microfluidics and Nanofluidics & Asia-Pacific International Symposium on Lab on Chip (AMN&APLOC 2011), Singapore, January 5-7, 2011*.
  33. **T. Leïchlé**, K.-T. Liao, and C.-F. Chou, "Shortening the diffusion length: Real-time sensing with single-pixel resolved kinetics using room-temperature bonded biofunctional nanoslits", *Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS), Groningen, The Netherlands, October 3-7, 2010*, pp. 494-496.
  34. L. Nicu, T. Alava, **T. Leïchlé**, D. Saya, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, C. Soyer, D. Remiens, C. Ayela, and K. Haupt, "Integrative technology-based approach of MEMS for biological applications", *IEEE International Solid-State Circuits Conference, San Francisco, USA, February 7-11, 2010*.
  35. C. Ayela, H. Lalo, S. Guillon, **T. Leïchlé**, F. Vandeveldel, A. Valvanuz Linares, L. Nicu and K. Haupt, "Micro and nanopatterning tools to produce biomimetic chips based on molecularly imprinted polymers", *MRS Fall Meeting, Boston, USA, November 30 – December 4, 2009*.
  36. K.-T. Liao, **T. Leïchlé**, C.-F. Chou, and N. Swami, "Ultrafast protein preconcentration by nanoscale molecular traps", *Proceedings of the Conference on Advances in Microfluidics and Nanofluidics, Hong Kong, China, January 5-7, 2009*, pp.132-134.
  37. **T. Leïchlé**, F. Mathieu, J.-B. Pourciel, and L. Nicu, "An electroassisted picoliter droplet dispenser", *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Workshop on Tip-based Nanofabrication (TBN 2008), Taipei, Taiwan, October 19-21, 2008*, 2p., B-03.
  38. Y. Roupioz, **T. Leïchlé**, E. Descamps, P. Mailley, N. Duroure, C. Bergaud, T. Livache, and L. Nicu, "Micro-electrochemical functionalization of biochips with pyrroles-modified molecular probes: a versatile route toward densely grafted microarrays", *Biosensors 2008, Shanghai, China, May 14-16, 2008*.
  39. C. Levallois, V. Bardinal, C. Vergnenègre, **T. Leïchlé**, T. Camps, E. Daran, and J.-B. Doucet, "VCSEL collimation using self-aligned integrated polymer microlenses", *Proceedings of SPIE, Photonic Europe, Strasbourg, France, April 7-10, 2008*, vol. 6992, 69920W.
  40. M. Lishchynska, **T. Leïchlé**, and L. Nicu, "Piezoresistive sensitivity of MEMS-based liquid dispensing system with built-in force sensors", *Proceedings of the 33<sup>rd</sup> International Conference on Micro- and Nano- Engineering (MNE'07), Copenhagen, Denmark, September 23-26, 2007*, 2p., P-BIO-1.
  41. C. Martin, A. Llobera, **T. Leïchlé**, G. Villanueva, A. Voigt, V. Fakhfour, J. Yeon, N. Berthet, J. Bausells, G. Gruetzner, L. Nicu, J. Brugger, and F. Perez-Murano, "Novel methods to pattern polymers for microfluidics", *Proceedings of the 33<sup>rd</sup> International Conference on Micro- and Nano- Engineering (MNE'07), Copenhagen, Denmark, September 23-26, 2007*, 2p., 3A-2.
  42. D. Saya, **T. Leïchlé**, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, C. Bergaud, and L. Nicu, "Contact force control of piezoresistive cantilevers with in-plane nanotips for femtoliter droplet deposition", *Proceedings of the 33<sup>rd</sup> International Conference on Micro- and Nano- Engineering (MNE'07), Copenhagen, Denmark, September 23-26, 2007*, 2p., 4A-3.
  43. **T. Leïchlé**, F. Mathieu, J.-B. Pourciel, D. Saya, C. Bergaud, and L. Nicu, "Bioplume: A MEMS-based femtoliter dispenser with electrospotting means for patterning surfaces at the micro- and the nanometer scales", *MRS 2007, Spring Meeting, San Francisco, USA, April 9-14, 2007*.
  44. E. Descamps, P. Mailley, T. Livache, K. Nguyen, A. Filoramo, L. Goux-Capes, M. Goffman, **T. Leïchlé**, L. Nicu, and C. Bergaud, "Pyrrole nano-electrochemistry: from fabrication of ODN chip to

- the generation of ODN scaffolds", *XIX<sup>th</sup> International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Toulouse, France, April 1-4, 2007*.
45. N. Berthet, **T. Leïchlé**, E. Trévisiol, J.-B. Pourciel, D. Saya, C. Bergaud, L. Nicu, and J.-M. François, "'Spot-in-spot" hybridization of oligonucleotides deposited on a glass slide by a microcantilever-based device", *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS), Tokyo, Japan, November 5-9, 2006*, pp.1217-1219.
  46. **T. Leïchlé**, E. Descamps, B. Corso, S. Laurent, P. Mailley, T. Livache, J.-B. Pourciel, C. Bergaud, and L. Nicu, "MEMS-based picoliter electrochemical cell array for the fabrication of oligonucleotide chips", *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS), Tokyo, Japan, November 5-9, 2006*, pp. 774-776.
  47. D. Saya, **T. Leïchlé**, J.-B. Pourciel, C. Bergaud, and L. Nicu, "Collective fabrication of in-plane silicon nanotip for parallel femtoliter droplet deposition", *Proceedings of the 32<sup>nd</sup> International Conference on Micro- and Nano- Engineering (MNE'06), Barcelona, Spain, September 17-20, 2006*, pp. 47-48.
  48. P. Mailley, E. Descamps, E. Fortin, S. Szunerits, T. Livache, **T. Leïchlé**, L. Nicu, and C. Bergaud, "Substrate microstructuration by biologically fonctionnalised conducting polymers using localised electrochemical methods", *4<sup>th</sup> International Workshop on Scanning Electrochemical Microscopy (SECM), Falcade, Italy, September 3-6, 2006*.
  49. E. Descamps, **T. Leïchlé**, L. Nicu, C. Bergaud, T. Livache, and P. Mailley, "Microarrays' fabrication using electrochemical femtocell", *11<sup>th</sup> International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2006), Bordeaux, France, June 10-15, 2006*.
  50. C. Ayela, **T. Leïchlé**, C. Bergaud, E. Cattan, C. Soyer, M. Pugnieri, and L. Nicu, "High quality factors of silicon membranes with piezoelectric actuation and detection scheme for biosensing purpose in liquid media", *Proceedings of the IEEE International Frequency Control Symposium and Exposition, Miami, USA, June 5-7, 2006*, vol.1 and 2, pp. 123-128.
  51. L. Tanguy, **T. Leïchlé**, and L. Nicu, "Theoretical considerations for continuous electrowetting in U-shaped channels", *5<sup>th</sup> International Meeting on Electrowetting, Rochester, USA, May 31 – June 2, 2006*.
  52. C. Bergaud, **T. Leïchlé**, D. Saya, and L. Nicu, "Cantilever-based patterning methods: application to surface patterning from the micro to nanometer scale", *E-MRS/IUMRS ICEM, Spring Meeting, Materials Research Society, Symposium G "Functional Materials for Micro and Nanobiosystems", Nice, France, May 29 – June 2, 2006*.
  53. V. Bardinal, E. Daran, C. Vergnenègre, **T. Leïchlé**, Y. Segui, T. Camps, J.-B. Pourciel, V. Conedera, L. Gavin-Djidina, and M. Guirardel, "Design and fabrication of polymer microlenses arrays for VCSELs using a cantilever-based microsystem", *Proceedings of SPIE, Photonic Europe, Strasbourg, France, April 3-6, 2006*, vol. 6185, 618510.
  54. **T. Leïchlé**, D. Saya, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, C. Bergaud, and L. Nicu, "A closed-loop MEMS-based spotter integrating position sensors with nanometric precision for the control of droplet uniformity", *Proceedings of the 1<sup>st</sup> IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2006), Zhuhai, China, January 18-21, 2006*, pp. 730-733.
  55. P. Belaubre, J.-B. Pourciel, D. Saya, **T. Leïchlé**, F. Mathieu, L. Nicu, and C. Bergaud, "First step towards a fully automated trim control for liquid deposition device at the microscale using piezoresistive cantilevers row", *Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers'05), Seoul, Korea, June 5-9, 2005*, vol. 1, pp. 648-651.
  56. **T. Leïchlé**, D. Saya, P. Belaubre, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, J.-P. Laur, L. Nicu, and C. Bergaud, "Liquid loading of silicon-based cantilevers using electrowetting actuation for microspotting applications", *Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers'05), Seoul, Korea, June 5-9, 2005*, vol. 1, pp. 135-138.

57. **T. C. Leïchlé**, W. Ye, and M. G. Allen, "A sub- $\mu$ W micromachined magnetic compass", Proceedings of the 16<sup>th</sup> IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS'03), Kyoto, Japan, January 19-23, 2003, pp. 514-517.
58. **T. C. Leïchlé**, M. von Arx, and M. G. Allen, "A micromachined resonant magnetic field sensor", Proceedings of the 14<sup>th</sup> IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS'01), Interlaken, Switzerland, January 21-25, 2001, pp. 274-277.
59. **T. C. Leïchlé**, M. von Arx, and M. G. Allen, "A micromachined resonant magnetic field sensor", Late News Poster Session, Supplemental Digest of the Solid-State Sensor and Actuator Workshop, Hilton Head Island (South Carolina), USA, June 4-8, 2000, pp. 19-20.

#### Conférences Invités :

1. **T. Leïchlé**, "Real-time monitoring of protein binding kinetics using a fluorescence-based nanofluidic immunosensor", Synergy Microfluidics & Biology SYMiBio Workshop, Paris, France, March 24-25, 2016.
2. L. Nicu, and **T. Leïchlé**, "Nanoelectromechanical systems for biology: where to go from now?", Proceedings of the 2012 International Semiconductor Conference, Sinaia, Romania, October 15-17, 2012, vol. 1, pp. 51-56.
3. **T. Leïchlé**, "NanoElectroMechanical Systems for Biosensing Applications", International Conference and Exhibition on Integration Issues of Miniaturized Systems 2012, Zurich, Switzerland, March 21-22, 2012.

#### Séminaires Invités :

1. P. Cordelier, and **T. Leïchlé**, "Circulating microRNA detection using fluorescence-based nanofluidic platform for the management of pancreatic cancer", Microscale Affairs Conference Series, IPGG, Paris, France, December 12, 2018.
2. **T. Leichle**, "Challenges inherent to the miniaturization of resonant microelectromechanical biosensors", Congrès Biotrace, 9<sup>ème</sup> édition, Les biocateurs: Défis technologiques pour le diagnostic de demain, Montpellier, France, 6-7 February, 2014.
3. **T. Leïchlé**, and L. Nicu, "Electromechanical Biosensors: from MEMS to NEMS", LIMMS Workshop, Beyond Frontiers of Nanoscience and Biosystems, Paris, France, May 16-17, 2013.

#### Livre et Chapitre de livre :

1. **T. Leïchlé**, "Porous Silicon and Microfluidics", Handbook of Porous Silicon, Springer International Publishing, ISBN: 978-3-319-04508-5 (2016).
2. L. Nicu, and **T. Leïchlé**, "Micro- and Nanoelectromechanical Biosensors", Wiley-ISTE, ISBN: 978-1-84821-479-8 (2014).

#### Brevets :

1. P. Moritz, L.-M. Lacroix, G. Viau, and **T. Leichle**, "Procédé de fabrication d'un aimant permanent", Patent application n°FR1872920 (2018)
2. C.F. Chou, **T. Leichle**, Y.L. Lin, P. Teerapanich, "Sensing device, and sensing system and sensing method using the same", US Patent # 20150346104, EU Patent Grant EP2950096B1, China Patent Grant CN105181658B (2018)

3. H. Ranchon, A. Bancaud, P. Teerapanich, and **T. Leichle**, "Concentrateur de biomolécules à objets en solution", *CNRS patent, reference number: FR1457544* (2015). "Method and device for concentrating molecules or objects dissolved in solution", *US Patent App. 15500508, EP App. 319495A1, JP App. 2017529522A, WO App. 2016016470A9* (2017).
4. Mark G. Allen, and **T. C. Leichlé**, "System and method for providing a resonant micro-compass", *US Patent # 6,429,652* (2002).





### 8.3 Publications représentatives

1. P. Teerapanich, M. Pugnière, C. Henriquet, Y.-L. Lin, C.-F. Chou, and T. Leïchlé, "Nanofluidic Fluorescence Microscopy (NFM) for real-time monitoring of protein binding kinetics and affinity studies", *Biosensors & Bioelectronics*, 88, pp. 25-33 (2017).
2. P. Teerapanich, M. Pugnière, C. Henriquet, Y.-L. Lin, A. Naillon, P. Joseph, C.-F. Chou, and T. Leïchlé, "Nanofluidic fluorescence microscopy with integrated concentration gradient generation for one-shot parallel kinetic assays", *Sensors and Actuators B*, 274, pp. 338-342 (2018).
3. J. Cacheux, M. Brut, A. Bancaud, P. Cordelier, and T. Leïchlé, "Spatial Analysis of Nanofluidic-Embedded Biosensors for Wash-Free Single-Nucleotide Difference Discrimination", *ACS Sensors*, 3 (3), pp 606-611 (2018).
4. T. Leïchlé, and D. Bourrier, "Integration of lateral porous silicon membranes into planar microfluidics", *Lab on a Chip*, 15, pp. 833-838 (2015).
5. Y. He, and T. Leïchlé, "Fabrication of lateral porous silicon membranes for planar microfluidics by means of ion implantation", *Sensors and Actuators B*, 239, pp. 628-634 (2017).
6. A. Bhaswara, H. Keum, S. Rhee, B. Legrand, F. Mathieu, S. Kim, L. Nicu, and T. Leïchlé, "Fabrication of nanoplate resonating structures via micro-masonry", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 24 (11), 115012 (2014). IOP Select - 2014 Highlights of Journal of Micromechanics and Microengineering
7. A. Bhaswara, H. Keum, F. Mathieu, B. Legrand, S. Kim, L. Nicu, and T. Leïchlé, "A simple fabrication process based on micro-masonry for the realization of nanoplate resonators with integrated actuation and detection schemes", *Frontiers in Mechanical Engineering*, 2, pp. 1-7 (2016).
8. S. Salomon, T. Leïchlé, D. Dezest, F. Seichepine, S. Guillon, C. Thibault, C. Vieu, and L. Nicu, "Arrays of nanoelectromechanical biosensors functionalized by microcontact printing", *Nanotechnology*, 23 (49), 495501 (2012).
9. D. Dezest, T. Leichle, P. Teerapanich, F. Mathieu, J.-B. Tse Sum Bui, K. Haupt, and L. Nicu, "Multiplexed functionalization of nanoelectromechanical systems with photopatterned molecularly imprinted polymers", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, (2018). DOI: 10.1088/1361-6439/aaf84e





Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)

## Nanofluidic Fluorescence Microscopy (NFM) for real-time monitoring of protein binding kinetics and affinity studies



Pattamon Teerapanich<sup>a,b</sup>, Martine Pugnère<sup>c</sup>, Corinne Henriquet<sup>c</sup>, Yii-Lih Lin<sup>d</sup>, Chia-Fu Chou<sup>d</sup>, Thierry Leichlé<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, F-31077 Toulouse, France

<sup>b</sup> Université de Toulouse, F-31077 Toulouse, France

<sup>c</sup> IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM, U1194, Université Montpellier, ICM, Institut Régional du Cancer, Montpellier, F-34090 France

<sup>d</sup> Institute of Physics, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 March 2016

Received in revised form

31 May 2016

Accepted 13 June 2016

Available online 30 July 2016

#### Keywords:

Nanofluidics

Biosensors

Fluorescence microscopy

Interaction kinetics

### ABSTRACT

Kinetic monitoring of protein interactions offers insights to their corresponding functions in cellular processes. Surface plasmon resonance (SPR) is the current standard tool used for label-free kinetic assays; however, costly and sophisticated setups are required, decreasing its accessibility to research laboratories. We present a cost-effective nanofluidic-based immunosensor for low-noise real-time kinetic measurement of fluorescent-labeled protein binding. With the combination of fluorescence microscopy and reversed buffer flow operation, association and dissociation kinetics can be accessed in one single experiment without extra buffer loading step, which results in a simplified operation and reduced time of analysis compared to typical microfluidic immunoassays. Kinetic constants of two representative protein-ligand binding pairs (streptavidin/biotin; IgG/anti-IgG) were quantified. The good agreement of extracted rate constants with literature values and analogous SPR measurements indicates that this approach is applicable to study protein interactions of medium- and high-affinities with a limit of detection down to 1 pM, regardless of the analyte size.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Analysis of protein interactions provides a fundamental understanding of their physiological functions at the cellular scale in virtually all chemical and biological processes. These studies offer essential information for the development of improved diagnostic tools and new therapeutic treatments against diseases (Ideker and Sharan, 2008). Over the last few decades, affinity based biosensors, exploiting the interaction between a free target analyte and an immobilized receptor on a solid surface, have been a key solution in characterizing biospecific interactions in vitro. This method reveals the affinity and kinetic information of various binding events particularly protein-ligands and nucleic acids (Malmqvist and Karlsson, 1997; Nguyen et al., 2007). Affinity biosensor implemented on solid-state device that couple immunochemical reactions to a transducer is termed as immunosensor. Immunosensors can be divided into different categories depending on the detection principles, for example, optical, electrochemical,

microgravimetric and thermometric (Luppa et al., 2001) schemes. Optical based immunosensors are the most widely used in clinical, food and environmental applications due to their performance characteristics.

Among optical based immunosensors, surface plasmon resonance (SPR) is currently the standard commercialized technology routinely used in the field of pharmaceutical and life sciences, offering a real-time detection of broad range of biomolecular interactions without labeling requirement (Myszka and Rich, 2000). Practically, measuring the interactions of low-molecular weight analytes such as hormones, antibiotics, and chemical drug-fragments with SPR instrument is a key limitation in terms of sensitivity. Furthermore, if the reaction is too fast, with a high association rate, the obtained kinetic information is not reliable due to the strong effect of mass transfer (Nguyen et al., 2007). More importantly, high-cost dedicated sensor surfaces and integration of optical components are required, which in turn increase the overall assay costs and complicate the instrument setup.

Traditional fluorescence stopped-flow has been a method of choice for most biologists to study millisecond kinetic reactions of various biomolecular interactions in solution, for example, protein-DNA interactions (Esadze and Iwahara, 2014), ligand binding

\* Corresponding author at: LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, F-31077 Toulouse, France.

E-mail address: [tleichle@laas.fr](mailto:tleichle@laas.fr) (T. Leichlé).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.033>

0956-5663/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Olsen et al., 1992) and enzyme reactions (Zhang et al., 2004). Total-internal-reflection fluorescence (TIRF) is a powerful analytical tool in visualizing real-time reversible interactions of fluorescent species on the surface with single-fluorophore sensitivity and minimized background fluorescence (Lakowicz, 2006; Schneckenburger, 2005). TIRF has been employed in combination with fluorescence polarization (FP) and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) to determine affinities and reveal binding kinetics of fluorescently labeled IgG with mouse receptor FcγRII and human estrogen receptors with their specific ligands (Kwok and Cheung, 2010; Lieto et al., 2003), with nanoscale spatial resolution. Other fluorescence based techniques enabling real-time measurement of biomolecular recognition events include fluorescence after photo bleaching (FRAP) (Lele and Ingber, 2006) and Förster resonance energy transfer (FRET) (Li et al., 2007). On top of everything, Episentec has newly developed an add-on tool, the label-enhanced SPR technology, breaking the performance barriers of conventional SPR. This new technology aims at enhancing sensitivity and selectivity together with capability to analyze small molecules and fast kinetic reactions by using developed Episentec™ dye labels (Granqvist et al., 2013). These aforementioned examples have clearly proved that label-based techniques are still up-to-date and are readily applicable for investigating binding kinetics of ligand-receptor interactions in complement with label-free techniques to bring on biologically meaningful information.

In parallel, we have lately witnessed remarkable progress of novel micro- and nano-fluidic devices, allowing single molecule analysis (Dittrich and Manz, 2005; Yeh et al., 2012), cell sorting (Mazutis et al., 2013; Wang et al., 2005), DNA separation (Ashton et al., 2003; Fu et al., 2007), and fast multiplexed protein detection (Didar et al., 2012; Mitsakakis and Gizeli, 2011). The combination of nanofluidics with advanced biosensor technology paves new roads for point-of-care clinical diagnostics particularly owing to their capability to integrate such devices into lab-on-a-chip as the dimensions scale down. Nanofluidic-based biosensors predominantly reduce the consumption of costly biological reagents with enhanced speed of analysis thanks to the shortened diffusion distance between immobilized probe molecules and flowing analytes in highly confined channels. First attempts to use bio-functionalized nanochannel for detection of streptavidin molecule using label-free impedance measurement in liquid induced flow has been reported (Karnik et al., 2005; Schoch et al., 2007). Though enhanced surface binding reactions have been demonstrated using pressure-driven flow over diffusion-limited reactions, long response time of 1–2 h were required due to the lack of localized selective surface modifications (Schoch et al., 2007).

To address the issue of localized and selective surface modifications in nanochannels, we have developed a strategy using pre-functionalized nanofluidic channels with biocompatible encapsulation technique for DNA and protein detection (Leichlé et al., 2012). We have shown that by confining the reaction volume into sub- $\mu\text{m}$  thick channels, fluorescence conjugated biomolecules can be detected in real-time without cumbersome washing steps using a conventional fluorescence microscope (Leichlé and Chou, 2015). This unique feature is specific to nanometer scale channels because the sample volume reduction during observation leads to negligible levels of fluorescence background, thus allowing us to directly probe the sensing surface without the need of using complicated and expensive setups, such as SPR, TIRFM, or quartz crystal microbalance (QCM). Moreover, the drastic reduction of diffusion length permits to operate in a reaction-limited regime with optimized target capture efficiency. Hence, all target molecules injected in the device are analyzed and because the typical sample volume is in the pL range, i.e. 4 orders of magnitude smaller than the sample volume of conventional microfluidic

biosensor formats (Darain et al., 2009), this platform is especially suitable to the analysis of ultra-small samples, e.g. the content of few cells.

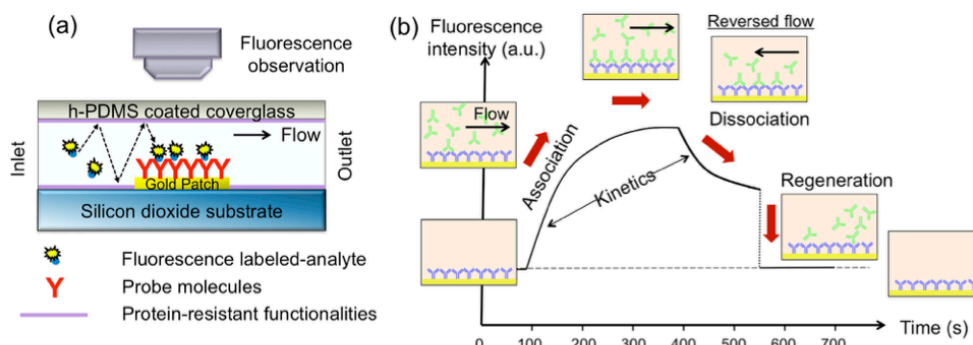
Here, we further demonstrate that this cost-effective sensing platform relying on the combinational use of biofunctional nanoslits and fluorescence detection, can achieve real-time monitoring of protein binding kinetics in physiological liquid environment with kinetic constant extraction, a platform we called Nanofluidic Fluorescence Microscopy (NFM). Fluorescence microscopy offers the possibility to carry out spatially resolved measurements where each camera pixel represents an independent measurement of the reaction kinetics. Hence, in addition to the high sensitivity with no analyte mass dependence inherent to this detection technique, large sampling area over a number of pixels ensures reduced statistical errors. On the other hand, because the fluorescent background level is proportional to the channel height, sub-micrometer channels offer signal to noise ratio of at least 100 on a large scale of dissociation constant  $K_D$ , in theory from the pM to the sub- $\mu\text{M}$  range, that concerns most molecules of interests. Here, two representative protein-receptor pairs of different affinities, streptavidin/biotin (high affinity) and mouse IgG/anti-mouse IgG (medium affinity), were chosen to demonstrate the capability of our devices to determine kinetic parameters. Binding kinetics of streptavidin/biotin interaction was investigated in our study since monitoring this high affinity recognition with the standard SPR method has not yet been addressed. IgG/anti-IgG pair was chosen as a generic candidate model for other types of protein-ligand interactions.

Molecular interactions within biofunctionalized nanoslits were visualized by classical fluorescence microscope under pressure-driven flow (Fig. 1a). The results presented here show that our device was capable of generating full kinetic sensorgram including both association and dissociation phases in one single-experiment with a single injection via reversed buffer flow operation, which is another golden feature of our device (Fig. 1b). Indeed, because we operate in full target capture, all upcoming molecules injected onto the sensor are consumed by the reaction and a diffusing layer (depleted layer) forms at the sensor site. This depleted layer constitutes a clear boundary between regions where the concentration of analyte drops from maximum to zero. Thus, the liquid downstream the sensor is analyte free and the dissociation study can be simply implemented after completion of the association phase by reserving the fluid flow within the nanochannel instead of injecting new buffer in the inlet, which results in a simplified operating protocol and reduced time of analysis. The extraction of binding constants was conducted using a finite element model, an analytical method, and a commercial software package to demonstrate that our kinetic data could steadily be applied to various fitting approaches. To validate the performance of our proposed device for kinetic constant determination, the extracted on/off rates were compared with the ones from literatures and with analogous SPR measurements.

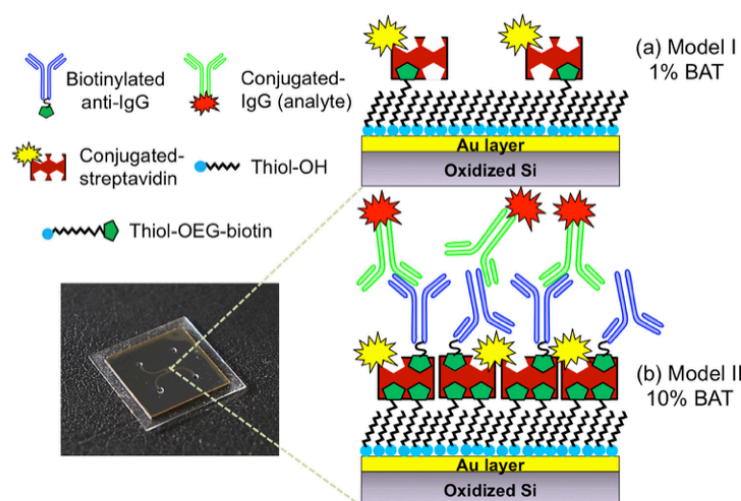
## 2. Material and methods

### 2.1. Surface chemistry

For selective immobilization of the bio-receptors on the surface inside nanoslits, gold-thiol chemistry was utilized via self-assemble monolayer (SAM) formation (Fig. 2). Gold surface was chosen for the local surface immobilization of bioreceptor probes in order to work with surfaces similar to the ones used in common SPR measurements. In this work, SAMs are composed of two thiol species, (1) hydroxyl-terminated thiol or a spacer and (2) biotinylated thiol used for further modification via biotin-streptavidin linkage.



**Fig. 1.** (a) Schematic representation of biofunctional nanoslit used in protein kinetic study. Receptor probe molecules are immobilized on the gold sensor surface located at the bottom of the nanochannel. Fluorescence labeled target molecules are introduced from the inlet by means of pressure-driven flow. The kinetic reaction of protein–ligand binding is monitored in real-time using fluorescence microscopy. (b) Typical sensorgram of kinetic analysis performed in nanofluidic device. The dissociation phase is simple induced by reversing the fluid flow in order to replace the analyte solution by the buffer solution.



**Fig. 2.** Schematic illustrations (not to scale) of two surface functionalization architectures on gold sensors used for protein kinetic study in nanoslits. (a) Model I streptavidin/biotin interaction on 1% biotinylated thiol modified surface; (b) Model II mouse anti-rabbit IgG/anti-mouse IgG interaction via biotin–streptavidin linkage on 10% biotinylated thiol modified surface. A photograph of fabricated nanoslit device is also provided.

Optimization of the mixing ratio between these two compounds allows better control of immobilized surface probe densities on the sensor surface, which is a crucial parameter for kinetic studies. For the streptavidin/biotin interaction model, 1% of biotinylated thiol was used to obtain an optimum surface density of immobilized biotin to avoid the problem of non-steric hindrance upon binding which could change their kinetic binding behaviors. On the other hand, 10% biotinylated thiol was employed in the second model of mouse IgG/anti-mouse IgG interaction, providing the maximum density of immobilized streptavidin molecules for subsequent anchoring of the biotinylated anti-mouse IgG receptor. This surface chemistry strategy offers wide spread use of biotinylated proteins as the receptors for targeting other specific ligands.

## 2.2. Fabrication of bio-functionalized device

The fluidic device consists of a set of 450 nm deep, 50  $\mu\text{m}$  wide

nanochannels binding two 5  $\mu\text{m}$  deep, 400  $\mu\text{m}$  wide microfluidic channels in a silicon substrate. The chips were fabricated using micromachining methods including conventional photolithography and reactive ion etching (details of the fabrication process are provided in S2 of the supplementary information).

The functionalization protocol used to graft the probe molecules onto the gold sensors embedded in the nanofluidic channels was partly carried out before chip sealing (see details in S3 of the supplementary information). This first functionalization step resulted in the coverage of the sensor surface with a mixed monolayer of hydroxy-terminated thiol/biotin-terminated thiol, thus suitable for the streptavidin–biotin interaction studies but also allowing further modification after encapsulation. Encapsulation of the fabricated micro- and nanochannels was carried out by means of a hard-PDMS (*h*-PDMS) coated cover glass with oxygen plasma activation (S4 of supplementary information). After encapsulation step, the chips were filled with a blocking solution to

prevent non-specific adsorption of proteins on the channel walls.

After chip bonding, surface functionalization was performed in flow to immobilize receptor molecules on the gold surface. First, streptavidin was grafted onto biotinylated SAM layer by introducing a 100 nM solution of Alexa Fluor 488 conjugated streptavidin (ST-AF 488) at a constant flow velocity of 200  $\mu\text{m/s}$  for 15 min until the saturation was achieved. After rinsing with the buffer solution, the biotinylated anti-mouse IgG receptor was subsequently immobilized onto the sensor via streptavidin-biotin linkage by injecting a 100 nM solution of biotinylated goat anti-mouse IgG for 15 min and rinsing with the buffer solution for 5 min.

### 2.3. Kinetic assay

After the sensor was functionalized with the desired receptors, the fluorescently labeled analyte solution was introduced to the sensor embedded nanoslits. The sensor was monitored in real-time upon binding of the fluorescent target analyte to the corresponding surface immobilized probes using an inverted fluorescence microscope (see S6 of supplementary information). Reverse buffer operation was employed to achieve a full kinetic sensorgram (association and dissociation phases). The working principle of this operation is simple and straightforward. Briefly, the fluorescent-targeted analyte is injected from one inlet during the association phase for the binding reaction. The analyte flow is then stopped and the pressure on the opposite inlet is applied to allow the introduction of the fresh buffer solution for the dissociation of the surface bound complex. This operation can easily be accomplished by switching the automated pressure controller from one inlet to another one without having to remove the setup for refilling the new solution. This operation is key feature specific to our device in order to accomplish a full kinetic sensorgram in one single reagent loading, which is commonly impractical in case of classical microfluidic formats. Indeed, in the present nanoslit configuration, the thin diffusion layer is formed within the channel depth and propagates along the channel length (as opposed to microfluidic sensors, where the diffusion layer grows on top of the sensor in the depth of the channel); there is thus clear boundary between the analyte and the buffer and pressure-driven flow can be conveniently used to switch between the two phases.

### 2.4. Data analysis and kinetic constant extraction

Fluorescence images were properly analyzed to derive the normalized specific binding fluorescence intensities and plot the resulting sensorgram (see S6 of supplementary information). To extract the kinetic constants from binding assays, the sensor responses from various analyte concentrations were fitted with three different procedures. The first method involves use of a developed finite element model (FEM) to investigate the behavior of our devices and to predict the binding kinetics, regarding the convection-diffusion equations for mass transport of analyte species and the binding reactions between the analytes and the surface immobilized receptors (see S7 of Supplementary information for details). Based on the calculated Damköhler numbers being less than one (see Section 3.1), our pressure-driven flow based nanoslit biosensor is not limited by the mass transport of the analytes, which could significantly reduce the sensor performances in terms of sensitivity, response time and kinetic data accuracy. Therefore, our computational model is relatively similar to previous studies (Choi et al., 2010) rather than two-compartment models (Myszka et al., 1998). Our experimental data was fitted with the simulated kinetic curves by means of coefficient of determination (R-square). The second fitting approach is based on a simplified analytical solution called well-mixed model, assuming pseudo first order kinetics and that the kinetics are not mass-

transfer limited (Karlsson et al., 1991). Finally, an available commercial BIAevaluation software package (GE Healthcare) was used to estimate the binding constants from our experimental kinetic data obtained in nanoslits. To this aim, separate fitting of association and dissociation phases (global-local fit) was performed with a Langmuir fit model.

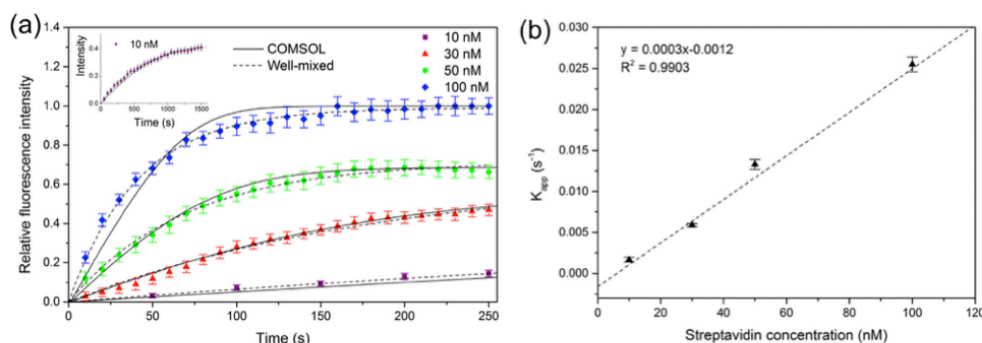
### 2.5. Validation with SPR setup

To further validate the ability of our device for extraction of rate constants of biomolecular events, an analogous real-time kinetic assay was conducted to study the interaction of mouse IgG/anti-mouse IgG using surface plasmon resonance (SPR) setup (see S8 of supplementary information). The surface chemistry for receptor immobilization on the dedicated SPR sensor surface and the kinetic binding conditions were kept the same as the one used in nanoslits. Global analysis was performed to simultaneously fit the association and dissociation phases with one set of rate constants using BIAevaluation 4.1.1 software package. The kinetic parameters obtained from nanoslit experiments were then compared with that obtained from SPR measurements.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Regime of operation

In order to assess the operation conditions of our nanofluidic embedded biosensor, it is essential to estimate the Peclet number ( $Pe_H$ ) with respect to the channel height, the sensor size, and the Damköhler number ( $Da$ ). The Peclet number relates the rate of convection to the rate of diffusion,  $Pe_H = U_m H/D$ , where  $U_m$  is the mean flow velocity (in the range of 200  $\mu\text{m/s}$  for a typical experiment),  $H$  is the channel height (450 nm), and  $D$  is the diffusion coefficient ( $7.4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  for 53 kDa streptavidin molecule (Spinke et al., 1993) and  $1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  for 150 kDa IgG molecule (Hu et al., 2007)). The sensor size is expressed as  $\lambda = L/H$ , where  $L$  is the sensor length (e.g. the whole sensor length or the length of 10 pixels used in data analysis). The Peclet numbers of 1.2 and 9 are found in case of streptavidin and mouse IgG, respectively. These numbers being close to the unity imply that the time for the analyte to diffuse across the entire height of the channel is equal to the time for the analyte to be transported over the sensor via convection. Theoretically, all analyte molecules in the channel should have the possibility to interact with the probe on the sensor surface, and the system approaches the limit of full collection when  $Pe_H < 0.5$  (Sjoelander and Urbaniczky, 1991). For both models, the sensor size ( $\lambda$ ) can be calculated as 111 for the whole sensor length (50  $\mu\text{m}$ ) and 8.9 in case of 10 pixels data collection (4  $\mu\text{m}$ ). These dimensionless numbers again describe our sensor to fall into "full collection" regime at sufficiently low  $Pe_H$  and large enough sensor ( $\lambda$ ) according to earlier work (Squires et al., 2008). On the other hand, the Damköhler number ( $Da$ ) is expressed as the ratio between the rate of reaction and the rate of diffusion,  $Da = \frac{k_a b_m H^2}{D}$ , where  $k_a$  is the association rate constant ( $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for streptavidin/biotin binding and  $8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for anti-mouse/mouse IgG interaction) and  $b_m$  is the immobilized probe density ( $4 \times 10^{-8} \text{ mol/m}^2$  for streptavidin/biotin model and  $1 \times 10^{-9} \text{ mol/m}^2$  for mouse IgG/anti-mouse IgG model). The calculated  $Da$  being smaller than one (0.24 for streptavidin/biotin and 0.036 for anti-mouse/mouse IgG) indicates that kinetic reactions fall into a reaction-limited regime and not diffusion-limited.



**Fig. 3.** (a) Real-time sensor responses of streptavidin-biotin interaction measured in biofunctional nanoslits. Kinetic curve obtained from each concentration is attributed to the measurement from a different nanofluidic device (the error bars: standard errors). The sensor responses were normalized to the relative fluorescence intensity and fitted with the computation model based on finite element method and well-mixed model assuming a simple Langmuir 1:1 interaction. The black (—) and (---) lines represent the predicted curves from the best fit of finite element simulation and well-mixed model, respectively. (b) Plot of apparent rate constants ( $K_{app}$ ) determined from non-linear least-squares fit as a function of streptavidin concentration. The plot shows linear trends with R-square value of 0.9903.

### 3.2. Kinetic experiments on Model I: Streptavidin/biotin

Kinetic experiments were performed on biotinylated thiol modified nanochannel after confirming that pre-modified probe molecules maintained their bio-reactivity following the chip encapsulation procedure (see S5 of Supplementary information). ST-AF 488 solutions ranging in concentration from 10 nM to 100 nM were introduced continuously at a constant flow velocity of 200  $\mu\text{m/s}$  and allowed to bind with biotin immobilized on sensor surfaces. The fluorescence images were recorded in real-time to monitor the association process of this specific binding event. Due to very high binding affinity and exceptionally long dissociation time of streptavidin-biotin recognition system, four different devices were employed to measure the binding constants of streptavidin at each concentration.

The fluorescence intensities were normalized and fitted with simulated data attained from a finite element model. The relative sensor responses of streptavidin-biotin binding at various concentrations fitted with a simulation model are shown in Fig. 3a. It was observed that the experimental data of streptavidin binding at low concentration (10–50 nM) fitted the simulation data well with R-square in a range of 0.99. Nevertheless, high concentration of streptavidin (100 nM) shows a relatively poor fit with the simulation results (R-square=0.95). This might be due to several reasons pronounced at high analyte concentration including steric hindrance, heterogeneity of the surface, non-specific binding, deviation from 1:1 interaction model etc. To determine the binding affinity based on the computational model, the association and dissociation rate constants at each concentration were extracted from the best fit of the predicted binding curves to the experimental data. The average association rate constant ( $k_a$ ) was determined to be  $7.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and dissociation rate constant ( $k_d$ ) of  $8.0 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  was observed from the best fit for all concentrations. Additionally, a lower off-rate was also applied in the simulation model, but there was no change in sensor responses. As a result, dissociation constant ( $K_D$ ) for streptavidin-biotin interaction can be estimated as  $K_D \leq 1.1 \times 10^{-12} \text{ M}$ .

The effect of various flow velocities ranging from 200 to 465  $\mu\text{m/s}$  (associated to the  $Pe_H$  number in the range of 1.2–2.8) on binding kinetics were also investigated however the sensor responses did not show any significant differences, indicating no mass transport limitation as expected. Therefore, the binding constant can also be determined using a simple “well-mixed” model, assuming a simple biomolecular first-order interaction. The

binding of analyte to the sensor surface with an association rate constant  $k_a$  and dissociation rate constant  $k_d$  is given by

$$C_s = \frac{k_a b_m C (1 - e^{-(k_a C + k_d)t})}{k_a C + k_d} \quad (1)$$

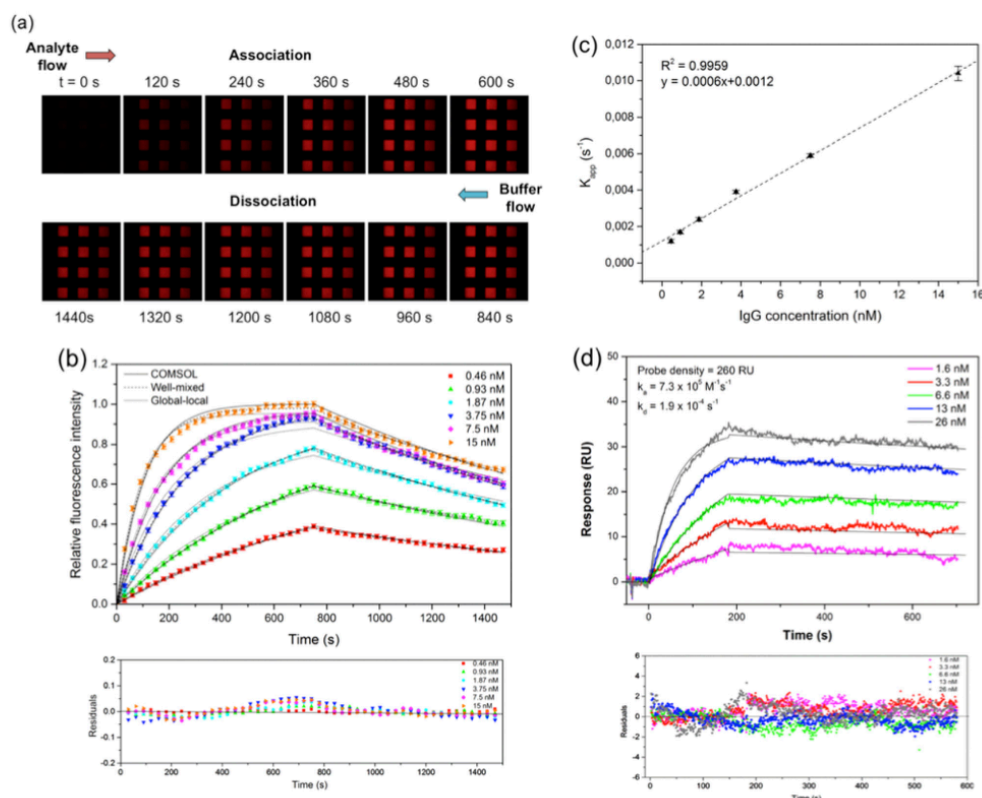
where  $C$  is the analyte concentration in bulk solution,  $C_s$  is the bound complex concentration on the surface and  $b_m$  is the slope density or binding sites on the surface. This model is defined as “well-mixed” model assuming that the detection kinetics are reaction rate-limited and the analyte concentration is constant and uniform everywhere above the sensor surface. The apparent time constant is given by  $K_{app} = k_a C + k_d$ , which can be derived by fitting the kinetic curves to Eq. (1). A plot of apparent time constant as a function of target analyte concentration is shown in Fig. 3b. It is seen that the apparent time constant increases with increasing analyte concentration. The plot gave a linear fit with a slope of 0.0003 and R-square of 0.9903. A derived slope of  $0.0003 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  results in an association rate constant  $k_a$  of  $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . This derived  $k_a$  value is in a good agreement with the value extracted from our finite element model and within the reported range in the literatures based on microfluidic platform (Coltro et al., 2014; D’Agata et al., 2008; Srisa-Art et al., 2008), confirming the validity of the kinetic computational model to predict the binding responses of biospecific interactions.

### 3.3. Kinetic experiments on Model II: mouse IgG/anti-mouse IgG

To further validate our kinetic model, mouse immunoglobulin G (IgG) and anti-mouse IgG was chosen as another protein-receptor pair. After chip encapsulation, the chip bearing immobilized biotinylated thiols was functionalized in flow with the fluorescently labeled streptavidin (ST-AF 488) followed by the attachment of biotinylated anti-mouse IgG receptors. For fluorescence imaging purpose, two different dyes with non-overlapping emission spectra were selected in order to distinguish between the immobilization process of streptavidin and the subsequent binding study between the non-fluorescent immobilized receptors and the fluorescently labeled IgG analytes.

Kinetic measurements were performed by introducing various concentrations of Alexa Fluor-647 conjugated mouse anti-rabbit IgG (mIgG-AF 647) target analyte (diluted in PBS buffer) ranging from 0.46 to 15 nM to anti-mouse modified sensor chip under continuous flow velocity of 200  $\mu\text{m/s}$ . The bound mouse IgG was





**Fig. 4.** (a) Fluorescence image snapshots taken during association and dissociation processes upon Alexa Fluor-647 mouse anti-rabbit IgG (1.87 nM) injection into anti-mouse modified nanoslit. (b) Real-time sensor responses at various analyte concentrations ranging from 0.46 nM to 15 nM (the error bars: standard errors). The data were normalized to relative fluorescence intensity and fitted with three different models: (1) finite element simulation, (2) well-mixed model and (3) global-local fitting by BIAevaluation software package, assuming a simple Langmuir 1:1 interaction. The black (—), (---) and (---) lines represent the predicted curves from the best fit of finite element simulation, well-mixed model, and global-local fitting, respectively. The residual versus time plots are also shown for all concentrations. (c) Plot of apparent rate constants ( $K_{app}$ ) as a function of mouse IgG concentration. (d) Sensorgrams of mouse IgG/anti-mouse IgG binding kinetics obtained from analogous SPR measurement. Kinetic curves were fitted using a 1:1 global analysis model from BIAevaluation software package (black line). The residual versus time plots are demonstrated for all concentrations.

allowed to dissociate from the surface receptor by injection of a pure buffer solution via the reversed flow operation. The fluorescence images were recorded in real-time to monitor the association and dissociation processes inside nanoslit (Fig. 4a). In this study, the association time was fixed the same for all target concentrations enabling a global analysis using BIAevaluation software package. The sensor surface was regenerated by injecting the solution of 10 mM glycine-HCl pH 2.0 for a short period of time and thoroughly rinsed with buffer solution before performing the next measurement cycle. Additionally, an irrelevant target analyte (Alexa Fluor-600 goat anti-rabbit IgG) was introduced to anti-mouse immobilized nanoslit to verify non-specific interaction however no significant increase in fluorescence intensity was observed.

The resulting kinetic data were then normalized and fitted with three different models: (i) our finite element simulation, (ii) the well-mixed model and (iii) the global-local fitting by BIAevaluation software (Fig. 4b). Based on finite element computational modeling, the binding rate constants were determined from the best fit of the predicted kinetic curves to the experimental data by

means of coefficient of determination. It can be observed that our simulated kinetic model describes the immunoreaction assay in nanoslit well as each experimental binding curve was fitted accurately ( $R$ -square in a range of 0.99) (Fig. S5). The average association rate constant ( $k_a$ ) was determined to be  $8.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and dissociation rate constant ( $k_d$ ) of  $6.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  was achieved, giving an equilibrium dissociation constant  $K_D$  of 0.77 nM. Subsequently, the experimental data were fitted to the well-mixed analytical model with non-linear least squares method and the apparent time constant ( $K_{app}$ ) was plotted as a function of analyte concentration, giving a good fit with  $R$ -square of 0.9959 (Fig. 4c). The desorption of bound analyte from the surface receptor was estimated using a first-order exponential decay. This results in the association and dissociation rate constants of  $6.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $5.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , respectively. Finally, the kinetic data were examined using a global-local analysis by BIAevaluation software. Comparable to our simulation, the best fit was found using a Langmuir 1:1 binding model giving residual versus time plots lower than 0.1 (Fig. 4b). The average values of  $k_a$  and  $k_d$  were determined to be  $12 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  with SE of  $2.0 \times 10^4$  and

$5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  with SE of  $1.8 \times 10^{-5}$ , respectively, supporting the validity of our finite element model for good quantitative description of the kinetic data.

### 3.4. Benchmarking with SPR

To further evaluate our platform, using the same preparation coated-gold surface as nanoslits, an analogous real-time kinetic measurement of mouse IgG/anti-mouse IgG was conducted using surface plasmon resonance setup. Sensorgrams containing kinetic information of these binding events at various concentrations ranging from 1.6 to 26 nM are shown in Fig. 4d. Global analysis was utilized to identify the binding model and quantify kinetic parameters using BIAevaluation software package. The best fit for the entire data was found with a 1:1 Langmuir binding model without influence of mass transport, giving  $k_a$  and  $k_d$  of  $7.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  with SE of  $3.0 \times 10^3$  and  $1.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , with SE of  $8.0 \times 10^{-6}$ , respectively. Furthermore, repeated kinetic measurements were also conducted at different immobilized surface probe densities (Fig. S6) and with unconjugated target molecules (Fig. S7) to ensure the accuracy of determined kinetic parameters from the binding data and to investigate the influence of labeling on binding kinetics of molecular interactions. The estimated binding rate constants were still consistent. In summary, our nanoslit based biosensor platform yielded kinetic constants that are in a good agreement with the SPR measurement and in the range with literature values (Table 1), thus extending the validity of our platform for accurately quantifying the binding kinetics of biomolecular interactions.

### 3.5. Range of operation and detection limit

The accurate determination of association and dissociation constants for the two couples of ligands presented here (streptavidin/biotin and mouse IgG/anti-mouse IgG) illustrates the various

affinity strengths that can be studied with our system. Affinity studies usually require kinetic plots for several analyte concentrations ranging from  $1/10$  to  $10 K_D$  in order to adequately extract kinetics constants. Limitation of our technique in terms of working concentrations is given by the fluorescence signal to noise ratio, e.g. the fluorescence emitted by the analytes specifically interacting at the sensor surface vs. the fluorescence due to the molecules flowing in the fluidic channel. In reaction-limited regime at equilibrium, for concentrated ( $C > K_D$ ) and diluted solutions ( $C < K_D$ ), where analyte molecules bind all or a fraction of the receptor molecules, we respectively have:

$$S/N = \frac{b_m}{H \times C} \quad (2)$$

$$S/N = \frac{b_m}{H \times K_D} \quad (3)$$

Thus, the sampling volume reduction during observation translates into a decreased background with a signal to noise ratio inversely proportional to the channel height. Using the grafted probe density,  $b_m$ , obtained with the presented surface functionalization protocol for IgG grafting, the previous equations demonstrate that high enough  $S/N$  can be obtained with sub-micrometer channels ( $H < 1 \mu\text{m}$ ) even for medium to low affinity molecules, e.g. we can expect  $S/N$  of  $\sim 100$  in 100 nm deep channels for  $K_D$  of 0.1  $\mu\text{M}$ . In fact, the pM to the sub- $\mu\text{M}$  range can be addressed with the presented technique, which concerns most molecules of interests.

Finally, to ensure that our device can be employed not only for investigating binding kinetics of protein-ligand interactions but can also be applied as a highly sensitive and rapid on-chip immunosensor, limit of detection (LOD) is another important performance characteristic for validation. In this study, the detection limit was determined by introducing different concentrations of mlgG-AF 647 target analyte solutions to anti-mouse IgG-modified nanoslit and the fluorescence intensity was recorded. The fluorescence intensity change with the introduction of target analyte as a function of time is plotted in Fig. S8. It should be noted that the obtained LOD depends strongly on the sensitivity of the camera in which the imaging parameters were adjusted in our case to optimize this LOD. No significant increase in fluorescence intensity was observed when an analyte-free buffer solution was injected, while introduction of 1 pM resulted in a significant increase in fluorescence intensity after 30 min ( $S/N \sim 3$ ). With a sample volume of 10.5 nL, a mole detection limit can be determined as 10 zeptomole. Notably, increasing the analyte concentration to 10 pM, our sensor can easily detect the binding response signal within 5 min. The value of detection limit obtained from our system for mouse IgG sensing is significantly better ( $\sim 100$  times) than or comparable to existing microfluidic immunosensing formats (Ivnitski et al., 1998; Sapsford et al., 2001; Yu et al., 2005). Additionally, this on-chip immunosensor shows good repeatability with a standard deviation of 2.28% at analyte concentration of 5 nM (Fig. S9). Furthermore, the total immunoassay time (including injection, immobilization and detection steps) required for mouse IgG detection based on streptavidin-biotin linkage for anti-mouse IgG immobilization was found to be approximately 40 min in our study while the traditional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) takes hours to days to complete the whole assay. Therefore, our approach also demonstrates fast and sensitive immunosensing platform for protein detection with low reagent consumption ( $\sim 1000$  times less than SPR setup), indicating a great potential in clinical diagnosis.

**Table 1**  
Comparison of kinetic constants for streptavidin/biotin and IgG/anti-IgG binding between our biofunctional nanofluidic platform, SPR and literature.

Biosensor platform	Association rate	Dissociation rate	Equilibrium dissociation
<b>Model I:</b>			
<b>Streptavidin/biotin</b>	$(k_a, 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$(k_d, 10^{-7} \text{ s}^{-1})$	$(K_D, 10^{-12} \text{ M})$
<b>Nanoslit biosensor</b>			
– FEM simulation model	$7.1 \pm 2.5$	$8.0 \pm 1.2$	$\leq 1.1$
– Well-mixed model	$3.0 \pm 0.3$	N/A	
<b>Literature</b> (Coltro et al., 2014; D'Agata et al., 2008; Hosokawa et al., 2006; Srisa-Att et al., 2008)	4.4–450	0.2	$\sim 0.1$
<b>Model II:</b>			
<b>IgG/anti-mouse IgG</b>	$(k_a, 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$(k_d, 10^{-4} \text{ s}^{-1})$	$(K_D, 10^{-10} \text{ M})$
<b>Nanoslit biosensor</b>			
– FEM simulation model	$8.0 \pm 1.2$	$6.2 \pm 0.3$	7.7
– Well-mixed model	$6.0 \pm 0.3$	$5.5 \pm 0.4$	9.2
– Global local fit	$12 \pm 0.2$	$5.0 \pm 0.2$	4.2
<b>SPR</b>			
(Global analysis)	$7.3 \pm 0.1$	$1.9 \pm 0.1$	2.6
<b>Literature</b> (Lee et al., 2007; Pereira et al., 2011; Piran and Riordan, 1990; Yu et al., 2005)	2.5–13	3.0	1.5–12

#### 4. Conclusions

We have presented the first effective platform for real-time kinetic monitoring of protein interactions using nanofluidic-based immuno-biosensors coupled with conventional fluorescence microscopy and pressure driven flow. Remarkably, we have demonstrated that association and dissociation kinetics of immunoreaction in nanoslit can be achieved in one-single experiment without removing the fluidic setup via reversed buffer flow technique which is impractical for classical microfluidic immunoassay formats. We have also validated that our kinetic data obtained from nanoslit platform can be readily applied to various fitting approaches, including a finite element model, an analytical model and a commercial software, to quantify kinetic parameters (on/off rates) of two protein-receptor binding pairs. The extracted values are consistent with SPR measurement and previously reported values in literatures. As a result, our new approach holds promise as an alternative tool for real-time detection with signal to noise ratio of at least 100 for a broad range of protein-ligand interactions with  $K_D$  from pM to sub- $\mu$ M. Our platform is expected to achieve the level of performance of commercial SPR biosensor, with the additional advantages of simplicity, low sample consumption, optimized target capture, reduced statistical errors, no limitation of analyte size, and limit of detection down to the picomolar range without using any combined preconcentration or enzymatic amplification schemes. Furthermore, we believe our novel method provides a potential possibility to integrate into lab-on-a-chip with fast and multiplexed sensing for point-of-care clinical diagnostic and drug screening applications.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge the Programme Blanc jointly sponsored by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-IS10-0001) and the Ministry of Science and Technology, Taiwan (103-2923-M-001-007-MY3), and the MAE (Ministère des Affaires Étrangères) for the Doctoral Fellowship of P.T. This work was partly supported by the French RENATECH Network, Academia Sinica Integrated Thematic Project (AS-103-TP-A01), and AOARD grant #124002.

#### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.033>.

#### References

- Ashton, R., Padala, C., Kane, R.S., 2003. Microfluidic separation of DNA. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 497–504.
- Choi, C.J., Belobraydich, A.R., Chan, L.L., Mathias, P.C., Cunningham, B.T., 2010. Comparison of label-free biosensing in microplate, microfluidic, and spot-based affinity capture assays. *Anal. Biochem.* 405, 1–10.
- Coltro, W.K.T., Neves, R., de, S., Motheo, A., de, J., da Silva, J.A.F., Carrilho, E., 2014. Microfluidic devices with integrated dual-capacitively coupled contactless conductivity detection to monitor binding events in real time. *Sens. Actuators B Chem.* 192, 239–246.
- D'Agata, R., Grasso, G., Spoto, G., 2008. Real-time binding kinetics monitored with surface plasmon resonance imaging in a diffusion-free. *Environ. Open Spectrosc. J.* 2, 1–9.
- Darain, F., Gan, K.L., Tjin, S.C., 2009. Antibody immobilization on to polystyrene substrate-on-chip immunoassay for horse IgG based on fluorescence. *Biomed. Microdevices* 11, 653–661.
- Didar, T.F., Foudeh, A.M., Tabrizian, M., 2012. Patterning multiplex protein microarrays in a single microfluidic channel. *Anal. Chem.* 84, 1012–1018.
- Dittrich, P.S., Manz, A., 2005. Single-molecule fluorescence detection in microfluidic channels – the Holy Grail in *muTAS?* *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1771–1782.
- Esadze, A., Iwahara, J., 2014. Stopped-flow fluorescence kinetic study of protein sliding and intersegment transfer in the target DNA search process. *J. Mol. Biol.* 426, 230–244.
- Fu, J., Schoch, R.B., Stevens, A.L., Tannenbaum, S.R., Han, J., 2007. A patterned anisotropic nanofluidic sieving structure for continuous-flow separation of DNA and proteins. *Nat. Nanotechnol.* 2, 121–128.
- Granqvist, N., Hanning, A., Eng, L., Tuppurainen, J., Viitala, T., 2013. Label-enhanced surface plasmon resonance: a new concept for improved performance in optical biosensor analysis. *Sensors* 13, 15348–15363.
- Hosokawa, K., Omata, M., Sato, K., Maeda, M., 2006. Power-free sequential injection for microchip immunoassay toward point-of-care testing. *Lab Chip* 6, 236–241.
- Hu, G., Gao, Y., Li, D., 2007. Modeling micropatterned antigen-antibody binding kinetics in a microfluidic chip. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1403–1409.
- Ideker, T., Sharan, R., 2008. Protein networks in disease. *Genome Res.* 18, 644–652.
- Ivnicki, D., Wolf, T., Solomon, B., Fleminger, G., Rishpon, J., 1998. An amperometric biosensor for real-time analysis of molecular recognition. *Bioelectrochem. Bioenergy* 45, 27–32.
- Karlsson, R., Michaelsson, A., Mattsson, L., 1991. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods* 145, 229–240.
- Karnik, R., Castelino, K., Fan, R., Yang, P., Majumdar, A., 2005. Effects of Biological Reactions and Modifications on Conductance of Nanofluidic Channels. *Nano Lett.* 5, 1638–1642.
- Kwok, K.-C., Cheung, N.-H., 2010. Measuring binding kinetics of ligands with tethered receptors by fluorescence polarization and total internal reflection fluorescence. *Anal. Chem.* 82, 3819–3825.
- Lakowicz, J.R., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. Springer, New York.
- Lee, K.-H., Su, Y.-D., Chen, S.-J., Tseng, F.-G., Lee, G.-B., 2007. Microfluidic systems integrated with two-dimensional surface plasmon resonance phase imaging systems for microarray immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* 23, 466–472.
- Leichlé, T., Chou, C.-F., 2015. Biofunctionalized nanoslits for wash-free and spatially resolved real-time sensing with full target capture. *Biomicrofluidics* 9, 034103.
- Leichlé, T., Lin, Y.-L., Chiang, P.-C., Hu, S.-M., Liao, K.-T., Chou, C.-F., 2012. Biosensor-compatible encapsulation for pre-functionalized nanofluidic channels using asymmetric plasma treatment. *Sens. Actuators B Chem.* 161, 805–810.
- Lele, T.P., Ingber, D.E., 2006. A mathematical model to determine molecular kinetic rate constants under non-steady state conditions using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Biophys. Chem.* 120, 32–35.
- Li, Y., Augustine, G.J., Wening, K., 2007. Kinetics of complexin binding to the SNARE complex: correcting single molecule FRET measurements for hidden events. *Biophys. J.* 93, 2178–2187.
- Lieto, A.M., Cush, R.C., Thompson, N.L., 2003. Ligand-receptor kinetics measured by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 85, 3294–3302.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W., 2001. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* 314, 1–26.
- Malmqvist, M., Karlsson, R., 1997. Biomolecular interaction analysis: affinity biosensor technologies for functional analysis of proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 378–383.
- Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W.L., Weitz, D.A., Griffiths, A.D., Heyman, J.A., 2013. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat. Protoc.* 8, 870–891.
- Mitsakakis, K., Gizeli, E., 2011. Multi-sample acoustic biosensing microsystem for protein interaction analysis. *Biosens. Bioelectron.* 26, 4579–4584.
- Myszka, D.G., Rich, R.L., 2000. Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. *Pharm. Sci. Technol. Today* 3, 310–317.
- Myszka, D.G., He, X., Dembo, M., Morton, T.A., Goldstein, B., 1998. Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys. J.* 75, 583–594.
- Nguyen, B., Taniou, F.A., Wilson, W.D., 2007. Biosensor-surface plasmon resonance: quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions. *Methods* 42, 150–161.
- Olsen, K., Svensson, B., Christensen, U., 1992. Stopped-flow fluorescence and steady-state kinetic studies of ligand-binding reactions of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* 209, 777–784.
- Pereira, A.T., Novo, P., Prazeres, D.M.F., Chu, V., Conde, J.P., 2011. Heterogeneous immunoassays in microfluidic format using fluorescence detection with integrated amorphous silicon photodiodes. *Biomicrofluidics* 5, 14102.
- Piran, U., Riordan, W.J., 1990. Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex. *J. Immunol. Methods* 133, 141–143.
- Sapsford, K.E., Liron, Z., Shubin, Y.S., Ligler, F.S., 2001. Kinetics of antigen binding to arrays of antibodies in different sized spots. *Anal. Chem.* 73, 5518–5524.
- Schneckenburger, H., 2005. Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 13–18.
- Schoch, R.B., Cheow, L.F., Han, J., 2007. Electrical Detection of Fast Reaction Kinetics in Nanochannels with an Induced Flow. *Nano Lett.* 7, 3895–3900.
- Sjoelander, S., Urbaniczky, C., 1991. Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis. *Anal. Chem.* 63, 2338–2345.
- Spinke, J., Liley, M., Schmitt, F.-J., Guder, H.-J., Angermaier, L., Knoll, W., 1993. Molecular recognition at self-assembled monolayers: Optimization of surface functionalization. *J. Chem. Phys.* 99, 7012–7019.
- Squires, T.M., Messinger, R.J., Manalis, S.R., 2008. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nat. Biotechnol.* 26, 417–426.
- Srisa-Art, M., Dyson, E.C., deMello, A.J., Edel, J.B., 2008. Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics. *Anal. Chem.* 80, 7063–7067.

- Wang, M.M., Tu, E., Raymond, D.E., Yang, J.M., Zhang, H., Hagen, N., Dees, B., Mercer, E.M., Forster, A.H., Kariv, I., Marchand, P.J., Butler, W.F., 2005. Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. *Nat. Biotechnol.* 23, 83–87.
- Yeh, J.-W., Taloni, A., Chen, Y.-L., Chou, C.-F., 2012. Entropy-driven single molecule tug-of-war of DNA at micro-nanofluidic interfaces. *Nano Lett.* 12, 1597–1602.
- Yu, C.-J., Chou, C., Hsu, H.-Y., Chan, T.-S., Lee, Z.-Y., Wu, H.-T., 2005. Fiber optic biosensor for monitoring protein binding kinetics. *Proc. SPIE* 5691, 200–208.
- Zhang, Z., Rajagopalan, P.T.R., Selzer, T., Benkovic, S.J., Hammes, G.G., 2004. Single-molecule and transient kinetics investigation of the interaction of dihydrofolate reductase with NADPH and dihydrofolate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2764–2769.



Contents lists available at ScienceDirect

## Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/snb](http://www.elsevier.com/locate/snb)

## Nanofluidic fluorescence microscopy with integrated concentration gradient generation for one-shot parallel kinetic assays

Pattamon Teerapanich<sup>a</sup>, Martine Pugnère<sup>b</sup>, Corinne Henriquet<sup>b</sup>, Yii-Lih Lin<sup>c</sup>, Antoine Naillon<sup>d</sup>, Pierre Joseph<sup>a</sup>, Chia-Fu Chou<sup>c</sup>, Thierry Leïchlé<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France<sup>b</sup> IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM, U1194, Université de Montpellier, ICM, Institut Régional du Cancer, Montpellier, F-34090, France<sup>c</sup> Institute of Physics, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan<sup>d</sup> CNRS, IMFT, F-31400 Toulouse, France

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Affinity assay  
Biosensor  
Nanofluidics

## ABSTRACT

We report a simple and cost-effective nanofluidic fluorescence microscopy platform with parallel kinetic assay capability for the determination of kinetic parameters in a single run. An on-chip microfluidic concentration diluter, or gradient generator, was integrated to a biofunctionalized nanofluidic chip, enabling simultaneous interrogation of multiple biomolecular interactions with a full titration series of analyte in a single experiment. We demonstrate that since the association and dissociation phases are induced by the on-chip gradient generator and a reverse buffer flow operation, complete kinetic sensorgrams for IgG/anti-IgG interactions can be achieved within 20 min on a single device, which is at least 10 times faster than traditional kinetic techniques. This method could contribute to low-cost, rapid and high-throughput drug-screening and clinical diagnostics.

## 1. Introduction

High-throughput measurement of biomolecular interactions with rapid determination of the affinity and kinetic parameters are of critical importance in drug discovery processes and proteomic analysis [1]. Surface plasmon resonance (SPR) is established as a powerful bioanalytical tool for quantitative characterization of molecular binding events owing to its real-time and label-free detection [2]. Traditional kinetic experiment requires the successive introduction of different analyte concentrations and the sensor surface is regenerated after each analyte injection, a protocol regarded as “multi-cycle kinetics”. These repetitive procedures are typically performed manually, and thus are laborious and time-consuming.

Over the past decade however, single cycle titration kinetic was implemented on SPR to decrease the number of regeneration steps: FastStep [3] and diSPR<sup>®</sup> [4] dynamic injections are now commercialized in the PIONEER FE SPR instrument, mainly used in drug screening [5]. Moreover, there has been a growing interest in high-throughput kinetic analysis using SPR imaging (SPRI) technology as demonstrated in the commercial cross-flow ProteOn XPR 36 assay system (BioRad) [6], or the flow cell based FlexChip (Biacore) [7]. Combined with protein arrays, SPRI uses a parallel detector such as a CCD camera to measure kinetics on multiple ligand surfaces in a single run without the

need of surface regeneration. In the near future, SPR microscopy [8] and emerging SPR systems based on nanostructures [9] which propose higher throughput and sensitivity, could also stimulate the field.

Despite the capability to provide kinetic data in a parallel manner, the above mentioned systems necessitate a high-cost specialized optical instrument and specifically trained operators [10]. On the other hand, electrochemical and quartz crystal microbalance biosensors may provide low-cost solution for kinetic studies [11–13], but they encounter the similar issues, as SPR platform, of either sensor surface regeneration [14], difficulty in parallel kinetic assays [15], or slow assay time, particularly when target concentrations are close to the sensor detection limit [16,17], for kinetic analysis, though the later can be alleviated by implementing complex analyte enrichment strategies [18–22]. Therefore, there is still of great demand to develop simple, rapid and cost-effective methods that allow high-throughput access to kinetic information.

Miniaturized fluidic systems have lately emerged to address the challenges associated with present bioanalytical tools [23]. Microfluidics that offers a high degree of parallelization has the potential to increase the assay throughput while minimizing reagent consumption and analysis time. With Reynolds numbers being well below one, laminar flow has been an effective way to deliver concentration gradients of chemical species within microfluidic channels. Microfluidic diluters

\* Corresponding author.

E-mail address: [tleichle@laas.fr](mailto:tleichle@laas.fr) (T. Leïchlé).<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.167>

Received 3 May 2018; Received in revised form 27 July 2018; Accepted 31 July 2018

Available online 02 August 2018

0925-4005/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

offer means to automatically generate stable and reproducible concentration gradients on chip for cell-based experiments [24], pharmaceutical studies [25] and high-throughput fluorescent immunoassays [26]. Despite several successful applications, there have been a few efforts to implement gradient-generating microfluidic devices for kinetic assays. Most recently, we have reported the feasibility of using a nanofluidic fluorescence microscopy system (NFM) for low-noise real-time measurements of protein binding kinetics with optimized response time and target capture [27]. This system, relying on the combination of a functionalized nanofluidic device with a conventional fluorescence microscope, allows the generation of full kinetic sensorgrams (association and dissociation curves) with a single injection via a simple reversed flow operation. Thanks to the unique feature of nanometer scale channels, the reduced observation volume, leading to negligible levels of fluorescence background, allows the sensor surface to be directly probed without using sophisticated apparatuses such as SPR [28].

Herein, we implement a microfluidic diluter in the NMF platform, allowing one-shot kinetic measurements to be carried out in a parallel manner on a single chip. This approach is capable of simultaneous monitoring multiple ligand surfaces through multiple analyte streams with up to ten different concentrations spanning almost 2 orders of magnitude using a single-analyte injection and without the need for lengthy surface regeneration procedure. The microfluidic diluter is employed to produce stable analyte concentration gradients within the device, thus eliminating tedious manual dilution process. In this work, generation of concentration gradients relies on diffusion-based partial mixing as described elsewhere [29], where desired concentration gradients can be achieved by regulating the input flow rates. The microfluidic dilution network is designed such that a suitable dynamic concentration range required for kinetic studies is achieved at the outputs and the target solutions are transported through each channel at identical flow speeds. In principle, different analyte concentrations generated from the concentration diluter can be introduced over the sensors located at independent nanochannels and the concentration-dependent binding data can be collected all at once using a bench-top fluorescence microscope and a CCD camera. We demonstrate the device performance for high-throughput measurements through kinetic studies of mouse immunoglobulin G (IgG)/anti-mouse IgG interaction.

## 2. Materials and methods

The integrated device is composed of three main components: the first component is a Y-shape microfluidic diluter, referred as the main microchannel, for the generation of partial-mixing concentration gradients; the second component is an array of 10 separated nanoslits with embedded probe-immobilized gold sensors for kinetic studies; the third component is a microchannel used for in-situ functionalization and reversed-buffer flow operation. The dimensions of each component are shown in Fig. 1. The Y-shape gradient network has two input fluid lines, one for the analyte solution with the maximum concentration for kinetic experiments, and the other for the diluent (buffer solution). Two confluent streams of liquid merge at the intersection and laterally mix via molecular diffusion in the main microchannel as they flow downstream side by side, thus generating traverse concentration gradients.

The geometry of microfluidic diluter was designed using COMSOL Multiphysics to target the desired concentration profile and flow speed (see details of the design in the ESI). After a fixed distance, the main microchannel is partitioned into a series of 10 parallel narrow microchannels to permanently isolate and homogenize distinct sample concentrations emanating from the main flow stream before entering the nanoslits. Furthermore, the Y-shape microfluidic gradient network is symmetrical in order to guarantee the same flow velocity at all outputs, which is indispensable for parallel kinetic measurements. The flow velocity has a major influence on the steepness of the output concentration gradient profile wherein a wide sigmoidal concentration profile is obtained at a low flow velocity. Nevertheless, too high of a

flow velocity can lead to non-homogeneity of the sample solutions at the exit as they do not experience enough residence time to mix while flowing along the narrow microchannels. Hence, there is a tradeoff between the concentration range generated from the gradient device and the homogeneity of the sample solution. Still, the simulation results show (see ESI) that with the selected geometry and inlet pressure, the designed Y-shape microfluidic dilution network enables gradient generation with a range of concentrations spanning approximately two orders of magnitude, and all channel outputs possessed virtually identical flow velocities.

The fluidic chip ( $16 \times 16 \text{ mm}^2$ ) was fabricated on a silicon substrate using standard photolithography and reactive ion etching techniques as described previously [27]. The microfluidic channels are  $10 \mu\text{m}$  deep while the nanochannels are  $450 \text{ nm}$  deep. Selective immobilization of protein receptors within the nanochannel was achieved by patterning  $100 \text{ nm}$  thick gold patches onto the silicon substrate. The functionalization protocol used to immobilize the probe molecules onto the gold sensors embedded in the nanoslits was partly carried out prior to chip encapsulation (see details in the ESI). The fluidic chip was sealed with a hard-PDMS coated cover glass using a specifically developed room-temperature bonding process [30]. The fluidic chip was then filled with a blocking solution (a buffer containing 1% bovine serum albumin and 0.02% Tween-20) to prevent nonspecific adsorption of proteins on the channel surfaces. After chip bonding and channel passivation, the functionalization of the gold sensor with protein probes was finalized in flow as described in the ESI.

The device was mounted on a dedicated fluidic support and the reservoirs were connected to a pressure controller (MFC-8C Fluigent) to induce liquid flows. All experiments were monitored using a CCD camera (ANDOR iXonEM + 885) and an inverted microscope (Olympus IX70) equipped with a white light source (Lumencor SOLA light engine). Fluorescence images were acquired with a  $10\times$  microscope objective to cover an area of approximately  $800 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$ , allowing us to visualize the binding reactions in all channels.

## 3. Results and discussion

In order to investigate the effectiveness of the diluter for generating accurate concentration gradients of target solutions, we used fluorescent molecules to visualize the local concentration by means of fluorescence microscopy. A  $20 \text{ nM}$  Alexa Fluor-647 conjugated mouse anti-rabbit IgG (mIgG-AF 647) solution was injected at the analyte input port and a buffer solution at the diluent input port. To create a stable concentration gradient using the Y-type diluter, it was compulsory to maintain the pressure equilibrium between the two feeding streams at the input ports by using a single pressure source and a Y-barbed connector (Fig. 2).

An analyte-buffer interface was observed at the stagnation point (Fig. 3a) upon injection of the mIgG-AF 647 and buffer solutions. Both fluids were mixed by molecular diffusion as they progressed down the main channel resulting in a broader fluorescence region. The concentration gradient at the end of the main channel was constantly isolated and maintained in the downstream array of narrow microchannels. It was observed that the concentration gradient was stabilized within 2 min and controllable during the time span of the kinetic experiments (typically 10–15 min). This is particularly crucial to achieve robust and accurate kinetic information of the observed interactions. Besides, the time required to establish a steady-state equilibrium gradient was observed to be less than 1 min. This timescale is relatively short compared to the total kinetic analysis time (see next section), thus allowing the observation of the initial association phase of the binding reactions. As expected, the fluorescence intensity in the channel outputs increased from the left to the right (Fig. 3b), generating a characteristic diffusion-induced sigmoidal concentration profile [31] (error function [32]). The corresponding target concentrations were estimated by exploiting the observed linear relationship to correlate the fluorescence

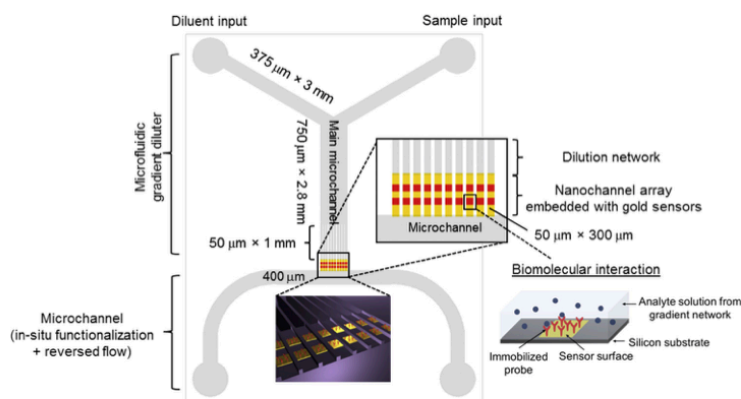


Fig. 1. Schematic representation of the concentration diluter embedded nanofluidic device used for one-shot kinetic analysis. The gradient network generates a concentration gradient of analytes that crosses over surface immobilized probes located in the nanochannel array. The Y-type diluter results in simple chip design and fabrication.

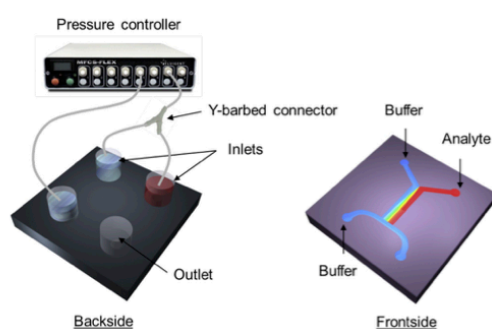


Fig. 2. Schematic diagram of the fluidic setup for the generation of analyte concentration gradients. Analyte (red color) and buffer (blue color) solutions are introduced at the inlet ports using a single pressure source and a Y-barbed connector to maintain the pressure equilibrium between two feeding streams, improving the stability of the concentration gradients within the main microchannel (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

intensity with that of the known analyte concentration close to the inlet of the device. Fig. 3c shows the resulting plot of normalized fluorescence intensities along with the (output numbers) corresponding analyte concentrations. With an optimized flow speed at the input reservoirs, our device was capable of generating the gradients with a concentration range of approximately 2 orders of magnitude. Although this Y-type concentration diluter merely provides a sigmoidal concentration profile in the network, the generated gradient offers a sufficient number of different analyte concentrations within a suitable range for kinetic studies.

To demonstrate the ability of our device to perform one-shot kinetic analysis and to yield reliable kinetic information, kinetic studies of mouse IgG (mIgG-AF 647)/anti-mouse IgG interaction were conducted. The immobilization of anti-IgG probes on the sensor surface was carried out in-situ after chip encapsulation (details of the functionalization protocol can be found in ESI). In this experiment, a 20 nM solution of mIgG-AF 647 was used as an analyte input concentration. Fluorescently labeled analytes at different concentrations produced from the concentration diluter was allowed to interact with the receptor-immobilized sensor surfaces. The binding interactions occurring in 10 separate nanoslits were observed simultaneously under the fluorescence microscope. In order to monitor the dissociation phase, the analyte flow

from the Y-junction input was replaced by a reversed fluid flow from the output microchannel in order to introduce a fresh buffer solution. The total analysis time for complete kinetic experiments, including the association and dissociation steps for a full set of analyte concentrations, was approximately 20 min. This approach is therefore considerably faster than conventional kinetic studies where the total analysis time can reach several hours.

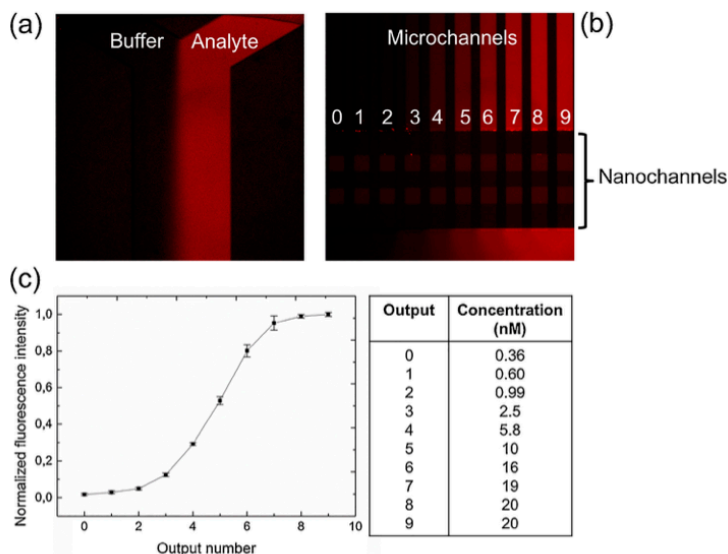
The resulting gradient of concentration is shown in Fig. 4a (with estimated analyte concentrations ranging from 0.57 nM to 20 nM), along with the binding of the IgG to surface-immobilized anti-IgG. The fluorescence signals on the sensor patches gradually increase from the left channel to the right one, concomitantly with the increase in target concentration. In this study, we selected the binding data from the diluter output 1–6 that provide an adequate concentration range for curve fitting. Kinetic constant determination was carried out using an analytical well mixed model, assuming a simple 1:1 interaction and a constant and uniform analyte concentration above the sensor, similarly as in our previous work [27]. Briefly, the binding signal was selected from the regions of interest within the sensor patches for each concentration and the background signal was removed. Fig. 4b displays the kinetic sensorgrams for the IgG/anti-IgG interaction. To determine the binding constants of this interaction, the data were fitted with the well-mixed model and the plot of the apparent time constant as a function of the analyte concentration yielded a linear fit with a slope, i.e. an on-rate  $k_{on}$ , of  $5.3 \pm 0.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9909$ , plot not shown). The dissociation constant was extracted by fitting the dissociation curves with a first-order exponential decay and the average off-rate constant  $k_{off}$  was found to be  $7.8 \pm 0.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . This gives the equilibrium dissociation constant ( $KD$ ) of 1.5 nM. These values are in the same order of magnitude as those measured in a sequential fashion with our NFM platform (i.e.  $k_{on} = 6.0 \pm 0.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $k_{off} = 5.5 \pm 0.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $KD = 0.92 \text{ nM}$ ) [27] and those reported earlier using conventional kinetic experiments [33,34].

#### 4. Conclusions

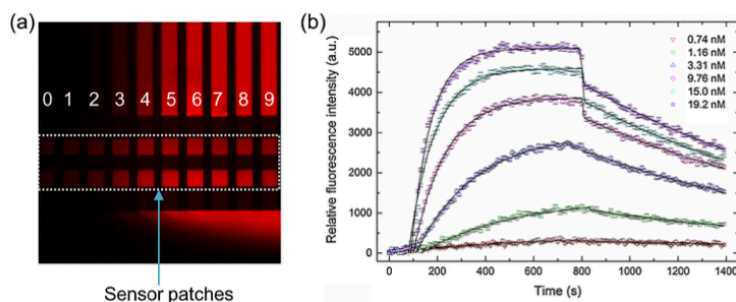
We have demonstrated a convenient, simple and effective on-chip concentration diluter-based nanofluidic fluorescence microscopy for parallel kinetic studies of biomolecular interactions. This represents the first application of one-shot kinetic analysis on a nanofluidic biosensor platform. A mouse IgG/anti-mouse IgG interaction model was used to evaluate the effectiveness of the integrated device. The results show that our system is capable of performing parallel kinetic measurements on a single device, providing accurate and high-throughput access to kinetic information of protein interactions. Since the surface

P. Teerapanich et al.

Sensors &amp; Actuators: B. Chemical 274 (2018) 338–342



**Fig. 3.** (a) Fluorescence image at the Y-junction network where the analyte stream merges with the buffer solution. (b) Fluorescence image of ten channel outputs demonstrating the gradient dilution of analyte concentrations. (c) Plot of the normalized fluorescence intensities for all ten channels, showing a characteristic sigmoidal concentration profile. The error bars represent the fluorescence variations from 10 different regions of interest. The corresponding analyte concentrations are described in the table on the right.



**Fig. 4.** (a) Fluorescence image of the observation area measured upon the binding of analytes at different concentrations with the surface immobilized probes. A mean sensor response was derived from a  $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$  region of interest. (b) Kinetic sensorgrams of the IgG/anti-IgG interaction for various analyte concentrations obtained from one-shot kinetic analysis with the concentration diluter integrated nanofluidic device.

regeneration is not required, this approach offers time-saving assays (~10 times) and substantial reduction of reagent consumption (~1000 times) as compared to traditional kinetic experiments, such as in SPR setup. It is expected that this innovative technology will open up new opportunities for improved high-throughput screening in drug discovery and real-time protein interaction arrays.

#### Acknowledgements

We are grateful to Sandrine Geoffroy, Laboratoire Matériaux et Durabilité des Constructions (LMDC), Toulouse, for her helpful discussion. The authors acknowledge the Programme Blanc jointly sponsored by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-IS10-0001) and the Ministry of Science and Technology, Taiwan (103-2923-M-001-007-MY3), and the MAE (Ministère des Affaires Étrangères) for the doctoral fellowship of P.T. This work was partly supported by the French RENATECH Network, Academia Sinica Integrated Thematic Project (AS-106-TP-A03), and AOARD grant #134023.

#### References

- [1] K. Andersson, R. Karlsson, S. Löfås, G. Franklin, M.D. Hämäläinen, Label-free kinetic binding data as a decisive element in drug discovery, *Expert Opin. Drug*

*Discov.* 1 (2006) 439–446.

- [2] L.G. Fägerstam, A. Frostell-Karlsson, R. Karlsson, B. Persson, I. Rönnerberg, Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis, *J. Chromatogr.* 597 (1992) 397–410.
- [3] R.L. Rich, J.G. Quinn, T. Morton, J.D. Stepp, D.G. Myszka, Biosensor-based fragment screening using FastStep injections, *Anal. Biochem.* 407 (2010) 270–277.
- [4] J.G. Quinn, Modeling Taylor dispersion injections: determination of kinetic/affinity interaction constants and diffusion coefficients in label-free biosensing, *Anal. Biochem.* 421 (2012) 391–400.
- [5] A. Chavanieu, M. Pugnère, Developments in SPR Fragment Screening, *Expert Opin. Drug Discov.* 11 (2016) 489–499.
- [6] O. Nahsol, et al., Parallel kinetic analysis and affinity determination of hundreds of monoclonal antibodies using the ProteOn XPR36, *Anal. Biochem.* 383 (2008) 52–60.
- [7] R.L. Rich, et al., Extracting kinetic rate constants from surface plasmon resonance array systems, *Anal. Biochem.* 373 (2008) 112–120.
- [8] S.G. Patching, Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein ligand interactions and its potential for drug discovery, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 43–55.
- [9] J.A. Maynard, N.C. Lindquist, J.N. Sutherland, A. Lesuffeur, A.E. Warrington, M. Rodriguez, S.H. Oh, Surface plasmon resonance for high-throughput ligand screening of membrane-bound proteins, *Biotechnol. J.* 4 (2009) 1542–1558.
- [10] J. Homola, S.S. Yee, D. Myszka, Chapter 4 – surface plasmon resonance biosensors, *Optical Biosensors*, second edition, Elsevier, 2008, pp. 185–242.
- [11] M. Labib, E.H. Sargent, S.O. Kelley, Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules, *Chem. Rev.* 116 (2016) 9001–9090.
- [12] N.S. Swami, C.F. Chou, R. Terberueggen, Two-potential electrochemical probe for study of DNA immobilization, *Langmuir* 21 (2005) 1937–1941.




- [13] C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault, Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 663–670.
- [14] Y. Liu, X. Yu, R. Zhao, D.H. Shangguan, Z.Y. Bo, G.Q. Liu, Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin G and histidine using quartz crystal microbalance biosensor in solution, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 1419–1427.
- [15] B.J. Sanghavi, S. Sitaula, M.H. Griep, S.P. Karna, M.F. Ali, N.S. Swami, Real-time electrochemical monitoring of adenosine triphosphate in the picomolar to micromolar range using graphene-modified electrodes, *Anal. Chem.* 85 (2013) 8158–8165.
- [16] Y. Gao, L.K. Wolf, R.M. Georgiadis, Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 3370–3377.
- [17] C.W. Wei, J.Y. Cheng, C.T. Huang, M.H. Yen, T.H. Young, Using a microfluidic device for 1  $\mu$ l DNA microarray hybridization in 500 s, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005).
- [18] N. Swami, C.F. Chou, V. Ramamurthy, V. Chaurey, Enhancing DNA hybridization kinetics through constriction-based dielectrophoresis, *Lab Chip* 9 (2009) 3212–3220.
- [19] K.T. Liao, C.F. Chou, Nanoscale molecular traps and dams for ultrafast protein enrichment in high-conductivity buffers, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 8742–8745.
- [20] K.T. Liao, M. Tsegaye, V. Chaurey, C.F. Chou, N.S. Swami, Nano-constriction device for rapid protein preconcentration in physiological media through a balance of electrokinetic forces, *Electrophoresis* 33 (2012) 1958–1966.
- [21] V. Chaurey, A. Rohani, Y.H. Su, K.T. Liao, C.F. Chou, N.S. Swami, Scaling down constriction-based (electrodeless) dielectrophoresis devices for trapping nanoscale bioparticles in physiological media of high-conductivity, *Electrophoresis* 34 (2013) 1097–1104.
- [22] M. Bercovici, C.M. Han, J.C. Liao, J.G. Santiago, Rapid hybridization of nucleic acids using isotachopheresis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 11127–11132.
- [23] J. Khandurina, A. Guttman, Bioanalysis in microfluidic devices, *J. Chromatogr. A* 943 (2002) 159–183.
- [24] B.G. Chung, et al., Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device, *Lab Chip* 5 (2005) 401–406.
- [25] J. Pihl, et al., Microfluidic gradient-generating device for pharmacological profiling, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3897–3903.
- [26] X. Jiang, J.M.K. Ng, A.D. Stroock, S.K.W. Dertinger, G.M. Whitesides, A miniaturized, parallel, serially diluted immunoassay for analyzing multiple antigens, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5294–5295.
- [27] P. Teerapanich, et al., Nanofluidic Fluorescence Microscopy (NFM) for real-time monitoring of protein binding kinetics and affinity studies, *Biosens. Bioelectron.* 88 (2017) 25–33.
- [28] T. Leichlé, C.-F. Chou, Biofunctionalized nanoslits for wash-free and spatially resolved real-time sensing with full target capture, *Biomicrofluidics* 9 (2015) 034103.
- [29] M.A. Holden, S. Kumar, E.T. Castellana, A. Beskok, P.S. Cremer, Generating fixed concentration arrays in a microfluidic device, *Sens. Actuators B Chem.* 92 (2003) 199–207.
- [30] T. Leichlé, et al., Biosensor-compatible encapsulation for pre-functionalized nanofluidic channels using asymmetric plasma treatment, *Sens. Actuators B Chem.* 161 (2012) 805–810.
- [31] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*, second edition, Oxford University Press, 1975.
- [32] J.-B. Salmon, A. Ajdari, P. Tabeling, L. Servant, D. Talaga, M. Joanicot, In situ Raman imaging of interdiffusion in a microchannel, *Appl. Phys. Lett.* 86 (2005) 094106.
- [33] C.-J. Yu, et al., Fiber optic biosensor for monitoring protein binding kinetics, *Proc. SPIE* 5691 (2005) 200–208.
- [34] K.E. Sapsford, Z. Liron, Y.S. Shubin, F.S. Ligler, Kinetics of antigen binding to arrays of antibodies in different sized spots, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5518–5524.

## Spatial Analysis of Nanofluidic-Embedded Biosensors for Wash-Free Single-Nucleotide Difference Discrimination

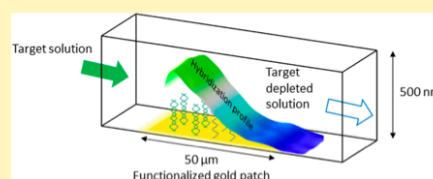
 Jean Cacheux,<sup>†,‡</sup> Marie Brut,<sup>†</sup> Aurélien Bancaud,<sup>†</sup> Pierre Cordelier,<sup>‡,§</sup> and Thierry Leïchle<sup>\*,†,§</sup>
<sup>†</sup>LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France

<sup>‡</sup>Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées, Université Toulouse III Paul Sabatier, INSERM, CRCT, Toulouse, France

 Supporting Information

**ABSTRACT:** In this work, we demonstrate that the analysis of spatially resolved nanofluidic-embedded biosensors permits the fast and direct discrimination of single-nucleotide difference (SND) within oligonucleotide sequences in a single step interaction. We design a sensor with a linear dimension much larger than the channel depth in order to ensure that the reaction over the whole sensor is limited by the convection rate. Thus, the targets are fully collected, inducing a nonuniform spatial hybridization profile. We also use the nanoscale height of the channel, which enables us to minimize the amount of labeled molecules flowing over the sensor and hence to reduce the fluorescence background, to carry out real-time hybridization detection by fluorescence microscopy. Taken together, these design rules allow us to show that the spatial hybridization profile depends on the duplex affinity, and we speculate that the on and off-rate constants can be inferred during target injection, which is not possible in local analysis where the dissociation step through rinsing must be conducted. We finally manage to discriminate a GT mismatch on a microRNA sequence by optimizing the interaction temperature and the probe design after a few minutes of interaction in a single step protocol. This work may be applied to any biosensing transduction scheme with spatial resolution, e.g., surface plasmon resonance imaging, integrated into nanofluidic channels for applications where high oligonucleotide sequence selectivity and short analysis times are required.

**KEYWORDS:** single-nucleotide difference, miRNA, nanofluidics, biosensing, fluorescence, depletion, hybridization



A single-nucleotide difference (SND) can originate from either a polymorphism or a mutation<sup>1</sup> of one base into an oligonucleotide sequence. The gold standard for the identification of such SND is Next Generation Sequencing,<sup>2,3</sup> a costly and time-consuming approach that enables the systematic discovery of new SND. Sanger sequencing that targets specific sequences is another cheaper and faster solution to achieve SND analysis; however, it is not well-suited to short targets, e.g., miRNA, since cloning and amplification steps are carried out before sequencing.<sup>4,5</sup> Following identification, target detection methods using an appropriate probe design, such as DNA microarrays,<sup>6</sup> can be relevant. They mostly consist of measuring the ratio of hybridized duplexes while sweeping the temperature in order to detect a reduced melting temperature (the SND sequence is energetically less stable than the full-match target). Nevertheless, these methods always require a preamplification step via polymerase chain reaction (PCR) because of their low sensitivity.<sup>7,8</sup> Alternative approaches include the use of specific rolling circle amplification,<sup>9</sup> a multistep protocol based on enzymatic reaction and quantum dots labeling. Additional strategies are based on molecular beacons coupled to quantum dots<sup>10</sup> or graphene sheets,<sup>11</sup> both using a specific revelation step and only revealing differences at equilibrium. Also, specific enzymes (T4 RNA ligase and DNAzyme) coupled to gel electrophoresis<sup>12</sup> offer good selectivity but involve multiple preparation steps. Finally,

addressing the association and dissociation rates of the duplex formation may help discriminate single base differences.<sup>13,14</sup> It was shown that the discrimination is clear only during the rinsing step because the dissociation rate is much faster when a mismatch is present in the duplex while no discrimination is possible when solely studying the association rate.<sup>15</sup>

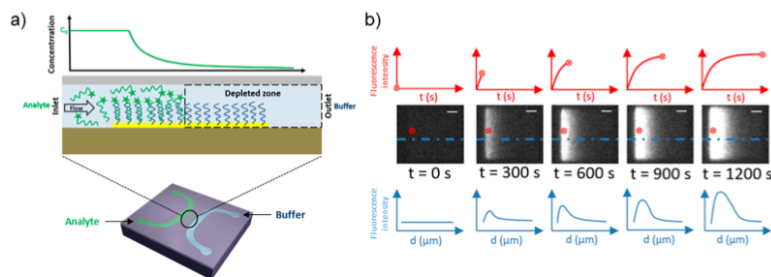
Despite the fact that highly sophisticated detection methods have already been developed, none of them are compatible with direct detection and absolute quantification of oligonucleotides since they often require a cumbersome, multistep protocol including target amplification. Moreover, such technologies rarely point out specificity at the base level (single nucleotide differences, SND) or the stability of the SND/probe duplex that strongly relies on the position and the nature of the bases involved in the mismatch.<sup>16,17</sup>

Here, we present a novel nanofluidic-embedded biosensor functionalized with DNA probe sequences complementary to candidate oligonucleotides, specific enough to detect SND via affinity discrimination in a single-step real-time detection protocol. Our sensing platform relies on the analysis of the spatial hybridization profile along the sensor, derived through fluorescence imaging, that highly relies on the duplex affinity.

Received: September 8, 2017

Accepted: February 13, 2018

Published: February 13, 2018



**Figure 1.** (a) Working principle of the nanofluidic biosensor: target molecules (green) injected in the nanochannel are trapped by the specific probes (blue) immobilized onto a gold patch. This results in a depleted zone, and the concentration of target molecules decreases along the fluid flow. (b) Time-lapse fluorescence images recorded onto the sensor (scale bar = 10  $\mu\text{m}$ ) and data analysis: classical kinetic study is obtained by plotting the fluorescence signal from a spatially resolved specific sensor location (one camera pixel) versus time (top, red), and profile analysis proposed in this work, obtained by plotting the fluorescence intensity along a line of pixels on the sensor versus the distance (bottom, blue).

By optimizing the interaction temperature and the probe design, we manage to discriminate gold-standard, hard-to-detect mismatches on a 22 base single-stranded microRNA sequence within a few minutes of interaction, in the absence of preanalytical processing or a washing step. Taken together, the novel analysis method presented herein not only allows for the real-time identification of microRNA at the single-base level but can also be translated into further applications (DNA, proteins, etc.) with any transduction scheme (surface plasmon resonance, MEMS, etc.) as long as the biosensor is spatially resolved into nanochannels.

## RESULTS AND DISCUSSION

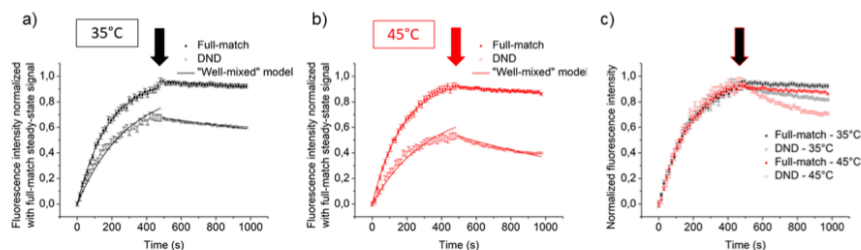
**Nanofluidic-Embedded Biosensing Platform.** The biosensor consists of a functionalized gold patch embedded in a nanochannel connected to two inlet/outlet microchannels. The nanoscale size of the fluidic channel results in several consequences unique to our platform. First of all, the time for molecules to diffuse over the channel height, which is within the millisecond range, is highly shortened in comparison with the travel time by convection over the gold patch. Hence, the sensor operates into a “full target collection” regime where upcoming molecules are consumed by the sensor and a depletion zone forms along the fluid flow (Figure 1a).<sup>18</sup> Besides, because the sensor length (50  $\mu\text{m}$ ) is much larger than the channel height (500 nm), the biochemical reaction over the whole sensor surface is limited by the convection rate. As a result, the reaction rate is not uniform at the sensor surface, unlike what is usually observed in microfluidic devices. By defining a sensor with a high spatial resolution (<1  $\mu\text{m}$ ), it is possible to locally study the molecular interaction and plot the nonuniform reaction rate along the sensor length.

The other consequence of using nanofluidics is that the number of labeled target molecules flowing above the sensor (concentration  $\times$  channel thickness) is reduced and the resulting fluorescent background is negligible. Thus, it is possible to observe the dynamic target/probe molecules reactions in real-time and without the need to wash the channel. Consequently, we can use our sensing platform with standard fluorescence microscopy to probe the sensor surface with high spatial resolution (determined by the camera pixel size) and study dynamic interactions with a simple and standard laboratory equipment.

Using fluorescence images of the biosensor, there are various ways to analyze the signal over the sensor and to derive information on molecular affinity (Figure 1b). The classical approach is based on the spatially localized data, where the fluorescence signal recorded as a function of time results in common kinetic sensorgrams and fitting methods are used to obtain association and dissociation constants. To this aim, the fluorescence signal, i.e. the reacting probe ratio, is measured with a continuous flow of labeled targets. Because the association rate depends on the target concentration, fluorescence intensity is taken at the forefront of the sensor where the target concentration above the sensor equates the solution concentration. Moreover, the signal is measured locally using only one (or a few) pixel in order to be in reaction-rate limited vs convection-limited interaction regime (Figure 1b, top). Then, the sensor is rinsed (by reversing the fluid flow in the nanochannel and allowing buffer solution to flow back on the sensor) to dissociate the probe/target duplexes. Association and dissociation constants are then derived from the kinetic sensorgram using a simple Langmuir fit of the data.

From the same data set, it is also possible to proceed to a global analysis of the sensor by plotting the fluorescence signal along the sensor length following a line of pixels at various times (Figure 1b, bottom). Because of the nonuniform reaction kinetics taking place along the sensor length due to the convection-limited regime and the target depletion layer, this analysis provides additional information on the probe/target interaction. Consequently, same association/dissociation constants can be obtained during a single association step without the need for time-consuming rinsing steps.

**Hybridization Profile Analysis.** When biomolecules with strong affinity interact in appropriate flow conditions, target molecules injected in the nanochannels are captured by the sensor until it saturates and the flowing solution is depleted. As a result, the fluorescence profile along the sensor length exhibits a sharp peak at the front and a rapid decay. Considering the same geometry and flow rate, weaker duplex affinities result in lower reaction rates. The direct consequence is that the amount of target molecules captured at the upcoming sensor surface is lower and a portion of injected targets can flow over the sensor and interact downstream. This leads to the leveling of the fluorescence profile where the signal peak at the front of the sensor is not as high and the decay, not as abrupt. In the extreme case, where the interaction is nonspecific, the reaction



**Figure 2.** Kinetic sensorgrams of the full-match and DND targets at 35 °C (a) and 45 °C (b) after normalizing each set of data using the full-match steady-state value: during these experiments, a 100 nM analyte solution is injected in the nanochannel with a pressure of 10 mbar during 480 s, then the sensor is rinsed with pure buffer by reversing the pressure flow (at the time indicated by the arrow). (c) Same data as in (a) and (b) after normalizing each set of data with its steady state value.

rate is low enough leading to a reaction rate uniform all over the sensor surface and so is the profile.

We have experimentally observed the aforementioned behavior and studied the dependence of the hybridization profile on the duplex affinity using microRNA targets. To this aim, we have selected two targets from the let-7 microRNA family that differ only from two nucleotides (hereinafter called “full-match” for the let-7c sequence and “DND”, i.e., double nucleotide difference, for the let-7f sequence) and one DNA probe sequence that includes locked nucleic acid (LNA) bases complementary to the full-match sequence (p-let-7c-6LNA sequence, see Supporting Information Table S1). First, we studied the kinetics of interaction of each duplex in a classic configuration, where association and dissociation rates are obtained from spatial localized data using the procedure described in the previous section. Since similar affinities were measured at room temperature (see Supporting Information Figure S1a), experiments were conducted at higher temperatures (the affinity of each duplex depends exponentially on the reciprocal of the temperature) to help better discriminate the two targets (Figure 2a and b). It is worth noting that the fluorescence signal could not be directly compared between experiments at different temperatures because the dye yield is temperature-dependent.<sup>19,20</sup> Thus, data were normalized using the steady state fluorescence signal of the full-match sequence for each temperature (Figure 2a and b).

Using the full-match target steady-state signal for data normalization, a difference between the plots for the two targets is clearly observed after target-probe interaction, even at 35 °C (Figure 2a). As expected, better discrimination is obtained by increasing the temperature to 45 °C (Figure 2b). However, experiments conducted at 55 °C (see the Supporting Information Figure S1b) show that the DND target is no longer detected (no hybridization occur on the sensor) while a significant fluorescence is still measurable with the full match target. Using the experimental sensorgrams, binding constants were extracted using a Langmuir fit,<sup>21,22</sup> and then experimental Gibbs free energies were derived for each duplex. These experimental data are in very good agreement with the theoretical energies obtained with molecular dynamics simulations (see data in Table 1 and description of the theoretical data calculation in the Supporting Information).

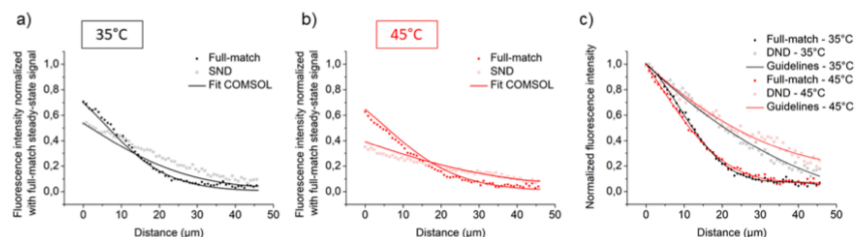
An interesting point is that when the data normalization for full-match and DND is carried out using each steady state value (Figure 2c), no difference is observed during the association step between the signal from the full-match and from the DND

**Table 1.** Experimental and Theoretical Gibbs Free Energies of the Two Targets and the LNA Probe at the Working Temperatures

target	interaction temperature (°C)	$\Delta G_{\text{Gibbs-th}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{Gibbs-exp}}$ (kcal/mol)	error (%)
full-match (let-7c)	35	-12.49	-12.36	1.0
	45	-12.23	-12.18	0.4
DND (let-7f)	35	-11.39	-11.36	0.2
	45	-10.57	-10.59	0.2

targets whatever the operating temperature. Indeed, while the hybridized probe ratio is lower for the DND target, the dynamic behavior of the hybridization is similar. Nevertheless, a clear signal difference is measured during the dissociation step, even after normalization, because the DND unhook much faster than the full-match targets. Furthermore, the dissociation rate does not rely on sample concentration whereas the association rate does: this means that if the sample concentration is unknown, it is mandatory to carry out the dissociation step by rinsing the sensor to achieve proper target discrimination in the absence of reference.

The alternative method to analyze data during the association step, as proposed in this work, is to plot the hybridization profile along the sensor instead of providing a local analysis vs time. Similar to kinetic analysis, the fluorescence response is first normalized using the steady state signal of the full-match target (Figure 3a and b). In addition, and because the flow velocity increases by approximately 20% due to the change in solution viscosity when shifting temperature, data are collected 360 and 300 s after injecting the sample for experiments performed at 35 and 45 °C, respectively. This ensures an equivalent amount of molecules (~500 zeptomoles) injected into the sensor. As with the kinetic analysis, a clear signal difference between the two sequences is detectable at 35 °C, because the duplex binding constant is weaker for the DND target. Consequently, the number of hybridized probes at equilibrium is lower and target molecules that do not interact with probes at the beginning of the sensor are carried out by the fluid flow and have the ability to do so downstream. This phenomenon may account for a lower response at the front of the sensor in case of the DND target while the measured fluorescence intensity is higher further down. The interesting feature of this analysis strategy is that when each profile is normalized with its own steady state



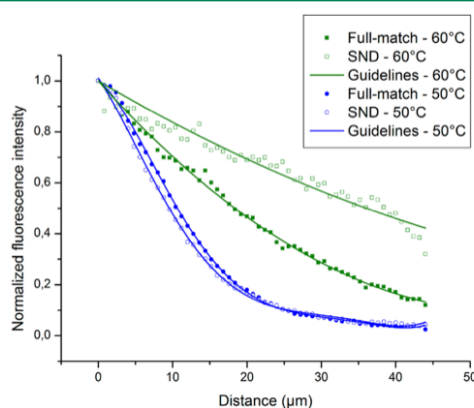
**Figure 3.** Hybridization profiles recorded during the association step (a) at 35 °C after 360 s of interaction and (b) at 45 °C after 300 s of interaction, all normalized using the full-match target steady state signal. (c) Same data as in (a) and (b) after normalizing each set of data with its steady state value.

value (Figure 3c), differences in the spatial profiles of the full-match and DND targets are still clear unlike what is observed on the association part of the sensorgrams (Figure 2c). A COMSOL simulation (fitting method in the Supporting Information) using the experimental affinity constants obtained from the sensorgram fits confirms the influence of the differences in affinity on the hybridization profile ( $R^2 = 0.9903$ ).

**Discrimination of Single Base Difference within MicroRNA Family Members.** To demonstrate the high selectivity of our nanofluidic-embedded biosensor platform coupled to the proposed spatial profile analysis, we have selected two microRNA targets very difficult to discriminate, let-7b and let-7c, belonging to the same microRNA family (let-7), in which sequences differ only by one nucleotide. The sixth adenine nucleotide (A) from the let-7c sequence is replaced by a guanine base (G) in the let-7b sequence leading to a guanine-thymine mispairing upon hybridization with the let-7c complementary probe (p-let-7c-3LNA), which is one of the most stable mismatches ( $\Delta T_m \sim 1$  °C). To increase the probe affinity with the RNA targets and improve the selectivity of the probe,<sup>23,24</sup> we have designed probes with added LNA nucleotides at the SND position and the two nearby bases (cf. Table S1 in the Supporting Information). Next, the hybridization temperature was optimized using melting curves, during which the ratio of hybridized probe is measured on the sensor at a constant target concentration with increasing temperature. Since a slight signal difference between the two target sequences was observed from 50 to 60 °C (Figure S2, not seen with classic DNA probes), this temperature range was selected for the hybridization experiments. The resulting hybridization profiles for the full-match and SND sequences at both temperatures are shown in Figure 4: while discrimination is tenuous at 50 °C, a difference between the profiles is clearly observed after a few minutes of interaction at 60 °C, demonstrating that, following fine-tuning of the experimental conditions, the spatial analysis of the nanofluidic-embedded biosensor provides means to quickly and selectively distinguish SND in a single-step interaction.

## CONCLUSION

In this work, we present a novel microfluidic setting affording real-time detection of microRNA and selective enough to discriminate these tiny molecules at a single-base level. Moreover, this work describes for the first time a new analysis strategy for affinity biosensors operating in a convection-limited regime and full target collection with spatial resolution. Indeed, the hybridization profile measured at the sensor surface



**Figure 4.** Hybridization profiles recorded after 1200 s of interaction at 50 and 60 °C for the SND and the full-match targets (applied pressure: 5 mbar).

provides additional information compared to classically non-spatially resolved analysis due to the nonuniform hybridization rate along the sensor. Hence, kinetic data can possibly be derived during the association step only since it involves multiple binding and unbinding events along the fluid flow. This analysis stands out from classical kinetic approaches where full sensorgrams obtained not only through association but also dissociation require to rinse the sensor. Additionally, we have demonstrated that, by optimizing the operating temperature and the probe design, we could discriminate one of the most stable SNDs in a few minutes. Hence, this work opens doors to many applications where high-selectivity and short analysis times are requested. We suggest that it could be a suitable technique to detect DNA mutation or methylation, another landmark of (epi)genetic modification, which seems to modulate DNA duplex affinity.<sup>25</sup> More generally, the presented analysis method can also be applied to any transduction scheme for spatially resolved biosensors integrated into nanofluidic channels.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials and Reagents.** Oligonucleotides (targets and probes) sequences were synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium) (cf. sequences in the Supporting Information Table S1). Buffer solution

PBS 1× was purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA). Mercaptoethanol (MCE) was purchased from Sigma-Aldrich.

**Fabrication of Biofunctionalized Nanofluidic Devices.** The chip microfabrication process has been previously described.<sup>26</sup> The functionalization protocol used to graft the probe molecules onto gold patches embedded in the nanofluidic channels was carried out before chip sealing. Briefly, it consists in a 1 h incubation of thiolated DNA probes (p-let7-c-3LNA or p-let7-c-6LNA in Table S1) followed by a 1 h incubation of MCE after deionized water rinsing and N<sub>2</sub> drying.<sup>27</sup> Encapsulation of the fabricated micro- and nanochannels was carried out by means of a hard-PDMS coated cover glass activated with oxygen plasma at room temperature, as described previously.<sup>28</sup>

**Fluorescence Interaction.** After sensor functionalization and chip encapsulation, fluorescently labeled microRNA targets diluted at 100 nM in PBS 1× solution were introduced in the nanofluidic channels using pressure driven flow (MFCS, fluidigent). Applied pressure during the experiments was 5 or 10 mbar. Binding of the fluorescent targets to the biosensor surface immobilized with probe molecules was monitored in real-time using an inverted fluorescence microscope (Olympus IX71) coupled to a light source (lumencor, SOLA 6-LCR-SB) and an EMCCD (iXon<sup>EM</sup> + 885, Andor) with a 20× objective and a Cy3-dedicated filter set (41007a-Cy3, chroma). The exposure time was 200 ms, and the imaging period was 15 or 30 s. Reverse buffer flow operation with PBS 1× was used to achieve full kinetic sensorgrams (association and dissociation phases). Temperature was controlled via the PE94 LinkPad temperature controller from Linkam (UK).

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acssensors.7b00667.

Table of oligonucleotide sequences, kinetic sensorgrams of the full-match and DND targets at room temperature and 55 °C, on chip melting curves for the SND and the full-match targets, profile fitting method with COMSOL simulation, and theoretical Gibbs free energy calculation method (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [leichle@laas.fr](mailto:leichle@laas.fr).

### ORCID

Aurélien Bancaud: 0000-0002-0308-249X

Thierry Leichlé: 0000-0003-3183-8976

### Author Contributions

<sup>§</sup>P.C. and T.L. contributed equally to this work. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge ANR-13-IS10-0001, IDEX Programme Oncodevice Action Thématique Stratégique 2013 Université Fédérale de Toulouse, Fondation ARC program Jeune Chercheur for funding. We thank CALMIP supercomputer center for CPU resources.

## ■ ABBREVIATIONS

SND, single nucleotide difference; DND, double nucleotide difference

## ■ REFERENCES

- (1) Karki, R.; Pandya, D.; Elston, R. C.; Ferlini, C. Defining 'mutation' and 'polymorphism' in the era of personal genomics. *BMC Med. Genomics* **2015**, *8*, 37.
- (2) Nielsen, R.; Paul, J. S.; Albrechtsen, A.; Song, Y. S. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 443–451.
- (3) Li, R.; Li, Y.; Fang, X.; Yang, H.; Wang, J.; Kristiansen, K.; Wang, J. SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. *Genome Res.* **2009**, *19*, 1124–1132.
- (4) Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5463–5467.
- (5) Mullikin, J. C.; Hunt, S. E.; Cole, C. G.; Mortimore, B. J.; Rice, C. M.; Burton, J.; Matthews, L. H.; Pavitt, R.; Plumb, W.; Sims, S. K.; Ainscough, R. M. R.; Attwood, J.; Bailey, J. M.; Barlow, K.; Bruskiewich, R. M. M.; Butcher, P. N.; Carter, N. P.; Chen, Y.; Clee, C. M.; Coghill, P. C.; Davies, J.; Davies, R. M.; Dawson, E.; Francis, M. D.; Joy, A. A.; Lample, R. G.; Langford, C. F.; Macarthy, J.; Mall, V.; Moreland, A.; Overton-Larty, E. K.; Ross, M. T.; Smith, L. C.; Steward, C. A.; Sulston, J. E.; Tinsley, E. J.; Turney, K. J.; Willey, D. L.; Wilson, G. D.; McMurray, A. A.; Dunham, I.; Rogers, J.; Bentley, D. R. An SNP map of human chromosome 22. *Nature* **2000**, *407*, 516–520.
- (6) Urakawa, H.; El Fantroussi, S.; Smidt, H.; Smoot, J. C.; Tribou, E. H.; Kelly, J. J.; Noble, P. A.; Stahl, D. A. Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 2848–2856.
- (7) Upadhyaya, A.; Smith, R. A.; Chacon-Cortes, D.; Revêchon, G.; Bellis, C.; Lea, R. A.; Haupt, L. M.; Chambers, S. K.; Youl, P. H.; Griffiths, L. R. Association of the microRNA-Single Nucleotide Polymorphism rs2910164 in miR146a with sporadic breast cancer susceptibility: A case control study. *Gene* **2016**, *576*, 256–260.
- (8) Qi, J.-H.; Wang, J.; Chen, J.; Shen, F.; Huang, J.-T.; Sen, S.; Zhou, X.; Liu, S.-M. High-resolution melting analysis reveals genetic polymorphisms in MicroRNAs confer hepatocellular carcinoma risk in Chinese patients. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 643–655.
- (9) Zeng, Y.; Zhu, G.; Yang, X.; Cao, J.; Jing, Z.; Zhang, C. A quantum dot-based microRNA nanosensor for point mutation assays. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7160–7162.
- (10) Guo, Q.; Bai, Z.; Liu, Y.; Sun, Q. A molecular beacon microarray based on a quantum dot label for detecting single nucleotide polymorphisms. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 107–110.
- (11) Mehdi Khoshfetrat, S.; Mehrgardi, M. A. Dual amplification of single nucleotide polymorphism detection using graphene oxide and nanoporous gold electrode platform. *Analyst* **2014**, *139*, 5192–5199.
- (12) Park, K.; Choi, B.; Kim, Y. S.; Shin, S.; Hah, S. S.; Jung, W.; Oh, S.; Kim, D. Detection of single-base mutation in RNA using T4 RNA ligase-based nick-joining or DNazyme-based nick-generation. *Anal. Biochem.* **2011**, *414*, 303–305.
- (13) Yoon, H. R.; Lee, J. M.; Jung, J.; Lee, C.; Chung, B. H.; Jung, Y. Highly improved specificity for hybridization-based microRNA detection by controlled surface dissociation. *Analyst* **2014**, *139*, 259–265.
- (14) Peterson, A. W.; Wolf, L. K.; Georgiadis, R. M. Hybridization of Mismatched or Partially Matched DNA at Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14601–14607.
- (15) Qavi, A. J.; Mysz, T. M.; Bailey, R. C. Isothermal Discrimination of Single-Nucleotide Polymorphisms via Real-Time Kinetic Desorption and Label-Free Detection of DNA Using Silicon Photonic Microring Resonator Arrays. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6827–6833.
- (16) Naiser, T.; Kayser, J.; Mai, T.; Michel, W.; Ott, A. Position dependent mismatch discrimination on DNA microarrays – experiments and model. *BMC Bioinf.* **2008**, *9*, 509–521.
- (17) Pan, S.; Sun, X.; Lee, J. K. Stability of complementary and mismatched DNA duplexes: Comparison and contrast in gas versus solution phases. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *253*, 238–248.
- (18) Squires, T. M.; Messenger, R. J.; Manalis, S. R. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 417–426.

- (19) Sun, H.; Xiang, J.; Zhang, X.; Chen, H.; Shi, Y.; Yu, L.; Yang, Q.; Li, Q.; Guan, A.; Tang, Y. A colorimetric temperature sensor of a cyanine dye supramolecule and its application in reversible switch. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *105*, 071914.
- (20) Sanborn, M. E.; Connolly, B. K.; Gurunathan, K.; Levitus, M. Fluorescence Properties and Photophysics of the Sulfoindocyanine Cy3 Linked Covalently to DNA. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11064–11074.
- (21) Vijayendran, R. A.; Ligler, F. S.; Leckband, D. E. A Computational Reaction–Diffusion Model for the Analysis of Transport-Limited Kinetics. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5405–5412.
- (22) Wang, J.-Y.; Drlica, K. Modeling hybridization kinetics. *Math. Biosci.* **2003**, *183*, 37–47.
- (23) You, Y.; Moreira, B. G.; Behlke, M. A.; Owczarzy, R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e60.
- (24) Castoldi, M.; Schmidt, S.; Benes, V.; Noerholm, M.; Kulozik, A. Z.; Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* **2006**, *12*, 913–920.
- (25) Karberg, M.; Leavitt, R.; Cabaya, D. A.; Eden, M. V.; Jia, X. Y. Abstract #5147: A method for quantifying DNA methylation percentage without chemical modification. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 5147–5147.
- (26) Teerapanich, P.; Pugnière, M.; Henriquet, C.; Lin, Y.; Chou, C.; Leichlé, T. Nanofluidic Fluorescence Microscopy (NFM) for real-time monitoring of protein binding kinetics and affinity studies. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *88*, 25–33.
- (27) Wong, E. L. S.; Chow, E.; Gooding, J. J. DNA Recognition Interfaces: The Influence of Interfacial Design on the Efficiency and Kinetics of Hybridization. *Langmuir* **2005**, *21*, 6957–6965.
- (28) Leichlé, T.; Lin, Y.; Chiang, P.; Hu, S.; Liao, K.; Chou, C. Biosensor-compatible encapsulation for pre-functionalized nanofluidic channels using asymmetric plasma treatment. *Sens. Actuators, B* **2012**, *161*, 805–810.



# Lab on a Chip

PAPER

View Article Online  
View Journal | View Issue



Cite this: *Lab Chip*, 2015, 15, 833

## Integration of lateral porous silicon membranes into planar microfluidics

Thierry Leichlé<sup>\*ab</sup> and David Bourrier<sup>ab</sup>

Received 17th September 2014,  
Accepted 19th November 2014

DOI: 10.1039/c4lc01094a

www.rsc.org/loc

In this work, we present a novel fabrication process that enables the monolithic integration of lateral porous silicon membranes into single-layer planar microchannels. This fabrication technique relies on the patterning of local electrodes to guide pore formation horizontally within the membrane and on the use of silicon-on-insulator substrates to spatially localize porous silicon within the channel depth. The feasibility of our approach is studied by current flow analysis using the finite element method and supported by creating 10  $\mu\text{m}$  long mesoporous membranes within 20  $\mu\text{m}$  deep microchannels. The fabricated membranes are demonstrated to be potentially useful for dead-end microfiltration by adequately retaining 300 nm diameter beads while macromolecules such as single-stranded DNA and immunoglobulin G permeate the membrane. The experimentally determined fluidic resistance is in accordance with the theoretical value expected from the estimated pore size and porosity. The work presented here is expected to greatly simplify the integration of membranes capable of size exclusion based separation into fluidic devices and opens doors to the use of porous silicon in planar lab on a chip devices.

### Introduction

Lab on a chip devices aim at integrating functions routinely used in medical laboratories into miniaturized chips to target health care applications with a promising impact foreseen in point-of-care testing.<sup>1</sup> Among these fundamental operations, sample preparation, which is to be performed prior to sample analysis, involves many steps to result in a purified sample. While several techniques have been recently developed to carry out this task on-chip,<sup>2,3</sup> the use of porous membranes is an evident choice given their long history in separation science.

Lately, there has been growing interest in integrating porous membranes into microfluidics for various purposes especially some related to sample pre-treatment, *e.g.* sample filtration<sup>4–6</sup> and sample concentration.<sup>7–9</sup> As a result, there are now many methods and materials available to create membranes from porous elements and integrate them onto chips.<sup>10</sup> Various strategies that have been developed for membrane integration include the direct incorporation of membranes into channels during chip assembly,<sup>11,12</sup> the *in situ* fabrication of membranes within already existing enclosed channels,<sup>13,14</sup> the realization of membranes during the chip fabrication process,<sup>15,16</sup> and the direct use of membrane properties of the bulk-chip material.<sup>17,18</sup> In addition to the diversity in integration methods, the range of materials

constituting membranes is wide, spanning from polymers, hydrogels, to ceramics and silicon.

One of the materials used as membrane constituents, porous silicon is of special interest because of the specific advantages it offers in addition to the obvious size exclusion based filtering capability. Indeed, charge effects contribute to the ion selectivity properties of nanoporous silicon,<sup>19</sup> and selective mass-transport of reagents can be achieved by tuning the surface chemistry of the membrane pores.<sup>20</sup> Moreover, if appropriately functionalized with biological probes, porous silicon can serve as a biosensing layer due its unique optical properties,<sup>21,22</sup> thus allowing sample preparation and analysis to be carried out by a single element.<sup>23</sup> However, in a dead-end configuration (*vs.* cross-flow), integration of porous silicon membranes is currently achieved by sandwiching the membrane between two micromachined layers bearing fluidic channels (Fig. 1a), because silicon pores are created through the substrate.<sup>24</sup> This results in three-dimensional (3D) fluidic networks that lack the simplicity of operation and direct observation accessibility of planar microfluidic devices. Besides, these hybrid processes do not offer design flexibility and clearly limit membrane integration into lab on a chip.

To tackle this constraint, we propose a fabrication method enabling the monolithic integration of porous silicon membranes into planar, two-dimensional (2D) microfluidics. The feasibility of our approach relies on pores created parallel to the substrate surface so that they run laterally within the membrane and bridge microchannels lying in the same

<sup>a</sup> CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France.

E-mail: tleichle@laas.fr

<sup>b</sup> Univ de Toulouse, LAAS, F-31400 Toulouse, France



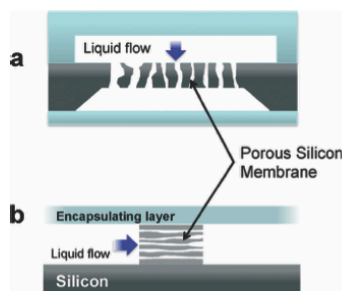


Fig. 1 Schematics showing the difference between (a) transverse and (b) lateral porous membranes integrated into 3D and 2D fluidic systems, respectively.

plane, as depicted in Fig. 1b. Pores are grown in a lateral fashion by controlling the position of the current source and the direction of the current flow during silicon anodization, in a configuration similar to the one reported for the fabrication of lateral porous alumina membranes.<sup>25,26</sup> Technically, in our case, this is achieved by injecting charges through electrodes that are locally patterned within microchannels etched on the top layer of a silicon-on-insulator (SOI) wafer. Our proposed fabrication process was used to create 10  $\mu\text{m}$  long mesoporous membranes within 20  $\mu\text{m}$  deep microchannels. We show preliminary experiments demonstrating the capability of the porous membrane to remove unwanted components from a solution in a dead-end filter configuration. The permeation of small molecules and the retention of polymer microspheres mimicking larger biological species are in accordance with the measured average pore size of the fabricated membranes.

## Concept – finite element simulation

The most common method used to fabricate porous silicon is the electrochemical anodization of a silicon substrate in a hydrogen fluoride (HF) electrolyte. The mechanism leading to the dissolution of silicon and the formation of pores relies on the local oxidation of silicon due to the injected current (holes) that is subsequently etched in HF.<sup>27</sup> The propagation of pores is dictated by various mechanisms but always follows the electrical current lines.

In a classical etch cell set up, the current is injected *via* the backside of (*i.e.* through) a silicon wafer so that the current flows in a direction perpendicular to the silicon surface, leading to the formation of vertical pores (with respect to the surface of the wafer). However, for porous silicon membranes to be used as dead-end filters in planar microfluidics, pores have to be horizontally distributed in the membrane in order to connect the inlet and outlet microchannels. In order to do so, our approach relies on the use of electrodes patterned on one of the sidewalls of a step bridging two microchannels in order to inject the current on one side of that step while the electrochemical reaction occurs on the other sidewall. This

configuration leads to the current flowing horizontally to the silicon surface through the step so that the pores propagate in a lateral fashion until the step is fully converted into a porous membrane.

In order to investigate the feasibility of our approach, we have first studied the orientation of the current flowing within silicon by means of finite element analysis (FEA, COMSOL Multiphysics 4.0a) in two etching configurations. The electrochemical cell was simplified to a 2D model and the Electric Currents physics interface was used to compute electrical currents and potentials. The steady-state solutions were obtained for a 1 V potential difference applied between the electrodes located on the silicon and in the electrolyte and for electrical conductivity and relative permittivity values found in the literature<sup>28</sup> and in the COMSOL material library (Si:  $\sigma = 10^5 \text{ S m}^{-1}$ ,  $\epsilon_r = 12.1$ ; electrolyte:  $\sigma = 10^4 \text{ S m}^{-1}$ ,  $\epsilon_r = 80.1$ ). Fig. 2 presents simulation results, displaying the current flow (white arrows) and potential (color scale) within the bulk silicon and the electrolyte in the case of classically fabricated vertical pores (Fig. 2a, upon current injection at the bottom of the silicon substrate) and in the case of pore formation within the membrane (Fig. 2b, upon current injection within the side-wall electrode). As expected, while the current flows vertically in the former case, leading to the formation of classically reported vertical pores, the use of local electrodes patterned on the membrane wall forces the current to flow through the silicon membrane. From the simulation results of Fig. 2b, we can reveal that in order to confine the current flow lines to the step/membrane, it has to be electrically isolated from the silicon substrate. In this case, the electrode patterned on the surface of the silicon wafer does not inject any charges into the substrate. Thus, our proposed method relies on using electrodes patterned on the membrane in combination with the use of silicon-on-insulator substrates. This method should lead to pore propagation solely into the membrane in a lateral fashion while preventing pore propagation in the substrate, hence resulting in a confined porous membrane within the channel.

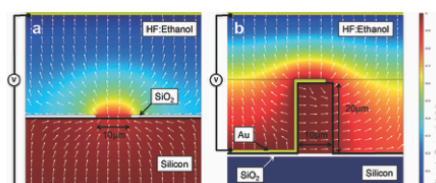
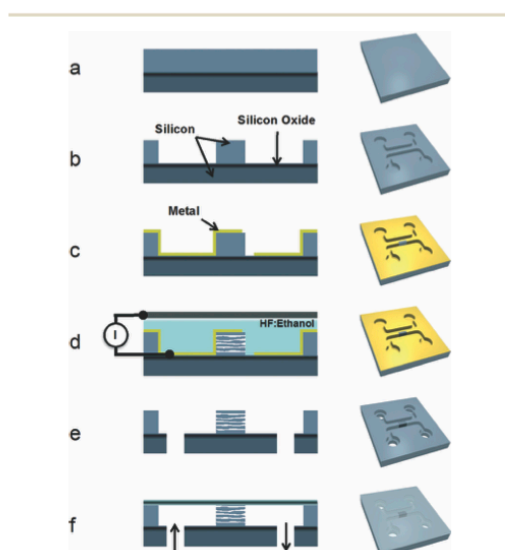


Fig. 2 Finite element analysis 2D models of the fabrication of porous silicon *via* (a) the classical approach, where current injected at the backside of the silicon wafer flows perpendicular to the surface of the substrate and thus leads to the formation of vertical pores; (b) the proposed approach, where current injected *via* a locally patterned electrode through a step formed within the top layer of a silicon-on-insulator wafer flows horizontally and thus leads to the formation of lateral pores. The white arrows represent the direction of current flow and the color scale indicates the local potential.

## Device fabrication

To demonstrate the feasibility of our approach, microfluidic chips with integrated lateral porous silicon membranes were fabricated following the process shown in Fig. 3. The key steps of this process are firstly the fabrication of a solid membrane bridging two etched microchannels and secondly, in a single step, the protection of the silicon surface except that of the membrane sidewall where pores are to be created and the patterning of an electrode to provide charges on the opposite membrane sidewall.

Confinement of the porous membrane within the microchannel depth was achieved using a silicon-on-insulator wafer as a starting substrate (P-type,  $d = 100$  mm,  $t = 20/2/450$   $\mu\text{m}$ ,  $\rho = 0.01\text{--}0.02/0.015$   $\Omega$  cm, Shin-Etsu). The dopant type and concentration of the top silicon layer were selected to allow mesoporous silicon formation upon anodization of the membrane without the use of external illumination. The large thickness of that top silicon layer was desired for channels to be deep enough to permit the generation of reasonable volumetric flow rates by means of a conventional pressure source routinely used in microfluidics (*i.e.* providing a 1 bar maximum applied pressure).



**Fig. 3** Fabrication process of the fluidic chip with an integrated lateral porous silicon membrane (left: section view; right: three-dimensional representation). (a) The starting substrate consists of a SOI wafer. (b) Dry etching of the top silicon layer down to the buried oxide is used to create microchannels. (c) A metal layer used as the working electrode is deposited in a conformal way and etched where anodization of silicon is to be initiated. (d) Silicon anodization is carried out in a HF: ethanol bath. (e) Fluidic inlets and outlets are realized by means of sandblasting. (f) The channels are sealed by anodic bonding.

The process started by deep reactive ion etching the inlet and outlet microchannels using the buried oxide as an etch stop layer (Fig. 3b). Integration of the lateral porous silicon membrane was then carried out by anodizing a portion of the bulk silicon lying in between the two channels. For this purpose, an electrode was created by first sputtering 100 nm/500 nm Cr/Au layers in a conformal way to ensure the presence of metal on the sidewalls of the bulk silicon part to permeate. After appropriate annealing (250 °C, 20 min), the metal was then patterned by means of photolithography using a thick photoresist (AZ 40XT), followed by wet etching in appropriate baths in order to access the opposite silicon membrane sidewall, where pore formation was to be initiated (Fig. 3c). This metal layer was not only used as an electrode to bring charges within the doped silicon for anodization but it also acted as a protective layer for the remaining area where porous silicon was undesired. Finally, the formation of pores within the membranes was achieved by anodic dissolution of silicon in a 1 : 1 ethanol : 48% aqueous HF solution for 2 min at a current density of 200 mA cm<sup>-2</sup> (Fig. 3d). The electric current was injected into the patterned electrodes (used as the anode) on the front side of the wafer, while the cathode consisted of a platinum disk immersed in the solution and facing the wafer in the electrolyte bath. It is important to note here that since silicon oxide was etched by the electrolyte, the anodization time could not exceed the time it takes to fully etch the buried layer because of possible device failure. This restriction thus limited the maximum thickness of the porous membrane. Following the anodization step, both Cr/Au metal layers were removed in wet etch baths. In order to create fluidic inlets/outlets and connect the fluidic chip to reservoirs, holes were drilled through the silicon wafer by sandblasting (Fig. 3e). The channels were then encapsulated by anodic bonding the silicon chips bearing the fluidic channels to a 150  $\mu\text{m}$  thick transparent borofloat 33 wafer (Schott) at 370 °C,  $5 \times 10^{-5}$  mbar, and 600 V for 10 min. Finally, individual chips were obtained by dicing the borofloat substrate.

A typical 1.6 cm  $\times$  1.6 cm fabricated chip is shown in Fig. 4a. The microfluidic chip bears two 20  $\mu\text{m}$  deep microchannels, each having two inlet/outlet holes that are separated by a 10  $\mu\text{m}$  thick porous silicon membrane (Fig. 4b). Fig. 4c and d display cross section SEM images of the fabricated mesoporous membrane. The formation of pores is initiated on one side of the membrane sidewall and they propagate through the membrane by following the current density lines until they reach the electrode placed on the opposite sidewall, *i.e.* where holes are injected. Thus, as expected, silicon anodization results in the creation of a membrane displaying horizontal/lateral pores bridging the two microchannels.

## Filtering experiments

Experiments were carried out to demonstrate that the fabricated pores are open-ended pipes that adequately connect the microchannels situated on both sides of the membrane. Various size objects (300 nm diameter beads, 40-mer

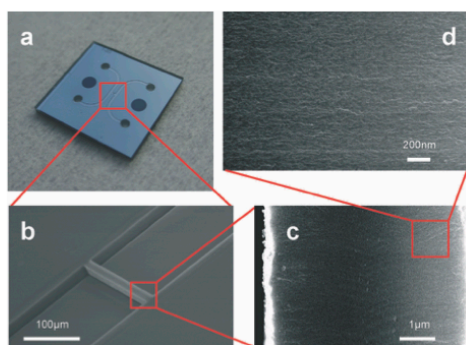


Fig. 4 (a) Optical photograph of a fabricated fluidic chip integrating a lateral porous silicon membrane. (b) SEM picture of the lateral porous silicon membrane bridging two fluidic microchannels. (c) and (d) SEM section views of the fabricated membrane. The membrane thickness is 10  $\mu\text{m}$ .

single-stranded DNA and immunoglobulin G (IgG) molecules) were used to prove the dead-end filtration capability of the porous membranes.

Initial chip loading was achieved by injecting DI (deionized) water into the fluidic inlets of the two microchannels. Then, the test solutions were sequentially flown through the membrane by loading the left side microchannel and applying various pressures between both microchannels, *i.e.* across the membrane, by means of a pressure generator (MFCS-8C, Fluigent). All solutions were appropriately degassed before loading. The test solutions consisted of 300 nm diameter green fluorescent polystyrene microspheres (Duke Scientific) diluted in DI water at a final concentration of  $7.4 \times 10^7$  beads  $\text{mL}^{-1}$ , Cy3-labelled 40-mer single-stranded DNA (5'-CY3-GTC TAT AAA CAA AGT CTT CCT GGA AGT AAT TGT AAG CAT C-3', Unimed Healthcare Inc.) at 1  $\mu\text{M}$  in DI water, and Alexa Fluor 660 donkey anti-goat IgG (Invitrogen) diluted at 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in phosphate buffered saline (PBS) 1 $\times$ . Fluorescence images were obtained during the experiments by means of a IX70 Olympus inverted epifluorescence microscope equipped with 10 $\times$  and 20 $\times$  objectives and appropriate filters (UMWIB3 from Olympus, U-M41007 and U-M41008 from Chroma) and an Andor iXon 885 EMCCD camera (with acquisition time/kinetic cycle time in the range of 0.1–0.5 s/0.5–1 s).

Fig. 5 presents sequential images recorded while flowing solutions back and forth through the membrane for the case of the three different dissolved species. First, loaded 300 nm diameter microspheres did quickly accumulate at the microchannel/membrane interface when positive pressure was applied between the left-hand side and the right-hand side microchannels filled with bead solution and DI water, respectively (Fig. 5b). Reversing the pressure resulted in the majority of beads to flow outward the membrane surface into the left microchannel, while few beads remained stuck to the membrane surface due to non-specific adsorption. Observation of

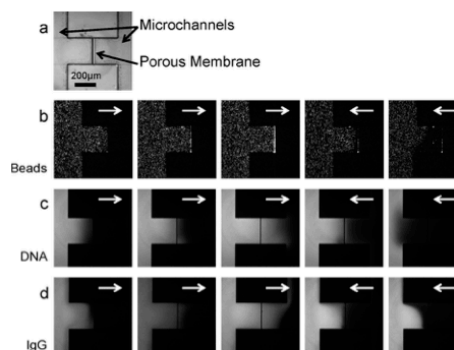


Fig. 5 Filtering capability of the fabricated membrane tested by flowing fluorescent beads and macromolecules. (a) Bright field optical picture of the microchannels with an integrated membrane. (b) Test flow of 300 nm beads retained by the membrane. (c) and (d) 40-mer single-stranded DNA and IgG molecules flowing back and forth through the membrane. The pictures are presented sequentially from left to right and the white arrows indicate the direction of the fluid flow that is inverted during the experiment.

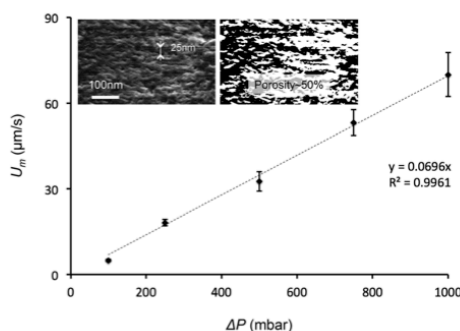
this pressure-driven flow indicated that the pores were open-ended pipes. After loading the left microchannel with the 40-mer single-stranded DNA sample (Fig. 5c), a rise of the fluorescence level was observed in the right-hand side of the membrane upon pressure increase, thus demonstrating that DNA strands flowed through the membrane. This situation was reversible since applying the positive pressure on the right-hand side channel led to a fluorescence decrease in both microchannels, showing that the DNA molecules could flow backwards into the feeding channel. Fig. 5d illustrates that the exact same behavior was obtained when flowing IgG molecules in the porous silicon chip.

The outcome of these experiments is that full retention is achieved for 300 nm size beads, while small molecules permeate the porous membrane. It can be concluded that size exclusion based separation can be accomplished with the presented fluidic chip integrating a lateral porous silicon membrane. The experimental results indicate that the cut-off size of the fabricated membrane is larger than  $\sim 10$  nm (40-mer single-stranded DNA displays a 4 nm minimum radius of gyration,<sup>29</sup> and IgG molecules have a 5.29 nm hydrodynamic radius<sup>30</sup>) but much smaller than the 300 nm diameter of the beads. This range is consistent with the  $\sim 25$  nm average pore size of the fabricated membrane estimated from the SEM picture shown in Fig. 6.

## Measurement of the hydrodynamic resistance

Finally, the hydrodynamic resistance of the fabricated membrane, which is an essential characteristic used in the design consideration of fluidic and lab on a chip devices, was experimentally estimated. To this aim, the pressure-driven flow

Lab on a Chip



**Fig. 6** Graph showing the measured flow velocity as a function of the pressure applied across a membrane. From the linear relationship, we can deduce the hydrodynamic resistance of the membrane. The two insets show SEM pictures of the porous membrane used to estimate the mean pore size and the layer porosity (the right inset shows a binary image after threshold conversion of the left inset image).

velocity induced in the microchannels was measured by manually tracking the position of 300 nm fluorescent polymer microspheres for applied pressures ranging from 0.1 bar to 1 bar.

In brief, following the experimental protocol described in the previous section, where beads were introduced into the left side microchannel, a constant pressure was generated at the inputs of the right-hand side microchannel causing the particles to flow inward the left microchannel. This was conducted after ensuring that pressure was equilibrated between the various inlets/outlets (*i.e.* upon observation of a net null flow velocity with beads experiencing only Brownian motion). The particle velocity was measured in the straight channel and in the vicinity of the membrane by averaging the displacement of 5 nanobeads over time, where each particle position (pixel location) was directly extracted from the recorded images using ImageJ. To ensure that the measurements reflect the maximum flow velocity as adequately as possible, care was taken to position the focus plane in the middle of the channel depth and only beads in focus were tracked. Finally, given the fact that particle velocity increases with applied pressure, measurements were carried out over 3 s at 1 bar applied pressure and up to 25 s at 100 mbar (corresponding to the analysis of 7 and 51 acquired frames, respectively). The resulting increase in measured velocity with applied pressure is shown in Fig. 6.

The hydrodynamic resistance of a fluidic network linearly relates the fluid flow  $Q$  to the applied pressure  $\Delta P$ . The resistance of the fabricated membrane  $R_h$  was thus extracted from the linear fit of the experimental data, by neglecting the resistance contribution of the microfluidic channels. This resulted in a value of  $2.9 \times 10^{-1} \text{ Pa s } \mu\text{m}^{-3}$  for the 10  $\mu\text{m}$  thick porous membrane. Theoretically, the hydrodynamic resistance of an idealized membrane of cylindrical pores with the same radius can be obtained from the Hagen–Poiseuille equation, provided that transport mechanisms other than laminar flow are neglected.<sup>31</sup>

$$R_h = \frac{\Delta P}{Q} = \frac{8\eta l}{r_p^2 w h \phi} \quad (1)$$

where  $\eta$ ,  $l$ ,  $w$ ,  $h$ ,  $\phi$ , and  $r_p$  are the fluid dynamic viscosity, membrane length (*i.e.* thickness), width, height, porosity, and pore radius, respectively. Neglecting the tortuosity of the pores and using the geometrical values for the fabricated membranes (where ~25 nm pore diameter and ~50% porosity were estimated from the SEM images shown in the inset of Fig. 6) lead to a theoretical hydrodynamic resistance of  $2 \times 10^{-1} \text{ Pa s } \mu\text{m}^{-3}$ . This value, which is more than 6 orders of magnitude higher than the resistance of a similar size microchannel without an integrated membrane, is in accordance with the value obtained from flow velocity measurements and thus demonstrates that the injected fluid indeed flows through the fabricated porous layer across the entire section of the microchannel.

## Conclusions

We have demonstrated the integration of lateral porous silicon membranes into planar microfluidic channels using a specifically dedicated fabrication process. The key ideas of this process are to guide pore formation horizontally during anodization by means of electrodes patterned on the silicon surface and to spatially localize porous silicon growth within a controlled depth through the use of silicon-on-insulator substrates. To demonstrate the feasibility of our approach, 10  $\mu\text{m}$  thick mesoporous membranes with ~25 nm diameter pores bridging 20  $\mu\text{m}$  deep microchannels were prepared as part of the chip fabrication process. Preliminary experiments have shown that while 300 nm diameter polymer microspheres are retained from flowing through the membrane, macromolecules such as 40-mer single-stranded DNA and IgG do permeate, thus illustrating the potential of lateral porous membranes for dead-end filtration. While obvious applications include on-chip sample preparation through size based separation, such membranes could also be used for other purposes, *e.g.* sample concentration. The method presented here constitutes a new technical solution for the integration of membranes into planar single-layer microfluidic devices with the advantages inherent to the use of porous silicon.

## Acknowledgements

This work was partly supported by the French RENATECH network.

## Notes and references

- 1 P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam and B. H. Weigl, *Nature*, 2006, **442**, 412–418.
- 2 J. Lichtenberg, N. F. de Rooij and E. Verpoorte, *Talanta*, 2002, **56**(2), 233–266.
- 3 J. Kim, M. Johnson, P. Hill and B. K. Gale, *Integr. Biol.*, 2009, **1**, 574–586.

- 4 J. E. Kim, J. H. Cho and S. H. Paek, *Anal. Chem.*, 2005, 77(24), 7901–7907.
- 5 C. C. Striemer, T. R. Gaborski, J. L. McGrath and P. M. Fauchet, *Nature*, 2007, 445, 749–753.
- 6 H. Wei, B. H. Chueh, H. Wu, E. W. Hall, C. W. Li, R. Schirhagl, J. M. Lin and R. N. Zare, *Lab Chip*, 2011, 11, 238–245.
- 7 R. S. Foote, J. Khandurina, S. C. Jacobson and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 57–63.
- 8 R. T. Kelly, Y. Li and A. T. Woolley, *Anal. Chem.*, 2006, 78(8), 2565–2570.
- 9 J. H. Lee, Y. A. Song and J. Han, *Lab Chip*, 2008, 8, 596–601.
- 10 J. de Jong, R. G. H. Lammertink and M. Wessling, *Lab Chip*, 2006, 6, 1125–1139.
- 11 B.-H. Chueh, D. Huh, C. R. Kyrtsos, T. Houssin, N. Futai and S. Takayama, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 3504–3508.
- 12 J. Ou, T. Glawdel, R. Samy, S. Wang, Z. Liu, C. L. Ren and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 7401–7407.
- 13 J. Moorthy and D. J. Beebe, *Lab Chip*, 2003, 3(2), 62–66.
- 14 S. Song, A. K. Singh and B. J. Kirby, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 4589–4592.
- 15 R. W. Tjerkstra, J. G. E. Gardeniers, J. J. Kelly and A. Van den Berg, *J. Microelectromech. Syst.*, 2000, 9(4), 495–501.
- 16 L. J. Heyderman, B. Ketterer, D. Bachle, F. Glaus, B. Haas, H. Schiff, K. Vogelsang, J. Gobrecht, L. Tiefenauer and O. Dubochet, *Microelectron. Eng.*, 2003, 208, 67–68.
- 17 E. Leclerc, Y. Sakai and T. Fujii, *Biomed. Microdevices*, 2003, 5(2), 109–114.
- 18 J. Leng, B. Lonetti, P. Tabeling, M. Joanicot and A. Ajdari, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, 96(8), 084503.
- 19 R. Ishimatsu, J. Kim, P. Jing, C. C. Striemer, D. Z. Fang, P. M. Fauchet, J. L. McGrath and S. Amemiya, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 7127–7134.
- 20 L. Velleman, C. J. Shearer, A. V. Ellis, D. Losic, N. H. Voelckera and J. G. Shapter, *Nanoscale*, 2010, 2, 1756–1761.
- 21 V. S.-Y. Lin, K. Motesharei, K. S. Dancil, M. J. Sailor and M. R. Ghadiri, *Science*, 1997, 278, 840–843.
- 22 C. Pacholski, M. Sartor, M. J. Sailor, F. Cunin and G. M. Miskelly, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 11636–11645.
- 23 L. M. Bonanno and L. A. DeLouise, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 23, 444–448.
- 24 K. Grigoras, S. Franssila, T. Sikanen, T. Kotiaho and R. Kostianen, *Phys. Status Solidi A*, 2005, 202(8), 1624–1628.
- 25 C. S. Cojocar, J. M. Padovani, T. Wade, C. Mandoli, G. Jaskierowicz, J. E. Wegrowe, A. Fontcuberta, I. Morral and D. Pribat, *Nano Lett.*, 2005, 5(4), 675–680.
- 26 M. Gowtham, L. Eude, C. S. Cojocar, B. Marquardt, H. J. Jeong, P. Legagneux, K. K. Song and D. Pribat, *Nanotechnology*, 2008, 19, 035303.
- 27 M. J. Sailor, in *Porous silicon in practice*, WILEY-VCH, 2012.
- 28 A. Ivanov, *Proceedings of the 2011 COMSOL Conference*, Stuttgart, 2011.
- 29 A. Y. Sim, J. Lipfert, D. Herschlag and S. Doniach, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2012, 86, 021901.
- 30 J. K. Armstrong, R. B. Wenby, H. J. Meiselman and T. C. Fisher, *Biophys. J.*, 2004, 87, 4259–4270.
- 31 A. Kovacs and U. Mescheder, *Sens. Actuators, B*, 2012, 175, 179–185.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/snb](http://www.elsevier.com/locate/snb)

## Fabrication of lateral porous silicon membranes for planar microfluidics by means of ion implantation



Yingning He, Thierry Leïchlé\*

LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 April 2016

Received in revised form 18 July 2016

Accepted 8 August 2016

Available online 8 August 2016

## Keywords:

Porous silicon  
Ion implantation  
Filtration  
Microfluidics  
Lab-on-a-chip

## ABSTRACT

We introduce a new fabrication method based on ion implantation to create lateral porous silicon membranes and integrate them into planar microfluidic devices. Our proposed method relies on the fact that the formation of porous silicon by anodization highly depends on the dopant type and concentration, which can be manipulated by ion implantation. In order to confine the porosification at desired locations within silicon steps bridging microchannels, we use boron and phosphorus implantation to respectively create a p++ layer buried in an n-type silicon substrate, and a protective n-type surficial layer. The use of a metal electrode patterned onto the silicon step for current injection during anodization enables pores to propagate laterally during the membrane formation. The optimal implantation doses and energies leading to the required boron and phosphorus profiles are determined by means of process simulation and further confirmed by SIMS analysis. We demonstrate that the proposed fabrication process leads to the creation of lateral porous silicon membranes with open-ended pores adequately bridging microchannels and that we are able to manipulate the pore size (~3–30 nm) and membrane porosity (~15–65%) by adjusting the current density during anodization. The adequate dead-end filtration capability of the fabricated membranes was tested and demonstrates the interest of the presented fabrication process for microfluidic applications.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Porous membranes are of great interest for on-chip sample preparation and analysis since they enable size and charge-based molecule separation [1,2], but also molecule pre-concentration by ion concentration polarization [3–5]. Fabricating and integrating a membrane with well-defined pore size and shape is challenging because, as the feature size decreases, the choice of fabrication approaches is limited and the control of membrane characteristics becomes difficult [6]. Arrays of nanochannel fabricated by various nanomachining techniques provide a route to obtain membranes with controllable properties, but the resulting porosity is relatively low and so is the surface area and throughput. Membranes directly created from porous materials can tackle these limitations [7,8]. Out of the various materials available to constitute porous membranes, porous silicon offers many advantages: the process of creating porous silicon by electrochemical etching of silicon

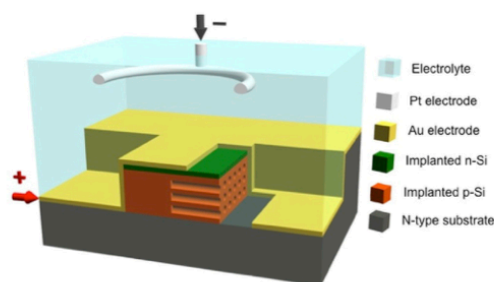
enables the control of the membrane physical properties by adjusting the anodization conditions [9]; the porosity can reach values as high as 97% [10]; porous silicon formation is compatible with CMOS technology and on-chip electronics [11]; porous silicon is biocompatible and its surface chemistry can be easily and conveniently adjusted for biomedical applications [12]; finally, porous silicon offers the advantage to enable interferometric biosensing [13–15]. Porous silicon membranes are usually integrated into fluidic chips by sandwiching fabricated membranes between two layers bearing inlet and outlet microchannels, resulting in three-dimensional fluidic networks.

Recently, we have proposed a fabrication process leading to the realization of porous silicon membranes with lateral pores that allows the integration of these membranes within planar fluidics with the benefit of simpler packaging and use [16]. In our previous work, lateral porous silicon membranes were monolithically integrated into microchannels using silicon-on-insulator (SOI) substrates. The proposed fabrication technique relied on the use of locally patterned electrodes to guide pore formation horizontally within the membrane, and on the use of SOI substrates to spatially localize the porous silicon within the channel depth. The disad-

\* Corresponding author.

E-mail address: [tleichle@laas.fr](mailto:tleichle@laas.fr) (T. Leïchlé).<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.035>

0925-4005/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.



**Fig. 1.** Schematics describing our technical approach for the fabrication of lateral porous silicon membranes: cross-sectional view of the device during silicon anodization. Current is injected from the locally patterned electrode into the p++ silicon layer. Because the n-type implanted layer and substrate act as native etch-stops and current guides, porous silicon is solely formed in the p++-type implanted layer in a lateral fashion.

vantage of this approach is that the buried oxide layer is exposed to highly concentrated hydrofluoric acid during anodization, which limits the anodization time and thus the control of membrane properties, such as pore size, porosity and membrane thickness.

In this work, we present a new method for the fabrication of lateral porous silicon membranes based on boron and phosphorus implantation. Our proposed method relies on the fact that the formation of porous silicon by anodization is highly dependent on the dopant type and concentration [17–19]. While we still use electrodes patterned on the membrane sidewalls to inject current for anodization, the doping via implantation enables to confine the membrane analogously to but instead of the SOI buried oxide box. Our approach is described in Fig. 1. A heavily doped p-layer is created by ion implantation within an n-type substrate to constitute the porous membrane by subsequent anodization. Then, in order to confine the lateral pore formation to the p++-layer, a thin n-type layer is implanted at the surface of the wafer: this n-type silicon layer and the n-type substrate act as native etch-stops that prevent pore formation [20–22]. Indeed, both the implanted n-layer and the substrate exhibit high electrical resistance, respectively because the top layer is thin and the dopant concentration is low. Besides, the n-type silicon top layer and the electrolyte form a Schottky diode-like junction, which operates in a reverse bias for the corrosion current [23]. Since both the top n-layer and the substrate are prevented from anodization, they act as electrical insulators guiding the current flow through the p++-layer in a lateral fashion. The use of implanted layers thus solves the limitation of anodization time since the insulating layers are not etched away in the HF solution, thus enabling the fabrication of larger membranes with bigger range of pore sizes and porosities.

## 2. Experimental

### 2.1. Fabrication process

The fabrication process of the lateral porous silicon membrane by means of ion implantation is detailed in Fig. 2. The process starts by creating a sacrificial oxide layer (40 nm) by thermal oxidation of an n-type silicon wafer ( $d = 100$  mm,  $t = 525$   $\mu\text{m}$ ,  $\rho = 7$   $\Omega\text{cm}$ ), in order to prevent surface damage and channeling effects during subsequent ion implantation. Then, a thick and heavily doped p-layer is formed by boron implantation (dose =  $2 \times 10^{15}$   $\text{cm}^{-2}$ , energy = 150 KeV) and thermal annealing at 1150 °C for 8 h (Fig. 2a). After removing the oxide layer in buffered HF (5%), phosphorus implantation (dose =  $1 \times 10^{14}$   $\text{cm}^{-2}$ , energy = 50 KeV) and rapid

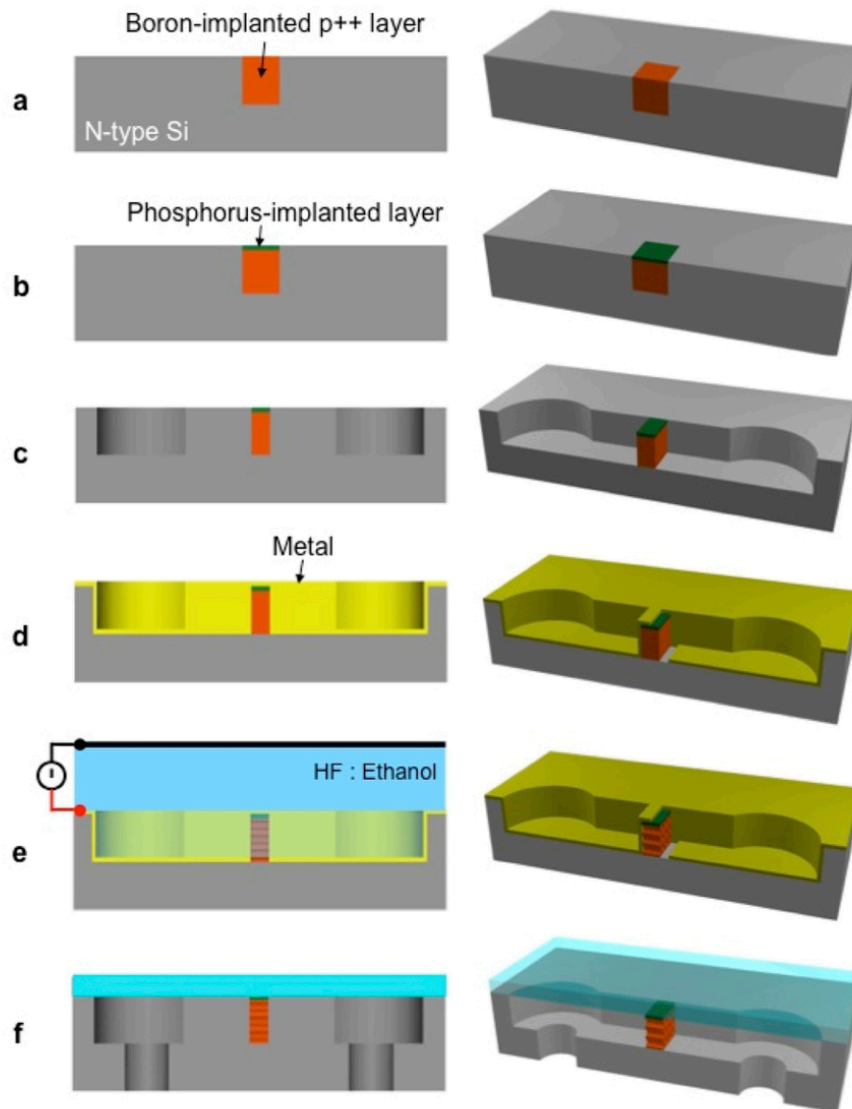
thermal annealing (1000 °C for 5 min) are carried out to form a  $\sim 150$  nm thick n-type layer (Fig. 2b). A masking layer (ECI 2.6  $\mu\text{m}$ ) is used during phosphorus implantation to provide large porosity areas on the chip surface for better control of the current density during subsequent anodization. Then, 5  $\mu\text{m}$  deep inlet and outlet microchannels are created by reactive ion etching (Fig. 2c). This specific channel depth is chosen in accordance to the thickness of the implanted p++-layer and thus the expected thickness of the porous membrane in order to fully integrate the membrane within the microchannels. It should be noted that while the boron-implanted layer is  $\sim 9$   $\mu\text{m}$  thick, only the top  $\sim 4$   $\mu\text{m}$  of the p++-layer turns into porous silicon because silicon anodization occurs in the region of highest dopant concentration.

Integration of the lateral porous silicon membrane is then achieved by anodizing the boron-implanted silicon lying in between the two channels. For this purpose, an electrode is first created by sputtering 100 nm/500 nm Cr/Au layers in a conformal way to ensure the presence of metal on the microchannel sidewalls. The native silicon oxide is etched away in buffered HF (5%) just before sputtering to ensure a good metal/silicon contact. After proper annealing (250 °C, 20 min), the metal is patterned by means of photolithography using a 5  $\mu\text{m}$  thick photoresist (AZ 4562), followed by wet etching in appropriate baths in order to reveal the opposite silicon membrane sidewall (Fig. 2d). The wafer is diced into individual chips before anodization so that different anodization parameters can be tested. For anodization purposes, the chip is loaded in a homemade etch cell and the formation of pores within the membranes is achieved by the anodic dissolution of silicon in a 1:3 ethanol:48% aqueous HF solution (Fig. 2e). The electric current is injected to the patterned electrodes (used as the anode) on the front side of the chip and is expected to flow within the p++-layer (sandwiched between the implanted n-layer and n-type substrate), while the cathode consists of a platinum ring immersed in the electrolyte bath and facing the chip. Following the anodization step, both Cr/Au metal layers are removed in wet etch baths. In order to create fluidic inlet/outlets and connect the fluidic chip to external fluidic reservoirs, holes are drilled through the silicon chip by sandblasting (Fig. 2f). The channels are finally encapsulated by anodic bonding (370 °C,  $5 \times 10^{-5}$  mBar, 600 V for 10 min) the silicon chip to a same size glass chip diced from a 500  $\mu\text{m}$  thick borofloat 33 wafer (Schott).

### 2.2. Optimization of implantation parameters

The profiles of the n- and p-doped layers are precisely controlled by means of ion implantation to obtain confined membranes with lateral pores using the afore-described fabrication process. Precise location of the porous silicon formation is monitored by the dopant type and concentration: as a result, it is of paramount importance to be able to predict the profiles and select the appropriate implantation parameters in order to obtain the desired results. To this aim, we have obtained dopant profiles using two-dimensional (2D) process simulation using the mathematical simulation program ATHENA (Silvaco Int.) that takes into account all process steps influencing the final profile, i.e. the implantation steps using the Pearson Implant model, the thermal annealing and thermal oxidation steps using the Fermi compress model and the de-oxidation steps. In order to create a thin implanted-n layer with a thick heavily doped p-type layer underneath, the phosphorus implantation dose was chosen high enough to form n-type silicon, but low enough to avoid pore formation due to the tunneling of holes – not to mention that high dopant concentration could easily lead to silicon electropolishing because of overwhelming current density [24,25].

The resulting simulated doping profiles obtained with the aforementioned parameters are shown in Fig. 3. The surficial n-type silicon layer is  $\sim 150$  nm and the thickness the heavily doped p-type



**Fig. 2.** Fabrication process of lateral porous silicon membrane using ion implantation. (a) Boron implantation in an *n*-type substrate to create a heavily doped *p*-layer for pore formation by anodization. (b) Phosphorus implantation to create an *n*-layer at the surface of the wafer. (c) Dry etching to form microchannels. (d) Metal layer deposition and patterning to create a working electrode. (e) Silicon anodization carried out in a HF:ethanol bath. (f) Fluidic inlets/outlets realized by sandblasting and chip encapsulation by anodic bonding. For figure clarity, the implanted areas are only displayed at the membrane location.

silicon layer is  $\sim 4 \mu\text{m}$ . In order to validate our model for process prediction, we have compared these simulation results with experimental data. To this aim, we have carried out the doping process, including all implantation and annealing steps on a fresh silicon wafer. After processing, the doping profiles were obtained from Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS), which are shown in Fig. 3: while the phosphorus profile is very similar to the simulated

one, the boron concentration is slightly lower than as predicted. But in general, the 2D process simulation fits the experimental results very well, especially for the values of the junction depths.

As previously mentioned, the final phosphorus concentration within the top implanted layer is crucial for our process to be successful. While SIMS analysis enables the accurate determination of the doping profile, it is a destructive process that can only



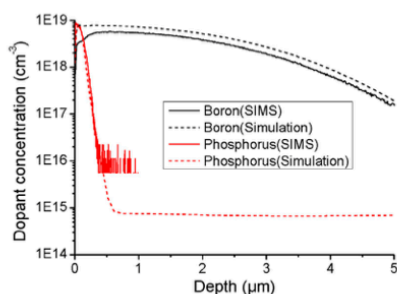


Fig. 3. Boron and phosphorus doping profiles within the silicon substrate. Experimental values obtained from SIMS analysis are compared to theoretical data from 2D process simulation.

be used for process implementation but not to characterize the device chips. As a result, we have rather used four-point probe measurement to assess the correct doping level. We have tested various samples consisting of previously boron-implanted silicon chips subsequently implanted with various doses of phosphorus. After proper annealing, the sheet resistances of implanted chips were obtained by means of a four-point probe, which show that as expected, phosphorus implantation changes the way the current flows and impacts the electrical measurement (Fig. 4). When the concentration of phosphorus is lower than boron in the surficial layer (case 2), the net doping results in low-doped *p*-type silicon. During the four-point probe measurement the current breaks through the low-doped *p*-layer and flows in the boron-implanted layer, so the sheet resistance is very low (Fig. 4a). On contrary, at sufficient phosphorus concentration (cases 3–4), a *p-n* junction is formed (Fig. 4b) and the current flows in the surficial *n*-layer, so the sheet resistance is high. After the formation of *p-n* junction,

a further increase of dose reduces the resistivity of the implanted *n*-layer. As a result, the sheet resistance declines.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Fabrication results

A fabricated chip ( $1.6\text{ cm} \times 1.6\text{ cm}$ ) is shown in Fig. 5a. The microfluidic chip bears two  $5\text{ }\mu\text{m}$  deep microchannels separated by a  $10\text{ }\mu\text{m}$  long porous silicon membrane. Fig. 5b and c display cross-section SEM images of the fabricated  $\sim 4\text{ }\mu\text{m}$  thick mesoporous membrane created by anodization at  $200\text{ mA cm}^{-2}$  during 1 min. It is important to note that the dopant concentration drops  $\sim 10$  times within the membrane depth (see Fig. 3), which could result in inhomogeneous pore size and porosity. However, this effect was hardly noticeable on the SEM observations (Fig. 5c). Because of low boron concentration below the depth of  $4\text{ }\mu\text{m}$ , few micropores are created in that region, as shown in Fig. 5b. As expected, the current flows in a lateral fashion within the *p*++-layer in between the implanted *n*-layer and substrate, thus resulting in lateral pores formed through the membrane.

The current density represents the supply rate of holes during anodization, which greatly influences the pore morphologies. As a result, by manipulating the current density, we are able to tune the pore size and porosity of the fabricated membrane. Fig. 6 shows SEM cross-sectional views of porous silicon created with current densities ranging from  $20\text{ mA cm}^{-2}$  to  $500\text{ mA cm}^{-2}$  (a–c). The resulting pore size and porosity of the fabricated membranes, estimated from the SEM pictures, respectively ranges from  $\sim 3$  to  $\sim 30\text{ nm}$  and  $\sim 15$  to  $\sim 65\%$  (Fig. 6d).

#### 3.2. Filtering tests

As a proof-of-concept of the dead-end filtration capability of the fabricated lateral porous silicon membrane, filtering experiments were carried out using solutions of various-size objects: Fluores-

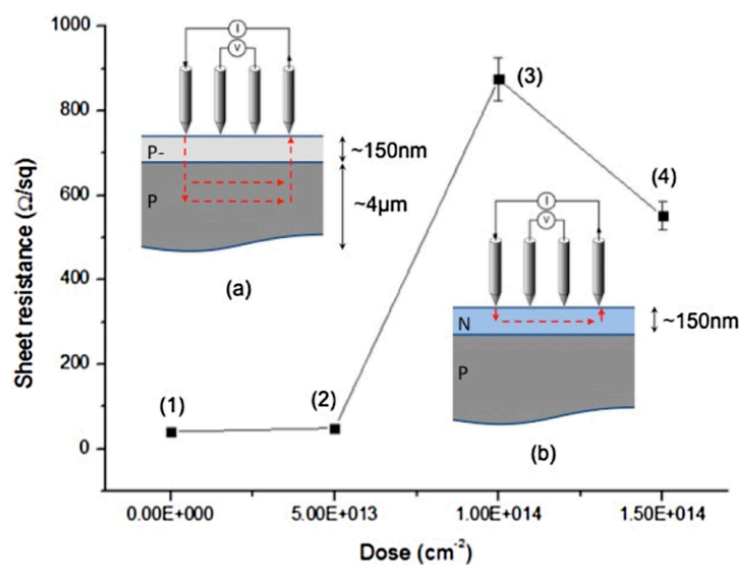
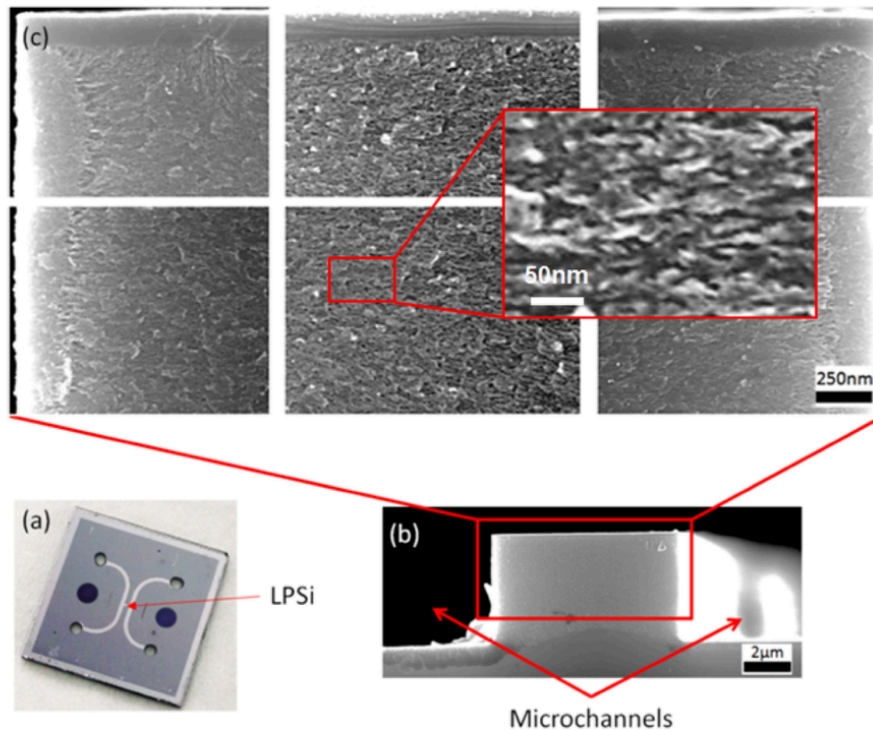
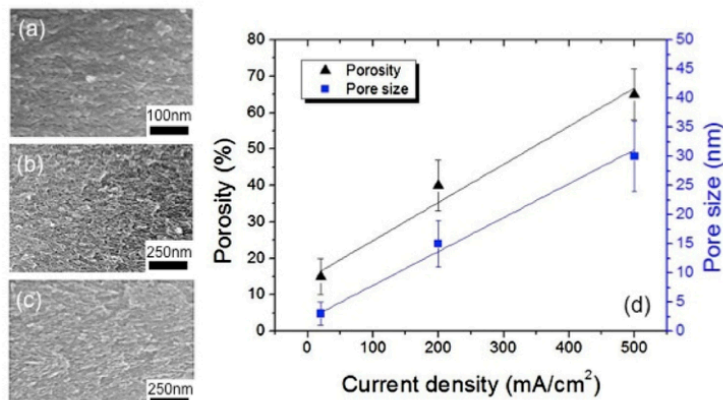


Fig. 4. Sheet resistance values measured for various phosphorus implantation doses in a previously implanted boron layer.



**Fig. 5.** (a) Optical photograph of a fabricated fluidic chip integrating a lateral porous silicon membrane (LPSi). (b) SEM picture of a lateral porous silicon membrane bridging two fluidic microchannels. The membrane is  $\sim 4 \mu\text{m}$  thick and  $10 \mu\text{m}$  long (c) SEM close up images of the fabricated membrane including a  $\sim 150 \text{ nm}$  thick protective *n*-type top layer without pores.



**Fig. 6.** Lateral porous silicon membranes fabricated using different current densities: (a)  $20 \text{ mA cm}^{-2}$  during 10 min; (b)  $200 \text{ mA cm}^{-2}$  during 1 min; (c)  $500 \text{ mA cm}^{-2}$  during 30 s. (d) Pore size and porosity as a function of current density.

cein (Sigma, at  $1 \mu\text{M}$  diluted in PBS  $1\times$ ), miRNA (Cy3-labelled 26 bases single-stranded RNA from Eurogentec Inc., at  $1 \mu\text{M}$  in PBS  $1\times$ ), and  $300 \text{ nm}$  diameter beads (greenfluorescent polystyrene microspheres from Duke Scientific diluted in DI water at a concentration

of  $7.4 \times 10^5$  beads/mL). Phosphate buffered saline (PBS)  $1\times$  solution was loaded into one of the microchannels and test solutions were loaded into the opposite microchannel. A pressure generator

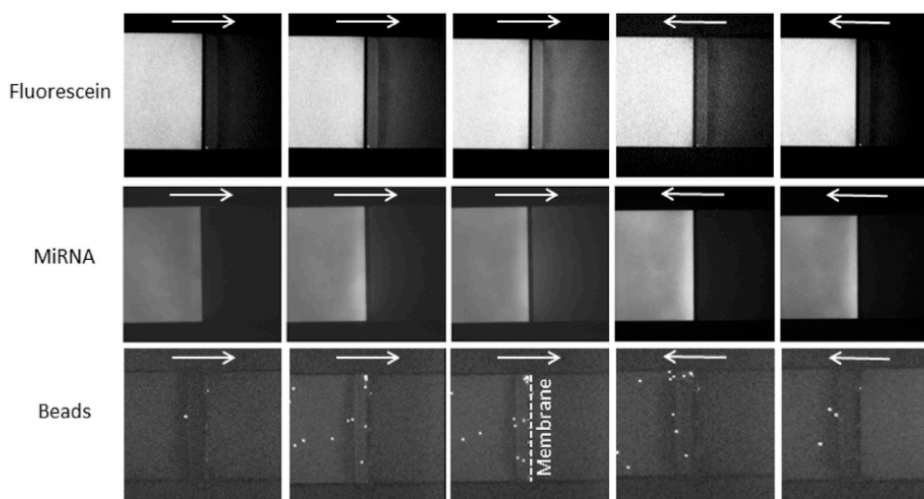


Fig. 7. Filtering capability of the fabricated membrane tested by flowing solutions of fluorescein, short miRNA, and nanobeads. The white arrows indicate the direction of the fluid flow. Porous silicon membrane is located at the center of each image. Fluorescein and miRNA molecules can flow back and forth through the membrane unlike the nanobeads.

(MFCS-8C, Fluigent) was used to push the test solution through the porous membrane with various pressures ranging from 0.1 to 1 bar. Fluorescein and miRNA solutions were prepared using PBS  $1\times$  to eliminate the electrostatic repulsion between negatively charged molecules and the negatively charged surface of the membrane as well as to minimize the Debye layer within the membrane [1]. All the solutions were properly degassed before use. Fluorescence images were recorded during the experiments by means of a IX70 Olympus inverted epifluorescence microscope equipped with  $10\times$  objective and dedicated filters (UMWIB3 from Olympus, U-M41007 and U-M41008 from Chroma), and an Andor iXon 885 EMCCD camera. The sequential images presented in Fig. 7 show that fluorescein and miRNA molecules flow back and forth through the membrane while beads are stuck onto the membrane wall, thus proving the size-based separation capability of our membrane with a cut-off size  $>10$  nm (hydrodynamic radius of fluorescein and miRNA:  $\sim 1$  nm and  $\sim 5$  nm). These results are consistent with the average pore size of  $\sim 15$  nm of the chip used for this experiment (membranes fabricated using a current density of  $200\text{ mA cm}^{-2}$ ).

Beside, the hydrodynamic resistance of the porous membrane was experimentally estimated by measuring the fluid flow derived from the bead displacement analysis as a function of applied pressure and compared to the theoretical value estimated by the Hagen-Poiseuille equation [15]. The results show that the fluid flow is indeed linearly related to the applied pressure, which lead a constant hydrodynamic resistance value of  $5.9\text{ Pa s}/\mu\text{m}^3$  in accordance with the  $3.6\text{ Pa s}/\mu\text{m}^3$  theoretical value, thus proving that the injected fluid flows through the entire section of the porous membrane.

#### 4. Conclusions

We have presented a new process for the fabrication of lateral porous silicon membranes based on ion implantation. This process enables the monolithic integration of porous silicon membranes into planar microfluidic devices. The key idea of this process is the local manipulation of dopant type and concentration by boron and phosphorus implantation. During anodization, pores propagate in

the heavily doped boron layer sandwiched between the  $n$ -type surficial layer and the  $n$ -type bulk silicon in a strict lateral fashion along the current flow injected via a patterned electrode. We have modeled our process using a 2D simulation tool to estimate the dopant profiles after ion implantation and we have used four-point probe measurement to experimentally find the optimal doses by measuring the sheet resistance of the surficial layer. Membranes with lateral pores were successfully fabricated and their functionality was demonstrated by conducting filtering experiments. The presented fabrication process enables the confinement of lateral porous silicon membranes at specific locations with desirable pore size and porosity into a lab-on-a-chip. We believe that these membranes, despite being more complex and costly than e.g. polymer ones, should offer a high degree of versatility providing possible technical solutions for on-chip sample preparation by filtration and sample pre-concentration, but also for on-chip biosensing by e.g. reflectance-based interferometry.

#### Acknowledgments

The authors are deeply thankful to Dr. Filadelfo Cristiano and Dr. Eric Imbernon for helpful discussions, to David Bourrier for his help with fabrication and Dr. Pattamon Teerapanich for her assistance in the fluidic experiments. Doctoral Fellowships from the China Scholarship Council (to Y.H.) is gratefully acknowledged. This work was partly supported by the French RENATECH network.

#### References

- [1] C.C. Striemer, T.R. Gaborski, J.L. McGrath, P.M. Fauchet, Charge- and size-based separation of macromolecules using ultrathin silicon membranes, *Nature* 445 (2007) 749–753.
- [2] H. Wei, B.H. Chueh, H. Wu, E.W. Hall, C.W. Li, R. Schirhagl, J.M. Lin, R.N. Zare, Particle sorting using a porous membrane in a microfluidic device, *Lab Chip* 11 (2011) 238–245.
- [3] S.H. Ko, Y.A. Song, S.J. Kim, M. Kim, J. Han, K.H. Kang, Nanofluidic preconcentration device in a straight microchannel using ion concentration polarization, *Lab Chip* 12 (2012) 4472–4482.
- [4] P. Kim, S.J. Kim, J. Han, K.Y. Suh, Stabilization of ion concentration polarization using a heterogeneous nanoporous junction, *Nano Lett.* 10 (2009) 16–23.

- [5] S. Kim, J. Han, Self-sealed vertical polymeric nanoporous-junctions for high-throughput nanofluidic applications, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3507–3511.
- [6] C. Duan, W. Wang, Q. Xie, Review article: fabrication of nanofluidic devices, *Biomicrofluidics* 7 (2013) 026501.
- [7] J. de Jong, R.G.H. Lammertink, M. Wessling, Membranes and microfluidics: a review, *Lab Chip* 6 (2006) 1125–1139.
- [8] M.E. Warkiani, A.A.S. Bhagat, B.L. Khoo, J. Han, C.T. Lim, H.Q. Gong, A.G. Fane, Isoporous micro/nanoengineered membranes, *ACS Nano* 7 (2013) 1882–1904.
- [9] A. Janshoff, K.P.S. Dancil, C. Steinem, D.P. Greiner, V.S.Y. Lin, C. Gurtner, K. Motesharei, M.J. Sailor, M.R. Ghadiri, Macroporous p-type silicon fabry-perot layers: fabrication, characterization, and applications in biosensing, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 12108–12116.
- [10] L. Canham, *Handbook of Porous Silicon*, Springer, 2014.
- [11] G. Barillaro, P. Bruschi, G.M. Lazzerini, L.M. Strambini, Validation of the compatibility between a porous silicon-based gas sensor technology and standard microelectronic process, *IEEE Sens. J.* 10 (2010) 893–899.
- [12] E.J. Anglin, L. Cheng, W.R. Freeman, M.J. Sailor, Porous silicon in drug delivery devices and materials, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1266–1277.
- [13] I. Rea, E. Orabona, A. Lamberti, I. Rendina, L. De Stefano, A microfluidics assisted porous silicon array for optical label-free biochemical sensing, *Biomicrofluidics* 5 (2011) 1–10.
- [14] C. Pacholski, M. Sartor, M.J. Sailor, F. Cunin, G.M. Miskelly, Biosensing using porous silicon double-layer interferometers: reflective interferometric fourier transform spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 11636–11645.
- [15] L.M. Bonanno, L.A. DeLouise, Whole blood optical biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 444–448.
- [16] T. Leichlé, D. Bourrier, Integration of lateral porous silicon membranes into planar microfluidics, *Lab Chip* 15 (2015) 833–838.
- [17] C.J.M. Eijkkel, J. Branebjerg, M. Elwenspoek, F.C.M. Van de Pol, A new technology for micromachining of silicon: dopant selective HF anodic etching for the realization of low-doped monocrystalline silicon structures, *Electron Device Lett.* 11 (1990) 588–589.
- [18] S.S. Tsao, D.R. Myers, T.R. Guilinger, M.J. Kelly, A.K. Datye, Selective porous silicon formation in buried p+ layers, *J. Appl. Phys.* 62 (1987) 4182–4186.
- [19] G. Barillaro, A. Diligenti, F. Pieri, F. Fuso, M. Allegrini, Integrated porous-silicon light-emitting diodes: a fabrication process using graded doping profiles, *Appl. Phys. Lett.* 78 (2001) 4154–4156.
- [20] T.E. Bell, P.T.J. Gennissen, D. DeMunter, M. Kuhl, Porous silicon as a sacrificial material, *J. Micromech. Microeng.* 6 (1996) 361–369.
- [21] M.I.J. Beale, J.D. Benjamin, M.J. Uren, N.G. Chew, A.G. Cullis, An experimental and theoretical study of the formation and microstructure of porous silicon, *J. Cryst. Growth* 73 (1985) 622–636.
- [22] E.V. Astrova, A.Z. Yuliya, 'Wagon-wheel' mask as a tool to study anisotropy of porous silicon formation rate, *Nanoscale Res. Lett.* 7 (2012) 1–8.
- [23] J.M. Sailor, *Porous Silicon in Practice: Preparation, Characterization and Applications*, John Wiley & Sons, 2012.
- [24] G. Lammel, P. Renaud, Free-standing, mobile 3D porous silicon microstructures, *Sens. Actuators A: Phys.* 85 (2000) 356–360.
- [25] R.W. Tjerkstra, G.E. Gardeniers, J.J. Kelly, A. Van Den Berg, Multi-walled microchannels: free-standing porous silicon membranes for use in  $\mu$ TAS, *J. Microelectromech. Syst.* 9 (2000) 495–501.

### Biographies

**Yingning He** is a Ph.D. candidate at LAAS-CNRS and the University of Toulouse in France since 2012. His research interests involve the fabrication and integration of porous membranes into lab-on-a-chip devices for biomicrofluidic filtering, preconcentration and biosensing.

**Thierry Leichlé** is a CNRS researcher at LAAS-CNRS in Toulouse (France). He obtained his M.S. in Electrical Engineering in 2002 from the Georgia Institute of Technology (Atlanta, USA) and his Ph.D. degree from the University of Toulouse in 2006. From 2007 to 2009, he benefited from a postdoctoral fellowship at the Institute of Physics, Academia Sinica, Taipei (Taiwan) before joining the Nanobiosystems group at LAAS-CNRS in 2010. His research interests focus on the use of micro- and nanotechnologies for bioengineering applications.

# Fabrication of nanoplate resonating structures via micro-masonry

A Bhaswara<sup>1,2</sup>, H Keum<sup>3</sup>, S Rhee<sup>3</sup>, B Legrand<sup>1,2</sup>, F Mathieu<sup>1,2</sup>, S Kim<sup>3</sup>, L Nicu<sup>1,2</sup> and T Leichle<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France

<sup>2</sup> Univ de Toulouse, LAAS, F-31400 Toulouse, France

<sup>3</sup> Department of Mechanical Science and Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA

E-mail: abhaswar@laas.fr, skm@illinois.edu and tleichle@laas.fr

Received 25 June 2014, revised 31 July 2014

Accepted for publication 26 August 2014

Published 16 October 2014

## Abstract

Advantages of using nanoscale membrane and plate resonators over more common cantilever shapes include higher quality factor ( $Q$  factor) for an equivalent mass and better suitability to mass sensing applications in fluid. Unfortunately, the current fabrication methods used to obtain such membranes and plates are limited in terms of materials and thickness range, and can potentially cause stiction. This study presents a new method to fabricate nanoplate resonating structures based on micro-masonry, which is the advanced form of the transfer printing technique. Nanoplate resonators were fabricated by transfer printing  $0.34\ \mu\text{m}$  thick square-shaped silicon plates by means of polydimethylsiloxane microtip stamps on top of silicon oxide base structures displaying  $20\ \mu\text{m}$  diameter cavities, followed by a thermal annealing step to create a rigid bond. Typical resulting suspended structures display vibration characteristics, i.e. a resonance frequency of a few MHz and  $Q$  factors above 10 in air at atmospheric pressure, which are in accordance with theory. Moreover, the presented fabrication method enables the realization of multiple suspended structures in a single step and on the same single base, without mechanical crosstalk between the resonators. This work thus demonstrates the suitability and the advantages of the micro-masonry technique for the fabrication of plate resonators for mass sensing purpose.

Keywords: micro-masonry, membrane resonator, silicon nanoplate, transfer printing, dynamic characterization, NEMS

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

## 1. Introduction

Although less prevalent than cantilevers, recent works have explored the potential of membrane and plate resonators for biosensing applications [1–5]. This is due to some inherent advantages of plate structures compared to cantilevers. From the mechanical point of view, a plate is stiffer than a cantilever of the same size. This increases its robustness, which is important during the device fabrication and its subsequent functionalization step with biomaterials. Assuming a constant effective mass, the increased rigidity also results in higher resonant frequencies, which in turn increases the quality factor ( $Q$  factor) of the structure and enhances its mass sensitivity [6].

In terms of transduction, plate geometries are appropriate for electrostatic actuation and capacitive sensing in a liquid environment. Capacitive transduction has advantages compared to piezoelectric transduction in terms of ease of fabrication and stability [7]. However, the use of electrostatics for cantilever actuation and displacement detection is not as straightforward in a liquid environment due to the presence of liquid between the electrodes, and requires complicated processing steps to encapsulate the device [8]. In contrast, a sealed plate-based electrostatic device leads to an easy encapsulation of a vacuum or an air gap between the electrodes. The sealed air gap between the plate and base also minimizes squeeze film damping, which is not the case in cantilevers [9].

Membrane and plate structures are commonly fabricated using deep reactive ion etching (RIE) from the wafer backside, using a buried oxide as a stopper layer [1, 2, 4, 5, 10]. While this technique is suitable for, e.g., piezoelectrically transduced devices, the large gap beneath the plates hinders electrostatic actuation. The sacrificial method, as used for the fabrication of capacitive micromachined ultrasonic transducers (CMUTs), is a proven technique to fabricate electrostatic plate MEMS [11, 12]. Recent works utilize holes patterned on the plate surface in order to release the devices; very thin plates with a high  $Q$  factor are obtained using this technique [13–15]. However, this technique cannot meet practical applications in a liquid environment due to the perforated surface. Release upon wet etching of the sacrificial layer is also a potential cause of stiction, leading to device failure [16, 17]. Finally, all of these fabrication techniques share the common limitation that every plate on a wafer is of the same thickness and material. Consequently, an alternative fabrication technique providing more flexibility in resonator design and material onto a single chip would open up new possibilities, such as multiplexed biosensing with a wide measurement range.

Transfer printing [18], which is used to transfer diverse materials such as metal lines [19]; photoresist patterns [20]; and semiconductor nanowires [21], offers a unique alternative solution for the fabrication of sealed nanoscale structures. Among the three basic modes of transfer printing, the deterministic assembly mode is of utmost interest for the fabrication of MEMS [18]. In this mode, a microstructure fabricated within a first substrate (donor) is selectively moved using a stamp onto another substrate (receiver) that can also contain other microstructured elements. Previously, we have shown the capability of this technique to create static structures, actuators, and comb-drive resonators [22–25]. In this work, we explore the possibility of using the transfer printing technique to fabricate silicon nanoplate resonating structures by studying the influence of this fabrication technique on the device performances.

## 2. Device fabrication

The basic concept of our fabrication technique is illustrated in figure 1. A plate resonating structure consists of a vibrating element and a base structure used for clamping. These two elements are obtained by means of two substrates: a 'donor' wafer and a 'receiver' wafer. The top layer of the silicon on insulator (SOI) donor wafer is used as the vibrating element of the structure itself (the ink), and defines the resonator thickness. The surface of the receiver wafer (a bulk silicon wafer onto which an oxide layer is deposited) is patterned with cavities to define the planar shape and size of the resonator, and to provide clamping of the vibrating element. After adequate releasing of the patterned donor wafer top layer, an elastomeric polydimethylsiloxane (PDMS) microtip stamp is used to lift this silicon ink and to position it on the microstructure formed onto the receiver wafer after proper alignment in order to cover the cavities. Thermal annealing is finally used to create a rigid bond between the two layers, leading to a nanoplate structure defined by the cavity.

The nanoplate inks are fabricated starting from SOI wafers (BT electronics, 0.34/1/500  $\mu\text{m}$  thickness, 4 inch, boron doped, 14–22  $\Omega\text{cm}$  resistivity), as described in prior works [22, 25]. First, 100  $\mu\text{m}$   $\times$  100  $\mu\text{m}$  squares are patterned using photolithography to define the ink shapes in the silicon device layer. Then, dry RIE is performed to form the nanoplates that remain attached to the buried oxide layer. Subsequently, hydrofluoric acid solution is utilized to remove the unnecessary box oxide layer as well as the small region beneath the silicon nanoplates. This undercut region is filled with photoresist (PR), followed by complete removal of the oxide layer, resulting in suspended nanoplates with PR anchors. The suspended nanoplates are then transfer printed through micro-masonry, leaving the PR anchors behind on the donor substrate. The thickness of the silicon nanoplate ink is defined by the thickness of the top silicon layer of the SOI wafers, which is 0.34  $\mu\text{m}$  in our case.

Receiver chips are fabricated by first depositing a 1.25  $\mu\text{m}$  thick PECVD oxide layer (at 300  $^{\circ}\text{C}$  and 1 mbar) on top of a bulk silicon wafer. Then, the base structure is patterned using photolithography followed by RIE (operated at room temperature and  $7 \times 10^{-3}$  mbar). The base structures consist of square shapes (120  $\mu\text{m}$  side lengths) with one or more circular cavities with radius  $r$  ranging from 8 to 30  $\mu\text{m}$ . A base structure with multiple cavities results in multiple nanoplate devices obtained in a single transfer printing step, thus enabling a parallel fabrication capability. Finally, and prior to the transfer printing of the ink onto the base structure, the receiver wafer is diced into 1 cm  $\times$  1 cm chips.

Transfer printing of the silicon nanoplate inks is then achieved by means of PDMS microtip stamps. These stamps have pyramidal tips that provide appropriate adhesion force both during the pickup and the printing step. The inks are aligned and transferred onto the base using an appropriate speed and force profile [25]. The chip is finally annealed at 950  $^{\circ}\text{C}$  to permanently bond the base and the membrane. Figure 2 shows SEM pictures of a resulting typical structure before and after the transfer printing process.

## 3. Results and discussion

Successful fabrication of nanoplate resonators via micro-masonry has demonstrated the perfect adequacy of this fabrication method for the realization of suspended structures. However, further study of the device structure and behavior was conducted in order to ensure that the as-fabricated suspended structures could indeed operate as acceptable resonators.

First, we have investigated the quality of the bond between the nanoplate ink and the base structure. Indeed, only a perfect bond can ensure that the shape and size of the suspended structure match that of the cavity. Moreover, this bond must be robust enough to withstand any additional post-processing steps, e.g. surface functionalization, and/or subsequent device operation, without being prone to delamination. The bond quality was thus studied by imaging the fabricated structures with infrared microscopy (figure 3). The larger lighter background,

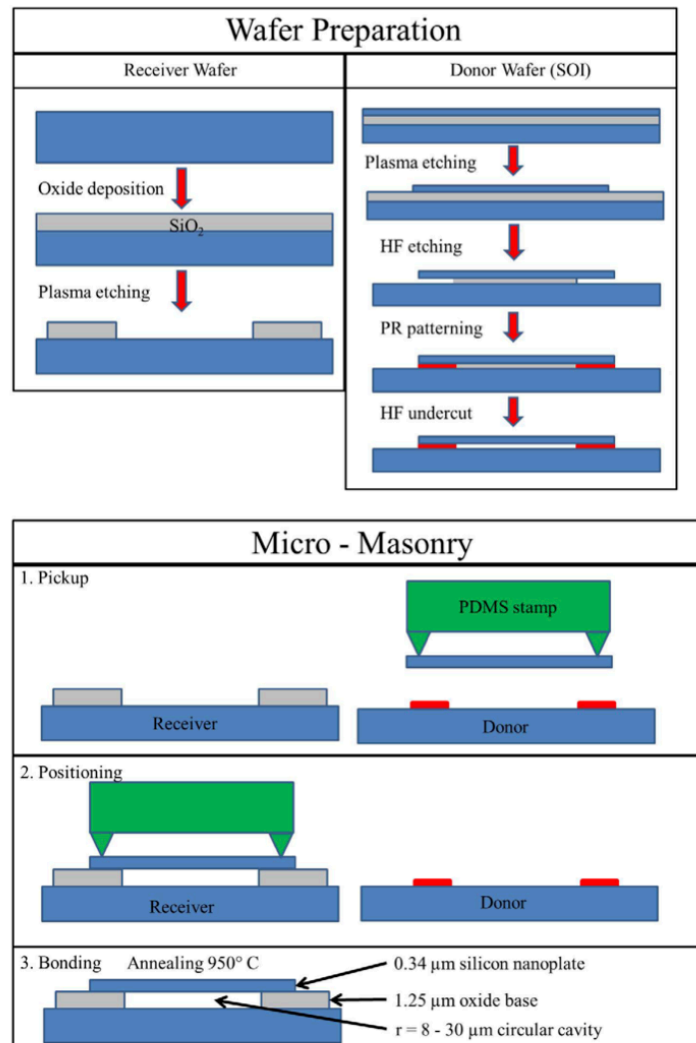
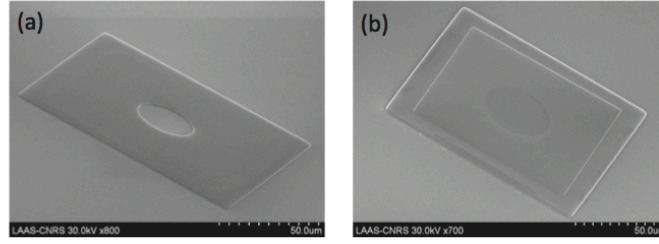


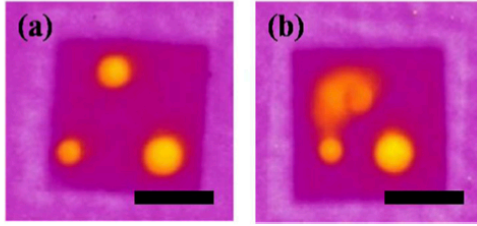
Figure 1. Illustration of the fabrication process.

smaller darker square, and circular yellow patterns indicate, respectively, base silicon dioxide, the micro-masonry assembled 340nm silicon nanoplate, and the air cavity covered with the nanoplate or imperfect contact between the base silicon dioxide and the silicon nanoplate. While most of the devices exhibited a tight and defectless bond, some air pockets/voids were observed between the base and the plate of some structures. Imperfections led to a change in resonator shape and oscillation mode, as well as erratic vibrations (and frequency responses) outside the cavity. It was also observed in the worst cases that these defects could cause the plates to be peeled from the base structure during post-processing steps.

Next, after the initial IR microscope check, defectless devices were characterized at various air pressure levels in order to probe their resonating properties using a Fabry-Pérot interferometer set-up [26]. Vibrational noise spectrum measurements were used to extract the resonance frequency and the  $Q$  factor of the first mechanical mode of the devices. A low-noise amplification (amplifiers from Mini-Circuits, overall gain = 41 dB, NF = 3.1 dB) and a 20 MHz low-pass filter were placed between the ac output of the photodiode (Mini-Circuits, SLP – 100 +) and the spectrum analyzer (Agilent 4395A used in spectrum analyzer mode) so as to enhance the limit of detection. Measurement averaging (up to 1000) was



**Figure 2.** An SEM image of the structure considered in this study: (a) 1.25  $\mu\text{m}$  thick  $\text{SiO}_2$  base structure hosting a 20  $\mu\text{m}$  radius cavity before the transfer printing process (b) the same structure after transfer printing the 0.34  $\mu\text{m}$  thick nanoplate ink and thermal annealing.



**Figure 3.** IR microscopy images of sample with 0.34  $\mu\text{m}$  thick plates taken after processing. Dark purple corresponds to a solid Si– $\text{SiO}_2$  bond with no air gap between them, while orange corresponds to the existence of air cavities. (a) Adequate bonding; air is only present inside the circular cavity. (b) Imperfect bonding; air is found not only in the cavity but also between the plate and the base. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

employed to recover the vibrational noise spectrum in the case of the smallest fluctuations observed at atmospheric pressure. Pressure variation of the chamber was obtained by pumping the vacuum chamber into high vacuum and by letting air flow in via a leak valve. Pressure measurement was performed using two sensors, a pirani-magnetron sensor (Agilent FRG-700), and a piezoresistive sensor (Thyracont VD 82 EX). The pirani sensor (30% accuracy) was used for lower pressures (<1 mbar), while the piezoresistive sensor (3% accuracy) was used for higher pressures (1 mbar–1 bar). All measurements were performed at room temperature (300 K).

The vibrational noise spectra of a typical structure (i.e. 20  $\mu\text{m}$  radius, 0.34  $\mu\text{m}$  plate thickness and 1.25  $\mu\text{m}$  gap height) are shown in figure 4. The Lorentzian shape of the curve can be observed both in the vacuum and at atmospheric pressure. Thus, the resonant frequency  $f_0$  and quality factor  $Q$  for every set of measurements are obtained by fitting a Lorentzian curve to the measurement data using the least squares method implemented in MathWorks MATLAB software. The experimental resonant frequency  $f_0$  in the vacuum is 2.798 MHz (figure 4(a)), which can be compared with the analytical resonant frequency  $f_{\text{analytical}}$  for a circular plate ideally clamped on the edge, as shown in [27]:

$$f_{\text{analytical}} = \sqrt{\frac{5}{3}} \frac{1}{\pi r \sqrt{\rho}} \sqrt{\frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \frac{t^2}{r^2} + \sigma_0} \quad (1)$$

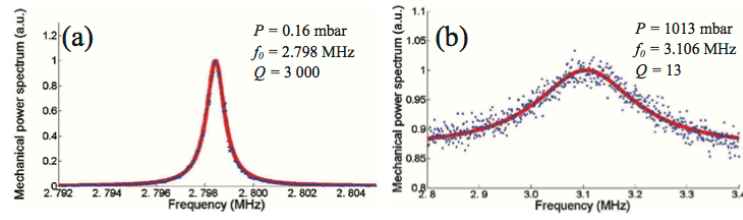
with  $r$  = plate radius,  $t$  = plate thickness,  $\rho$  = density of material,  $\nu$  = Poisson's ratio,  $E$  = Young's modulus and  $\sigma_0$  = in-plane stress

in the plate. Substituting silicon mechanical properties for plate bending ( $E = 170 \text{ GPa}$ ;  $\nu = 0.064$ ) and  $r = 20 \mu\text{m}$ ,  $t = 0.34 \mu\text{m}$  into equation (1) yields an  $f_{\text{analytical}}$  value of 3.455 MHz. It is noted that equation (1) is valid for isotropic materials, while single-crystal silicon has different mechanical properties depending on its crystal orientation. More accurate values of resonant frequencies were obtained by using anisotropic and orthotropic models in a finite element method (FEM) program. Implementation was done using COMSOL 3D modeling, using extra fine meshing for both models, while the mechanical properties were taken from the literature [28]. The resonant frequency obtained using FEM models  $f_{\text{FEM}}$  is 3.261 MHz for the structure under consideration. An identical  $f_{\text{FEM}}$  value is obtained using both the anisotropic and orthotropic model, assuming zero internal stress ( $\sigma_0 = 0$ ). This discrepancy between experimental ( $f_0$ ) and theoretical ( $f_{\text{analytical}}$ ,  $f_{\text{FEM}}$ ) resonant frequency values led to the conclusion that the fabricated nanoplate displays some internal stress. The in-plane stress changes the resonant frequency, which is shifted to a higher frequency for tensile stress (+ sign) and lower frequency for compressive stress (– sign). Assuming the geometry and the material properties are known, the in-plane stress can be determined by the difference between  $f_0$  and  $f_{\text{FEM}}$ :

$$\sigma_0 = \frac{3 \pi^2 r^2 \rho}{5} (f_{\text{FEM}}^2 - f_0^2). \quad (2)$$

Substituting  $f_0 = 2.798 \text{ MHz}$  (see figure 4(a)) and plate geometry in equation (2) yields an in-plane stress of  $\sigma_0 = -15 \text{ MPa}$ . As is the case for all the characterized samples (30 total), the measured resonance frequency is less than the one expected for zero stress, which indicates the presence of compressive stress within the plates. Mismatch of the thermal expansion coefficient between silicon and silicon oxide seems to be the source of the stress that is built up during the annealing step used for the nanoplate-base bonding [29]. Indeed, we have observed that some plates that were aligned flat during the transfer printing buckled after the thermal annealing step. The stress value was found to vary considerably between individual structures, due to variations during micro-masonry and imperfections of the cavity shape, which can be problematic for specific applications. Equation (1) also shows that at a certain critical compressive stress  $\sigma_{\text{crit}}$ , the plate buckles, and resonant frequency drops to zero. Rearranging the terms gives us the maximum radius  $r_{\text{max}}$  for a given plate thickness which can be fabricated without experiencing buckling:





**Figure 4.** Vibrational noise spectra for a device with plate radius  $r = 20\mu\text{m}$ , plate thickness  $t = 0.34\mu\text{m}$ , and gap height  $h = 1.25\mu\text{m}$ . (a) in a vacuum (b) at atmospheric pressure. Blue dots indicate measurement data and solid red lines indicate Lorentzian fits.

$$r_{\text{max}} = \sqrt{\left(\frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \frac{t^2}{(-\sigma_{\text{crit}})}\right)}. \quad (3)$$

Putting in  $t = 0.34\mu\text{m}$  and  $\sigma_{\text{crit}} = -15\text{MPa}$  into equation (3) gives a value of  $r = 41.9\mu\text{m}$ . While this limits our fabrication technique in fabricating large and thin plate resonators, strain control techniques [10] might be explored in future studies to counterbalance the stress induced by micro-masonry.

The study of the quality factor of the fabricated nanoplates was then used to estimate the damping of the structure, which is related to energy loss in the resonator. Air damping has a large impact on device performance such as mass sensitivity, and is an important consideration for designing mass sensors. This is more so considering practical applications of plate resonators, often requiring them to operate under atmospheric pressure, or even liquid. We thus measured the response of the devices under varying air pressure, which can be divided into intrinsic, molecular, and viscous regimes depending on the Knudsen number  $Kn$  [30]:

$$Kn = \frac{k_B T}{\sqrt{2} \pi d_{\text{air}}^2 P l_{\text{res}}}, \quad (4)$$

with  $k_B$  as the Boltzmann's constant,  $T$  as the temperature,  $d_{\text{air}}$  as air collision diameter,  $P$  as the air pressure, and  $l_{\text{res}}$  as the resonator's characteristic length (diameter in the present case).

Even in a perfect vacuum, energy dissipation occurs by what are collectively called intrinsic mechanisms, such as phonon-phonon scattering, phonon-electron scattering, thermoelastic damping, support dissipation, and surface defect dissipation. As the surrounding gas pressure increases, the increased dissipation causes a decrease of total measured  $Q$  factor  $Q_{\text{total}}$ :

$$Q_{\text{total}}^{-1} = \sum Q_i^{-1}, \quad (5)$$

where  $Q_i$  is the  $Q$  factor corresponding to distinct dissipation mechanisms (intrinsic, air, fluid, etc). Measurement in the intrinsic regime ( $Kn > 100$ ) is directly related to the material property and process variations. Measurement in the molecular and viscous regimes is useful to identify the damping model which applies to our resonator, and can be used when designing devices operating in practical conditions.

$Q$  versus  $P$  measurement results for the representative device are shown in figure 5. In the intrinsic regime, the device has a  $Q$  factor of around 3000, which is typical for most of

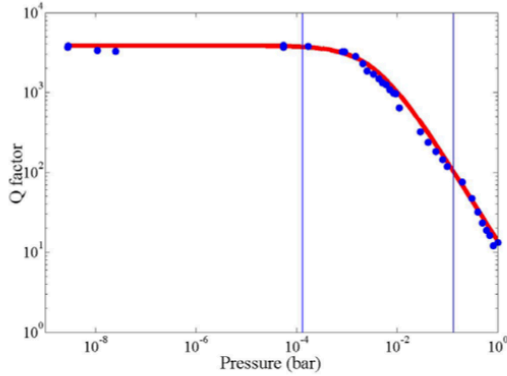
the devices we fabricated. As the pressure increases, the device enters the molecular regime ( $100 > Kn > 0.01$ ), where momentum transfer between the air molecules and the resonator becomes dominant. Here, it was observed that, similarly to other MEMS devices, the  $Q$  factor is inversely proportional to air pressure [31]:

$$Q_{\text{mol}} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{1.5} \frac{\sqrt{RT/M_{\text{air}}}}{P} t \rho f, \quad (6)$$

with  $R$  the gas constant ( $R = 8.317\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ),  $T$  the absolute temperature (K),  $M_{\text{air}}$  the molar mass of air ( $29\text{g mol}^{-1}$ ),  $P$  the air pressure (Pa),  $t$  the resonator plate thickness,  $\rho$  the density of resonator material (for Si  $\rho = 2329\text{kg m}^{-3}$ ) and  $f$  the vibration frequency of the resonator. While a narrow gap between a resonator and the substrate commonly produces additional damping due to the squeeze film effect [31] for cantilevers, this is not the case for enclosed plate structures (as in our case), since there is no air flowing between the gap and the environment.

The red line in figure 5 corresponds to the  $Q$  factor obtained by substituting  $Q_{\text{intrinsic}} = 3000$  (which was obtained experimentally at a high vacuum) and  $Q_{\text{mol}}$  from equation (6) into equation (5). It can be seen that this model adequately describes the experimental results, even in a viscous regime up to atmospheric pressure, where a quality factor of  $Q = 13$  was observed for devices with  $r = 20\mu\text{m}$ . It has to be noted that the low  $Q$  factor observed at atmospheric pressure was related to the geometry of the device, not to the nature of transfer printing process. It would be possible to get devices with high  $Q$  factors in air by increasing the thickness and the resonance frequency.

To complete the dynamic characterization of our structure, we studied the dependence of the resonance frequency to the air pressure. The shift of resonance frequency relative to the resonance frequency in vacuum ( $(f_0 - f_v)/f_v$ , with  $f_v = 2.798\text{MHz}$ ) is shown in figure 6. Negligible shift of  $f_0$  was observed until the device entered the molecular regime, where the frequency of the device increased with pressure. At 1 bar, i.e. at atmospheric pressure, the resonant frequency of the device is  $3.106\text{MHz}$ , compared to  $2.798\text{MHz}$  in the intrinsic regime. Most of the  $f_0$  increase can be attributed to the air below the closed gap, which acts as an added stiffness and increases the effective spring constant  $k_{\text{eff}}$  of the device as the pressure increases. The influence of possible temperature variations on  $f_0$  is negligible, with typical value for frequency drift of the order of  $-30\text{ppm } ^\circ\text{C}^{-1}$  [32]. This is in contrast to observation of an  $f_0$  shifts around 10%.



**Figure 5.**  $Q$  versus  $P$  profile for a structure with radius  $r = 20\mu\text{m}$ , plate thickness  $t = 0.34\mu\text{m}$ , and gap height  $h = 1.25\mu\text{m}$ . Blue markers indicate measurement data, while the red line corresponds to the  $Q$  factor obtained by substituting  $Q_{\text{intrinsic}} = 3000$  and  $Q_{\text{mol}}$  from equation (6) into equation (5). The vertical blue lines indicate boundaries between different damping regimes ( $Kn = 100$  for intrinsic to molecular and  $Kn = 0.01$  for molecular to viscous).  $Q$  factor values are extracted from the vibrational noise spectra of the device.

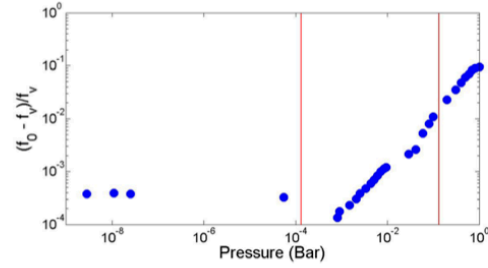
The influence of the fabrication process on the plate, and on its dynamic behavior, can be summarized as follows. Measurement of the resonance frequencies compared to theoretical modeling leads to the estimation of the residual stress of the nanoplates that is found to be  $-15\text{MPa}$  (compressive), which limits the ability to fabricate thin and large area membranes. As is typical with other resonators, the air damping behavior of the device obeys the molecular damping model with large intrinsic  $Q$  factor ( $Q = 3000$ ), compared to the molecular  $Q$  factor ( $Q = 13$ ) at atmospheric pressure, as encountered during practical conditions. The enclosed gap structure produces negligible squeeze film damping and also gives rise to significant resonant frequency shift, which is a feature of all nanoplate resonators.

With regard to practical considerations, it is useful to evaluate the potential performances of our nanoplate resonators for mass sensing applications. The sensitivity  $S_{\text{mass}}$  of a vibrating mass sensor at resonance is a common figure of merit given by (7):

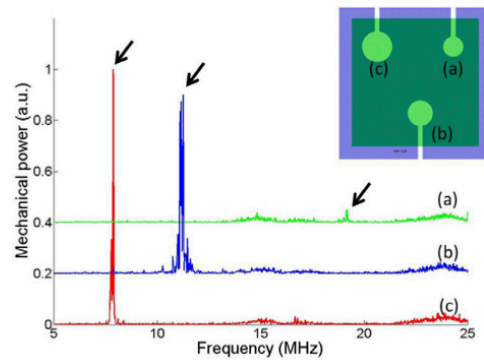
$$S_{\text{mass}} = \frac{2M_{\text{eff}}}{f_0}, \quad (7)$$

where  $M_{\text{eff}}$  is the effective mass corresponding to the vibration mode in a lumped model approach. The mass of a silicon plate resonator with dimensions of  $r = 20\mu\text{m}$  and  $t = 0.34\mu\text{m}$  is  $9.82 \times 10^{-13}\text{kg}$ , which corresponds to an effective mass of  $2.65 \times 10^{-13}\text{kg}$  for the first vibration mode under consideration here [33]. Putting in  $f_0 = 2.798\text{MHz}$  gives an  $S_{\text{mass}}$  of  $189\text{agHz}^{-1}$ , which is more sensitive compared to values reported for several mechanical resonators used for practical applications [2, 34–38]. Another figure of merit is the mass resolution, which depends on the experimental conditions through the signal-to-noise ratio (SNR) and the  $Q$  factor:

$$\text{mass resolution} = \frac{M_{\text{eff}}}{Q \text{SNR}}. \quad (8)$$



**Figure 6.** Relative shift of the resonance frequency  $(f_0 - f_v)/f_v$  versus pressure for structure with diameter  $r = 20\mu\text{m}$ , plate thickness  $t = 0.34\mu\text{m}$  and gap height  $h = 1.25\mu\text{m}$ . Resonance frequency values are extracted from the vibrational noise spectra of the device.



**Figure 7.** Frequency response obtained in air of a multiple cavity device with plate thickness  $t = 0.34\mu\text{m}$  and radius (a)  $r = 8\mu\text{m}$  (green, 18.8MHz peak), (b)  $r = 10\mu\text{m}$  (blue, 10.9MHz peak) and (c)  $r = 12\mu\text{m}$  (red, 7.7MHz peak). Arrows indicate the location of resonance peaks. The curves for (a) and (b) are vertically shifted by 0.4 and 0.2, respectively, for clarity. It can be seen that no crosstalk between cavities is observed. Inset: schematic top view of the device.

The mass resolution in high vacuum was determined from signal analysis. The maximum achievable SNR is obtained as follows: the signal of the device is taken at the onset of nonlinearity, i.e. when the shape of the frequency response curve becomes non-Lorentzian. The SNR is then calculated by the ratio between this signal value to the thermomechanical noise floor, which gives  $\text{SNR} = 49\text{dB}$  for a 1 Hz measurement bandwidth. Putting in the measured  $Q$  factor ( $Q = 3000$ ), provides in equation (8) a theoretical mass resolution of  $1.02\text{agHz}^{-1}$  in high vacuum.

Finally, the parallel fabrication possibility of our approach was proven by realizing several resonators in a single printing step: from an application point of view, it is of interest to see whether there is mechanical crosstalk between closely located resonating structures, since it might complicate measurements on devices with multiple cavities. To investigate this point, the amplitude spectra of three cavities of various sizes ( $r = 12, 10$  and  $8\mu\text{m}$ ) located within a single base structure were recorded (figure 7). In this case, external piezo actuation

was used to induce high vibration amplitudes. No resonance peak from neighboring plates was observed when one of the plates was measured, which suggests minimal, if any, mechanical crosstalk between the suspended structures. This means that the device anchoring strength is rigid enough to diminish acoustic radiation between adjacent suspended structures, and micro-masonry could allow fabrication of devices with separate responses within a single base structure in a single step.

#### 4. Conclusion

In summary, we fabricated suspended plate resonating structures using the micro-masonry method. The resulting devices were shown to be robust, although care should be taken to avoid defects and delamination. The micro-masonry process was estimated to introduce compressive stress around  $-15\text{MPa}$ , which could potentially cause buckling and currently limits its ability to fabricate large area, thin suspended structures. As study of the fabricated resonator dynamic responses demonstrated that they behave as expected. The air damping of the device corresponds to the momentum transfer model at a molecular regime, with an intrinsic  $Q$  factor of 3000 in the vacuum and 13 at atmospheric pressure, which is suitable for mass sensing applications in atmospheric pressure. The theoretical mass sensitivity and resolution of the device are  $189\text{agHz}^{-1}$  and  $1.02\text{agHz}^{-\frac{1}{2}}$ , respectively, which is better than values reported for other resonators. This technique has the advantage of creating arrays of different structures within a single fabrication step, with no measurable mechanical crosstalk between them. It is foreseen that this technique will be useful for the fabrication of capacitively transduced plate devices that can be operated in a liquid environment for biosensing purposes.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the INSIS-CNRS financial support NANOBIOD-2013, and the NSF financial support CMMI-1351370. This work was partly supported by the French RENATECH network.

#### References

- [1] Ayala C and Nicu L 2007 Micromachined piezoelectric membranes with high nominal quality factors in Newtonian liquid media: a Lamb's model validation at the microscale *Sensors Actuators B* **123** 860–8
- [2] Xu T, Wang Z, Miao J, Yu L and Li C M 2008 Micro-machined piezoelectric membrane-based immunosensor array *Biosensors Bioelectron.* **24** 638–43
- [3] Lu X, Guo Q, Xu Z, Ren W and Cheng Z-Y 2012 Biosensor platform based on stress-improved piezoelectric membrane *Sensors Actuators Phys.* **179** 32–8
- [4] Alava T, Mathieu F, Mazenq L, Soyer C, Remiens D and Nicu L 2010 Silicon-based micromembranes with piezoelectric actuation and piezoresistive detection for sensing purposes in liquid media *J. Micromech. Microeng.* **20** 075014
- [5] Cha M, Shin J, Kim J-H, Kim I, Choi J, Lee N, Kim B-G and Lee J 2008 Biomolecular detection with a thin membrane transducer *Lab. Chip* **8** 932–7
- [6] Ekinci K L and Roukes M L 2005 Nanoelectromechanical systems *Rev. Sci. Instrum.* **76** 061101
- [7] Puers R 1993 Capacitive sensors: when and how to use them *Sensors Actuators Phys.* **37–38** 93–105
- [8] Rollier A-S, Legrand B, Collard D and Buchaillot L 2006 The stability and pull-in voltage of electrostatic parallel-plate actuators in liquid solutions *J. Micromech. Microeng.* **16** 794
- [9] Bao M and Yang H 2007 Squeeze film air damping in MEMS *Sensors Actuators Phys.* **136** 3–27
- [10] Shchepetov A, Prunnila M, Alzina F, Schneider L, Cuffe J, Jiang H, Kauppinen E I, Torres C M S and Ahopelto J 2013 Ultra-thin free-standing single crystalline silicon membranes with strain control *Appl. Phys. Lett.* **102** 192108
- [11] Ergun A, Yaralioglu G and Khuri-Yakub B 2003 Capacitive micromachined ultrasonic transducers: theory and technology *J. Aerosp. Eng.* **16** 76–84
- [12] Ismail A K, Burdess J S, Harris A J, McNeil C J, Hedley J, Chang S C and Suarez G 2006 The principle of a MEMS circular diaphragm mass sensor *J. Micromech. Microeng.* **16** 1487
- [13] Adiga V P, Ilic B, Barton R A, Wilson-Rae I, Craighead H G and Parpia J M 2011 Modal dependence of dissipation in silicon nitride drum resonators *Appl. Phys. Lett.* **99** 253103
- [14] Adiga V P, Ilic B, Barton R A, Wilson-Rae I, Craighead H G and Parpia J M 2012 Approaching intrinsic performance in ultra-thin silicon nitride drum resonators *J. Appl. Phys.* **112** 064323
- [15] Southworth D R, Barton R A, Verbridge S S, Ilic B, Fefferman A D, Craighead H G and Parpia J M 2009 Stress and silicon nitride: a crack in the universal dissipation of glasses *Phys. Rev. Lett.* **102** 225503
- [16] Mastrangelo C H and Hsu C H 1993 Mechanical stability and adhesion of microstructures under capillary forces: I. Basic theory *J. Microelectromech. Syst.* **2** 33–43
- [17] Tas N, Sonnenberg T, Jansen H, Legtenberg R and Elwenspoek M 1996 Stiction in surface micromachining *J. Micromech. Microeng.* **6** 385
- [18] Carlson A, Bowen A M, Huang Y, Nuzzo R G and Rogers J A 2012 Transfer printing techniques for materials assembly and micro/nanodevice fabrication *Adv. Mater.* **24** 5284–318
- [19] Zaumseil J, Meitl M A, Hsu J W P, Acharya B R, Baldwin K W, Loo Y-L and Rogers J A 2003 Three-dimensional and multilayer nanostructures formed by nanotransfer printing *Nano Lett.* **3** 1223–7
- [20] Yeom J and Shannon M A 2010 Detachment lithography of photosensitive polymers: a route to fabricating 3D structures *Adv. Funct. Mater.* **20** 289–95
- [21] Javey A, Nam, Friedman R S, Yan H and Lieber C M 2007 Layer-by-layer assembly of nanowires for three-dimensional, multifunctional electronics *Nano Lett.* **7** 773–7
- [22] Kim S et al 2010 Microstructured elastomeric surfaces with reversible adhesion and examples of their use in deterministic assembly by transfer printing *Proc. Natl Acad. Sci.* **107** 17095–100
- [23] Keum H, Seong M, Sinha S and Kim S 2012 Electrostatically driven collapsible Au thin films assembled using transfer printing for thermal switching *Appl. Phys. Lett.* **100** 211904
- [24] Zhang Y, Keum H, Park K, Bashir R and Kim S 2014 Micro-masonry of MEMS sensors and actuators *J. Microelectromech. Syst.* **23** 308–14
- [25] Keum H, Carlson A, Ning H, Mihi A, Eisenhaure J D, Braun P V, Rogers J A and Kim S 2012 Silicon micro-masonry using elastomeric stamps for three-dimensional microfabrication *J. Micromech. Microeng.* **22** 055018
- [26] Salomon S, Leïchlé T, Dezest D, Seichepine F, Guillon S, Thibault C, Vieu C and Nicu L 2012 Arrays of nanoelectromechanical biosensors functionalized by microcontact printing *Nanotechnology* **23** 495501
- [27] Schomburg W K 2011 *Introduction to Microsystem Design* (Berlin: Springer)

- [28] Hopcroft M A, Nix W D and Kenny T W 2010 What is the Young's modulus of silicon? *J. Microelectromech. Syst.* **19** 229–38
- [29] Iida T, Itoh T, Noguchi D and Takano Y 2000 Residual lattice strain in thin silicon-on-insulator bonded wafers: thermal behavior and formation mechanisms *J. Appl. Phys.* **87** 675–81
- [30] Martin M J, Houston B H, Baldwin J W and Zalalutdinov M K 2008 Damping models for microcantilevers, bridges, and torsional resonators in the free-molecular-flow regime *J. Microelectromech. Syst.* **17** 503–11
- [31] Bao M, Yang H, Yin H and Sun Y 2002 Energy transfer model for squeeze-film air damping in low vacuum *J. Micromech. Microeng.* **12** 341
- [32] Kim B, Candler R N, Hopcroft M A, Agarwal M, Park W-T and Kenny T W 2007 Frequency stability of wafer-scale film encapsulated silicon based MEMS resonators *Sensors Actuators A* **136** 125–31
- [33] Hauer B D, Doolin C, Beach K S D and Davis J P 2013 A general procedure for thermomechanical calibration of nano/micro-mechanical resonators *Ann. Phys.* **339** 181–207
- [34] Gfeller K Y, Nugaeva N and Hegner M 2005 Micromechanical oscillators as rapid biosensor for the detection of active growth of *Escherichia coli* *Biosensors Bioelectron.* **21** 528–33
- [35] Hosaka S, Chiyoma T, Ikeuchi A, Okano H, Sone H and Izumi T 2006 Possibility of a femtogram mass biosensor using a self-sensing cantilever *Curr. Appl. Phys.* **6** 384–8
- [36] Ilic B, Czaplewski D, Craighead H G, Neuzil P, Campagnolo C and Batt C 2000 Mechanical resonant immunospecific biological detector *Appl. Phys. Lett.* **77** 450–2
- [37] Oliviero G et al 2008 A biofunctional polymeric coating for microcantilever molecular recognition *Anal. Chim. Acta* **630** 161–7
- [38] Nugaeva N, Gfeller K Y, Backmann N, Düggelein M, Lang H P, Güntherodt H-J and Hegner M 2007 An antibody-sensitized microfabricated cantilever for the growth detection of *Aspergillus niger* spores *Microsc. Microanal.* **13** 13–7



# A Simple Fabrication Process Based on Micro-masonry for the Realization of Nanoplate Resonators with Integrated Actuation and Detection Schemes

Adhitya Bhaswara<sup>1,2</sup>, Hohyun Keum<sup>3</sup>, Fabrice Mathieu<sup>1,2</sup>, Bernard Legrand<sup>1,2</sup>, Seok Kim<sup>3</sup>, Liviu Nicu<sup>1,2\*</sup> and Thierry Leïchle<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Analysis and Architecture of Systems (LAAS), Centre national de la recherche scientifique, Toulouse, France, <sup>2</sup>Laboratory for Analysis and Architecture of Systems (LAAS), Université de Toulouse, Toulouse, France, <sup>3</sup>University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, IL, USA

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Oscar Vazquez Mena,  
University of California Berkeley, USA

### Reviewed by:

Qin Zhou,  
University of California Berkeley, USA  
Schahrazède Mouaziz,  
École Polytechnique Fédérale de  
Lausanne, Switzerland

### \*Correspondence:

Liviu Nicu  
nicu@laas.fr;  
Thierry Leïchle  
leïchle@laas.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Micro- and Nanoelectromechanical  
Systems,  
a section of the journal  
Frontiers in Mechanical Engineering

Received: 12 November 2015

Accepted: 10 February 2016

Published: 01 March 2016

### Citation:

Bhaswara A, Keum H, Mathieu F,  
Legrand B, Kim S, Nicu L and  
Leïchle T (2016) A Simple Fabrication  
Process Based on Micro-masonry for  
the Realization of Nanoplate  
Resonators with Integrated Actuation  
and Detection Schemes.  
Front. Mech. Eng. 2:1.  
doi: 10.3389/fmech.2016.00001

In this work, we use the micro-masonry technique to fabricate nanoplate resonators with integrated electrostatic actuation and capacitive detection in a few steps. Our approach is an alternative solution to the current fabrication methods used to create membranes and plates that usually rely on the selective etching of a sacrificial layer. Highly doped silicon plates were transfer printed using microtip elastomeric stamps onto insulated bases displaying cavities in order to form suspended structures with airtight gaps. By post-processing adequate interconnections, the fabricated resonators were actuated and their resonant frequency measured in a fully integrated manner. The tested nanoplate devices behave as predicted by theory and offer quality factors of more than 30 in air.

**Keywords:** resonator, MEMS/NEMS, electrostatic actuation, capacitive detection, micro-masonry

## INTRODUCTION

Resonant microelectromechanical and nanoelectromechanical systems (MEMS and NEMS) have been recently proven to be excellent candidates for bio- and chemical sensing because of their label-free approach, their excellent sensitivity, and their high level of integration. These devices possibly enable real-time detection of biomolecules in their natural liquid environment provided they can actually operate in such fluid during the measurement (Alava et al., 2010). This imposes great constraints onto the device design, namely, an actuation/sensing scheme that is compatible with the presence of a conductive medium surrounding the structure and a minimum damping from the environment when forced to vibrate and operate in dynamic mode, which offers a better sensitivity (Rollier et al., 2006; Lu et al., 2012).

In that regard, nanoscale membranes and plate resonators offer advantages over more common cantilever shapes that include higher quality factor ( $Q$  factor) for an equivalent mass and better suitability to mass sensing applications in liquid or gas (Vishwakarma et al., 2014). While many fabrication approaches can be used to create such devices where freestanding structures are obtained through the etching of a sacrificial layer (Ergun et al., 2003; Ismail et al., 2006) or the backside of a silicon wafer (Aslam, 2013), these techniques are limited in terms of materials and thickness range of

the fabricated structure and some can potentially cause stiction (Mastrangelo and Hsu, 1993; Tas et al., 1996).

Lately, transfer printing, a technique that is used to transfer diverse materials from DNA molecules or photoresist (PR), to semiconductor nanowires (Carlson et al., 2012), has been proven useful for the fabrication of various static (Keum et al., 2012) and mobile structures, e.g., micro-mirrors (Yang et al., 2015), under the name of micro-masonry. As a follow-up to our previous work (Bhaswara et al., 2014), where we have used micro-masonry to fabricate passive nanoplate resonators, here we demonstrate that micro-masonry enables the realization of similar devices with integrated electrostatic actuation and capacitive sensing. More specifically, on top of being very simple and straightforward, the advantage of using micro-masonry for resonant nanoplate fabrication is the ability to create an enclosed air-gap underneath the freestanding structure for proper actuation/sensing, which might potentially be appropriate for liquid operation.

An illustration of a nanoplate device with integrated electrostatic actuation and capacitive detection is shown in **Figure 1A**. The device consists of four parts: a top silicon layer, an insulating base structure, a bottom electrode, and metal interconnects. The freestanding resonating structure is formed by the portion of the top silicon layer suspended above the circular cavity that is created within the base structure. Such structure is simply obtained by transfer printing a silicon layer onto the previously patterned base. In our approach, both top and bottom layers/electrodes consist of highly doped silicon to allow electrostatic actuation and capacitive detection. In our design, devices are set up in pairs

in order to facilitate capacitance compensation for the detection scheme (**Figure 1B**).

Three important parameters were considered in the device design: the cavity (i.e. resonating plate) radius  $r$ , the plate thickness  $t$ , and the gap height  $h$ . In terms of electrical detection, it is favorable to increase the device capacitance by maximizing  $r$  and minimizing  $h$ . In terms of vibration mechanics, minimizing  $r$  and maximizing  $t$  lead to an increase of the resonance frequency of the device and thus of its  $Q$  factor. However, one needs to keep in mind that the device resonant frequency cannot exceed the bandwidth of the measurement electronics. In terms of fabrication, it is preferable to minimize  $r$  and maximize  $h$  and  $t$ . Indeed, thinner and larger plates can be difficult to transfer print and are prone to buckling because of compressive stress induced during the high-temperature sealing process. To best satisfy the aforementioned considerations, we have thus selected the following trade-off values: a gap height  $h = 200$  nm, a plate thickness  $t = 340$  nm, and a cavity radius  $r$  between 8 and 20  $\mu\text{m}$  (Bhaswara et al., 2014).

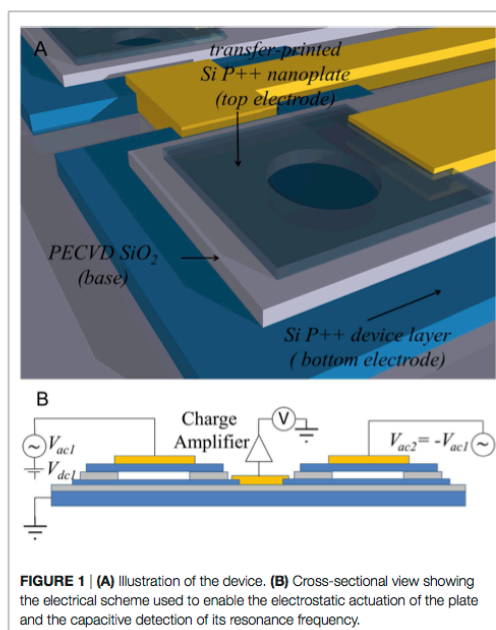
## MATERIALS AND METHODS

### Device Fabrication

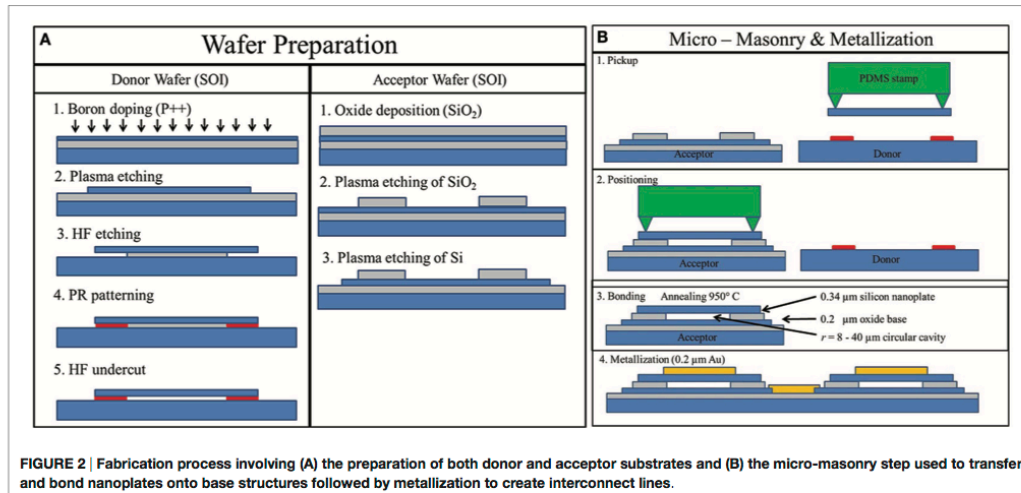
The fabrication process of the device is illustrated in **Figure 2**. Two silicon-on-insulator (SOI) wafers were used as starting substrates to fabricate the nanoplate resonators: first, a 0.34/1/500- $\mu\text{m}$  thick P-type wafer (from BT electronics) was used as the donor substrate; second, a 2/1/500- $\mu\text{m}$  thick P++-type wafer (from BT electronics) was used as the acceptor substrate. The donor SOI wafer was further doped with boron at a dose of  $10^6$  atoms/ $\text{cm}^2$ , followed by thermal annealing at 1000°C during 20 min in order to reduce the electrical resistance of the top layer. Low resistance top layers for both donor and acceptor wafers were necessary in order to use silicon directly as top and bottom electrodes of the device.

The nanoplate inks were fabricated from the donor wafer as follows. First, 100  $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  squares were patterned using photolithography to define the ink shapes in the silicon device layer. Then, dry reactive ion etching (RIE) was performed to form the nanoplates that remained attached to the buried oxide layer. Subsequently, HF solution was utilized to remove the unnecessary box oxide layer as well as a small region beneath the silicon nanoplates. This undercut region was filled with PR followed by complete removal of oxide layer resulting in suspended nanoplates with PR anchors. The suspended nanoplates were then transfer printed through micro-masonry, leaving PR anchors behind on the donor substrate. The thickness of the silicon nanoplate ink was defined by the thickness of the top silicon layer of the SOI donor wafer (0.34  $\mu\text{m}$  in our case).

The acceptor chips were fabricated from the acceptor wafer as follows. First, a 200-nm thick PECVD oxide layer was deposited at 300°C, 1 mbar on top of a bulk silicon wafer. Then, the base structure was patterned using photolithography followed by RIE. The base structures consisted of square shapes (120  $\mu\text{m}$  side lengths) with one or more circular cavities with radius  $r$  ranging from 8 to 20  $\mu\text{m}$ . Base structures with multiple cavities resulted in multiple nanoplate devices obtained in a single transfer-printing

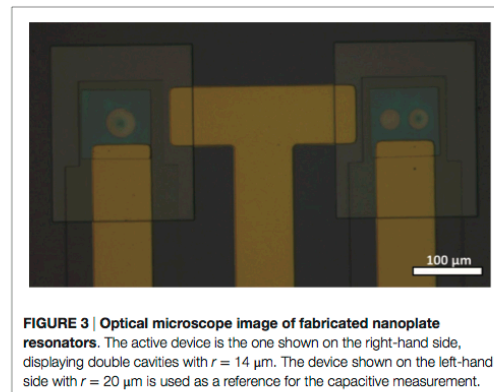


**FIGURE 1 | (A)** Illustration of the device. **(B)** Cross-sectional view showing the electrical scheme used to enable the electrostatic actuation of the plate and the capacitive detection of its resonance frequency.



step, thus enabling a parallel fabrication capability. Another lithography step followed by RIE was carried out to separate the bottom electrodes below each base structure in order to electrically address them separately. Finally, and prior to the transfer printing of the ink onto the base structure, the receiver wafer was diced into 1 cm × 1 cm chips.

Transfer printing of the silicon nanoplate inks was achieved by means of PDMS microtip stamps (Kim et al., 2010; Keum et al., 2012). These stamps have pyramidal tips that provide suitable adhesion force to enable the pickup and the printing steps. While the transfer printing of Si layers onto SiO<sub>2</sub> surfaces was previously demonstrated (Keum et al., 2012), the nanometer thick Si layer suspended above the cavity is prone to buckle during high-temperature annealing process due to the differences in thermal expansion coefficients, thus possibly leading to the delamination of the nanoplate. In order to improve adhesion between the Si layer and the SiO<sub>2</sub> base, the base was exposed to O<sub>2</sub> plasma prior to transfer printing of the Si nanoplates (Suni et al., 2002). On the surface-activated SiO<sub>2</sub> base substrate, the inks were aligned and transferred using appropriate speed and force profiles. A manual stage equipped with an optical microscope was utilized to manipulate the donor substrate while the stamp was stationary under the microscope. Afterwards, the nanoplates were pressed along the circumference of the cavities to ensure good contact using a single tip stamp. The chip was finally annealed at 600°C to permanently bond the base and the nanoplate. Afterwards, the combined structures underwent metallization to create electrical interconnects to the top electrode (silicon nanoplate, i.e., top silicon layer of the donor wafer) and the bottom electrode (top silicon layer of the acceptor substrate), and to ground the bulk silicon acceptor wafer. In order to do so, Cr and Au layers were evaporated and patterned by lift-off at the single chip level.



For packaging purposes, each chip was finally wire-bonded and mounted onto a specifically designed and fabricated printed circuit board (PCB). Typical fabricated devices are shown in Figure 3: the device on the right-hand side with double cavities of radius  $r = 14 \mu\text{m}$  is the actual active resonator, while the device shown on the left-hand side is used as a reference for appropriate capacitance compensation.

### Measurement Method

Figure 4 shows the equivalent circuit of a paired device (active and reference resonators), as well as the configuration of voltage bias at each port. The charges flowing through device 1 (active device), represented by the parasitic capacitance  $C_{p1}$  and the

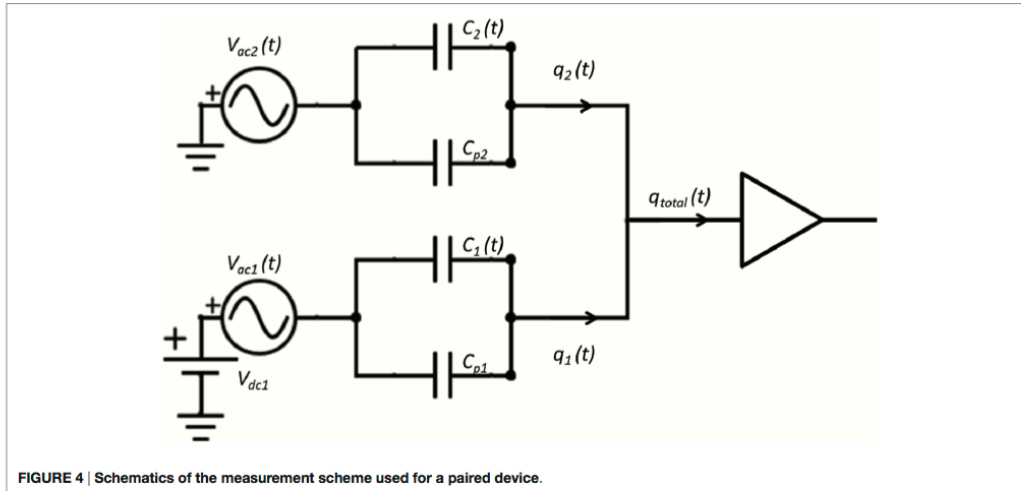


FIGURE 4 | Schematics of the measurement scheme used for a paired device.

resonator capacitance  $C_1(t)$ , and driven by a combination of AC bias  $V_{ac1}$  and DC bias  $V_{dc1}$  is expressed by (Trusov and Shkel, 2007)

$$q_1(t) = V_{ac1}(t)C_{p1} + (V_{ac1}(t) + V_{dc1})C_1(t). \quad (1)$$

The second term of the equation with  $C_1(t)$  contains the information about the resonator movement, while the first term of the equation concerns the static capacitance of the device, the parasitic effects of the oxide layer between the electrodes, and the parasitic capacitance of the silicon and the metal interconnects. This parasitic term is orders of magnitude larger than the measurement signal (actually about two orders of magnitude for the presented device) and must be properly removed before final signal amplification.

In this measurement scheme, compensation is achieved by driving device 2 using an AC voltage bias  $V_{ac2}$  close in magnitude to  $V_{ac1}$  but with an opposite phase. Devices 1 and 2 are geometrically symmetrical except for the number and size of the cavities, thus they have identical parasitic capacitance value and  $C_{p1} = C_{p2} = C_p$ . Since devices 1 and 2 were designed with different resonant frequencies,  $C_2(t)$  can be considered constant with respect to time when  $C_1(t)$  varies with time around its resonance, and vice versa. Thus, we can neglect the effect of  $C_2(t)$  around the resonant frequency of device 1, and the charges flowing out of device 2 is

$$q_2(t) = V_{ac2}(t)C_{p2} + V_{ac2}(t)C_2(t) \approx V_{ac2}(t)C_{p2}. \quad (2)$$

Since

$$C_{p2}V_{ac2}(t) = C_{p1}V_{ac2}(t) \approx -C_{p1}V_{ac1}(t) \quad (3)$$

the total charges  $q_{total}$  feeding the amplifier is

$$q_{total}(t) = q_1 + q_2 = V_{ac1}(t)C_{p1} + (V_{ac1}(t) + V_{dc1})C_1(t) + V_{ac2}(t)C_{p2},$$

$$q_{total}(t) = (V_{ac1}(t) + V_{dc1})C_1(t). \quad (4)$$

This quantity of charges was then amplified using a charge amplifier and fed into a network analyzer. The resulting data were subtracted with the background signal at  $V_{dc1} = 0$  V and filtered using the moving average method to remove the noise.

In addition to the integrated capacitive detection measurements, optical detection of the resonant frequency of the active devices was achieved using a Fabry-Perot setup for comparison means (Bhaswara et al., 2014). The center of each nanoplate was chosen as the optical measurement spot, since it corresponds to the maximum amplitude of the first vibration mode of a circular plate. To reflect typical sensor working conditions, characterizations were carried out under atmospheric pressure at room temperature unless stated otherwise.

## RESULTS AND DISCUSSION

The frequency response of a fabricated device displaying two cavities with  $r = 14 \mu\text{m}$  (Figure 3) under  $V_{dc1}$  ranging from 0 to 3.5 V and  $V_{ac1}$  of 0.22 V obtained using optical and capacitive sensing is shown in Figures 5A,B, respectively. The resonant peaks corresponding to fundamental modes of the two cavities can be observed using both optical and capacitive methods. The difference in resonant frequency between the supposedly identical cavities is expected to come from process variation, which might result in slightly different geometries and intrinsic stress inside the plate.

For the optical characterization response, which is proportional to the displacement of the resonator, peaks can still be detected at  $V_{dc1} = 0.5$  V and even at  $V_{dc1} = 0$  V due to presence of a DC offset within the device. The value of this DC offset is  $V_{offset} = 0.32$  V, which was determined by adjusting the DC bias until the peak value fell down under the noise level of the measurement device. For capacitive sensing method, which senses the vibrations of both cavities simultaneously, distinct peaks can be distinguished starting at  $V_{dc} = 1.5$  V, below which no clear resonant peaks can be observed.



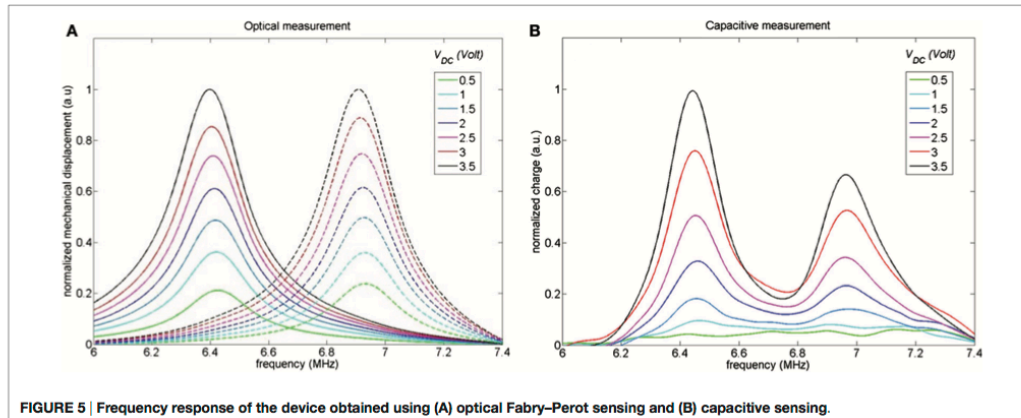


FIGURE 5 | Frequency response of the device obtained using (A) optical Fabry–Perot sensing and (B) capacitive sensing.

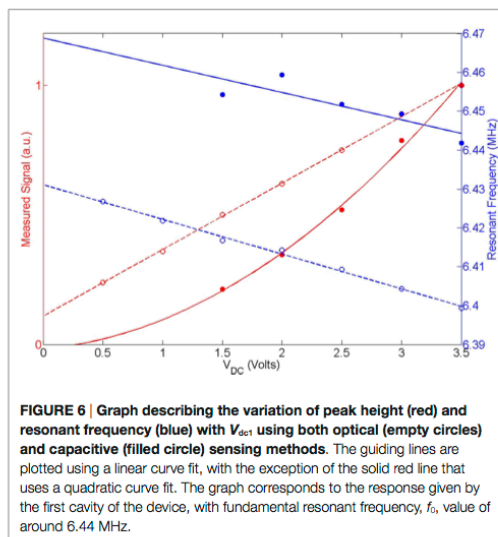


FIGURE 6 | Graph describing the variation of peak height (red) and resonant frequency (blue) with  $V_{dc1}$  using both optical (empty circles) and capacitive (filled circle) sensing methods. The guiding lines are plotted using a linear curve fit, with the exception of the solid red line that uses a quadratic curve fit. The graph corresponds to the response given by the first cavity of the device, with fundamental resonant frequency,  $f_0$ , value of around 6.44 MHz.

The normalized mechanical displacement and the normalized output charge for one of the cavities is shown in Figure 6 as a function of  $V_{dc1}$  (empty and filled red circles, respectively). While in general, the amplitude of the circular plate capacitor is a non-linear function of  $V_{dc1}$  (Ahmad and Pratap, 2010), the displacement of the device is small enough so that the experimentally measured amplitude is observed to be linear up to a DC bias value of 3.5 V. However, the output charge is observed to vary with the square of  $V_{dc1}$ . Looking back into Eq. 4, it can be observed that  $q_{total}(t)$  is proportional to  $V_{dc1}^2$  only if  $C_i(t)$  is proportional to  $V_{dc1}$ , which, similarly to the case of the amplitude vibration, is true

only for small displacements. Thus, both optical and capacitive measurements show that the device behavior is consistent with what is expected for parallel plate capacitors in the linear regime for  $V_{dc1}$  values between 0.5 and 3.5 V.

The variation of resonant frequency with  $V_{dc1}$  for the first cavity is shown in Figure 6 for both optical and capacitive sensing (empty and filled blue circle, respectively). Comparison between the two sensing methods shows that optical measurement gives rise to a lower resonant frequency value (around 45 kHz lower) compared to capacitive sensing. This can be attributed to the local heating of the device by the laser beam used in the Fabry–Perot setup, which causes both compressive thermal stress within the structure and change in the silicon's Young modulus that reduces the resonant frequency. For both sensing methods, it can be observed that the resonant frequency decreases linearly and inversely with  $V_{dc1}$ . The optical sensing method shows that between  $V_{dc1} = 0.5$  and 3.5 V, the resonant frequency is reduced by 27.5 kHz, while the capacitive sensing method shows that between  $V_{dc1} = 1.5$  and 3.5 V, the resonant frequency is reduced by 12.5 kHz. The frequency decrease appears to be linear, which suggests influence from both spring softening effect as commonly observed in capacitive devices (Seeger and Boser, 2003), and tensile stress on the plate due to the DC bias applied between the electrodes.

The analytical value for the first mode resonant frequency of a circular clamped plate is (Schomburg, 2011)

$$f_{analytical} = \sqrt{\frac{5}{3}} \frac{1}{\pi r \sqrt{\rho}} \sqrt{\frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \frac{t^2}{r^2} + \sigma_0} \quad (5)$$

where  $r$  is the plate radius,  $t$  the plate thickness,  $\rho$  the density of material,  $\nu$  the Poisson's ratio,  $E$  the Young's modulus, and  $\sigma_0$  the in-plane stress in the plate. Assuming no stress, substituting silicon mechanical properties for plate bending ( $\rho = 2329 \text{ kg m}^{-3}$ ,  $E = 170 \text{ GPa}$ , and  $\nu = 0.064$ ) and  $r = 14 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $t = 0.34 \text{ }\mu\text{m}$  into Eq. 5 yields an analytical resonant frequency  $f_{analytical}$  value of 7.05 MHz, which is pretty consistent with the values obtained from optical

and capacitive measurements. Still, the lower experimental resonant frequency values indicate the presence of tensile stress within the plate, which can be determined using Eq. 5:

$$\sigma_0 = \frac{3\pi^2 r^3 \rho}{5} (f_{\text{analytical}}^2 - f_{\text{experimental}}^2). \quad (6)$$

Substituting  $f_{\text{experimental}} = 6.44$  and  $6.96$  MHz for the first and second devices yields the in-plane stress values of  $\sigma_0 = -22.2$  and  $-3.4$  MPa, respectively. These values are comparable with results obtained in our previous work (Bhaswara et al., 2014) and are representative of typical stress values and resonance frequency variations involved with the micro-masonry process.

For a further assessment of the structure's performances, we have finally compared the device behavior in atmospheric pressure and vacuum. Figure 7 shows the frequency response of one of the devices both in atmospheric pressure ( $P = 1012$  mbar) and in vacuum ( $P = 1.2$  mbar) obtained using optical sensing. The Q factor of the device at atmospheric pressure is determined to be  $Q_{\text{air}} = 33$ . In vacuum, the Q factor was determined to be  $Q_{\text{vacuum}} = 77$ , which is much lower compared to the values obtained from our previous work ( $Q_{\text{vacuum}} = 3000$ ) (Bhaswara et al., 2014). This result suggests that a pocket of air exists in the gap between the plate and the substrate even when the measurement chamber is under vacuum, and the seal between the plate and the base structure is thus hermetic. For information, our previous structures exhibited vents within the base structure, thus allowing pressure under the plate to equilibrate the working pressure (Bhaswara et al., 2014). While this results in lower  $Q_{\text{vacuum}}$ , this does not significantly affect operation in air, and the tight seal will prove advantageous in liquid environment. This also means that our presented process that relies on micro-masonry for the fabrication of nanoplate structures could also be used for obtaining devices with vacuum pockets, which might potentially find applications, e.g., pressure sensors or biosensors.

## CONCLUSION

We have successfully fabricated nanoplate resonators with integrated actuation and sensing schemes using micro-masonry. This method was used to fabricate devices with 200-nm-thick air gaps without structure collapsing due to stiction. We have demonstrated that the resulting structure is robust enough to withstand post-processing (e.g., metallization and lift-off processing). The fabricated device was driven at its resonant frequency using electrostatic actuation, and the vibration amplitude detection

## REFERENCES

- Ahmad, B., and Pratap, R. (2010). Elasto-electrostatic analysis of circular micro-plates used in capacitive micromachined ultrasonic transducers. *IEEE Sens. J.* 10, 1767–1773. doi:10.1109/JSEN.2010.2049017
- Alava, T., Mathieu, F., Mazenq, L., Soyer, C., Remiens, D., and Nicu, L. (2010). Silicon-based micromembranes with piezoelectric actuation and piezoresistive detection for sensing purposes in liquid media. *J. Micromech. Microeng.* 20, 075014. doi:10.1088/0960-1317/20/7/075014
- Aslam, M. (2013). Bulk etching of silicon wafer and development of a polyimide membrane. *J. Phys. Conf. Ser.* 439, 012029. doi:10.1088/1742-6596/439/1/012029

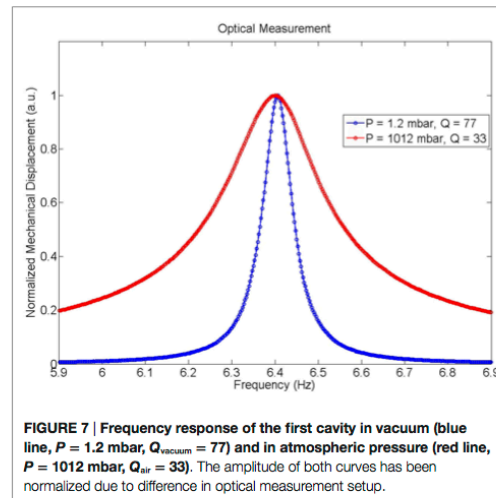


FIGURE 7 | Frequency response of the first cavity in vacuum (blue line,  $P = 1.2$  mbar,  $Q_{\text{vacuum}} = 77$ ) and in atmospheric pressure (red line,  $P = 1012$  mbar,  $Q_{\text{air}} = 33$ ). The amplitude of both curves has been normalized due to difference in optical measurement setup.

of multiple resonators was performed using both capacitive and optical sensing. The device exhibits behavior consistent with parallel plate capacitor device theory for small displacements. Compressive stress within the plate was determined to be between 3 and 20 MPa, which is comparable with values obtained in the previous works. Comparison of device Q factor in vacuum and atmospheric pressure suggests that the bond between the base and the plate is airtight.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

TL, LN, and SK conceived the research; AB designed and characterized the nanoplates; AB, and HK fabricated the nanoplates; FM designed and fabricated the associated electronics; and BL helped with electrical characterization and data analysis.

## FUNDING

The authors gratefully acknowledge the INSIS-CNRS financial support NANOBIOD-2013 and the NSF financial support CMMI-1351370. This work was partly supported by the French RENATECH network.

- Bhaswara, A., Keum, H., Rhee, S., Legrand, B., Mathieu, F., Kim, S., et al. (2014). Fabrication of nanoplate resonating structures via micro-masonry. *J. Micromech. Microeng.* 24, 115012. doi:10.1088/0960-1317/24/11/115012
- Carlson, A., Bowen, A. M., Huang, Y., Nuzzo, R. G., and Rogers, J. A. (2012). Transfer printing techniques for materials assembly and micro/nanodevice fabrication. *Adv. Mater.* 24, 5284–5318. doi:10.1002/adma.201201386
- Ergun, A., Yaralioglu, G., and Khuri-Yakub, B. (2003). Capacitive micromachined ultrasonic transducers: theory and technology. *J. Aerosp. Eng.* 16, 76–84. doi:10.1061/(ASCE)0893-1321(2003)16:2(76)
- Ismail, A. K., Burdess, J. S., Harris, A. J., McNeil, C. J., Hedley, J., Chang, S. C., et al. (2006). The principle of a MEMS circular diaphragm mass sensor. *J. Micromech. Microeng.* 16, 1487. doi:10.1088/0960-1317/16/8/008

- Keum, H., Carlson, A., Ning, H., Mihi, A., Eisenhaure, J.D., Braun, P. V., et al. (2012). Silicon micro-masonry using elastomeric stamps for three-dimensional microfabrication. *J. Micromech. Microeng.* 22, 055018. doi:10.1088/0960-1317/22/5/055018
- Kim, S., Wu, J., Carlson, A., Jin, S. H., Kovalsky, A., Glass, P., et al. (2010). Microstructured elastomeric surfaces with reversible adhesion and examples of their use in deterministic assembly by transfer printing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17095–17100. doi:10.1073/pnas.1005828107
- Lu, X., Guo, Q., Xu, Z., Ren, W., and Cheng, Z.-Y. (2012). Biosensor platform based on stress-improved piezoelectric membrane. *Sens. Actuators A Phys.* 179, 32–38. doi:10.1016/j.sna.2012.03.004
- Mastrangelo, C. H., and Hsu, C. H. (1993). Mechanical stability and adhesion of microstructures under capillary forces. I. Basic theory. *J. Microelectromech. Syst.* 2, 33–43. doi:10.1109/84.232593
- Rollier, A.-S., Legrand, B., Collard, D., and Buchallot, L. (2006). The stability and pull-in voltage of electrostatic parallel-plate actuators in liquid solutions. *J. Micromech. Microeng.* 16, 794. doi:10.1088/0960-1317/16/4/016
- Schomburg, W. K. (2011). *Introduction to Microsystem Design*. Berlin; Heidelberg: Springer. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-19489-4>
- Seeger, J. I., and Boser, B. E. (2003). Charge control of parallel-plate, electrostatic actuators and the tip-in instability. *J. Microelectromech. Syst.* 12, 656–671. doi:10.1109/JMEMS.2003.818455
- Suni, T., Henttinen, K., Suni, I., and Mäkinen, J. (2002). Effects of plasma activation on hydrophilic bonding of Si and SiO<sub>2</sub>. *J. Electrochem. Soc.* 149, G348–G351. doi:10.1149/1.1477209
- Tas, N., Sonnenberg, T., Jansen, H., Legtenberg, R., and Elwenspoek, M. (1996). Stiction in surface micromachining. *J. Micromech. Microeng.* 6, 385. doi:10.1088/0960-1317/6/4/005
- Trusov, A. A., and Shkel, A. M. (2007). Capacitive detection in resonant MEMS with arbitrary amplitude of motion. *J. Micromech. Microeng.* 17, 1583. doi:10.1088/0960-1317/17/8/022
- Vishwakarma, S. D., Pandey, A. K., Parpia, J. M., Southworth, D. R., Craighead, H. G., and Pratap, R. (2014). Evaluation of mode dependent fluid damping in a high frequency drumhead microresonator. *J. Microelectromech. Syst.* 23, 334–346. doi:10.1109/JMEMS.2013.2273803
- Yang, Z., Jeong, B., Vakakis, A., and Kim, S. (2015). A tip-tilt-piston micro-mirror with an elastomeric universal joint fabricated via micromasonry. *J. Microelectromech. Syst.* 24, 262–264. doi:10.1109/JMEMS.2015.2405032

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Bhaswara, Keum, Mathieu, Legrand, Kim, Nicu and Leïchle. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Arrays of nanoelectromechanical biosensors functionalized by microcontact printing

S Salomon, T Leïchlé, D Dezest, F Seichepine, S Guillon, C Thibault, C Vieu and L Nicu

CNRS, LAAS, F-7 Avenue du Colonel Roche, F-31400 Toulouse, France

and

Univ. de Toulouse, LAAS, F-31400 Toulouse, France

E-mail: [teichle@laas.fr](mailto:teichle@laas.fr)


Received 13 June 2012, in final form 11 October 2012

Published 19 November 2012

Online at [stacks.iop.org/Nano/23/495501](http://stacks.iop.org/Nano/23/495501)

## Abstract

The biofunctionalization of nanoelectromechanical systems (NEMS) is critical for the development of new classes of biosensors displaying improved performance and higher levels of integration. In this paper we propose a modified microcontact process ( $\mu$ CP) in order to biofunctionalize arrays of NEMS with a probe molecule on the active sensing areas together with an anti-fouling layer on the passive areas in a single, self-aligned step. We demonstrate the adequate functionalization/anti-fouling of arrays of freestanding nanocantilevers as dense as  $10^5$  nanostructures  $\text{cm}^{-2}$  by using both fluorescence microscopy and dynamic measurements of the structures' resonant frequency. The proper bioactivity of an antibody deposited onto the cantilevers and the blocking property of a bovine serum albumin layer are both assessed by incubating specific and non-specific tagged secondary antibodies followed by fluorescence imaging. Furthermore, measurement of the resonant frequency of the nanocantilevers before and after functionalization and biological recognition demonstrate that using  $\mu$ CP for device functionalization does not damage the nanostructures and preserves the mechanical sensing capability of our NEMS.

 Online supplementary data available from [stacks.iop.org/Nano/23/495501/mmedia](http://stacks.iop.org/Nano/23/495501/mmedia)

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

## 1. Introduction

High-frequency nanoelectromechanical systems (NEMS) are attracting more and more interest as a new class of sensors and actuators for potential applications ranging from computation [1] to single (bio)molecule sensing [2, 3]. For NEMS to be considered as a viable alternative to their actual biosensing macro-counterparts, they have to simultaneously meet three major requirements: high mass responsivity, low minimum detectable mass and low response time.

Without any doubt, as emphasized by theoretical studies [4], the two first specifications (high mass responsivity and low minimum detectable mass) can be successfully addressed by NEMS devices. Such predictions have been

already validated in the case of virus sensing [5], enumeration of DNA molecules [6] or even single molecule nanomechanical mass spectrometry [2]. Nanometer scale sensors have been proved in theory [7, 8] to be inadequate for practical response time scales which, if confirmed, could definitely impede the path towards realistic biosensing applications. To prevent this from happening, one possible trade-off strategy would consist in taking advantage from considering a single NEMS device not alone but as part of a functional array of similar devices [9]. This paradigm, while preserving the benefits of high mass responsivity and low minimum detectable mass of a single device, allows us to use the considerably higher capture area of the NEMS array so the response time reaches practical relevance. However, in that

case, the non-reactive areas of the chip containing multiple sensors functionalized with a single type of probe molecule must be adequately coated with an anti-fouling film in order to lower the probability of adsorption of target molecules anywhere other than on sensitive areas and hence permit their detection at ultra-low concentrations.

Thus, to address the production of massively parallel arrays of NEMS for biorecognition applications, one has to be able to perform uniform, reliable biofunctionalization of nanoscale devices at a large-scale (i.e. at the level of the entire NEMS array) while being able to block all other surfaces. The grafting of probe molecules onto nanoscale sensors is one of the major issues preventing the breakthrough of NEMS devices for biodetection applications [10]. While this technical difficulty can easily be circumvented when taking a bottom-up approach, since the nanostructures can be functionalized before integrating them into a device, it raises tremendous constraints when considering NEMS devices obtained by means of micro- and nanofabrication techniques. Indeed, preservation of the bioactivity of the sensing layer avoids subsequent fabrication steps leading to the degradation or the alteration of the probe molecules, e.g. processes involving plasma and vacuum environments or harsh chemicals [11]. This means that surface modification is most likely to be carried out at the end of the fabrication process, i.e. after the release of the nanostructures. Hence care must be taken when delivering probe molecules onto freestanding fragile structures to keep the integrity of the sensor.

Moreover, the functionalization of a large array of NEMS devices implies that submicron patterns can be created at a large scale. Thus, the most common functionalization method relying on the immersion of the entire sample in a dedicated biochemical solution is not fulfilling the need to create localized biofunctionalized areas [12]. Lately, many techniques have been proposed to locally biofunctionalize microscale sensors, such as ink-jet printing [13] and the use of separate microcapillaries [14]. However, these approaches are neither likely to produce submicron patterns nor to be scaled up to create large and multiplexed arrays. Photolithographic light-directed synthesis [15], already used for gene chip fabrication, is appropriate for large multiplexed arrays, but the diffraction limit makes it difficult to apply to nanoscale patterning. Liquid drop dispensers have also been demonstrated as useful tools for the biofunctionalization of MEMS sensors [16]; however, the capillary forces induced when retracting the tool from the surface are most likely large enough to damage nanostructures. Other technologies used to create nanoscale patterns by means of tip-based liquid or molecular transfer, such as miniaturized fountain pens [17, 18] and scanning-probes [19], could possibly address the issues related to the biofunctionalization of fragile nanostructures, even if the creation of patterns on large areas seems technically difficult to implement. Finally, one can think of using interesting approaches relying on the use of localized electrochemical reactions induced at the surface of addressable electrodes [20, 21], despite the problems raised by the high-multiplexing requirements of the electrode array in order to access individual or groups of nanostructures.

In this paper we propose to use microcontact printing [22], which is a highly parallel deposition technology [23] with nanoscale resolution [24], for the localized biofunctionalization of large-scale arrays of nanostructures. Microcontact printing ( $\mu$ CP) is a 'dry' deposition technology known to keep biomolecules fully active after deposition. Our proposed method relies on a modified  $\mu$ CP process [25], where the trenches in the stamp are actually used to transfer the molecules of interest, while the base of the stamp provides mechanical support during the printing step and can additionally be used to deposit blocking molecules on the non-reactive parts of the array. The stamp is designed so that, when placed on a surface, the bottom of the trenches comes into contact with that surface if a pressure is applied, thus allowing molecular transfer without inducing too much force onto the structure to be functionalized [26]. Using this method, we demonstrate the adequate functionalization/anti-fouling of arrays of freestanding nanocantilevers as dense as  $10^5$  nanostructures  $\text{cm}^{-2}$  by using both fluorescence microscopy and dynamic measurements of the structures' resonant frequency. The proper bioactivity of an antibody deposited onto the cantilevers, and the blocking property of a bovine serum albumin (BSA) layer are both assessed by incubating specific and non-specific tagged secondary antibodies followed by fluorescence imaging. Furthermore, measurement of the resonant frequency of the nanocantilevers before and after functionalization and biological recognition demonstrate that using  $\mu$ CP for device functionalization does not damage the nanostructures and preserves the mechanical sensing capability of our NEMS.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

A21083 Alexa Fluor 660 donkey anti-goat IgG (IgG1), A11001 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (specific IgG2), and A21202 Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (non-specific IgG2) were purchased from Invitrogen and diluted in phosphate buffered saline (PBS) 1 $\times$  solution at the respective concentrations of 400, 50, and 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Albumin from BSA and A23015 BSA fluorescein conjugate were purchased from Sigma and Invitrogen, respectively, and were both diluted at a final concentration of 1  $\text{mg ml}^{-1}$  in 1 $\times$  PBS.

### 2.2. Fabrication of NEMS arrays

Silicon on insulator (SOI) wafers were used as substrates for the fabrication of the nanocantilevers arrays. From SOI wafers (340 nm thick p-type Si/1  $\mu\text{m SiO}_2$ /525  $\mu\text{m}$  thick Si; Soitec), cantilevers with controllable thickness can be fabricated and released in aqueous solution without structure sticking issues. The nanocantilevers were patterned using a UV stepper photorepeater (I Line CANON FPA 3000 i4/i5, numerical aperture 0.63) via a 600 nm thick positive photoresist layer (ECI). The top silicon layer was etched by reactive ion etching (RIE; Alcatel AMS4200) until the intermediate  $\text{SiO}_2$

layer appeared. The sacrificial SiO<sub>2</sub> layer was then etched by dipping the wafer in a buffered hydrofluoric acid (BHF) solution leading to the release of the nanocantilevers. Finally, a 9 nm thick oxide layer was grown at the surface of the nanostructures by thermally oxidizing the chips in a dedicated furnace. Fabricated cantilevers are 8 μm long, 2.6 μm wide and 340 nm thick. Each 1.5 cm × 1.5 cm chip holds more than 10<sup>5</sup> nanostructures.

### 2.3. Fabrication of polydimethylsiloxane stamps

Polydimethylsiloxane (PDMS) stamps were fabricated using Sylgard 184 products with a 1:10 ratio of curing agent and prepolymer. After mixing the two reagents, the mixture was carefully degassed. Standard 100 mm silicon wafers were used as master molds and the patterns were created using optical photolithography followed by a 340 nm deep reactive ion etching (DRIE) step. The master molds were silanized using octadecyltrichlorosilane (OTS; Sigma, 1% in xylene). The PDMS mixture was injected onto the master mold in a dedicated stainless steel set-up and cured at 60 °C for 4 h. Glass slides were placed in the set-up to create precise composite stamps consisting of patterned 1.5 cm × 1.5 cm × 400 μm PDMS films glued to the 1.5 cm × 1.5 cm × 1 mm thick glass slides (see supplementary figure S1 available at [stacks.iop.org/Nano/23/495501/mmedia](http://stacks.iop.org/Nano/23/495501/mmedia)).

### 2.4. Printing process

Freshly prepared PDMS stamps were first rinsed 10 times with 1 ml deionized (DI) water and then dried with a nitrogen gun. The stamps were inked by incubating for 2 min in a 400 μg ml<sup>-1</sup> Alexa Fluor 660 donkey anti-goat IgG 1 × PBS solution. The stamps were rinsed 10 times with 1 ml PBS solution, 10 times with 1 ml with DI water, dried with nitrogen and then printed six times onto bare glass slides to remove all antibodies at the surface of the stamps, i.e. at the top of the trenches. To print the anti-fouling layer and the probe biomolecules in a single step, stamps were additionally incubated for 2 min in a 1 mg ml<sup>-1</sup> BSA solution, then rinsed and dried following the above-described procedure. Immediately after inking, the stamps were aligned with the oxygen plasma cleaned 1.5 cm × 1.5 cm NEMS chips using a microscope and an automated chuck (Karl Suss PA200 set-up). The alignment procedures were assisted by moiré patterns to minimize alignment errors. The stamps and the chips were gently brought into contact and a backpressure was applied onto the stamps for 30 min in order to deform the patterns so that the bottom of the trenches could touch the nanocantilevers, as clearly seen in the supplementary movie M1 (available at [stacks.iop.org/Nano/23/495501/mmedia](http://stacks.iop.org/Nano/23/495501/mmedia)). The pressure was applied by placing the stamps and the NEMS chip within a vice and the pressure level and the duration of the print were assessed by studying the level of fluorescence emitted by the transferred molecules (i.e. by seeking and obtaining a maximum level of fluorescence, comparable to that resulting from printing onto a planar SiO<sub>2</sub> surface) while avoiding breaking the nanocantilevers.

The deposition of the anti-fouling layer in a batch process was carried out by incubating the NEMS chips in a degassed 1 mg ml<sup>-1</sup> BSA solution for 30 min. The chips were then rinsed 10 times with 1 ml degassed PBS solution, 10 times with 1 ml degassed DI water and then dried with a nitrogen gun.

### 2.5. Molecular recognition and imaging

For biodetection purposes, the donkey anti-goat IgG functionalized NEMS chips were incubated in a 50 μg ml<sup>-1</sup> Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG solution or in a 50 μg ml<sup>-1</sup> Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG solution for 2 h. After incubation, the NEMS chips were thoroughly washed 10 times with 1 ml degassed PBS solution. The chips were then soaked in a beaker containing 50 ml PBS solution and agitated with an orbital shaker (Heidolph Instruments Rotamax) at 50 rpm for 45 min. The samples were then rinsed 10 times with 1 ml degassed DI water and dried with a nitrogen gun. The use of degassed solutions prevented bubble formation in the cavities underneath the nanocantilevers, thus allowing the entire surface of the chip to contact the solutions and avoiding the accumulation of molecules at the bubble contact lines as well as inhomogeneity and poor efficiency of the rinsing steps.

Fluorescence images were acquired using an Olympus IX70 inverted microscope, a 20× objective (numerical aperture 0.40, Olympus), two filter sets dedicated to the observation of Alexa Fluor 660 and Alexa Fluor 488/fluorescein dyes (U-M41008 from Chroma and U-MWIB3 from Olympus, respectively) and a Clara CCD ANDOR camera (DR-328G-C01-SIL, 5 s acquisition time).

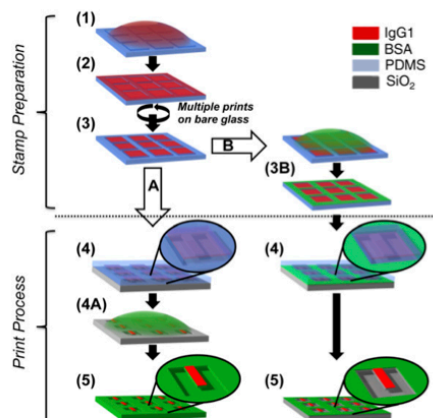
### 2.6. Measurement of the NEMS resonant frequency

The nanocantilever resonant frequencies were measured in vacuum using a Fabry-Pérot interferometry bench. The NEMS chips were mounted on a piezoelectric disk, electrically actuated by a network analyzer (Agilent 4395A) and coupled to an in-house high-frequency amplifier. The device was placed inside a vacuum chamber pumped down to 10<sup>-6</sup> mbar at room temperature. A 30 mW He-Ne laser (Melles Griot) was focused on the nanostructures using a beam expander and a long working distance microscope objective (20×, numerical aperture 0.28), leading to a 3 μm minimal beam size. Interferences were detected by a photodetector (New Focus 1601) connected to the network analyzer to track the response of single nanocantilevers at the excitation frequency.

## 3. Results and discussion

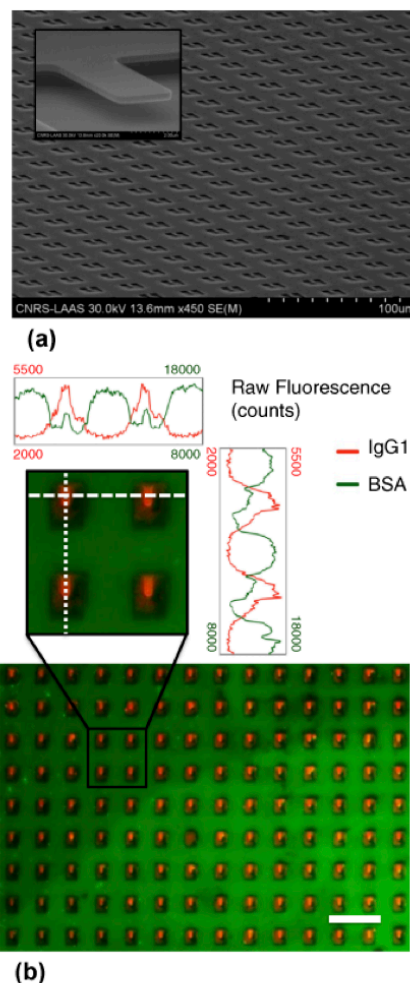
### 3.1. NEMS functionalization

The functionalization process, illustrated in figure 1, includes two stages: the PDMS stamp preparation and inking and the actual printing or transfer process. First, the PDMS stamp is incubated with the probe biomolecules, thus covering the entire stamp surface (the top and bottom of the trenches). In order to remove probe molecules from the top of the trenches,



**Figure 1.** Schematics of the NEMS functionalization process using a PDMS stamp. Two approaches can be used. (A) Surface functionalization by microcontact printing followed by blocking the remaining surfaces with a batch process. (B) Surface functionalization and passivation both carried out by microcontact printing. (1) Inking the stamp with the desired molecules (IgG1). (2) Washing and drying the stamp. (3) Cleaning outside the stamp grooves, i.e. removing the molecules from the stamp base, by carrying multiple prints. (3B) Inking the stamp with the anti-fouling molecules (BSA). (4) Printing after aligning the stamp and the chip. (4A) Incubating the chip with the anti-fouling molecule (BSA). (5) Result of the NEMS biofunctionalization process.

i.e. where the stamp is supposed to contact the non-reactive areas of the chip to be functionalized, the stamp is brought into contact with a bare glass substrate. Few contacts on clean glass slides are usually made in order to ensure that no traces of molecules are left at the surface of the stamp. This step, the so-called 'cleaning step', results in the presence of biomolecules solely in the trenches of the stamp. Thus, during this cleaning step, it is crucial to make sure that the PDMS patterned trenches do not collapse in order to keep the bottom of the trenches correctly inked. Then, in order to deposit an anti-fouling layer outside the biofunctional patterns, the stamp is incubated with a surface blocking molecule (figure 1(B)). The addition of this inking step leads, after printing, to the patterning of probe molecules and anti-fouling agents in a single, self-aligned step. This method is thus especially suited to the single-step functionalization and passivation of planar structures, such as membranes. Alternatively, the deposition of the anti-fouling layer can also be carried out in a batch process, after functionalizing the array of nanostructures (figure 1(A)). Transfer of the molecules from the stamp onto the chip to functionalize it is finally achieved by bringing the stamp into contact with the array of NEMS, after aligning features patterned on both surfaces and deforming the stamp under pressure until the bottom of the cavities gently touches the nanostructures. Deforming the stamp and inducing the collapse of the trenches to transfer biomolecules ensures that a minimum pressure is applied onto the structures and thus prevents any damage or breakage of the NEMS.



**Figure 2.** Biofunctionalized arrays of nanocantilevers. (a) Scanning electron microscopy images of fabricated silicon nanocantilevers. (b) Superimposed fluorescence pictures (taken with two dedicated filter sets) of an array of nanocantilevers functionalized after printing the Alexa Fluor 660 IgG1 and the fluorescein-BSA in a single step (scale bar: 50  $\mu\text{m}$ ). The inset provides a zoom of the array along with the fluorescence profiles measured with the two filters.

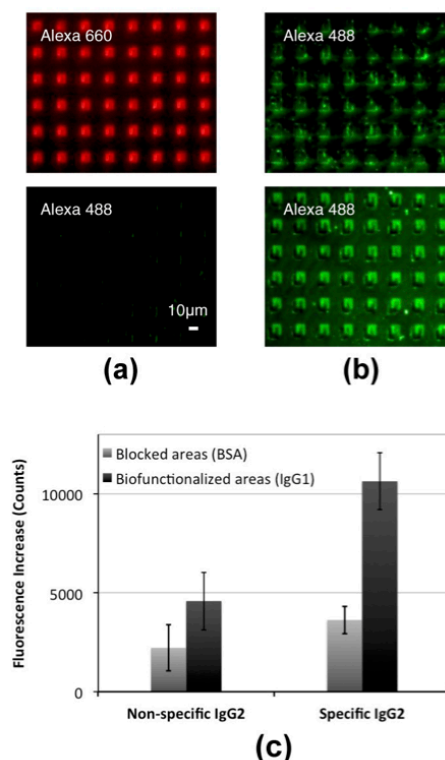
In the present work, we demonstrate the feasibility of our approach by biofunctionalizing arrays of freestanding nanocantilevers. More than  $10^5$  nanocantilevers were fabricated onto 1.5 cm  $\times$  1.5 cm chips from SOI wafers using standard microfabrication techniques. Fabricated cantilevers with typical dimensions of 8  $\mu\text{m}$  length, 2.6  $\mu\text{m}$  width and 340 nm thickness are freely standing above 15  $\mu\text{m}$   $\times$  12.5  $\mu\text{m}$   $\times$  1  $\mu\text{m}$  long, wide and deep cavities (figure 2(a)).

The PDMS stamp used for biofunctionalization purposes was designed to fit the pitch of the nanocantilever array and the size of the patterned trenches was adjusted to the dimensions of the cavity under each nanocantilever, i.e.  $15\ \mu\text{m} \times 12.5\ \mu\text{m}$ , such as to increase alignment efficiency. In that case, even with a misalignment of several microns, which is the minimum typical tolerance of alignment tools found in academic labs, the probe biomolecules are still transferred to the entire surface of the nanocantilevers (since the patterning area is larger than each cantilever). In fact the only alignment issue could originate from a discrepancy between the designed stamp and its actual size after de-molding: indeed, due to the shrinkage of the polymer during the baking step, the pattern size of fabricated stamps typically shrinks by about 1%. Even if this effect is not likely to affect printing results for most applications, dimensional compliance cannot be ensured when working with arrays of thousands of nanocantilevers spanning a few centimeters: thus even if the stamp is perfectly aligned along one side of the array, the patterns would be shifted from a few lines or columns on the opposite side. Hence, to avert this shrinkage effect, we have created composite stamps consisting of patterned  $1.5\ \text{cm} \times 1.5\ \text{cm} \times 400\ \mu\text{m}$  PDMS films glued to  $1.5\ \text{cm} \times 1.5\ \text{cm} \times 1\ \text{mm}$  thick glass slides. This fabrication trick resulted in a stamp deformation lower than 0.05%.

Alexa Fluor 660 donkey anti-goat IgG (IgG1) and albumin from the BSA–fluorescein conjugate were printed in a single self-aligned step, respectively onto and around large arrays of nanocantilevers using the printing process described in figure 1(B) and in section 2.4. The as-biofunctionalized arrays of nanocantilevers were imaged by fluorescence microscopy using two filter sets dedicated to the observation of the Alexa Fluor 660 and the fluorescein dyes (figure 2(b)). As can be seen in the inset of figure 2(b), the levels of raw fluorescence indicate that indeed IgG1 is solely patterned onto the nanocantilevers, while the entire remaining surface of the chip is covered with BSA molecules. These results indicate the proper deposition of the probe and the anti-fouling biomolecules at the desired location of the chip, without apparent breakage of the nanocantilevers.

### 3.2. Bioactivity of the functionalized NEMS

Next, to demonstrate the bioactivity of the deposited donkey anti-goat IgG and the anti-fouling property of the BSA layer, we carried out biodetection experiments involving exposure to goat anti-mouse IgG (specific IgG2) and donkey anti-mouse IgG (non-specific IgG2), inducing, respectively, specific and non-specific interactions with the patterned IgG1. For the purpose of these experiments, the surface blocking step was carried out in a batch mode, following the process displayed in figure 1(A), rather than using the double stamp transfer. Indeed, the single and self-aligned biofunctionalization and passivation stamp process, which is perfectly suited for planar surfaces (e.g. nanomembranes or nanoelectrodes), does not enable the deposition of molecules underneath the nanocantilevers and inside the cavities: these surfaces would not be properly blocked and would thus



**Figure 3.** Validation of the bioactivity of the functionalized NEMS array using fluorescence microscopy: (a) fluorescence images of the printed IgG1 using the filter sets respectively dedicated to observe the Alexa 660 and the Alexa 488 fluorophores (top and bottom), (b) fluorescence images of biofunctionalized chips after incubation with the specific IgG2 and non-specific IgG2 (top and bottom, respectively), and (c) graph comparing the mean increase of fluorescence signal due to specific and non-specific tagged IgG2 incubation, measured on three regions of interest of the BSA layer and on 20 biofunctionalized cantilevers of the same chip.

be subject to non-specific adsorption of the incubated molecules, leading to the false positive response of a mass sensor (which is our chosen detection scheme) due to the added mass at the back-side surface of the nanocantilevers. Following IgG1 printing onto the cantilever top surface and a batch immobilization of BSA molecules everywhere else (i.e. additionally at the bottom of the cavities and underneath the cantilevers), specific recognition of the printed donkey anti-goat IgG was carried out by incubating the functionalized chips in a  $50\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$  Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG solution for 2 h. Other functionalized chips were also incubated in a  $50\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$  Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse solution for control experiments.

The results of the incubation experiments are shown in figure 3. Fluorescence images in figure 3(a) show the adequate immobilization of Alexa Fluor 660 donkey anti-goat



IgG at the surface of the nanocantilevers that cannot be seen using the filter cube dedicated to the observation of Alexa Fluor 488 labeled specific and non-specific IgG2. Non-fluorescently labeled BSA was deliberately chosen for this experiment to avoid disrupting the signal emitted by the Alexa Fluor 488 of the secondary IgG2. Figure 3(b), top and bottom, shows fluorescence images obtained using the filter sets dedicated to the Alexa Fluor 488 after incubation, respectively with non-specific and specific IgG2. While a slight non-specific interaction is observed all over the chip, the specific interaction can clearly be seen at the surface of the nanocantilevers, thus demonstrating the adequate passivation of the chip and the bioactivity of the deposited IgG1 at the nanocantilever surface. Evidence of these results is reinforced when plotting the increase of fluorescence signals averaged over the blocked and functionalized areas of a single chip before and after incubation with IgG2 (figure 3(c)). Indeed, the increase in fluorescence at the surface of the nanocantilevers is meaningfully larger in the case of specific interaction with a high signal to noise ratio, while the fluorescence of the negative control is comparable to the level of non-specific adsorption observed on the BSA layers for both specific and non-specific molecules. Thus, the nanocantilevers biofunctionalized with our modified  $\mu$ CP method are adequately proven to work as biosensors.

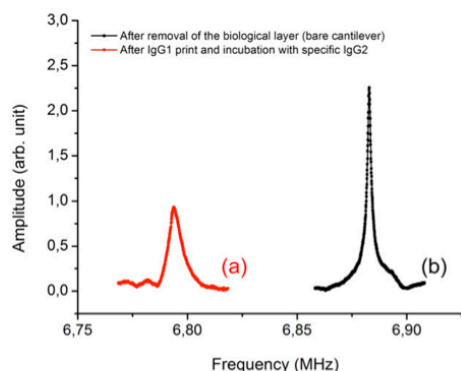
### 3.3. Label-free detection of captured analytes

Finally, measurements of the resonant frequency and the quality factor corresponding to the fundamental mode of vibration of the functionalized nanocantilevers were then conducted to address two questions: do the nanocantilevers preserve their mechanical integrity once the functionalization and the successive incubation steps have been done? Are the calculated mean added masses—relative to the resonant frequency shifts measured before functionalizing the nanocantilevers and after incubating with the specific IgG—relevant from a biological point of view?

In order to answer these questions, we introduce mechanical considerations as a basis for the interpretation of the measurements performed on the nanocantilevers in a dynamic regime. When biological molecules are added to the surface of a cantilever, the total effective mass increases by  $\Delta m_{\text{eff}}$  resulting in a proportional shift of the NEMS resonant frequency  $\Delta f$ , given by

$$\Delta f = \frac{-f_0}{2M_{\text{eff}}} \Delta m_{\text{eff}} \quad (1)$$

where  $f_0$  and  $M_{\text{eff}}$  are the resonant frequency and the effective modal mass of the cantilever. Theoretically, the resonant frequency and the effective modal mass of the designed cantilevers are respectively equal to 6.87 MHz and 4.1 pg (resulting in a mass sensitivity of  $-1.2 \text{ ag Hz}^{-1}$  and a minimum detectable mass of 0.9 fg for a mean measured  $Q$  factor of around  $4.5 \times 10^3$ ). In order to estimate the mean mass added to our cantilevers, we have used the resonant frequency  $f_0$  measured after removal of the biological layers,



**Figure 4.** Resonant frequency curves of a single nanocantilever (a) after IgG1 printing followed by the detection of specific IgG2, and (b) after removing all the printed and captured biomolecules.

the measured resonant frequency change, and the effective modal mass estimated from the cantilever dimensions.

The question of the mechanical integrity was thoroughly investigated by performing systematic resonant frequency and quality factor measurements on 16 nanocantilevers randomly chosen among thousands of structures of a single functionalized array. The main and first conclusion is that the nanostructures undergo the different biological treatments without damage, i.e. these structures are not broken and are still vibrating. Moreover, the resonant frequency and corresponding quality factor values decrease in a reproducible way, as expected, after loading of the biological matter (figure 4). Indeed, the decrease in the quality factor is attributed to a damping effect induced by the presence of the biological layer on top the surface of the nanocantilevers, while the systematic drop of the resonant frequency is due to the total mass added during the biological protocol sequences. The latter assumption neglects the surface stress effects that the biomolecules may exert onto the dynamic behavior of the nanocantilevers. This hypothesis is supported by the fact that the thickness of the transferred material by  $\mu$ CP onto the active area of one nanocantilever represents only a tiny fraction of its overall thickness [27].

The question related to the biological relevance of the mean added mass value is rather delicate to address from a quantitative point of view. Table 1 provides the mean measured resonant frequency shift, the corresponding mean added mass per unit area, and the relative mean variation of measured quality factor values for 16 nanocantilevers after biofunctionalization with IgG1, incubation with BSA protein and interaction with the specific IgG2. The resonant frequencies and quality factors of bare nanocantilevers considered as reference values are obtained after removing the biological layers. Experimentally this is achieved by immersing the NEMS chips into a Piranha bath for 10 min. The standard deviation values are indicated in the brackets along with each of the measured and calculated parameters indicated above.

**Table 1.** Measured resonant frequency shift and quality factor drop induced by the functionalization ( $\mu$ CP) and passivation (batch) steps followed by biological recognition with the specific secondary IgG2. Frequency and quality factor shifts were calculated for 16 nanocantilevers of a single array and then averaged (the associated standard deviation is given within the brackets). The resulting calculated added mass is also given.

Mean resonant frequency shift (kHz)	Mean added mass ( $\text{fg } \mu\text{m}^{-2}$ )	Mean quality factor shift (%)
-97.8 (15.5)	22 (3.5)	-66.2 (10.2)

A qualitative analysis of table 1 confirms that mass-loaded cantilevers exhibit a simultaneous decrease of resonant frequency and of the quality factor. Moreover, the mass addition value of  $22 \text{ fg } \mu\text{m}^{-2}$  is significantly higher than the one previously reported after solely printing the IgG1, i.e.  $11.7 \text{ fg } \mu\text{m}^{-2}$  [26], which is in accordance with the extra mass due to the BSA molecules adsorbed underneath the cantilevers and the goat anti-mouse IgG specifically interacting with the bioactive layer. An ideal comparison between the resonant frequency of a same cantilever measured after each biological protocol step, i.e. after biofunctionalization, surface blocking, and incubation, would provide data directly proving the actual biosensing capability of our functionalized nanocantilever resonators. However, this approach is banned because of the *modus operandi* used to perform the measurements. Due to the vacuum conditions imposed by the Fabry-Pérot experimental set-up, it would be risky to assume that the biological molecules grafted onto the nanocantilevers are not irreversibly denatured or damaged once submitted to such extreme conditions after the dynamic characterizations. Since biological protocols take place on the same chip which necessarily undergoes back-and-forth steps between vacuum and liquid media, we deliberately decided to carry out the entire biological protocol before performing the resonant frequency measurements, and then to remove the final biological arrangement to obtain the initial resonant frequency. For this reason, we are currently unable to provide direct comparison of resonant frequency shifts induced by the incubation of specific and non-specific interacting molecules, since the added mass due to the printed IgG1 and incubated BSA cannot be measured directly before the final steps. One way to prevent such a critical experimental configuration would be to perform all biological reactions and subsequent measurements in liquid media and in real-time, as classically done with tools such as a quartz microbalance [28]. However, it has become obvious that the nanocantilever geometry is fundamentally inadequate for dynamic sensing in liquid due to the dramatic impact of the surrounding medium on the quality factor and as a result on the minimum detectable mass by such structures. With the advent of new NEMS geometries more adapted to biosensing in liquid media, we foresee that biofunctionalized integrated NEMS sensors may soon be provided by means of the patterning approach presented in this paper. Still, with these preliminary results, supported by fluorescence microscopy, we can safely conclude that the biofunctionalization technique presented here is a first

step towards setting-up bioNEMS as the ultimate mechanical systems for complex and multiplexed biosensing operations.

#### 4. Conclusion

In this paper, we have presented a technique for the biofunctionalization and surface blocking of a large array of nanostructures based on a single, self-aligned  $\mu$ CP process. Our method relies on the use of a PDMS stamp displaying patterns inked with probe and anti-fouling molecules at the bottom and the top of the trenches, respectively. While the anti-fouling layer is transferred upon direct contact of the stamp with the surface of the chip, probe biomolecules are delivered by deforming the trenches so that the PDMS bottom patterns come into contact with the nanostructures. As a proof of concept, we have functionalized arrays of more than  $10^5$  nanocantilevers  $\text{cm}^{-2}$  with donkey anti-goat IgG, while blocking the remaining chip surface with BSA. The bioactivity and anti-fouling properties of the deposited molecules were assessed by incubating the NEMS chips with goat anti-mouse IgG and donkey anti-mouse IgG, inducing specific and non-specific recognition of the printed IgG, followed by fluorescence observations. Next, measurement of the nanocantilever resonant frequency demonstrated that the nanostructures retain their mechanical integrity, and thus their sensing capability, after the printing and the incubation steps. We believe that the technique presented in this paper answers the biofunctionalization challenge of nanostructures for the development of future generations of functional bioNEMS.

#### Acknowledgments

The French National Research Agency (program ANR/PNANO 2008, project NEMSPIEZO 'ANR-08-NANO-015') is gratefully acknowledged for financial support. DD was supported by a PhD student fellowship from the Direction Générale de l'Armement.

#### References

- [1] Blick R H, Qin H, Kim H-S and Marsland R 2007 A nanomechanical computer—exploring new avenues of computing *New J. Phys.* **9** 241
- [2] Naik A K, Hanay M S, Hiebert W K, Feng X L and Roukes M L 2009 Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry *Nature Nanotechnol.* **4** 445–50
- [3] Jensen K, Kim K and Zettl A 2008 An atomic-resolution nanomechanical mass sensor *Nature Nanotechnol.* **3** 533–7
- [4] Ekinci K L, Yang Y T and Roukes M L 2004 Ultimate limits to inertial mass sensing based upon nanoelectromechanical systems *J. Appl. Phys.* **95** 2682–9
- [5] Ilic B, Yang Y and Craighead H G 2004 Virus detection using nanoelectromechanical devices *Appl. Phys. Lett.* **85** 2604–6
- [6] Ilic B, Yang Y, Aubin K, Reichenbach R, Krylov S and Craighead H G 2005 Enumeration of DNA molecules bound to a nanomechanical oscillator *Nano Lett.* **5** 925–9
- [7] Sheehan P E and Whitman L J 2005 Detection limits for nanoscale biosensors *Nano Lett.* **5** 803–7
- [8] Nair P R and Alam M A 2006 Performance limits of nanobiosensors *Appl. Phys. Lett.* **88** 233120

- [9] Sampathkumar A, Ekinci K L and Murray T W 2011 Multiplexed optical operation of distributed nanoelectromechanical systems arrays *Nano Lett.* **11** 1014–9
- [10] Arlett J L, Myers E B and Roukes M L 2011 Comparative advantages of mechanical biosensors *Nature Nanotechnol.* **6** 203–15
- [11] Leichlé T, Lin Y-L, Chiang P-C, Hu S-M, Liao K-T and Chou C-F 2012 Biosensor-compatible encapsulation for pre-functionalized nanofluidic channels using asymmetric plasma treatment *Sensors Actuators B* **161** 805–10
- [12] Fischer L M, Wright V A, Guthy C, Yang N, McDermott M T, Buriak J M and Evoy S 2008 Specific detection of proteins using nanomechanical resonators *Sensors Actuators B* **134** 613–7
- [13] Bietsch A, Zhang J Y, Hegner M, Lang H P and Gerber C 2004 Rapid functionalization of cantilever array sensors by inkjet printing *Nanotechnology* **15** 873–80
- [14] McKendry R, Zhang J Y, Arntz Y, Strunz T, Hegner M, Lang H P, Baller M K, Certa U, Meyer E, Guntherodt H J and Gerber C 2002 Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99** 9783–8
- [15] Pease A C, Solas D, Sullivan E J, Cronin M T, Holmes C P and Fodor S P A 1994 Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA-sequence analysis *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91** 5022–6
- [16] Vandevelde F, Leichle T, Ayela C, Bergaud C, Nicu L and Haupt K 2007 Direct patterning of molecularly imprinted microdot arrays for sensors and biochips *Langmuir* **23** 6490–3
- [17] Meister A, Liley M, Brugger J, Pugin R and Heinzelmann H 2004 Nanodispenser for attoliter volume deposition using atomic force microscopy probes modified by focused-ion-beam milling *Appl. Phys. Lett.* **85** 6260–2
- [18] Saya D, Leichle T, Pourciel J B, Bergaud C and Nicu L 2007 Collective fabrication of an in-plane silicon nanotip for parallel femtoliter droplet deposition *J. Micromech. Microeng.* **17** N1–5
- [19] NanoInk 2010 Application Note: Biosensor Functionalization [www.nanoink.net](http://www.nanoink.net)
- [20] Harper J C, Polsky R, Dirk S M, Wheeler D R and Brozik S M 2007 Electroaddressable selective functionalization of electrode arrays: catalytic NADH detection using aryl diazonium modified gold electrodes *Electroanalysis* **19** 1268–74
- [21] Descamps E, Leichle T, Corso B, Laurent S, Mailley P, Nicu L, Livache T and Bergaud C 2007 Fabrication of oligonucleotide chips by using parallel cantilever-based electrochemical deposition in picoliter volumes *Adv. Mater.* **19** 1816–21
- [22] Kumar A and Whitesides G M 1993 Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching *Appl. Phys. Lett.* **63** 2002–4
- [23] Decre M M J, Schneider R, Burdinski D, Schellekens J, Saalmink M and Dona R 2003 Wave printing (I): Towards large-area, multilayer microcontact printing *Symp. on Nontraditional Approaches to Patterning* (Boston, MA: Mat. Res. Soc.) pp 59–61
- [24] Gu J, Xiao X, Takulapalli B R, Morrison M E, Zhang P and Zenhausern F 2008 A new approach to fabricating high density nanoarrays by nanocontact printing *J. Vac. Sci. Technol. B* **26** 1860–5
- [25] Chalmeau J, Thibault C, Carcenac F and Vieu C 2008 Self-aligned patterns of multiple biomolecules printed in one step *Appl. Phys. Lett.* **93** 133901
- [26] Guillon S, Salomon S, Seichepine F, Dezest D, Mathieu F, Bouchier A, Mazenq L, Thibault C, Vieu C, Leichlé T and Nicu L 2012 Biological functionalization of massively parallel arrays of nanocantilevers using microcontact printing *Sensors Actuators B* **161** 1135–8
- [27] Tamayo J, Ramos D, Mertens J and Calleja M 2006 Effect of the adsorbate stiffness on the resonance response of microcantilever sensors *Appl. Phys. Lett.* **89** 224104
- [28] Okahata Y, Kawase M, Niikura K, Ohtake F, Furusawa H and Ebara Y 1998 Kinetic measurements of DNA hybridisation on an oligonucleotide-immobilized 27-MHz quartz crystal microbalance *Anal. Chem.* **70** 1288–96

# Multiplexed functionalization of nanoelectromechanical systems with photopatterned molecularly imprinted polymers

D Dezest<sup>1</sup>, T Leichlé<sup>1</sup>, P Teerapanich<sup>1</sup>, F Mathieu<sup>1</sup>, B Tse Sum Bui<sup>2</sup>, K Haupt<sup>2</sup> and L Nicu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Analysis and Architecture of Systems, CNRS, University of Toulouse, 7 avenue du Colonel Roche, BP54200, Toulouse 31031, France

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, CNRS Enzyme and Cell Engineering Laboratory, Rue Roger Couttolenc, CS 60319, 60203 Compiègne Cedex, France

E-mail: [denis.dezest@gmail.com](mailto:denis.dezest@gmail.com)

Received 15 September 2018, revised 23 November 2018

Accepted for publication 12 December 2018

Published 14 January 2019



CrossMark

## Abstract

Implementing dedicated and reliable biochemical recognition functionalities onto nanoelectromechanical systems (NEMS) is of primary importance for their development as ultra-sensitive and highly-integrated biosensing devices. In this paper, we demonstrate the large-scale and multiplexed integration of molecularly imprinted polymers (MIPs) as highly stable biomimetic receptors onto arrays of nanocantilevers. Integration is carried out by spin-coating and photopatterning the polymer layers before releasing the nanostructures. We demonstrate that these biomimetic layers are robust enough to withstand the wet-etch of the sacrificial layer making this functionalization strategy compatible with further MEMS/NEMS processing. As a proof of concept, we fabricate NEMS resonators coated with a MIP using Boc-L-phenylalanine as the template molecule. We demonstrate the preserved molecular recognition ability of the patterned sensitive layer through the fluorescence detection of dansyl-L-phenylalanine, a fluorescent derivative of the template, and the mechanical integrity of the resonators by means of resonant frequency measurements.

Keywords: microfabrication, molecularly imprinted polymer, nanoelectromechanical systems, photolithography, sensor

Supplementary material for this article is available [online](#)

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

## 1. Introduction

Biosensors consist of two key components: a receptor layer ensuring specific recognition of target molecules combined with a transducer that converts the chemical/biological stimuli into a measurable physical signal [1]. With unprecedented mass resolutions, outstanding sensitivities and label-free detection capability, nanoelectromechanical systems (NEMS) are promising candidates for bio/chemical sensing applications.

However some technical obstacles such as the integration of efficient transduction schemes [2, 3], the low response time related to their miniaturization [4, 5] and the difficulty to implement multiplexed functionalization [6] currently limit their widespread use as low-cost portable sensing tools. One trade-off strategy for achieving practical response time with nanometer-size sensors consists in architecting large-scale arrays of NEMS devices [7]. This paradigm allows taking advantage of the tremendous sensing attributes of a single

NEMS device while considerably expanding the capture area for the analyte. In return, such approach requires suitable and reliable functionalization of the NEMS arrays ensuring both the mechanical integrity of free-standing structures and the recognition capabilities of the sensing layer.

Microscale counterparts of NEMS biosensors commonly call for antibodies, nucleic acids or aptamers as sensing elements. These receptors are usually immobilized onto the chemically modified transducer surface while bare areas of the chip have to be blocked with anti-fouling molecules to minimize non-specific adsorption. Although intrinsically highly specific and selective, the use of biological sensing elements presents several limitations. First, the physical and chemical grafting strategies used to immobilize affinity molecules must ensure that the binding sites remain available and that the packing density results in optimized target capture. Furthermore, biological species can be easily degraded or altered due to poor stability outside their native environment. Consequently surface modification is always carried out post-fabrication process, i.e. after the release of the NEMS devices, raising the constraint of functionalizing freestanding and therefore fragile mechanical structures. Finally, traditional functionalization methods such as dip-and-dry [8], ink-jet printing [9], liquid-drop dispensing [10] or microcapillaries [11] are neither likely to produce submicron patterns nor to be scaled up to create large-scale and multiplexed arrays. In recent work we reported a very promising method based on microcontact printing for the functionalization of large-scale arrays of NEMS with antibodies [12]. Although addressing most of the limitations mentioned above, further investigations of the sensing capabilities were limited by the experimental vacuum conditions for gravimetric measurements.

In this context, artificial biomimetic receptors and particularly molecularly imprinted polymers (MIPs) appear as a powerful alternative. Molecular imprinting pioneered by Wulff [13] and later Mosbach [14] refers to the process of imprinting a synthetic polymer with a template molecule. Briefly, a template is co-polymerized in the presence of functional and cross-linking monomers. Initially, self-assembly of the functional monomers around the template molecule is driven by non-covalent or covalent interactions depending on the imprinting approach. Subsequent polymerization freezes the formed complexes within a highly cross-linked polymeric matrix. Finally, removal of the template reveals 3D binding cavities complementary to the template in size, shape and position of the functional groups, capable of molecular recognition [15–17]. MIPs are often referred to as plastic antibodies due to their ability to bind target molecules with similar affinity and specificity to those of their natural counterparts. Unlike biological materials, the superior stability of MIPs offers the unique advantage to withstand harsh environments and to be compatible with a wide range of microfabrication techniques [18] such as soft lithography [19], microspotting [20], photolithography [21] and two-photon stereolithography [22].

In spite of being such excellent candidates, only few works combining the integration of MIPs as the sensing layer onto micro/nano electromechanical systems have been reported in

the literature. At the micro scale, we have previously demonstrated the successful functionalization of piezoelectric micromembranes by microspotting for the selective detection of an herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid [20]. Ayala *et al* [23] explored the all-organic MEMS strategy consisting in the fabrication of large MEMS cantilevers entirely made from MIP using stencil lithography. More recently, Holthoff *et al* [24] reported the integration of a sol-gel derived xerogel based MIP layer onto a doubly clamped microbeam by simple spin-coating for the vapor phase detection of traces of nerve agent dimethyl methylphosphonate and explosive derivative 2,4,6-trinitrotoluene.

In this paper, we investigate the direct patterning of a MIP sensitive layer onto an array of NEMS resonators by means of photolithography. This approach combining the advantages of the most widely used patterning technique in microelectronics and the robustness of synthetic polymers is worth to be considered as a large-scale, multiplexed and compatible with further MEMS processing functionalization strategy. As a proof of concept, we address the questions of the preserved molecular recognition capabilities following the buried oxide layer wet-etch step used to release the nanostructures and the mechanical integrity of the fabricated devices by means of fluorescence detection and resonant frequency measurements. The MIP was imprinted with the template Boc-L-phenylalanine (Boc-L-Phe) and the recognition was assessed using its fluorescent derivative dansyl-L-phenylalanine (dansyl-L-Phe) (chemical structures can be found in figure S1 of the supplementary material ([stacks.iop.org/JMM/29/025013/mmedia](https://stacks.iop.org/JMM/29/025013/mmedia))).

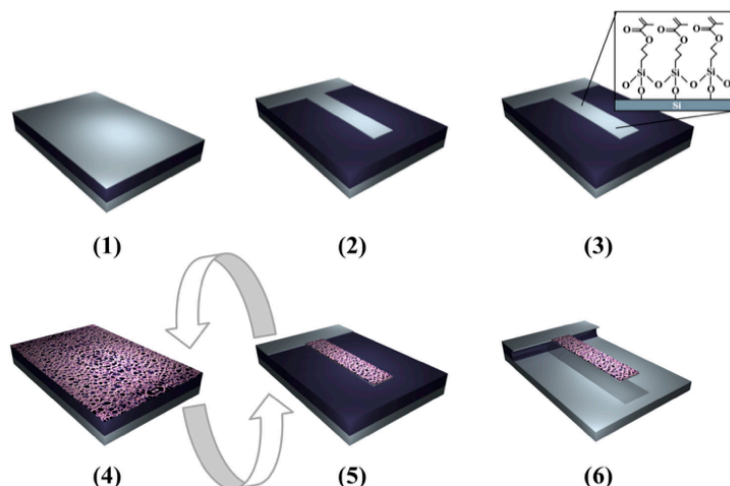
## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Dansyl-L-Phe was purchased from MP Biomedicals (Santa Ana, USA). Boc-L-Phe was purchased from Alfa Aesar (Haverhill, USA). 2-Carboxyethyl acrylate (CEA) monomer, 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate, 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DPAP), trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM), poly(vinyl acetate) (PVAc), diethylene glycol dimethyl ether (Diglyme), acetic acid, anhydrous acetonitrile and anhydrous toluene were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Methanol was purchased from VWR (Radnor, USA).

### 2.2. MIP formulation

MIP formulation for the template Boc-L-Phe was adapted from previous work [21]. MIP precursors solution was prepared using a 1:8:16 molar ratio between a non-fluorescent analog template Boc-L-Phe (82 mM), functional monomers CEA (661 mM) and cross-linker TRIM (1323 mM). The amount of polymerization photoinitiator DPAP was 0.66% relatively to the number of moles of polymerizable groups. Diglyme was used as the porogen (2.28 ml), which contained 1% relatively to the total mass of the solvent of PVAc as a co-porogen. The volume ratio between the porogen and the monomers was 2:1. The mixture was finally carefully mixed,



**Figure 1.** Integration process of MIP and NIP onto NEMS resonators. (1) Starting Silicon-on-insulator (SOI) wafer. (2) Dry etching of the silicon device layer to define the cantilevers' shape. (3) Silanization to provide the polymerizable functional groups ensuring the polymer's covalent adhesion onto the surface. (4) Spin-coating and (5) local polymerization and patterning of the MIP/NIP layers onto the cantilevers' surface using photolithography. (6) Structures release by wet etching of the sacrificial oxide layer.

filtered and degassed during 3 min under nitrogen atmosphere to eliminate any trace of oxygen. The prepolymerization mixture was kept in the dark until use. Non-imprinted polymer (NIP) control solution was prepared in the same way but in the absence of the template molecule.

### 2.3. AFM imaging

Atomic force microscopy (AFM) measurements (Dimension Icon, Bruker Inc., USA) were performed in tapping mode with a 285 kHz resonant frequency and a  $42 \text{ N m}^{-1}$  force constant probe (Arrow™ NC, NanoWorld Inc., Switzerland).

### 2.4. Binding experiments

For biodetection purposes, NEMS cantilevers were functionalized using a MIP imprinted with the non-fluorescent template Boc-L-Phe while binding was monitored with its fluorescent analogue dansyl-L-Phe. After fabrication, elution of the template was performed to provide free access to the binding cavities within the polymer matrix. Template was extracted by immersing the chip in a mixture of methanol/acetic acid (4/1), 3 times for 1 h each. Then the chip was rinsed 3 times during 1 h with methanol and dried under a stream of nitrogen prior to incubation with the analyte. Binding experiments were performed by soaking the chip overnight in a  $100 \mu\text{M}$  solution of dansyl-L-Phe in acetonitrile.

### 2.5. Fluorescence detection

Fluorescence images of the MIP and NIP patterns were acquired using an Olympus IX70 inverted microscope, a  $20\times$  (N.A. 0.40) and a  $40\times$  (N.A. 0.6) objectives (Olympus

Inc., Japan), a set of a bandpass excitation filter (370/36 nm) combined with a longpass dichroic mirror (405 nm) and a bandpass emission filter (470/10 nm), and a CCD camera (Clara CCD DR-328G-C01-SIL, Andor Inc., Northern Ireland). Raw images were converted to TIF format (16 bits, grayscale) prior to quantitative analysis using the open source software ImageJ. Each intensity measurement was obtained by averaging the fluorescence level over several regions of interest (MIP/NIP patterns) and was background-corrected by subtracting the averaged fluorescence level of the bare substrate.

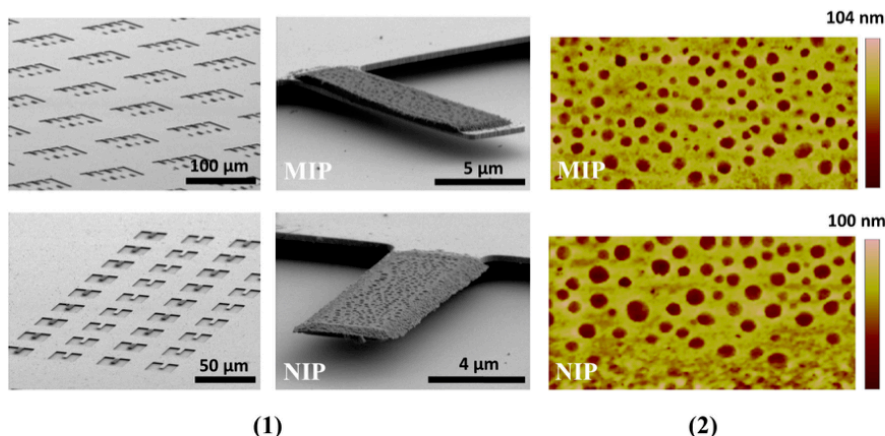
### 2.6. Resonant frequencies measurements

Cantilevers' resonant frequencies were measured in vacuum ( $6 \cdot 10^{-2}$  mbar) and at room temperature using an in-house Fabry–Perot interferometer [3]. The chip was mounted onto a piezodisk for collective actuation of the cantilevers while each individual mechanical response was optically read. Fundamental resonant frequencies were monitored by means of a network analyzer (Agilent 4395A) coupled to the piezoshaker and an AC-coupled photodetector (New Focus 1601, Newport Inc., USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. MIP and NIP photopatterning onto NEMS

SOI 100 mm wafers (340 nm thick p-type Si/1  $\mu\text{m}$  SiO<sub>2</sub>/525  $\mu\text{m}$  thick Si, Soitec Inc., France) were used as substrates for the fabrication of the cantilevers' arrays. The main steps of the NEMS fabrication and functionalization process are illustrated in figure 1.



**Figure 2.** (1) Typical SEM images of MIP and NIP co-integration onto large-scale arrays of NEMS. (2) AFM scans are  $2.5 \times 5 \mu\text{m}^2$  and show the porous morphology of the MIP and NIP layers at the clamping regions of the cantilevers.

First, the shape of devices was defined by photolithography (Ma-150, Karl Suss Inc., Germany) using vacuum-contact mode. An anti-reflective coating of BARC (AZ® Barli® II 200) as well as customized illumination (MO exposure optics, Karl Suss Inc.) were used to reduce the diffraction-induced distortion of patterns and to enhance the cantilevers critical dimension. The top silicon layer was etched by reactive ion etching (AMS4200, Alcatel Inc., France) until the intermediate  $\text{SiO}_2$  layer appeared. Wafers were then diced into  $14 \times 14 \text{ mm}^2$  individual chips which were subsequently cleaned with piranha solution ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1:1 v/v, 5 min) to remove any organic residuals, activated under oxygen-plasma (PVA TePla 300,  $1000 \text{ ml min}^{-1}$ , 800 W, 5 min) and finally silanized overnight using a solution of 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate at 1% volume ratio in anhydrous toluene. This treatment provided the polymerizable functional groups ensuring the subsequent polymer's covalent adhesion onto the surface. The MIP precursor solution was then spin-coated ( $5000 \text{ rpm s}^{-1}$ , 5000 rpm, 30 s) onto the substrate which was placed immediately after under an automated mask aligner (EVG 620, EV Group, Austria) to locally pattern and polymerize the MIP layer onto the cantilevers surface. Alignment and insulation using contact mode ( $39 \text{ mW cm}^{-2}$  at 365 nm, 2 bar, 2 s) were performed under a nitrogen atmosphere to avoid the inhibition of the radical polymerization by oxygen. Chips were finally immersed into two successive baths of acetone and ethanol (2 min) to remove unreacted monomers. For multiplexed deposition, the whole photolithography cycle was repeated to pattern the NIP onto the same chip. The sacrificial  $\text{SiO}_2$  layer was wet-etched using buffered hydrofluoric acid ( $\text{HF}:\text{NH}_4\text{F}$ , 7:1 v/v, 30 min) leading to the release of the nanocantilevers. Due to the high aspect ratio of the designed mechanical structures, extra care and additional steps were required to prevent the sticking of the suspended cantilevers to the underlying silicon surface of the SOI. First, the wet-etch release was immediately followed by a carbon dioxide-based supercritical

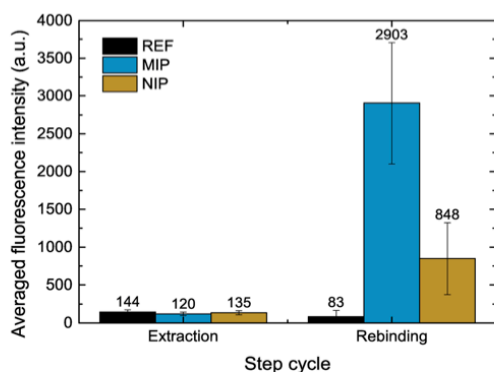
drying (Automegasamdri®-915B, Tousimis Inc., USA). Then a surface chemical treatment based on perfluorododecyl-trichlorosilane (FDTS) was performed in vapor phase (40 Torr,  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ : 100 sccm, FDTS: 50 sccm, 2 min, Orbis™ 1000 module Aurix™, Memsstar Inc., UK) in order to coat the underlying surface of the cantilevers with a durable chemical anti-sticking layer. Fabricated cantilevers were  $15 \mu\text{m}$  long,  $4 \mu\text{m}$  wide and 340 nm thick.

MIP and NIP successful co-integration onto arrays of NEMS were characterized using SEM and AFM. Typical images of released cantilevers with an integrated sensitive polymeric layer are shown in figure 2.

The surface of some cantilevers was left bare (non-functionalized) to be used as further reference. The presence of a network of pores is clearly visible from the topology of the polymer layers. This porous morphology is typical of the use of a low concentration of PVAc as co-porogen within the pre-polymerization mixture [20, 21]. The porogenic additive is of primary importance for MIPs patterned as thin films using photo-induced free radical polymerization. This patterning method involves a high exposure intensity yielding to fast and uncontrolled polymerization within a few seconds. The role of PVAc is to increase the thermodynamic driving force for phase separation between the growing polymer and the solvent, yielding to a faster rate of pores formation and better accessibility to potential binding sites within the polymer [25]. Polymers thicknesses measured by AFM at the clamping region of the cantilevers were found to vary between 60 nm and 300 nm for the different samples.

### 3.2. Molecular recognition of the functionalized NEMS

First, a preliminary study was conducted on test patterns in order to verify that the MIP rebinding capabilities were left unaltered after HF exposure. Details and results of this study are available in the supplementary material.



**Figure 3.** Fluorescence detection of dansyl-L-Phe ( $100 \mu\text{M}$  in acetonitrile) with MIP functionalized array of NEMS. Intensity measurements for the MIP, NIP and non-functionalized reference cantilevers were obtained by averaging the fluorescence signal over six different cantilevers randomly chosen over the array and were background-corrected by subtracting the averaged fluorescence level of the bare substrate. Same exposure parameters were used for each measurement. Error bars correspond to the measured fluorescence signal dispersion over the regions of interest for each kind of cantilevers.

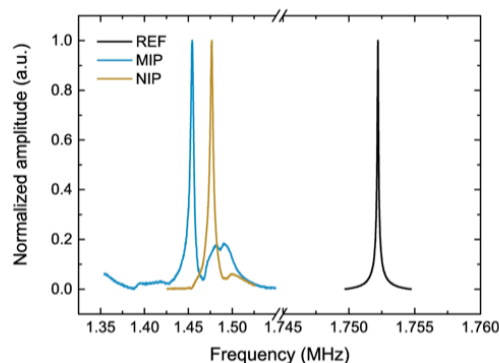
Molecular recognition properties of the functionalized NEMS were then assessed with the fluorescence detection of a  $100 \mu\text{M}$  solution of dansyl-L-Phe in acetonitrile. The binding experiment consisted of cycles of extraction/rebinding of the analyte performed using dip-and-dry method while monitoring each step with fluorescence microscopy. Results are shown in figure 3.

As can be seen, fluorescence intensities are significantly higher after rebinding for cantilevers functionalized with MIP and NIP compared to reference cantilevers, while similar levels are observed after extraction of the analyte. Although these results indicate a certain extent of non-specific binding between the analyte and the NIP layer, the noticeable difference in specificity between MIP and NIP cantilevers clearly demonstrates the preserved molecular recognition activity of the sensitive polymeric layer.

### 3.3. Mechanical sensing integrity of the functionalized NEMS

The question of the mechanical sensing integrity was investigated by measuring the resonant frequency and quality factor of the fundamental mode of vibration. For each kind of MIP, NIP and non-functionalized cantilevers, measurements were repeated on eight different devices randomly chosen among the array of structures for statistical analysis. The main conclusion of this study is that all probed cantilevers were found able to vibrate with typical frequency response as shown in figure 4, therefore demonstrating the preserved mechanical integrity of the fabricated functionalized devices.

Results of a quantitative analysis displayed in table 1 confirmed that both MIP and NIP functionalized cantilevers exhibited reproducible and significantly lower resonant



**Figure 4.** Typical fundamental resonant frequency curves of MIP, NIP and reference cantilevers. Measurements were performed in vacuum ( $6 \cdot 10^{-2}$  mbar) at room temperature.

**Table 1.** Averaged resonant frequency and quality factor of MIP, NIP and reference cantilevers measured from eight devices of the array. The corresponding standard deviation is given within the brackets.

	MIP	NIP	REF
Resonant frequency (MHz)	1.450 (0.023)	1.477 (0.015)	1.756 (0.008)
Quality factor	476 (87)	546 (97)	21 713 (880)

frequencies (with a frequency drop of respectively 17% and 16% for MIP and NIP) compare to bare reference cantilevers, as expected due to the added mass of polymer.

Finally, gravimetric detection of the dansyl-L-Phe was conducted. However the added mass induced frequency shift could not be resolved with enough confidence due to the low quality factor resulting from the functionalization of the cantilevers and the low molecular weight of the analyte (398 Da). Damping due to viscoelastic losses within the polymer is generally expected but its extent is hardly predictable. Based on these experimental results, further work will be dedicated in optimizing the NEMS design and the polymer thickness to improve the sensor performance both in terms of sensitivity and limit of detection. Still, with this preliminary study supported by fluorescence microscopy, we are confident in the potential of this functionalization strategy based on the compatible integration with further MEMS processing of MIP onto NEMS resonators.

## 4. Conclusion

In this paper, we have presented an approach based on photolithography and MIPs for the multiplexed functionalization of arrays of nanocantilevers. This method allows to simultaneously pattern large-scale arrays of NEMS prior to their release upon sacrificial layer etching making this strategy compatible with further MEMS processing and suitable for applications in which the functionalization of free standing



mechanical structures may be a risk. The question of the molecular recognition integrity of the sensitive layer was successfully addressed by conducting rebinding experiments with a labeled model target dansyl-L-Phe and fluorescence observations. Measurements of the cantilevers resonant frequencies demonstrated the preserved mechanical integrity and thus the potential label-free detection by the functionalized resonating devices. We believe this functionalization strategy offers a promising and alternative approach to conventional methods based on biological materials to extend the use of NEMS towards sensing in harsh environments.

### Acknowledgments

The French Direction Générale de l'Armement and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-IS10-0001) are gratefully acknowledged for their financial support.

### ORCID iDs

D Dezest  <https://orcid.org/0000-0002-6001-0599>

### References

- [1] Thévenot D R, Toth K, Durst R A and Wilson G S 2001 Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification *Biosens. Bioelectron.* **16** 121–31
- [2] Arndt G, Defay E, Rhun G L, Rey P, Perruchot F, Aid M, Liu L and Miller M 2010 Dynamic analytical modelling and piezoelectric characterization of a Pb(Zr, Ti)O<sub>3</sub>/SiN cantilever with losses *J. Micromech. Microeng.* **20** 115019
- [3] Dezest D, Thomas O, Mathieu F, Mazonq L, Soyer C, Costecalde J, Remiens D, Deü J F and Nicu L 2015 Wafer-scale fabrication of self-actuated piezoelectric nanoelectromechanical resonators based on lead zirconate titanate (PZT) *J. Micromech. Microeng.* **25** 035002
- [4] Sheehan P E and Whitman L J 2005 Detection limits for nanoscale biosensors *Nano Lett.* **5** 803–7
- [5] Nair P R and Alam M A 2006 Performance limits of nanobiosensors *Appl. Phys. Lett.* **88** 233120
- [6] Arlett J L, Myers E B and Roukes M L 2011 Comparative advantages of mechanical biosensors *Nat. Nanotechnol.* **6** 203–15
- [7] Bargatin I, Myers E B, Aldridge J S, Marcoux C, Brianceau P, Duraffourg L, Colinet E, Hentz S, Andreucci P and Roukes M L 2012 Large-scale integration of nanoelectromechanical systems for gas sensing applications *Nano Lett.* **12** 1269–74
- [8] Fischer L M, Wright V A, Guthy C, Yang N, McDermott M T, Buriak J M and Evoy S 2008 Specific detection of proteins using nanomechanical resonators *Sensors Actuators B* **134** 613–7
- [9] Bietsch A, Zhang J, Hegner M, Lang H P and Gerber C 2004 Rapid functionalization of cantilever array sensors by inkjet printing *Nanotechnology* **15** 873
- [10] Saya D, Leïchlé T, Pourciel J B, Bergaud C and Nicu L 2007 Collective fabrication of an in-plane silicon nanotip for parallel femtoliter droplet deposition *J. Micromech. Microeng.* **17** N1
- [11] McKendry R et al 2002 Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array *Proc. Natl Acad. Sci.* **99** 9783–8
- [12] Salomon S, Leïchlé T, Dezest D, Seichepine F, Guillon S, Thibault C, Vieu C and Nicu L 2012 Arrays of nanoelectromechanical biosensors functionalized by microcontact printing *Nanotechnology* **23** 495501
- [13] Wulff G and Sarhan A 1972 The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **11** 334–42
- [14] Arshady R and Mosbach K 1981 Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization *Makromol. Chem.* **182** 687–92
- [15] Haupt K, Linares A V, Bompart M and Bui B T S 2011 Molecularly imprinted polymers *Molecular Imprinting* vol 325, ed K Haupt (Berlin: Springer) pp 1–28
- [16] Cieplak M and Kutner W 2016 Artificial biosensors: how can molecular imprinting mimic biorecognition? *Trends Biotechnol.* **34** 922–41
- [17] Wackerlig J and Lieberzeit P A 2015 Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing—synthesis, characterisation and application *Sensors Actuators B* **207** 144–57
- [18] Bompart M, Haupt K and Ayela C 2011 Micro and nanofabrication of molecularly imprinted polymers *Molecular Imprinting* vol 325, ed K Haupt (Berlin: Springer) pp 83–110
- [19] Lalo H, Ayela C, Dague E, Vieu C and Haupt K 2010 Nanopatterning molecularly imprinted polymers by soft lithography: a hierarchical approach *Lab Chip* **10** 1316
- [20] Ayela C, Vandeveldel F, Lagrange D, Haupt K and Nicu L 2007 Combining resonant piezoelectric micromembranes with molecularly imprinted polymers *Angew. Chem., Int. Ed.* **119** 9431–4
- [21] Guillon S, Lemaire R, Linares A V, Haupt K and Ayela C 2009 Single step patterning of molecularly imprinted polymers for large scale fabrication of microbiochips *Lab Chip* **9** 2987–91
- [22] Gomez L P C et al 2016 Rapid prototyping of chemical microsensors based on molecularly imprinted polymers synthesized by two-photon stereolithography *Adv. Mater.* **28** 5931–7
- [23] Ayela C, Dubourg G, Pellet C and Haupt K 2014 All-organic microelectromechanical systems integrating specific molecular recognition—a new generation of chemical sensors *Adv. Mater.* **26** 5876–9
- [24] Holthoff E L, Li L, Hiller T and Turner K L 2015 A molecularly imprinted polymer (MIP)-coated microbeam MEMS sensor for chemical detection *Proc. SPIE* **9455**
- [25] Schmidt R H, Belmont A-S and Haupt K 2005 Porogen formulations for obtaining molecularly imprinted polymers with optimized binding properties *Anal. Chim. Acta* **542** 118–24

## Résumé

Afin de permettre l'avènement de la médecine personnalisée et les promesses qui l'accompagnent en terme notamment d'amélioration de la prise en charge des patients et de baisse des coûts des soins médicaux, il est nécessaire de développer de nouveaux dispositifs de dosage moléculaire permettant de démocratiser les analyses à partir de prélèvements non-invasifs (biopsies liquides).

Les technologies issues de la microélectronique ont fait naître une grande variété de biocapteurs, sous la forme de dispositifs à haut degré d'intégration offrant des avantages indéniables par rapport aux techniques d'analyses moléculaires classiques : détection sans marquage, quantification directe des biomolécules, préparation d'échantillon minimale et rendu des résultats accéléré. Ce sont précisément ces avantages, liés à une technologies potentiellement bas coût, multiplexe, et portable qui entretiennent la promesse d'avoir accès à des analyses routinières au chevet du patient, calquée sur le modèle de réussite des appareils de mesure du glucose pour les personnes diabétiques.

Mes activités de recherche conduites au LAAS ces 10 dernières années sont axées sur l'utilisation des microtechnologies pour l'analyse moléculaire en traitant les différentes composantes d'un biocapteur : développement de moyens de transduction, de stratégies de biofonctionnalisation et outils pour la préparation d'échantillon. Plus spécifiquement, mes travaux visent à tirer parti de la réduction de taille et du confinement spatial inhérents aux bioMEMS : plateforme nanofluidique pour l'étude cinétique d'interactions moléculaires, intégration de membranes de silicium poreux dans des systèmes fluidiques planaires pour la réalisation d'étapes pré-analytiques sur puce, et recours aux MEMS résonants pour la détection sans marquage.