



HAL
open science

Conception et réalisation d'un microsystème robotisé de dépôt de liquide biologiques par microleviers en silicium pour l'élaboration de biopuces

Pascal Belaubre

► **To cite this version:**

Pascal Belaubre. Conception et réalisation d'un microsystème robotisé de dépôt de liquide biologiques par microleviers en silicium pour l'élaboration de biopuces. Automatique / Robotique. INSA de Toulouse, 2003. Français. NNT: . tel-00004456

HAL Id: tel-00004456

<https://theses.hal.science/tel-00004456>

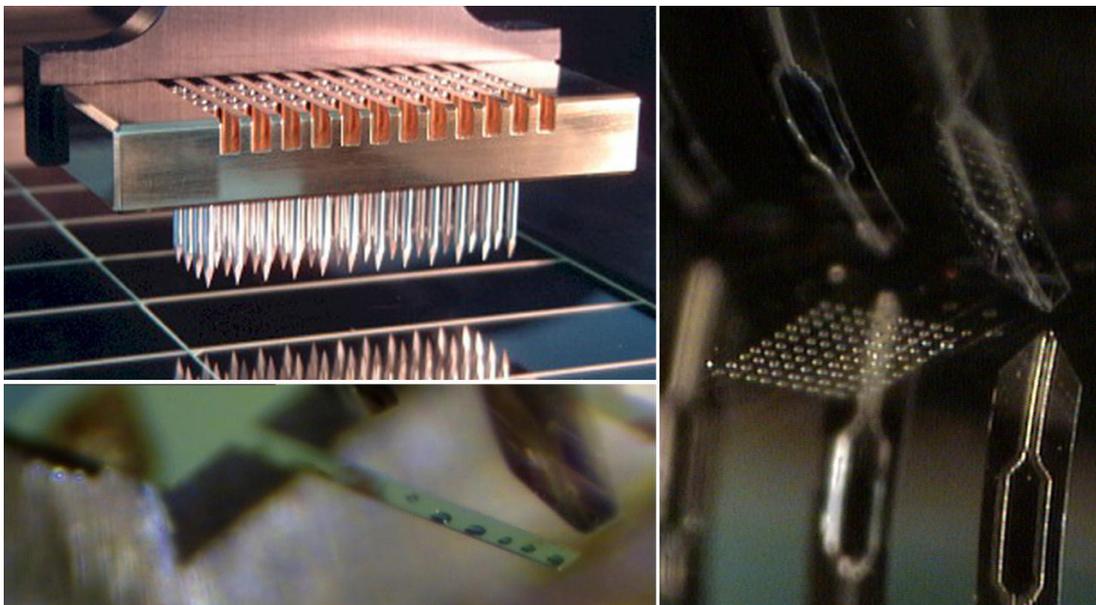
Submitted on 3 Feb 2004

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.

**Conception et réalisation d'un micro-système
robotisé de dépôt de produits biologiques
par micro-leviers en silicium pour
l'élaboration de biopuces**

Pascal Belaubre



THESE

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

En vue de l'obtention du
Doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées
Toulouse

Spécialité :
Systèmes Automatiques

par
Pascal BELAUBRE

CONCEPTION ET RÉALISATION D'UN MICRO-SYSTÈME
ROBOTISÉ DE DÉPÔT DE PRODUITS BIOLOGIQUES
PAR MICRO-LEVIERS EN SILICIUM POUR
L'ÉLABORATION DE BIOPUCES

Soutenue le 19 Décembre 2003, devant le jury :

Rapporteurs	T.	Coleman
	D.	Collard
Examineurs	G.	Pietu
	G.	Authié
Invités	L.	Bouet
	M.C.	Potier
	A.	Martinez
Directeur de thèse	G.	Garcia
Co-directeur de thèse	C.	Bergaud

Rapport LAAS N°03XXX

NOM : BELAUBRE Prénom : Pascal

CONCEPTION ET RÉALISATION D'UN MICRO-SYSTÈME ROBOTISÉ DE DÉPÔT DE PRODUITS BIOLOGIQUES PAR MICRO-LEVIERS EN SILICIUM POUR L'ÉLABORATION DE BIOPUCES, 150 pages

Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'INSA de Toulouse, spécialité Systèmes Automatiques, soutenue au LAAS-CNRS de Toulouse en 2003

RESUME :

Les biopuces permettent d'analyser en quelques heures des milliers de séquences (ADN ou protéines) et d'identifier quels gènes répondent à l'action d'une molécule ou sont impliqués dans une maladie. Le travail présenté porte sur la conception et la réalisation d'un système miniaturisé et robotisé de dépôt de produits biologiques par micro-leviers en silicium pour la réalisation de biopuces. Après un descriptif détaillé des différentes techniques pour fabriquer des biopuces, nous expliquons notre démarche et nos objectifs. La méthode de fabrication est basée sur l'utilisation de micro-leviers en silicium et la mise en place d'une technique de dépôt par contact direct entre ces outils et le support de la biopuce. Le dépôt s'effectue par capillarité. L'originalité de notre travail repose sur les dimensions géométriques (dépôts de quelques microns en diamètre), sur l'utilisation de volumes très faibles (quelques picolitres). Un autre avantage réside dans le faible coût de production des leviers par une technique de réalisation très simple. L'étude valide ensuite cette approche en démontrant la possibilité de réaliser des puces à ADN et à protéines et de déposer différents produits avec un seul et même levier. Puis, le problème du chargement des microleviers est traité : une technique d'électromouillage est tout d'abord utilisée mais son efficacité reste limitée. Elle évolue vers la diélectrophorèse, technique connue pour permettre de transporter des liquides en modifiant l'équilibre des charges. Enfin, l'intégration de piézorésistances sur les leviers permet de détecter le contact avec le support et de garantir une uniformité dans la force d'appui et le temps de contact des leviers sur le support.

MOTS CLES : biopuces, capillarité, électromouillage, micro-leviers

JURY, 19/12/2003, Salle de Conférence, LAAS-CNRS, Toulouse :

Président	G.	Authié
Rapporteurs	A.W.	Coleman
	D.	Collard
Examineurs	G.	Pietu
Invités	L.	Bouet
	M.C.	Potier
	A.	Martinez
Directeur de thèse	G.	Garcia
Co-directeur de thèse	C.	Bergaud

Dépôt à la bibliothèque en 4 exemplaires.

Revues

BELAUBRE P., GUIARDEL M., LEBERRE V., POURCIEL J.B., AND BERGAUD C.
Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples
Sensors and Actuators : Physics A, 2003, A paraître

BELAUBRE P., GUIARDEL M., LEBERRE V., DAGKESSAMANSKAIA A., TREVISIOL E., FRANCOIS J.M.,
POURCIEL J.B., GARCIA G., AND BERGAUD C.
Fabrication of biological microarrays using microcantilevers
Applied Physics Letters, vol. 82, num. 18, pp 3122-3124, May 2003
Article cité dans *Virtual Journal of Biological Physics Research*, May 1, 2003, Vol. 5, Issue 9

Conférences internationales avec actes et comité de sélection

BELAUBRE P., GUIARDEL M., LEBERRE V., DAGKESSAMANSKAIA A., TREVISIOL E., FRANCOIS J.M.,
POURCIEL J.B., GARCIA G., AND BERGAUD C.
Silicon-based microcantilevers for multiple biological sample deposition
IEEE Transducers'03, 12th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and
Microsystems, Boston, pages 1816-1819, June 2003

BELAUBRE P., GUIARDEL M., LEBERRE V., DAGKESSAMANSKAIA A., TREVISIOL E., FRANCOIS J.M.,
POURCIEL J.B., GARCIA G., AND BERGAUD C.
Silicon-based micropins for multiple biological sample deposition
Nanobiotechnologies II, Grenoble, page PO2.7, April 2003

BELAUBRE P., GUIARDEL M., LEBERRE V., POURCIEL J.B. AND BERGAUD C.
Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples
Euroensors XVI, 16th European Conference on Solid-State Transducers, Prague, pages 541-544,
September 2002

Autres communications

BELAUBRE P., GUIARDEL M., LEBERRE V., DAGKESSAMANSKAIA A., TREVISIOL E., FRANCOIS J.M.,
POURCIEL J.B., GARCIA G. AND BERGAUD C.
Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples
SITEF, Technologies et Sciences du Vivant, Toulouse, October 2002

BELAUBRE PASCAL
Système de dépôt de solutions biologiques pour la fabrication de puces à ADN
Lettre d'informations Biotech n°12, 8 Septembre 2002

BELAUBRE PASCAL
Système de dépôt de liquides biologiques pour la fabrication de puces à ADN
Journée INTRAGENOPOLE, 24 Juin 2002 Toulouse

BELAUBRE PASCAL
Fabrication de puces à ADN : Dépôt de liquides biologiques
3ème Congrès des Doctorants de l'Ecole Systèmes, 22-23 Mai 2002 Blagnac

FRANCOIS J.M., LE BERRE V., DAGKESSAMANSKAIA A., SOKOL S., MEUNIER B., MAJORAL J.P.,
CAMINADE A.M., PRATVIEL G., TREVISIOL E., BERGAUD C., MARTINEZ A., GUIARDEL M., BELAUBRE
P., CHEVALET C.

*La plateforme transcriptome-biopuces du genopole Toulouse Midi-Pyrénées : Structure d'ouverture et de
développement des puces à ADN*
Ecole d'Eté Sciences Nano-Microtechnologie pour la Biologie, Porquerolles, 22-28 oct. 2001

Brevet

BERGAUD C., GUIARDEL M., BELAUBRE P., BELIER B. ET POURCIEL J.B.
Système de dépôt de solutions biologiques avec ou sans contact pour la fabrication de biopuces
Dépôt de brevet n° FR2839662 en cours d'extension internationale, 16 Mai 2002, publié 21-11-2003

*à mes parents,
à Christophe, Françoise et Mélina,
à Caroline*

Remerciements

Je me dois de commencer par adresser mes remerciements aux personnes, Jean-Claude Laprie et Malik Ghallab, directeurs du LAAS-CNRS, qui m'ont permis de rentrer dans le monde de la recherche, en intégrant cette structure adaptée et dédiée à la recherche scientifique, afin de réaliser mon stage de DEA puis ma thèse.

Je souhaite également remercier tous les membres de mon jury de thèse : Gérard AUTHIE, Professeur à l'Université Paul Sabatier et président de ce jury ; Antony COLEMAN et Dominique COLLARD, Directeurs de Recherche respectivement à l'IBCP de Lyon et à l'IEMN de Lille qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse ; Geneviève PIETU, Directeur de Recherche à l'INSERM de Paris ; Marie-Claude POTIER, Chargé de Recherche à l'ESPCI de Paris, Augustin MARTINEZ, Professeur à l'INSA de Toulouse ; Laurence BOUET, Directeur Général Délégué à INNOPSY ; sans oublier Germain GARCIA, Professeur à l'INSA de Toulouse et Christian BERGAUD, Chargé de Recherche au LAAS-CNRS de Toulouse mes directeur et co-directeur de thèse.

C'est Augustin Martinez, qui cherchant « un automaticien » et sur les conseils de Germain Garcia, vint me voir en premier afin de me présenter le sujet, un sujet fabuleusement intéressant, multidisciplinaire, une application concrète pour les biologistes, tout un ensemble qui me convainc de ne pas prolonger ma coopération avec l'équipe de Michel Devy et Frédéric Lerasles et le groupe RIA. Ils furent les premiers à allumer ma flamme pour ce monde de la recherche pendant un passionnant stage de DEA et je tiens à les en remercier également. Augustin m'avait « enflammé » avec ce sujet et surtout la manière dont il en parlait. C'était du concret, de l'utile, pour la santé... Trois années déjà, que le temps passe vite ! Je me rappelle encore les débuts laborieux, surtout concernant l'obtention de la bourse, quelle galère !

Ensuite, ce fut la rencontre avec Christian Bergaud, les choses se précisaient, avant l'obtention de la bourse puis l'attente du matériel, les premières expérimentations, les premières explications, les premiers résultats, mais, chut, le reste est dans les pages qui suivent.

Je tiens à insister sur ma reconnaissance envers Christian Bergaud et Germain Garcia, tout d'abord pour m'avoir offert ce sujet (avec Monsieur Martinez), pour m'avoir supporté dans tous les sens du terme, mais surtout pour leur disponibilité de tous les instants. Christian et ses fabuleuses idées aura été LE guide de mes recherches, une source de renseignements intarissable, un interlocuteur de premier choix pour toutes les réflexions possibles et imaginables, un passionné qui a su transmettre son savoir et sa passion, un moteur pour faire avancer la barque

de mes travaux même au plus fort de la tempête. Germain fut un catalyseur, me rassurant à chaque étape et m'encourageant dans mes démarches. Il sut prendre du recul pour analyser la situation et m'accueillir à chaque fois que je le jugeais nécessaire. Il me permit également, avec Bernard Pradin, d'avoir l'immense plaisir d'enseigner, m'accordant une totale confiance dont je serai toujours redevable.

Un (grand) merci tout particulier à Jean-Bernard Pourciel pour son aide précieuse, capitale même, pour sa gentillesse et les nombreuses réponses qu'il m'a procurées. Il m'a permis de gagner un temps précieux et a contribué à mon épanouissement dans ce monde. Sa « débrouillardise » restera pour moi un modèle du genre.

Et puis bien évidemment, je tiens à remercier le groupe Nano, notamment Christophe Vieu son responsable, dont l'enthousiasme ne peut que pousser à la réussite, Liviu Nicu dont la gentillesse n'a d'égal que sa compétence scientifique, et merci à Matthieu Guirardel, mon compagnon de thèse, de bureau (avec Daisuke Saya), de « bunker » d'expérimentation, pour sa patience, CELUI à qui on peut tout demander, pour LaTeX, pour l'administratif, pour les techniques de microfabrication, pour ce que l'on veut, celui à qui je dois les leviers et mes expérimentations, et donc en quelques sortes ces travaux.

J'ai une pensée toute particulière pour Fabrice Mathieu (et son petit dernier) avec qui j'ai partagé la chaleur du « bunker », et Denis Lagrange, ainsi que toute l'équipe de la plate-forme transcriptome du Génopôle, Jean-Marie François, Véronique Leberre, Adilia Dagkessamanskaia, Sergei Sokol et Emmanuelle Trévisiol notamment.

Je n'oublierai pas d'associer la multitude de personnes que j'ai pu croisées durant ces trois années, qui ont fait de mon quotidien un pur bonheur, mes collègues thésards, Farcy, Georges, Alex, les Laurent's, les Jérôme's, William, et tant d'autres aussi, les stagiaires Yannick, Peter, des collègues tout court Pierre Temple, Fuccio Cristiano, Emmanuel Scheid, Jean-Pierre Laur, Christian Berty notre « imprimeur » bien sûr, et Xavier.

Je tiens aussi à remercier mes amis de l'INSA, qui font partie de ma vie au jour le jour, supportant mes humeurs et mes joies, et qui quelque part, ont également également contribué à ces travaux en me permettant de m'épanouir en dehors du travail.

Enfin, comment ne pas associer à mon parcours, ma famille, mes parents grâce à qui je suis ici, physiquement et intellectuellement, sans qui rien de tout ce qui m'est arrivé n'aurait pu voir le jour ; comment ne pas remercier mon frère et ma belle-soeur (et leur future petite fille), et Caroline ma compagne depuis 7 ans, qui dut supporter mes sautes d'humeurs, mes joies, surtout mes craintes (et c'est pas terminé!) et m'offrir ses sourires pour détourner mon attention des mes (légers) tourments.

Table des matières

Remerciements	7
Introduction générale	1
1 Génomes, gènes et biopuces, la révolution de la génomique	5
1.1 Introduction	6
1.2 Les biopuces, puces à ADN et à protéines	7
1.2.1 Qu'est-ce qu'une biopuce ?	7
1.2.2 Historique	8
1.3 Etapes de fabrication d'une biopuce	11
1.3.1 Supports	11
1.3.2 Les techniques de dépôt des sondes	14
1.3.3 Détection et analyse	14
1.4 Fixation des sondes	18
1.4.1 La synthèse <i>in situ</i>	18
1.4.2 Techniques jet d'encre, systèmes « fermés »	20
1.4.3 Techniques par contact, capillarité et tension de surface	25
1.5 Vers une compatibilité avec les micro et nanotechnologies	28
1.5.1 Technologies émergentes	28
1.5.2 Justification de l'approche retenue	30
2 Instrumentation et banc expérimental	33
2.1 Introduction	35
2.2 Les leviers	36
2.2.1 Idée de départ	36
2.2.2 Procédé de fabrication	37
2.2.3 Vers des leviers actifs	39
2.3 La plate-forme expérimentale	40
2.3.1 La table de positionnement XYZ	41
2.3.2 Interfaçage	43
2.3.3 Contrôle visuel de l'expérience	47
2.4 Perspectives en cours	49
2.4.1 Vers des leviers piézorésistifs	49

2.4.2	Dispositif électronique de lecture	53
2.5	Conclusion	56
3	Expérimentations et résultats	59
3.1	Introduction	60
3.2	Validation de l'utilisation de la table XYZ	60
3.2.1	Validation avec les pointes classiques commerciales	61
3.2.2	Validation avec les micro-leviers développés au LAAS	64
3.3	Dépôts d'oligonucléotides et de protéines	66
3.3.1	Puces à ADN	66
3.3.2	Puces à protéines	67
3.4	Étude de la diffusion et du temps de contact	69
3.4.1	Protocole expérimental	70
3.4.2	Résultats expérimentaux	70
3.4.3	Paramètres influençant le transfert d'un produit	72
3.5	Étude de la « cross-contamination »	72
3.5.1	Protocole expérimental	73
3.5.2	Résultats expérimentaux	73
3.6	Compatibilité avec les micro- et nano-technologies	75
3.6.1	Vers une meilleure résolution	75
3.6.2	Développement de micro-biocapteurs	77
3.7	Conclusion	78
4	Contrôle actif du chargement et du dépôt	81
4.1	Introduction	82
4.2	La mouillabilité	83
4.2.1	Mouillage : définition	83
4.2.2	Relation de YOUNG	84
4.3	Les techniques utilisant un champ électrique	85
4.3.1	Electrophorèse	85
4.3.2	Electromouillage	86
4.3.3	Diélectrophorèse	92
4.3.4	Approche retenue	94
4.4	Amélioration du principe du chargement et du dépôt	96
4.4.1	Amélioration du chargement	96
4.4.2	Contrôle actif du dépôt	99
4.4.3	Dépôt assisté par champ	105
4.5	Conclusion	109
	Conclusion générale	111
	Bibliographie	115
A	Notion de biologie moléculaire et biopuces	121
A.1	Le message du gène	122
A.1.1	Les acides nucléiques	122
A.1.2	Les protéines	125
A.2	Applications des biopuces et enjeux	126
A.2.1	L'analyse de l'expression des gènes	127
A.2.2	L'analyse de mutation	127
A.2.3	Le séquençage par hybridation	128

A.2.4	La pharmacogénomique	129
B	Partenaires du projet Européen et du réseau d'Excellence	133
B.1	Partenaires engagés dans le réseau d'Excellence Nano-To-Life	134
B.2	Partenaires engagés dans le projet Européen NaPa	135

Table des figures

1.1	Principe des biopuces (a) et Résultats (b)	7
1.2	Adressage électrochimique	14
1.3	Visualisation par fluorescence	15
1.4	Principes des techniques Dot-blot inverse et hybridation sandwich	16
1.5	Principe de la photolithogravure	19
1.6	Technologies jet d'encre et piézoélectriques	21
1.7	Technique d'impression par bubble jet	23
1.8	Principe des systèmes « fermés »	23
1.9	Dépôt par utilisation d'un champ électrique	24
1.10	Utilisation de l'énergie acoustique pour la formation de gouttes	24
1.11	Aiguilles utilisées : Affymetrix et Telechem	26
1.12	Image fluorescente d'un microarray par l'aiguille Telechem	27
1.13	Lithographie douce : deux techniques (Scientific American, Inc©)	29
1.14	Dip-pen lithographie	30
1.15	Synthèse des techniques de fabrication	31
2.1	Pointe Telechem et micro-levier de première génération	36
2.2	Procédé de fabrication de microleviers intégrant un réservoir	37
2.3	Configurations des réservoirs des micro-leviers	38
2.4	Rangée de 4 leviers à réservoir débouchant	39
2.5	Table XYZ de positionnement	41
2.6	Agencement de la table XYZ	42
2.7	(1) : Support levier et électronique, (2) et (3) : Réglages angulaires	43
2.8	Réservoirs à produits (1) et Peltier pour le séchage (2)	43
2.9	Interface graphique pour l'utilisateur	45
2.10	Boîtier de transmission et de réception des signaux	45
2.11	Contrôleur de la table : Interface PC/Table	47
2.12	Microscope (a) Image obtenue (b)	48
2.13	ScanArrayers : Genepix et BioAnalyzer	50
2.14	Principe de fonctionnement des leviers équipés de piézorésistances	51
2.15	Utilisation des leviers piézorésistifs	52
2.16	Graficets de fonctionnement du contrôle actif du dépôt	53
2.17	Connexions des entrées et sorties du contrôleur d'axes	54

2.18	Connexions entre les différents éléments du contrôle actif	55
2.19	Micro-système pour l'électronique de lecture	55
2.20	Communications et liaisons dans la plate-forme expérimentale	56
3.1	Aiguilles Telechem : (1) Principe (2) Formes (3) Fixation	62
3.2	Formation d'un dépôt par contact direct	62
3.3	Spots réalisés avec une pointe Telechem et notre table XYZ	63
3.4	Système de fixation d'une aiguille classique à notre table XYZ	63
3.5	Dépôts d'un mélange de DMSO+colorant sur or	64
3.6	Dépôts sur lame de verre d'une mélange DMSO+colorant	65
3.7	Oligonucléotides marqués en CY3 observés au microscope optique	66
3.8	Oligonucléotides marqués en CY3 observés par le BioAnalyzer	67
3.9	Visualisation des spots de protéines pendant l'expérimentation	68
3.10	Visualisation au microscope de l'interaction protéine-anticorps	69
3.11	Spots résultant de l'étude sur le temps de contact	70
3.12	Mise en évidence de la diffusion	71
3.13	Dispositif expérimental pour la contamination croisée	74
3.14	Etude de la crosscontamination	74
3.15	Scanner LightScan d'Innopsys	76
3.16	Images de dépôts marqués en CY5 par le LigthScan d'Innopsys	76
3.17	Membranes piézoélectriques	78
3.18	Dépôts sur des micro-leviers	78
3.19	Dépôt sur des micro-membranes à actionnement piézoélectrique	79
4.1	Angle de contact	83
4.2	Energie superficielle	84
4.3	Principe de l'électrophorèse	86
4.4	Photographie d'une séparation électrophorétique	87
4.5	Principe de l'électromouillage	90
4.6	Principe de l'EWOD	90
4.7	Principes de l'électromouillage	91
4.8	Principe de la diélectrophorèse sur particules	93
4.9	Evolution du phénomène d'ébullition par effet Joule	95
4.10	Principe du chargement par diélectrophorèse	95
4.11	Montages expérimentaux inspirés par celui de Pellat	97
4.12	Déplacement d'une goutte par diélectrophorèse	100
4.13	Changement des points de contact pendant la diélectrophorèse	100
4.14	Tension minimum en fonction de la largeur du filet	101
4.15	Tension minimum en fonction de g et w et de k	101
4.16	Déformation d'un microlevier (1) simple (2) piézorésistif	102
4.17	Montage demi-pont à courant constant pour la mesure de la force d'appui	103
4.18	Expérimentation avec les leviers piézorésistifs	105
4.19	Courbe de réponse d'un micro-levier piézorésistif	106
4.20	Forme du liquide lors de l'electrospray	107
4.21	Micro-levier percé	108
4.22	Dépôt par une technique sans contact	108
A.1	Bases azotées : Adénine, Guanine, Cytosine, Thymine	123
A.2	Séquençage par hybridation	129
B.1	Partenaires du projet Nano-To-Life	134

Introduction générale

L'information contenue par les gènes est véhiculée de façon héréditaire à travers l'acide désoxyribonucléique, l'ADN. La séquence du génome est la source des caractéristiques des traits physiques et morphologiques de l'organisme.

Un organisme simple tel que celui d'une bactérie possède un nombre de gènes variant de 1 à 5 millions (megabase), les génomes des mammifères, dont celui de l'Homme, en contiennent approximativement 3000 megabases. La complexité génomique provient en partie de l'expression des gènes.

Les différences biologiques entre les individus d'une population sont dues à la fois à des facteurs génétiques et environnementaux. Ces influences peuvent être comprises en étudiant les variations de la séquence génomique (mutations et polymorphismes) et en quelle quantité chaque gène est exprimé dans une cellule ou un tissu donné ; c'est ce que l'on appelle l'expression génétique. On devine alors aisément toutes les difficultés que l'on peut rencontrer lorsque l'on se lance dans ces études.

Les puces à ADN et à protéines ou les biopuces en général, sont des petits supports (souvent en verre) recouverts, de façon ordonnée (sous forme de matrices), par des dépôts de liquides biologiques (ADN, protéines, ...), que l'on fait réagir avec un autre produit biologique marqué le plus souvent en fluorescence. La réaction qui se produit est une réaction d'interaction (hybridation quand il s'agit des puces à ADN). Les séquences qui sont complémentaires les unes des autres (une appartenant à la solution déposée, l'autre appartenant à la solution réagissant avec la bio-puce) s'hybrident ou interagissent. Il ne restera plus qu'à mesurer l'interaction et à la localiser à l'aide d'un appareil scannant¹ en fluorescence. Les puces permettent ainsi d'analyser en quelques heures des milliers de séquences d'ADN ou d'ARN ou de protéines. Il est ainsi possible de savoir quels gènes répondent à l'action d'une molécule, ou sont impliqués dans une maladie ou encore de déterminer l'expression de gènes de l'organisme étudié dans des conditions données.

En permettant la mise en commun d'un nombre important de données, les biopuces ou microarrays représentent une avancée technique fondamentale pour la recherche dans le domaine du biomédical. Dans l'industrie pharmaceutique, par exemple, les investissements liés à cette recherche pour le développement de nouveaux médicaments occupent une place considérable dans le budget. De nouveaux développements sont donc nécessaires pour réduire le coût de ces recherches.

Les avantages des bio-puces sont les suivants :

¹Cet appareil balaye la surface en l'éclairant et en fait une image numérique.

- elles permettent l'analyse simultanées de l'expression des gènes ;
- elles permettent de développer de nouvelles méthodes, plus sensibles, de détection ;
- elles nécessitent des volumes plus faibles, donc à moindre coût ;
- elles permettent aux processus analytiques d'être plus rapides compte-tenu de leurs faibles dimensions.

Les domaines de la microbiologie industrielle et du biomédical sont autant concernés par les puces à faible et moyenne densité de dépôts (environ 100 à 500 dépôts / cm²), lorsque les génomes concernés sont de petites tailles (1000 à 5000 gènes), que par les puces à forte densité (environ 10000 dépôts/cm²) lorsqu'il s'agit de génomes entiers.

Ainsi, l'analyse d'un échantillon de sang, d'ADN, de solution polluée, d'écosystème, ..., pourra bientôt se faire au moyen d'une puce de moins d'1 cm² avec des appareils portables pour y déceler les micro-organismes présents ou la mutation d'un gène (puces de diagnostic).

Mais nous n'en sommes pas là, même si l'arrivée des biopuces va révolutionner les domaines du développement de médicaments et de la bio-analyse, avec des applications nombreuses, dans le diagnostic médical, biologique et génomique, et dans la recherche thérapeutique. C'est une technologie au confluent de la microélectronique, de la chimie combinatoire, de la biologie moléculaire, de l'informatique et du traitement du signal, fondée sur le principe de l'interaction ADN-ADN (hybridation), ADN-protéine, ou protéine-protéine.

Au niveau de la fabrication des biopuces, trois principales technologies s'affrontent, la photolithographie (synthèse in situ), la technique jet d'encre ou piezoélectrique et le microspotting. Ces trois technologies permettent de fabriquer des microarrays pour la détection de mutation et pour des applications sur l'expression génomique, qui sont les deux principales applications des biopuces. Les exigences au niveau du dépôt, de la densité, de la qualité, de la flexibilité, et du coût, ainsi que d'autres critères, dictent laquelle de ces trois technologies est la plus appropriée pour une application donnée.

La photolithographie repose sur l'utilisation des technologies des semiconducteurs dans un contexte de biopuce. Des photomasques solides et définis spatialement, permettent la synthèse de phases d'ADN grâce à une lumière qui sert à activer les versions phosphoramidites modifiées des quatre bases de l'ADN, A, C, G et T, pour la synthèse de l'ADN. Ses principales applications sont l'analyse de l'expression génomique et la détection des mutations. Affymetrix est la société développant cette méthode. La technique de jet d'encre est issue de sa première utilisation — les applications pour les imprimantes développées par IBM dans les années 1970 — pour déposer des produits biologiques à la place de l'encre. Enfin, la technologie de micro-dépôt est basée sur un contact direct entre un outil de dépôt (le plus souvent une aiguille) et la surface de dépôt (lame de verre, membranes, ...).

C'est dans le contexte de ce dernier axe, et donc sur la partie fabrication des biopuces, que se situe le travail de thèse rapporté dans ce mémoire. En collaboration avec le génopôle Toulouse Midi-Pyrénées, cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes² du CNRS à Toulouse. Intuitivement, nous avons pensé qu'en réduisant les dimensions actuelles des systèmes classiquement utilisés et commercialisés, nous pourrions alors développer des micro-outils permettant d'obtenir des résultats au moins aussi acceptables que ceux obtenus par les autres méthodes de lithographie et de jet d'encre. Notre travail a donc été développé de la manière qui suit :

- dans un premier temps, nous avons essayé de reproduire des biopuces avec les outils de dépôt du commerce, en utilisant une table XYZ appropriée pour nos futurs outils,
- puis, nous avons réalisé les tests nécessaires à la faisabilité et à la validation de notre approche et de nos outils, faisant face notamment à des phénomènes perturbant le fonctionnement classique,

²L.A.A.S.

- enfin, nous avons développé et amélioré nos outils afin d'améliorer la qualité des dépôts et d'en réduire considérablement le coût de revient.

Différents objectifs motivent notre démarche :

- une réduction du coût de revient d'un spot³
- la volonté de rendre compatible ces systèmes pour la biologie et la génomique avec les micro et nanotechnologies⁴,
- permettre à tous les laboratoires le souhaitant de s'équiper de telles technologies, très coûteuses aujourd'hui, afin qu'ils puissent utiliser pleinement la puissance de ces nouveaux outils de diagnostic que sont les biopuces.

Ainsi, nous décrivons dans le *premier chapitre* les notions nécessaires à la compréhension du fonctionnement des biopuces, en précisant notamment les différents éléments composant une biopuce et en développant les différentes techniques de fabrication utilisées. Ce chapitre se terminera en présentant les nouvelles approches pouvant concerner la fabrication des biopuces⁵, et en expliquant pourquoi nous avons retenu une approche similaire à ces dernières.

Le *deuxième chapitre* présentera toute l'instrumentation utilisée au cours de ces travaux. Après une brève analyse afin de justifier de nos équipements et de leur compatibilité avec non seulement notre application mais également des applications concernant les micro- et nanotechnologies, nous partirons d'une échelle macroscopique afin de décrire la table XYZ et toutes les interfaces, pour arriver à une échelle microscopique en expliquant la fabrication des micro-leviers, les cantilevers, nos outils de dépôt.

Dans le *troisième chapitre*, nous présenterons tous nos résultats permettant la validation de notre approche avec les objectifs de départ. Plusieurs expérimentations ont été mises en place :

- le dépôt d'oligonucléotides (pour les oligochips ou puces à ADN),
- le dépôt d'anticorps primaires (pour les puces à protéines),
- l'influence du temps de contact lors du dépôt, afin de mettre en évidence le phénomène de diffusion,
- l'étude de la cross-contamination⁶ et donc d'un procédé de nettoyage, et enfin,
- une automatisation du processus de dépôt permettant de garantir une homogénéité des spots, en temps de contact, et en force d'appui.

La validité de ces expérimentations permet de conclure quant à la faisabilité de réaliser un outil pour les biopuces, compatible avec les micro et nanotechnologies et intégrant à la fois un procédé permettant de déposer les sondes, avec des garanties d'homogénéité, et d'analyser les résultats obtenus via des biocapteurs.

Enfin, dans un *quatrième chapitre*, nous traiterons de la première difficulté rencontrée lors de ces travaux, à savoir qu'avec la réduction des échelles, des phénomènes négligeables à une échelle macroscopique prennent une importance toute autre à une échelle micrométrique. Nous avons dû faire face à des problèmes de capillarité, de microfluidique, qui nous ont contraints à utiliser des techniques d'électromouillage, afin de contrôler les tensions de surface, les charges,

³Des outils utilisant les méthodes classiques de microfabrication reviendraient bien moins chers que des outils microusinés par laser ; à la fois une garantie d'homogénéité et des volumes réduits diminueraient les quantités de produits nécessaires, et intégrer un système de détection sur le support permettrait une intégration plus forte et une réduction de l'instrumentation.

⁴Réduction des échelles afin d'augmenter les densités et donc les informations contenues par une seule biopuce, amélioration du rapport signal/bruit, détection plus rapide, miniaturisation des systèmes et intégration,

⁵Plus précisément le dépôt des sondes par contact direct

⁶i.e. la possibilité de déposer au moins deux produits différents avec un même outil sans trouver trace de pollution entre produits.

la mouillabilité des surfaces. Après un état de l'art sur les différentes techniques, nous présenterons l'approche retenue pour le chargement de nos cantilevers ainsi que les différentes modifications que nous avons prévues d'opérer à court terme.

CHAPITRE 1

Génomomes, gènes et biopuces, la révolution de la génomique

1.1 Introduction

La biologie est la branche des sciences qui s'intéresse au vivant, depuis l'étude des populations jusqu'à l'exploration des molécules et de leurs interactions.

Par exemple, au niveau d'un être humain, on peut mener une étude :

- globale, intégrée : anatomie, physiologie,
- par système : systèmes nerveux, immunitaire, endocrinien (se rapportant aux hormones),
- au niveau de la cellule unique : biologie cellulaire,
- au niveau de la biomolécule : biochimie, biologie moléculaire.

Les données que l'on retire de chaque niveau apportent une meilleure compréhension du système dans son aspect global et intégré.

Pour des raisons pratiques et techniques, les études globales ou par systèmes se sont développées les premières. L'Homme, via les Sciences, a ensuite cherché à comprendre le fonctionnement de l'environnement en le regardant de plus en plus en détails jusqu'au niveau moléculaire. C'est pour cela que le développement de la biologie moléculaire et de ses applications (dont les biopuces) n'est qu'assez récent (années 70). Il est cependant réducteur de tirer une conclusion sur le fonctionnement global à partir d'une donnée unique moléculaire. Par exemple, une des grandes problématiques est de déterminer quels gènes sont responsables de telle ou telle maladie. Mais il ne faut pas confondre avec ceux qui sont une conséquence de cette maladie et qui permettent simplement de dire si le sujet est atteint de la maladie.

La biologie moléculaire aborde la compréhension du vivant par l'intermédiaire de l'étude des gènes, de leur expression, et de leur contrôle. Les gènes constituent le support de l'hérédité. Chacun d'entre nous possède des gènes dont un allèle provient de son père biologique et l'autre de sa mère biologique. Chacun de nous transmet de la même manière à ses enfants la moitié de ses gènes, l'autre moitié étant donnée par son (sa) conjoint(e).

Contrairement à ce que les termes laissent entendre, la biologie moléculaire ne se préoccupe pas de toutes les molécules. C'est une branche de la Biologie qui s'occupe du fonctionnement des gènes, de ses produits ARN et des protéines (Cf. annexe A). Les glucides et les lipides font plutôt partie de la « biochimie ». La puissance d'analyse de la biologie moléculaire est devenue incontournable pour qui veut s'immiscer dans l'intimité des mécanismes du vivant. Le but est de disséquer ces mécanismes afin de pouvoir agir en cas de dysfonctionnement. L'enjeu est devenu capital car une partie des maladies sont d'origine génétique. L'exploitation en est actuellement facilitée par l'abondance des kits et des appareils automatisés qui permettent des analyses précises et fiables. Les biopuces en sont le parfait exemple.

C'est vers la fin de l'année 1993 que Mark Schena et son équipe, du département de biochimie de l'université de Stanford, a mis à jour l'idée folle que l'analyse de l'expression des gènes serait facilitée par les puces à ADN. Grâce au soutien de Fodor, Shalon et Brown, il put faire passer le projet de l'état d'embryon à celui de publication en octobre 1995.

Pourquoi donc s'intéresser autant aux mutations des gènes et à leur expression ? Deux raisons s'imposent. Savoir à quel niveau s'exprime un gène dans différents tissus, différentes situations physiologiques ou pathologiques, c'est indubitablement faire un pas vers la compréhension de sa fonction. Information limitée, l'expression ne dit pas tout, et ses indications sont parfois ambiguës ou trompeuses (elle n'en reste pas moins précieuse) : nous connaissons tous des gènes à expression ubiquitaire (i.e. exprimés, présents partout) et qui pourtant jouent un rôle crucial dans un seul tissu¹. La deuxième raison est technique : ces données sont à l'heure actuelle les seules que nous soyons capables d'obtenir pour de grands ensembles de gènes, les

¹Songons par exemple à l'enzyme adénosine désaminase, exprimée dans la plupart des tissus et critique pour le bon fonctionnement des lymphocytes et dont l'absence est responsable d'un déficit immunitaire sévère sans autres symptômes majeurs.

seules qui puissent être rassemblées à l'échelle des dizaines de milliers d'entités révélées par le séquençage de banques d'ADN ou de génomes entiers. Après la connaissance de la séquence du génome, c'est-à-dire le contenant de l'information, il faut s'attaquer au contenu, c'est-à-dire l'expression des gènes, comprenant la transcription ou étude des ARN (les transcrits) et la traduction.

Nous allons tout d'abord définir de manière précise ce qu'est une biopuce, à la fois en termes de principes et mécanismes mis en jeu mais aussi en termes de composants. Les domaines d'applications et le rôle de ces biopuces sont détaillés en annexe A.1. Ensuite, nous présenterons les techniques de fabrication des biopuces, en décrivant les différentes parties constituant les biopuces et en introduisant à la fois les techniques conventionnelles, ou classiques, et les techniques compatibles avec les micro et nanotechnologies. C'est en se basant sur l'utilisation de ces technologies et de leurs dernières innovations, que nous pourrions conclure le chapitre en exposant la problématique de cette thèse, en justifiant notamment de la voie empruntée et en donnant une première approche de son déroulement.

1.2 Les biopuces, puces à ADN et à protéines

1.2.1 Qu'est-ce qu'une biopuce ?

Les biopuces consistent en (Cf. figure 1.1(a)) :

1. un support solide de quelques centimètres carrés, traité en surface pour faciliter l'accrochage de biomolécules,
2. des sondes moléculaires, qui peuvent être des fragments d'ADN (oligonucléotides ou produits PCR²) ou des protéines, déposées de façon géométrique sur le support.

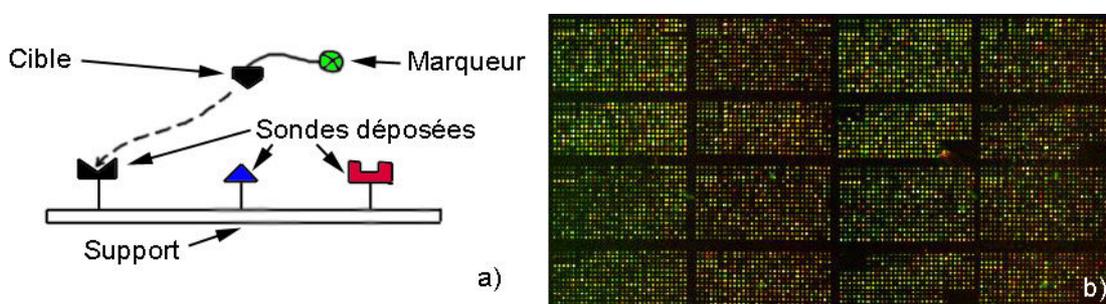


Fig. 1.1 : Principe des biopuces (a) et Résultats (b)

Sur la figure 1.1(a), on se rend compte que la cible (une molécule d'acide nucléique ou une protéine) tendra à se fixer sur une seule sonde (spécificité de l'interaction). Un marqueur, incorporé à la cible, permettra par la suite de visualiser ce résultat (b).

Les sondes sont des fragments de taille variable que l'on utilise pour repérer de manière caractéristique, dans une réaction d'interaction, dite d'hybridation moléculaire pour l'ADN, la séquence à laquelle on s'intéresse. Ainsi, on distingue aujourd'hui deux grands types de biopuces, les puces à ADN et les puces à protéines mais le principe de base reste le même dans les deux cas.

Grâce à cette technique, chacune des sondes est représentée par un dépôt sur le support (ou puce). Elles peuvent fixer de façon très spécifique les fragments de gènes complémentaires

²Réaction de Polymérisation en Chaîne, voir en annexe A pour plus de détails.

(cibles), présents dans les échantillons biologiques à tester et marqués en fluorescence ou radio-activité. Lorsqu'il s'agit d'ADN ou d'ARN, la mise en présence de séquences cibles marquées et des sondes permet de reconstituer la double hélice d'ADN par hybridation.

Une hybridation est une réaction hautement spécifique permettant de détecter rapidement la présence des cibles sur les sondes. Elle désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires, et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile U lorsqu'il s'agit d'ARN), et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G), selon le principe de Watson et Cricks. La formation et la stabilité des duplex dépendent de nombreux facteurs en plus de la composition en bases : longueur des duplex, complexité de la séquence, le pH et la salinité, la température du milieu... . Un complément des notions de biologie moléculaire est donné en annexe A. L'hybridation est à la base de nombreuses techniques de biologie moléculaire impliquant la mise en présence d'au moins deux brins simples d'acides nucléiques dans des conditions physico-chimiques bien précises. Le brin, dont on a défini la séquence est la sonde ; l'autre brin, celui que l'on souhaite caractériser, constitue la cible. La cible est marquée par réaction enzymatique et parfois par couplage chimique avec une molécule pouvant générer un signal.

L'interaction protéine/protéine ou anticorps/protéine, beaucoup plus complexe, possède les mêmes propriétés de sélectivité mais nous ne détaillerons que la réaction d'hybridation. Il faut noter que dans le cas des puces à protéines, le support et le système de dépôt doivent posséder comme caractéristique fondamentale de garder intacte l'activité biologique de la protéine.

Des techniques optiques de détection de la fluorescence ou de détection de radioactivité permettent par la suite de détecter l'interaction sonde/cible.

Ainsi, après une étape de lavage, permettant d'éliminer les cibles non hybridées, la quantification des signaux obtenus et l'identification des fragments de gènes reconnus sont ensuite rendues possibles au moyen d'un système d'acquisition d'image puis d'analyse des données faisant appel à des logiciels informatiques spécialement conçus à cet effet. Les résultats obtenus sont ensuite validés sur le plan statistique et interprétés dans un contexte bioinformatique.

La technologie des biopuces connaît à l'heure actuelle un essor exceptionnel et suscite un formidable intérêt dans la communauté scientifique. La biopuce permet d'analyser en quelques heures des informations sur l'expression de milliers de gènes, sur la présence de mutation au sein d'un gène, sur la présence de protéines au sein d'un complexe biologique. Son utilité est scientifiquement incontestable car la connaissance du niveau d'expression d'un gène dans ces différentes situations constitue une avancée vers sa fonction, mais également vers le criblage de nouvelles molécules et l'identification de nouveaux médicaments et de nouveaux outils de diagnostic. Ces applications au diagnostic médical et aux recherches thérapeutiques suscitent l'émergence de quantités de sociétés « Biotech ». C'est donc un formidable outil de diagnostic dont les applications jouent un rôle primordial dans l'avancée de la recherche biomédicale.

1.2.2 Historique

1.2.2.1 Les macroarrays

La plus ancienne des techniques est celle des « membranes à haute densité », qui tendent aujourd'hui à prendre le nom de *macroarrays* par référence à leur version miniaturisée *microarrays*. Elle utilise des clones d'ADNc ou leurs produits de PCR disposés régulièrement sur des membranes de Nylon, hybridés avec des cibles complexes radioactives produites par rétrotranscription d'une préparation d'ARNm ou total. L'hybridation, conduite en condition d'excès de sonde par rapport à la cible aboutit à la fixation sur chaque segment d'ADN d'une quantité de l'espèce correspondante de la cible proportionnelle à son abondance dans le mélange d'ARN de

départ ; l'ensemble des données est acquis de manière quantitative, généralement par un système à écran phosphore, et mesure ainsi le niveau d'expression de chacun des gènes représentés - plus précisément l'abondance relative de chacun des ARNm dans le mélange de départ.

Des robots aptes à la confection des macroarrays sont disponibles dans le commerce, les systèmes de détection sont en place dans de nombreux laboratoires, et cette méthode est à la portée de beaucoup d'équipes, d'autant que plusieurs fabricants commercialisent des membranes prêtes à l'emploi portant quelques centaines ou quelques milliers de gènes³. Sous sa forme la plus répandue, cette technique utilise des membranes d'assez grandes dimensions, avec une densité de quelques dizaines de dépôts par cm² et un espacement entre les spots déposés supérieur à 1 mm, compatible avec une détection par sondes marquées au ³³P (Phosphore) ou au ³²P. Une évolution vers la miniaturisation est en cours, avec un espacement réduit à deux trois cents microns et une détection colorimétrique [1] ou radioactive (avec des systèmes à haute résolution, jusqu'à 5 μ m par pixel)⁴. L'emploi des sondes fluorescentes est moins courant à cause de l'autofluorescence des supports existants. Cette méthode a pour elle sa flexibilité, l'excellente sensibilité absolue de la détection radioactive et sa large gamme dynamique, ainsi que la capacité élevée des membranes Nylon qui permet la fixation de fortes quantités d'ADN cible et abaisse ainsi le seuil de détection. De plus, ces membranes sont réutilisables jusqu'à quatre à cinq fois après déshybridation. Cette méthode est employée par de nombreuses équipes académiques [2]-[3] et par plusieurs industriels notamment Hyseq⁵.

1.2.2.2 Les microarrays et oligo-chips

Les méthodes plus récentes sont celles des *microarrays* et des puces à oligonucléotides ou *oligochips*. Un *microarray* comporte quelques milliers de gènes représentés par des produits PCR ou oligonucléotides déposés grâce à un robot sur un support donné. L'hybridation est effectuée avec une sonde complexe obtenue par rétrotranscription du mélange d'ARN en présence de nucléotides substitués autorisant une détection ultérieure (directe ou non) par fluorescence. L'acquisition des résultats est généralement effectuée par un système de balayage laser équipé d'une optique confocale, les signaux étant mesurés par photomultiplicateur (Cf. section sur la détection, chapitre 1.3.3).

Les *microarrays* ont l'avantage de la compacité : on peut envisager des jeux comportant cinquante ou cent mille sondes. De plus, le double ou éventuellement le triple marquage sont possibles, ce qui permet des comparaisons directes entre cibles différentes.

Quant aux puces à ADN de type « oligochips », elles ont été développées au départ dans une autre perspective, celle du « séquençage par hybridation » [4],[5],[6] qui reste cependant une application très peu utilisée. Des milliers d'oligonucléotides de séquence connue sont greffés sur une petite surface de verre ou de silicium ; la lecture de la puce, après hybridation avec un ADN marqué en fluorescence, donne des informations sur sa séquence. Les puces vendues par Affymetrix⁶ sont destinées à des applications de recherche de mutations (VIH). Il s'agit là d'un « quasi-séquençage » dans lequel la puce porte un jeu d'oligonucléotides représentant la séquence parfaitement complémentaire du gène considéré et la séquence comportant différentes mutations : l'hybridation avec une cible provenant d'un prélèvement biologique révèle alors les éventuelles différences entre la séquence présente chez le patient et la séquence habituelle.

³Clontech « Atlas array », Genome Systems « Gene discovery array » et Research Genetics « Gene-Filters » respectivement sur <http://www.clontech.com/clontech/Catalog/Hybridization/Atlas.html>, <http://www.genomesystems.com/GDA/> et <http://www.resgen.com/>

⁴Il faut tenir compte de l'espacement nécessaire entre les spots pour éviter que deux spots se chevauchent lors de la visualisation, le ³²P ayant notamment une émission plus importante que le ³³P, mais aussi de la résolution de l'appareil de détection.

⁵<http://www.hyseq.com/>

⁶<http://www.affymetrix.com>

Mais Affymetrix s'intéresse beaucoup à la mesure de niveaux d'expression, et a produit dans ce but des *puces à expression* dans lesquelles chaque gène est représenté par un jeu d'oligonucléotides répartis le long de sa séquence codante ; la viabilité de cette approche a été démontrée [7],[8]. Bénéficiant de l'impressionnant potentiel de miniaturisation de la technique, on arrive aujourd'hui⁷ à produire des puces portant des millions d'éléments et pouvant ainsi mesurer le niveau d'expression de milliers de gènes.

Limites Le premier point est celui de la sensibilité et de la quantité d'échantillon nécessaire pour préparer une cible complexe. Ces deux paramètres sont interdépendants : la détection est d'autant plus forte (en termes de détection d'espèces rares) que la concentration de cible est élevée, puisque les signaux lui sont proportionnels (c'est même le principe de la mesure). Et les quantités mises en jeu à ce niveau sont comparables pour les trois méthodes, de l'ordre du microgramme d'ARNm. Quantité élevée, qui limite par exemple, une analyse à partir d'une biopsie ou de quelques dizaines de milliers de cellules obtenues par tri cellulaire, et qu'il est urgent de réduire. Regardons de plus près ce résultat à première vue paradoxal, puisque les concentrations de la cible diffèrent considérablement, les volumes d'hybridation se comptant en millilitres d'un côté (*macroarrays*), en microlitres de l'autre (*microarrays, oligochips*). Un calcul à partir des données publiées [7][9][10] montre pourtant que le seuil de détection⁸ est du même ordre, soit quelques dizaines de millions. Cela découle d'une quantité de sondes fixées beaucoup plus importante sur Nylon que sur lame de verre⁹, et d'une meilleure sensibilité intrinsèque de la détection radioactive. De plus, l'agitation du milieu d'hybridation dans lequel baigne la membrane évite tout épuisement local de la sonde, contrairement à ce qui se passe pour les *microarrays* souvent hybridés sous une lamelle de microscope avec un volume total d'une dizaine de microlitres. Naturellement, l'amplification de la sonde [7][8] recule cette limite.

Venons-en maintenant à la validation des mesures. Il ne suffit pas de collecter des dizaines de milliers de niveaux d'expression. Il convient aussi de garantir la validité des chiffres obtenus, l'absence de divers artefacts qui peuvent les affecter, et de connaître les limites de confiance des différentiels observés. On a longtemps estimé que, dans des expériences bien conduites, une variation d'un facteur deux pour le niveau d'expression d'un gène donné est significative. Cette valeur est maintenant plus faible lorsque l'on associe un calcul statistique rigoureux à l'analyse des résultats.

Reste enfin l'interprétation détaillée des résultats. La masse d'informations résultant de ces expériences est considérable : le niveau d'expression de milliers de gènes est mesuré dans plusieurs tissus et/ou sous diverses conditions. Examiner ces données, les appréhender, les comprendre, n'est pas trivial. De nombreux développements sont encore nécessaires au niveau des logiciels d'analyse et de représentation, afin d'extraire des données d'expression sous forme de valeurs numériques rattachées à une entité génique - et aussi de les rendre disponibles à la communauté des biologistes.

⁷Les méthodes de fabrication (Cf. chapitre 1.4) des *oligo-chips* suivent de près celles de l'industrie des microprocesseurs dont on connaît les prodiges récents en termes de miniaturisation.

⁸le nombre minimum de molécules d'une espèce spécifique présent dans la cible afin d'obtenir un signal détectable.

⁹le signal observé est proportionnel non seulement à la concentration de la sonde, mais aussi à la quantité de cible : la probabilité d'hybridation pour chaque molécule de cible est indépendante du nombre de ces molécules donc les signaux s'ajoutent à la seule condition que les interactions entre ces molécules soient négligeables, ce qui est le cas sur support Nylon où les molécules d'ADN occupent moins de 1 % du volume du dépôt.

1.3 Etapes de fabrication d'une biopuce

On a vu qu'une biopuce peut être comparée à une usine miniature qui permet d'analyser simultanément des milliers de fragments d'ADN ou de protéines. Aujourd'hui les technologies qu'elles mettent en oeuvre se diversifient mais, schématiquement, les étapes sont les suivantes :

- la préparation des sondes,
- la construction de la puce (qui concerne essentiellement les travaux de cette thèse),
- la préparation de l'échantillon à analyser,
- sa réaction sur la puce (hybridation pour l'ADN), et
- la détection et le traitement des signaux obtenus.

La fixation covalente de sondes moléculaires sur un support solide est déjà largement utilisée, notamment pour la conception de nombreux tests de diagnostic fondés sur la technique de Dot-blot inverse¹⁰ (voir figure 1.4). Cependant, les supports utilisés pour ces tests, les microplaques de titration à 96 puits, ont une capacité de fixation des sondes très restreinte et sont, à cause des importantes quantités de réactifs consommées, d'une mise en oeuvre coûteuse. Leur utilisation pour des analyses mettant en jeu des dizaines voire des centaines de milliers de sondes différentes n'est donc pas envisageable.

En réalité, c'est le développement de méthodes de dépôt des sondes en des sites précisément définis, à forte capacité, qui a permis, par la miniaturisation de la technique Dot-blot inverse, l'émergence du concept des biopuces. Il existe aujourd'hui de nombreux types de biopuces différant par la nature des supports utilisés, le type de sonde, le mode de lecture des hybridations et la méthode d'adressage.

Cette section décrit à la fois les différents supports utilisés, les méthodes de détection, mais ne détaille pas les méthodes de fixation des sondes, qui seront l'objet du paragraphe suivant.

1.3.1 Supports

Dans les années 80, les analyses traditionnelles basées sur l'hybridation utilisaient des membranes flexibles en nitrocellulose ou en nylon, et la détection par la radioactivité et l'autoradiographie. Les microarrays utilisent, pour ces mêmes analyses, des surfaces solides avec une détection et un marquage par fluorescence.

Ainsi, les supports se présentent sous la forme de surfaces planes ou poreuses (percées de puits) composées de différents matériaux. Le choix d'un support est conditionné par ses propriétés physico-chimiques, ou plus précisément, par l'adéquation de celles-ci avec les conditions dans lesquelles le support va être placé lors de la synthèse (ou de la fixation) des sondes et lors de l'utilisation de la puce. Il est donc nécessaire, avant d'envisager l'emploi d'un support particulier [11], de considérer les caractéristiques telles que la stabilité au pH, la résistance physique, la réactivité et la stabilité chimique ainsi que la capacité à fixer non spécifiquement les acides nucléiques. Un des avantages des surfaces solides, est la possibilité de déposer des petits volumes de produits biologiques à un endroit très bien défini alors que les substrats poreux tel que le nylon ou la nitrocellulose provoquent une diffusion du produit déposé, phénomène incompatible avec les microarrays. De plus, un support non-poreux ne permet pas l'absorption des produits et réactifs par le support lui-même. Ceci permet notamment de pouvoir enlever rapidement des petites quantités de produit, rendant les concentrations en produits plus importantes et une dynamique d'hybridation très rapide. Un autre avantage est l'uniformité de l'attache sur une surface non-poreuse, améliorant ainsi la qualité des composants du microarray. La planéité du format des microarrays permet une véritable analyse en parallèle. Ce type

¹⁰Le Dot-Blot est une technique d'hybridation entre un acide nucléique fixé sur un filtre et une sonde libre. Le Dot-Blot inverse est évidemment fondé sur le schéma inverse, l'acide nucléique est « libre » et la sonde fixée.

d'analyse amène une amélioration significative en termes de précision des données. Pour toutes ces raisons, des matériaux comme le verre, le silicium, les polymères sont couramment utilisés. Leur surface est, dans une première étape dénommée « fonctionnalisation », rendue réactive vis-à-vis des groupements qu'on souhaite y fixer. Après la fonctionnalisation, des molécules dites espaçantes peuvent être greffées sur la surface activée. Utilisées comme intermédiaires entre la surface et la sonde, ces molécules de taille variable, permettent un affranchissement vis-à-vis des propriétés de surface des supports, lesquelles s'avèrent souvent gênantes pour la synthèse (ou la fixation) des sondes et pour l'hybridation. La plate-forme transcriptome du Génopôle de Toulouse a notamment emprunté cette voie en fabricant des dendrilames [12, 13] : des dendrimères sont greffés sur des lames de verre améliorant ainsi l'espacement entre les sondes déposées et le support et facilitant la réaction d'interaction des cibles avec les sondes.

On remarquera que tous ces supports peuvent être classés en deux catégories :

- les supports dits neutres, qui ne joueront pas d'autre rôle que celui de permettre une fixation optimale des sondes, avec une densité plus ou moins importante ;
- les supports dits actifs, qui posséderont les mêmes caractéristiques que les supports neutres, mais qui interviendront en plus dans la transduction du signal.

Comme les supports neutres, les supports actifs vont permettre la fixation des sondes sur le support (voire même leur synthèse directe) ainsi que l'hybridation des séquences cibles. Ils ne facilitent pas seulement la transduction par leurs propriétés physiques telles que la transparence du verre pour la détection par fluorescence, mais jouent un rôle de vecteur de signal.

1.3.1.1 Chimie de greffage

Les réactions chimiques mises en jeu lors de l'étape de greffage dépendent du type de matériau utilisé (métal ou silicium ou matériaux dérivés) et du mode de greffage considéré (covalent ou affiné). Quelle que soit la surface de dépôt, il est très rare qu'il n'y ait pas un traitement de surface. En général, une couche d'interface est utilisée avant l'interaction biospécifique. Il s'agit le plus souvent d'une monocouche obtenue par auto-assemblage¹¹ de molécules organiques ou inorganiques. Cette couche joue trois rôles essentiels :

- Elle permet de modifier directement les propriétés physico-chimiques et biochimiques d'une surface grâce à la structure moléculaire des chaînes polymères organiques ou inorganiques constituant la couche et des groupements fonctionnels à leur extrémité (hydrophobicité, hydrophilie, ...). En particulier, les propriétés de mouillabilité¹² d'une surface ou encore les propriétés d'une interface à interagir spécifiquement avec certaines molécules peuvent être modulées pour des applications très ciblées.
- Elle joue également le rôle d'espaceur entre la surface et la biomolécule. Ceci permet de s'affranchir d'effets ou d'interactions parasites de la surface en plaçant le site actif de la biomolécule où s'effectuera la reconnaissance biospécifique à une distance suffisamment importante (de l'ordre de plusieurs nanomètres) de la couche d'accroche (or ou oxyde de silicium).
- Elle permet, le cas échéant, de démultiplier le nombre de sites de greffage et ainsi d'augmenter la sensibilité de la détection.

1.3.1.2 Les différents types de supports

Les plaques de microtitration Classiquement, les puits des plaques de microtitration sont carboxylés (oxydation par un agent physique ou chimique), et l'ADN qui va servir de sonde est

¹¹SAM : Self Assembled Monolayer.

¹²La mouillabilité est la faculté pour une substance solide de recevoir un liquide en lui permettant de s'étaler sur la surface la plus grande possible.

aminé. Ainsi, l'ADN peut se fixer au fond des puits de façon covalente grâce à l'établissement d'une liaison covalente par un agent couplant. Malgré les avantages de cette technique (facilité de mise en oeuvre, faible coût, accessibilité de la sonde, ...), le problème principal pour des analyses nécessitant un grand nombre de sondes différentes reste leur faible capacité ainsi que la nécessité de quantités importantes de réactifs, excluant par là même une application industrielle.

Cependant, le schéma d'arrangement en matrice de la plaque, avec sur une aire précise, un type précis et défini, reste l'idée de base pour un adressage localisé sur la surface du support.

Le verre Support devenu classique de la synthèse chimique en phase solide, ce matériau peu onéreux présente plusieurs caractéristiques avantageuses : il est inerte, non polaire et mécaniquement stable [14]. De plus, sa transparence naturelle facilite la lecture en fluorescence des empreintes d'hybridation. Le procédé de synthèse *in situ* (Cf. paragraphe correspondant 1.4.1) mis au point par Affymetrix [15] utilise une surface de verre activée par silanisation. Ce dernier possède un groupement fonctionnel amine ou hydroxyle avec lequel peut réagir un nucléotide modifié. Le Genosensor Consortium, association de compagnies américaines publiques et privées [16], utilise des lames de verre portant des puits espacés de 3 mm : ce support est activé à l'epoxysilane. Une autre équipe, celle de DeRisi et Coll, utilise un protocole où la surface d'une lame de microscope est rendue adhésive par un traitement à la poly-L-lysine. Les sondes sont ensuite déposées au moyen d'un robot et fixées par une exposition aux ultraviolets.

Les polymères L'équipe d'Andrei Mirzabekov, Argonne, Illinois, a développé une puce (appelée les MAGiChip, pour MicroArrays of Gel Immobilized Compounds on a Chip)[17] constituée de carrés de polyacrylamides polymérisés sur une surface de verre silanisée. La technologie mise en oeuvre permet la fixation de 20000 à 40000 éléments de gel sur une surface de 1 cm². Le gel de polyacrylamide est rendu réactif par un traitement à l'hydrate d'hydrazine. De leur côté, les sondes oligonucléotidiques sont fonctionnalisées par une oxydation aboutissant à la formation d'un dialdéhyde capable de réagir avec les groupes hydrazides du gel. Point important, la fixation des sondes ne s'effectue pas sur une surface, mais à l'intérieur d'un volume de gel. En conséquence, leur densité est beaucoup plus importante. Revers de la médaille, le gel restreint la diffusion des molécules cibles. Le polypropylène est un matériau dont la structure ne met en jeu que des liaisons carbone-carbone ou carbone-hydrogène. Considéré comme chimiquement inerte, ce polymère présente peu d'affinité pour les acides nucléiques. L'équipe de Robert S. Matson (Beckman Instruments, Fullerton, Californie [18]) a réalisé grâce à un synthétiseur d'oligonucléotides, la synthèse *in situ* de 17 mers sur des surfaces de polypropylène aminé en 1994. Les molécules sont, dans le cas présent, fixées sans utilisation de groupement espaçant. Les chercheurs de la société CIS Biointernational (Grenoble), aujourd'hui APIBIO, ont développé un procédé de synthèse électrochimique d'un autre polymère, le polypyrrole, à la surface d'électrodes d'or déposées sur un support de silicium.

Autres supports Différents types de métaux, notamment l'or et le platine, sont utilisés par la société Nanogen et le Genosensor Consortium lequel a développé un protocole de fixation d'oligonucléotides sur microélectrodes d'or. La puce constituée est composée de 36 microélectrodes interconnectées. Les hybridations sont repérées par l'interrogation de chaque électrode selon un mode proche de l'interrogation des mémoires des semi-conducteurs [16] (voir section 1.3.3.4). L'or est utilisé pour la capacité de molécules telles que les thioethers, à s'organiser de façon géométrique à sa surface, tout en formant une monocouche protectrice vis-à-vis d'agents chimiques corrosifs. Ces molécules peuvent aisément être greffées aux extrémités d'oligonucléotides et les présenter ainsi de manière ordonnée. De plus, l'or est un métal conducteur inoxydable

et peut intervenir dans un mode de transduction électrochimique, voire même optique, lorsque la couche d'or est ramenée à quelques centaines d'Å.

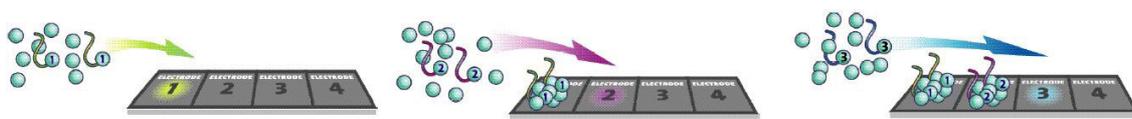


Fig. 1.2 : Adressage électrochimique

En France, la société CIS bio International, en collaboration avec le Léli et le CEA à Grenoble, a choisi cette approche d'adressage électrochimique qui est un complément de la chimie de greffage. La puce est composée d'un support en silicium recouvert à chaque plot d'une miniélectrode en or. Chaque puce peut contenir un multiple d'un module de base formé de 128 plots. Le dépôt des sondes repose sur une réaction électrochimique. C'est la mise sous tension sélective de l'électrode correspondante qui permet l'adressage de chaque sonde sur son plot par copolymérisation [19]. Les sondes se fixent ainsi au fur et à mesure sur leur site spécifique. Ce travail est réalisé par un robot. Le principe est illustré sur la figure 1.2. Cette approche a permis au laboratoire du Léli du commissariat à l'énergie atomique de fabriquer deux types de puces montées sur des supports de silicium : la première contient 48 microélectrodes de $50 \mu\text{m}$ de côté sur un support de 4 cm^2 ; quant à la seconde, de dimensions beaucoup plus réduites, 10 mm^2 , elle porte 128 microélectrodes. Une puce de dernière génération contient 8100 plots.

1.3.2 Les techniques de dépôt des sondes

Le support doit donc recevoir des sondes, des échantillons d'ADN ou de protéines. Si le support reste capital dans le processus de fabrication, le dépôt des sondes sur celui-ci l'est tout autant. Car il faut non seulement que les sondes tiennent sur le support mais il faut qu'elles soient correctement positionnées afin de pouvoir traiter et analyser correctement les résultats. Si les trois aspects, support, dépôt de sondes et détection, sont nécessaires pour fabriquer une biopuce, nos travaux concernent seulement la technique de dépôt des sondes par contact direct, les deux autres principales techniques étant la photolithographie et des systèmes de type « jet d'encre ». C'est pourquoi la section 1.4 qui va suivre, décrit en détails toutes ces techniques et commencera à faire apparaître les avantages et les inconvénients de chacune.

1.3.3 Détection et analyse

Après la réaction d'interaction, une étape de lecture de la puce permet de repérer les sondes ayant réagi avec l'échantillon test. Ce repérage des hybridations effectives est en quelque sorte une prise d'« empreintes » qui sera traitée par un système informatique. Elle résulte de la mesure des signaux émis par les cibles marquées, au moyen de molécules fluorescentes ou radioactives dans la plupart des cas¹³, appariées avec les sondes. D'autres méthodes de détection faisant appel à la luminescence, à la résonance plasmonique de surface ou à des phénomènes électroniques sont aussi envisageables (Cf. section 1.3.3.4).

La lecture est une étape clé. En effet, sa précision conditionne de façon majeure la qualité des données traitées par le système informatique et donc la précision des interprétations.

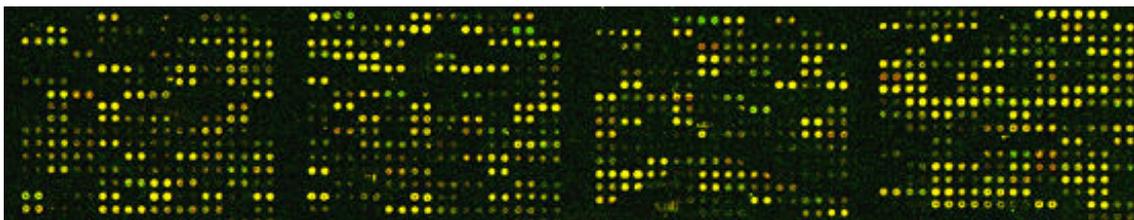


Fig. 1.3 : Visualisation par fluorescence

1.3.3.1 La mesure des signaux fluorescents

L'utilisation de molécules fluorescentes (cyanine, fluorescéine, ...) constitue la méthode de marquage la plus courante. Ses avantages sont nombreux. Elle permet une révélation directe ou indirecte de l'hybridation et autorise l'utilisation de différents fluorochromes. Des mesures en temps réel avec une résolution importante peuvent être effectuées (mais cela reste rarement utilisé par les puces à ADN ou à protéines). Affymetrix a proposé un appareil ou *scanner* conçu pour lire ses puces GeneChipTM. Il permet de détecter les hybridations par un balayage de la surface de la puce en microscopie confocale [20]. Après hybridation et lavage, la puce est placée en position retournée dans la cellule de lecture du *scanner*. Les fluorochromes sont alors excités par un laser à argon, l'émission de fluorescence est captée par l'objectif du microscope et traverse une série de filtres jusqu'à un tube photomultiplicateur. Le balayage de l'ensemble de la surface est effectué de manière à collecter le maximum d'informations (de pixels) par site de synthèse. La résolution¹⁴ ne cesse de s'améliorer, partant d'environ 50 μm pour arriver aujourd'hui au micron. Ce progrès accompagné de l'évolution du procédé de lithographie, permet la constitution de puces à très haute densité. L'équipe de Pat Brown à Stanford (CA, USA) a publié également plusieurs articles très convaincants sur un tel système de balayage laser ([10], [21], [22], [23]) et donne sur son site¹⁵ des renseignements détaillés. L'approche a été également employée par plusieurs groupes industriels, notamment *Synteni* (entreprise fondée par un collaborateur de Pat Brown), et un système complet a été commercialisé par *Molecular Dynamics* (200 kEuros).

D'autres méthodes de détection des signaux fluorescents ont été testées : le couplage d'un microscope en épifluorescence et d'une caméra CCD [17], l'utilisation d'un système de collecte à fibre optique [15], qui permettent de diminuer notablement les temps de lecture mais s'avèrent moins résolutifs. Une autre utilisation des fibres optiques consiste à greffer des sondes directement sur celles-ci [24] et à connecter le capteur ainsi formé à un système d'imagerie approprié. Après hybridation, les informations sont accessibles soit directement par illumination, soit par repérage des différents marquages que l'on peut effectuer. La résolution est de 1 sonde par pixel et la lecture d'empreinte d'hybridation est réalisée en une seconde.

1.3.3.2 L'utilisation du radiomarquage

La détection de l'hybridation peut être également réalisée en exploitant le radiomarquage. La méthode classique consiste à effectuer une rétrotranscription de l'ARN cible, en incorporant un nucléotide marqué au ³²P ou au ³³P. Après hybridation et lavage, l'empreinte d'hybridation est saisie par autoradiographie ou au moyen d'un écran accumulateur de phosphore. Le Phosphorimager (commercialisé par Molecular Dynamics), permet la digitalisation de l'empreinte

¹³90 % des puces utilisent la fluorescence, 5 % la radioactivité. Ainsi, nos travaux utiliseront la détection classique par fluorescence.

¹⁴Distance minimale séparant deux points perceptibles.

¹⁵<http://cmgm.Stanford.EDU/pbrown/>

d'hybridation. Le radiomarquage permet de réaliser des mesures d'une grande sensibilité. Il souffrait d'une définition beaucoup trop faible, environ $300 \mu\text{m}$ [25] mais les derniers appareils peuvent atteindre une résolution de $5 \mu\text{m}$ par pixel. Reste le problème de chevauchement des spots dû aux émissions du phosphore.

1.3.3.3 Autres types de détection

D'autres types de détection, moins utilisés, existent également.

La détection enzymatique d'hybridation sur puce est dérivée du système de révélation utilisé dans certaines techniques de dot-blot inverse (Cf. schéma 1.4). Dans ces techniques, l'ADN cible est fixé sur une membrane et les sondes sont biotinylées. La détection est réalisée par ajout d'un complexe streptavidine-HRP (HorseRadish peroxidase ou Peroxydase de Raifort), l'enzyme permettant l'oxydation d'un chromogène. La mesure du signal est réalisée par colorimétrie.

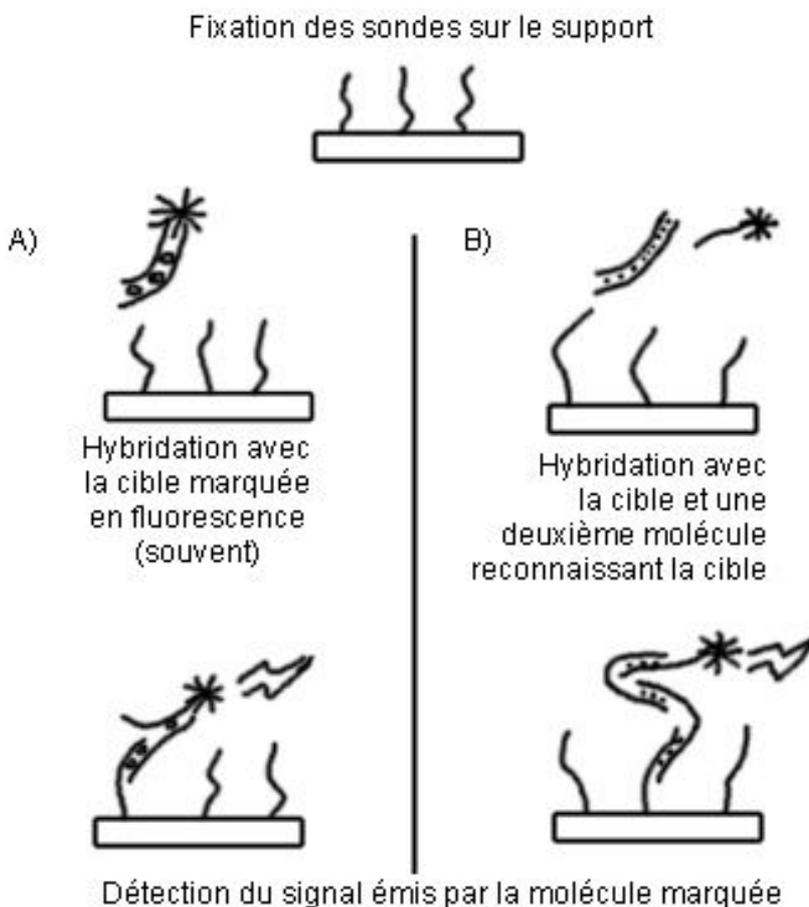


Fig. 1.4 : Principe des techniques de dot-blot inverse (A), et d'hybridation sandwich (B).

Différentes méthodes basées sur l'utilisation de la phosphatase alcaline peuvent servir de base dans le développement d'un système de détection. Le point limitant l'utilisation de ce type de procédé est la nécessité de compartimenter physiquement les sites contenant les différentes sondes de façon à empêcher la diffusion du produit issu de la révélation enzymatique.

La détection électrochimique est utilisée pour les sondes fixées sur des électrodes de carbone. Elle utilise la propriété de certaines molécules à se réduire spontanément au contact d'un duplex d'acide nucléique. Ainsi, cette molécule libératrice libère un électron en s'intercalant

entre les deux molécules du duplex. Les molécules les plus utilisées sont des complexes métalliques cationiques à activité Rédox. La mesure des signaux d'hybridation requiert une électrode annexe en platine ainsi qu'une électrode de référence (Ag/AgCl) en plus de l'électrode de carbone. La mesure réalisée est une variation de différence de potentiel sur une durée donnée. Le rapport ainsi obtenu est proportionnel à la quantité d'ADN hybridé. Outre sa sensibilité, ce système offre l'avantage d'être facilement transportable, ce qui pourra se révéler intéressant pour les études de terrain.

1.3.3.4 Vers une détection électronique

Se démarquant des méthodes classiques de détection de l'hybridation, une approche devrait donner à terme à une puce à ADN plus qu'une simple connotation électronique tout en rendant inutile l'étape de marquage des cibles. En effet, l'hybridation de deux molécules d'acides nucléiques s'accompagne de variation de propriétés physiques qu'il est possible de quantifier dans certaines conditions.

Lorsqu'une structure, constituée d'un semi-conducteur (Si) et recouverte d'un diélectrique (SiO₂) où sont fixées des sondes, est placée dans des conditions de polarisation adéquates, un courant, sensible aux modifications de charges du semi-conducteur, circule normalement de la source vers le drain. Or, l'hybridation des sondes entraîne une modification de la densité de charges du semi-conducteur à l'interface Si/SiO₂. Une mesure de la variation de la tension, établie entre la grille et la source afin de maintenir constante la valeur du courant, permet donc de repérer les associations spécifiques entre sondes et acides nucléiques cibles. Ce système a été mis au point à l'École centrale de Lyon et se dénomme GENFET (GEN Field Effect Transistor).

De leur côté, les chercheurs du GenoSensor Consortium et la société Beckman Instruments s'intéressent pour le développement de leur puce électronique, ou Permittivity ChipsTM, à la dispersion diélectrique due aux charges négatives des groupements phosphates constitutifs du squelette sucre-phosphate des acides nucléiques¹⁶. Ce phénomène, dépendant de la longueur de la molécule d'ADN, peut être quantifié par la fréquence de relaxation de la molécule. Cette grandeur varie, en effet, d'un facteur 100 lorsque la taille de l'ADN varie d'un facteur 10. C'est, par exemple, le cas lorsqu'un fragment simple brin de 100 bases s'hybride avec une sonde 10 mers. En pratique, un analyseur d'impédance permet de mesurer l'énergie absorbée par les sondes : celle-ci prenant une valeur maximale différente -respectivement 5 et 10 MHz - selon qu'elles sont hybridées ou non, il est possible de répéter électroniquement les hybridations.

Enfin, au LAAS, des membranes et des leviers piézoélectriques ont été développés et caractérisés, par des modes de fonctionnement ou des fréquences de résonance. Ainsi une hybridation, perturbant les contraintes en surface de ces capteurs, perturbe les modes de fonctionnement permettant de détecter ces hybridations.

Il faut noter que ces travaux concernent la partie détection et ne sont pas traités dans cette thèse. Ils sont donnés ici à titre d'indications sur les techniques émergeant aujourd'hui et concernant les biopuces.

Lors des travaux réalisés et présentés dans cette thèse, et qui portent sur la partie dépôt des oligonucléotides et des protéines (voir la section suivante), nous sommes restés à un marquage classique en fluorescence, utilisant à la fois un ScanArrayerTM ou une optique avec microscope et des filtres excitant la puce à certaines longueurs d'onde bien déterminées, afin de visualiser le marqueur fluorescent utilisé. Nous avons pu bénéficier de deux ScanArrayersTM différents, le Genepix et le BioAnalyzer, possédant deux résolutions différentes, qui seront décrits en détail ultérieurement.

¹⁶Cf. annexe A pour la structure des acides nucléiques.

1.4 Fixation des sondes

N'oublions pas qu'une puce est constituée par une multitude de sondes moléculaires, précisément organisées sur un support solide dont la surface est miniaturisée. Elle est au centre d'un système où d'autres éléments (systèmes d'imagerie, microordinateur, ...) permettent la saisie et l'interprétation d'une empreinte d'hybridation.

L'adressage est défini comme la capacité à fixer de façon précise une molécule sur un site prédéfini.

Il existe différentes approches pour constituer des biopuces et fixer les sondes¹⁷ : les molécules sont soit pré-synthétisées et ensuite fixées sur le support, soit synthétisées directement sur le support (synthèse *in situ*), ce dernier cas n'étant valable que pour les puces à ADN (oligonucléotides).

Le choix de l'une de ces approches est conditionné par le type d'utilisation qui sera fait de la puce. Ainsi, lorsqu'il n'est pas nécessaire de disposer d'une grande diversité ni d'une grande densité de sondes, il est possible de fabriquer manuellement au laboratoire des puces à moindre coût. Cependant, le développement de véritables outils d'analyse à grande capacité passe par la mise au point de protocoles beaucoup plus complexes et partiellement automatisés.

1.4.1 La synthèse *in situ*

La construction des sondes *in situ* repose sur l'utilisation d'un synthétiseur automatique d'oligonucléotides couplé à la surface de la puce. La synthèse des sondes peut être schématiquement décrite comme la condensation d'unités nucléotidiques protégées. Cette réaction de condensation fait le plus souvent appel à des méthodes chimiques fondées sur l'utilisation du phosphite-phosphoramidite. La pureté des molécules issues de ces synthèses est un facteur clé. En effet, la qualité des résultats obtenus lors de l'utilisation d'une biopuce est conditionnée par la correspondance exacte qui doit exister entre la séquence que l'on souhaite fixer en un site et la séquence effectivement fixée. On distingue cependant deux types de puces réalisées par cette technique : les puces à faible densité de sondes et celles à haute densité.

1.4.1.1 Puces à haute densité

Responsable de la miniaturisation des composants électroniques (semi-conducteur), cette technique, développée par Affymetrix et basée sur la méthode VLSIPS & trade (Very Large Scale Immobilised Polymer Synthesis) développée par Fodor en 1991, permet, en revanche, une précision extrême dans la fabrication des bio-puces. L'idée centrale est la synthèse combinatoire dirigée par la lumière, de formes variées de polymères sur une surface (voir figure 1.5).

Après avoir déposé un substrat photosensible sur le verre afin d'activer la surface, on éclaire à travers un masque la puce vierge avec de la lumière ultraviolette. Les zones où l'on souhaite déposer un nucléotide spécifique (par exemple de l'adénine) sont transparentes, les autres restant opaques à la lumière. Les zones éclairées de la puce sont activées et prêtes à recevoir les nucléotides car l'illumination conduit à la déprotection des groupes amines exposés qui sont alors activés pour le couplage au premier nucléoside modifié. La fixation des molécules sur la puce se fait au moyen d'un groupement photolabile (décroché par la lumière), que chacune d'elles porte à son extrémité [7][26]. L'utilisation de masques de formes différentes permet la construction d'oligonucléotides de tailles et de séquences souhaitées en des sites parfaitement définis.

Un grand degré de miniaturisation est possible car la densité de la synthèse n'a qu'une limitation physique quant à l'accessibilité spatiale, ici en l'occurrence la diffraction de la lumière.

¹⁷Il y a donc un abus de langage en plaçant la synthèse *in situ* dans un paragraphe sur la fixation des sondes, vu que dans ce cas, les sondes sont formées base par base.

Avec les masques couramment utilisés par Affymetrix, les dimensions des sites de synthèse peuvent être facilement de $50\ \mu\text{m}$ par $50\ \mu\text{m}$.

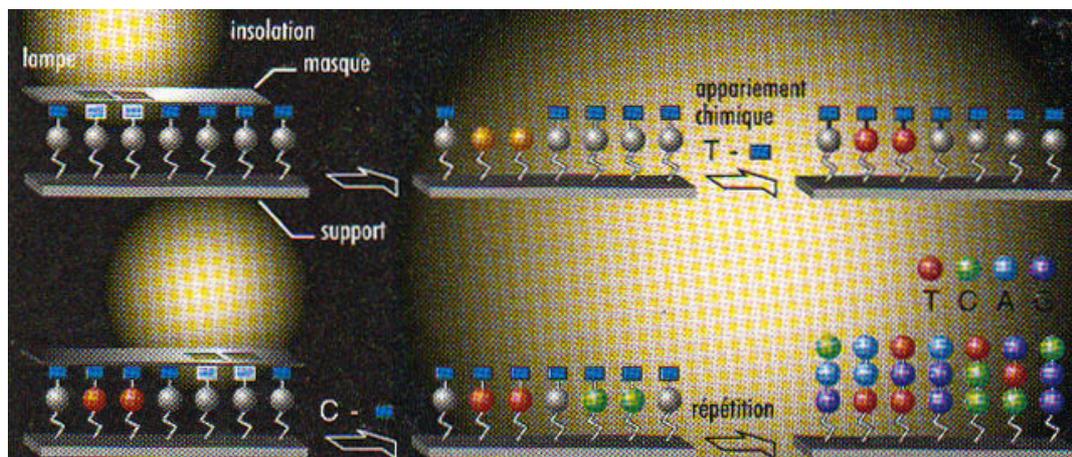


Fig. 1.5 : Principe de la photolithogravure

Cette méthode est pour le moment très onéreuse. De plus, il est à noter que l'efficacité de synthèse avoisine 92-94 % à chaque étape de couplage, ce qui peut engendrer un bruit de fond d'autant plus important que l'oligonucléotide à synthétiser est long et des erreurs de séquence, ce qui est très problématique pour les puces oligochips et la production de mésappariement, *mismatch*. Ensuite, l'empilement d'une base de plus sur toutes les sondes nécessite donc quatre passages, au cours desquels on module la forme du masque. Avec ce procédé, les sondes peuvent comporter jusqu'à 30 bases. Cette longueur dépend de la fiabilité de la méthode. Le rendement effectif de la réaction de synthèse est en effet de l'ordre de 95 %¹⁸. Au-delà de 30 bases, le risque d'erreur dans la composition des sondes n'assure plus à la puce une fiabilité suffisante. Affymetrix compense ce handicap par une miniaturisation supérieure à celle de ses concurrents, qui lui permet de fixer davantage de sondes plus courtes sur une même surface (en moyenne 20 bases).

Enfin, les biopuces produites par ce procédé ne permettent l'hybridation que d'un seul échantillon marqué à la fois dans la mesure où la méthode de détection ne permet pas de faire un mélange de deux marqueurs comme avec les autres puces.

1.4.1.2 Puces à faible et moyenne densité de sondes

La méthode développée par Southern et son équipe [27] est basée sur l'utilisation d'un synthétiseur d'oligonucléotides (ABI 381A, Applied Biosystem, Foster City, CA) connecté à une cellule de Téflon où se déroule la réaction ; cette cellule est couplée au support, ici du verre recouvert d'un dérivé d'hexaéthylène glycol. Ce système est un système semi-automatique : l'ABI 381A délivre les réactifs automatiquement pendant chaque phase de couplage, mais la lame est déplacée manuellement.

Selon un protocole assez proche, Weiler et al [28] a synthétisé 64 oligonucléotides sur une membrane de polypropylène. Cette synthèse fait appel à une chimie phosphoramidite modifiée, permettant à la fois d'utiliser les oligonucléotides comme substrat d'hybridation, mais possède l'avantage de pouvoir ensuite détacher les oligonucléotides de la membrane (ce qui permet éventuellement une analyse ultérieure des duplex, par exemple par PCR). Ces méthodes ne permettent pas la synthèse de puces à grandes capacités.

¹⁸Ce qui signifie que 5 % des sondes ne restent pas accrochées correctement.

1.4.1.3 Problématique

Comme pour les microprocesseurs, les puces par photolithogravure sont fabriquées en parallèle par centaines. L'avantage majeur de cette approche est que le nombre d'oligonucléotides qu'il est possible de synthétiser en même temps sur la puce est considérable. Les puces actuellement commercialisées par Affymetrix en ont près de 100 000 et les dernières, expérimentales, en possèdent plus d'un million. L'inconvénient est que, si les opérations de déprotection et de couplage ne sont pas parfaites, il y a création d'oligonucléotides n'ayant pas la bonne séquence ou d'oligonucléotides branchés qui introduiront du bruit de fond lors de l'utilisation. Il semble cependant que ce problème soit maintenant bien maîtrisé. Un autre inconvénient de cette approche est que la longueur des ADN qu'il est ainsi possible de synthétiser est faible. Ainsi, le problème majeur de la synthèse *in situ* reste son incapacité à analyser et à corriger les éventuelles erreurs introduites lors de la synthèse *in situ* de la surface.

Mais la solution de la synthèse *in situ*, de par son principe, ne peut pas actuellement être améliorée en terme de coût ou de rapidité, au niveau réalisation et analyse de la puce. Notre but étant de permettre d'obtenir un outil plus évolué que ceux disponibles actuellement et à un coût moindre¹⁹, il ne nous est pas apparu comme un domaine sur lequel nous devions lancer notre recherche.

En plus des inconvénients cités précédemment, cela reste une solution peu pratique en ce sens qu'il faut tout renouveler (masques, etc...) lorsque l'on souhaite réaliser une biopuce différente. Enfin, si les sondes à réaliser sont longues (en termes de nombre de bases les constituant), cette solution devient également obsolète et inadaptée.

1.4.2 Techniques jet d'encre, systèmes « fermés »

Une bonne précision au niveau des sites de fixation peut être obtenue en détournant l'utilisation des têtes à jet d'encre des imprimantes. Le principe est le suivant : une tête d'impression contient plusieurs solutions de fragments d'ADN, qu'elle dépose ensuite avec une grande précision sur le support²⁰.

Ces systèmes sont fermés dans le sens où le liquide n'est pas en contact avec l'air, permettant ainsi de limiter tout problème d'évaporation. Ils incluent tout un système de microvalves, de micropompes et de canaux afin d'acheminer les produits et d'effectuer les dépôts.

Pendant il existe différentes techniques utilisant ce genre de procédé, appelé jet d'encre.

1.4.2.1 Utilisation d'un phénomène piezoélectrique

C'est durant les années 70 qu'IBM s'est lancé dans un programme massif de développement afin d'adapter la technologie jet d'encre en continu à ses ordinateurs. En effet, au début des années 60, Sweet, de l'université de Stanford, avait démontré qu'en appliquant une « onde de pression », le jet d'encre se cassait en gouttes de forme et d'espacement uniformes [29]. Vers la fin des années 1970, les premiers systèmes de « gouttes-sur-demande », *drop-on-demand*, apparaissent. Ce sont des systèmes qui n'éjectent les gouttes que lorsqu'elles sont utilisées pour imager quelque chose. Beaucoup de ces systèmes seront produits et commercialisés en 1970 et 1980 tels le Siemens PT-80, imprimante de caractères en série [30]. Dans ces imprimantes, sur chaque impulsion de tension, une goutte d'encre est éjectée par une onde de pression créée par le mouvement mécanique d'actionneurs céramiques piézoélectriques.

¹⁹Ceci afin qu'un maximum d'équipes de recherche puissent s'équiper de tels dispositifs et faire avancer les recherches concernées par ces outils et notamment la recherche biomédicale, dont l'enjeu n'est plus à justifier.

²⁰Il est à noter que cette technique développée notamment par Incyte Pharmaceuticals en collaboration avec Affymetrix, permet aussi de déposer des sondes présynthétisées ou de les synthétiser *in situ*.

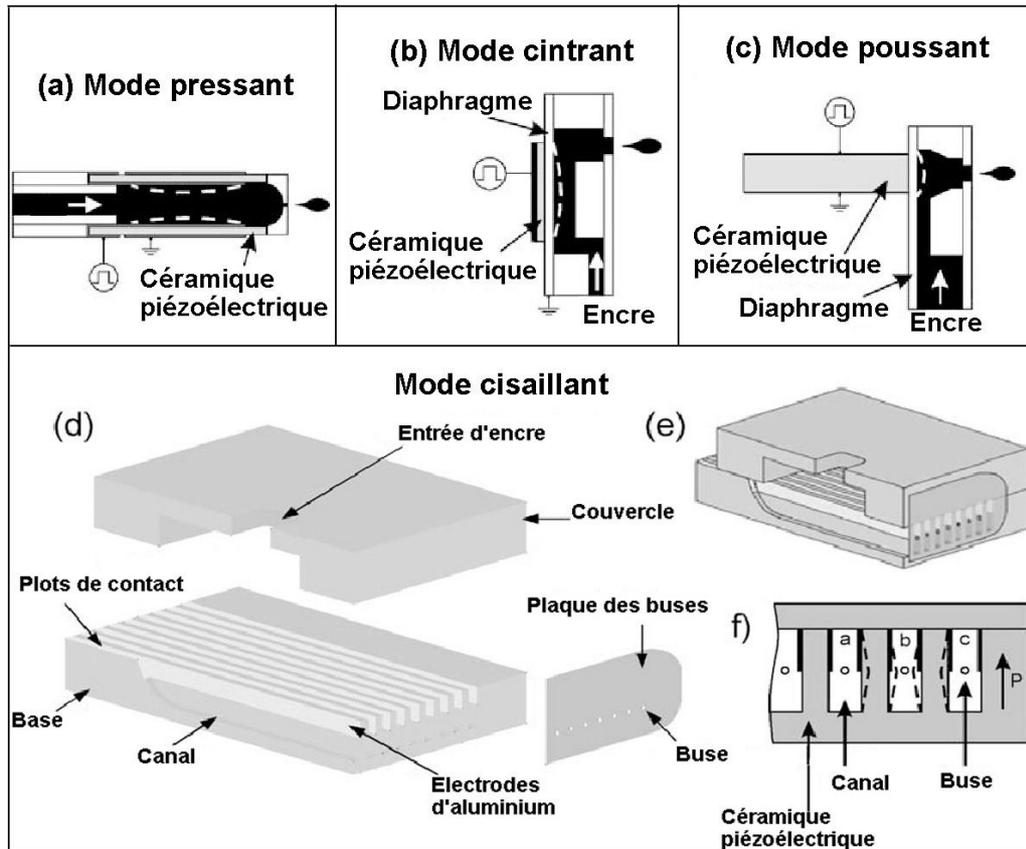


Fig. 1.6 : Technologies jet d'encre et piézoélectriques

Cette technologie dépend du mode de déformation du piézocéramique et donne ainsi quatre types de technologies : le mode pressant (*squeeze mode*), le mode cintrant (*bend mode*), le mode poussant (*push mode*) et le mode cisailant (*shear mode*). Ces modes sont schématisés sur la figure 1.6. Pour le mode pressant, des tubes céramiques radialement polarisés sont utilisés. Pour les modes poussant et cintrant, le champ électrique est généré entre les électrodes parallèlement à la polarisation du piézomatériau. Dans le mode cisailant enfin, le champ électrique doit être perpendiculaire à la polarisation des piézocéramiques.

Ainsi, on peut fabriquer des microvalves et des micropompes, basées sur ce principe et utilisant les modes de fonctionnement qui vont être décrits et qui permettront de déposer les produits souhaités [31].

Actionneur en mode pressant Cet actionneur comprend un tube équipé de céramique piézoélectrique d'environ 1 mm de diamètre. Le tube, qui est polarisé radialement, est équipé d'électrodes sur ses surfaces internes et externes. Lorsque l'on souhaite réaliser un dépôt, une impulsion est appliquée sur le transducteur, provoquant une contraction de celui-ci. La réduction soudaine du volume entraîne l'expulsion d'une petite quantité de liquide par l'orifice. Une petite quantité d'encre est aussi ramenée dans le tube par l'impulsion, mais cette quantité est négligeable de par la haute impédance acoustique créée par la longueur et le petit calibre du tube. L'impulsion électrique peut décroître relativement doucement et le transducteur peut alors revenir doucement à son volume initial. De par ce faible taux de variation de volume, la réduction de la pression est trop faible pour contrer la tension de surface à l'orifice. Ainsi, un flux de liquide remplace le liquide éjecté sans créer un appel d'air à travers l'orifice. Cet

actionneur a été implémenté dans l'imprimante Siemens PT-80.

Actionneur en mode cintrant La figure 1.6 (b) représente un actionneur utilisant ce mode de fonctionnement. Il est constitué d'une chambre de compression comprenant une arrivée d'encre et un engorgement débouchant sur un orifice. Un diaphragme conducteur forme un côté de la chambre avec une plaque de déflexion formée de céramiques piézoélectriques. La surface est couverte par un revêtement conducteur, permettant ainsi une connexion électrique. En appliquant une tension électrique à la plaque piézoélectrique, une contraction de celle-ci se produit, entraînant une flexion du diaphragme. La pressurisation dans la chambre provoque l'éjection d'une goutte par l'orifice. La taille de cette goutte dépend de la tension appliquée, de la durée de l'impulsion et du diamètre de l'orifice [32]. C'est le principe de base utilisé pour les imprimantes Tektronix Phaser 300 et 350, ainsi que les Epson Color Stylus 400, 600 et 800.

Actionneur en mode poussant Dans ce mode représenté en figure 1.6 (c), lorsque les baguettes en céramique se dilatent, elles poussent l'encre à s'éjecter par l'orifice. En théorie, les actionneurs piézoélectriques peuvent entrer en contact direct et pousser l'encre. Mais en pratique, un fin diaphragme est incorporé entre l'actionneur piézoélectrique et l'encre afin d'éviter toute interaction non désirée entre le matériel piézoélectrique et l'encre [33]. Epson, Trident et DataProducts sont des exemples d'industriels ayant implémenté avec succès ce type de systèmes.

Actionneur en mode cisailant La figure 1.6 montre la configuration en mode cisailant, par une vue interne (d et e), par une vue en coupe (f) perpendiculaire à la direction des jets. En (e), nous pouvons observer l'actionneur assemblé et en (d), les différents composants. La plaque de base contient une multitude de canaux d'encre espacés de $137 \mu m$. La largeur et profondeur des canaux sont respectivement de 75 et $360 \mu m$. Les canaux sont peu profonds près des plots de contact puis plus profonds dans la partie principale. Des électrodes métalliques sont déposées sur la moitié supérieure des murs des canaux. Chaque paire d'électrodes pour un canal, est connectée galvaniquement à la zone des plots. Le couvercle, le plus souvent en PZT pour des raisons thermiques, est collé sur la plaque de base. Il forme le toit des canaux contenant l'encre et fixe de façon rigide le sommet des murs de ceux-ci. Les canaux sont remplis par l'entrée sur le couvercle. La plaque des buses (orifices) est ensuite assemblée. Les compagnies Xaar et Spectra sont des pionniers dans le design de ces têtes d'impression.

1.4.2.2 Utilisation d'une bulle

En 1979, Canon invente une méthode où les gouttes d'encre sont éjectées de la buse par la croissance et la formation d'une bulle de vapeur d'eau sur la surface localisée à proximité de la buse [34]. C'est ce que l'on appelle : *Bubble jet*. Hewlett-Packard développa également une technologie basée sur le *bubble jet* appelé ThinkJet pour thermal inkjet [35].

Cette technologie est proche de la précédente. Elle diffère simplement par le fait qu'au lieu qu'une déformation d'un matériel ait lieu par un phénomène piézoélectrique, c'est une résistance chauffante qui activée, forme une bulle d'air qui va créer la compression dans la chambre et ainsi éjecter la goutte d'encre (voir figure 1.7). De la position de cette résistance dépend le nom de la technologie : roof-shooter si celle-ci est dans l'axe de l'orifice, side-shooter si elle lui est perpendiculaire. Cette technique a déjà été utilisée pour fabriquer des puces à ADN [36].

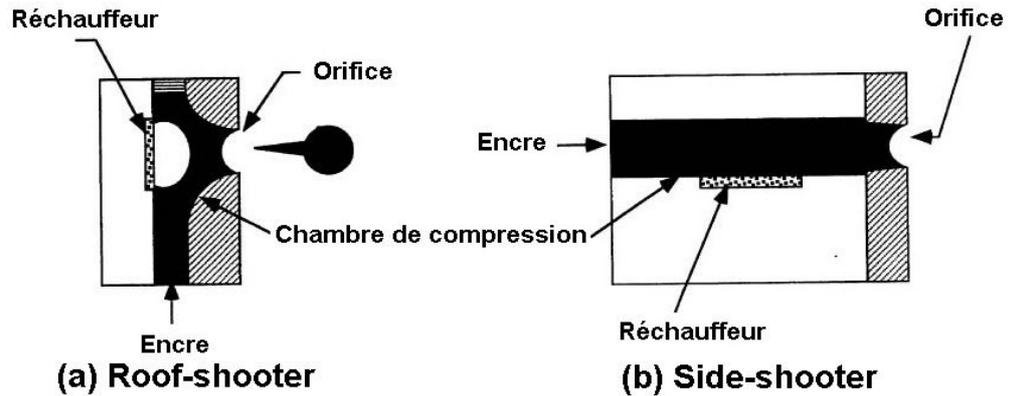


Fig. 1.7 : Technique d'impression par bubble jet

1.4.2.3 Autres systèmes fermés, electro spray

Il faut noter que tous les systèmes que nous venons de présenter sont des systèmes que l'on appelle « fermés », dans le sens où l'encre ou le produit que l'on souhaite déposer n'est pas à l'air libre sauf une fois déposé. Il y a donc des systèmes de capillaires afin d'amener le produit jusqu'aux chambres de compression et aux têtes d'impression. Le principe est illustré sur la figure 1.8.

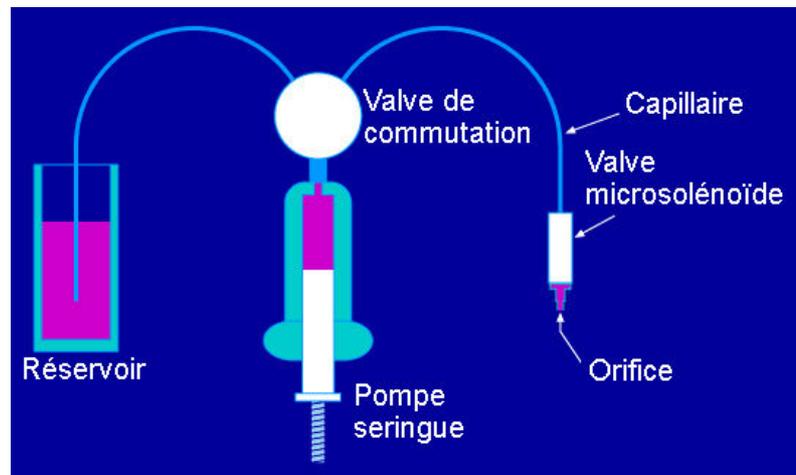


Fig. 1.8 : Principe des systèmes « fermés »

Il existe cependant d'autres types de systèmes fermés. Une technique développée par l'équipe de Mitsuru Ishikawa [37] utilise un champ électrique appliqué entre le capillaire contenant le produit à déposer et la surface de dépôt. Typiquement, une tension de 1000 Volts est appliquée durant 10 ms et permet de déposer des gouttes une par une et de l'ordre du femtolitre en volume. La taille des spots est très dépendante du champ électrique et donc de la distance entre le capillaire et la surface de dépôt, ainsi que de la tension appliquée.

Cette technique est proche d'une technique appelée electro-spray et notamment développée par l'équipe de Morozov [38]. Celle-ci est basée sur le fait que, passé un certain seuil en tension, il y a nébulisation et atomisation du produit contenant les sondes. Ainsi, en arrosant grâce à ce phénomène un masque, appelé « shadow mask », seuls les endroits, où un trou était dessiné,

accueilleront des sondes. Le spray de sondes est obtenu par application d'un champ électrique d'une manière similaire à la technique précédente. Ces deux techniques sont schématiquement représentées sur le schéma 1.9, avec la méthode par champ électrique simple en (a) et par electro spray en (b).

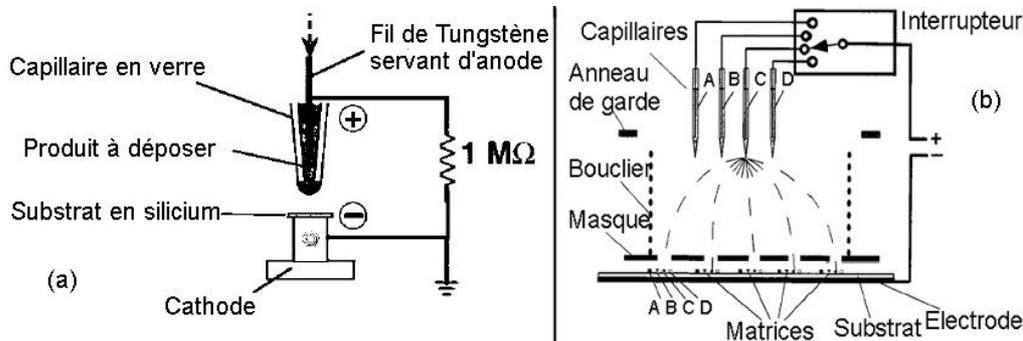


Fig. 1.9 : Dépôt par utilisation d'un champ électrique

Enfin une dernière technique, apparue récemment et développée par Picoliter²¹, utilise, afin soit de déposer soit de déplacer des produits (liquides), l'énergie acoustique. Un transducteur convertit l'énergie électromagnétique des fréquences radio afin de réaliser ceci. Ce transducteur n'est pas en contact avec le liquide ce qui diffère des méthodes que l'on vient de présenter. Car si toutes n'entraient pas en contact avec la surface dépôt, toutes faisaient entrer en contact les transducteurs avec le produit à déposer, nécessitant alors des processus de nettoyage et l'utilisation de plusieurs pipettes pour déposer différents liquides simultanément. De cette manière, il a été possible de déposer des gouttes allant de 0,1 pL à 1 μ L, soit des spots d'environ 100 μ m en diamètre. Le principe de ce système est exposé en figure 1.10. Cette technique est en cours d'amélioration, notamment par E.S. Kim [39] de l'Université de Californie du Sud, à Los Angeles.

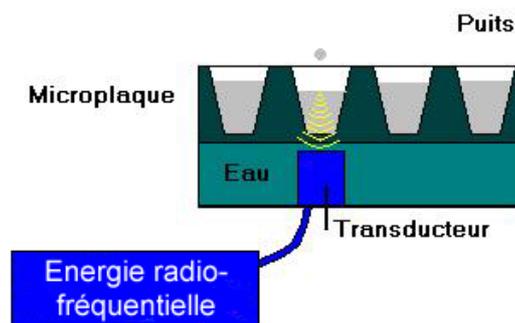


Fig. 1.10 : Utilisation de l'énergie acoustique pour la formation de gouttes

1.4.2.4 Discussion sur cette technique

Les biopuces produites par micropipetteurs offrent une grande souplesse d'utilisation car il est facile pour le chercheur d'en modifier le contenu. En outre, elles sont relativement peu

²¹<http://www.picoliterinc.com/>

coûteuses. La préparation et l'optimisation de ces biopuces ne sont cependant pas simples, l'assemblage de milliers de gènes sur une puce nécessitant la validation et la purification de nombreux ADNc.

D'autres types de puces, comme les biopuces électroniques (Nanogen), dans lesquelles des circuits électriques miniatures sont utilisés afin de diriger les tests moléculaires à la surface de la puce sont maintenant en développement.

Il faut quand même noter que ces méthodes emploient une technologie de fabrication très complexe (utilisation de micropompes, de microvalves, ...). De plus, le nettoyage de systèmes fermés, aux échelles auxquelles nous souhaitons travailler, pose également un gros problème : souvent des traces de produits restent dans les capillaires polluant ainsi les dépôts et expérimentations suivants. Ensuite, il n'est pas rare, et de nombreux travaux se font sur ce point, que les capillaires transportant les produits explosent sous l'effet de la pression exercée afin d'achever le produit [40]. Pour terminer sur les systèmes de type jet d'encre (piézoélectrique), aujourd'hui lors de la création de spot, on ne peut pas empêcher l'apparition de spots satellites, qui risquent de perturber les réactions et les spots environnants, faussant les résultats. Ainsi, l'homogénéité des spots n'est pas complètement garantie. Les volumes sont de l'ordre de quelques centaines de picolitres.

De plus, la résolution (le nombre de spots par centimètres carrés) reste encore limitée (environ 2000 spots/cm²). Ceci est dû au fait qu'en augmentant la densité, et donc en augmentant par exemple, la fréquence d'activation des microvalves ou des actionneurs, le liquide a tendance à rester dans le système et le dépôt est moins précis. Cette technique montre donc ses limites à développer un système commercialement viable.

Concernant la technique de bubblejet, l'utilisation de haute température peut dénaturer une protéine²² et en modifier son comportement, et également endommager la tête d'impression. De plus, les volumes déposés sont beaucoup plus conséquents et peuvent varier beaucoup plus facilement.

1.4.3 Techniques par contact, capillarité et tension de surface

Nous allons passer aux méthodes par contact, c'est-à-dire mettant en contact direct le système de dépôt avec la surface sur laquelle on effectue ce dépôt. Il existe plusieurs types de techniques, la plus classique utilise des aiguilles, appelées parfois capillaires ou micro-aiguilles (pins), et un principe proche de celui d'une plume de stylo encre. Mais toutes utilisent le phénomène de capillarité pour effectuer les dépôts.

1.4.3.1 L'utilisation d'aiguilles (pins)

L'équipe d'Andréi Mirzabekov utilise une méthode automatisée de transfert d'oligonucléotides [17]. Synthétisées par un appareil de facture classique, les sondes activées par le couplage sont disposées dans des plaques de microtitration. Leur transfert sur la matrice est réalisé au moyen d'une aiguille (capacité de 1 nL) dont le déplacement dans les trois dimensions de l'espace est contrôlé par ordinateur. C'est la méthode la plus classique et la plus répandue utilisant une technique contact. Biorobotics, Genemachines, Genomic Solutions ou encore Affymetrix utilisent et développent des outils pour cette technique.

Les aiguilles ou pins Les aiguilles classiquement utilisées sont en acier inoxydable. Leur forme est proche de celle d'une plume de stylo encre et comporte donc une fente ou canal par lequel s'écoulera le liquide à déposer. Le principe d'utilisation est le suivant :

²²Ce qui ne pose en revanche aucun problème avec de l'ADN, l'hybridation future étant alors favorisée par cette dénaturation.

Les aiguilles sont plongées dans un réservoir contenant le liquide à déposer. Il en résulte un transfert du liquide dans le canal des aiguilles (par capillarité).

Ensuite, le contact effectué entre la pointe de l'aiguille et la surface de dépôt se traduit par la formation d'un spot, dont le diamètre dépend de plusieurs facteurs : la tension de surface de l'aiguille, du fluide et de la surface de dépôt, ainsi que la force d'appui de l'aiguille sur la surface et son temps de contact avec cette même surface, le phénomène de diffusion prenant alors une place plus prépondérante que la capillarité seule (Cf. chapitre 3, paragraphe 3.4).

On peut utiliser des aiguilles solides²³ pour effectuer ce transfert de produit des micropuits (réservoirs) sur des lames de microscope. Le bout des aiguilles solides est généralement plat et leur diamètre détermine le volume de produit déposé. On a par la suite amélioré ces aiguilles en utilisant des bouts concaves, qui fonctionnent mieux dans certains cas. Mais le volume chargé avec n'importe quel type d'aiguilles solides est relativement faible, rendant le processus de dépôt assez lent.

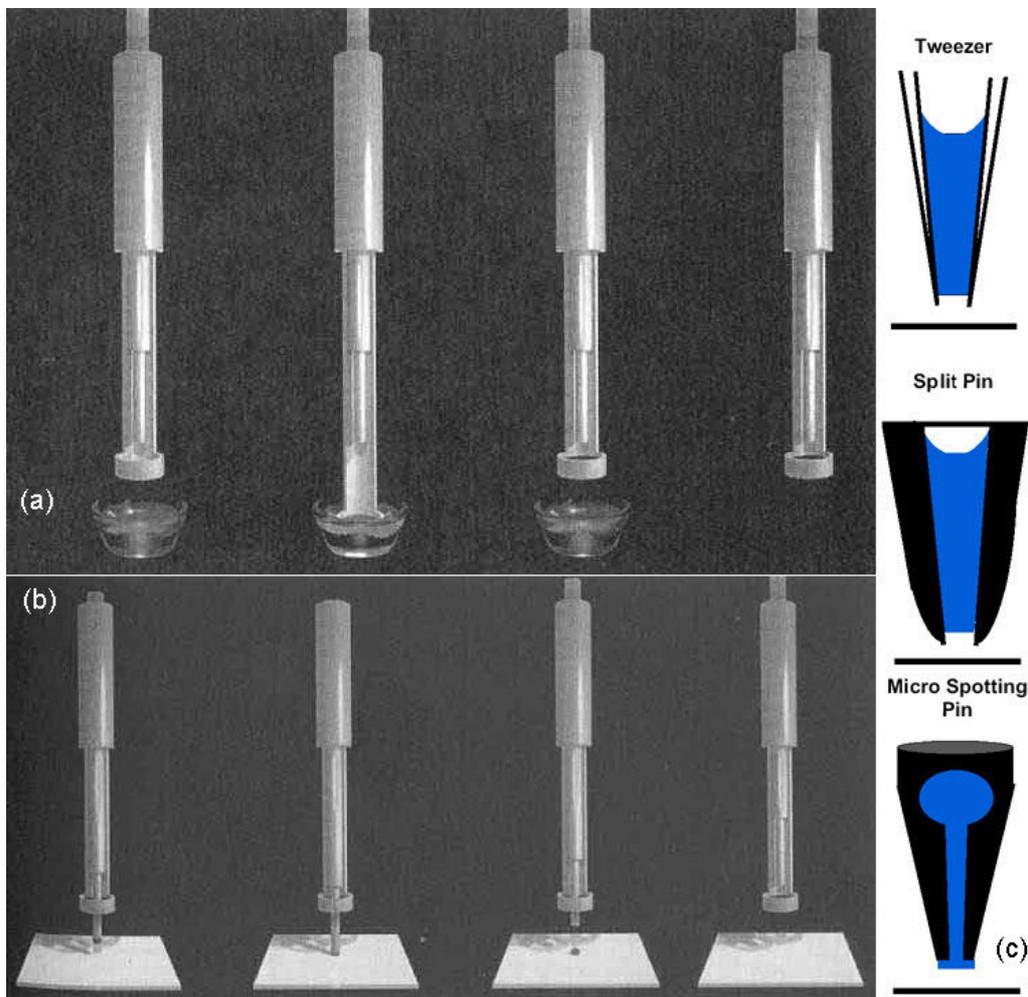


Fig. 1.11 : Aiguilles utilisées : (a,b) Pin and ring d'Affymetrix, (c) Microaiguille de Telechem

Pour éviter ce problème, des capillaires, pincettes et autres aiguilles à fente ont été développés et permettent de réaliser plusieurs dépôts avec un seul chargement (Cf. figure 1.11(c)). Les capillaires et pincettes ont trouvé leurs applications dans la recherche ([21], [41] et [42])

²³Dans le sens de pleines, par opposition aux aiguilles creuses.

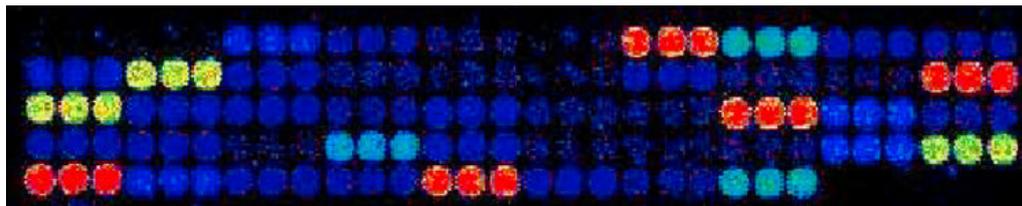


Fig. 1.12 : Image fluorescente d'un microarray par l'aiguille Telechem. 140 μm entre deux spots adjacents.

bien que la configuration ouverte du canal contenant le liquide entraîne des irrégularités dans les volumes chargés. De plus, le besoin de briser le ménisque du produit chargé en appuyant les pincettes sur la surface réduit la durée de vie de ces dernières. Les aiguilles à fente ont une fine rainure usinée sur l'extrémité de l'aiguille afin de contenir le produit. Lorsque l'aiguille à fente entre dans la solution à déposer, le chargement s'effectue dans cette rainure. En appuyant sous l'action de la seule force du poids de l'aiguille sur la surface, on réalise un dépôt d'un petit volume de liquide.

Actuellement, la technologie la plus utilisée est celle développée par TeleChem International (Cf. figure 1.11 (c), Microspotting). Leur microaiguille fonctionne comme un tampon, et chaque chargement peut contenir environ 0,2 μL de la solution. La portion de solution située à l'extrémité de l'aiguille est mise en contact avec le substrat (surface de dépôt). Lorsque l'aiguille se retire, la force d'attraction du substrat sur le liquide (capillarité) retient une petite quantité de produit du canal de l'aiguille. Les dimensions des spots varient selon le modèle d'aiguilles de 75 à 360 μm en diamètre. Un exemple de microarray est donné en figure 1.12.

Il faut remarquer qu'une variation de cette technique a été développée par Genetic Micro-Systems (désormais Affymetrix) appelée « pin-and-ring », soit aiguille-et-anneau (Cf. figure 1.11 (a et b)). On plonge un petit anneau dans le produit à déposer afin de capturer du produit dans cet anneau (formation d'un ménisque) (a), puis une aiguille solide est passée à travers l'anneau (b) et donc à travers le produit retenu par l'anneau. Le liquide pris sur le bout plat de l'aiguille est déposé par contact sur la surface. L'inconvénient de cette technique réside dans la quantité de liquide très importante prélevée par l'anneau pour former le ménisque.

Le robot de positionnement La deuxième composante essentielle de cette technologie est le robot permettant de positionner les aiguilles de manière correcte, selon les trois dimensions de l'espace et avec une précision suffisante afin que deux spots adjacents ne se superposent pas. Tous ces systèmes présentent une erreur de positionnement et moins elle est importante, plus le système est cher.

Les caractéristiques principales, parmi lesquelles on devra trouver un compromis, de ce type de système de positionnement seront donc :

- la répétabilité, c'est-à-dire, l'erreur lorsque l'on se positionne en une position A, que l'on fait ensuite une série de déplacements et que l'on retourne à cette position A ;
- la précision, i.e. l'erreur lorsque l'on passe d'une position A à une position B, souvent exprimée en $\pm x \mu m$;
- la résolution, ou encore le pas de déplacement le plus petit réalisable par le système ;
- la vitesse linéaire, soit la vitesse maximum qu'un axe de déplacement peut atteindre et conserver ;
- le signal retour de position, qui exprime la faculté du système à déterminer la position actuelle de celui-ci.

Enfin, l'environnement et les conditions de contrôle peuvent affecter la qualité de fabrication de la biopuce. L'humidité et la poussière sont des paramètres qu'il ne faut pas négliger, le premier en prévention du phénomène d'évaporation des produits à déposer, le deuxième pour la qualité générale de la biopuce, la poussière pouvant se déposer sur le support ce qui peut perturber les résultats. Bien évidemment, tout ce système est généralement contrôlé par un ensemble de logiciels, paramétrables afin de pouvoir réaliser exactement la biopuce souhaitée.

1.4.3.2 Limitation

Dans ces systèmes, le diamètre du système entrant en contact avec la surface de dépôt, la tension de surface de ce même système, du fluide et du support de dépôt influent sur le diamètre (et donc sur le volume déposé) d'un spot. On obtient des volumes variant du picolitre au nanolitre pour des diamètres de 75 à 360 μm (avec des aiguilles TelechemTM). L'absence de contrôle du temps de contact, de la force de contact, du réglage du parallélisme entre les aiguilles et la surface de dépôt, ne peuvent garantir une homogénéité parfaite des spots à l'heure actuelle. Ceci se traduit notamment par la réalisation de n-uplets d'un produit et une moyenne de ces n résultats afin de garantir la validité de ceux-ci. De plus, l'usure de l'aiguille de dépôt est très rapide, ajoutant au coût de revient de cette technique.

1.5 Vers une compatibilité avec les micro et nanotechnologies

Comme nous venons de le voir, le domaine des biopuces est en plein développement, de par l'avancée au niveau génétique et génomique, mais aussi grâce aux progrès technologiques, que ce soit au niveau de la miniaturisation ou tout simplement de l'utilisation de diverses sciences et disciplines (multidisciplinarité), qui en interagissant entre elles, permettent de faire progresser et évoluer ces technologies. Cette évolution rapide, presque dictée par un besoin pressant et une nécessité de comprendre les fonctions cellulaires pour les maîtriser, pourra se concrétiser très rapidement en se basant sur plusieurs principes que nous allons décrire dans ce qui suit.

1.5.1 Technologies émergentes

Devant les limites de la photolithographie, à savoir des modifications nécessaires à cette technique trop chères et difficilement réalisables techniquement, l'utilisation d'un faisceau d'électron (au lieu de la lumière) qui est une solution coûteuse et lente, et les rayons X et les UV qui peuvent quant à eux endommager les équipements utilisés durant le processus, la recherche d'approches non conventionnelles les plus simples et les moins chères, méthodes de fabrication de nanostructures, a été stimulée. L'équipe de Whitesides [43] notamment, s'est rendu compte dès le début des années 1990, que des techniques simples, telles que l'impression, le moulage et le gaufrage, pouvaient permettre de créer des nanostructures. Ces techniques sont appelées lithographie douce (soft lithography), parce qu'elles utilisent généralement un tampon en polymère, le polydimethylsiloxane (PDMS).

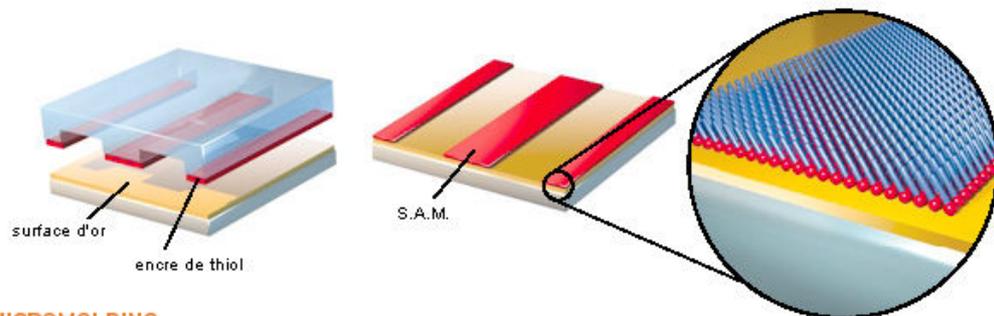
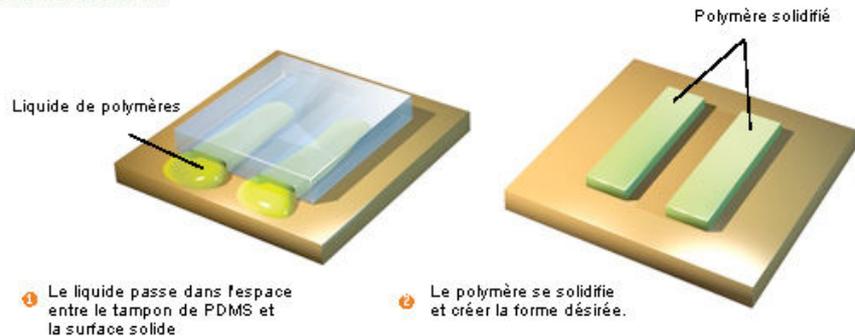
Pour faire de la lithographie douce, on doit d'abord réaliser un moule ou un tampon, le plus souvent dans un wafer en silicium. Il en résulte un tampon qui correspond fidèlement au modèle désiré, un modèle de quelques nanomètres peut être reproduit. Certes, la création du modèle peut s'avérer coûteuse, mais ensuite, la création du tampon, et ses diverses utilisations sont aisées et peu chères.

On distingue deux méthodes d'utilisation, l'impression par microcontact (microprinting), et le micromoulage (micromolding).

MICROCONTACT PRINTING

1 Le tampon de PDMS est appuyé contre la fine couche d'or

2 Les thiols forment une monocouche qui s'organise seule sur l'or et qui reproduit le modèle.

**MICROMOLDING**

1 Le liquide passe dans l'espace entre le tampon de PDMS et la surface solide

2 Le polymère se solidifie et crée la forme désirée.

Fig. 1.13 : Lithographie douce : deux techniques (Scientific American, Inc©)

Le microprinting La première méthode (Cf. figure 1.13, (1)), développée par Amit Kumar du groupe de Whitesides [44] à l'université d'Harvard, consiste à « encre » le tampon de PDMS avec une solution réactive constituée de molécules organiques appelées thiols. Le tampon est ensuite mis en contact avec un support approprié - un film fin d'or sur une plaque de verre, de silicium ou de polymère. Les thiols réagissent avec la surface d'or, créant une monocouche auto-assemblée appelée SAM pour Self-Assembled Monolayer, réplique parfaite du tampon-modèle. Utilisée correctement et avec précaution, cette technique peut reproduire des formes de 50 nanomètres.

Le micromolding Le micromoulage dans des capillaires utilise le tampon de PDMS placé sur une surface solide (Cf. figure 1.13, (2)). Un liquide de polymères passe par capillarité dans l'espace libre laissé entre le tampon-moule et la surface. Le polymère se solidifie ensuite à la forme désirée. On peut arriver à réaliser des structures de 10 nanomètres de cette manière, ce qui est particulièrement utile pour fabriquer des outils optiques de faibles longueurs d'onde, et tout ce qui peut être utilisé dans les réseaux de fibres optiques, etc. ... Une autre application pourrait se trouver dans le domaine de la nanofluidique, extension de la microfluidique, en produisant des biopuces avec des canaux de quelques nanomètres de large. A cette échelle, la dynamique fluidique pourrait permettre de séparer des matériaux tels que des fragments d'ADN.

La dip-pen lithographie Enfin, cette technique dérivée du scanning par AFM (Microscope à Force Atomique) est développée par l'équipe de Chad A. Mirkin [45], [46]. Elle fonctionne comme le principe de la plume d'oie ou plume biseautée. La pointe de l'AFM est enrobée

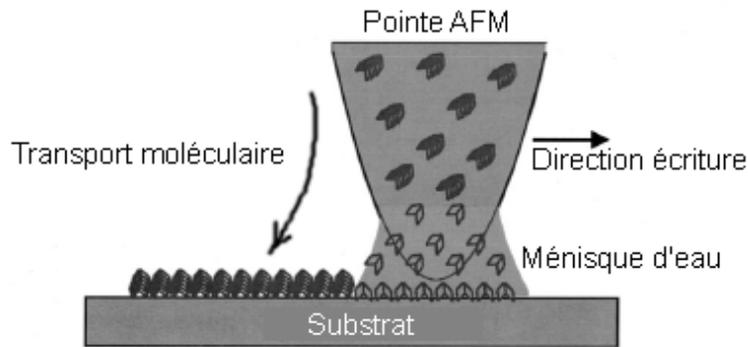


Fig. 1.14 : Dip-pen lithographie

d'un fin film de molécules de thiol, insolubles dans l'eau, mais qui réagissent avec la surface d'or. Quand ce système est placé dans une atmosphère à forte concentration de vapeur d'eau, une goutte d'eau ou ménisque condense entre la surface en or et la pointe du microscope. La tension de surface place le levier de l'AFM à une certaine distance fixe de l'or. Le ménisque sert de pont sur lequel les molécules de thiol vont migrer de la pointe (où elles étaient fixées après séchage) sur la surface en or, où elles seront fixées (voir figure 1.14).

Ces techniques commencent à être développées afin d'être utilisées pour déposer des oligonucléotides et des protéines [47]. Actuellement elles restent limitées pour une application aux biopuces, un procédé de nettoyage étant très complexe à mettre en oeuvre d'une part, les déplacements étant limités également par l'outillage ($100 \mu m$), et le nombre de spots réalisés pour un chargement restant très faible d'autre part. De plus, le temps de chargement des produits est très long, car il nécessite une longue période d'incubation et de séchage (plusieurs heures). Ce facteur temps est également augmenté avec cette technique, basée sur le phénomène de diffusion, lors du procédé de dépôt en lui-même. Les temps de contact varient de plusieurs minutes à environ une seconde, cette dernière durée étant la limite inférieure.

1.5.2 Justification de l'approche retenue

Un tableau va conclure cette étude. Le tableau 1.15 reprend les trois grandes catégories de fabrication, en synthétisant leur mode de fonctionnement, leurs applications et les sociétés les développant.

Il résume les différentes caractéristiques, avantages et inconvénients des différentes techniques présentées (que nous avons regroupées en trois catégories)²⁴(les chiffres donnés sont des estimations pour la comparaison simplement, et peuvent différer légèrement selon l'application).

Une colonne concernant notre projet a également été ajoutée, présentant nos espérances et nos besoins.

Au vu de toutes les remarques précédentes, il nous a paru plus intéressant d'utiliser une technique proche du microprinting, c'est-à-dire une technique par contact en utilisant une aiguille ou un outil de dépôt similaire.

Tout d'abord, une méthode par contact direct est peu coûteuse, de par la possibilité de fabriquer en masse les outils de dépôt (aiguilles ou cantilevers) et en s'appuyant sur des techniques de microfabrication classiques. C'est également la solution d'un point de vue nettoyage

²⁴La synthèse in situ a été retirée, car trop chère et ses progrès étant limités.

<i>Paramètre</i>	<i>Photolithographie</i>	<i>Piézoélectrique</i>	<i>Microspotting</i>	<i>Micro-leviers.</i>
Synthèse combinatoire	✓	✓	✗	✓
Jet d'encre	✗	✓	✗	✓
Contact	✗	✗	✓	✓
Masques utilisés	✓	✗	✗	✗
Diamètre des spots (µm)	1-10	125-175	75-360	10-100
Densité (spots/cm²²)	244000	10000	6500	
Restriction sur la longueur des sondes	✓	✗	✗	✗
Éléments déposés	Oligonucléotides	Oligos, ADNc, protéines	Oligos, ADNc, protéines	Oligos, ADNc, protéines
Volume chargé (µL)	-	5-10	0,5-2,5	0,1-0,5
Volume déposé (nL)	-	0,05-10	0,2-1,0	0,001
Volume programmable	✓	✓	✗	✓
Nombre d'aiguilles ou de buses	-	4-8	64	
Vitesse de dépôt (spots/sec)	100-500		64	
Applications	Expression des gènes, Détection de mutations	Expression des gènes, Détection de mutations	Expression des gènes, Détection de mutations	Expression des gènes, Détection de mutations
Simplicité	☹	☹	☺	☺
Robustesse	☹	☹	☺	☺
Coût	💰💰💰💰	💰💰💰💰	💰💰	💰
Sociétés associées	Affymetrix	Biodot, Cartesian, Packard Instruments, Incyte, Protogene, Rosetta, ...	Cartesian, Genetix, Genometrix, Gene Machines, Genetic Microsystems, Hyseq, Molecular Dynamics, Synteni, TeleChem, ...	LAAS-CNRS

Fig. 1.15 : Synthèse des techniques de fabrication

la plus simple, car c'est un système ouvert, facilitant des processus de séchage ou soufflage. De plus, cette technique permet d'atteindre de hautes densités en utilisant plusieurs pointes simultanément et d'être très précis dans la fabrication des biopuces, en termes de positionnement des sondes notamment (très utile pour la partie analyse). En réduisant les dimensions et les échelles de travail par rapport à des systèmes commerciaux classiques, nous avons dû faire face à des problèmes de microfluidique, les forces dues aux tensions de surface prenant notamment une toute autre importance. Enfin, notre système est évolutif, car pour répondre à ces problèmes, un électromouillage de la surface de nos outils, et une détection (contrôle actif) du dépôt des sondes, ont été intégrés sur nos leviers.

Ceci ne fait que renforcer notre volonté de rendre complètement compatible cette technique avec les micro et nanotechnologies. Plusieurs aspects entrent en jeu :

- production personnalisée et à façon des pointes, leviers de dépôts, en silicium et grâce à des techniques de microfabrication classiques, peu coûteuses car produisant en masse,
- couplage à un robot qui assure une homogénéité et un bon positionnement des spots,
- utilisation de capteurs intégrés afin de posséder un outil, à la fois pour déposer des sondes et pour contrôler activement ce dépôt, et pour analyser les dépôts réalisés (biocapteur).

Le coût sera réduit de par :

- les quantités de produit déposé et donc utilisé,
- le coût de revient d'un levier,
- la possibilité de nettoyer facilement, et donc de pouvoir réutiliser, les leviers, et
- l'utilisation d'un seul et même outil, le robot et le support de dépôt pour les parties fabrication et analyse des biopuces.

La qualité des produits obtenus serait garantie par un contrôle de la force de contact, par une résolution accrue et des densités plus importantes, réduisant le rapport bruit / signal.

Les travaux de cette thèse portent sur la fabrication des cantilevers (micro-leviers) i.e. leur forme, etc..., sur leur contrôle, à tous les niveaux, remplissage, déplacement, appui, et dépôts des sondes²⁵. La partie détection et biocapteurs est développée dans une autre thèse du laboratoire par Matthieu Guirardel²⁶.

²⁵La réduction des échelles de travail font que nos travaux concernant ce dépôt, se rapprochent du fonctionnement de la technologie Dip-pen décrite auparavant et réduire encore nos échelles de travail renforcerait cette similarité.

²⁶guirardel@laas.fr

Instrumentation et banc expérimental

Sommaire

1.1	Introduction	6
1.2	Les biopuces, puces à ADN et à protéines	7
1.2.1	Qu'est-ce qu'une biopuce ?	7
1.2.2	Historique	8
1.2.2.1	Les macroarrays	8
1.2.2.2	Les microarrays et oligo-chips	9
1.3	Etapes de fabrication d'une biopuce	11
1.3.1	Supports	11
1.3.1.1	Chimie de greffage	12
1.3.1.2	Les différents types de supports	12
1.3.2	Les techniques de dépôt des sondes	14
1.3.3	Détection et analyse	14
1.3.3.1	La mesure des signaux fluorescents	15
1.3.3.2	L'utilisation du radiomarquage	15
1.3.3.3	Autres types de détection	16
1.3.3.4	Vers une détection électronique	17
1.4	Fixation des sondes	18
1.4.1	La synthèse <i>in situ</i>	18
1.4.1.1	Puces à haute densité	18
1.4.1.2	Puces à faible et moyenne densité de sondes	19
1.4.1.3	Problématique	20
1.4.2	Techniques jet d'encre, systèmes « fermés »	20
1.4.2.1	Utilisation d'un phénomène piezoélectrique	20
1.4.2.2	Utilisation d'une bulle	22
1.4.2.3	Autres systèmes fermés, electrospray	23
1.4.2.4	Discussion sur cette technique	24
1.4.3	Techniques par contact, capillarité et tension de surface	25
1.4.3.1	L'utilisation d'aiguilles (pins)	25
1.4.3.2	Limitation	28
1.5	Vers une compatibilité avec les micro et nanotechnologies	28

1.5.1	Technologies émergentes	28
1.5.2	Justification de l'approche retenue	30

2.1 Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons présenté les biopuces, leur principe et leur fabrication, en exposant notamment toutes les techniques actuellement disponibles pour déposer les sondes. Cet état de l'art nous a permis de dégager une technique qui semble pouvoir s'adapter aux micro- et nano-technologies, la technique de dépôt par contact direct en utilisant des micro-leviers en silicium.

Dans une certaine mesure, nos travaux peuvent être comparés aux travaux de l'équipe de Chad Mirkin de l'Université de NorthWestern[45] [46], qui utilise la pointe d'un Microscope à Force Atomique (AFM) pour effectuer les dépôts. En termes de taille de spots déposés, cette technique est la plus intéressante. Mais une des principales limites de cette méthode pour notre application est l'impossibilité d'avoir une grande marge de manoeuvre en déplacement, l'AFM ne pouvant balayer qu'une très petite surface (sans parler du nombre de spots que l'on peut déposer en un seul chargement et des problèmes de nettoyage inhérents à cette technique).

C'est pourquoi nous souhaitons que notre système puisse répondre de manière véritablement adaptée à la fabrication des biopuces, c'est-à-dire :

- obtenir des spots de taille inférieure ou égale à 100 microns de diamètre,
- avoir une homogénéité entre les différents spots à $\pm 10\%$,
- pouvoir déposer différents produits avec un seul et même outil, en s'affranchissant des problèmes de contamination.

Ainsi, ce deuxième chapitre sera consacré à l'instrumentation et à la présentation détaillée de la plate-forme expérimentale dans sa totalité (dépôt et visualisation).

En suivant l'exemple donné par Pat Brown¹ sur son site², nous nous efforcerons de présenter clairement le système aussi bien d'un point de vue des besoins que des solutions que nous avons apportées.

Une *première partie* sera consacrée aux micro-leviers ou cantilevers, qui constituent nos outils de dépôt. Nous aborderons notamment le procédé de fabrication de ces leviers et certaines de leurs caractéristiques.

La plate-forme expérimentale sera décrite dans une *deuxième partie*. La table de positionnement XYZ sera présentée dans un premier temps, en insistant sur ses possibilités en termes de vitesse et de précision de positionnement, et en discutant de sa disposition. Ensuite nous présenterons l'interface utilisateur-table, c'est-à-dire, l'ensemble formé par le PC, la carte d'acquisition, le contrôleur d'axes (contrôleur de la table XYZ) et les différentes liaisons entre ces éléments. Pour conclure cette partie, nous exposerons les différentes méthodes utilisées au cours de ces travaux afin de visualiser le bon déroulement de l'expérience et d'analyser les résultats obtenus. Deux types de visualisation permettent d'effectuer ce contrôle, une que l'on nomme « directe » car se déroulant pendant le processus de dépôt, une « indirecte », qui se fait a posteriori ou en différé.

Enfin, la *dernière partie* décrira les perspectives concernant l'instrumentation. Les micro-leviers intégrant des piézorésistances seront décrits dans un premier temps, puis nous terminerons par l'électronique³ que nous utilisons pour contrôler activement ces leviers.

¹Initiateur de la technique par contact, Pat Brown donne en effet un descriptif détaillé de son système, c'est-à-dire du système manipulant les micro-aiguilles et des micro-aiguilles en elles-mêmes. Il y décrit également tous les protocoles expérimentaux qu'il a réalisés.

²<http://cmgm.Stanford.EDU/pbrown/>

³L'électronique est développée par Fabrice Mathieu et Denis Lagrange, ingénieurs du service 2I au LAAS-CNRS.

2.2 Les leviers

Les micro-leviers ou cantilevers sont les outils que nous manipulons et qui transportent les produits à déposer. C'est en mettant en contact la pointe de ces cantilevers avec une surface que nous créons un dépôt par capillarité.

Nous utilisons des rangées de cantilevers fabriquées en masse par des techniques coûteuses. Actuellement, des supports contenant une rangée de quatre micro-leviers ont été réalisés, mais il est tout à fait envisageable d'augmenter le nombre de leviers sur chaque rangée.

2.2.1 Idée de départ

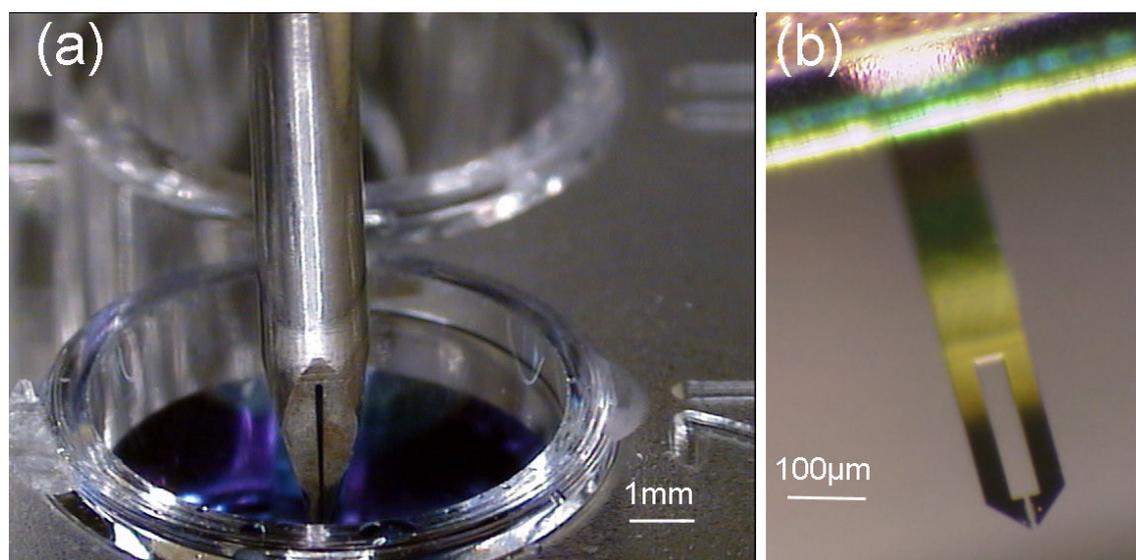


Fig. 2.1 : (a) Pointe de dépôt de Telechem dans son réservoir de chargement (b) Levier de la première génération

L'idée de départ est de réduire les dimensions des pointes commerciales (type TelechemTM, voir figure 2.1 (a)) et de réaliser des outils en silicium, par des procédés classiques de micro-fabrication qui permettent de fabriquer à faible coût et en masse. Le principe de fonctionnement est comparable à celui d'une plume de stylo encre.

Nous avons testé une première génération de leviers proposée par Benoit Belier, lors d'un stage post-doctoral au LAAS. Le fil conducteur était le suivant : les techniques pour fabriquer des microleviers étaient relativement simples et bien maîtrisées. Nous avons décidé de dessiner un canal au milieu de ces leviers, canal qui s'élargirait ensuite afin de créer un réservoir (voir figure 2.1 (b)).

Devant les difficultés rencontrées pour remplir les canaux et réservoirs de ces leviers, nous avons rajouté des électrodes le long du canal qui nous permettent de contrôler activement la mouillabilité⁴, la tension de surface de nos leviers, et donc le caractère hydrophile ou hydrophobe de ceux-ci. Nous verrons dans le chapitre 4, « Contrôle actif du chargement et du dépôt », que l'utilisation d'un champ électrique permet dans certaines conditions de modifier les paramètres

⁴La mouillabilité est la faculté pour une substance solide de recevoir un liquide en lui permettant de s'étaler sur la surface la plus grande possible. Notons également qu'une diminution de l'angle de raccordement entre le liquide et la surface se traduit par une augmentation de la mouillabilité et qu'à un angle de raccordement nul correspond l'étalement.

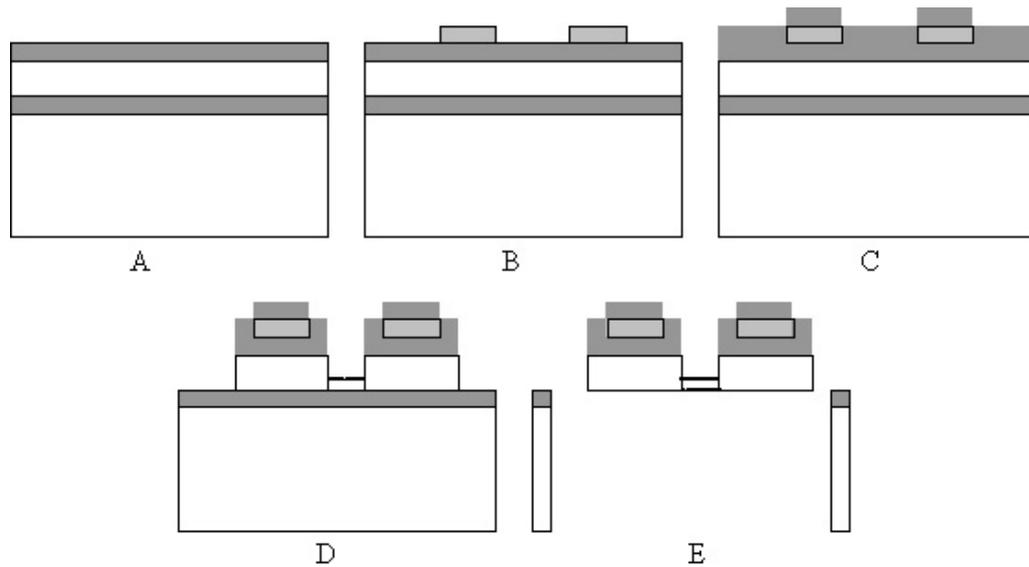


Fig. 2.2 : Procédé de fabrication de microleviers intégrant un réservoir

que nous venons de citer, et ainsi d'optimiser le transfert de liquide dans des géométries confinées.

Les leviers que nous utilisons désormais, sont de forme rectangulaire terminée par une extrémité triangulaire. Une fente au centre des leviers, débouchant à l'extrémité, canalise le liquide. Un réservoir de forme rectangulaire peut être inséré en terminaison supérieure du canal. Deux pistes métalliques longent ce canal et le réservoir. Ces derniers peuvent être débouchants ou non. Les dimensions géométriques des leviers sont les suivantes :

- Longueur du levier : 1 à 2mm
- Largeur : 210 μm
- Épaisseur : 1 à 20 μm (dépend de l'épaisseur du substrat SOI⁵ de départ)
- Intervalle : 450 μm
- Longueur du canal : 250 μm (lorsqu'un réservoir est dessiné), 550 μm (sans réservoir)
- Largeur du canal : 5 μm
- Longueur du réservoir : 250 μm
- Largeur du réservoir : 80 μm
- Largeur des pistes : 20 μm

Une table de positionnement permet ensuite d'utiliser ces microstructures pour les phases de remplissage et de dépôt. Il s'agit, pour la phase de chargement, de plonger les microstructures dans le réservoir contenant la solution à déposer et de remplir les microcanaux par effet de capillarité optimisé par l'effet de champ. Pour la phase de dépôt, la table de positionnement XYZ permet de positionner les microstructures très précisément par rapport à une surface destinée à recevoir le dépôt. Le dépôt s'effectue alors par contact direct des micro-leviers avec la surface de la biopuce.

2.2.2 Procédé de fabrication

Le procédé de fabrication de leviers pour le dépôt est basé sur les techniques de fabrication collective de la microélectronique. Il a été conçu et mis en place par Matthieu Guirardel lors de ses travaux de thèse effectués au LAAS. Une série d'étapes technologiques est réalisée sur

⁵Substrat de silicium sur isolant, Silicon On Insulator.

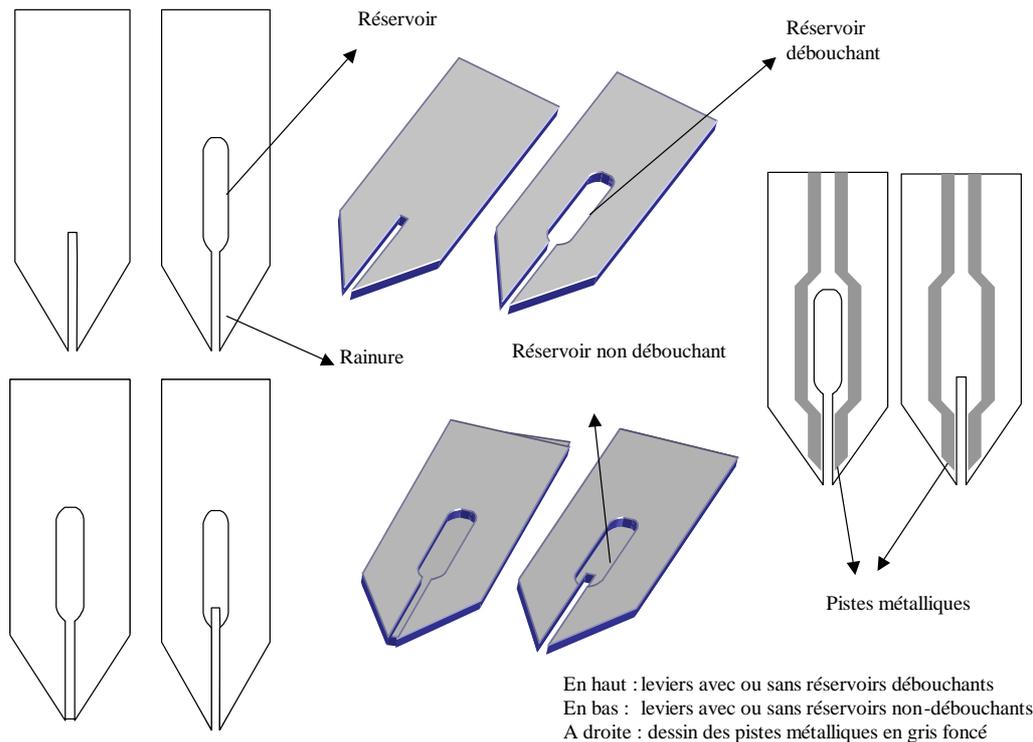


Fig. 2.3 : Description des différentes configurations concernant les microleviers contenant les réservoirs

des substrats SOI (Silicon On Insulator) (figure 2.2). La première partie du procédé comprend une succession d'élaborations de couches minces, la deuxième partie consiste en une suite de micro-usinages afin de définir les leviers.

La première étape (A) est un dépôt d'oxyde de silicium par dépôt chimique en phase vapeur à basse pression appelé LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition), servant d'isolant entre le substrat et les métallisations suivantes.

Ensuite (B), un lift-off⁶ permet de réaliser les pistes métalliques :

- photolithographie,
- évaporation du métal,
- retrait de la résine dans de l'acétone et ultrasons,
- recuit de la métallisation.

Lors de la dernière étape, un deuxième dépôt d'oxyde de silicium (C) par LPCVD est effectué pour isoler les métallisations du liquide suivi d'une photolithographie pour accéder aux plots de contacts des métallisations par attaque chimique de l'oxyde de silicium.

Pour débiter le micro-usinage, une photolithographie dessine les contours des leviers, une gravure plasma (gravure ionique réactive ou RIE) est alors réalisée premièrement pour l'oxyde de silicium puis une seconde pour le silicium monocristallin (D). Enfin une dernière photolithographie face arrière de la plaquette, suivie d'une gravure ionique réactive profonde (DRIE) du silicium sont réalisées pour libérer les leviers (E). La gravure plasma est stoppée par la couche d'arrêt d'oxyde de silicium du SOI, une gravure ionique réactive de cet oxyde est finalement réalisée - toujours face arrière - pour terminer de libérer les structures.

⁶Par opposition à une métallisation normale, dite pleine plaque, c'est-à-dire où l'on dépose le métal sur toute la plaque avant de graver les endroits où l'on souhaite supprimer le métal, un lift-off est un procédé de métallisation avec un dépôt de résine au préalable (avant le dépôt du métal). Cette résine est ensuite enlevée entraînant également le retrait du métal qui avait été déposé dessus.

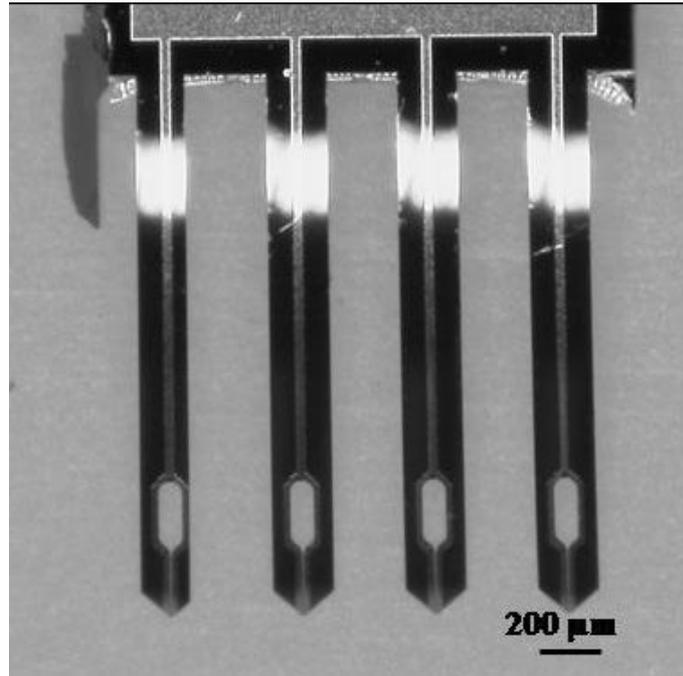


Fig. 2.4 : Rangée de 4 leviers à réservoir débouchant

Lors de la gravure des profils des leviers, plusieurs configurations sont envisageables selon le profil désiré (voir figure 2.3). Pour des leviers à canal débouchant (traversant toute l'épaisseur du levier) avec ou sans réservoir, une seule étape suffit en arrêtant la gravure du silicium sur la couche d'oxyde du SOI. Cependant, pour la gravure de structures non débouchantes, deux photolithographies suivies de gravures doivent être réalisées consécutivement. La première, définissant le canal et le réservoir doit être arrêtée avant d'arriver sur l'oxyde intermédiaire du SOI. Il faut alors faire suivre cette étape par une photolithographie et gravure des profils des leviers sans leur canal jusqu'à l'oxyde du SOI.

Trois types de leviers peuvent être obtenus :

- des leviers sans réservoir possédant juste un canal de $5 \mu m$,
- des leviers avec réservoir non débouchant simplement « creusés », et enfin
- des leviers avec réservoir débouchant.

Ces derniers sont visibles sur la figure 2.4.

2.2.3 Vers des leviers actifs

2.2.3.1 Traitements de surface

Plusieurs approches peuvent être utilisées sur ces systèmes pour optimiser le comportement du liquide sur la surface. Une première méthode, passive, consiste à traiter les surfaces pour les rendre hydrophiles ou hydrophobes. Nous pouvons tout d'abord jouer sur les matériaux dérivés du silicium connaissant leurs propriétés : l'oxyde de silicium sera utilisé comme matériau hydrophile et le silicium monocristalin sera utilisé comme matériau hydrophobe. Cependant, le silicium ayant tendance à s'oxyder naturellement en surface, il peut être nécessaire de réaliser un traitement chimique de surface. Ces traitements consistent en une accroche de silanes avec des groupements méthyls ou fluorés comme terminaison, sur de l'oxyde de silicium. Ces composés se forment sur de l'oxyde de silicium sous forme de monocouches auto-assemblées et ont l'avantage d'être fortement hydrophobes.

2.2.3.2 Contrôles actifs

Une autre approche, active celle-ci, est basée sur le contrôle électrique de la tension de surface du liquide. En effet, il a été montré par un mécanisme similaire à l'électrophorèse, que l'on peut déplacer un liquide par la seule action d'une différence de potentiel électrique entre le liquide et des électrodes isolées. Une autre technique consiste à utiliser un champ électrique alternatif pour confiner un liquide polaire (eau par exemple) dans les zones de fort champ électrique. Ce champ étant créé entre deux électrodes isolées et coplanaires, le liquide se « plaque » littéralement sur les électrodes. Enfin, une technique très simple permet de jouer sur la tension de surface d'un électrolyte en mettant directement en contact le liquide avec l'électrode (c'est-à-dire sans isolant) qui est portée à un potentiel inférieur à la tension activant l'électrolyse du liquide. Ces techniques seront développées et expliquées plus en détails dans le chapitre 4.

2.3 La plate-forme expérimentale

Par plate-forme expérimentale, nous entendons tout ce qui est nécessaire à la réalisation des expérimentations. Cela inclut non seulement les éléments nécessaires à la réalisation des dépôts de sondes — la table de positionnement XYZ, le système de contrôle par caméra, et les leviers — mais également les dispositifs qui nous permettent de vérifier la cohérence et le bon fonctionnement de ces expérimentations, c'est-à-dire un système de visualisation a posteriori.

Trois principales caractéristiques ont dirigé nos recherches et nos choix relatifs à cette plate-forme expérimentale afin de réaliser ces travaux — précision, vitesse, liberté de mouvement du système.

Précision Afin d'être compatible avec les micro- et nano-technologies, le système doit être capable de travailler avec une précision en positionnement inférieure au micron. Cette précision doit être effective à la fois lors de déplacements relatifs et absolus et bien entendu, lors du retour à une position désirée.

Vitesse La vitesse est un paramètre également très important. En effet, elle a une influence sur le dépôt⁷ ; elle doit être assez élevée pour limiter une éventuelle évaporation des produits à déposer. En même temps, elle doit pouvoir être réduite de manière significative afin d'être contrôlable lors de la phase de dépôt et de garantir la précision souhaitée. Enfin, si l'un des objectifs principaux est de réduire le coût de revient des biopuces, il faut également être en mesure d'en produire assez rapidement. Les longs trajets lors des recharges en produits peuvent alors s'effectuer à grande vitesse, les phases de dépôt à vitesse réduite.

Liberté de mouvement Comme nous l'avons dit précédemment, notre système doit être capable de balayer une surface importante et ainsi de réaliser en parallèle plusieurs biopuces. Le support classiquement utilisé aujourd'hui pour recevoir des dépôts étant la lame de verre de 25 mm par 75 mm, le système doit être capable d'avoir, au moins pour les axes X et Y (largeur et profondeur), une mobilité supérieure ou égale à 15 cm. Ainsi, la surface balayée étant suffisante, nous pourrions être capables de traiter au moins 12 lames de verre, soit réaliser 12 biopuces, en même temps, tout du moins lors d'une même expérimentation.

⁷Par exemple, l'inertie peut modifier la force d'appui et la dynamique du système de positionnement.

2.3.1 La table de positionnement XYZ

Le rôle de la table est de permettre le positionnement des microleviers, à la fois pour les phases de chargement du liquide, de dépôts par contact, de nettoyage et de séchage. Le pas de fonctionnement, c'est-à-dire la distance minimum qu'elle peut parcourir, est un paramètre fondamental, afin d'être compatible avec les micro- et nano-technologies, mais il n'est pas le seul.



Fig. 2.5 : Table XYZ de positionnement

Les différentes caractéristiques citées précédemment ont motivé pour une part importante le choix de notre dispositif. Mais d'autres paramètres ont également été pris en compte.

Un système répondant à nos besoins avait déjà été développé au LIMMS-CNRS à Tokyo, Japon, pour un projet portant sur la profilométrie réalisé par Jean-Bernard Pourciel [48][49]. Nous avons donc transposé le système expérimental au LAAS, en octroyant simplement à la table XYZ plus de mobilité et en jouant sur les paramètres internes permettant de modifier, entre autres, la vitesse afin de répondre à notre cahier des charges.

La plate-forme et ses éléments sont présentés dans la figure 2.5. Il s'agit d'une table trois axes X, Y et Z, chacun des axes étant motorisé et asservi. Le pas minimal de fonctionnement, dont dépend la précision du système, son contrôle et sa fiabilité, est de 50 nanomètres, ce qui est largement suffisant pour réaliser des spots de quelques microns de diamètre. Cela permet également un contrôle très fin du contact levier-surface de dépôt nous assurant ainsi une meilleure homogénéité des spots réalisés et une réduction en taille des spots très intéressante.

Chaque axe est actionné par un moteur pas à pas asservi, équipé d'un contrôle en boucle fermée, alimenté en tension alternative. Les autres caractéristiques, valables pour chacun des axes, sont les suivantes :

- Plage de mouvement (mm) : 200
- Taille du support en mouvement (mm) : 80×80
- Moteur pas à pas à 5 phases
- Distance minimale parcourue à chaque impulsions (pas) (μm) : 0,05
- Diamètre et pas de la vis à bille de précision : diamètre : 8 mm, pas : 2 mm
- Guide de mouvement : construction en rail
- Précision de repositionnement (mm) : 0,001
- Précision axiale (mm) : moins de 0,015

- Capacité de charge (kg) : 13
- Poids (kg) : 2,5
- Vitesse maximum (mm/sec) : 100

Il est à noter que nous n'utilisons pas les axes X et Y « emboîtés » comme sur la figure 2.5 mais en « T », l'axe Z étant monté sur l'axe des X (voir figure 2.6). Le support mobile devant recevoir les lames de verre ou autres supports à sondes est positionné sur l'axe des Y. Un système motorisé permettant de contrôler une rotation suivant l'axe Z de ce support est également utilisé.

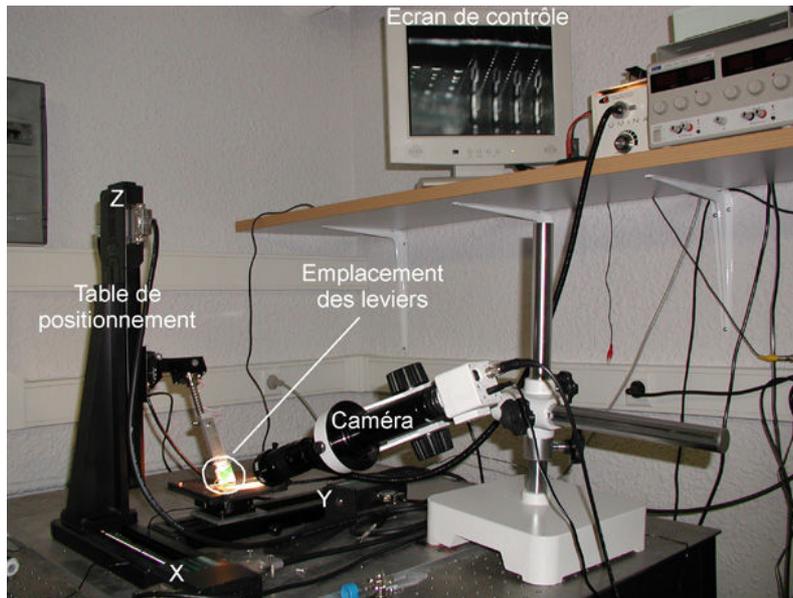


Fig. 2.6 : Agencement de la table XYZ

Ainsi, on distingue deux parties dans la table, X et Z d'un côté déplaçant les leviers, et Y sur lequel est fixé le support, assurant le positionnement et la rotation de celui-ci dans le plan XOY. Sur les autres axes, des systèmes de contrôle manuel permettent de contrôler la rotation des leviers. Un contrôle automatique de l'orientation des leviers via des boucles de régulation est également envisageable. Il assurerait une coplanarité parfaite avec la surface de dépôt, et permettrait l'homogénéité de la taille de spots réalisés. L'avantage de cette disposition est qu'elle permet le mouvement des leviers toujours dans le même plan XOZ. Ainsi, il suffit de placer le système de vidéo dans ce plan afin de pouvoir toujours observer le mouvement des leviers.

D'autre part, des pièces réalisées à l'atelier mécanique du LAAS par Xavier Dollat, ont permis le positionnement adéquat des leviers. Sur la figure 2.7(1), on peut voir la pièce permettant d'encapsuler la tête contenant l'électronique de lecture⁸ et le support des leviers, et de fixer cela à l'axe Z de la table. Les pièces en (2) servent quant à elles à modifier et régler les angles de rotation d'axes X et Y, et ainsi la coplanarité entre la rangée de leviers et la surface de dépôt.

Enfin sur la figure 2.8, nous observons la pièce qui fait office de réservoir : les grands réservoirs contiennent les produits de nettoyage (agitation des leviers dans ces produits), et les petits réservoirs contiennent les produits à déposer. Un dispositif à effet peltier est également

⁸L'électronique de lecture consiste en une carte qui permet de détecter une déformation des leviers, due à un contact par exemple. Cette déformation est mesurée par une piézorésistance intégrée au levier. Tout ce système est précisément décrit dans le paragraphe 2.4.2.

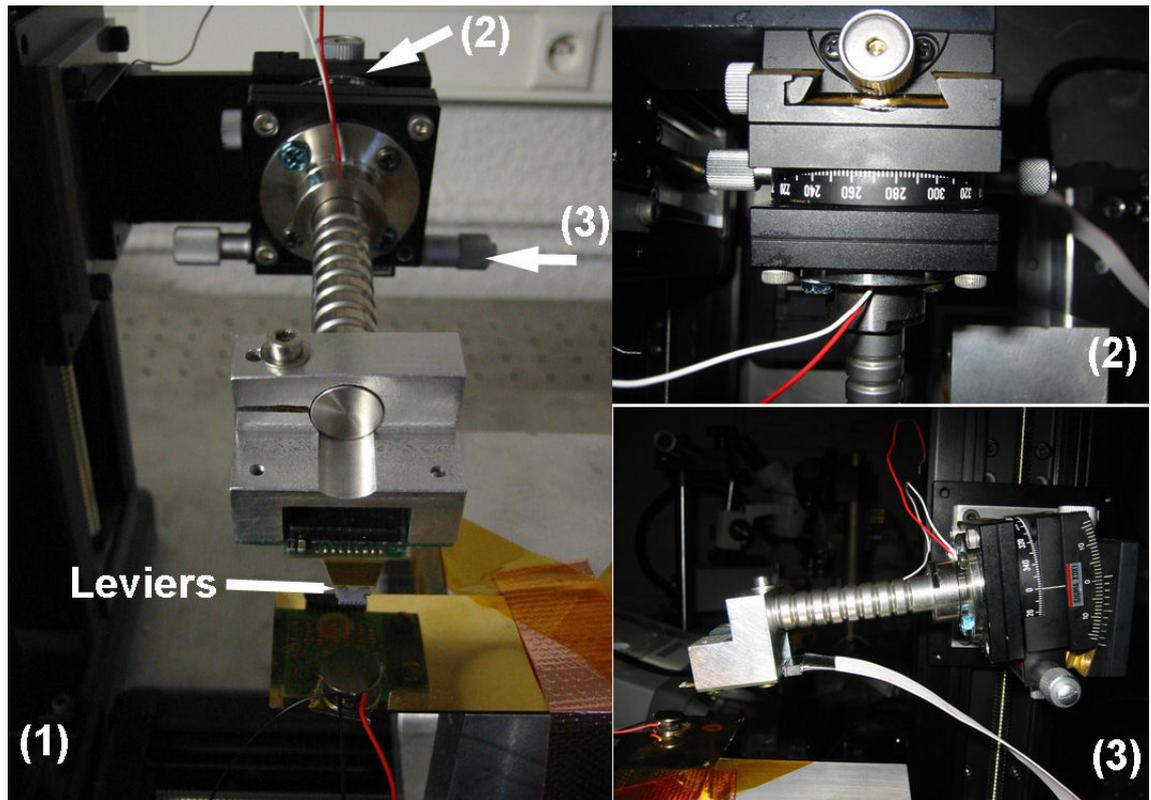


Fig. 2.7 : (1) : Support levier et électronique, (2) et (3) : Réglages angulaires

utilisé pour sécher les leviers lorsque ceux-ci ont été nettoyés. La température est d'environ 70°C dans son environnement proche (quelques millimètres) ce qui est largement suffisant pour sécher complètement les leviers.



Fig. 2.8 : Réservoirs à produits (1) et Peltier pour le séchage (2)

2.3.2 Interfaçage

Cette partie décrit les connexions entre les différents éléments et l'interface graphique permettant à l'utilisateur de réaliser les dépôts à l'aide de la table XYZ.

L'utilisateur utilise le PC et un logiciel pour réaliser la biopuce. Il a pris soin auparavant de remplir les réservoirs avec les produits adéquats et d'assurer quelques réglages concernant le positionnement du support. Ensuite, le PC prend en charge le contrôle des différents axes de la table de positionnement des leviers, afin d'obtenir les spots désirés. Il communique « ses

ordres » à un boîtier de commande via un port série, dont le taux de transfert des données est de 9600 bauds.

Ceci est largement suffisant pour une partie de l'application correspondant à des déplacements relatifs ou absolus bien définis. Mais, nous nous sommes rendus compte que la dynamique du système ainsi contrôlé serait trop lente⁹ pour la précision que nous souhaitions atteindre. Aussi, un autre module a été ajoutée au boîtier permettant de contrôler celui-ci (et donc les axes de la plate-forme XYZ) sans passer par le PC et d'obtenir alors des temps de réponse bien plus rapides.

2.3.2.1 PC et carte d'acquisition

Une interface graphique (voir figure 2.9) a été programmée en VB6¹⁰ et permet de régler les paramètres de base pour réaliser des dépôts :

- nombre de colonnes et de lignes de la matrice de spots à réaliser,
- nombre de spots pouvant être réalisés avec un seul chargement,
- nombre de spots à réaliser avec le produit A, le produit B, etc. ... et enfin,
- l'espacement entre les spots adjacents.

Un certain nombre de paramètres supplémentaires a été rajouté afin de pouvoir affiner le contrôle du processus de dépôt, et de l'optimiser. Nous avons notamment plusieurs modes de fonctionnement pour l'étape de chargement du produit : nous avons déjà indiqué que les leviers étaient équipés d'électrodes permettant l'application d'un champ électrique. Tous les paramètres concernant l'application du champ électrique sont accessibles (durée, fréquence, tension crête à crête, etc...).

Le procédé de nettoyage comporte également des variantes paramétrables : nombre de cycles de nettoyage, choix d'agiter ou non les leviers dans le liquide de nettoyage, Toutes les vitesses sont également paramétrables : la vitesse de déplacement, la vitesse lors du dépôt, Enfin, l'interface permet à l'utilisateur de conserver en mémoire des positions récurrentes telles que l'emplacement des réservoirs, du système de chauffage peltier et du support où doivent être réalisés les dépôts.

Grâce à cette interface, l'utilisateur choisit le mode de fonctionnement (après avoir donc mis à jour tous ces paramètres et mis en mémoire tous les points de fonctionnement importants), soit il contrôle chaque spot, soit il laisse l'expérience se dérouler dans son intégralité avec comme seule possibilité celle de l'interrompre à tout moment et de manière définitive si un problème technique survenait.

Tous les « ordres » sont communiqués au contrôleur d'axes (*Stage Controller*) (Cf. paragraphe 2.3.2.2) via une connexion RS232. Pour ce qui est de la génération des signaux pour l'application du champ électrique (pour le processus de chargement notamment), c'est un boîtier (voir figure 2.10) constitué principalement de connexions BNC qui est utilisé. Ce dernier permet d'acquérir et de générer des signaux dont la tension est comprise entre -10 Volts et +10 Volts. Nous l'utiliserons en acquisition de signal pour détecter la fin de la réalisation d'un dépôt (voir paragraphe 2.4.2 pour les détails sur ce point).

La dernière composante de l'installation « PC » connectée au boîtier précédent, est une carte d'acquisition qui permet de contrôler des variations de tensions, qui pour notre application sont les variations de tensions dues au contact entre les leviers et la surface de dépôt et plus précisément à la déflexion alors induite. Nous détaillerons dans le paragraphe 2.4.2, l'utilisation de cette tension. Retenons simplement pour l'instant que le module utilisé est une carte de National Instruments, NI-DAQ, PC-MIO16XE, qui permet l'acquisition de signaux compris

⁹La communication par le port série et surtout l'utilisation de Visual Basic et d'un système d'exploitation ralentissent considérablement les temps de réponse lors d'une communication.

¹⁰Visual Basic 6.0

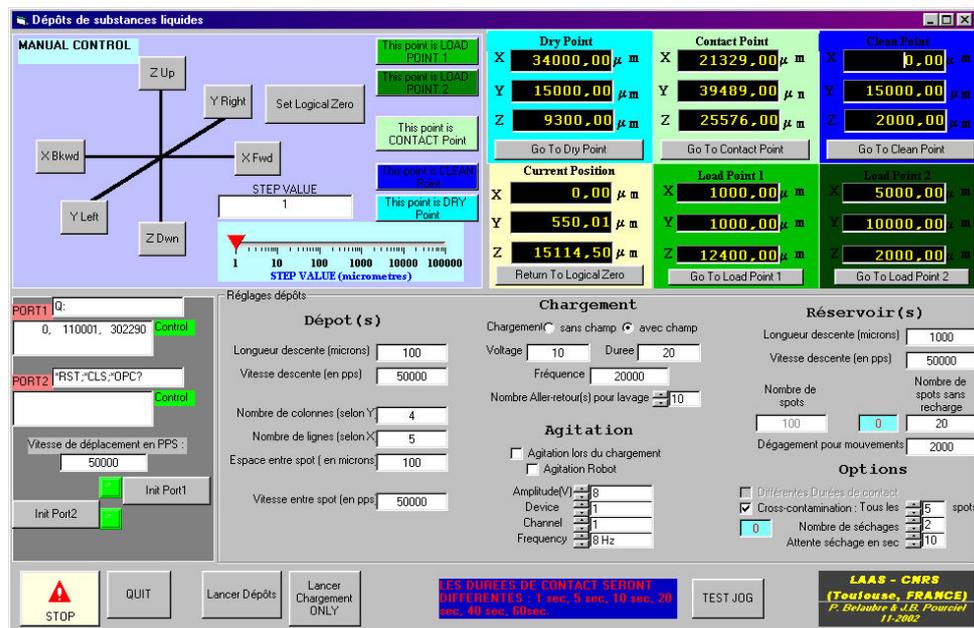


Fig. 2.9 : Interface graphique pour l'utilisateur

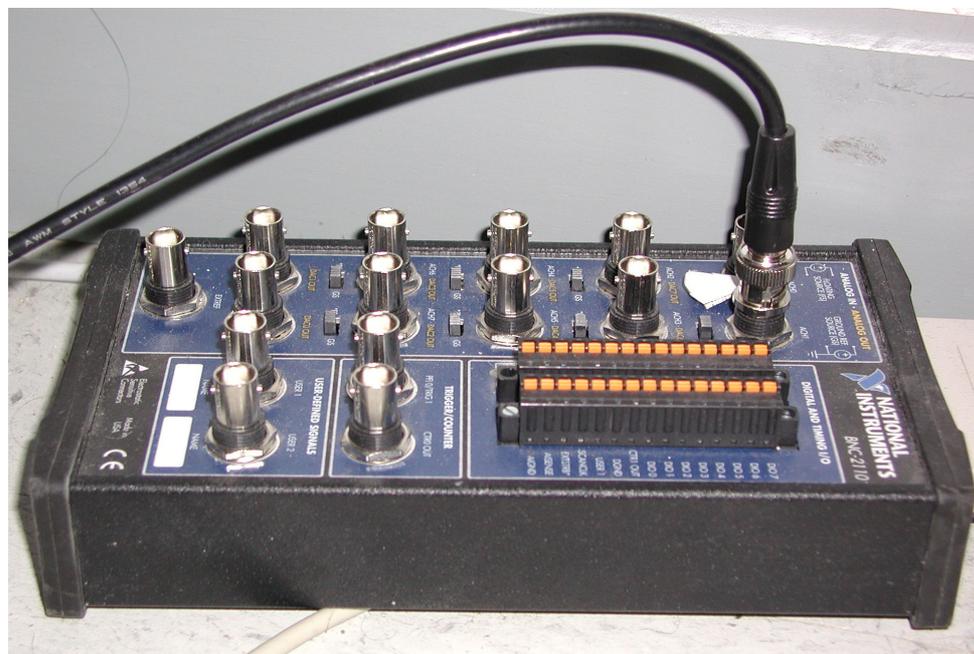


Fig. 2.10 : Boîtier de transmission et de réception des signaux

entre -10 Volts et +10 Volts et à une fréquence d'échantillonnage¹¹ de 100 kHz via le boîtier précédemment décrit, ou la génération de tensions -10V/+10V.

2.3.2.2 Le contrôleur d'axes

C'est le véritable interprète entre les commandes transmises via le logiciel par le PC et les différents axes de la table. L'ensemble des axes de la table XYZ est relié au contrôleur qui lui-même est connecté au PC par une ligne de communication série RS 232.

Il possède différents modes de fonctionnement :

- Mode HOST : les axes peuvent être contrôlés via une transmission de signaux vers ou provenant d'un autre appareil tel un PC. Les commandes sont des chaînes de caractères.
- Mode MANUAL : les axes sont alors opérés directement par l'utilisateur en utilisant les commandes (boutons) disponibles sur le Pad. Les « interrupteurs de mémoire¹² » qui gèrent des paramètres internes, peuvent également être modifiés dans ce mode de fonctionnement.
- Mode REMOTE (EXECUTE) : les axes sont cette fois-ci contrôlés par les signaux en entrée/sortie connectés sur le contrôleur. Ces signaux sont générés par un système de contrôle externe. Ce mode met à disposition un panel de commandes plus réduit telles que le lancement de programme interne, mouvement à vitesse constante, arrêt, réglage des vitesses, ...
- Mode TEACHING (PROGRAM) : tous les paramètres de la position actuelle peuvent être mémorisés et transférés sur un PC ou dans un programme interne au contrôleur. A noter que dans ce mode, les axes peuvent être contrôlés et déplacés via le Pad.
- Mode EDIT : il s'agit du mode d'édition des programmes internes. Deux programmes au maximum peuvent être saisis.
- Mode LOAD : ce mode permet à la fois de charger un programme d'un PC pour le stocker en interne (ainsi que tous les paramètres) et inversement de stocker dans le PC des données internes (up load and download).
- mode TEST : ce mode permet de tester les états des entrées/sorties contrôlant les axes en mode REMOTE.

Son rôle est également de renvoyer des états au PC, soit des positions absolues, soit le fait que la dernière action est terminée et qu'ainsi la suivante peut être lancée. Il peut éventuellement envoyer des messages d'erreur et possède un interrupteur prioritaire sur n'importe quel type de commande pour les axes qui arrête et annule tout mouvement ou toute commande (STOP d'URGENCE).

Un PAD, permettant de contrôler manuellement (mode MANUAL) les axes, lui est également connecté. Il permet entre autres, de régler tous les paramètres internes qui influent sur le fonctionnement et le contrôle des axes (vitesse en impulsions par seconde, pas par impulsion, mode de communication, etc.).

La figure 2.11 présente le PAD ainsi que le contrôleur. Un deuxième contrôleur est également utilisé (et peut également être piloté par le PC) pour piloter une rotation selon l'axe Z, des supports fixés sur l'axe Y.

Le contrôleur d'axes est principalement utilisé en mode HOST, c'est-à-dire qu'il est contrôlé

¹¹Il faut bien préciser que cette fréquence d'échantillonnage est une fréquence d'acquisition. Lorsque l'on souhaite, par exemple, à partir des valeurs acquises calculer une loi de commande, ces calculs prennent du temps et l'envoi de la commande sur le système également, rendant l'échantillonnage à 100 kHz beaucoup trop rapide par rapport à ce calcul. Ainsi, avec le logiciel de développement VB6, le système d'exploitation, et la vitesse du processeur utilisé, il nous était impossible de calculer une loi de commande à cette fréquence là.

¹²Memory switch : Paramètres internes, tels que la vitesse (de chaque axe), les informations de communication (Baud rate, ...), les paramètres du pas pour une impulsion, l'origine relative d'un axe, ...



Fig. 2.11 : Contrôleur de la table : Interface PC/Table

par le PC. Mais pour notre application et pour des raisons détaillées¹³ dans le chapitre 4, paragraphe 4.4.2, nous avons dû utiliser également le mode REMOTE (contrôle réalisé par les entrées/sorties du contrôleur). Le PC peut à la fois « avoir la main », mode HOST, puis la passer au contrôleur d'axes, mode REMOTE, et ensuite reprendre le contrôle. Ceci montre le double rôle joué par le contrôleur, même si celui-ci reste en fait toujours sous l'autorité du PC. Ceci va être décrit plus en détails dans le paragraphe 2.4.2.

2.3.3 Contrôle visuel de l'expérience

Pour l'observation visuelle, nous distinguerons deux parties : d'une part, une visualisation par caméra avec zoom qui sert au contrôle du bon déroulement de l'expérience, et d'autre part, un microscope optique permettant de valider et de qualifier les résultats. Après une méthode « directe » de visualisation, nous allons décrire deux outils qui utilisent le fait que les sondes ou les cibles à observer sont marquées en fluorescence.

Le système de contrôle par caméra et écran TFT est également relié au PC pour une acquisition d'images ou de films. Il est installé afin d'observer en direct le bon déroulement des opérations commandées par le robot. Il est à noter que ce système de visualisation est très pratique car lors de la réalisation des dépôts, les micro-gouttes formées sur la surface sont le plus souvent invisibles à l'oeil nu. Le système de visualisation avec un grossissement de 270, permet de voir ces gouttes et ainsi d'avoir une première idée sur le bon fonctionnement de l'expérimentation en cours (ce qui n'est pas le cas sur les outils de dépôts actuels).

Mais si ce contrôle semble nécessaire, il n'est toutefois pas suffisant et c'est pourquoi nous nous devons d'utiliser d'autres moyens afin de contrôler les dépôts. Nous utilisons la fluorescence afin de « marquer » nos dépôts. Ensuite, deux appareils sont à notre disposition : un microscope et un scanner. Ces deux outils permettent, a posteriori, d'obtenir des images en fluorescence de nos dépôts et vont être décrits dans les deux paragraphes qui suivent.

¹³La raison principale étant une vitesse de communication trop lente en mode HOST.

2.3.3.1 Le microscope

Le principe du microscope est d'éclairer en lumière blanche le support de la biopuce à travers un filtre qui ne laissera passer que la longueur d'onde correspondant au marqueur fluorescent utilisé. Une fois la mise au point effectuée sur la surface ayant reçu les dépôts, seuls les emplacements où une cible marquée se sera fixée seront visibles. La figure 2.12 montre le microscope (a) que nous avons utilisé au LAAS et le type d'image numérique obtenue (b), en ayant positionné un appareil photo numérique sur l'objectif. Il s'agit d'un microscope optique inversé Olympus (IX70).

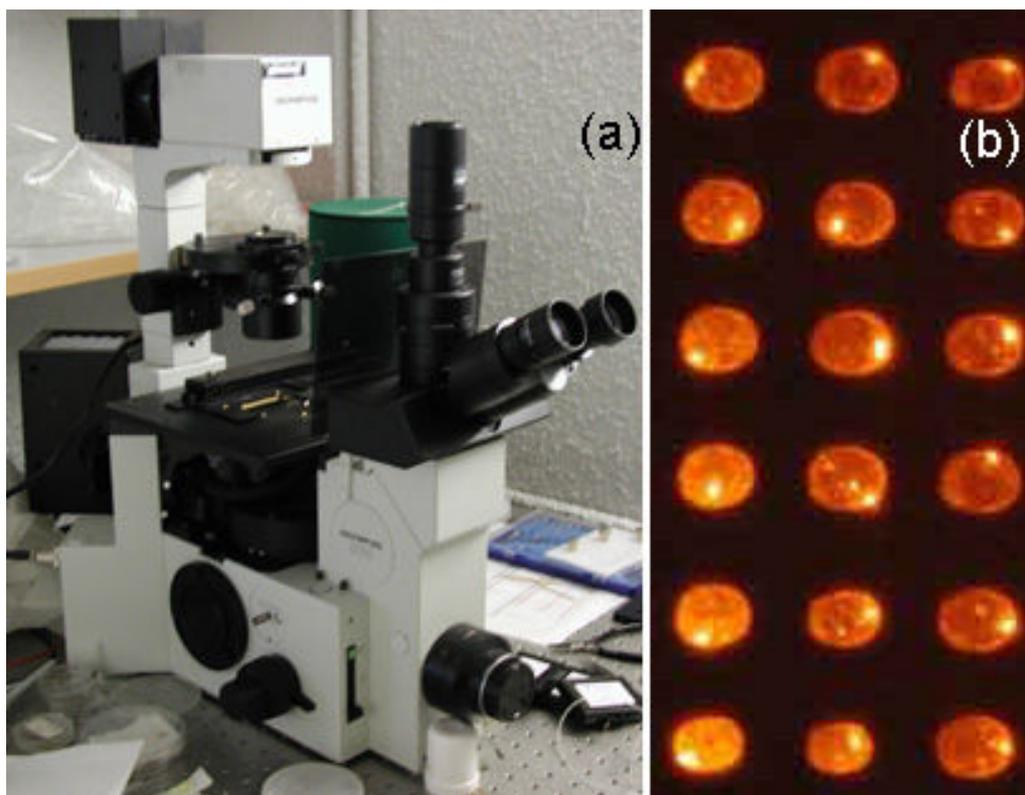


Fig. 2.12 : Microscope (a) Image obtenue (b)

2.3.3.2 Le scanner

Le principe de fonctionnement du scanner est très similaire à celui des scanners utilisés en micro-informatique : la surface est balayée par une tête de lecture, mais la différence réside dans le fait que nous n'éclairons pas la surface avec de la lumière blanche. Nous utilisons des longueurs d'onde bien déterminées qui dépendent du marqueur utilisé sur les produits déposés. Les images obtenues sont donc des images en fluorescence. Les zones ne possédant pas d'éléments éclairant à la longueur d'onde désirée restent noires. Ces scanners sont distingués sous l'appellation de ScanArrayersTM.

Nous avons utilisé deux scanners différents, présentant des résolutions¹⁴ différentes. Ainsi, le GenePix 4000B, que possède la plate-forme transcriptôme du Génomole de Toulouse, a une résolution de 10 μm par pixel. On comprend aisément que cette résolution devient rapidement

¹⁴Nous entendons par résolution la taille que représente un pixel affiché à l'écran dans l'image résultant de l'analyse.

insuffisante lorsque nous réalisons des spots de l'ordre de la dizaine de microns en diamètre. L'image « pixellise » et devient assez rapidement peu claire. Cependant, cet instrument de lecture permet de travailler à deux longueurs d'onde différentes, et ainsi d'obtenir soit deux images distinctes, soit une image résultant de leur superposition. Il utilise des lasers de 532 nm (17 mW) et de 635 nm (10 mW) réduisant ainsi le temps de balayage à environ 5 minutes par lame de verre à la résolution maximale de $10 \mu\text{m}$ par pixel. Au niveau de la détection proprement dite, sa limite est de $0,1 \text{ fluor}/\mu\text{m}^{215}$ pour la Cyanine 3 (Cy 3) et la Cyanine 5 (Cy 5).

Le deuxième instrument utilisé est le BioAnalyzer Reader de LaVision Biotec, Bielefeld. Cet instrument de lecture possède une résolution de $1 \mu\text{m}$ par pixel, beaucoup plus appropriée à nos travaux. La figure 2.13 présente dans sa partie supérieure les deux appareils (GenePix à gauche, BioAnalyzer à droite) et dans la partie inférieure les deux images obtenues après le scanning d'une même surface. On voit aisément qu'avec le BioAnalyzer il est possible de distinguer les formes de spots de façon claire, même avec des spots avoisinant les $10 \mu\text{m}$ de diamètre. Cependant, nous n'avons pu utiliser cet appareil que lors d'une mise à l'essai.

2.4 Perspectives en cours

2.4.1 Vers des leviers piézorésistifs

On peut déjà dire que les leviers que nous avons développés et utilisés sont actifs, dans le sens où nous utilisons des électrodes placées le long du canal qui permettent de contrôler le transfert de liquide sur nos leviers, via la mouillabilité et la tension de surface. Le positionnement de ces électrodes pourrait être optimisé (dans le sens où cela améliorerait le processus de chargement du produit) en les plaçant directement à l'intérieur du canal en suivant une technique proche de celle développée par Ishizuka [50] à l'université de Waseda, Japon.

Mais une amélioration sera ajoutée à nos leviers : des piézorésistances, qui agiront comme des capteurs de force (voir schéma de principe sur la figure 2.14) en mesurant une déflexion plus ou moins importante des leviers. Un tel système permettra d'aligner parfaitement les leviers par rapport à la surface de dépôt d'une part, et d'autre part de contrôler parfaitement à la fois le temps d'appui et la force d'appui. De ces paramètres dépendent l'homogénéité des spots déposés, la cohérence des résultats et la validité de notre approche.

C'est un des avantages majeurs de notre approche car ce type de contrôle actif n'existe pas sur les systèmes commerciaux. C'est pourtant un aspect qu'il faut prendre en compte car il peut engendrer des disparités importantes lors du dépôt, dues à l'usure de la micro-aiguille, ou encore à des dérives mécaniques.

2.4.1.1 Principe de fabrication

Pour intégrer des piézorésistances, il est nécessaire de le faire avant l'étape A de la figure 2.2 (Cf. 2.2.2). Une couche d'oxyde mince est tout d'abord déposée avant l'implantation des dopants dans le silicium. L'épaisseur de cet oxyde, la dose et l'énergie du dopage doivent être choisies judicieusement pour obtenir une sensibilité maximale de la piézorésistance. L'oxyde (A) est ensuite déposé puis ouvert par attaque chimique au niveau des contacts de la piézorésistance, puis un dépôt métallique est réalisé (B) par lift-off prenant en compte les pistes servant d'électrodes et les pistes pour les piézorésistances. Le procédé de fabrication se poursuit ensuite normalement.

¹⁵0,1 mol de fluorochrome (molécule fluorescente) par μm^2 .

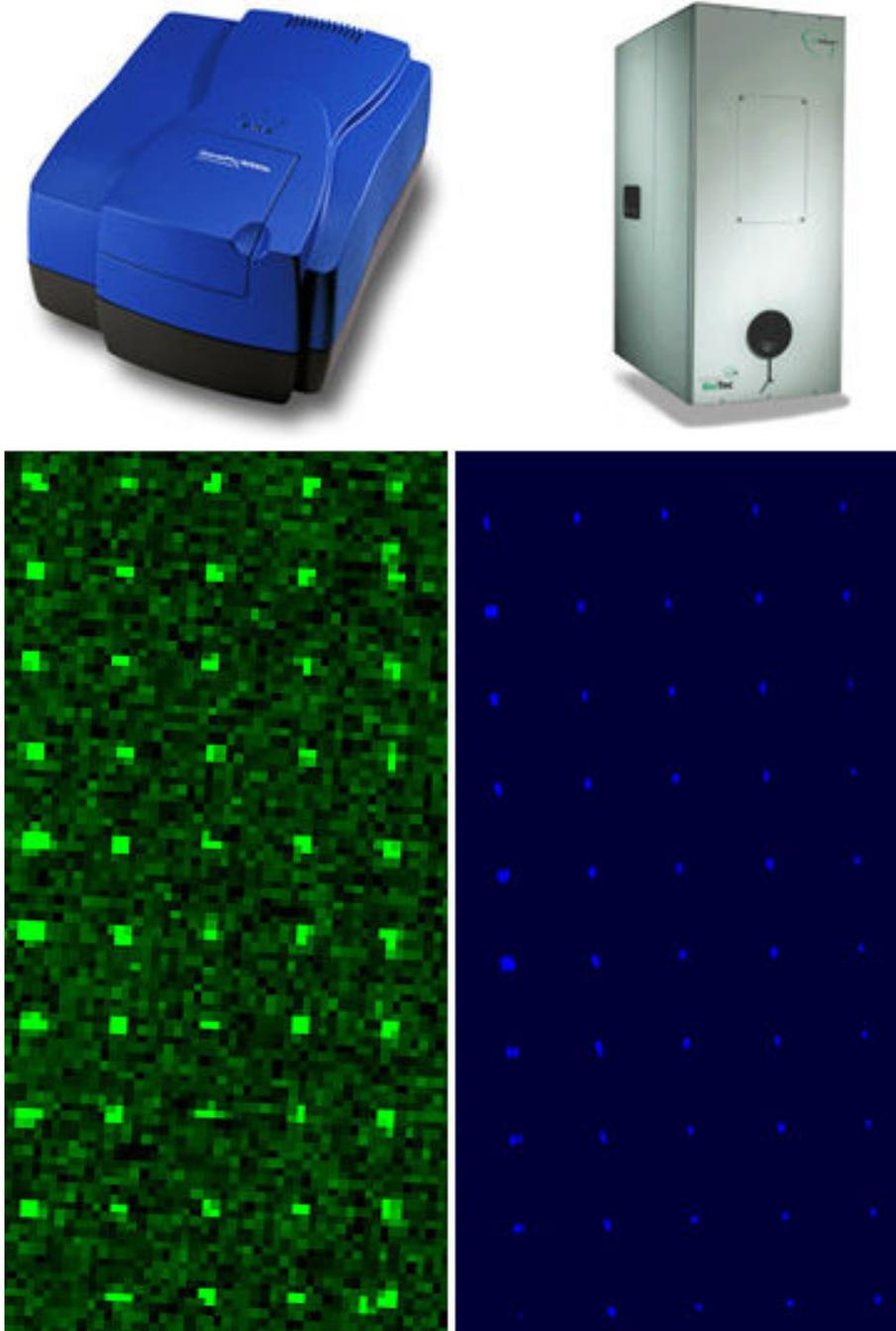


Fig. 2.13 : ScanArrayers : GenePix (gauche) et BioAnalyzer (droite) de résolutions respectives de 10 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ et 1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$

2.4.1.2 Principe d'utilisation

Le principe du contrôle actif serait alors le suivant :

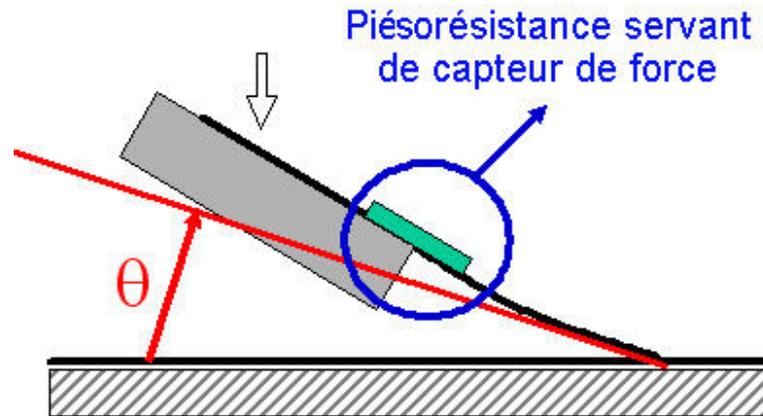


Fig. 2.14 : Principe de fonctionnement des leviers équipés de piézorésistances

Nous fabriquons des rangées de leviers dont les deux leviers situés aux extrémités sont équipés de jauges de contraintes piézorésistives ou piézorésistances (voir figure 2.15 pour le principe). Une première étape d'étalonnage est alors nécessaire, afin d'aligner parfaitement les leviers avec la surface de dépôt, de telle sorte qu'il y ait contact simultané (et avec une même force) sur les deux leviers lors de la descente. Ensuite lors du dépôt, ces capteurs servent à contrôler le temps de contact et la force d'appui. Notons qu'un contrôle actif de la coplanarité entre la rangée de leviers et la surface est prévu mais n'a pas été réalisé à l'instant de la rédaction.

Notre première intention était de coupler les piézorésistances aux leviers servant à réaliser les dépôts. Deux raisons s'opposent à ce choix :

- une telle réalisation compliquerait considérablement la fabrication des leviers et surtout la connectique qui en découlerait. N'oublions pas que d'une part, les électrodes longeant le canal doivent être connectées, et que d'autre part, les leviers piézorésistifs nécessitent 4 connexions chacun ;
- ensuite, les leviers exerçant le double rôle de déposer et contrôler le dépôt seraient perturbés dès la phase de remplissage. En effet, toute modification ou nouvelle contrainte en surface modifie la valeur de la piézorésistance. Ainsi, lors de la phase de chargement du produit à déposer, cette valeur varierait mais ne correspondrait pas à une déflexion due au contact. La mesure de la force d'appui deviendrait très difficile à obtenir.

A noter que deux versions sont envisageables :

- une version contenant des micro-leviers piézorésistifs de même longueur que les micro-leviers servant au dépôt, et qui ainsi permet véritablement de mesurer la force exercée sur les micro-leviers et le temps de contact,
- une autre où les micro-leviers piézorésistifs sont un peu plus longs, permettant d'avoir un laps de temps pour corriger de manière dynamique une éventuelle erreur de coplanarité avant la réalisation des spots, et d'obtenir un contrôle plus fin du dépôt. Par contre dans ce cas, on ne mesure pas le temps de contact des micro-leviers effectuant le dépôt mais celui des micro-leviers piézorésistifs.

La mise en place de cette technique est décrite dans le paragraphe suivant qui présente le dispositif électronique permettant d'utiliser les piézorésistances.

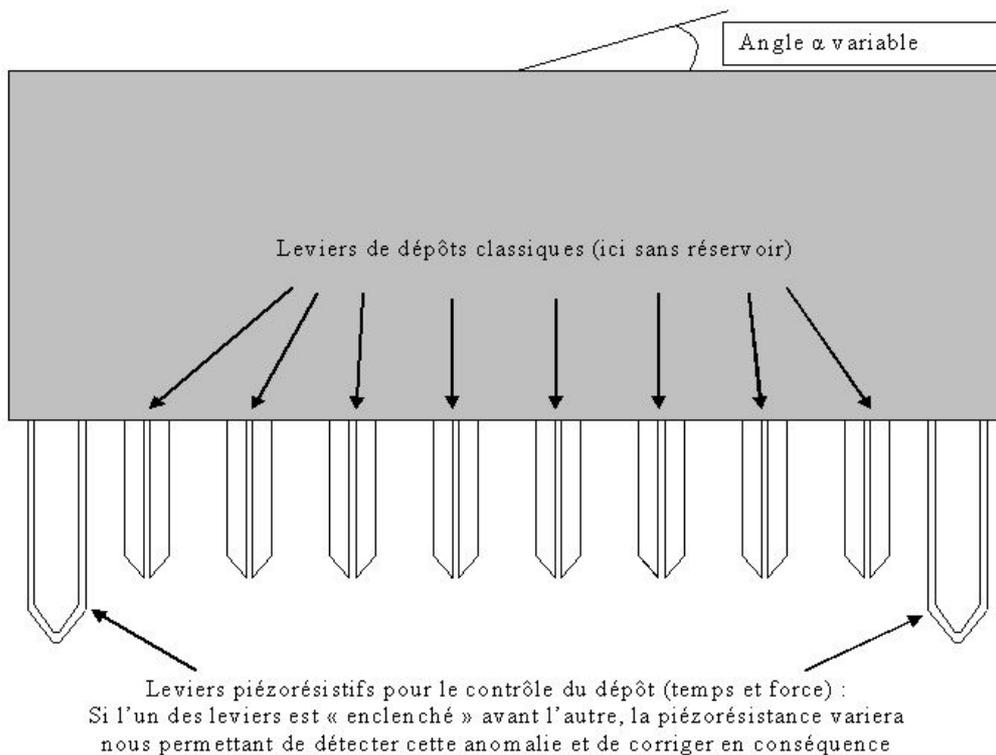


Fig. 2.15 : Utilisation des leviers piézorésistifs

Enfin, une dernière étape concernant les leviers peut être envisagée. Il s'agit d'adapter les leviers aux systèmes de dépôt actuels afin de pouvoir comparer les possibilités de nos micro-outils avec les pointes commerciales actuelles. C.J. Kim [51] a réalisé des outils en silicium directement adaptables sur le système de dépôt. Mais le principe de fonctionnement de ce système nécessite forcément du jeu dans la liaison pointe/table de positionnement, qui à notre échelle de travail (environ une dizaine de microns de diamètre) n'est plus négligeable. En effet, les outils sont reliés à la table de positionnement au moyen d'une liaison pivot-glissante. Ainsi, lors du contact avec la surface de dépôt, les outils glissent dans leurs emplacements et seul leur poids exerce une force sur le support. Pour que ce glissement ait lieu, il nécessite obligatoirement un jeu. Ceci entraîne une trop grande erreur dans l'alignement des spots et leur disposition en général (figure 6 [51]), ce qui est problématique pour la phase d'analyse, car le traitement des données repose sur l'hypothèse que les dépôts sont répartis uniformément sur la surface. De plus, ce mode de fonctionnement ne permet pas vraiment de paramétrer la taille des spots : la force d'appui ne pouvant varier, seule la diffusion du liquide sur la surface peut modifier la taille des spots, mais c'est un phénomène lent. Il nécessiterait donc une grande augmentation du temps de contact afin de modifier la taille des spots. Nous rappelons que dans notre cas, aucun jeu n'est possible et la force d'appui peut être modifiée, car les leviers sont totalement solidaires de la table de positionnement. La force d'appui permet de modifier l'angle de contact entre les leviers et la surface de dépôt. Nous pouvons donc à la fois agir sur cet angle (et donc la capillarité) et sur le temps de contact pour modifier la taille de nos spots.

2.4.2 Dispositif électronique de lecture

Le dispositif électronique de lecture constitue la partie de la plate-forme, développée par F. Mathieu et D. Lagrange du service Informatique/Instrumentation du LAAS, qui contrôle la phase de descente des leviers vers le support, le contact ou appui sur cette même surface, le temps de contact et la phase de remontée des leviers. C'est grâce à ce contrôle actif en temps-réel que nous pourrions garantir une homogénéité des spots en temps de contact et force d'appui et donc en volume déposé grâce aux piézorésistances intégrées aux micro-leviers.

2.4.2.1 Hypothèse de fonctionnement

On se place dans le cas où les leviers se situent au dessus de l'emplacement désiré pour réaliser le spot. Ainsi, nous ne décrivons que le fonctionnement d'un point de vue micro-informatique et électronique pour la réalisation (descente, arrêt et remontée des micro-leviers).

Les schémas de la figure 2.16 indiquent le fonctionnement global d'un point de vue du PC (en haut) qui supervise l'expérimentation, et d'un point de vue électronique (en bas), détection et contrôle du contact.

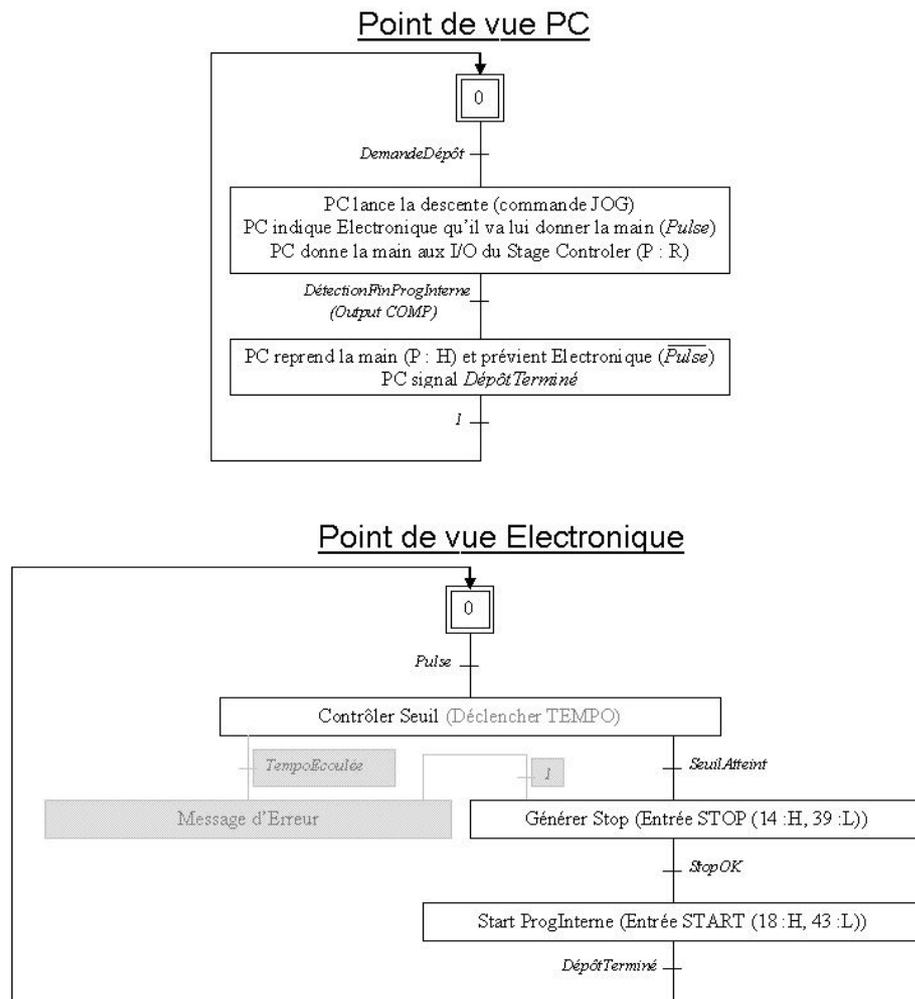


Fig. 2.16 : Graficets de fonctionnement du contrôle actif du dépôt

2.4.2.2 Point de vue PC

Lorsqu'une demande de dépôt est générée par le programme d'exécution, le micro-ordinateur lance la descente des leviers à une vitesse constante (paramétrée par l'utilisateur) et donne ensuite le contrôle à l'électronique (passage en mode REMOTE, c'est donc les entrées/sorties (générées par l'électronique) du contrôleur d'axes qui pilotent ce dernier) après lui avoir indiqué ce changement par une impulsion (*Pulse*). Le logiciel dans le PC est alors bloqué jusqu'à la détection de la fin d'exécution du programme interne du contrôleur d'axes.

Lorsque cette détection est effective, le PC reprend le contrôle en repassant en mode HOST et prévient l'électronique que son « travail » est terminé en envoyant une nouvelle impulsion (*Pulse*).

Le dépôt est ainsi réalisé et la procédure de réalisation d'un dépôt est à nouveau dans son état initial et attend une prochaine demande de dépôt (*DemandeDépôt*).

2.4.2.3 Point de vue électronique

Le dispositif électronique attend avant de démarrer et de véritablement contrôler les valeurs des piézorésistances « l'autorisation » du PC (signal *Pulse*). Lorsque celle-ci est reçue, la tête de lecture s'attache alors à détecter le seuil de variation entré par l'utilisateur (variation de la résistance, durée du contact, ...). En parallèle peut être lancée une temporisation qui sert de sécurité : si cette temporisation s'est écoulée avant la détection du seuil de variation, c'est qu'un problème s'est produit et qu'il faut arrêter la procédure de dépôt.

Dans les deux cas (seuil détecté ou temporisation écoulée), le système électronique engendre sur les entrées / sorties 14 et 39 du contrôleur d'axes un STOP qui arrête la descente de l'axe Z et des leviers. Ensuite, il lance un programme interne au contrôleur d'axes qui engendre une remontée de l'axe Z de 100 μm . Une fois ce programme interne terminé, le contrôleur d'axes génère automatiquement sur ses sorties une impulsion qui servira à indiquer au PC la fin du dépôt (*DépôtTerminé*).

Enfin, dès réception d'une nouvelle impulsion *Pulse* de la part du PC, l'électronique s'initialise et stoppe son activité de contrôle.

Remarques Diverses

- La transition StopOK n'existe pas, et il n'y a pas de moyen de détecter l'arrêt complet de l'axe du robot. Cependant, on peut estimer la distance parcourue après l'envoi de l'arrêt grâce au temps de contact, en considérant que le dernier déplacement s'est déroulé à la vitesse de descente (ce qui revient à majorer notre distance, vu qu'il y a décélération) . La vitesse de descente influence ce paramètre.
- Le dispositif électronique doit donc être capable de contrôler deux entrées ; STOP et START. Le principe utilisé pour connecter ces entrées sera le suivant :

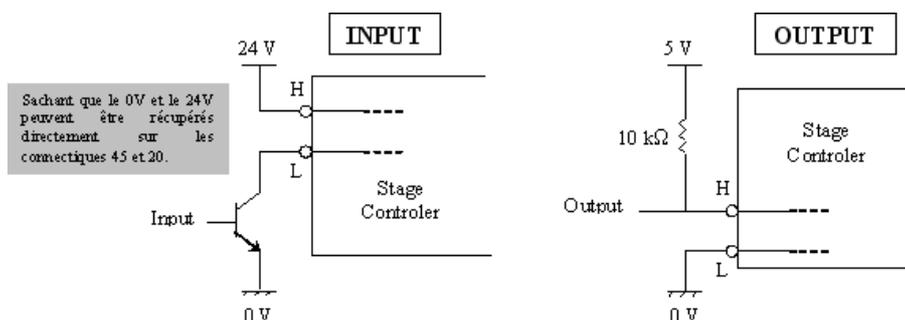


Fig. 2.17 : Connexions des entrées et sorties du contrôleur d'axes

- La connectique ainsi que le nombre de connexions entre la carte de lecture, le contrôleur d'axes et le PC sont décrites dans le schéma 2.18.

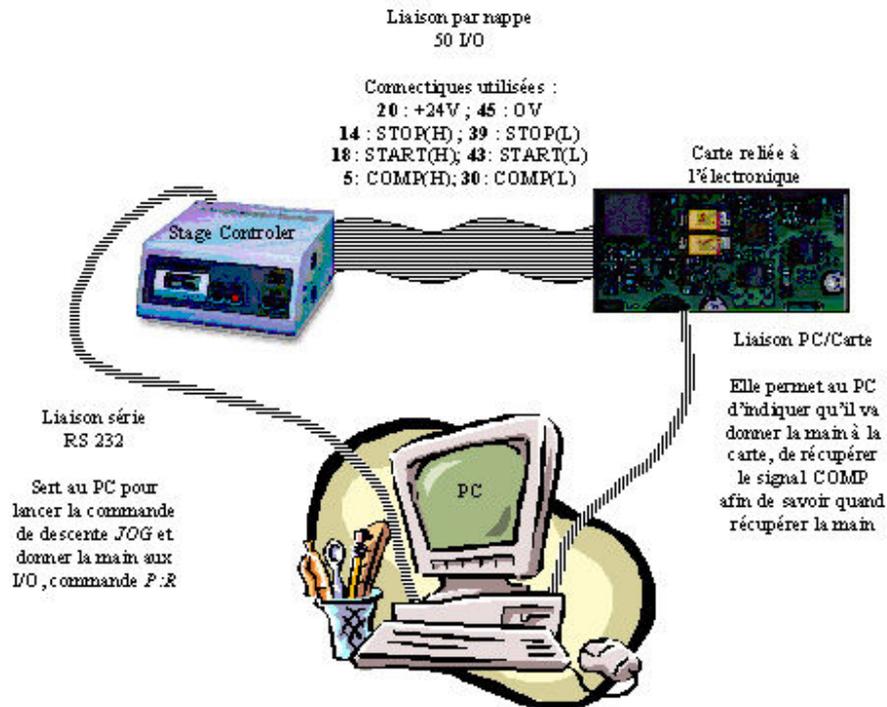


Fig. 2.18 : Connexions entre les différents éléments du contrôle actif

La figure 2.19 montre à la fois le micro-système (1), le capteur à micro-leviers (2) et l'ergonomie d'un micro-levier (3). Attention, ces micro-leviers sont les micro-leviers piézorésistifs et ne servent aucunement à déposer un produit. Le peigne que l'on peut visualiser sur la figure 2.19 contient uniquement des leviers servant de capteurs.

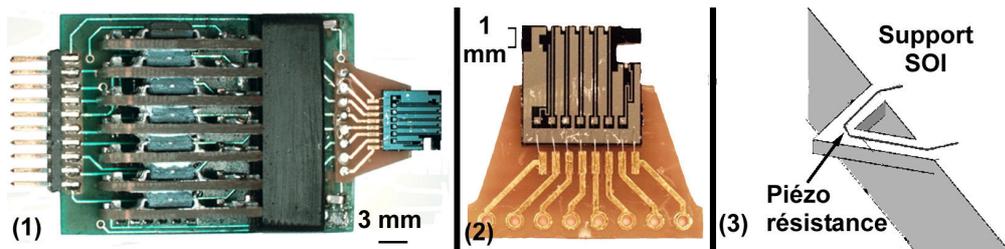


Fig. 2.19 : (1) Le micro-système (2) Le capteur à micro-leviers (3) Ergonomie retenue d'un micro-levier.

Remarque : Notons que pour nous affranchir des phénomènes d'évaporation (les volumes des liquides utilisés étant très faibles), nous pourrions utiliser une enceinte permettant de réaliser les expérimentations sous atmosphère contrôlée (température et humidité). Même si cette possibilité devra être sérieusement reconsidérée lors d'une nouvelle réduction des échelles de travail, elle n'apparaît pas a posteriori comme nécessaire (Cf. chapitre 3).

2.5 Conclusion

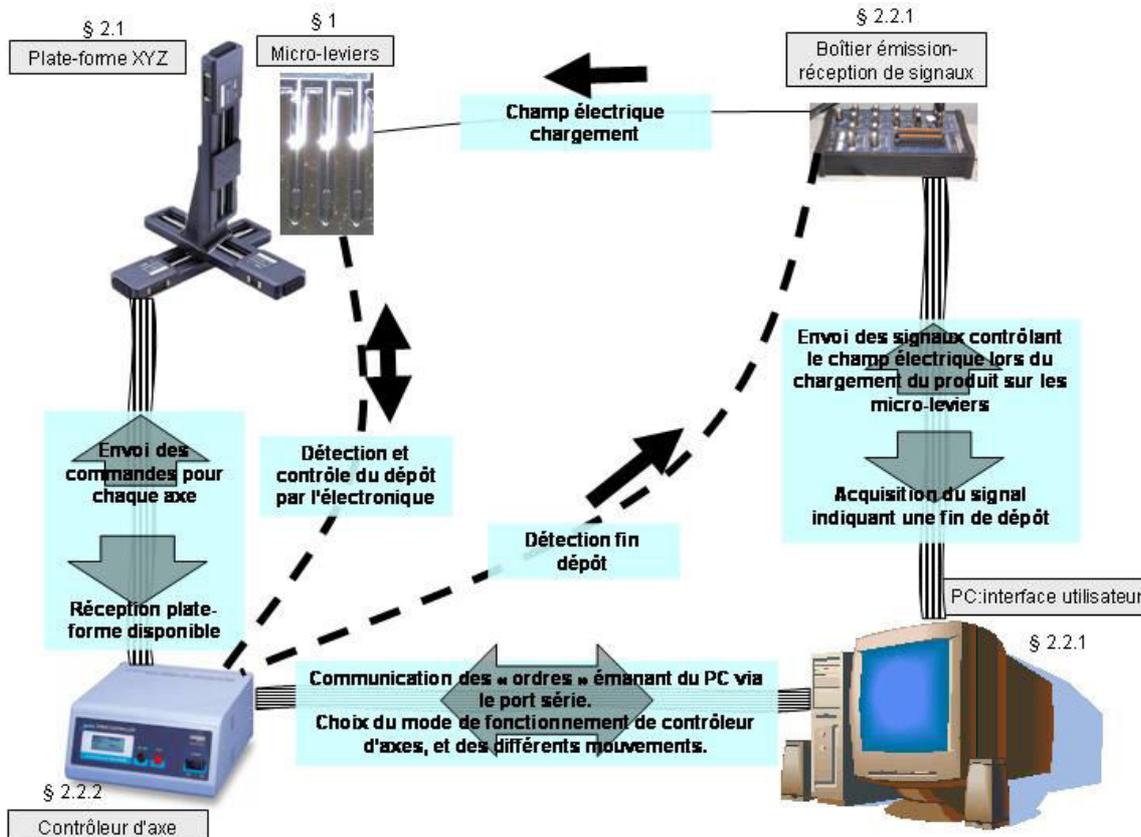


Fig. 2.20 : Communications et liaisons dans la plate-forme expérimentale

Dans le premier chapitre, nous avons justifié le choix de la technique de dépôt que nous avons utilisée. L'objectif de ce deuxième chapitre était de décrire de façon aussi complète que possible l'environnement des travaux et les différents outils utilisés.

Il s'agissait ainsi de décrire nos besoins, et de justifier les réponses et choix que nous avons faits. Désormais, afin d'être compatible avec les micro- et nano-technologies, il nous faut disposer d'un système ayant une précision, et des caractéristiques au niveau vitesse et liberté de mouvements suffisantes afin de répondre à une fabrication de biopuces peu coûteuse, rapide et en parallèle. Nous disposons d'un système d'observation visuelle du déroulement de l'expérience et avons recours à des techniques classiques de lecture en fluorescence pour valider notre approche et calibrer le système.

Afin de contrôler l'homogénéité des spots, maîtriser la force d'appui lors du contact est devenu primordial. Sans capteur, les leviers permettent déjà une certaine homogénéité (variation du diamètre des dépôts de l'ordre de 10 %, équivalente à celle des systèmes classiquement commercialisés). Cependant, il apparaît nécessaire d'en intégrer afin de contrôler et d'observer le temps de contact et la force appliquée lors du contact avec le support. Cette évolution nécessite l'utilisation d'un système électronique externe couplé au microcalculateur. L'utilisateur doit entrer correctement ses paramètres, préparer les différents produits, de dépôt et nettoyage, dans les différents réservoirs.

Tout ce système de communication et les liaisons entre les différents périphériques de notre plate-forme expérimentale sont présentés sur la figure 2.20. On peut observer que les liaisons

correspondant à l'utilisation des leviers pézorésistifs ont été mises en pointillés car cette partie est en cours de réalisation. Nous montrerons plus tard (Cf. chapitre 4, paragraphe 4.4.2) que, d'un point de vue fonctionnel, leur utilisation a été validée avec notre plate-forme.

Un de nos premiers objectifs a été atteint, à savoir une réduction du coût. En effet, la plate-forme expérimentale que nous venons de décrire est bien moins chère que les systèmes classiquement commercialisés. Reste qu'il nous faut désormais démontrer qu'elle est utilisable pour la fabrication de biopuces, i.e. qu'elle répond aux attentes et besoins des utilisateurs de biopuces en général, les biologistes.

Expérimentations et résultats

Sommaire

2.1	Introduction	35
2.2	Les leviers	36
2.2.1	Idée de départ	36
2.2.2	Procédé de fabrication	37
2.2.3	Vers des leviers actifs	39
2.2.3.1	Traitements de surface	39
2.2.3.2	Contrôles actifs	40
2.3	La plate-forme expérimentale	40
2.3.1	La table de positionnement XYZ	41
2.3.2	Interfaçage	43
2.3.2.1	PC et carte d'acquisition	44
2.3.2.2	Le contrôleur d'axes	46
2.3.3	Contrôle visuel de l'expérience	47
2.3.3.1	Le microscope	48
2.3.3.2	Le scanner	48
2.4	Perspectives en cours	49
2.4.1	Vers des leviers piézorésistifs	49
2.4.1.1	Principe de fabrication	49
2.4.1.2	Principe d'utilisation	51
2.4.2	Dispositif électronique de lecture	53
2.4.2.1	Hypothèse de fonctionnement	53
2.4.2.2	Point de vue PC	54
2.4.2.3	Point de vue électronique	54
2.5	Conclusion	56

3.1 Introduction

Le chapitre précédent a permis de décrire l'ensemble des instruments et outils dont nous disposons, notamment les micro-leviers. Ceux-ci ont suivi une évolution dictée par l'apparition d'une difficulté majeure, remplir le canal (large de $5 \mu m$) et le réservoir des micro-leviers avec le produit que nous souhaitons déposer (Cf. chapitre 4). Le chapitre suivant apportera une réponse aux problèmes rencontrés lors du chargement des produits sur les leviers. La solution mise en place permet de charger de manière suffisante (environ une centaine de dépôts réalisables pour un chargement) les produits à déposer en se basant sur l'utilisation d'un champ électrique.

Étant désormais capables de charger des produits, l'objectif de ce chapitre est de montrer la faisabilité en laboratoire et donc, le possible transfert des techniques issues des micro- et nano-technologies pour des applications comme la réalisation de biopuces. Ne perdons pas de vue que l'objectif principal, une réduction du coût de revient d'une biopuce, passe par une réduction du prix de l'outillage, par une réduction de la taille des spots, donc des quantités de produits utilisés et par une meilleure homogénéité, afin d'éviter la production de n-uplets pour valider un résultat¹.

Différentes étapes ont permis de valider notre approche. Ainsi la *première partie* s'attache à démontrer l'efficacité de la table de positionnement XYZ, en réussissant à obtenir avec des pointes du commerce classiques, des résultats similaires à ceux obtenus par d'autres systèmes de dépôt.

Les parties suivantes relatent les résultats obtenus en utilisant nos propres micro-leviers. La *deuxième partie* traite, dans un premier temps, du dépôt d'oligonucléotides (des séquences d'ADN) et démontre le bon déroulement de l'hybridation². Dans un second temps, elle aborde la problématique non triviale des puces à protéines et de leur réalisation. Le but est de montrer que cette interaction complexe protéine-protéine, ainsi que la fixation de ces protéines sur un support, est parfaitement réalisable en utilisant notre approche et nos outils.

Dans la *troisième partie*, nous étudions le contact entre le levier et la surface de dépôt lors du dépôt. Nous étudions notamment l'influence du phénomène de diffusion, car si les forces de capillarité sont prépondérantes dans le processus de dépôt, nous verrons que la diffusion peut aussi jouer un rôle non négligeable.

La *quatrième partie* s'intéresse à la problématique de la contamination croisée (cross-contamination) ou de la pollution. Une biopuce, quelle qu'elle soit, est composée de différents produits, et afin d'optimiser sa réalisation, il est intéressant (et presque nécessaire) de ne pas changer d'outillage pour chacun des produits. Ainsi, il fallait montrer la possibilité de déposer au moins deux produits différents avec un seul et même levier et trouver ainsi un protocole approprié de nettoyage et séchage des micro-leviers.

Une *cinquième partie* complète la démonstration de la compatibilité de notre système avec les micro- et nano-technologies, en présentant différentes expérimentations réalisées au sein du LAAS avec la table de positionnement. Elle débouchera sur une prospective importante liée à ce projet et portant sur les biopuces et les biocapteurs.

3.2 Validation de l'utilisation de la table XYZ

La première expérimentation qui nous paraît nécessaire, est d'être capable, en utilisant les outils classiquement utilisés et commercialisés, d'obtenir des résultats similaires en remplaçant le système de dépôt classique par la table de positionnement XYZ.

¹C'est-à-dire de reproduire plusieurs fois le même dépôt et de faire la moyenne des analyses sur ces dépôts pour valider un résultat.

²Réaction d'interaction en brin d'ADN, Cf. chapitre 1, section 1.2.1 et l'annexe A, section A.1.1.2

Ensuite, il faudra remplacer les pointes du commerce par nos leviers et effectuer une comparaison.

3.2.1 Validation avec les pointes classiques commerciales

Notre but est dans un premier temps, de déposer des solutions colorées, afin d'étudier le comportement vis-à-vis des pointes commerciales et lors du dépôt lui-même. C'est également le moyen de contrôler et d'observer comment s'effectue le transfert du liquide du réservoir dans le levier durant la phase de chargement, et du levier sur le support durant la phase de dépôt.

Ainsi avons nous commencé par déposer un mélange contenant un colorant (du Bleu de Bromothymol) et de l'eau. Afin de s'affranchir d'éventuels problèmes d'évaporation³, nous mélangeons du DMSO⁴ à notre solution à déposer.

3.2.1.1 Protocole expérimental

Le protocole de l'expérimentation est le suivant :

- Tout d'abord, en ayant pris soin de travailler avec des pointes commerciales propres, nous plongeons celles-ci dans le réservoir contenant le produit coloré à déposer ; les forces de capillarité provoquent le remplissage du canal et du réservoir ;
- Puis nous faisons entrer en contact, de manière très douce, la pointe du commerce avec notre surface de dépôt, qui est généralement une lame de verre ou parfois une lame recouverte d'une mince couche d'or. Le dépôt s'opère alors sous l'effet des forces de capillarité de la surface de dépôt. Notons que la force d'appui n'est simplement due qu'au poids de l'aiguille réalisant le dépôt⁵ ;
- Une fois le nombre de spots désiré obtenu, nous retirons les aiguilles afin de les nettoyer pour un usage futur.

La figure 3.1(1) schématise le principe de fonctionnement de la méthode par contact direct. On observe en 3.1(3) la pièce permettant de réaliser la liaison glissante existant pour ce système et une matrice d'aiguilles dans son intégralité. Chaque aiguille est un cylindre taillé en pointe et dont l'extrémité est fendue suivant le diamètre. C'est cette fente qui sert à la fois de canal et de réservoir pour le produit à déposer (voir figure 3.1(2)).

3.2.1.2 Résultats expérimentaux

Le principe de dépôt par capillarité est illustré par les deux images de la figure 3.2. Elles ont été obtenues avec la caméra de contrôle, l'une étant prise juste avant le contact effectif entre le l'aiguille et la lame de verre, la seconde étant prise juste après⁶.

³Les réalisations de biopuces se font généralement dans une enceinte où à la fois la température et le taux d'humidité sont contrôlés. Les quantités de produits manipulées étant très faibles, l'évaporation est un phénomène non négligeable et se doit d'être minimisée.

⁴DMSO : DiMethyl SulfOxyde.

⁵En effet, le principe de l'utilisation des aiguilles du commerce repose sur une liaison glissante entre ces aiguilles et le support à aiguilles que déplace le système de dépôt (la table XYZ dans notre cas précis). Lorsque l'aiguille entre en contact avec la lame de verre et que le système continue de descendre, la liaison glissante permet à celui-ci de continuer de descendre sans contraindre les aiguilles. L'inconvénient de cette méthode est que lorsque l'alignement n'est pas parfait entre les aiguilles et le support de dépôt, certaines aiguilles entrent en contact plus tôt que d'autres, ce qui peut provoquer des disparités entre les dépôts réalisés. De plus, cette erreur est non détectable, si ce n'est par une visualisation « a posteriori », et non réversible.

⁶L'expérimentation est réalisée pas à pas, en approchant micron par micron l'aiguille du support (lame de verre). La deuxième image a été enregistrée dès le contact effectif.

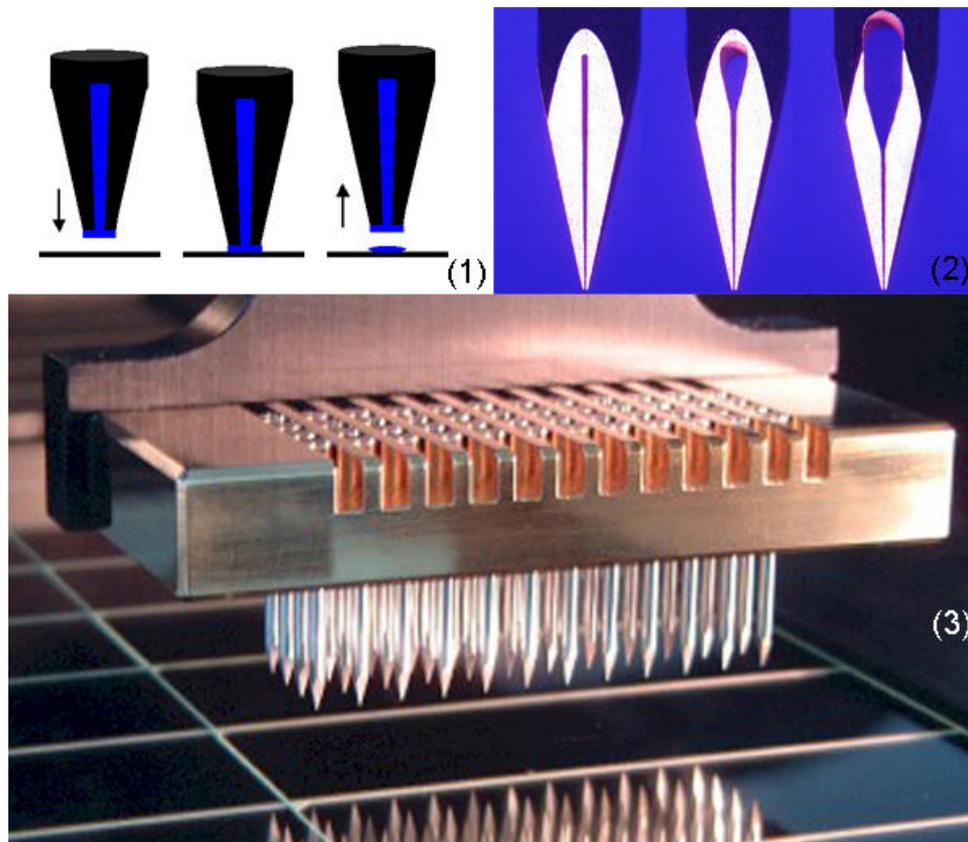


Fig. 3.1 : Aiguilles Telechem : (1) Principe (2) Formes (3) Fixation

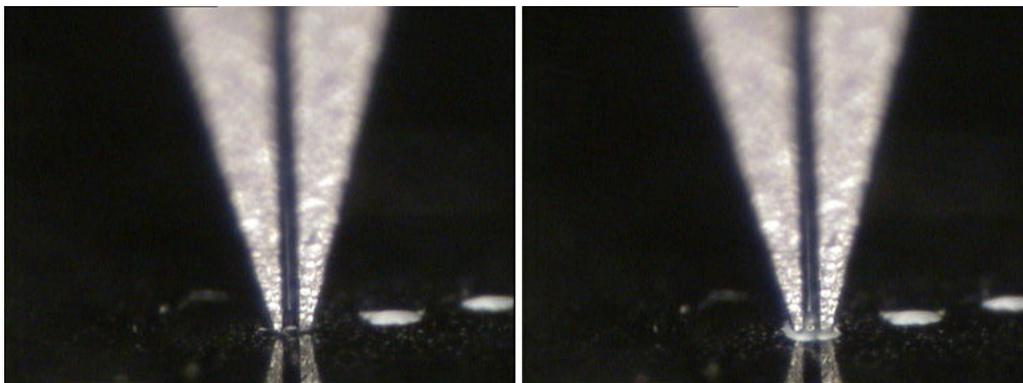


Fig. 3.2 : Formation d'un dépôt par contact direct

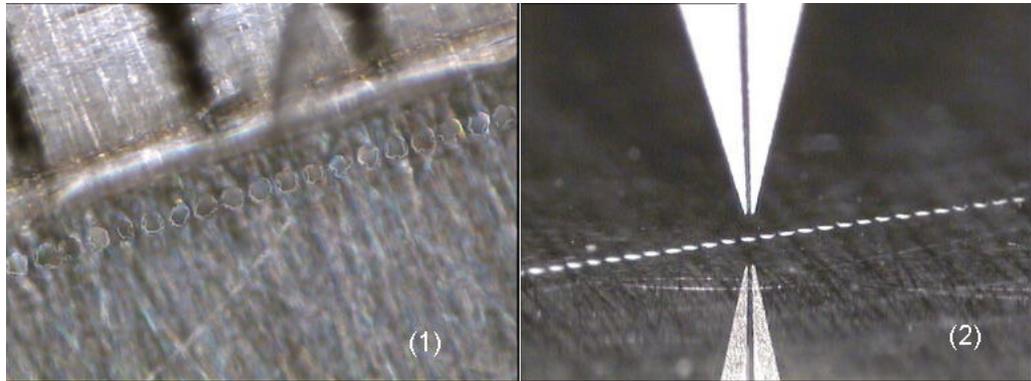


Fig. 3.3 : Spots réalisés avec une pointe Telechem et notre table XYZ

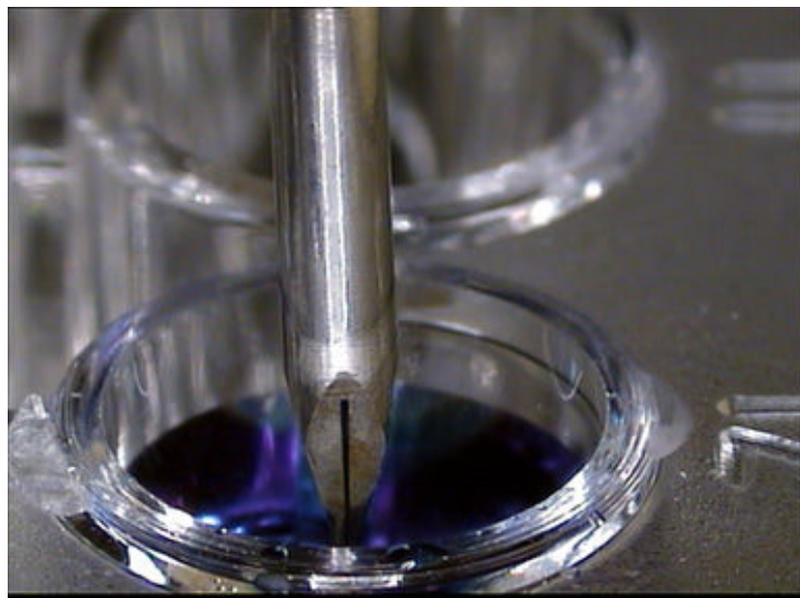


Fig. 3.4 : Système de fixation d'une aiguille classique à notre table XYZ

La figure 3.3 montre un cliché d'une lame de verre après le protocole de dépôt(1) d'un mélange contenant simplement de l'eau (H₂O) et du DMSO. Cette fois-ci le protocole expérimental est effectué sous le contrôle du logiciel, et la matrice de spots a été créée en un seul chargement. Les spots obtenus ont en moyenne un diamètre d'environ 100-120 μm , soit quelques nanolitres en volume, ce qui correspond aux caractéristiques des spots réalisés avec les mêmes pointes et le système de dépôt à la plate-forme génomique du Génopole de Toulouse. Une échelle millimétrique a été placée à proximité. Dans la partie de droite (2), nous pouvons observer une vue plus lointaine de ces spots avec l'aiguille ayant servi au dépôt. Nous sommes capables de réaliser au moins un centaine de spots avec un seul chargement et d'obtenir un alignement convenable. La force d'appui (obtenue par la descente de l'axe Z) ne peut être modifiée. En effet, seul le poids de l'aiguille exerce une force sur la surface de dépôt, le système de fixation de l'aiguille (figure 3.4) étant très proche de celui présenté en 3.1(3). Ainsi le système de positionnement que nous avons réalisé permet de reproduire les mêmes performances que les systèmes de dépôt classiques.

3.2.2 Validation avec les micro-leviers développés au LAAS

Dans un deuxième temps, il faut démontrer que nos leviers sont aptes à remplacer les pointes. Pour toutes ces premières expérimentations, nous ne déposons pas des produits biologiques, et il n'y aura pas d'interaction par la suite. Nous déposons simplement des mélanges contenant de l'eau, du DMSO pour s'affranchir du phénomène d'évaporation et parfois un colorant (Bleu de Bromothymol i.e. BBT, par exemple). Nous observons le résultat en visualisant les spots grâce à notre système de visualisation, une caméra CCD et un moniteur.

Nous avons donc remplacé l'aiguille par nos leviers. Le principe de fonctionnement diffère alors un peu du précédent. Désormais, la liaison glissante d'axe Z existant entre l'aiguille et la table XYZ est remplacée par une liaison fixe. Ainsi, démontrer la validité de notre approche revient à démontrer notre capacité à faire entrer en contact les leviers avec la surface de dépôt avec une force suffisante et sans risque de rupture des leviers.

Le protocole diffère également lors du processus de chargement des produits dans le canal et le réservoir des micro-leviers. En effet, le chapitre précédent nous a permis de définir le protocole à suivre pour effectuer le chargement.

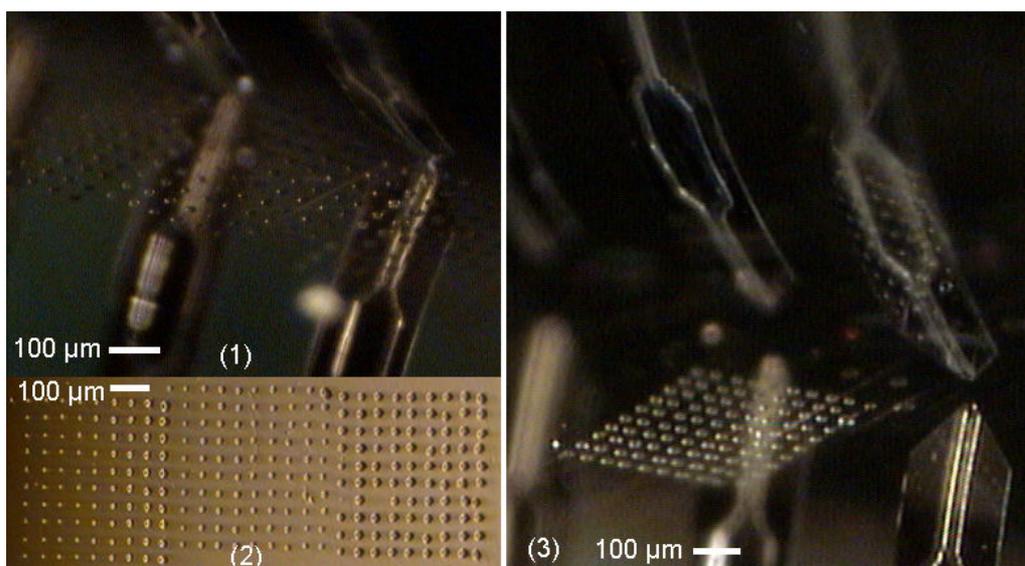


Fig. 3.5 : Dépôts d'un mélange de DMSO+colorant sur or

Les images de la figure 3.5 montrent les résultats obtenus en déposant un mélange contenant du DMSO et un colorant. La surface de dépôt est une lame de verre recouverte d'une mince couche d'or : en effet, pour pouvoir appliquer un champ électrique lors de la phase de chargement, nous avons dû utiliser une surface conductrice, le liquide à charger étant déposé via une micro-pipette sur cette même surface.

Deux expérimentations sont représentées (figure 3.5), l'une sur les images (1) et (2) concerne la réalisation d'une triple matrice en simultané par trois leviers. La distance interspot, c'est-à-dire la distance entre deux spots adjacents, est de $50 \mu m$. L'image (1) montre les leviers durant l'expérimentation et les phases de dépôts et l'image (2) les spots résultant. On observe un léger décalage entre les matrices réalisées par les trois leviers. Ceci s'explique par un défaut d'alignement du mouvement de l'axe Y par rapport à l'ensemble des trois leviers et une légère déformation de nos leviers avant l'expérimentation due au processus de fabrication. Sur l'image (3), une seule matrice de 10×10 a cette fois-ci été réalisée, avec une distance interspot de $40 \mu m$ lors d'une deuxième expérimentation.

Dans les deux cas, la taille moyenne des spots est d'environ $20 \mu m$ en diamètre ce qui est plutôt satisfaisant et bien en deçà de ce qui se fait actuellement par des méthodes conventionnelles de dépôt par contact (100 à $120 \mu m$ en diamètre). Le volume déposé est de l'ordre du picolitre et permet ainsi de réduire considérablement les quantités de produits utilisés. Les différences en taille de spots d'une matrice à l'autre s'expliquent par une force d'appui⁷ et un temps de contact différent à cause du décalage entre les leviers.

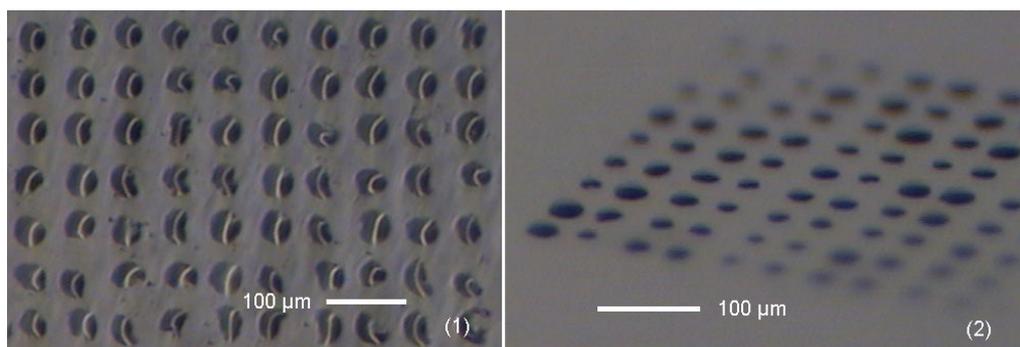


Fig. 3.6 : Dépôts sur lame de verre d'une mélange DMSO+colorant

Sur la figure 3.6 sont présentées deux matrices de spots obtenues avec le même mélange que celui utilisé lors des deux expérimentations précédentes. La différence réside dans le fait que ces dépôts sont réalisés sur une lame de verre de laboratoire classique. On notera le caractère plus hydrophobe de l'or comparé au verre, nous permettant d'obtenir ces spots plus petits et plus réguliers (plus en forme de goutte). Les spots ainsi obtenus ont une taille d'environ 30 à $40 \mu m$ en diamètre. Sur l'image (1), la distance interspot est de $60 \mu m$ alors que sur l'image (2), elle est de $50 \mu m$.

Quoi qu'il en soit, ces résultats démontrent que notre système permet d'obtenir des densités de plusieurs dizaines de milliers de spots au cm^2 avec une homogénéité acceptable et comparable aux systèmes actuellement commercialisés. La variation moyenne en pourcentage sur la taille du diamètre des spots est d'environ 5%.

⁷Pour être exact, la différence de force d'appui provoque une différence au niveau de la déformation (courbure) des leviers, causant ainsi une disparité au niveau du dépôt.

3.3 Dépôts d'oligonucléotides et de protéines

3.3.1 Puces à ADN

Les puces à ADN sont les premiers outils utilisés parmi les biopuces (Cf. chapitre 1). Leur principe repose sur l'interaction spécifique entre deux brins d'ADN complémentaires, l'hybridation. Nous allons démontrer la faisabilité d'une telle expérience avec notre système en montrant notamment qu'il est possible de fixer des oligonucléotides grâce au système de dépôt que nous avons développé.

3.3.1.1 Protocole expérimental

Le protocole expérimental se rapproche de celui utilisé pour les expérimentations précédentes à savoir :

- Plonger les micro-leviers dans le produit contenant des oligonucléotides (25 mers) marqués en fluorescence avec de la Cyanine 3 (Cy3) en utilisant le protocole de chargement qui sera détaillé dans le chapitre 4 ;
- Réaliser une matrice de 6×8 spots dans un premier temps, puis réaliser une matrice de 5×10 spots (les images peuvent montrer plusieurs matrices, car plusieurs micro-leviers déposaient simultanément).

Une fois les expérimentations terminées, il faut observer le résultat. Précisons déjà que lors de l'exécution, notre système de visualisation en direct nous a permis d'observer la formation de gouttes lors du dépôt. Ces gouttes disparaissent ensuite rapidement sous l'effet de l'évaporation. Cependant, comme nous allons le constater, le dépôt d'oligonucléotides marqués avec notre système est très concluant.

3.3.1.2 Résultats expérimentaux [52]

Deux images vont nous permettre de valider ce premier résultat. Les protocoles expérimentaux ne diffèrent que par le nombre de spots formant la matrice. Mais les procédés de visualisation a posteriori changent :

- Sur la figure 3.7, la lame de verre ayant reçu les dépôts est observée au microscope (décrit dans le chapitre 2, partie 2.3.3.1). Nous pouvons constater que les spots alors obtenus ont un diamètre d'environ $30 \mu m$ soit un volume de quelques picolitres. La distance interspot est de $70 \mu m$. La réalisation d'une matrice par un micro-levier nécessite 5 minutes environ.

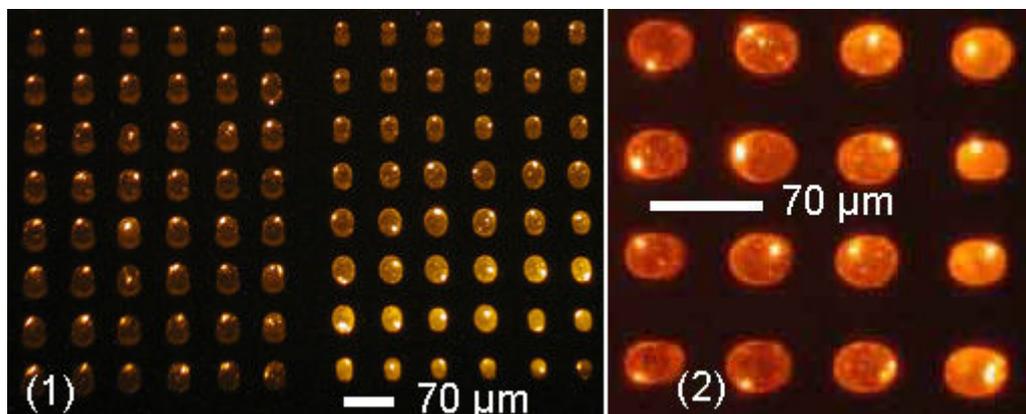


Fig. 3.7 : Dépôts d'oligonucléotides marqués en CY3 observés au microscope optique

- Sur la figure 3.8, les spots résultant de la réalisation d'une matrice ayant pour distance interspot $100\ \mu\text{m}$ sont observés à l'aide du BioAnalyzer Reader de LaVision Biotec, Bielefeld, possédant une résolution de $1\ \mu\text{m}$ par pixel.

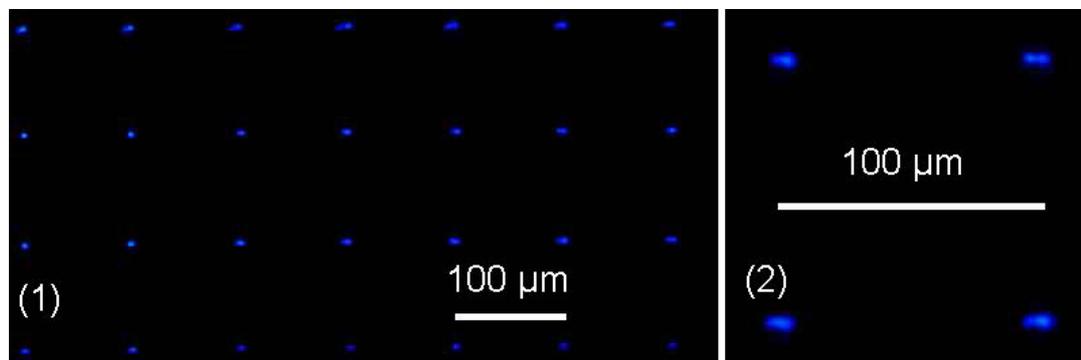


Fig. 3.8 : Dépôts d'oligonucléotides marqués en CY3 observés par le BioAnalyzer, LaVision

Nous pouvons constater la forme légèrement ovale des dépôts. Ceci s'explique par deux facteurs :

1. la force d'appui des micro-leviers sur la lame de verre qui est trop importante et provoque un glissement de ceux-ci sur la surface, et
2. l'angle formé par les leviers et la surface de contact avant appui qui influe sur la force minimum pour provoquer ce glissement

Il faudra donc tenir compte de ce paramètre lors des phases de pré-réglage du système de dépôt.

Nous pouvons dire que le système permet de produire des dépôts homogènes et de l'ordre du picolitre en volume. Il permet de fixer de façon durable des oligonucléotides sur une lame de verre. La différence de taille entre les deux expérimentations provient d'utilisation de forces d'appui différentes. Mais pour une même expérimentation, il apparaît que les spots sont comparables en taille et en forme et peuvent donc permettre la réalisation d'une puce à oligonucléotides.

3.3.2 Puces à protéines

Les puces à protéines se développent actuellement de manière considérable. Elles permettent de caractériser les interactions protéines / protéines ou anticorps / anticorps, constituant un nouvel outil de diagnostic formidable pour les technologies du biomédical.

Cependant, cette interaction est beaucoup plus complexe qu'une simple hybridation entre deux brins d'ADN. La fixation des protéines sur un support n'est pas une chose facile, d'autant plus qu'il faut garder le caractère actif de cette protéine. Ensuite, il faut se placer dans des conditions qui permettront la réalisation de l'interaction et la fixation de la deuxième protéine. Enfin, il faut également faire en sorte que les zones non fonctionnalisées de la lame de verre — entendons par là, les parties de la lame de verre n'ayant pas reçu un dépôt de sondes (première protéine) — ne fixent pas également la deuxième protéine.

Ainsi, le protocole expérimental est un peu plus lourd et exigeant que le précédent.

3.3.2.1 Protocole expérimental

Le but est de faire réagir deux entités (anticorps) entre elles, sachant que cette interaction se produit de manière spécifique. Nous allons ainsi travailler sur un anticorps IgG anti-chèvre

fabriqué dans le lapin, et un anticorps IgG anti-lapin fabriqué dans le singe. Le but de l'expérimentation sera de valider l'interaction spécifique entre ces deux anticorps.

Le protocole expérimental peut être séparé en deux parties distinctes :

- une première correspondant aux dépôts des sondes, qui seront des spots d'une solution d'anti-corps IgG anti-chèvre, fabriqué dans le lapin, mélangé à 40% de glycerol, sur une lame de verre ;
- une deuxième correspondant à la réaction d'interaction de ces spots en incubant la lame de verre pendant 3h dans une deuxième solution contenant de l'anticorps IgG anti-lapin, fabriqué dans le singe, mélangé à de la fluoresceine.

Nous précisons tout d'abord que l'ajout de glycerol à la première solution permet de réduire le phénomène d'évaporation et aussi de maintenir active la protéine que nous déposons. De plus, après avoir laissé reposer à l'air libre la lame de verre, celle-ci est saturée par une solution contenant 1% de BSA⁸. Ceci empêche toute protéine (et dans notre cas la deuxième protéine) de se fixer à un endroit non activé (c'est-à-dire où nous n'avons pas déposé au préalable la première protéine). Enfin, avant l'incubation dans la deuxième solution, un nettoyage de la surface de la lame de verre est effectué. Ainsi, le seul moyen d'observer la fluoresceine est que la réaction d'interaction devant lier les deux protéines ait bien eu lieu.

La figure 3.9 montre le système pendant la phase de dépôt de la première protéine (Anti-goat, lapin). La distance interspot est de 70 μm et ainsi nous constatons que les spots ont un diamètre de 30 μm (soit quelques picolitres en volume).

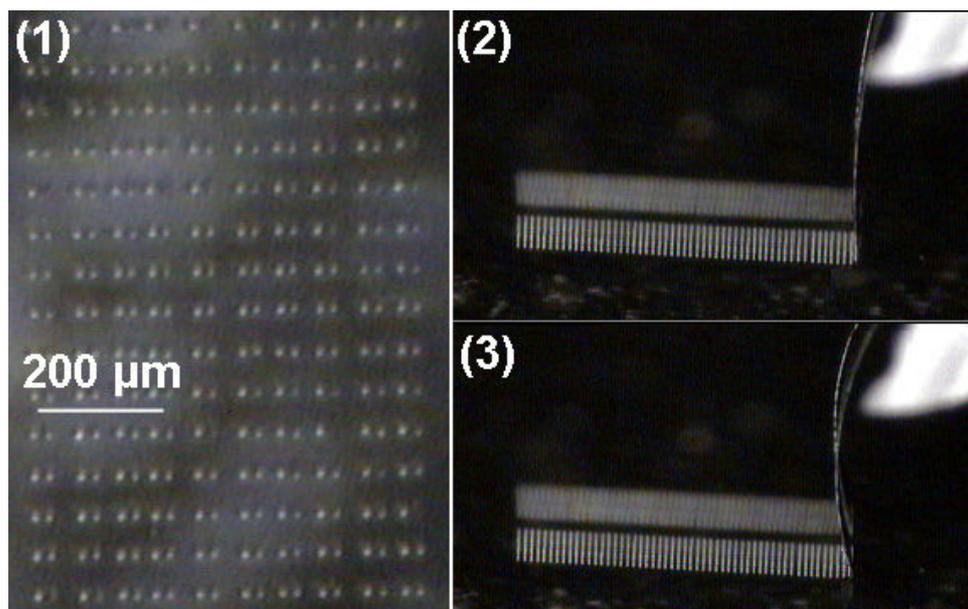


Fig. 3.9 : Visualisation des spots de protéines pendant l'expérimentation : (1) Spots résultant en vue de haut (2) Leviers avant contact (3) Leviers lors du contact

3.3.2.2 Résultats expérimentaux et discussion

Sur la figure 3.10, nous pouvons examiner les spots observés à l'aide du microscope inversé (Cf. chapitre 2, section 2.3.3.1). Ceux-ci sont clairement visibles et prouvent que la deuxième protéine s'est fixée sur la première déposée. Ainsi, nous en déduisons qu'à la fois la première

⁸Bovine Serum Albumine.

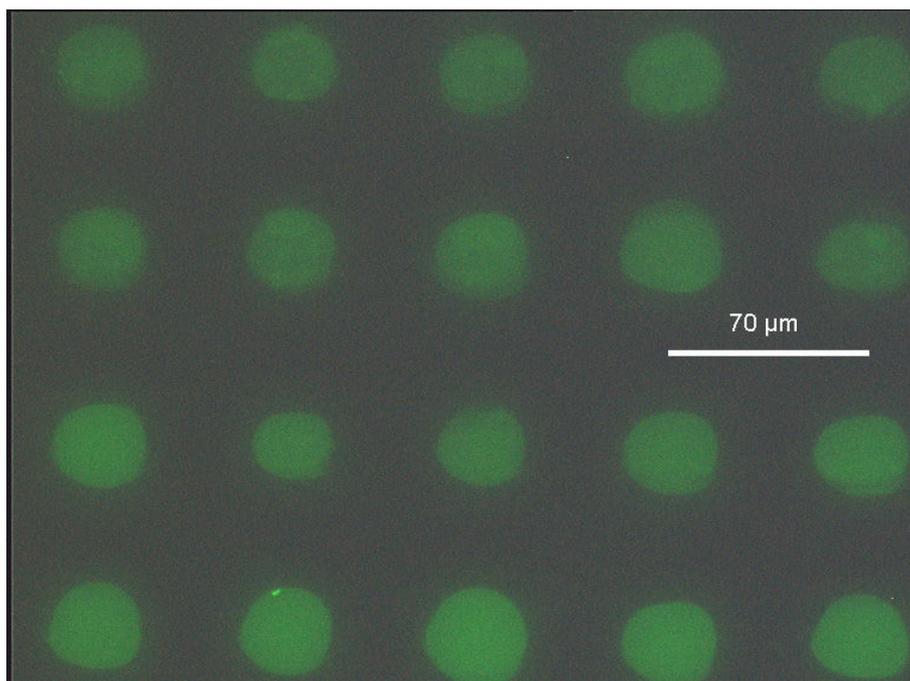


Fig. 3.10 : Visualisation au microscope de l'interaction protéine-anticorps

protéine s'est fixée de manière durable sur la lame de verre, et qu'ensuite la deuxième protéine s'est bien fixée spécifiquement sur la première. Le protocole expérimental a parfaitement fonctionné et prouve que notre système permet la réalisation de puces à protéines.

D'un point de vue caractéristiques des spots, ou plus exactement des images en fluorescence des spots, ceux-ci ont un diamètre d'environ $30 \mu m$ (soit toujours quelques picolitres en volume). La variation de dimension (en diamètre) des spots est de 2% en moyenne et indique une homogénéité acceptable et de l'ordre des systèmes commerciaux.

Si nous comparons ces résultats avec ceux pouvant être obtenus par les systèmes dits « classiques », nous nous rendons compte que notre technique est la seule, avec celle de l'équipe de Chad Mirkin de l'Université de NorthWestern⁹, permettant à l'heure actuelle de déposer directement des protéines à l'échelle du picolitre. En effet, cette équipe réalise par la technique de la Dip-pen Nanolithographie des dépôts bien inférieurs en taille. L'équipe a récemment obtenu des nanostructures de protéines [53]. Mais cette technique conserve les inconvénients que nous avons présentés dans le chapitre 1, paragraphe 1.5.1, à savoir peu de spots réalisables en un seul chargement, une surface pouvant être balayée de faible dimension ($100 \times 100 \mu m^2$), la nécessité d'un taux d'humidité avoisinant les 90 % et une lenteur dans le processus de dépôt : tout d'abord, chaque spot nécessite au minimum 5 secondes pour se former et surtout, le chargement de la protéine à déposer sur les leviers dure 1 heure. Enfin, il faut systématiquement changer le levier lorsque l'on change de produit.

3.4 Étude de la diffusion et du temps de contact

Nous souhaitons désormais montrer que les forces de capillarité ne sont pas les seules à prendre part au processus de dépôt lors du contact des micro-leviers sur le support. Cette étude est mise en place car intuitivement, on devine que le temps de contact a une influence sur la

⁹<http://www.chem.northwestern.edu/~mkngrp/>

quantité de produit déposé.

Deux raisons à cela :

- la première qui consiste à vouloir décrire de façon plus précise le processus de dépôt en lui-même et donc mener une étude plus fondamentale sur celui-ci ;
- la deuxième qui s'appuie sur la première et démontre toute l'importance d'avoir des temps de contact similaires pour tous les spots.

Dans les systèmes de dépôt actuellement commercialisés, le réglage de l'alignement des micro-pointes par rapport au support et à sa surface se fait visuellement, sans appareil, à l'oeil nu. Est-ce véritablement suffisant pour garantir l'homogénéité des différents spots réalisés ?

3.4.1 Protocole expérimental

Le protocole expérimental est presque similaire à celui correspondant à l'expérimentation sur le dépôt d'oligonucléotides. En effet, une phase de chargement du produit (marqué à la cyanine 3 (CY3)) précède chaque processus de dépôt. Mais chaque processus de dépôt diffère du précédent par un temps de contact variable entre le micro-levier et la lame de verre — 5 secondes, pour les premiers spots réalisés, 60 secondes pour les derniers. La distance interspot est choisie de façon à ne permettre aucune contamination entre deux spots adjacents et est fixée à 70 μm . Cinq processus de dépôt ont été réalisés, chacun comprenant une matrice de 6 \times 8 spots avec des temps de contact respectifs de 5, 10, 20, 40 et 60 secondes.

3.4.2 Résultats expérimentaux

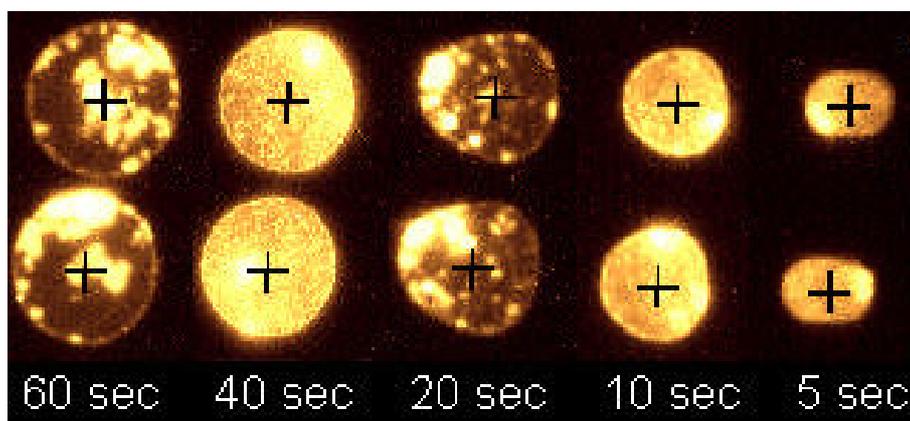


Fig. 3.11 : Spots résultant de l'étude sur le temps de contact

Les résultats confirment l'idée de départ. Le diamètre des spots réalisés dépend effectivement du temps de contact¹⁰. Sur la figure 3.11, nous pouvons observer un spot isolé de chaque processus de dépôt. Les images ont été réalisées avec la même échelle afin de pouvoir effectuer une comparaison. Plus le temps de contact est long, plus les spots s'élargissent.

Si nous traçons cette évolution en fonction de la racine carrée (voir figure 3.12) du temps¹¹

¹⁰Nous précisons à nouveau que ce n'est bien évidemment pas le seul paramètre entrant en jeu : l'angle d'attaque des leviers par rapport au support, la force d'appui, entre autres, sont des paramètres jouant un rôle tout aussi important mais qui ne varient pas ou très peu lors du processus de dépôt.

¹¹De façon rigoureuse, nous signalons que le temps n'est qu'une approximation du temps réel de contact. En effet, les temps affichés correspondent au temps écoulé entre la fin du mouvement descendant des leviers vers le support et le début de leur mouvement remontant. Pour retrouver le temps réel, il faut donc ajouter le temps de contact pendant la phase de descente et de montée. Ces temps sont très largement négligeables

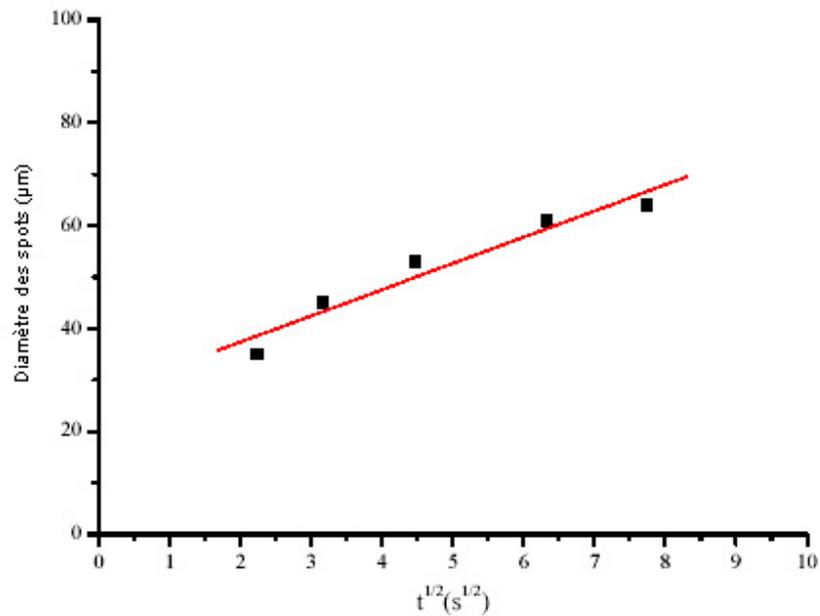


Fig. 3.12 : Mise en évidence de la diffusion : Diamètre des spots en fonction de la racine carrée du temps de contact

(correspondant au temps de contact entre les micro-leviers et la surface de dépôt), nous remarquons qu'il existe une relation proportionnelle entre les deux grandeurs. Ceci est caractéristique du phénomène de diffusion et démontre son influence sur les dépôts.

Bien évidemment, nous souhaitons réaliser nos spots le plus rapidement possible, et ainsi limiter l'influence de la diffusion et sa part prise lors de processus de dépôt. Un des avantages de la diffusion est l'homogénéité dans la forme des spots. Ainsi, s'il existe toujours un glissement du micro-levier sur la surface lors du contact, la forme ovale résultante tend à disparaître par l'effet de la diffusion. Par contre, l'augmentation de la taille des spots ne va pas dans le sens de notre volonté de réduction de taille des spots et d'augmentation de densité.

Pour répondre à la question posée quelques lignes plus haut, les systèmes commerciaux peuvent avoir des disparités entre les temps de contact pour différents dépôts, le maximum étant obtenu pour les deux spots situés aux extrémités lors d'une phase de dépôt (les supports étant supposés parfaitement plans). Le rapport entre les temps de contact alors obtenus reste cependant largement acceptable pour garantir une bonne homogénéité des spots mais supérieur à celui de notre système de par des distances plus importantes entre deux leviers situés aux extrémités et lors du contact.

Nous retiendrons donc qu'il faut contrôler le temps de contact de manière suffisante afin de garantir une certaine homogénéité des spots, en taille et forme et que concernant cette dernière, le contrôle de la force d'appui sur le support s'avère capital afin d'éviter un glissement du micro-levier.

devant les temps de contact affichés car les déplacements en contact sont très courts (quelques microns seulement) et s'effectuent donc très rapidement

3.4.3 Paramètres influençant le transfert d'un produit

Une récente étude [54] de l'équipe de Chad Mirkin tente d'identifier les paramètres participant au transfert du produit du levier sur le support lors du dépôt.

Cette équipe précise que le mécanisme du transfert d'encre n'est pas totalement compris, justifiant d'autant plus ce type d'étude.

Travaillant sur la technique de Dip-pen nanolithographie (voir chapitre 1, paragraphe 1.5.1), Mirkin distingue deux processus lors du dépôt :

- une première étape de transport moléculaire de la pointe au substrat, qui correspond dans la plupart des cas à la dissolution de l'encre dans le ménisque naturellement formé entre la pointe et le support ;
- une deuxième d'adsorption sur la surface et de formation de monocouche.

Ces deux étapes dépendent de plusieurs variables comprenant la température, l'humidité, les propriétés physico-chimiques de l'encre et de la surface, la vitesse d'impression et la force d'appui.

L'étude citée, et dont nous présentons rapidement les résultats, porte sur l'influence de la température et de l'humidité sur deux types de molécules.

Quel que soit le type de produit déposé, la taille des spots augmente avec la température. Cette variation peut être modélisée comme une exponentielle sans saturation mais compliquée par d'autres paramètres.

Le nombre de molécules dissoutes, le taux de diffusion à travers le ménisque, et le taux d'absorption de la surface augmentent avec la température. En effet, les interactions de Van der Waals qui doivent respectivement être formées et rompues lors de la désorption et de la dissolution du liquide sont facilitées à haute température.

L'humidité joue également un rôle. Mais la vitesse¹² de déplacement de l'outil déposant (lorsqu'il est en contact) influe également sur le dépôt et sur ses dépendances envers la température et l'humidité. Par exemple, pour des conditions similaires, la taille de lignes augmente plus rapidement que celle de spots (le ménisque permettant le transfert ne peut se former complètement lors d'un mouvement pour créer des lignes).

C'est sur ce ménisque que l'influence de l'humidité est la plus importante. De la forme et de la taille du ménisque dépendent les dépôts. La solubilité du liquide est un facteur clef de la dépendance en température et en taux d'humidité du ménisque.

Afin d'optimiser le dépôt d'un type de produit, il conviendrait — si le résultat n'était pas déjà convenable dans des conditions ambiantes — de réaliser une étude du substrat et du liquide (solubilité) afin de se placer dans les conditions optimales en température et en humidité.

3.5 Étude de la « cross-contamination »

Cette dernière étude est essentielle pour valider notre approche et démontrer la faisabilité de réalisation des biopuces grâce à notre système. En effet, jusqu'à maintenant, nous nous sommes montrés capables de déposer de façon durable des oligonucléotides et des protéines (anticorps) sur un support et d'appliquer un protocole permettant d'obtenir une garantie des interactions ADN / ADN ou anticorps / anticorps. Nous avons également montré que le contrôle du dépôt en termes de temps de contact et de force permet de réaliser entre 80 et 100 spots homogènes en taille avec un seul procédé de chargement de produit.

Mais lors de la réalisation d'une biopuce, plusieurs produits sont déposés sur le support. Si nous devons utiliser un micro-levier par produit à déposer, notre approche reste très peu

¹²Par opposition à une position immobile.

pratique et surtout augmente le coût de la réalisation d'autant que le nombre de produits augmente. Cette solution ne semble pas être acceptable. Il faut donc nous montrer capables, via un processus adapté et optimisé de nettoyage, de déposer différents produits avec un seul et même micro-levier. Seul problème, éviter toute contamination croisée, c'est-à-dire toute présence résiduelle d'un produit déposé auparavant.

3.5.1 Protocole expérimental

Nous allons utiliser deux produits bien distincts : l'un sera marqué au CY3 et l'autre au CY5. L'expérimentation consiste à réaliser plusieurs matrices avec ces deux produits mais en utilisant un seul et même micro-levier pour tous les dépôts. Lors de la transition d'un produit à l'autre, nous utilisons un procédé de nettoyage. Une fois l'expérimentation terminée, nous visualisons à l'aide du ScanArrayerTM l'image en fluorescence de la lame de verre sur laquelle nous avons réalisé cette étude. Si des traces résiduelles sont présentes lors du chargement d'un nouveau produit, nous obtiendrons des spots pas exactement verts ou rouges (CY3 ou CY5), mais des spots qui auront tendance à virer vers le jaune, couleur résultant d'un mélange de rouge et de vert.

Si l'idée originale pour la fabrication des leviers est de s'inspirer des formes des pointes des systèmes existants et de réduire les échelles, cette fois, nous nous inspirons des protocoles de nettoyage utilisés et mis en place dans les systèmes commerciaux. Nos outils sont des systèmes ouverts dans le sens où le contenu du canal et de l'éventuel réservoir est accessible ce qui, nous le savons par expérience, facilite grandement le nettoyage et empêche tout résidu de rester dans le canal ou le réservoir.

Les protocoles de nettoyage, ou de transition entre deux produits, commercialement utilisés consistent à immerger les leviers dans un réservoir contenant un produit nettoyant et à les agiter vigoureusement. Ensuite, une étape de séchage est mise en place et le cycle peut recommencer. Généralement, au moins trois cycles sont réalisés afin de garantir un bon nettoyage¹³.

Sur la figure 3.13, nous pouvons observer une pièce métallique (1) réalisée à l'atelier mécanique du LAAS-CNRS par Xavier Dollat, comprenant plusieurs trous correspondant aux différents réservoirs pour les produits que nous utilisons durant cette expérimentation. Nous pouvons aussi distinguer un système à effet Peltier (2) que nous utilisons comme élément chauffant afin de sécher les micro-leviers comme indiqué dans le protocole précédent. Le dispositif Peltier a été choisi car sa forme très plane nous permet de limiter les mouvements de la table de positionnement et ne constitue pas un obstacle pour les déplacements. Nous contrôlons sa mise en service par une sortie analogique du module inclus dans le PC et la température est d'environ 70°C à la position des micro-leviers. Nous pouvons également constater la présence d'une rainure (3) servant à maintenir en position les lames de verre.

3.5.2 Résultats expérimentaux [52]

Nous avons réalisé deux expérimentations, une première utilisant le protocole de nettoyage décrit ci-dessus et une deuxième n'utilisant pas de protocole de nettoyage.

Les résultats sont présentés sur la figure 3.14. Sur la partie supérieure (1), nous visualisons grâce au Genepix de la plate-forme transcriptôme les spots résultant de l'utilisation d'un protocole de nettoyage séchage. Aucune contamination n'a eu lieu à l'échelle à laquelle nous observons (i.e. de l'ordre du micron). Aucune trace de CY3 n'est visible dans les spots conte-

¹³Notons également qu'avec les systèmes commerciaux, environ une dizaine de spots sont réalisés sur une lame appelée lame blot, où l'excès de liquide à la surface de l'aiguille va être éliminé. Ceci permet d'atteindre un état de fonctionnement du processus de dépôt produisant des spots plus réguliers et plus homogènes par la suite.

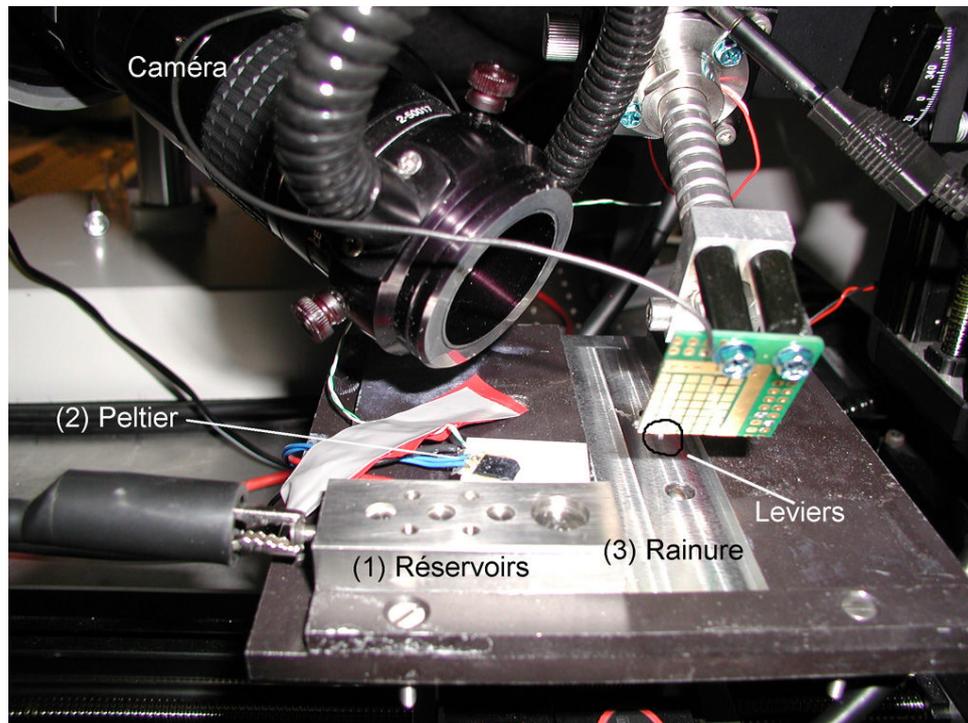


Fig. 3.13 : Dispositif expérimental pour la contamination croisée

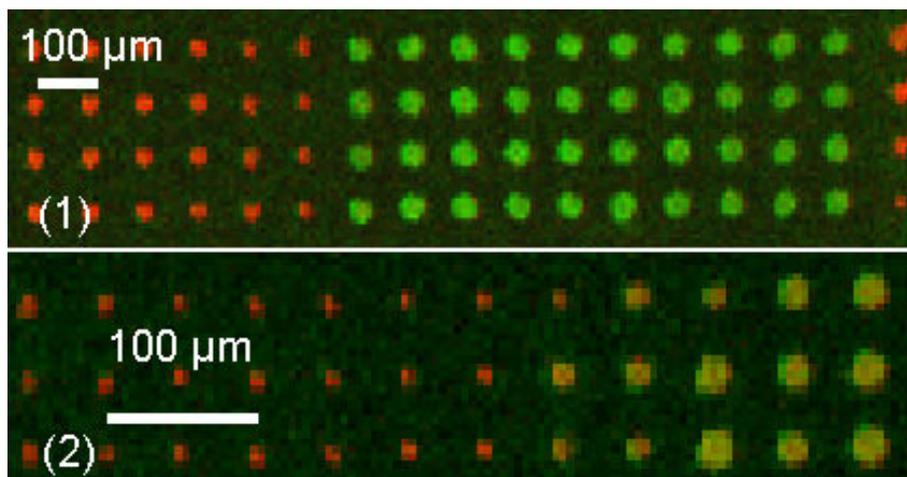


Fig. 3.14 : Etude de la crosscontamination

nant du CY5 et vice-versa. Ainsi, le protocole de nettoyage-séchage est fiable pour garantir l'élimination de toute trace d'un précédent produit lors de la phase de chargement.

La partie inférieure (2) de cette figure présente les spots résultant de la même expérimentation sans le protocole de nettoyage. La transition entre les spots marqués en CY3 et ceux marqués en CY5 n'est pas distincte. Nous réalisons des spots contenant un mélange des deux produits à déposer ; il y a une contamination croisée, ou pollution entre les produits.

Cette deuxième expérimentation démontre la véritable nécessité du protocole de nettoyage et la première permet ainsi de finaliser et de valider la démarche mise en place depuis le début de l'étude. Nous sommes désormais capables de produire des biopuces à haute densité et en limitant le nombre de micro-outils utilisés.

3.6 Compatibilité avec les micro- et nano-technologies

Une volonté affichée lors de ce projet est de rendre compatibles ces techniques de dépôt avec les micro- et nano-technologies, notamment dans un souci de réduction de coût. Le but est de passer des MEMS¹⁴, Micro-Systèmes Electro-Mécaniques, aux NEMS¹⁵, Nano-Systèmes Electro-Mécaniques, et cette application pour le vivant, la biopuce, peut en être le parfait exemple.

L'ensemble des travaux présentés précédemment traite du système dépôt par une méthode par contact direct, de ce que nous considérons comme la partie *fabrication* de la biopuce. Toute la partie analyse de données repose dans la majeure partie des cas sur l'utilisation de la fluorescence. Ce fut le cas pour tous les travaux exposés dans cette thèse.

Ainsi nous allons décrire le partenariat qui a été mis en place avec une société développant un outil de visualisation en fluorescence possédant une meilleure résolution que le Genepix (voir 2, paragraphe 2.3.3.2). Nous montrerons ensuite qu'il est envisageable d'utiliser d'autres procédés de visualisation et d'analyse a posteriori. De nombreux travaux ont été réalisés et sont en cours sur des biocapteurs ([55], Chapitre 1).

3.6.1 Vers une meilleure résolution

Une collaboration (notamment avec des accords de confidentialité) a été mise en place avec la société Innopsys, qui désirait principalement un système permettant de réaliser des dépôts plus petits que ceux réalisés par les systèmes commerciaux et moins coûteux que des puces Affymetrix. Ceci nous permettait d'obtenir une application concrète à nos travaux.

3.6.1.1 Présentation de la société Innopsys

La société Innopsys développe et commercialise pour le marché international des équipements opto-électroniques destinés à des professionnels de l'industrie du stockage optique et du diagnostic médical.

Son initialiseur de disques optiques, premier produit de la société, est actuellement le plus rapide du marché. Ses performances techniques permettent à INNOPSYS de se positionner sur le marché actuellement détenu par quelques sociétés japonaises. INNOPSYS s'ouvre des perspectives de développement grâce à des contrats d'étude à long terme sur des applications à fort potentiel, notamment dans le domaine des biotechnologies.

L'objectif d'INNOPSYS est de mettre à profit sa forte capacité technologique et son savoir-faire pour développer des équipements industriels performants et compétitifs.

¹⁴Micro Electro Mechanical Systems

¹⁵Nano Electro Mechanical Systems

La technologie d'INNOPSYSS a également permis à la société de se positionner sur des marchés porteurs et novateurs tels que le lecteur optique de biopuces pour lequel un partenariat en cours débouchera sur la fabrication de ces lecteurs.

La technologie INNOPSYSS est appliquée dans le développement d'un scanner confocal de puce ADN haute densité modifiée Affymetrix en collaboration avec la société bioMérieux et le LETI /CEA (projet LightScan).

Le scanner LightScan (Cf. figure 3.15) est développé pour les applications de diagnostic de la société bioMérieux et ne peut pas être utilisé pour lire les puces standard d'Affymetrix. Cet équipement a pour but de remplacer les scanners conventionnels actuels (volumineux et coûteux) et permettre l'utilisation des biopuces par une instrumentation de routine dans les laboratoires d'analyse.



Fig. 3.15 : Scanner LightScan d'Innopsys

Le principe du scanner consiste à utiliser des techniques issues du disque optique (notamment une tête de lecture CD). Un format optique, constitué de pistes et d'adresses, équivalent à celui existant sur un CD, est gravé sur le substrat Affymetrix avant le dépôt des sondes ADN. La présence de ce format sur la biopuce permet l'utilisation d'un système de balayage bas coût et d'une tête de lecture en charge du focus et du suivi de pistes avec une très grande précision. Cette technique offre les avantages d'atteindre une résolution inférieure à $2 \mu m$, de réduire le prix par un facteur compris entre 5 et 10 et d'obtenir une sensibilité

supérieure à celle des scanners conventionnels.

Compte tenu de ses potentialités et de son caractère innovant, ce scanner bas coût (projet Lightscan) a été labellisé en 1999 par le Réseau Nano et Micro-Technologie (RMNT) du Ministère de la Recherche et de la Technologie.

3.6.1.2 Expérimentation et résultats

Cette société est donc entrée en contact avec notre équipe afin que nous réalisions des dépôts sur leur système de lecture. Le but est de valider leur approche et de démontrer la résolution de leur système. De notre côté, c'est également l'occasion de pouvoir valider notre approche et de confirmer nos résultats en terme de taille. Enfin, la possibilité d'accéder à un système de lecture peu coûteux et pouvant répondre à nos besoins en terme de résolution est intéressante.

Nous avons donc réalisé des dépôts sur le support adapté au scanner. La seule contrainte est de déposer un produit contenant du CY5 comme marqueur fluorescent, leur système ne pouvant travailler qu'à cette longueur d'onde actuellement. Leur résolution étant importante, il nous faut également essayer de réduire au maximum la taille des spots afin de valider leur système.



Fig. 3.16 : Images de dépôts marqués en CY5 par le LightScan d'Innopsys

Nous avons donc réalisé plusieurs dépôts d'un oligonucléotide 20 mers dilué dans du tampon phosphate 0.3M et marqué au CY5. Deux zones du support sont analysées, une comprenant une matrice 4×4 et deux lignes de 12 spots. La distance interspot est de 50 μm et les deux lignes sont espacées de 100 μm .

Le support des dépôts a ensuite été lu sur le scanner EP9, scanner standard fonctionnant à la longueur d'onde 635nm. La puissance du laser a été fixée à 1mW. Le temps de lecture de la totalité d'un support (puce) est de 6 minutes 30. Ces mêmes puces ont été examinées sur un microscope en fluorescence pour qu'Innopsys puisse comparer son système.

Nous pouvons observer sur la figure 3.16 les images résultant de l'utilisation du LightScan. Celle-ci nous permet de confirmer les problèmes déjà décrits auparavant.

Tout d'abord les premiers spots, i.e. ceux réalisés juste après une phase de chargement, sont un peu plus importants que les suivants, nous suggérant ainsi de réaliser les 10 premiers dépôts sur un support à part¹⁶.

Ensuite, la matrice de spots s'étendant sur une surface importante, la variation de la distance entre les leviers et le support avant le dépôt, due à la non-coplanarité du support par rapport à la rangée des leviers, peut s'avérer non négligeable. N'oublions pas qu'elle entraîne une disparité au niveau du diamètre des spots et donc du volume de produit déposé. Cette disparité s'explique par une déformation des micro-leviers plus ou moins prononcée lors du contact. Ceci renforce notre idée qu'il faut être capable de contrôler de manière active la force d'appui ou plus exactement la phase de descente des leviers et le contact entre ces derniers et le support.

Néanmoins, cette collaboration permet de démontrer la capacité de notre système à réaliser des dépôts d'environ 20 μm de diamètre et celle du LightScan d'analyser des biopuces formées par des dépôts aussi petits.

Une volonté affichée du projet est de s'affranchir de la fluorescence pour la détection et l'analyse des biopuces. Nous souhaitons développer de nouvelles techniques basées sur l'utilisation du silicium, afin de mettre en oeuvre des micro-capteurs, chimiques ou autres, qui seront compatibles avec notre système de dépôts miniaturisés.

3.6.2 Développement de micro-biocapteurs

Matthieu Guirardel développe, dans le cadre de sa thèse au LAAS-CNRS, des membranes piézoélectriques. Ces membranes (voir figure 3.19) qui ressemblent à des peaux de tambour peuvent au choix être actionnées, afin de provoquer une oscillation, ou servir de capteur au travers de la variation de la valeur de la charge dans la couche piézoélectrique. En effet, un changement des contraintes en surface ou un ajout de masse influence de façon importante la fréquence de résonance d'un tel dispositif. Nous pourrions donc utiliser de tels procédés afin de détecter une hybridation par exemple, lorsqu'il s'agit d'une interaction ADN/ADN, ou toute autre interaction. Ainsi, les marqueurs en fluorescence et les systèmes pour « scanner » le support ne seraient plus utiles. Ces membranes serviraient à la fois de support et d'outil analytique pour traiter les données.

La figure 3.18 démontre que le système que nous avons développé peut déposer un produit sur un micro-levier de 50 μm de large, sans détériorer ni briser celui-ci. Ce micro-levier peut aisément être caractérisé — fréquence de résonance, raideur, ... — avant le dépôt, après le dépôt et après une éventuelle réaction avec un autre produit. Nous pouvons aussi imaginer de traiter spécifiquement la surface de différents micro-leviers et obtenir ainsi des comportements distincts pour chacun d'entre eux. Les applications sont nombreuses. Des dépôts ont également

¹⁶En effet, après 10 dépôts environ, il apparaît une homogénéité acceptable en ce qui concerne la taille des spots.

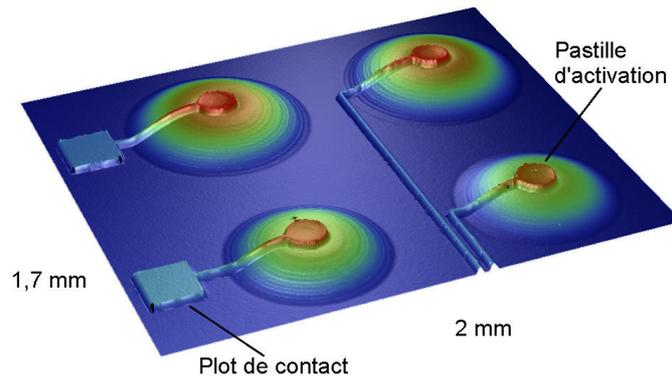


Fig. 3.17 : Membranes piézoélectriques



Fig. 3.18 : Dépôts sur des micro-leviers

été réalisés sur ces membranes souples et résistantes, tout du moins par rapport à notre force d'appui.

Il faut savoir que de telles membranes sont plus résistantes que de simples micro-leviers. Sur la figure 3.19, nous déposons de manière individuelle, c'est-à-dire sur chaque membrane à actionnement piézoélectrique. Notons que ces membranes sont des membranes de deuxième génération par rapport à celles présentées sur la figure 3.17 dans le sens où la capacité aux plots de contact a été diminuée, permettant ainsi d'améliorer les effets inverses (actionnement) et direct (capteur) des membranes. De plus, ce type de microcapteur possède un minimum détectable d'environ 100 pg/cm^2 [55], ce qui est environ 20 fois supérieur aux autres types de capteurs piézoélectriques acoustiques.

3.7 Conclusion

Dans ce troisième chapitre, nous nous sommes attachés à présenter l'ensemble des résultats permettant de valider notre approche, à savoir démontrer la faisabilité de la réalisation de biopuces avec un système utilisant des micro-outils en silicium.

Il a ainsi fallu :

dans un premier temps,

- déposer des **oligonucléotides**,
- déposer des **anticorps (ou protéines)**,

de manière durable tout en maintenant les composés déposés actifs ;

dans un second temps,

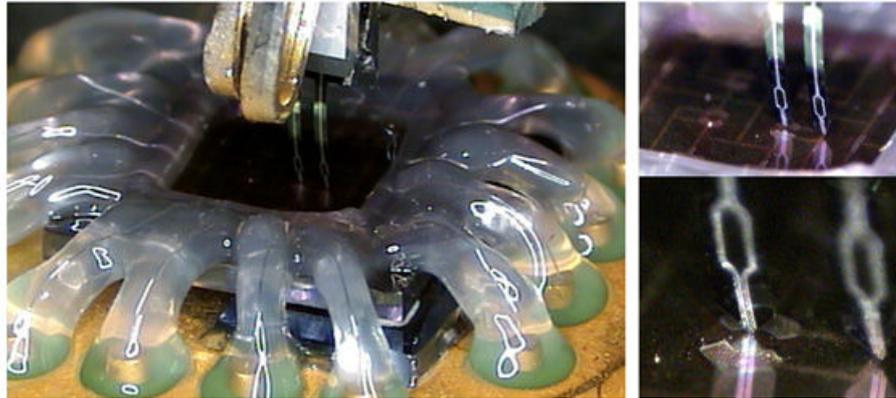


Fig. 3.19 : Dépôt sur des micro-membranes à actionnement piézoélectrique

- **éviter toute contamination**, entre des spots adjacents et entre différents produits chargés dans un même micro-levier,
 - garantir une **homogénéité** des spots,
 - **réduire la taille** des spots, soit augmenter leur densité,
- tout cela à travers un système moins coûteux que les systèmes de dépôt actuels.

Nous avons également étudié plus profondément le procédé de dépôt lors du contact entre les micro-leviers et le support du dépôt. Nous avons confirmé que le phénomène de diffusion prend part au dépôt, redémontrant ainsi la nécessité de contrôler le temps de contact lors du dépôt (sans parler de la force d'appui). Les paramètres tels que la température, le taux d'humidité jouent un rôle prépondérant dans la formation du dépôt, surtout lorsque l'on réduit les échelles de travail. Cette influence est également d'autant plus importante que le temps de contact entre l'outil déposant et le substrat est court. Dans notre cas, les conditions ambiantes¹⁷ se révèlent être suffisantes pour garantir un dépôt homogène, mais un contrôle plus précis de ces conditions permettrait sans doute une optimisation.

Tous ces résultats justifient notre approche. Il nous est possible de réaliser des biopuces (puces à ADN et/ou puces à protéines) à haute densité, sans dénaturer les produits déposés et en garantissant une homogénéité acceptable, permettant de valider les résultats..

Une telle compatibilité permet d'entrevoir une réduction conséquente des prix de revient des biopuces et ainsi de développer encore plus cet outil de diagnostic et son emploi.

De plus, plusieurs expériences réalisées avec notre plate-forme expérimentale démontrent la compatibilité de telles techniques avec les micro- et nano-technologies et permettent d'entrevoir de nouvelles techniques pour la détection et l'analyse a posteriori des biopuces.

Nos micro-leviers, principaux outils servant à la réalisation des dépôts, ont suivi une évolution dictée par les différents phénomènes observés.

C'est ainsi que le chapitre suivant traite de la première difficulté rencontrée. En effet, la réduction des échelles de travail entraîna la prépondérance de certains phénomènes, rendant totalement impossible l'utilisation de nos leviers et leur chargement. Il fallait alors trouver un moyen de modifier les tensions de surface et le caractère hydrophile de nos leviers, le tout sans risquer d'altérer les propriétés chimiques des produits et sondes que nous déposons, et ainsi d'optimiser le processus de chargement.

Enfin, nous avons également constaté dans ce chapitre l'importance du temps de contact (diffusion), de la force d'appui des leviers sur le support et du phénomène de glissement que

¹⁷Soit environ 22°C et 65 % d'humidité.

cela peut engendrer. Si d'un point de vue fonctionnel, notre système a été validé, il est possible d'optimiser le processus de dépôt. La deuxième partie du chapitre suivant présentera la mise en oeuvre d'un système de détection du contact afin de mettre en place un contrôle actif du dépôt garantissant l'homogénéité de nos dépôts.

Contrôle actif du chargement et du dépôt

Sommaire

3.1	Introduction	60
3.2	Validation de l'utilisation de la table XYZ	60
3.2.1	Validation avec les pointes classiques commerciales	61
3.2.1.1	Protocole expérimental	61
3.2.1.2	Résultats expérimentaux	61
3.2.2	Validation avec les micro-leviers développés au LAAS	64
3.3	Dépôts d'oligonucléotides et de protéines	66
3.3.1	Puces à ADN	66
3.3.1.1	Protocole expérimental	66
3.3.1.2	Résultats expérimentaux	66
3.3.2	Puces à protéines	67
3.3.2.1	Protocole expérimental	67
3.3.2.2	Résultats expérimentaux et discussion	68
3.4	Étude de la diffusion et du temps de contact	69
3.4.1	Protocole expérimental	70
3.4.2	Résultats expérimentaux	70
3.4.3	Paramètres influençant le transfert d'un produit	72
3.5	Étude de la « cross-contamination »	72
3.5.1	Protocole expérimental	73
3.5.2	Résultats expérimentaux	73
3.6	Compatibilité avec les micro- et nano-technologies	75
3.6.1	Vers une meilleure résolution	75
3.6.1.1	Présentation de la société Innopsys	75
3.6.1.2	Expérimentation et résultats	76
3.6.2	Développement de micro-biocapteurs	77
3.7	Conclusion	78

4.1 Introduction

Des éléments chimiques ou biochimiques sont utilisés afin de détecter des molécules spécifiques ou des produits de réactions sur tous les laboratoires-sur-puce. Pour que ces éléments remplissent leur fonction, un système microfluidique est nécessaire afin de recevoir ces éléments, de les manipuler, de les déposer et de distribuer de petits volumes sur la puce, volumes variant de quelques microlitres à une dizaine de picolitres. Mais ces systèmes ou ces mécanismes servant à manipuler de si petites quantités de produit sont tous électrostatiques, i.e. basés sur l'électromouillage, l'électroconvection, l'électrophorèse, l'électro-osmose et la diélectrophorèse.

Malgré des années d'études de ces phénomènes et de leurs effets, les travaux existant aujourd'hui sont un guide incomplet pour leur exploitation effective dans les applications en microfluidique. Travailler avec des structures inférieures à $100 \mu m$ provoque souvent des comportements inattendus.

Ces changements de comportements peuvent être attribués aux variations importantes des influences relatives des différentes grandeurs en compétition (à savoir la viscosité, les tensions de surface, et la capillarité). De nombreux paramètres prennent place lors du choix de l'utilisation d'un champ électrique pour une application microfluidique, tels que la taille des outils utilisés, le temps, la température, etc. ...

Le chapitre précédent a démontré la validité de notre approche vis-à-vis de l'utilisation des micro- et nano-technologies pour la fabrication de biopuces, en s'intéressant à tous les aspects biologiques notamment. Mais qui parle de micro- et nano-technologies parle également d'échelles micro- et nano-métriques et donc de changement de prépondérance entre les forces en présence. Le chargement d'un liquide dans un canal de $5 \mu m$ de large n'est pas aussi simple que si le canal fait environ 1 mm de large.

Ce chapitre tente dans un premier temps, de présenter les **paramètres** prenant part au **processus de chargement** du produit, en définissant de manière précise ce qu'est la *mouillabilité*.

Une fois ce phénomène défini, nous nous devons d'arriver à en modifier les deux propriétés que sont l'angle de contact et la tension de surface, et à permettre à nos leviers de se charger. Pour ce faire, plusieurs techniques basées sur l'utilisation de champs électriques sont couramment utilisées :

- l'électromouillage,
- la diélectrophorèse, et
- d'autres techniques basées par exemple sur les forces électro-statiques ou encore la photosensibilité.

L'électrophorèse est une technique utilisant également un champ électrique. Elle ne sert pas à modifier des paramètres tels que l'angle de contact, mais à quantifier des molécules ou autres particules. Son principe sera donc présenté rapidement afin de faire le lien avec les autres techniques, et notamment la diélectrophorèse. Nous dresserons dans un deuxième temps, un bref état de l'art de chacune des techniques, en nous efforçant de décrire leurs principes de fonctionnement et surtout sur quels paramètres elles ont une influence.

Puis nous présenterons la solution que nous avons choisie, solution qui nous a amenés à ajouter des électrodes le long du canal des micro-leviers. Nous justifierons ce choix et montrerons ses performances, notamment en nombre de spots déposés avec un seul processus de chargement. Le protocole utilisé sera décrit en détail. Ainsi, le chargement du produit dans les micro-leviers (canal et réservoir) sera parfaitement contrôlé et facilité.

La dernière partie de ce chapitre présentera dans un premier temps, l'évolution du contrôle

du chargement et une possible optimisation de celui-ci. Cette dernière se décompose en deux partie :

- tout d'abord, c'est le processus même du **chargement qui sera optimisé**, via une nouvelle implémentation des électrodes,
- puis, c'est l'acheminement du produit du réservoir principal aux micro-leviers qui sera considéré, afin d'éviter d'utiliser des quantités importantes de produit et de laisser celui-ci s'évaporer.

La possible réalisation aussi bien de puces à ADN que de puces à protéines aura été démontrée. Cependant, et dans un souci d'amélioration constante et de validation de nos résultats, nous souhaitons pouvoir encore plus garantir l'homogénéité des spots. Au delà même d'une simple garantie d'homogénéité, nous souhaitons pouvoir contrôler et visualiser le temps de contact et la force d'appui. En se rendant capable d'appliquer exactement la même force du premier au dernier dépôt réalisé, nous évitons de réaliser des dépôts similaires (n dépôts similaires = n-uplets) afin d'obtenir un résultat moyen sur ces dépôts.

Ainsi, dans un deuxième temps, les modifications possibles sur la méthode de dépôt liée aux électrodes implantées seront également présentées en fin de chapitre. A la fois un **contrôle précis du dépôt via des capteurs de force** et une **technique de dépôt sans contact** sont envisageables. Les premiers résultats concernant ces évolutions concluront ce chapitre.

4.2 La mouillabilité

4.2.1 Mouillage : définition

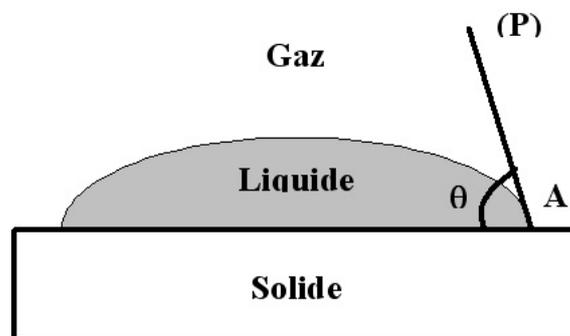


Fig. 4.1 : Angle de contact

La mouillabilité est la capacité d'une surface au mouillage, c'est-à-dire à faire étaler un liquide sur cette surface.

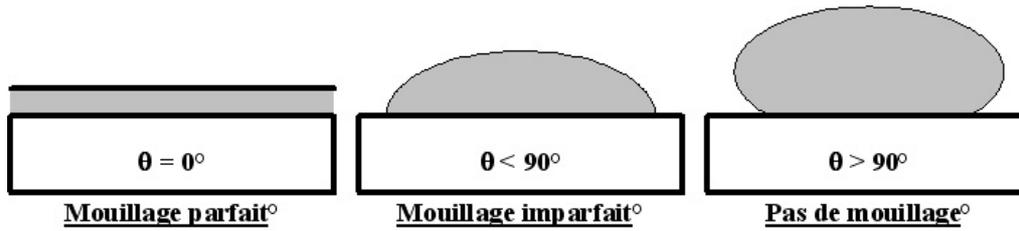
Plus précisément, le mouillage peut être défini comme le phénomène aboutissant à la création d'une interface solide-liquide, lorsque deux phases, l'une solide et l'autre liquide, sont en contact.

Le mouillage est alors caractérisé par un angle de contact produisant l'étalement plus ou moins prononcé de la goutte de liquide.

L'angle de contact (Cf. figure 4.1) est alors défini par le plan (P) tangent à la surface de la goutte en (A), ce dernier étant un point triple, c'est-à-dire appartenant à la courbe commune à la fois au gaz, au liquide et au solide.

Par convention, on mesure cet angle à l'intérieur du liquide.

L'angle de contact peut varier entre 0° et 180° , et conventionnellement trois situations peuvent alors être schématisées de la manière suivante :



Le mouillage parfait correspond à un étalement complet de la goutte sur le solide, le mouillage imparfait correspond à un étalement partiel et pas de mouillage dans le dernier cas, i.e. le solide a tendance à repousser la goutte et à faire en sorte qu'elle s'étale le moins possible.

4.2.2 Relation de YOUNG

L'étalement d'un liquide sur une surface solide placée dans un gaz provoque le déplacement de ce gaz : l'interface primitive (gaz/solide) disparaît et est remplacée par une nouvelle aire d'interface liquide/gaz.

Dans ce processus, c'est la variation d'énergie libre de surface qui joue le rôle déterminant. Idéalement, c'est-à-dire si on ne tient pas compte de l'énergie superficielle et si d'autres forces de friction n'interviennent pas, l'étalement se produira spontanément dans le sens d'une diminution de l'énergie libre de la surface totale.

La forme adoptée par la goutte sur le solide est donc caractéristique des interactions entre le liquide, le solide et le gaz.

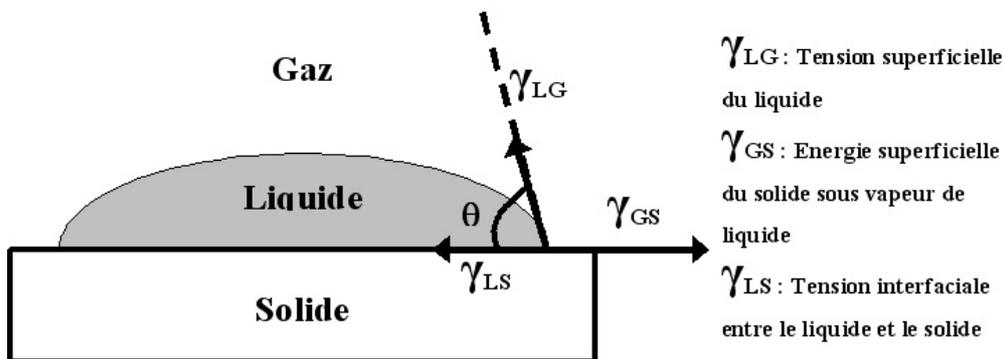


Fig. 4.2 : Energie superficielle

L'équilibre des forces est décrit par l'équation de YOUNG (les énergies superficielles sont en N/m) :

$$\gamma_{GS} = \gamma_{LS} + \gamma_{LG} \times \cos \theta$$

Si nous écrivons l'équation de la manière suivante :

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{GS} - \gamma_{LS}}{\gamma_{LG}}$$

Ceci explique que :

- l'addition d'un surfactant en diminuant la tension superficielle d'un liquide améliore le mouillage ; en effet, son ajout abaisse la tension superficielle du liquide et entraîne une augmentation de $\cos \theta$, donc une diminution de l'angle de contact θ ;

- les solides ayant de faibles énergies de surface (comme le Téflon par exemple) seront moins facilement mouillants car γ_{GS} étant faible, $\cos \theta$ est petit et par conséquent l'angle de contact θ est grand.

4.3 Les techniques utilisant un champ électrique

Comme nous l'avons précisé précédemment, nous allons présenter le principe de l'électrophorèse [56], non que cette technique puisse nous être utile dans le processus de chargement et dans la manipulation de liquides, mais parce que c'est une technique utilisant un champ électrique et dont dérivent d'autres techniques présentées par la suite.

4.3.1 Electrophorèse

4.3.1.1 Définition et principe

L'électrophorèse¹ est une technique de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Le terme d'ionophorèse est utilisé dans le cas d'ions de petite taille. Ce procédé est basé sur le mouvement des ions dans un champ électrique.

Dans tout champ électrique dont la tension appliquée est E , un ion q subit une force F_{eq} telle que :

$$F_{eq} = E \times q/d,$$

où d représente la distance entre les électrodes servant à appliquer le champ électrique. Dans une solution, la molécule est soumise à une force de frottement :

$$F_f = 6.\pi.r.\eta.v,$$

où r est le rayon de la molécule, η est la viscosité de la solution, et v est la vitesse de la molécule chargée.

Ainsi, la force totale est :

$$F_{tot} = F_{eq} - F_f.$$

Le plus souvent, l'électrophorèse est réalisée dans un gel de polyacrylamide ou un gel d'agarose, c'est pour cela que nous parlerons essentiellement de ce cas. Le mouvement de la molécule est ralenti suivant les dimensions relatives des pores de la matrice dans laquelle on dépose le produit.

La séparation est dépendante de la taille et de la charge des molécules. La taille des pores de la matrice inhibe le mouvement des molécules les plus larges. Chaque molécule contient des groupements ionisables et migre, lorsqu'un champ électrique est appliqué, soit vers l'anode soit vers la cathode en fonction de sa charge (voir figure 4.3).

¹Voir notamment « Principes de l'électrophorèse sur gel », 2000, <http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/principles.html>

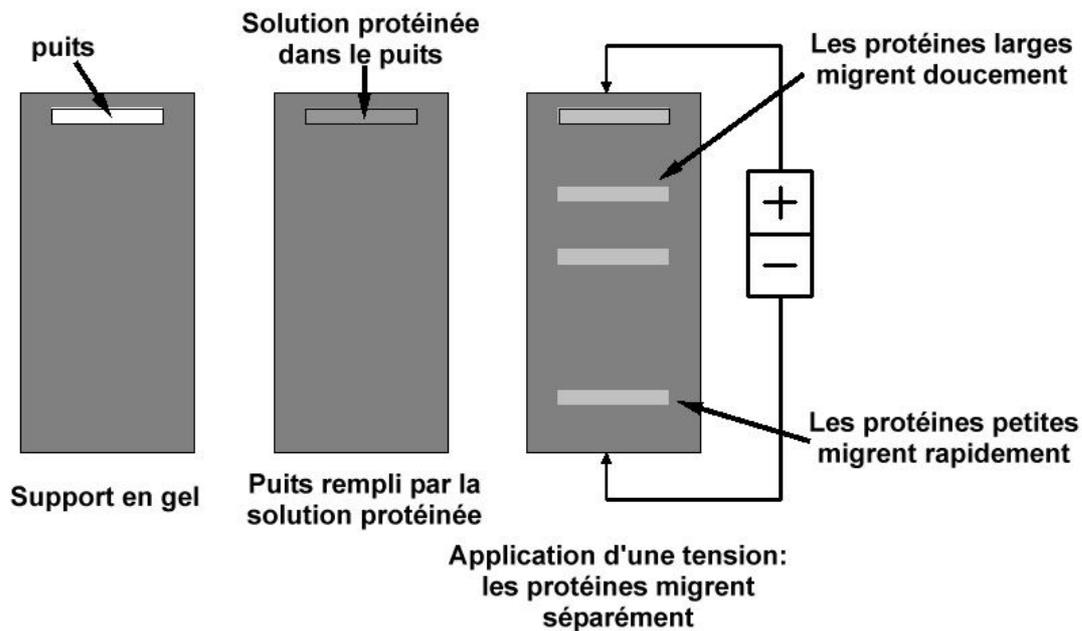


Fig. 4.3 : Principe de l'électrophorèse

4.3.1.2 Mode de fonctionnement

L'échantillon est placé dans le puits du support et une tension est appliquée. Les groupes ionisables dans chaque molécule font migrer celle-ci vers l'anode ou la cathode, en fonction de sa charge. Une protéine ayant une charge globale positive migrera vers le pôle négatif, et vers le pôle positif si sa charge globale est négative. Une fois que le gel est stabilisé, nous pouvons observer (voir figure 4.4) les macromolécules en utilisant un marqueur appelé bleu de Coomassie (marque uniquement les protéines, le BET² marque l'ADN). Chaque bande apparaissant sur le gel représente une protéine différente.

Cette technique est utilisée pour séparer et purifier les protéines, méthode utilisée pour l'analyse de solutions contenant des quantités de l'ordre du microlitre de différentes protéines.

Les principales applications sont :

- l'analyse des protéines de cellules en culture,
- la séparation de fragments d'ADN,
- la détermination des différences génétiques entre des espèces végétales et animales.

L'équipe de Ian Papautsky et A. Bruno Frazier travaille activement sur de nouveaux systèmes permettant d'améliorer cette technique [57].

4.3.2 Electromouillage

Bien que nous sachions depuis plus d'un siècle que l'énergie interfaciale entre deux éléments immiscibles peut être contrôlée en appliquant un potentiel électrique [58], la tension de surface, en tant que force, n'a été l'objet d'attention que récemment, avec l'apparition des micro-systèmes (MEMS). Cette force devient une force dominante à l'échelle micrométrique, c'est pourquoi il est devenu intéressant de l'utiliser lors de la fabrication d'outils micro-mécaniques [59].

²BET : Bromure d'Ethidium.

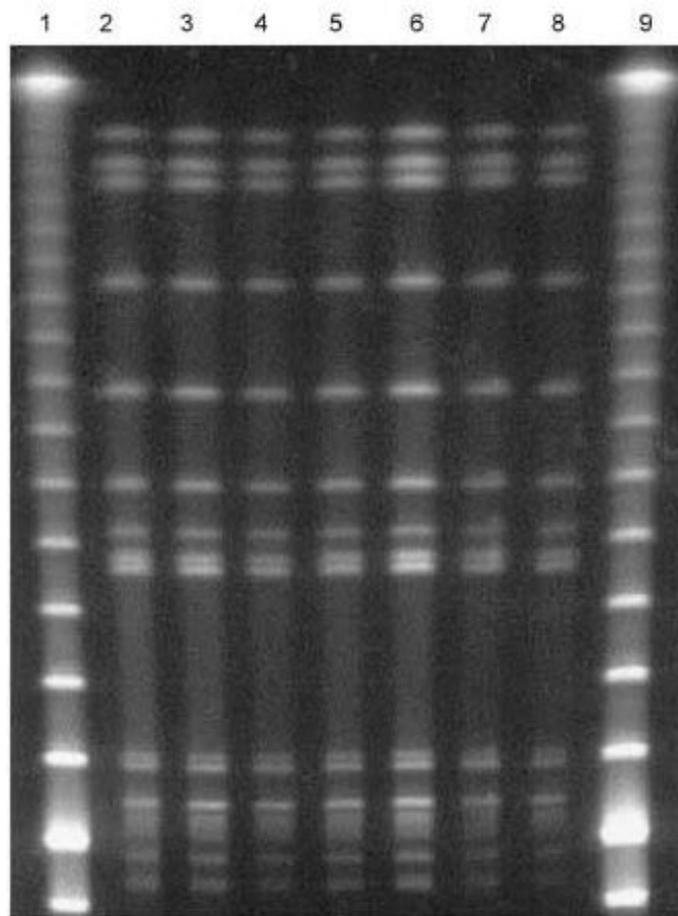


Fig. 4.4 : Photographie d'une séparation électrophorétique

Le contrôle électrique de la tension de surface, i.e. l'électrocapillarité ou électromouillage³, est porteur d'espoir pour les micro-outils de par sa faible consommation d'énergie, même si son implémentation reste plus complexe [60–62].

Bien que l'idée d'utiliser l'électromouillage — rendre une surface plus mouillante pour un liquide donné en appliquant une tension — afin de remplir des micro-canaux de liquides ait déjà été mise en application [61], son implémentation sur des micro-outils montre ses limites en terme de performance ; nous pensons notamment à la limite de la variation de l'angle de contact avant apparition du phénomène d'électrolyse.

Heureusement, depuis peu, le mouillage de films isolants peut être modifié par électromouillage [63]. Une large variation de l'angle de contact peut alors être obtenue en appliquant une tension importante (> 100 V), permettant ainsi la création de micro-outils pratiques.

Nous verrons cependant qu'il est désormais possible de réaliser des changements significatifs de l'angle de contact avec des tensions bien inférieures (de l'ordre de la dizaine de Volts).

4.3.2.1 Principes

Lorsqu'une tension externe est appliquée entre un liquide et un solide ou entre deux liquides non miscibles, les charges et les dipôles se redistribuent, modifiant ainsi l'énergie de surface à leur interface (voir figure 4.5).

Nous savons depuis longtemps [58] que la chaleur (thermocapillarité) et un potentiel électrique (électromouillage) peuvent être utilisés afin de modifier la tension de surface et qu'ainsi peut résulter un flux du liquide (ou des gouttes). L'électromouillage ne provoque aucun échauffement du liquide, se révèle plus rapide lors de déplacements (30-100 mm/s), et consomme moins d'énergie que son homologue thermique. Des exemples sont présents dans les domaines de l'optique, des micromoteurs, des micropompes, tous utilisant le principe de l'électromouillage continu, appelé CEW⁴. Ce dernier nécessite un métal liquide (par exemple le mercure) baignant dans un autre liquide (électrolyte), ce qui limite les produits pouvant être ainsi déplacés.

Deux autres principes d'électromouillage sont également mis en oeuvre, notamment pour les MEMS. Il s'agit de l'électromouillage [60], EW⁵, et l'électromouillage sur diélectrique [64], EWOD⁶, qui peuvent être utilisés pour manipuler des liquides à l'échelle microscopique sans la présence d'un autre liquide. Dans ces deux cas, le liquide est directement en contact avec l'air. Ainsi, non seulement les fonctions fondamentales de micropompage et des microvalves peuvent être mises en place, mais également des fonctions microfluidiques beaucoup plus compliquées telles que le mélange ou la séparation, et toujours en utilisant très peu d'énergie.

Un champ électrique appliqué sur une interface métal-solide peut modifier la tension de surface. Ce concept vient d'être utilisé pour des systèmes micrométriques [61, 62] et est illustré sur la figure 4.5. L'interface métal-électrolyte forme alors une double couche électrique appelée EDL, *Electric Double Layer*.

Cet électromouillage est seulement utile avec une combinaison d'électrodes métalliques et d'électrolytes qui peuvent générer une interface polarisable. La variation d'angle ($\Delta\theta$) induite par électromouillage conventionnel reste relativement faible parce que seulement de petites tensions peuvent être appliquées le long de l'EDL, la limite étant liée au transfert avant l'électrolyse. Il a été découvert récemment qu'une fine couche diélectrique insérée entre l'électrode et le liquide peut émuler l'EDL lors d'un électromouillage classique. Ce principe, illustré sur la figure 4.6, est appelé « Electromouillage-sur-diélectrique » (EWOD) afin de le distinguer de

³L'électromouillage et l'électrocapillarité représentent le même phénomène et sont utilisés sans distinction. Par mesure de clarté, nous garderons le terme d'électromouillage, sans doute le plus usité dans le milieu scientifique.

⁴CEW : Continuous ElectroWetting.

⁵EW : ElectroWetting.

⁶EWOD : ElectroWetting-On-Dielectric.

l'électromouillage sur une surface conductrice. EWOD doit être considéré comme un phénomène d'électromouillage pour certaines configurations matérielles. Le diélectrique idéal bloque le transfert d'électrons tout en maintenant un important champ électrique à l'interface qui se traduit par une redistribution des charges lorsqu'un potentiel est appliqué. En utilisant un diélectrique hydrophobe, l'angle de contact initialement large permet d'obtenir un $\Delta\theta$ important par électromouillage. De plus, en utilisant une couche diélectrique entre le liquide et l'électrode, virtuellement n'importe quel liquide peut alors être utilisé, sans se soucier de la polarisation de l'interface.

4.3.2.2 Comparaison entre les différents principes d'électromouillage

Les principes de l'électrocapillarité ou de l'électromouillage sont tous basés sur le fait que la tension de surface est une fonction du potentiel électrique le long d'une interface. Ils peuvent être classés en trois grandes catégories en fonction des types d'interfaces et de phases mises en jeu, comme le montre la figure 4.7.

La figure 4.7(a) explique l'électromouillage continu, CEW, qui utilise les changements de la tension de surface liquide (métal liquide) - liquide (électrolyte). Un mouvement est déclenché par une différence de pression causée par les tensions de surface induites par la tension appliquée aux deux ménisques. Des détails et une analyse plus approfondie du déplacement sont donnés en [66].

L'électromouillage et l'électromouillage-sur-diélectrique, EW et EWOD, utilisent le changement de la tension de surface solide-liquide, γ_{SL} , à l'interface liquide-solide-gaz, comme indiqué respectivement sur la figure 4.7 (b) et (c). Dans les deux cas, le changement de l'angle de contact ou de la mouillabilité est dû au changement prédominant de la tension de surface solide-liquide, γ_{SL} , qui se traduit par un déplacement du liquide à l'intérieur et hors du canal.

La relation mathématique reliant le potentiel électrique appliqué (V) et la tension de surface résultante (γ) peut être déduite de l'analyse thermodynamique de l'interface [67–70, 70–72]. Le résultat est exprimé dans l'équation de Lippmann 4.1 :

$$\gamma = \gamma_0 - \frac{1}{2}.c.V^2, \quad (4.1)$$

où γ_0 est la tension de surface de l'interface solide-solide avec un potentiel de charge de zéro (i.e. aucune charge à la surface du solide), et c est la capacité par unité de surface de l'EDL (pour l'CEW et l'EW) ou de la couche diélectrique (pour l'EWOD). Pour le cas de l'CEW, γ doit être considérée comme la tension de surface de l'interface entre le métal liquide et l'électrolyte. Dans les deux autres cas, γ dans l'équation 4.1 doit être interprétée comme la tension de surface de l'interface solide-liquide.

L'équation de Lippmann 4.1 peut être exprimée en termes d'angle de contact θ en incorporant l'équation de Young 4.2. L'équation 4.3 est appelée équation de Lippmann-Young :

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SG} - \gamma_{LG} \cdot \cos \theta, \quad (4.2)$$

$$\cos \theta = \cos \theta_0 + \frac{1}{\gamma_{LG}} \cdot \frac{1}{2} \cdot c \cdot V^2. \quad (4.3)$$

θ_0 représente l'angle de contact lorsque le champ électrique appliqué sur la couche interfaciale est de zéro, γ_{SL} est la tension de surface solide-liquide, et γ_{SG} symbolise la tension de surface solide-gaz. Nous prenons comme hypothèse que ces deux dernières grandeurs sont constantes et indépendantes du potentiel appliqué.

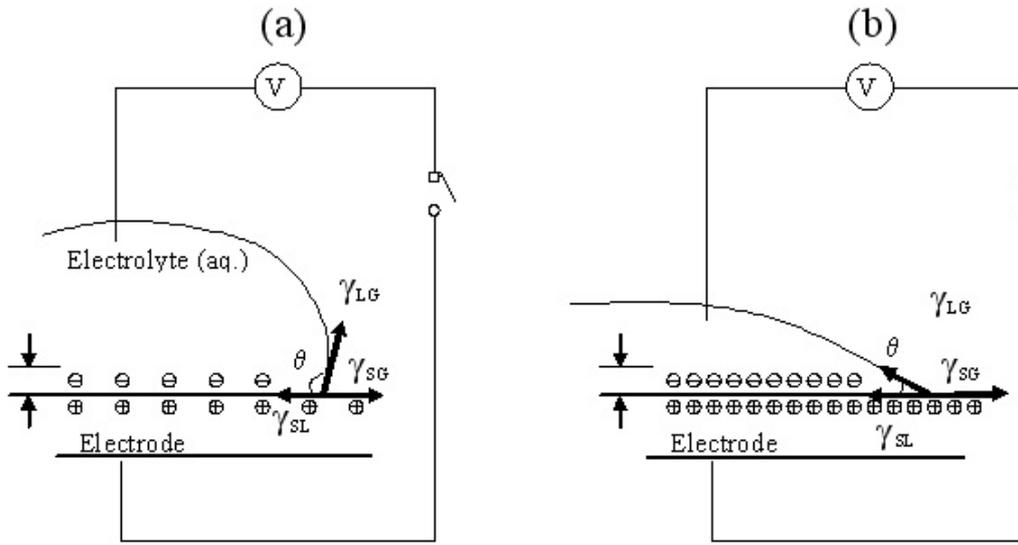


Fig. 4.5 : Principe de l'électromouillage (d'après [65]) : (a) Pas de tension externe appliquée. Les charges sont distribuées sur l'interface électrode-électrolyte, formant un EDL. (b) Tension externe appliquée. La densité de charge à l'EDL change de telle sorte que γ_{SL} et l'angle de contact diminuent ou augmentent.

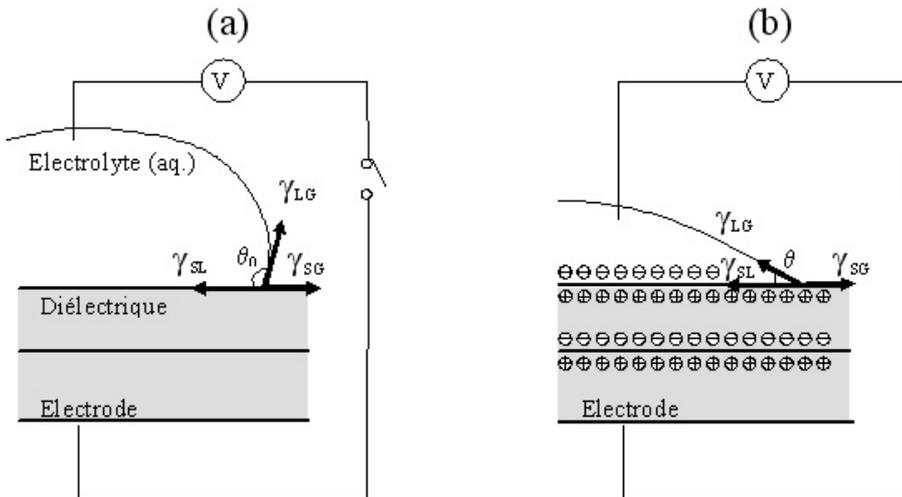


Fig. 4.6 : Principe de l'électromouillage sur diélectrique (d'après [65]) : (a) Pas de tension externe appliquée. Peu ou pas d'accumulation de charges sur l'interface. (b) Tension externe appliquée. Les charges s'accumulent sur les interfaces, γ_{SL} et l'angle de contact θ diminuent.

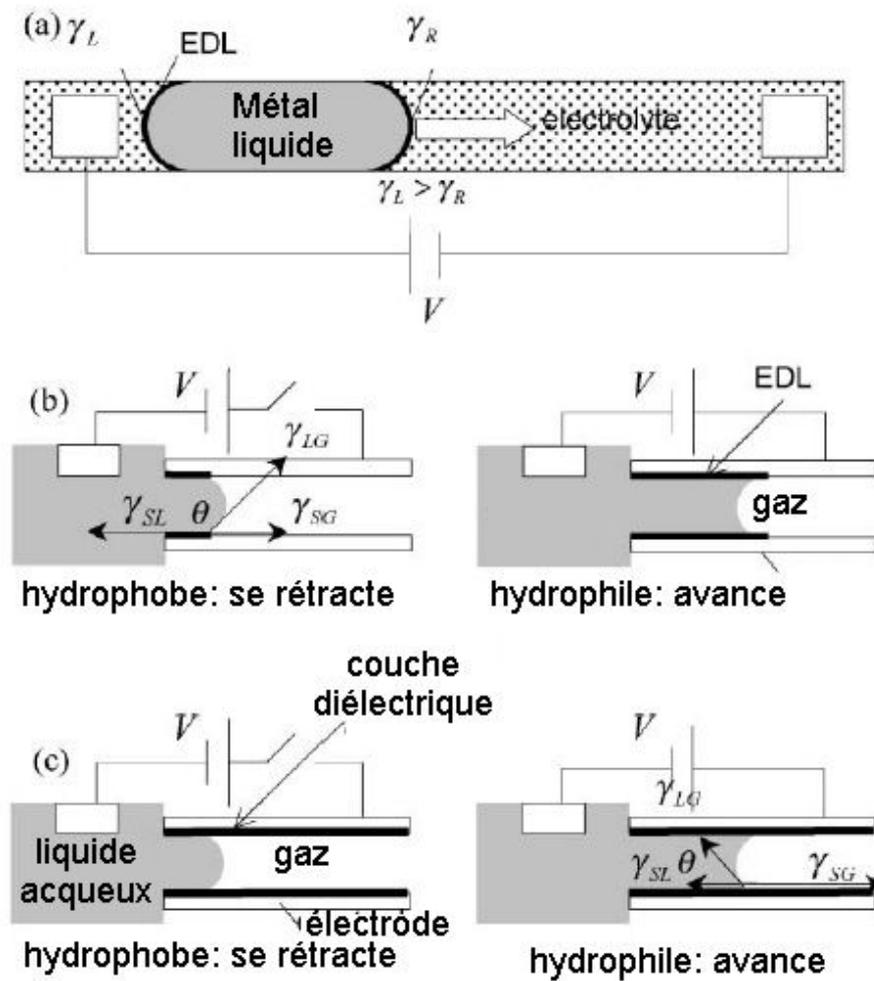


Fig. 4.7 : Principes de l'électromouillage [62] : (a) Electromouillage continu (CEW) ; (b) Electromouillage (EW) ; (c) Electromouillage-sur-diélectrique (EWOD).

L'angle de contact dans l'équation 4.3 est fonction de la tension appliquée entre le liquide et l'électrode. L'équation 4.3 implique également que la tension nécessaire pour obtenir un $\Delta\theta$ donné sera réduite si nous utilisons une couche diélectrique à forte capacité. La capacité spécifique d'un diélectrique est donnée par l'équation suivante :

$$c = \epsilon_0\epsilon/t, \quad (4.4)$$

où ϵ_0 représente la permittivité dans le vide, ϵ est la constante diélectrique du matériel diélectrique, et t a pour valeur l'épaisseur de la couche diélectrique.

De plus, lorsque l'angle de contact varie par action du champ électrique, la mouillabilité change également, et peut éventuellement passer d'un état hydrophobe à un état hydrophile. Il est aussi intéressant de noter que concernant l'électromouillage continu, l'angle de contact devrait toujours être considéré comme égal à 180° puisque la goutte n'est pas en contact direct avec la surface solide [73], alors que l'électromouillage classique ou sur-diélectrique utilise le changement de valeur de cet angle pour induire un mouvement aux liquides.

De nombreuses recherches décrivent les différents aspects de l'EWOD [61–64, 67, 68, 74–79]. Dans la plupart des ces études, un épais film diélectrique ($>10 \mu m$) est utilisé, et ainsi une tension assez importante ($>200 V$) est nécessaire afin d'obtenir une variation de l'angle de contact significative [62–64, 74–77].

Si typiquement de fortes tensions ($> 100 V$) sont nécessaires pour obtenir une variation suffisamment large de l'angle de contact ($\approx 40^\circ$) par EWOD afin de pouvoir transporter des liquides dans des microtubes, l'équipe de C.J. Kim a remarqué que l'équation de Lippmann-Young montre que l'épaisseur et la constante diélectrique de la couche diélectrique sont les principaux facteurs pour déterminer la tension nécessaire. En diminuant cette épaisseur et en utilisant un matériau ayant une constante diélectrique plus élevée, nous pouvons réduire la tension nécessaire. Cette équipe a utilisé l'oxyde de silicium comme couche diélectrique hydrophobe d'une épaisseur de 200 \AA . Une variation de l'angle de contact de 120° à 80° a été obtenue à environ $25 V$, et cette équipe a même réussi à diminuer cette tension jusqu'à $15 V$ [65].

4.3.3 Diélectrophorèse

La diélectrophorèse consiste à créer un mouvement sur une particule diélectrique à l'aide d'un champ électrique non uniforme. Elle se définit comme le déplacement de particules polarisables dans des champs non uniformes. L'eau comme n'importe quelle structure polarisable répond à l'effet d'un champ électrique en se regroupant dans les régions où le champ est à son maximum.

Le phénomène de diélectrophorèse (DEP) trouve aujourd'hui de nombreuses applications, notamment dans la manipulation de petits volumes de liquide, afin de contrôler leur déplacement sur un substrat par exemple, ou bien encore pour le tri cellulaire.

4.3.3.1 Principe

Considérons une particule diélectrique suspendue dans un champ électrique spatialement non uniforme comme indiqué sur la figure 4.8. Le champ appliqué induit un dipôle sur la particule. L'interaction de ce dipôle avec le champ électrique génère à son tour une force.

De par la présence d'un gradient de champ, les forces ne sont pas égales et un filet de liquide se met en mouvement. Si la particule est meilleure conductrice que le milieu qui l'entoure, le dipôle s'aligne avec le champ et les forces agissent sur le gradient de champ dans la direction du champ électrique le plus important. Si la particule est moins polarisable que son environnement, le dipôle s'aligne en opposition au champ et la particule est repoussée par les régions à fort champ électrique [80]. La force dépend du dipôle induit mais n'est pas affectée par la direction du champ électrique, répondant simplement au gradient du champ. Comme l'alignement avec le champ est impossible, la force peut également être générée par des champs de tensions alternatives qui auront l'avantage de réduire à néant toute force électrophorétique (due à une particule chargée).

Cet effet a été nommé diélectrophorèse par Pohl [81]. La force diélectrophorétique, F_{DEP} , agissant sur une sphère diélectrique homogène et isotropique, est donnée par :

$$F_{DEP} = 2.\pi.r^3.\epsilon_m.\Re[K(\omega)]\nabla E^2, \quad (4.5)$$

où r est le rayon de la particule, ϵ_m est la permittivité du milieu de suspension, ∇ est l'opérateur gradient, E est le champ électrique, et $\Re[K(\omega)]$ est la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti donné par :

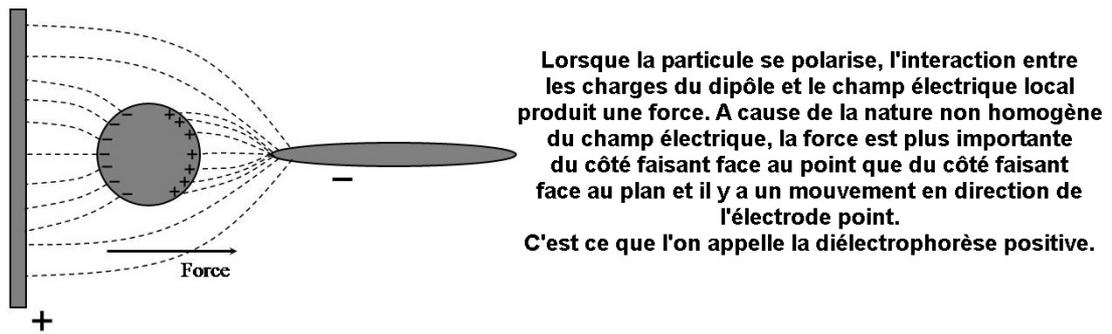


Fig. 4.8 : Principe de la diélectrophorèse sur particules

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*},$$

où ϵ_p^* et ϵ_m^* sont respectivement les permittivités de la particule et du milieu, et

$$\epsilon^* = \epsilon - \frac{j\sigma}{\omega},$$

avec σ conductivité, ϵ permittivité et ω fréquence angulaire du champ électrique appliqué.

La dépendance en fréquence de $\Re[K(\omega)]$ indique que la force exercée sur la particule varie en fonction de la fréquence. Le fait que la particule soit plus ou moins polarisable que le milieu agit sur l'amplitude de $\Re[K(\omega)]$. Si $\Re[K(\omega)]$ est positive, alors les particules se déplacent vers les régions de plus fort champ (c'est ce que l'on appelle la diélectrophorèse positive), l'inverse est appelé diélectrophorèse négative où les particules sont repoussées de ces régions. Il est possible de créer, en utilisant une certaine géométrie lors de la création des électrodes engendrant le champ électrique, des morphologies de champ électrique permettant de limiter les minima d'énergie potentielle par des régions à forces électriques croissantes. Grâce à de telles électrodes, les particules soumises à une DEP positive sont attirées par les régions à haut champ électrique et dans le cas d'une DEP négative, elles sont confinées dans des régions isolées à champ minimum.

4.3.3.2 Diélectrophorèse sur des liquides

Pohl définit la diélectrophorèse, DEP, comme étant l'attraction de particules non chargées, mais polarisables, vers les régions aux champs de haute intensité. La manipulation de liquides par DEP n'est pas concernée par la présence de particules dans le liquide. En fait, on exploite la force DEP afin de manipuler les masses liquides. La DEP sur les liquides n'est aucunement similaire à la DEP sur les particules, en ce sens que les liquides polarisables sont également dirigés vers les régions à haute intensité de champ, mais s'ajoute en plus le fait que le champ électrique influence la forme du liquide.

Comme le phénomène de capillarité, cela crée un nouvel équilibre électrostatique qui, correctement exploité, peut permettre de confiner des liquides dans des structures « sans murs ». La non uniformité du champ électrique sert de confinement.

4.3.3.3 Avantages et inconvénients

Aujourd'hui, la plupart des systèmes microfluidiques manipulant de petits volumes sont des systèmes fermés équipés de micro-capillaires, de valves et de micro-pompes ou autres

mécanismes permettant de créer et de contrôler des flux.

Le véritable inconvénient de ces techniques est la nécessité d'utiliser des tensions très importantes. En réduisant les dimensions, des couches diélectriques, par exemple, et en choisissant judicieusement les matériaux appropriés, on peut arriver à réduire cette limite et à n'utiliser que quelques dizaines de volts afin de mouvoir des gouttes de liquides.

La diélectrophorèse possède comme énorme avantage de pouvoir s'affranchir du phénomène d'électrolyse en travaillant en hautes fréquence (> 10 kHz). De plus, en travaillant à petite échelle ($< 100 \mu m$), l'effet Joule est fortement réduit car se dissipant plus facilement sur ces petites structures. En contre-partie, l'évaporation doit être considérée avec plus d'attention à cette échelle micrométrique. Enfin, les lignes de champ électrique pénètrent le liquide et contrôlent sa forme, créant ainsi une dépendance envers la fréquence de la tension appliquée.

4.3.4 Approche retenue

Lors des premières utilisations de nos micro-leviers, il nous était impossible de remplir la partie dite « réservoir ». La capillarité, à cette échelle micrométrique, ne suffisait pas.

Nous savions cependant qu'en utilisant un champ électrique, nous pouvions modifier les propriétés de l'interface liquide/leviers et ainsi permettre le chargement complet de nos outils.

4.3.4.1 Electromouillage et EWOD

La première idée fut d'implémenter des électrodes en aluminium sur les micro-leviers. Le procédé de fabrication ne devenait pas plus compliqué (voir chapitre 2), et cela ne nécessitait par la suite qu'un seul plot de connexion correspondant au potentiel des électrodes.

Une fois les électrodes implémentées sur nos micro-leviers, un principe d'électromouillage est utilisé, afin de faire évoluer l'angle de contact. Nous appliquons une tension de quelques Volts entre les électrodes et le réservoir contenant le produit à déposer, après avoir plongé nos micro-leviers dans celui-ci.

Les premiers résultats ne furent pas très satisfaisants, la variation de l'angle de contact restait très limitée pour des tensions continues de quelques Volts, et si nous augmentions celles-ci, nous passions rapidement au-dessus des tensions de claquage et à la fois un phénomène d'électrolyse et d'effet Joule se produisaient. Si pour des ADN (simple brin), la chaleur ne pose pas de problème, elle peut cependant dénaturer d'autres produits que nous pourrions être amenés à déposer (telles des protéines).

La deuxième idée fut de passiver nos électrodes, c'est-à-dire de recouvrir les électrodes par une fine couche d'oxyde de silicium. De cette manière, nous procédions alors à de l'électromouillage-sur-diélectrique EWOD. Notre couche d'oxyde étant très fine, nous nous trouvions dans les conditions idéales pour augmenter la variation de l'angle de contact. Cependant la tension de claquage restait trop faible même si le chargement s'était amélioré. Un phénomène d'ébullition était alors visible (voir figure 4.9). Malgré cela nous avons réalisé une centaine de dépôts d'oligonucléotides avec succès, mais pour certains produits ce double effet (Joule/Electrolyse) peut poser problème.

Ainsi, il nous fallait trouver une alternative, car l'effet Joule et l'électrolyse restaient problématiques.

4.3.4.2 Vers la Diélectrophorèse

La diélectrophorèse semble ainsi être la technique la plus appropriée, ne serait-ce que parce qu'elle est déjà utilisée pour déplacer des liquides ou des gouttes. La couche diélectrique permet de ne pas charger le produit et ainsi de ne pas le dénaturer (tout comme l'EWOD). A nouveau,

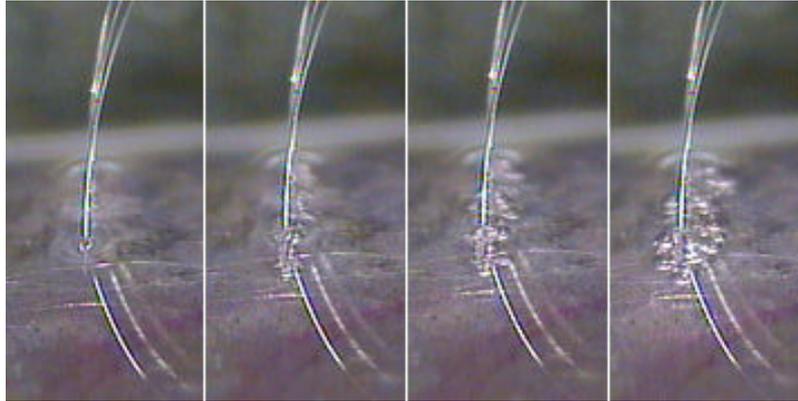


Fig. 4.9 : Evolution du phénomène d'ébullition par effet Joule

la réduction en taille permet de ne pas avoir à appliquer une tension trop importante, et le rôle principal est tenu par la fréquence du champ électrique appliqué.

L'application du champ électrique se fait toujours entre les électrodes et le réservoir contenant le produit à déposer. Cependant, en se situant à des fréquences supérieures à 10 kHz, nous évitons tout problème d'électrolyse. De plus, pour des applications à l'échelle micrométrique, l'augmentation de la chaleur par effet Joule est améliorée de manière significative, de par la prépondérance des forces électrostatiques et une dissipation rapide de la chaleur par les petites structures ($< 100 \mu m$).

Sur la figure 4.10, nous pouvons observer l'évolution du chargement et comment est exactement appliqué le champ électrique lors d'une animation.

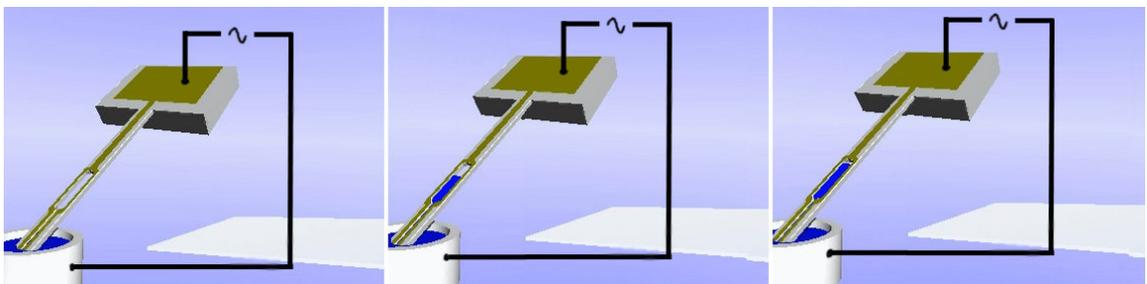


Fig. 4.10 : Principe du chargement par diélectrophorèse

Mais, l'implémentation de nos électrodes et leur forme font que nous ne sommes pas dans la meilleure configuration pour obtenir un chargement optimisé. Nous modifions simplement l'angle de contact à l'interface leviers/produit étalant un peu plus la goutte.

Reste néanmoins que cette technique nous permet de réaliser entre 60 et 100 dépôts en moyenne répondant ainsi aux besoins classiques de la fabrication des biopuces.

4.3.4.3 Protocole

Le protocole que nous allons décrire incorpore également les différentes étapes et les différents paramètres se rapportant au nettoyage des micro-leviers. En effet, à chaque étape de chargement des produits, il faut procéder à un nettoyage efficace des micro-leviers, afin d'éviter toute contamination (voir chapitre 3, paragraphe 3.5).

Nous immergeons donc nos leviers dans un réservoir contenant de l'eau distillée, et agitions nos leviers. Ceux-ci étant des systèmes ouverts c'est-à-dire que le liquide chargé est en contact avec l'air, une simple agitation permet un nettoyage complet. Puis nous séchons nos leviers à proximité du Peltier. Nous réitérons plusieurs fois ce cycle (3 fois généralement) avant de procéder au chargement proprement dit.

Plusieurs paramètres sont réglables :

- le nombre de cycles de nettoyage,
- l'agitation des leviers lors du nettoyage,
- la durée du séchage,
- le nombre de dépôts réalisables avec un seul chargement,
- le nombre de chargements possibles par réservoir,
- les emplacements des différents réservoirs,
- etc. ...

A l'usage, nous pouvons dire qu'un cycle de nettoyage, agitation des leviers dans l'eau distillée (5 allers-retours), séchage pendant 10 secondes, répété 3 fois suffit à garantir la propreté des micro-leviers (Cf. paragraphe 3.5 du chapitre 3). Augmenter ces paramètres ne peut que renforcer ce résultat mais n'est pas véritablement nécessaire (et fait perdre un peu de temps).

Ensuite, nous plongeons les micro-outils dans le réservoir contenant le produit que nous souhaitons déposer. Nous procédons à l'application du champ électrique souhaité. Tous les paramètres concernant la tension appliquée sont à disposition :

- la fréquence s'il s'agit de diélectrophorèse (à 0 sinon),
- la tension (crête à crête si diélectrophorèse),
- la durée (en secondes).

Généralement, une tension de 10 Volts crête à crête à une fréquence de 10 kHz est appliquée pendant une durée de 10 secondes pour la plupart des résultats présentés dans le chapitre 3. Ces paramètres pourraient être optimisés, notamment la durée de l'application du champ électrique car l'effet est quasi immédiat. Mais au delà de l'amélioration des paramètres de ce protocole, c'est le protocole lui-même que nous cherchons à améliorer pour l'instant (voir paragraphe suivant 4.4).

Ainsi, un processus complet de chargement, comprenant le déplacement vers les différents réservoirs, les nettoyages / séchages, le chargement, prendra environ 2 minutes et permet de réaliser entre 60 et 100 spots (temps comparable aux systèmes commercialisés). Il faut noter que ce processus peut largement être amélioré en termes de durée, de réduction en taille, et donc de déplacements, et de vitesse de la table de positionnement.

Remarque : Il arrive parfois, mais cela reste rare, que les premiers spots réalisés soient un peu plus « gros » que les suivants (poussière ou autre problème). Ceci est dû à un « surplus » de liquide qu'il faut éliminer, comme le fait un buvard pour un stylo-plume. Ainsi une option consiste à réaliser ces dépôts sur un emplacement autre que la biopuce. Cependant dans la plupart de nos expérimentations, ceci n'a pas été nécessaire, un contrôle visuel du chargement permettait de valider celui-ci et surtout de vérifier qu'aucune poussière ou autre élément ne viennent perturber le processus de chargement.

4.4 Amélioration du principe du chargement et du dépôt

4.4.1 Amélioration du chargement

Deux améliorations principales vont avoir lieu concernant le processus de chargement. La première porte directement sur la manière dont nous utilisons et appliquons le champ électrique.

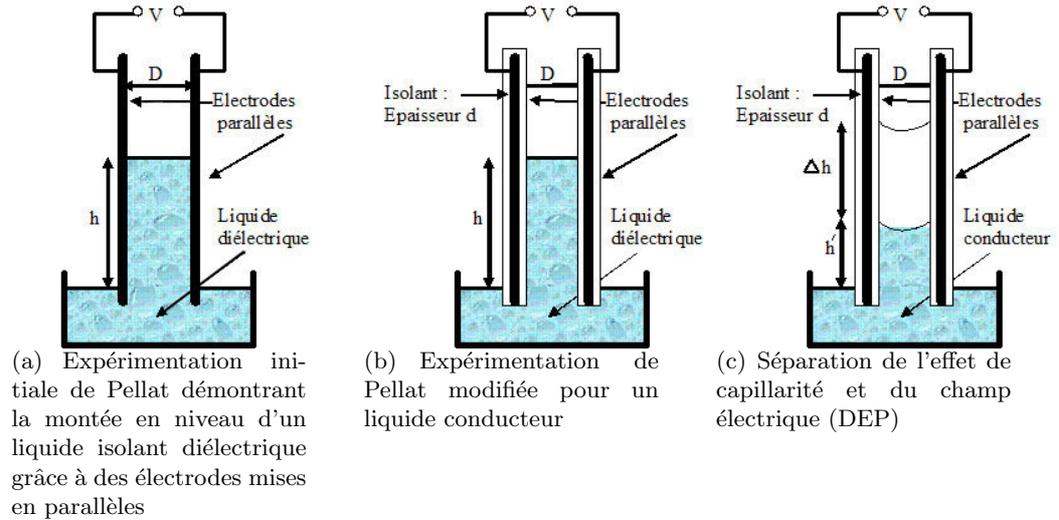


Fig. 4.11 : Montages expérimentaux inspirés par celui de Pellat [82]

La deuxième permettrait d'acheminer les produits vers de petits réservoirs et de remplir chaque micro-levier avec des produits différents.

4.4.1.1 Diélectrophorèse optimisée

Pellat [82] a démontré qu'un liquide confiné entre deux électrodes pouvait subir une montée opposée à la gravitation lorsqu'une tension est appliquée entre ces électrodes. La figure 4.11(a) montre la mise en place de cette expérimentation. Si celle-ci est réalisée dans l'air, que la densité massique du liquide est ρ_1 et que sa constante diélectrique est égale à κ_1 , alors l'expression de cette montée de niveau h est :

$$h \approx \frac{(\kappa_1 - 1)\epsilon_0 E^2}{2\rho_1 g},$$

où E est le champ électrique entre les électrodes et $g = 9,81m/s^2$ l'accélération gravitationnelle terrestre. Cette équation est correcte si la distance D entre les électrodes est assez petite afin que l'approximation du champ uniforme, $E = V/D$, soit applicable.

En fait, dans l'expérimentation de Pellat et dans celle de Pohl (à l'origine du mot diélectrophorèse), la force qui agit peut être formulée en termes de densité de force de Korteweg-Helmholtz, ce qui la placerait à l'emplacement libre (sans liquide) entre les électrodes, mais n'aurait aucune signification physique. Afin d'expliquer comment le liquide remonte sous l'action d'un champ électrique, il est utile de penser à la force du dipôle agissant sur les molécules polarisées du liquide dans la région à champ frangé, au bas des électrodes. Cette force peut être exprimée de la sorte :

$$f = \overline{P} \cdot \nabla \overline{E},$$

où \overline{P} est le vecteur densité des dipôles dans le liquide, non nul seulement là où le champ électrique est non uniforme.

Si nous utilisons un produit conducteur, il faut alors passer les électrodes avec une fine couche diélectrique (figure 4.11(b)). L'expression de la hauteur h de montée est alors différente [83] :

$$h = \frac{\kappa_d \epsilon_0 V^2}{4\rho_1 g d D}.$$

L'influence des forces de capillarité à notre échelle de travail et notamment la perturbation de l'angle de contact solide / liquide par un champ électrique doivent être pris en compte. En fait, par capillarité le liquide monte déjà entre les deux électrodes et cette montée se complète lorsque l'on applique un champ électrique (figure 4.11(c)) :

$$h = h' + \Delta h.$$

Ce qu'il faut retenir Nous distinguons aujourd'hui un effet électromécanique par électromouillage pur (le changement de l'angle de contact et le changement de hauteur de liquide associé) de la force électromécanique créée dans les zones à champ discontinu et qui permet notamment de mouvoir des liquides et des gouttes.

En distinguant les deux électrodes longeant le canal de nos micro-leviers, nous pouvons nous placer dans un contexte similaire à celui que nous venons de décrire et donc favoriser le chargement du produit.

De plus, ces électrodes pourraient être insérées à l'intérieur même du canal en utilisant une technique similaire à celle présentée par Wada et son équipe [84], favorisant ainsi d'autant plus la montée de liquide dans le canal et le réservoir du micro-levier.

4.4.1.2 Acheminement vers des réservoirs appropriés

La deuxième modification concerne les réservoirs où sont placés nos produits avant que ceux-ci soient chargés sur nos micro-leviers. Actuellement, nous sommes obligés de remplir les quatre leviers d'une même rangée avec le même produit car nous ne pouvons pas remplir des réservoirs assez petits. En effet, nous rappelons que nos micro-leviers sont espacés de $450 \mu m$. Lorsque nous les plongeons dans un réservoir, ils sont tous immergés dans le même liquide. Il nous faut donc trouver un moyen d'acheminer quatre produits dans des mini-réservoirs disposés au pas de nos micro-leviers (i.e. $450 \mu m$). Chacun des micro-leviers chargera alors un produit différent.

Par diélectrophorèse, il a été démontré qu'il est possible de mouvoir des liquides et des gouttes. Dans le cadre de son stage de DEA effectué au sein du LAAS, Peter Löw, développe un système d'électrodes permettant par diélectrophorèse d'étaler une goutte en suivant un chemin précis et déterminé au préalable. Son travail consiste à trouver les paramètres idéaux (épaisseurs couches diélectrique, oxyde de silicium, etc..., fréquence, tension crête à crête, traitements de surface, ...) pour notre application.

La figure 4.12 illustre le phénomène d'étirement par diélectrophorèse d'une goutte. Les paramètres sont les suivants :

- la largeur des électrodes est de $16 \mu m$ et leur espacement est de $4 \mu m$,
- l'épaisseur de la couche d'oxyde servant de couche diélectrique (passivation) est de 200 nm,
- en (1) aucune tension n'est appliquée,
- en (2), une tension de 105 Volts crête à crête (cac) à 100 kHz est appliquée et provoque un début de déformation de la goutte,
- en (3), la tension reste inchangée en fréquence mais passe à 125 Volts cac, accentuant ainsi le déplacement enclenché précédemment,
- enfin en (4) la tension passe à 85 Volts cac, permettant à la goutte de revenir sensiblement à sa position initiale.

Lors d'une autre expérimentation, c'est en modifiant les points de contact servant à appliquer une tension de 125 Volts crête à crête à 100 kHz que nous arrivons à provoquer le

mouvement de la goutte, comme l'indique la figure 4.13. Chaque portion de chemin, représentée par des électrodes différentes, est activée successivement. Notons qu'une tension minimum de 70 V est nécessaire afin de débiter le mouvement.

Nous pouvons aisément imaginer déposer avec une micro-pipette une goutte de produit dans un réservoir adéquat et fermé, nous évitant ainsi tout problème d'évaporation. Ce réservoir posséderait une sortie par laquelle le produit s'échapperait sous l'action d'un champ électrique. Les électrodes guideraient le produit jusqu'à un emplacement où se situerait le micro-levier devant recevoir ce produit. Et ainsi de suite pour les autres micro-leviers.

Considérons :

- w , la largeur des électrodes,
- g , l'espacement entre les électrodes,
- d , l'épaisseur de la couche diélectrique passivant les électrodes,
- κ , la constante diélectrique de la couche diélectrique, et
- R la largeur du filet de liquide s'étalant (en considérant qu'il couvre entièrement les électrodes et leur espacement soit $R = w + g/2$).

L'étude menée par Peter Löw, sachant que l'on souhaite réduire au maximum les tensions utilisées, fait ressortir :

$$\text{Si } \left. \begin{array}{l} R \searrow, d \searrow \text{ ou } \kappa \nearrow \\ w \nearrow \text{ et } g \searrow \end{array} \right\} \Rightarrow V \searrow$$

Ces résultats sont confirmés par les courbes visibles sur la figure 4.14. La constante diélectrique était fixée à 4 et différentes épaisseurs d de la couche diélectrique ont été testées. N'oublions pas que ces résultats sont valides si $d \ll w$ et $d \ll g$. Comme on peut le constater, la valeur minimum pour la tension est obtenue lorsque d diminue. Sur la courbe 4.14(2), pour des couches diélectriques fines, la tension minimum diminue jusqu'à ce que R soit inférieur à $5 \mu m$.

Puis, une série de mesures a été effectuée avec R constant, $R = 10 \mu m$. Sur la figure 4.15(1), nous pouvons constater qu'un espacement g inférieur à l'épaisseur w des électrodes est préférable afin de réduire la tension minimum (w augmente de gauche à droite et inversement pour g). Remarquons également qu'une diminution de l'épaisseur de la couche diélectrique réduit la tension minimum, confirmant le résultat précédent.

Enfin, la figure 4.15(2) présente l'influence de la constante diélectrique κ . Ainsi, une couche diélectrique avec une constante diélectrique aussi grande que possible est préconisée.

Le paramètre le plus important afin de minimiser la tension appliquée est donc l'épaisseur de la couche diélectrique. En la diminuant, nous pouvons arriver à des tensions d'environ 100 V. Malheureusement, lorsque ce paramètre approche la taille du micron, la tension de claquage diminue également et doit être prise en compte.

Les premiers résultats sont encourageants et nous poussent à croire que nous pourrions très prochainement charger de manière distincte deux micro-leviers adjacents, accélérant ainsi le processus de dépôt et réduisant les quantités de produits utilisés.

4.4.2 Contrôle actif du dépôt

Nous avons vu dans le chapitre 2, paragraphe 2.4.2, comment sont mis en place l'électronique et le contrôle des mouvements de la table XYZ utilisant des leviers piézorésistifs. Notre but est de contrôler le temps de contact et la force d'appui des micro-leviers sur le support, notamment parce que ces paramètres influencent le dépôt comme nous l'avons montré dans le chapitre 3, paragraphe 3.4. De plus, nous souhaitons avoir un parallélisme le plus parfait

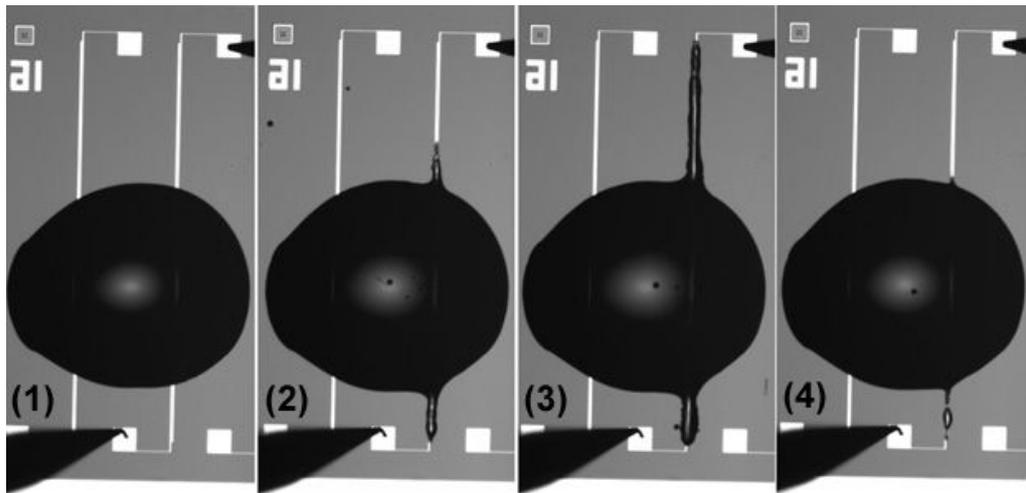


Fig. 4.12 : Déplacement d'une goutte par diélectrophorèse (100 kHz) : (1) 0 V (2) 105 V (3) 125 V (4) 85V (tensions crête à crête)

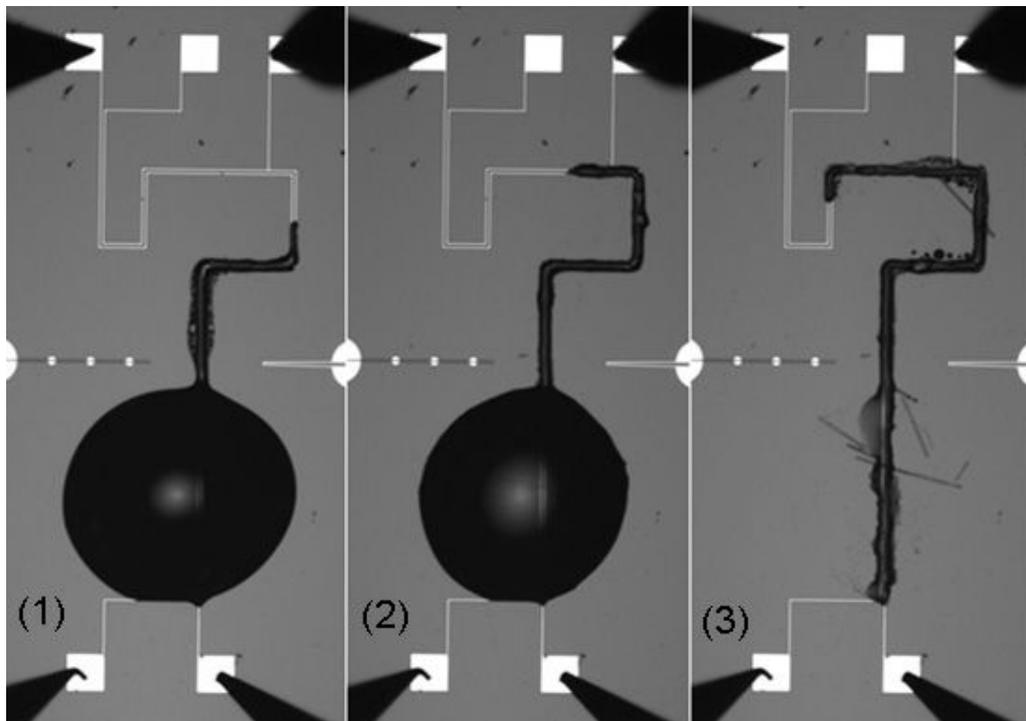


Fig. 4.13 : Changement des points de contact pendant une diélectrophorèse : (1) deux points, trois points (2) et quatre points (3) de contact activés

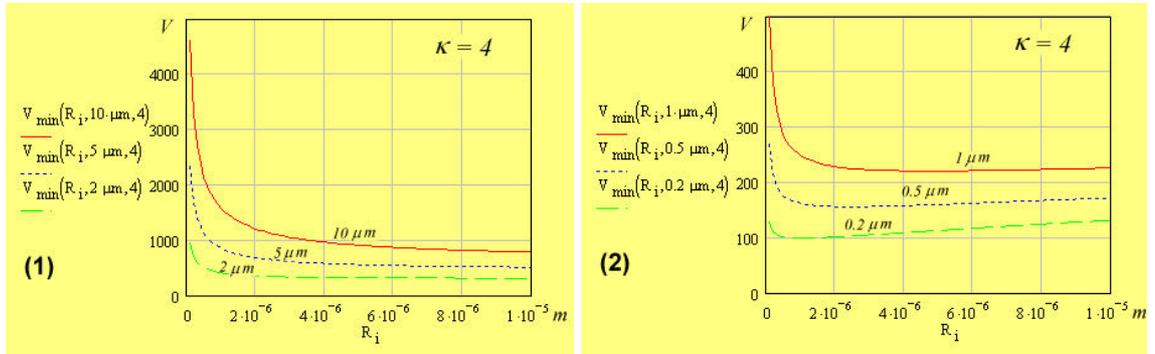


Fig. 4.14 : Tension minimum en fonction de la largeur du fil : Les différentes courbes représentent différentes épaisseurs d de la couche isolante.

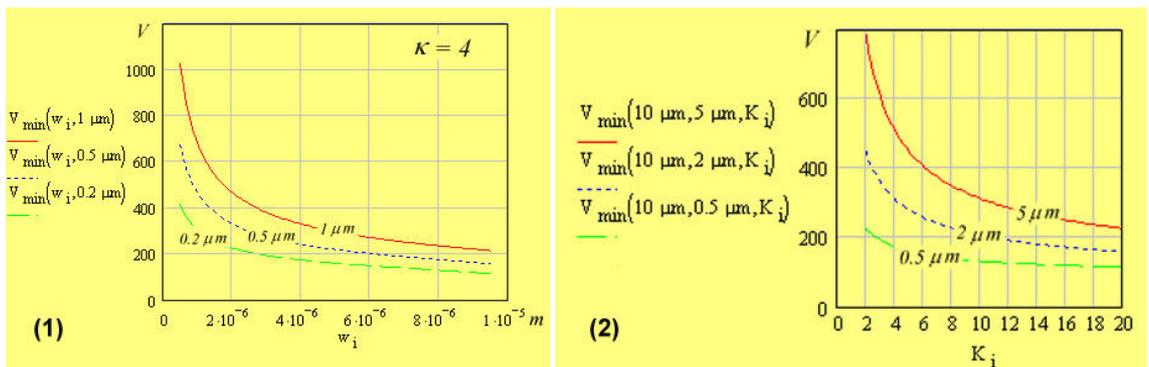


Fig. 4.15 : Tension minimum en fonction de (1) g , espacement entre électrodes, et w , largeur des électrodes, et (2) de k , constante diélectrique

possible entre notre rangée de leviers et ce même support, toujours dans le but de garantir une certaine uniformité entre nos dépôts. Les leviers piézorésistifs vont servir à réaliser ce contrôle.

Le paragraphe qui suit explique le principe de fonctionnement des piézorésistances, comment leur variation peut se traduire en force d'appui ou en déformation des micro-leviers et se termine en présentant les premiers résultats obtenus.

4.4.2.1 Principe de la piézorésistance

Le but est d'utiliser les micro-leviers piézorésistifs présentés dans le chapitre 2 en récupérant une tension qui traduira le déplacement effectué, la force exercée sur le micro-levier lors du contact.

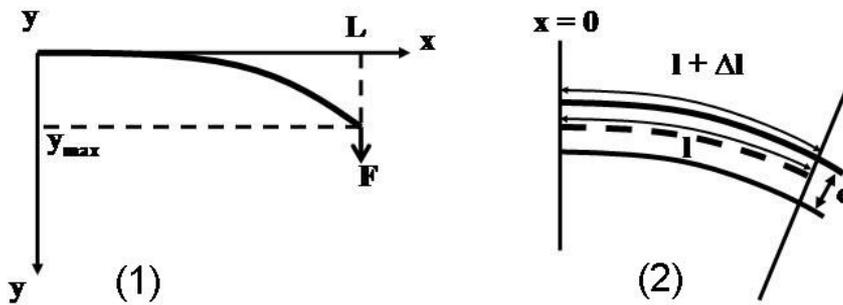


Fig. 4.16 : Déformation d'un microlevier (1) simple (2) piézorésistif

En effet, partons de l'équation d'une poutre, et en se plaçant en une position x (voir figure 4.16(1)) :

$$\frac{\partial^2 y}{\partial x^2} = \frac{F}{EI}(L - x).$$

où E est le module de Young, I le moment d'inertie et L la longueur du levier.

C'est une équation du second ordre linéaire qui peut avoir comme solution un polynôme de la forme :

$$y = A + Bx + Cx^2 + Dx^3.$$

On trouve alors :

$$C = \frac{FL}{2EI},$$

$$D = -\frac{F}{6EI}.$$

En intégrant des conditions initiales nulles, on trouve :

$$y = \frac{FL}{2EI}x^2\left(1 - \frac{x}{3L}\right),$$

soit une déflexion maximale à l'extrémité du micro-levier de :

$$y_{max} = \left(\frac{L^3}{3EI}\right)F$$

ce qui peut également s'écrire :

$$F = \frac{3EI}{L^3} y_{max} = K \cdot y_{max},$$

Plaçons nous désormais dans le cadre d'un micro-levier piézorésistif (voir figure 4.16(2)), on a alors :

$$\frac{\Delta l}{l} \Big|_{x=0} = \frac{3e}{2L^2} y_{max} = K_2 y_{max},$$

et ainsi

$$\frac{\Delta R}{R} = G_l \frac{\Delta l}{l}$$

avec l longueur de la résistance, L longueur du levier, e son épaisseur et G_l facteur de jauge longitudinal.

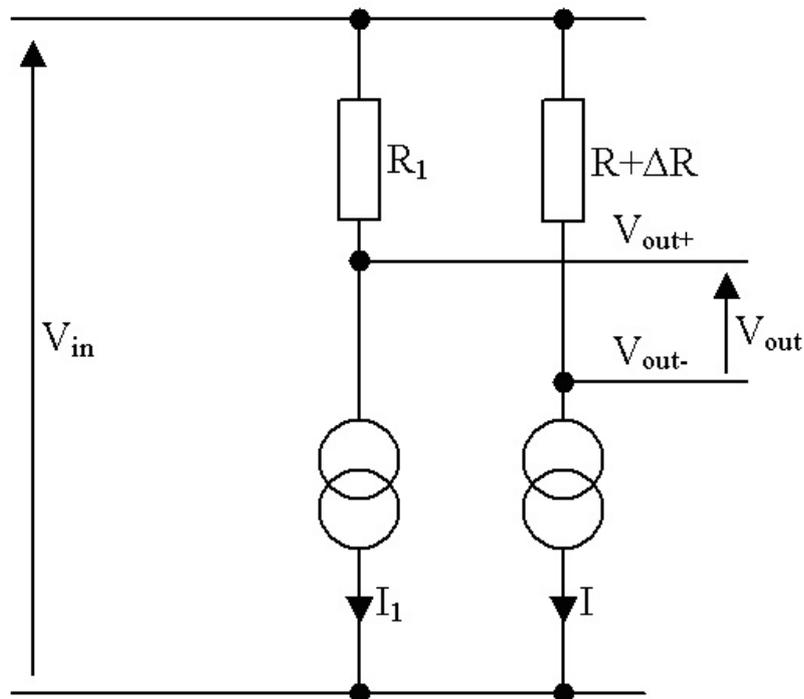


Fig. 4.17 : Montage demi-pont à courant constant pour la mesure de la force d'appui

Nous utilisons un montage demi-pont à courant constant (voir figure 4.17) s'inspirant d'une méthode classique de mesure par pont de Wheatstone. L'avantage de cette méthode, développée par Denis Lagrange et Fabrice Mathieu⁷, est qu'elle améliore la mesure de variation de résistance pour des conditions de puissance identiques. De plus, la méthode du pont de Wheatstone impose une grande précision sur les résistances pour que la mesure soit optimale, ce qui n'est plus le cas ici.

Comme pour la méthode du pont de Wheatstone, cette méthode impose que le pont soit équilibré pour $\Delta R = 0$.

La mesure s'effectuant sur la tension différentielle $V_{out} = V_{out+} - V_{out-}$, l'équilibre est réalisé pour $V_{out} = 0$ soit $V_{out+} = V_{out-}$.

⁷Dans le cadre de la thèse CNAM de Fabrice Mathieu, « Électronique de mesure rapprochée pour leviers piézorésistifs »

$$V_{in} - R_1 \cdot I_1 = V_{in} - R \cdot I$$

$$\Rightarrow R_1 \cdot I_1 = R \cdot I \Leftrightarrow \frac{I_1}{I} = \frac{R}{R_1}$$

Pour une variation nulle de résistance ($\Delta R = 0$), cette condition est respectée dès lors que le produit des résistances avec les courants qui les traversent sont identiques.

Le calcul du gain de ce montage sera effectué dans le cas d'un pont équilibré tenant compte des conditions de l'équation précédente. On a alors :

$$V_{out} = V_{out+} - V_{out-}$$

$$V_{out} = V_{in} - R_1 \cdot I_1 - (V_{in} - (R + \Delta R)I)$$

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

$$V_{out} = \Delta R \cdot I + R \cdot I - R_1 \cdot I_1$$

d'où selon la condition précédente :

$$V_{out} = \Delta R \cdot I$$

Après l'équilibrage, le résultat de la mesure n'est fonction que du courant traversant l'élément à mesurer et de la variation de résistance de celui-ci.

L'avantage de cette méthode est que la sensibilité du pont augmente en racine avec la valeur de la résistance de mesure car (P , puissance absorbée par l'élément mesurée) :

$$V_{out} = \Delta R \sqrt{\frac{P}{R}}$$

soit

$$V_{out} = \frac{\Delta R}{R} \sqrt{PR}.$$

Cette sensibilité est double de celle d'un pont de Wheastone.

Ce qu'il faut retenir, c'est que le signal de sortie peut être proportionnel à la fois à la force d'appui et au déplacement en bout de levier.

4.4.2.2 Premières expérimentations

Résolution du système La première expérimentation consiste simplement à contraindre nos micro-leviers et à regarder les signaux obtenus en sortie sur chacun d'entre eux. Le protocole expérimental consiste à mettre en contact les leviers sur un support rigide en les descendant, et à les déformer en continuant cette descente. La tension V_{MUX} permet de récupérer le signal de chaque micro-levier. Nous pouvons ainsi savoir lequel touche en premier. L'image 4.18 montre la carte du microcontrôleur et l'électronique servant à réaliser ces mesures et surtout à équilibrer les piézorésistances avant contact⁸, de manière à ce que les signaux de sortie sur V_{MUX} soient les mêmes, malgré une légère différence entre les résistances. Nous pouvons observer sur l'écran de contrôle le positionnement des micro-leviers par rapport au support.

Une fois en contact, nous continuons de descendre les leviers, les déformant volontairement et mesurons l'effet sur les tensions. Lorsque nous entrons en contact, notre signal oscille, parce

⁸Ceci est réalisé en supprimant l'offset sur la mesure de chaque piézorésistance.

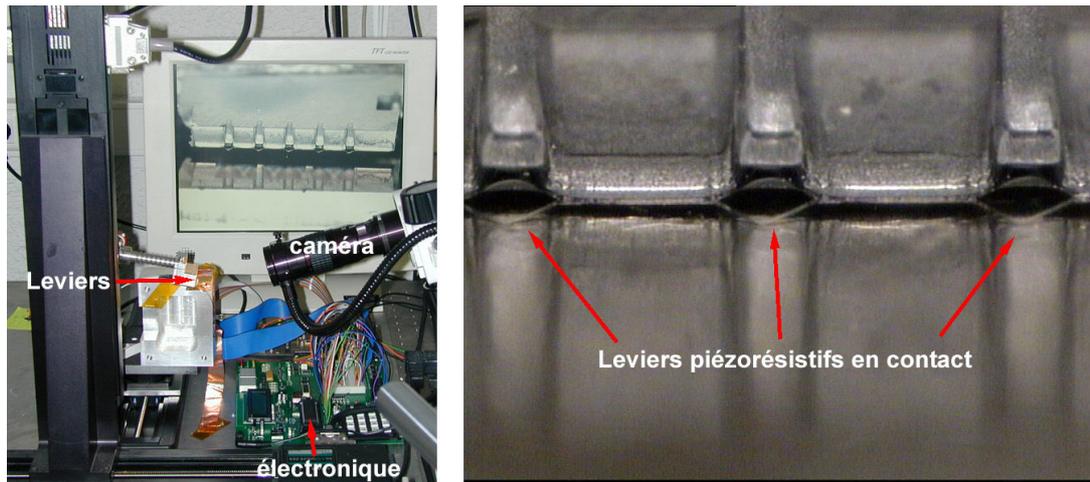


Fig. 4.18 : Expérimentation avec les leviers piézorésistifs

que le levier oscille également (vibrations acoustiques (mouvement de l'air) et mécaniques (montage), ...). A partir de là, nous lançons une acquisition pendant une descente de $2 \mu m$.

Le but est ainsi d'avoir une idée de la précision de notre système en terme de déplacement minimum détecté, et de savoir également comment ce déplacement est retranscrit. Ce paramètre, que nous appellerons « la résolution », consistera à évaluer la tension représentant un déplacement donné. Précisons que nous avons actuellement un bruit sur les signaux d'environ 10 mV.

Sur la figure 4.19, nous pouvons observer la réponse d'un levier déjà en contact sur le support. Une descente de $2,1 \mu m$ est effectuée avant une remontée de $2,0 \mu m$. Ainsi, notre résolution est d'environ 250 mV pour $1 \mu m$. Sachant que notre bruit de fond est d'environ 10 mV, nous pouvons détecter toute déflexion supérieure à $40 nm$. Ceci est parfaitement compatible avec notre plate-forme de positionnement puisque celle-ci a une précision de positionnement de 50 nm.

Avec un tel système, nous allons pouvoir garantir le temps de contact lors des dépôts. A l'heure actuelle, nous sommes limités par notre instrumentation dans la réduction de ce temps de contact. En effet, notre plate-forme de positionnement a un temps de réponse supérieur à la milliseconde et il faut rajouter à cela tous les temps de communication entre le micro-ordinateur et le contrôleur d'axe (via une liaison RS232). Si une application nécessite une réduction importante du temps de contact — il est actuellement de l'ordre de la seconde — il faudra alors revoir l'instrumentation (changement de la plate-forme de positionnement, communication via USB, ...).

4.4.3 Dépôt assisté par champ : de l'effet de champ à l'electrospray

A l'heure actuelle, nous avons essentiellement développé une technique par contact direct entre l'outil déposant et le substrat ou support. Cependant, une technique sans contact pourrait être adaptée et mise en place avec nos micro-leviers.

4.4.3.1 Principe et remarques

Dans le chapitre 1, nous avons présenté la technique electrospray de l'équipe de Morozov [38]. Des capillaires contiennent les produits à déposer. Une forte tension est alors appliquée

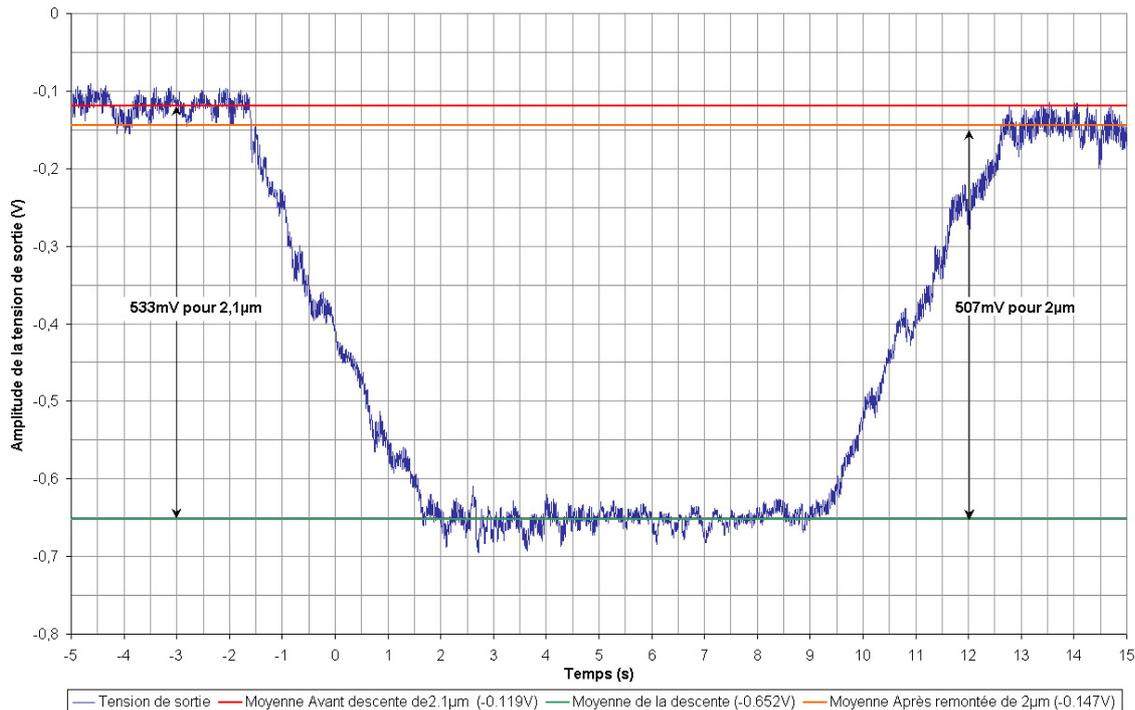


Fig. 4.19 : Courbe de réponse d'un levier lors d'une descente et d'une remontée

entre ces capillaires et le substrat où l'on souhaite effectuer les dépôts. En effet, passée une certaine tension (≈ 1000 V), il y a nébulisation et atomisation du produit⁹ contenant les sondes, celui-ci devenant instable car devant toujours se charger de plus en plus. Un masque, appelé « shadow mask », est utilisé afin que seuls les endroits, où un trou est dessiné, accueillent des sondes. Les particules éjectées ont une taille bien inférieure au micron et se déposent sur une surface qui est chargée à leur opposé (négativement si elles sont positives et vice-versa).

Deux remarques sont à effectuer par rapport à ce qui va suivre :

- la première qui consiste à analyser la nébulisation et l'atomisation du produit. En effet, le « nuage » ne se produit pas exactement dès la sortie des capillaires. Pendant un court instant — et donc sur une courte distance — le produit est éjecté de manière compacte à la manière d'un jet (voir figure 4.20¹⁰).
- de plus, le liquide forme un cône, dit cône de Taylor juste à l'extrémité du capillaire. Ceci est possible car les capillaires sont des systèmes fermés et les forces de capillarité luttent contre l'éjection du liquide.

Ainsi en se ramenant à notre échelle de travail et à nos micro-leviers, nous pourrions effectuer des dépôts de manière similaire, mais avec des tensions bien inférieures (quelques dizaines de Volts maximum).

L'inconvénient est qu'en réduisant cette distance, nous risquons de nous trouver seulement dans la zone de jet et ainsi ne pas profiter de l'effet de nébulisation. Or c'est cette zone qui est intéressante dans cette technique, car les particules sont alors séchées et donc extrêmement petites (inférieures au micron). Un certain « temps de vol » est donc nécessaire pour une utilisation optimale de ce procédé.

⁹Le produit se transforme en un nuage en quelque sorte.

¹⁰Image provenant du site <http://www.newobjective.com/electrospray/electrospray.html>

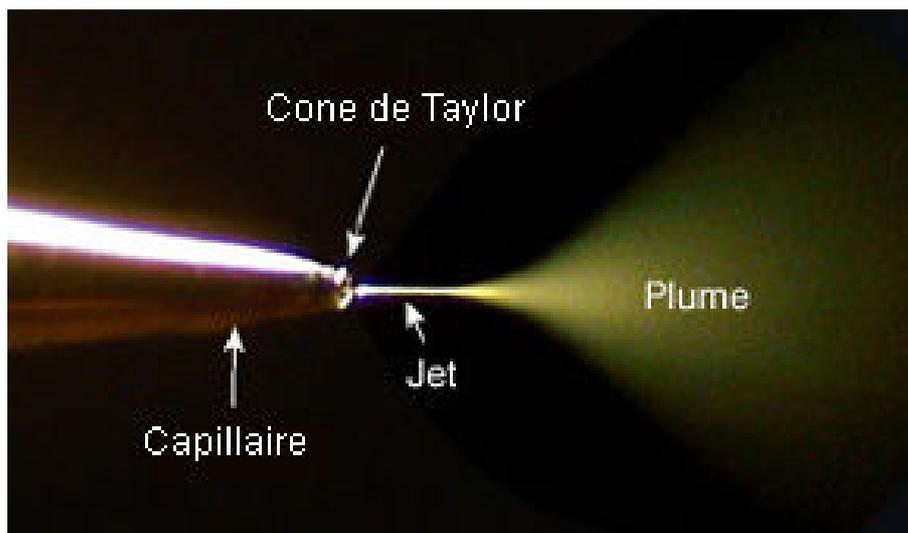


Fig. 4.20 : Forme du liquide lors de l'électrospray : en général, lorsque le liquide commence à s'éjecter du capillaire, il se charge et prend une forme conique appelée cône de Taylor, en l'honneur de M. G.I. Taylor qui a décrit ce phénomène en 1964. Le liquide prend cette forme car une fois chargé, une forme cylindrique peut contenir plus de charges qu'une sphère.

Remarque : Si l'on continuait d'augmenter la tension, une fois la nébulisation commencée, nous pourrions observer des jets multiples.

Enfin, en appliquant une tension (avec une polarisation inversée par rapport au chargement) entre les électrodes et le support des dépôts, et en réduisant la distance capillaire-substrat, nous ne sommes pas exactement dans un cas d'électrospray, car notre système n'est pas fermé. Mais la réduction des échelles de travail fait qu'en fait le cône de Taylor peut quand même se former et permettre l'éjection du liquide. Cette approche est d'ailleurs en cours de développement dans l'équipe de Christian Rolando [85] du Laboratoire de chimie Organique et Macromoléculaire de Lille. Les travaux de cette équipe montrent l'apparition du cône avec des structures similaires à nos micro-leviers [86, 87].

Cependant, si seul un effet de champ agit sur le liquide, ce qui sous-entend que celui-ci est chargé, nous parlerons alors d'un dépôt assisté par effet de champ, similaire à une technique développée par Ohigashi et al. [88] mais avec des tensions bien inférieures. Un nouveau type de leviers (voir exemple d'après [89] sur la figure 4.21) serait nécessaire pour réaliser de l'électrospray. Sur cette image, un cône percé est placé en bout de levier et sert à former un système « fermé » dans le sens où le liquide emprunte cette encolure pour être déposé. On peut imaginer une structure similaire pour réaliser des dépôts par électrospray.

4.4.3.2 Premiers résultats

Des premiers résultats ont été obtenus en utilisant cette méthode sans contact de dépôt assisté par champ électrique. Le principe est le suivant :

Nous approchons nos micro-leviers le plus possible du substrat devant recevoir le produit, et appliquons alors une tension entre les électrodes et le substrat, inversée en polarisation par rapport au processus de chargement (sans faire entrer en contact le levier avec le support).

L'image 4.22(1) représente la matrice obtenue en déposant de cette manière un mélange d'eau et de colorant (encre rouge). Les disparités en diamètre entre les différents spots pro-

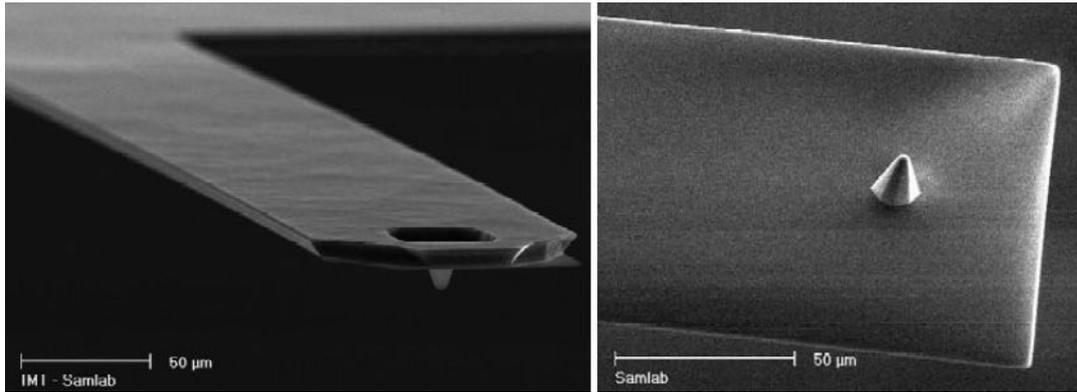


Fig. 4.21 : Micro-levier percé [89]

viennent de la difficulté à parfaitement contrôler la distance x entre l'extrémité des micro-leviers et la surface de dépôt (ici du cuivre)(voir figure 4.22(2)). En effet, les distances étant considérablement réduites par rapport à l'utilisation classique de cette technique, la moindre variation (due au contrôle du positionnement des leviers ou la surface de dépôt qui n'est pas parfaitement plane) entraîne une différence dans le champ électrique appliqué et donc dans la quantité de produit déposé. A noter que nous utilisons des impulsions électriques afin de réaliser les dépôts.

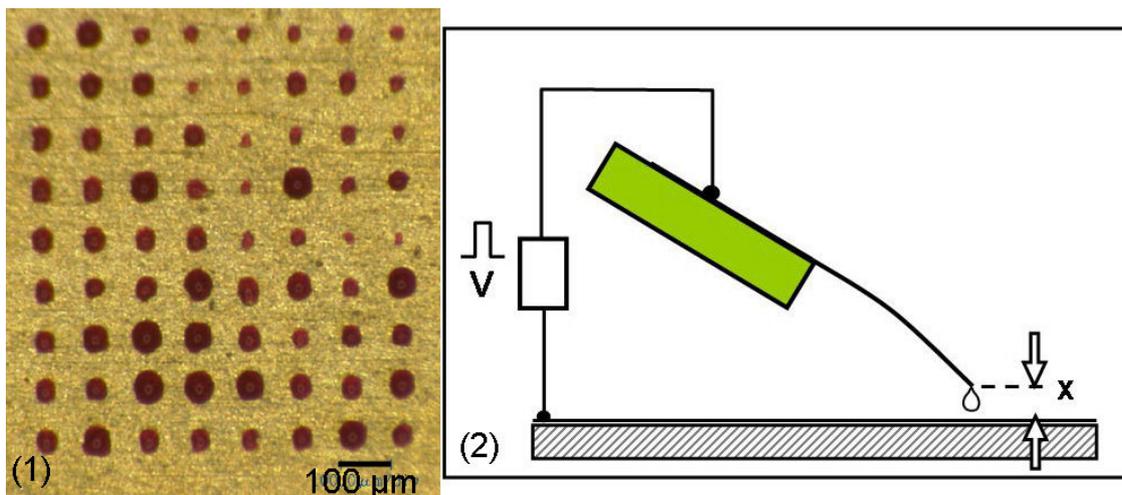


Fig. 4.22 : Dépôt par une technique sans contact : (1) Spots d'encre rouge (2) Principe

Nous pouvons légitimement penser que nos dépôts, vu la courte distance séparant nos outils de la surface de dépôt (quelques microns), sont réalisés non pas par nébulisation mais dans la partie « jet » dont nous avons parlé auparavant. Nous ne laissons pas la place matérielle nécessaire afin d'obtenir cette nébulisation. Notre méthode est donc comparable à la technique d'electrospray en ce sens que c'est également une technique sans contact et utilisant un champ électrique, mais actuellement nous pensons que nous n'utilisons pas l'atomisation du produit.

Aujourd'hui, et devant les résultats encourageants de la technique classique par contact présentés tout au long de cette thèse, nous n'avons pas développé cette technique. Simplement, nos micro-outils semblent être compatibles avec une telle utilisation. De plus, cette technique reste relativement coûteuse en quantité de produit, et nécessite des masques. Enfin, nous ne

connaissons pas encore quels sont les effets de la nébulisation sur les produits.

4.5 Conclusion

Ce chapitre décrit l'aspect actif de notre système notamment lors de la procédure de chargement. Après une étude des différentes techniques utilisant un champ électrique afin de manipuler ou de modifier un liquide, nous avons présenté dans un premier temps notre solution, basée sur le phénomène de la diélectrophorèse, pour le chargement des produits.

Ensuite, cette étude a mis en évidence la nécessité et la possibilité d'améliorer ce processus de chargement, notamment avec une implémentation différente des électrodes sur les leviers. Cette amélioration pourrait être complétée par une optimisation et une réduction des volumes utilisés en acheminant le produit vers les micro-leviers et en évitant toute évaporation lors de ce transfert.

Le processus de dépôt par contact peut lui aussi être assez rapidement amélioré grâce aux capteurs de force d'appui que sont les piézorésistances implémentées sur les micro-leviers. L'uniformité des spots pourrait ainsi être garantie par une homogénéité du temps de contact et de la force d'appui pour tous les dépôts.

Enfin, nous montrons que les électrodes pourraient également être utilisées lors du processus de dépôt et nous permettre de mettre en place une technique de dépôt sans contact. Cependant, une étude plus complète doit être mise en place afin de valider une telle approche.

Conclusion générale

Le travail que nous avons effectué durant ces trois années de thèse et présenté dans ce mémoire, tente d'apporter une nouvelle vision sur la fabrication des biopuces.

La biopuce est un outil formidable de diagnostic car elle permet d'analyser simultanément des milliers de séquences. Grâce à la réduction en taille, les biopuces mettent en oeuvre des processus analytiques rapides, fiables, et peu coûteux.

Le domaine des biopuces, que l'on nomme ainsi de par l'échelle de travail similaire à celle des puces électroniques, en est encore à ses balbutiements. De nombreuses applications sont désormais possibles, dans le domaine médical et la génétique, notamment dans la pharmacogénomique.

Les enjeux de cette nouvelle technologie sont considérables dans ces domaines, et les montants alloués concernant cette branche de la recherche ne cessent d'augmenter.

Notre premier chapitre a ainsi expliqué et décrit ce nouvel outil de diagnostic en essayant non seulement de faire un état de l'art des différentes techniques actuelles de fabrication, mais aussi de se plonger dans un proche avenir et de voir quelles sont, parmi ces techniques, celles qui peuvent être améliorées, optimisées voire complètement modifiées. Par ce dernier adjectif, nous n'entendons pas révolutionner entièrement la fabrication des biopuces quant au principe, mais quant à la technique et la technologie mises en place. Nous avons ainsi justifié notre approche, en nous appuyant d'une part sur des principes déjà existants, dépôt par contact direct entre l'outil et le support, et d'autre part sur des technologies de micro- et nano-fabrication peu coûteuses.

Une fois ces premiers concepts développés, une étude pratique, pour cette application concrète qu'est une biopuce, doit être mise en place afin de valider notre approche et notre système. Tout un ensemble de matériels avec des caractéristiques différentes, vitesse et précision pour la table de positionnement XYZ, tensions nécessaires, bande des fréquences utilisables, électronique de contrôle, interface de contrôle et de réglages, visualisation pré- et post-expérimentation, validation des résultats, est nécessaire pour mettre en place les protocoles expérimentaux indispensables à notre étude. Le chapitre 2, un peu à la manière d'un mode d'emploi, décrit tout cela en détails, suivant l'évolution pas à pas de ce matériel dont la principale composante est le micro-levier en silicium, le véritable outil de dépôt. Ces micro-leviers ont évolué afin de pouvoir à la fois remplir leur partie réservoir et réaliser ensuite entre 60 et 100 dépôts. Utilisant le principe d'une plume de stylo, nous avons intégré des électrodes en aluminium qui entourent à la fois le canal et la partie réservoir des micro-leviers.

C'est ainsi que le troisième chapitre aborde et présente l'aspect concrétisation, l'utilisation et les résultats obtenus avec notre système. Tous les aspects nécessaires et suffisants à la fabrication des biopuces y sont abordés. Les protocoles sont décrits de manière précise et les résultats discutés.

Plusieurs aspects peuvent se dégager parmi les objectifs préliminaires :

- un aspect *mécanique*, à savoir la validation de notre table de positionnement XYZ avec des outils du commerce,
- un aspect que nous nommerons abusivement¹¹ « *biologique* », à savoir être capable de déposer des oligonucléotides (ADN) et des protéines sans les dénaturer et dans des expérimentations semblables à celles réalisées couramment aujourd'hui,
- un aspect plus *fondamental*, l'étude de la contamination croisée, du processus de transfert lors du contact via l'étude du phénomène de diffusion et des paramètres entrant en jeu lors de ce processus,
- et enfin un aspect de *compatibilité* avec les micro et nano-technologies afin de faire avancer la technologie des biopuces et leur fabrication. Ces travaux vont d'ores-et-déjà dans ce sens, et le développement de biocapteurs¹² va très bientôt permettre d'améliorer cette compatibilité d'un point de vue utilisation et analyse des biopuces.

Ces objectifs remplis, d'autres sont également atteints :

- une amélioration du coût de revient des biopuces, par un outillage moins coûteux, des quantités de produits nécessaires plus faibles, et une possible optimisation de l'homogénéité des dépôts en terme de taille,
- une valorisation scientifique de ces travaux au travers de publications dans divers journaux [52, 90] et des communications nationales [91–94] et internationales [95–97],
- une valorisation industrielle, via des collaborations avec des sociétés telles qu'Innopsys et le partenariat avec la plate-forme transcriptome du Génopole de Toulouse ainsi qu'un dépôt de brevet [98].

Tous ces résultats ont été obtenus après avoir résolu la difficulté de la réduction en taille. En effet, il était impossible en trempant simplement les micro-leviers dans un réservoir contenant le produit à déposer de remplir le canal et la partie réservoir de ceux-ci. Ainsi, des électrodes en aluminium et l'application d'un champ électrique adéquat ont permis de modifier les paramètres tels que l'angle de contact, les tensions de surface. C'est pourquoi le dernier chapitre présente les techniques utilisées afin de modifier de tels paramètres via l'utilisation d'un champ électrique. D'une tension continue à une tension alternative, de l'électromouillage à la diélectrophorèse, notre procédé de chargement a évolué, nos outils également, s'attachant notamment à nous faire comprendre tous les aspects prenant part à ce procédé et ayant une influence.

La fin de ce mémoire est dédiée aux futures évolutions de notre système, que ce soit d'un point de vue principe d'utilisation ou matériel. Certaines sont déjà en cours et des premiers résultats encourageants ont été obtenus. Ainsi, un processus de dépôt sans contact pourrait être développé à partir de nos outils de base, les micro-leviers, en modifiant légèrement ceux-ci.

Mais la plus grande amélioration, en vue notamment d'une utilisation courante pour la réalisation de biopuces, concerne la partie chargement des produits sur nos micro-leviers. Un système d'acheminement des produits, d'un réservoir rempli manuellement et fermé (pour

¹¹Abusivement car l'application étant les biopuces, tous les résultats ont un aspect « biologique ».

¹²Une réalisation ultime consisterait en un support de dépôts équipés de micro-structures permettant d'analyser le produit déposé avant et après une interaction avec un second produit via la transmission d'un signal électrique pour chaque micro-structure. Une caractérisation de chaque micro-structure est alors nécessaire afin de comprendre la traduction en signal électrique de l'interaction.

éviter son évaporation) vers des réservoirs au pas de nos micro-leviers est en cours de développement. Le principe de base utilisé afin de mouvoir le liquide est la diélectrophorèse, principe couramment utilisé pour ce genre d'application.

Toutes ces perspectives et directions de recherche vont être développées et mises en place dans le cadre d'un projet intégré Européen **NaPa**¹³ et du réseau d'Excellence **Nano-To-Life**.

Ce dernier a pour but de coordonner les forces multidisciplinaires existantes afin d'atteindre un niveau technologique et scientifique suffisant dans toutes les disciplines liées aux nanobio-technologies. Des opportunités de marché seront offertes à des start-up dans le domaine de l'instrumentation biologique et biomédicale. Une dissémination du savoir visant principalement les scientifiques, l'industrie et la société sera mise en place et enfin, ce réseau tentera d'être plus compétitif que les initiatives américaines.

Nano-To-Life, Network of Excellence¹⁴, se concentrera principalement sur la recherche, la conception, l'étude, le design, l'amélioration et l'acceptation de nano-outils innovants pour la biologie, la médecine, la pharmacologie et la santé.

Deux types de partenaires sont associés dans ce projet (voir B.1) :

- un groupe noyau de 5 participants multidisciplinaires,
- des unités de recherches ou des compagnies spécialisées.

Concernant le projet Européen NaPa, il intègre les nouvelles méthodes de nano-adressage (Nanopatterning) afin d'anticiper et de répondre à une demande croissante de technologie, de standardisation et de métrologie nécessaires pour étudier, comprendre et mettre en place des structures nanométriques. Cette recherche se décompose en trois branches :

- nanoimpression par lithographie,
- soft lithography, et
- nanoadressage basé sur les MEMS.

Ainsi, NaPa regroupe 32 institutions Européennes, académiques et industrielles, possédant un vaste savoir-faire sur la nano-fabrication (voir B.2).

¹³NanoPatterning

¹⁴Nanotechnology for life, réseau d'Excellence.

Revues

Belaubre P., Guirardel M., Leberre V., Pourciel J.B., and Bergaud C.

Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples
Sensors and Actuators : Physics A, 2003, A paraître

Belaubre P., Guirardel M., Leberre V., Dagkessamanskaia A., Trevisiol E., Francois J.M., Pourciel J.B., Garcia G., and Bergaud C.

Fabrication of biological microarrays using microcantilevers

Applied Physics Letters, vol. 82, num. 18, pp 3122-3124, May 2003

Article cité dans *Virtual Journal of Biological Physics Research*, May 1, 2003, Vol. 5, Issue 9

Conférences internationales avec actes et comité de sélection

Belaubre P., Guirardel M., Leberre V., Dagkessamanskaia A., Trevisiol E., Francois J.M., Pourciel J.B., Garcia G., and Bergaud C.

Silicon-based microcantilevers for multiple biological sample deposition

IEEE Transducers'03, 12th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Boston, pages 1816-1819, June 2003

Belaubre P., Guirardel M., Leberre V., Dagkessamanskaia A., Trevisiol E., Francois J.M., Pourciel J.B., Garcia G., and Bergaud C.

Silicon-based micropins for multiple biological sample deposition

Nanobiotechnologies II, Grenoble, page PO2.7, April 2003

Belaubre, P., Guirardel M., Leberre V., Pourciel J.B. and Bergaud C.

Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples
Euroensors XVI, 16th European Conference on Solid-State Transducers, Prague, pages 541-544, September 2002

Autres communications

Belaubre P., Guirardel M., Leberre V., Dagkessamanskaia A., Trevisiol E., Francois J.M., Pourciel J.B., Garcia G. and Bergaud C.

Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples
SITEF, Technologies et Sciences du Vivant, Toulouse, October 2002

Belaubre Pascal

Système de dépôt de solutions biologiques pour la fabrication de puces à ADN
Lettre d'informations Biotechs n°12, 8 Septembre 2002

Belaubre Pascal

Système de dépôt de liquides biologiques pour la fabrication de puces à ADN
Journée INTRAGENPOLE, 24 Juin 2002 Toulouse

Belaubre Pascal

Fabrication de puces à ADN : Dépôt de liquides biologiques
3ème Congrès des Doctorants de l'Ecole Systèmes, 22-23 Mai 2002 Blagnac

Brevet

Bergaud C., Guirardel M., Belaubre P., Belier B. et Pourciel J.B.

Système de dépôt de solutions biologiques avec ou sans contact pour la fabrication de biopuces
Dépôt de brevet n° FR2839662 en cours d'extension internationale, 16 Mai 2002, publié 21-11-2003

Prix

Belaubre Pascal

Conception et réalisation d'un système de dépôt de produits biologiques pour la réalisation de biopuces
Lauréat du 1er Prix INSA Transfert, 20 Mai 2003

Bibliographie

- [1] JJW Chen, R Wu, PC Yang, et al. Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. 1998.
- [2] TM Gress, JD Hoheisel, GG Lennon, G Zehetner, et H Lehrach. Hybridization finger-printing of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome*, 3:609–61, 1992.
- [3] G Pietu, O Alibert, V Guichard, B Lamy, F Bois, E Leroy, R Mariage-Samson, R Houlgatte, P Soularue, et C Auffray. Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. *Genome Research*, 6:492–503, 1996.
- [4] KR Khrapko, Yup Lysov, AA Khorlin, IB Ivanov, GM Yershov, SK Vasilenko, VL Florentiev, et AD Mirzabekov. A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. *DNA Seq*, 1:375–88, 1991.
- [5] SP Fodor, JL Read, MC Pirrung, L Stryer, AT Lu, et D Solas. Light-directed spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251:767–73, 1991.
- [6] EM Southern, U Maskos, et JK Elder. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics*, 13:1008–17, 1992.
- [7] DJ Lockart, H Dong, MC Byrne, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 14:1675–80, 1996.
- [8] L Wodicka, H Dong, M Mittman, MH Ho, et DJ Lockart. Genome-wide expression monitoring in *saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 15:1359–67, 1997.
- [9] C Nguyen, D Rocha, S Granjeaud, M Baldit, K Bernard, P Naquet, et BR Jordan. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics*, (29):207–215, 1995.
- [10] M Schena, D Shalon, R Heller, A Chai, PO Brown, et RW Davis. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. Dans *Nat. Acad. Sciences USA*, pages 10614–9, October 1996.
- [11] M Schena et RW Davis. *PCR Methods Manual*, chapitre Parallel Analysis with Biological Chips, pages 445–55. Academic Press, San Diego, m. innis, d. gelfand, j. sninsky édition, 1998.
- [12] E Trévisiol, J Leclaire, G Pratviel, AM Caminade, JP Majoral, JM François, et B Meunier. Supports solides fonctionnalisés par des dendrimères phosphorés, leur procédé de préparation et applications. *French patent application*, BF 0205049, 2002.
- [13] E Trévisiol, V Le Berre, J Leclaire, G Pratviel, AM Caminade, JP Majoral, J François, et B Meunier. Dendrilsides, dendrichips: a simple chemical functionalization of glass slides as an effective mean for the preparation of biochips. *New Journal of Chemistry*, 27:1713–1719, 2003.

- [14] T Huynn-Dinn. *Synthèse et utilisation des oligonucléotides*. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, 1993.
- [15] EL Sheldon, R Briggs, J Bryan, M Cronin, M Oval, G McGall, E Gentalen, CG Miyada, R Masno, D Modlin, A Pease, D Solas, et SPA Fodor. Matrix DNA hybridization. *Clinical Chemistry*, 39 (4):718–719, 1993.
- [16] P Mérel. De la pcr aux puces à ADN. *Biofutur*, pages 139–58, 1994.
- [17] G Yershov et al. DNA analysis and diagnosis on oligonucleotide microchips (sequencing by hybridization pattern). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4913–4918, May 1996.
- [18] RS Matson, JB Rampal, et PJ Coassin. Biopolymer synthesis on polypropylene supports. *Analytical Biochemistry*, 217:306–310, 1994.
- [19] T Livache, A Roget, E Dejean, C Barthet, G Bidan, et R Teoule. Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole. *Nucleic Acids Res.*, 22:2915–21, 1994.
- [20] RJ Lipshutz, MS Morris, M Chee, E Hubbell, MJ Kozal, N Shah, N Shen, et R Yang. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *BioTechniques*, 19:442–447, 1995.
- [21] M Schena, D Shalon, RW Davis, et PO Brown. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270:467–70, 1995.
- [22] J Derisi, L Penland, PO Brown, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns un human cancer. *Nat. Genet.*, 14:457–60, 1996.
- [23] JL DeRisi, VR Iyer, et PO Brown. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278:680–6, 1997.
- [24] A Goffeau. Molecular fish on chips. *Nature*, 385:202–203, 1997.
- [25] AD Mirzabekov. DNA sequencing by hybridization—a megasequencing method and a diagnostic tool? *Trends Biotechnol.*, 12:27–32, 1994.
- [26] M Chee, R Yang, E Hubbell, A Berno, XC Huang, D Stern, et al. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science*, 247:610–614, 1996.
- [27] EM Southern, SC Case-Green, JK Elder, M Johnson, KU Mir, L Wang, et JC Williams. Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridization behavior of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, 22:1368–1373, 1994.
- [28] J Weiler et JD Hoheisel. Combining the preparation of oligonucleotide arrays and synthesis of high-quality primers. *Anal. Biochem.*, 243:218–227, 1996.
- [29] RG Sweet. signal apparatus with fluid drop recorder, us patent no. 3,596,275, 1971.
- [30] SL Zoltan. Pulse droplet ejection system, us patent no. 3,857,049. to Clevite Corporation, 1974.
- [31] A Koide, Y Sasaki, Y Yoshimura, R Miyake, et T Terayama. Micromachined dispenser with high flow rate and high resolution. Dans *MEMS*, 2000.
- [32] JL Kyser et SB Sears. Method and apparatus for recording with writing fluids and drop projection means thereof, us patent no. 3,946,398. to Silonics Inc, 1976.
- [33] A Mikalesen. Apparatus and method employing phase change ink, us patent no. 4,742,364. to DataProducts Corporation, 1988.
- [34] I Endo, Y Sato, S Saito, T Nakagiri, et S Ohno. Liquid jet recording process and apparatus thereof, uk patent no. 2,007,162. to Canon, 1979.
- [35] JL Vaught, FL Cloutier, DK Donald, JD Meyer, CA Tackind, et HH Taub. Thermal inkjet printer, us patent no. 4,490,728. to Hewlett-Packard, 1984.
- [36] T Okamoto, T Suzuki, et N Yamamoto. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nature Biotechnology*, 18:438–441, April 2000.

- [37] O Yogi, T Kawakami, M Yamauchi, JY Ye, et M Ishikawa. On-demand droplet spotter for preparing pico- to femtoliter droplets on surfaces. *Anal. Chem.*, 73:1896–1902, April 2001.
- [38] VN Morozov et TY Morozova. Electrospray deposition as a method for mass fabrication of mono- and multicomponent microarrays of biological and biologically active substances. *Anal. Chem.*, 71:3110–3117, August 1999.
- [39] D Huang et ESK Kim. Micromachined acoustic-wave liquid ejector. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 10:442–449, September 2001.
- [40] J Brazzle, I Papautsky, et AB A.B. Frazier. Hollow metallic micromachined needle arrays. *Journal on Micro Biomedical Devices*, 2:197–205, 2000.
- [41] KR Khrapko, AA Khorlin, IB Ivanov, BK Chernov, YP Lysov, SK Vasilenko, VL Florent'ev, et AD Mirzabekov. Hybridization of DNA with oligonucleotides immobilized in gel: a convenient method for detecting single base substitutions. *Molecular Biology*, 25:581–591, 1991.
- [42] D Shalon, SJ Smith, et PO Brown. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research*, 6:639–645, 1996.
- [43] GM Whitesides et JC Love. *The Art of Building Small*. Scientific american, 2001.
- [44] RS Kane, S Takayama, E Ostuni, DE Ingber, et GM Whitesides. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials*, 20:2363–2376, 1999.
- [45] RD Piner, J Zhu, F Xu, S Hong, et CA Mirkin. Dip-pen nanolithography. *Science*, 283:661, 1999.
- [46] S Hong, J Zhu, et CA Mirkin. Multiple ink nanolithography : Toward a multiple-pen nano-plotter. *Science*, 286:523, 1999.
- [47] H Taha, RS Marks, LA Gheber, I Rousso, J Newman, C Sukenik, et A Lewis. Protein printing with an atomic force sensing nanofountainpen. *Applied Physics Letter*, 83:1041–1043, August 2003.
- [48] E Lebrasseur, JB Pourciel, T Bourouina, T Mazuzawa, et H Fujita. A new characterization tool for vertical profile measurement of high-aspect-ratio microstructures. *Journal of Micromechanics and Micro-engineering*, (12):280–285, April 2002.
- [49] JB Pourciel, L Jalabert, et T Masuzawa. Profile and surface measurement tool for high aspect-ratio microstructures. volume 2, pages 1056–1061, Saitama, Japan, August 2002. 6th International Conference on Motion and Vibration Control.
- [50] M Ishizuka, M Abe, H Houjou, S Shoji, J Mizuno, K Tsutsui, et Y Wada. Design and fabrication of multi-metal electrodes implanted pdms structures for micro flow devices using 3-d assembly. volume 2, pages 999–1002, Boston, June 2003. Proceedings of Transducers'03.
- [51] JGF Tsai, Z Chen, S Nelson, et CJ Kim. A silicon-micromachined pin for contact droplet printing. pages 295–298. MEMS'03, January 2003.
- [52] P Belaubre, M Guirardel, V Leberre, A Dagkessamanskaia, E Trevisiol, JM Francois, JB Pourciel, G Garcia, et C Bergaud. Fabrication of biological microarrays using microcantilevers. *Applied Physics Letters, Cited in the Virtual Journal of Biological Physics Research, Volume 5, Issue 9, May 1, 2003*, 82(18):3122–3124, May 2003.
- [53] KB Lee, JH Lim, et CA Mirkin. Protein nanostructures formed via direct-write dip-pen nanolithography. *Journal of American Chemical Society*, 125:5588–5589, April 2003.
- [54] S Rozhok, R Piner, et CA Mirkin. Dip-pen nanolithography: What controls ink transport ? *J. Phys. Chem.*, B(107):751–757, 2003.
- [55] Mathieu Guirardel. *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré: détection de l'adsorption de nanoparticules d'or*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabathier de Toulouse, France, Septembre 2003.
- [56] Garret et Grisham. *Biochemistry*, volume 2nd edition. Saunders College Publishing, Fort Worth, 1999.

- [57] I Papautsky, S Mohanty, R Weiss, et AB Frazier. High lane density slab-gel electrophoresis using micro-machined instrumentation. *Electrophoresis*, 22:3908–3915, 2001.
- [58] MG Lippmann. Relations entre les phénomènes électriques et capillaires. *Annals of Chemistry and Physics*, 5(494):495–549, 1875.
- [59] CJ Kim. Invited lecture. Dans *30th AIAA Fluid Dynamics Conference*, page 1, Northfolk, VA, 1999.
- [60] H Matsumoto et JE Colgate. Preliminary investigation of micropumping based on electricla control of interfacial tension. pages 105–110, Napa Valley, CA, 1990.
- [61] J Lee et CJ Kim. Liquid micromotor driven by continuous electrowetting. *Proc. IEEE Micro Electro Mechanical Systems Workshop, Heidelberg, Germany*, pages 538–543, January 1998.
- [62] J Lee, H Moon, J Fowler, T Schoellhammer, et CJ Kim. Electrowetting and electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling. *Sensors and Actuators A*, 95:259–268, 2002.
- [63] B Berge. Electrocapillarité et mouillage de films isolants par l'eau. *C.R. Acad. Sci.*, Ser. II, 14:157–163, 1993.
- [64] HJJ Verheijen et MWJ Prins. Reversible electrowetting and trapping of charge: model and experiments. *Langmuir*, 15:66166620, 1999.
- [65] H Moon, SK Cho, RL Garell, et CJ Kim. Low voltage electrowetting-on-dielectric. *Journal of applied physics*, 92(7):4080–4087, October 2002.
- [66] J Lee et CJ Kim. Theory and modeling of continuous electrowetting microactuation. Dans *ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition*, pages 397–403, Nashville, TN, 1999. MEMS.
- [67] R Digilov. Charge-induced modification of contact angle: the secondary electrocapillary effect. *Langmuir*, 16:6719–6723, 2000.
- [68] H Verheijen et M Prins. Contact angle and wetting velocity measured electrically. *Rev. Sci. Instrum.*, 70:3668–3673, 1999.
- [69] F Saeki, J Baum, H Moon, J Yoon, CJ Kim, et R Garrell. Electrowetting on dielectrics (ewod): Reducing voltage requirements for microfluidics. *Polymeric Materials: Science and Engineering*, 85:12–13, August 2001.
- [70] Sk Cho, SK Fan, H Moon, et CJ Kim. Toward digital microfluidic circuits: Creating, transporting, cutting and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation. *IEEE Micro Electro Mechanical Systems Workshop, Las Vegas, NV*, pages 32–52, January 2002.
- [71] SK Cho, H Moon, J Fowler, , et CJ Kim. Splitting a liquid droplet for electrowetting-based microfluidics. *Proceedings of ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, IMECE2001/MEMS-23830*, November 2001.
- [72] AW Adamson. *Physical Chemistry of surfaces*. J Wiley, New York, 5th édition, 1990.
- [73] J Lee et CJ Kim. Surface tension-driven microactuation based on continuous electrowetting (cew). *MEMS* 9, 2:171–180, 2000.
- [74] M Vallet, B Berge, et L Vovelle. Electrowetting of water and aqueous solutions on poly(ethylene terphthalate) insulating films. *Polymer*, 37(12):2465–2470, 1996.
- [75] V Peykov, A Quinn, et J Ralston. Electrowetting: a model for contact-angle saturation. *Colloid. Polym. Sciences*, 278:798–793, 2000.
- [76] M Vallet, M Vallade, et B Berge. Limiting phenomena for the spreading of water on polymer films by electrowetting. *European Physics*, B11:583–591, 1999.
- [77] TD Blake, A Clarke, et EH Stattersfield. An investigation of electrostatic assist in dynamic wetting. *Langmuir*, 16:2928–2935, 2000.

- [78] MG Pollack, RB Fair, et AD Shenderov. Electrowetting based actuation of liquid droplets for microfluidic actuation. *Applied Physic Letter*, 77:1725–1726, 2000.
- [79] E Seyrat et RA Hayes. Amorphous fluoropolymers as insulators for reversible low-voltage electrowetting. *Journal of Applied Physics*, 90(3):1383–1386, 2001.
- [80] R Pethig. Dielectrophoresis: using inhomogeneous ac electrical fields to separate and manipulate cells. *Critical Reviews in Biotechnology*, 16:331–348, 1996.
- [81] HA Pohl. *Dielectrophoresis*. Cambridge University Press, Cambridge, 1978.
- [82] H Pellat. Mesure de la force agissant sur les diélectriques liquides non électrisés placés dans un champ électrique. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 119:691–694, 1895.
- [83] Thomas B. Jones. On the relationship of dielectrophoresis and electrowetting. *American Chemical Society*, 18:4437–4443, March 2002.
- [84] N Honda, K Emi, T Katagiri, T Irita, S Shoji, H Sato, T Homma, T Osaka, M Saito, J Mizuno, et Y Wada. 3d comb electrodes for amperometric immuno sensors. *Transducers'03, Boston*, 3C3.2, 8-12 June 2003.
- [85] S Le Gac, S Arscott, et C Rolando. Nouvelles sources 2d de nano-test. *20ème Journées Françaises de Spectrométrie de Masse*, Spectrométrie e Masse et Analyse Protéomique:60, Septembre 2003.
- [86] S Arscott, S Le Gac, C Druon, P Tabourier, et C Rolando. A planar on-chip micro-nib interface for nono esi-ms microfluidic applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14:310–316, 2004.
- [87] S Le Gac, S Arscott, et C Rolando. A planar microfabricated nanoelectrospray emitter tip based on a capillary slot. *Electrophoresis*, 24:3640–3647, 2003.
- [88] R Ohigashi, K Tsuchiya, Y Mita, et H Fujita. Micro capillaries array head for direct drawing of fine patterns. *14th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, pages 389–392, 2001.
- [89] A Meister, S Jeney, M Liley, T Akiyama, U Stauffer, et NF de Rooij. Nanoscale dispensing of liquids through cantilevered probes. *Microelectronic Engineering*, 67-68:644–650, 2003.
- [90] P Belaubre, M Guirardel, V Leberre, JB Pourciel, et C Bergaud. Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples. *Sensors and Actuators: Physics A*, page A paraître, 2003.
- [91] P Belaubre, M Guirardel, V Leberre, A Dagkessamanskaia, E Trevisiol, JM Francois, JB Pourciel, G Garcia, et C Bergaud. Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples. *SITEF 2002, Toulouse*, Technologies et Sciences du Vivant, Octobre 2002.
- [92] Pascal Belaubre. Système de dépôt de liquides biologiques pour la fabrication de puces ADN. *Journée INTRAGENOPOLE, Toulouse*, 24 Juin 2002.
- [93] Pascal Belaubre. Fabrication de puces à ADN: Dépôt de liquides biologiques. *3ème congrès des doctorants de l'Ecole Doctorale Systèmes, Blagnac*, 22-23 Mai 2002.
- [94] Pascal Belaubre. Système de dépôt de liquides biologiques pour la fabrication de puces à ADN. *Lettre d'informations Biotechs*, (12), 8 Septembre 2002.
- [95] P Belaubre, M Guirardel, V Leberre, A Dagkessamanskaia, E Trevisiol, JM Francois, JB Pourciel, G Garcia, et C Bergaud. Silicon-based microcantilevers for multiple biological sample deposition. *Transducers'03, Boston*, pages 1816–1819, June 2003.
- [96] P Belaubre, M Guirardel, V Leberre, A Dagkessamanskaia, E Trevisiol, JM Francois, JB Pourciel, G Garcia, et C Bergaud. Silicon-based micropins for multiple biological sample deposition. *Nanobiotechnologies II, Grenoble*, page PO2.7, April 2003.
- [97] P Belaubre, M Guirardel, V Leberre, JB Pourciel, et C Bergaud. Cantilever-based microsystem for contact and non-contact deposition of picoliter biological samples. *Euroensors XVI, Prague*, pages 541–544, September 2002.

- [98] C Bergaud, M Guirardel, P Belaubre, B Belier, et JB Pourciel. Système de dépôt de solutions biologiques avec ou sans contact pour la fabrication de biopuces. *Dépôt de brevet n° 0206016, en cours d'extension internationale*, 16 Mai 2002.
- [99] JG Hacia, W Makalowski, K Edgemon, M Erdos, C Robbins, SPA Fodor, LC Brody, et FC Collins. Evolutionary sequence comparison using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Genet.*, 18:155–158, 1998.
- [100] DG Wang, J Fan, C Siao, A Berno, P Young, R Sapolsky, et al. E. large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280:1077–1082, 1998.
- [101] RJ Sapolsky et RJ Lipshutz. Mapping genomic library clones using oligonucleotide arrays. *Genomics*, 33:445–456, 1996.
- [102] DD Shoemaker, DA Lashkari, D Morris, M Mittmann, et RW Davis. Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nature Genet.*, 14:450–456, 1996.
- [103] VG Cheung, JP Gregg, KJ Gogolin-Ewens, J Bandong, CA Stanley, L Baker, et al. Linkage-disequilibrium mapping without genotyping. *Nature Genet.*, 18(3):225–230, March 1998.
- [104] RJ Cho, MJ Campbell, EA Winzeler, et al. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell.*, 2:65–73, 1998.
- [105] PT Spellman, G Sherlock, MQ Zhang, et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell.*, 9:3273–97, 1998.
- [106] S Chu, J DeRisi, M Eisen, J Mulholland, D Botstein, PO Brown, et I Herskowitz. The transcriptional program of sporulation un budding yeast. *Science*, 282:699–705, 1998.
- [107] VR Iyer, MB Eisen, DT Ross, et al. The transcriptional program in response of human fibroblasts to serum. *Science*, 283:83–7, 1999.
- [108] AB Chetverin et FR Kramer. Oligonucleotide arrays: new concepts and possibilities. *Bio/Technology*, 12:1093–1099, 1994.
- [109] T Livache, B Fouque, A Roget, J Marchand, G Bidan, R Téoule, et G Mathis. Polypyrrole DNA chip on a silicon device : example of hepatitis c virus genotyping. *Anal. Biochem*, 255:188–194, 1998.
- [110] A Troesch, H Nguyen, CG Miyada, S Desvarenne, TR Gingeras, PM Kaplan, et al.. Mycobacterium species identification and tb rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *Clinical Microbiology*, 1999.
- [111] TR Gingeras, G Ghandour, E Wang, A Berno, PM Small, F Drobniowski, D Alland, E Desmond, M Holodniy, et J Drenkow. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic mycobacterium DNA arrays. *Genome Res.*, 8(5):435–448, Mai 1998.

ANNEXE A

Notion de biologie moléculaire et biopuces

A.1 Le message du gène

Au début du vingtième siècle, il était admis que les chromosomes des noyaux cellulaires étaient les porteurs de l'information héréditaire, mais l'on croyait que seules les protéines avaient une complexité suffisante pour stocker cette information. Il a fallu attendre 1944 pour que O. Avery fasse l'expérience déterminante qui démontrait que l'acide désoxyribonucléique (ADN), constituant spécifique du chromosome, était le support du matériel héréditaire. Onze ans plus tard, en 1953, Watson et Crick en élucidaient la structure. La notion de gène devenait enfin claire. Le gène devenait ce segment d'ADN qui contient une information génétique correspondant à la fabrication d'une chaîne polypeptidique unique, c'est-à-dire à un enchaînement d'acides aminés, selon le principe du code génétique. Cet enchaînement peut conduire à des protéines différentes.

A.1.1 Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des molécules du vivant, qui sont la base pour la synthèse de deux types de structure moléculaire :

- l'ADN : acide désoxyribo-nucléique,
- l'ARN : acide ribo-nucléique.

On les appelle également « polynucléotides », car ils résultent de la polymérisation de monomères appelés nucléotides.

A.1.1.1 Les monomères sont des nucléotides

Un nucléotide est un assemblage de trois molécules chimiques associées par liaisons covalentes.

Base azotée Une base azotée est une petite molécule plane composée de cycles où l'on retrouve à la fois des atomes de carbone et d'azote. Il en existe deux types, selon leur origine biochimique (Cf. figure A.1) :

- pyrimidines : cytosine (C), thymine (T), et Uracile (U), ces deux dernières étant très proches,
- purines : adénine (A) et guanine (G).

Sucre ou pentose Le sucre des nucléotides est une molécule à cinq atomes de carbone, donc une molécule en C5; on dit que c'est un pentose. Comme tous les sucres, le sucre des nucléotides porte une fonction « -OH » sur quelques-uns de ses carbones. Une réaction chimique particulière fait que le sucre du nucléotide forme un cycle à cinq côtés, occupé à chaque angle par un atome de C ou un O. Le premier des sucres des nucléotides a été identifié par des chercheurs du *Rockefeller Institute of Biochemistry*, ce qui forme les initiales RIB. Reste à lui adjoindre le suffixe "ose" pour rappeler que c'est un sucre, et on obtient ribose. Ce sucre est celui que l'on retrouve dans les nucléotides de l'ARN. Plus tard, on a découvert un autre sucre, très proche du ribose, mais différent, car il manquait un atome d'oxygène, remplacé par un hydrogène. On l'appela alors désoxy-ribose. Ce sucre entre dans la composition des nucléotides de l'ADN.

Groupe phosphate Ce sont des petits groupements créés autour d'un atome de phosphore P. Un nucléotide peut en posséder jusqu'à trois, mais il doit obligatoirement en posséder

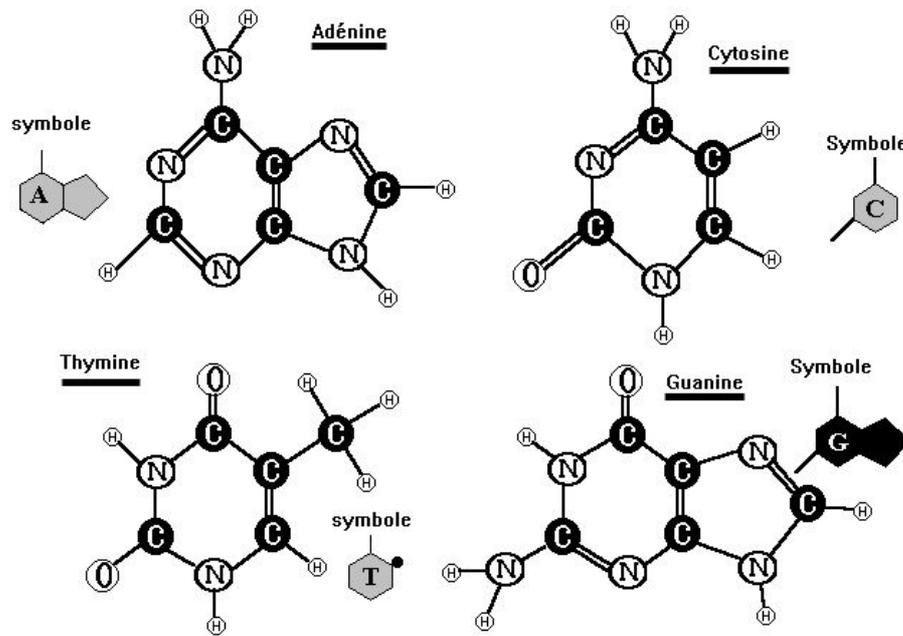


Fig. A.1 : Bases azotées : Adénine, Guanine, Cytosine, Thymine

un¹. Ces groupements sont responsables des propriétés acides de l'ADN et de l'ARN, par la charge « - » qu'ils portent. Si le nucléotide porte un seul groupement phosphate, on parle de mono-phosphate, s'il en a deux, di-phosphate, et trois tri-phosphate ou tri-P.

Obtention des acides nucléiques La polymérisation des nucléotides permet l'obtention de polymères, ou chaînes, c'est-à-dire des polynucléotides. Le processus de polymérisation s'effectue toujours de la même manière : deux nucléotides tri-P se rapprochent, un phosphate et une molécule d'eau sont éliminés et une liaison covalente se crée entre les deux nucléotides, c'est un lien phospho-diester. Un troisième tri-P approche et de la même manière une liaison covalente se forme entre le troisième tri-P et les deux premiers, et ainsi de suite. Le dernier tri-P aura simplement comme particularité d'avoir un groupement -OH libre.

Ainsi, on obtient un polynucléotide, sur lequel on peut distinguer :

- une alternance monotone de phosphates et de sucres ; on l'appelle le squelette pentose-phosphate,
- une succession de bases azotées dont l'ordre va se révéler important pour coder les informations nécessaires au fonctionnement de la cellule.

A.1.1.2 La réaction d'hybridation

La compréhension biologique des gènes est basée sur le principe élémentaire : tous les gènes sont une combinaison plus ou moins longue de quatre bases (ou molécules chimiques) A (adénine), T (thymine)(ou U (uracile)), C (cytosine), G (guanine). Ces quatre molécules s'associent les unes aux autres par des chaînes carboxyles et forment des séquences plus ou moins complexes (ACCGTCGAA...) dont le code constitue ainsi le message du gène. L'homme compte environ 30000 gènes et trois milliards de bases.

¹Si l'ensemble [sucre - base azotée] est dépourvu de groupement phosphate, on a alors affaire à un nucléoside, et non pas à un nucléotide.

Les bases azotées ont pour propriété de pouvoir s'associer deux à deux par des liaisons non-covalentes, de type hydrogène H, mais selon des règles bien précises :

- une purine ne peut s'apparier qu'à une pyrimidine,
- A s'associe toujours avec T, ou U, par deux liaisons H,
- C s'apparie toujours avec G, par trois liaisons H.

Les bases azotées peuvent se retrouver à la fois au niveau de l'ADN et de l'ARN : c'est le cas de A, C et G. Mais T est typique de l'ADN et U de l'ARN.

Ainsi, une chaîne est associée à son complémentaire pour former une longue spirale en double brin : l'acide désoxyribo nucléique, l'ADN. Nous sommes donc passés d'un simple brin d'acide nucléique à un double brin en hélice stable. Ceci est réalisé grâce à des liaisons hydrogènes A-T(ou U) et C-G, cette dernière étant la plus forte et donc la plus stable.

L'hybridation est le processus par lequel deux simples brins complémentaires vont former un brin double stable appelé hétéro-duplex. Cette hybridation peut se produire entre deux molécules complémentaires en solution ou bien entre une molécule en solution et sa molécule complémentaire immobilisée sur support solide. Ce principe, sur lequel est basé la technologie des biopuces, est un fondement de la biologie moléculaire, découvert par quatre équipes différentes en Grande-Bretagne, Russie et aux États-Unis.

Par exemple, pour la sonde AACCAA accrochée à une surface par un moyen quelconque, la séquence complémentaire TTGGTT viendra s'hybrider spécifiquement.

Ainsi, la composition en bases d'un duplex est donc un des principaux facteurs influençant sa stabilité. Cette dernière est caractérisée par une grandeur : la température de fusion (T_m), c'est-à-dire la température à laquelle 50% d'un acide nucléique double brin (duplex) est dissocié.

Un autre facteur entraînant une baisse importante de la stabilité des duplex est la survenue d'un mésappariement (mismatch). Cette situation se rencontre lorsqu'une base d'une des deux séquences associées n'est pas complémentaire de la base de l'autre séquence mais qu'il y a quand même formation d'un duplex. La température de fusion chutera alors de façon importante. L'accrochage entre les deux brins ne sera pas solide, tout comme une fermeture éclair, si un brin n'est pas accroché, la fermeture s'ouvre.

A.1.1.3 L'ADN

ADN signifie : Acide Désoxyribo-Nucléique. On retrouve les mêmes caractéristiques que pour l'ARN sauf que le sucre qui compose les nucléotides est le désoxyribose.

Sauf exception rarissime (quelques virus), l'ADN possède une structure composée de deux chaînes de poly-désoxyribonucléotides, complémentaires sur toute leur longueur : l'ADN est bicaténaire ou double-brin. La molécule d'ADN adopte un aspect en échelle qui se tord pour former une double hélice. Cette caractéristique est fondamentale pour le maintien de l'information génétique au cours des générations. Lorsque la cellule se divise, chacune des deux cellules filles doit contenir la totalité de l'information de la cellule dont elle est issue. Au moment de la division, les deux brins de la double hélice se séparent et chacun d'eux sert de matrice pour la synthèse du brin qui lui est complémentaire. L'information génétique est répliquée dans son intégralité. Deux doubles hélices complètes d'ADN sont formées.

L'ADN est le support de l'hérédité, donc des gènes. On le retrouve dans les chromosomes et associé de manière spécifique ou non-spécifique à de nombreuses protéines. L'analyse génomique à l'échelle de l'ADN ne permet pas de mesurer l'expression des gènes, c'est pourquoi on s'intéresse à l'ARN et aux protéines, copies des séquences codantes de l'ADN.

A.1.1.4 L'ARN messager

ARN signifie : Acide Ribo-Nucléique. On retrouve dans ces termes la notion d'acidité due aux groupements phosphate, la nature du sucre des nucléotides, le ribose, et le premier lieu de

mise en évidence, le noyau.

Fonctionnellement, on distingue trois catégories majeures d'ARN, l'ARNm ou ARN messager, l'ARNr ou ARN ribosomique, et l'ARNt ou ARN de transfert. Seuls les ARNm « codent » une protéine, dans le sens qu'ils permettent de déterminer la séquence primaire des protéines produites (Cf. paragraphe A.1.2).

L'information contenue dans l'ADN doit être transcrite pour avoir un effet sur la cellule. Pour cela, des régions spécifiques de l'ADN (régions codantes ou gènes) sont copiées sous forme d'un polynucléotide différent, l'ARN messager, qui véhicule l'information génétique jusqu'à la machinerie de synthèse protéique.

L'ARN se trouve sous forme d'une seule chaîne de nucléotides ; il est monocaténaire, ou simple brin. Ceci n'empêche pas l'ARN de pouvoir parfois se replier sur lui-même et d'effectuer des appariements entre bases azotées complémentaires, comme on le trouve notamment au sein de l'ARNt. Les molécules d'ARNm sont synthétisées selon un processus appelé transcription, semblable à la réplication. L'un des deux brins d'ADN sert de matrice pour la synthèse d'une chaîne d'ARN qui lui est rigoureusement complémentaire, mais seules des régions limitées de l'ADN sont copiées. L'ADN reprend sa structure originelle et l'ARN est libéré sous forme monocaténaire. La longueur d'un ARN est donnée en nombre de nucléotides, ou même en nombre de bases (azotées).

Rappelons que la base azotée U est typique de l'ARN, et que la base T n'y figure pas. Cette remarque prend toute son importance si l'on veut mettre en évidence une production d'ARN : on utilise alors de l'uridine radioactive, typique de l'ARN. L'utilisation de A, C, ou G radioactif n'est pas pertinente puisque l'on risque d'avoir incorporation de ces précurseurs à la fois dans l'ADN et l'ARN.

On peut noter que généralement, au cours des techniques *in vitro*, l'ARNm est rétrotranscrit en ADNc (ADN complémentaire). Au cours de cette rétrotranscription, la fluorescence est incorporée sur une base, permettant de marquer la molécule et de la mettre ainsi en évidence.

A.1.2 Les protéines

Les protéines sont les produits issus de la « traduction » des ARNm, donc ils traduisent l'expression des gènes. Elles constituent les agents d'exécution de la cellule.

A.1.2.1 Les monomères sont des acides aminés

De même que les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides, les protéines sont des polymères d'acides aminés. Un acide aminé est une molécule qui possède :

- une fonction acide -COOH,
- une fonction amine -NH₂.

En outre, un acide aminé possède un radical R qui lui est propre. Vingt radicaux existent dans les protéines fabriquées par le vivant donc il y a vingt acides aminés. Selon la nature du radical R, l'acide aminé possède telle ou telle propriété. En particulier, il peut être chargé positivement ou négativement.

A.1.2.2 Obtention des protéines

Les protéines résultent de la polymérisation des acides aminés. La polymérisation s'effectue dans un seul sens et le processus est le suivant : un deuxième acide aminé s'approche d'un premier et son groupement NH₂ réagit avec le groupement COOH du premier, créant ainsi une liaison covalente, appelée liaison peptidique, en éliminant de l'eau. On obtient alors un dipeptide. Un troisième acide aminé s'approche et réagit de la même manière sur le deuxième, et ainsi de suite. Ainsi le dernier acide aminé possède sa fonction COOH libre.

A.1.2.3 Structures

L'acquisition et le maintien d'une structure particulière sont primordiaux pour une protéine. C'est grâce à elle que la protéine pourra jouer son rôle.

Structure primaire La structure primaire d'un polypeptide est l'enchaînement de ses acides aminés. On l'appelle aussi séquence primaire. C'est un enchaînement de liaisons peptidiques (covalentes) et de -CH-, à partir desquels émergent régulièrement des radicaux R, chacun typique d'un acide aminé.

Structure secondaire La structure secondaire correspond à un repliement local d'un petit nombre d'acides aminés. Ils adoptent généralement la forme d'un feuillet ou d'une hélice. C'est le premier stade d'organisation où peuvent intervenir des liaisons non-covalentes, afin de contrôler la structure locale adoptée dans l'espace. Ces liaisons sont au centre des interactions entre de nombreuses macromolécules biologiques car elles peuvent se former ou se défaire aisément. Les protéines possèdent également des groupes hydrophobes qui s'associent entre eux dans des liaisons de types Van der Waals.

Structure tertiaire Cette forme correspond à l'organisation que l'on détermine par diffraction aux rayons X. Elle intègre l'ensemble de la structure tridimensionnelle, par exemple de l'hémoglobuline, protéine contenue dans les globules rouges dont les chaînes entourent les ions ferreux enfouis au centre de cette structure. Elle correspond à l'ensemble des repliements que prend le polypeptide dans l'espace. Il y a à ce niveau possibilité de structuration par apparition de liaisons covalentes (ponts di-sulfures) et par des liaisons non-covalentes.

Structure quaternaire Cette structure n'existe que si la protéine fonctionnelle est un assemblage de plusieurs polypeptides. Il peut y avoir des liaisons covalentes ou non qui permettent les interactions entre les polypeptides. Chaque chaîne polypeptidique prend le nom de monomère. S'il y a deux polypeptides ensemble, on a à faire à un dimère. Dans ces conditions, deux cas se retrouvent : soit les deux polypeptides sont identiques et c'est alors un homo-dimère, soit ils sont différents et nous avons alors un hétéro-dimère. On peut également avoir des trimères, tétramères, pentamères, etc. ...

Le problème de la dénaturation² des protéines est particulièrement important dans les mesures analytiques, que les protéines soient le réactif (enzymes, anticorps) ou l'objet de la mesure (hormones, récepteurs). Parmi les principaux produits dénaturants, on notera les solvants organiques, les acides, les bases. Enfin, l'urée, la guanidine et les détergents agissent souvent en provoquant des dissociations sans dénaturation, ce qui est utile dans les étapes d'isolement et de purification des protéines.

A.2 Applications des biopuces et enjeux

Les biopuces sont des outils analytiques permettant une étude systématique à haut débit et par effet de parallélisme. Elles constituent des outils permettant principalement la réalisation de trois catégories d'analyse : le séquençage par hybridation³, l'analyse de séquences / mutations et l'analyse de l'expression des gènes. Un domaine d'applications est la pharmacogénomique, champ de recherche à la frontière entre la pharmacologie et la génomique. Cependant la

²Dénaturer signifie détruire la structure tridimensionnelle sans détruire la structure primaire.

³Très peu utilisé car très complexe et coûteux à mettre en place.

première application des biopuces fut l'expression des gènes et son analyse. Ensuite vint l'utilisation d'analyses basées sur l'hybridation pour détecter les mutations [26], PracAp32-[99], pour l'analyse des polymorphismes [100], le *mapping* [101], les études d'évolution et d'autres applications [102], [103]. Les biopuces commencent également à servir pour étudier les interactions des protéines avec des acides nucléiques, des petites molécules, ou d'autres protéines.

A.2.1 L'analyse de l'expression des gènes

Le taux d'ARNm est une mesure de l'activité transcriptionnelle de la cellule dans une condition définie. Ce taux est l'image du fonctionnement de la cellule dans cette situation qui peut être sa phase de croissance, sa phase pathologique, etc. ... Des puces ont déjà servi à évaluer l'expression simultanée de milliers de gènes dans des systèmes biologiques bien connus, tels que celui du métabolisme respiratoire et de fermentation chez la levure [23], le cycle cellulaire de la levure [104], [105], la sporulation [106] et la stimulation de fibroblastes par le sérum [107]. Ces premiers travaux ont permis de valider la technologie. La réussite des études menées tient à la parfaite adéquation entre les puces constituées et le but de l'analyse. Ces puces analytiques ne sont pas des outils d'analyse universels, elles ne lisent que ce qu'elles peuvent lire : des séquences connues dont on sait qu'elles sont potentiellement présentes dans les échantillons testés. La comparaison des résultats obtenus par les puces à ADN avec ceux préalablement obtenus par d'autres approches⁴ a démontré une concordance pour les gènes dont l'expression était déjà connue dans ces systèmes biologiques. De plus, pour les milliers de nouveaux résultats obtenus, il existe une conformité « intuitive » avec des connaissances provenant d'autres processus cellulaires.

A.2.2 L'analyse de mutation

Elle repose sur la constitution de puces capables d'analyser chaque base d'une séquence déjà connue. Les sondes sont organisées en ensembles au sein desquels une séquence est strictement identique à celle de type sauvage alors que les autres sont caractérisées par une modification (substitution) localisée en milieu de séquence afin d'être dans les meilleures conditions d'hybridation. Le principe utilisé pour l'analyse de mutations est l'instabilité engendrée par les mésappariements internes entre cible et sonde.

De manière générale, pour une mutation donnée, l'analyse de substitutions (pour une position donnée) implique donc l'utilisation de quatre sondes, une pour la séquence sauvage et trois pour chacun des nucléotides pouvant se substituer au nucléotide original. Cela permet ainsi de repérer des séquences mutantes dans un échantillon test. L'analyse des intensités de fluorescence relatives à chaque sonde permet de déterminer si la séquence cible correspond au type sauvage ou comporte une mutation. Dans le premier cas, un spot « attendu » est allumé là où la sonde sauvage est située. Dans le second, un spot apparaît localisé à l'un des sites correspondants aux séquences mutées. De plus, ce phénomène s'accompagne d'une diminution de l'intensité d'hybridation au niveau des sondes permettant l'analyse des bases qui flanquent la mutation. L'analyse des différentes intensités d'hybridation est réalisée par un logiciel spécifiquement développé dans ce but.

Comme le prouve le projet sur le génome humain et les efforts qui sont faits afin de déterminer les séquences de gènes humains, il est important de trouver des mécanismes efficaces et fiables afin d'accéder aux variations génétiques individuelles.

La diversité génétique peut être évaluée par de nombreux marqueurs, tels les microsatellites, ou les Short Tandem Repeats (STRs). De plus, certains trinucleotides ont été utilisés pour identifier des zones répétées instables à l'origine de maladies génétiques humaines, notamment

⁴Exemple : Northern-blot/PCR quantitative, ...

la dystrophie myotonique. Wehnert *et al.* (Beckman instruments) ont développé une méthode permettant de détecter 60 trinuécléotides répétés grâce à un système dénommé « STR-Strip ». Ce système représente en fait une haute densité de sondes adressées sur une membrane de polypropylène. Les oligomères (21 mers) représentent tous les trinuécléotides possibles.

La première biopuce est commercialisée depuis plus d'un an par la société Affymetrix. Baptisée Gen-Chip HIV, elle a été spécialement conçue pour analyser les mutations des gènes codant pour deux enzymes du virus du SIDA, une reverse transcriptase (RT) et une protéase. Cette puce permet d'explorer le génome hautement polymorphe du virus HIV afin de détecter les mutations qui lui confèrent sa résistance aux médicaments anti-viraux (l'AZT devient inefficace après 3 à 12 mois de traitement). A l'heure des trithérapies, les médicaments favorisent en effet l'émergence de mutants résistants. La Gen-Chip HIV, actuellement testée dans une vingtaine de centres médicaux, aiderait à prévenir la biorésistance au traitement développé par le malade.

Autre terrain de prédilection des biopuces : la cancérologie. Au laboratoire d'électronique, de technologie et d'instrumentation (Leti, Grenoble) du Commissariat à l'Energie Atomique, les chercheurs s'affairent à la mise au point d'une puce à ADN qui rendra possible la détection des mutations génétiques liées à certains cancers du colon et du sein.

Un intérêt immense s'est développé afin d'appliquer cette technique au criblage des cancers, spécialement chez les individus susceptibles de porter une mutation les classant comme « personne à risque ».

L'équipe de Hacia *et al.* a créé une puce permettant de détecter les mutations de l'exon 11 du gène BRCA 1, responsable du cancer héréditaire du sein et de l'ovaire. La puce comporte 96 600 oligomères de 20 mers permettant de cribler un fragment de 3,45 kb pour identifier d'éventuelles substitutions ou insertions/délétions. L'essai réalisé mesure l'hybridation relative sur la puce des cibles d'ARN mutés et de type sauvage, marqués respectivement avec des fluorochromes rouges et verts. L'égale hybridation des deux transcrits produit un signal mixte. L'ARN d'un hétérozygote portant une substitution dans BRCA 1 s'hybridera avec deux oligonucléotides, révélant ainsi la présence d'un transcrit mutant. Si une mutation induisant un changement de cadre de lecture existe, alors une perte de signal sera visualisée en comparant l'intensité de la référence et des cibles.

Ainsi, cette étude montre que les individus hétérozygotes porteurs de la mutation peuvent être détectés malgré la présence du gène sain. Ce système peut être potentiellement adapté pour l'étude d'autres gènes d'intérêt comme par exemple pour p53, protéine intervenant également dans la cause de certains cancers.

A.2.3 Le séquençage par hybridation

L'utilisation des puces pour le séquençage des génomes est sans doute l'une des applications les plus innovantes en matière d'étude du génome. Le séquençage par hybridation⁵ a été proposé à la fin des années 80, simultanément par deux équipes anglaises, une équipe yougoslave et une équipe russe. Alors que la méthode enzymatique, i.e. lecture base par base, peut être considérée comme une épellation de la séquence, le SPH procède par lecture de petits blocs. Dans cette dernière approche, une séquence linéaire est en fait considérée comme un ensemble de sous-séquences chevauchantes [108] dont la détermination simultanée et le rassemblement, au moyen d'un programme informatique spécifique, permet la « reconstruction » de la séquence étudiée (voir figure A.2).

Des sondes de 8 mers sont utilisées, car on considère en pratique qu'un octamère est unique dans un génome. Pour un séquençage intégral, il faudra donc utiliser les 65 536 octamères existants. Ces sondes peuvent être synthétisées *in situ*, ou bien présynthétisées puis fixées sur

⁵SHOM pour Sequencing by Hybridization using an Oligonucleotide Matrix ou SbH pour Sequencing by Hybridization. On trouve également SPH pour Séquençage Par Hybridation en Français.

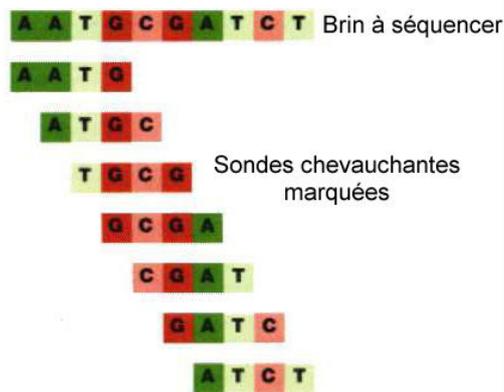


Fig. A.2 : Séquençage par hybridation. Le chevauchement des sondes le long de la séquence permet un séquençage par bloc.

un support (voir chapitre 1, paragraphe 1.3). La synthèse directe reste intéressante du fait du nombre de réactions réduites ($4 \times 8 = 32$ réactions). Toutefois, cette technique est limitante sur le plan économique, car si de telles synthèses sont aujourd'hui courantes, leurs coûts s'avèrent souvent élevés. De plus reste le problème majeur lié à la synthèse *in situ* à savoir l'impossibilité de contrôler la séquence des oligomères synthétisés contrairement à une synthèse classique.

Applications Le SPH doit être un outil de séquençage rapide, peu coûteux, fiable et entièrement automatisable. Pour ce faire, les optimisations portant sur l'amélioration de la préparation de la matrice, des procédures et des conditions d'hybridations, des systèmes de détection, des méthodes annexes de discrimination des mésappariements ainsi que le développement d'instruments et de logiciels appropriés ont été menés séparément et de manière approfondie.

De plus, la simplicité de la technique permet une automatisation par des systèmes existants et les puissances fournies par les ordinateurs courants sont suffisantes pour permettre un essor de cette technique dans plusieurs champs d'applications. Dans l'état actuel de développement, le SPH reste réservé aux applications de comparaison de séquences ne différant que par quelques bases (analyse de mutations, Cf. A.2.2).

A.2.4 La pharmacogénomique

La pharmacogénomique consiste à identifier les gènes impliqués dans l'efficacité (ou l'inefficacité) d'un produit, ou ses effets indésirables. Elle conduit à une meilleure compréhension des mécanismes d'action des médicaments. En montrant qu'une molécule a sur une cible une action variable, la biopuce ouvre le champ des potentiels thérapeutiques. Elle permet aussi d'identifier les effets secondaires d'un produit et, lors des essais cliniques, de faire des mesures de toxicité.

La dépense globale du diagnostic médical, est chiffrée à 25 milliards de dollars par an ; 10 à 20 % de l'ensemble des analyses seront vraisemblablement réalisés sur des biopuces en 2005. Le diagnostic moléculaire couvre deux champs distincts : les biopuces permettent de détecter les maladies infectieuses et les maladies génétiques. Les pathologies visées par les diagnostics sur biopuces sont celles qui nécessitent une grande rapidité d'intervention et pour lesquelles les méthodes traditionnelles de diagnostic sont limitées. En effet, le diagnostic moléculaire permet

des tests plus rapides, sensibles et spécifiques. En évitant certaines étapes préliminaires telle que la culture, il permet d'obtenir un résultat en quelques heures là où plusieurs jours étaient nécessaires.

Champs d'application :

- l'hépatite C : la société CIS Bio International a mis au point une biopuce capable de détecter la présence du virus de l'hépatite C et d'en préciser le type I, II ou III [109]. Les oligonucléotides spécifiques de certains gènes du virus sont fixés par adressage électrochimique sur la lame de silicium, l'hybridation est ensuite réalisée avec des ARN provenant d'échantillons de sang ;
- la tuberculose : le genre *Mycobacterium* regroupe environ 80 espèces et sous-espèces de bactéries. Parmi les espèces pathogènes, une dizaine est responsable de 90 % des mycobactérioses rencontrées chez l'homme. La tuberculose est la principale de ces pathologies. Elle est due aux espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum*). Les autres pathologies résultent d'infections opportunistes, particulièrement chez le sujet immunodéprimé, impliquant au total plus d'une dizaine de mycobactéries dites atypiques. Il s'agit de *M. xenopi* et *M. kansasii* responsables d'atteintes pulmonaires, ganglionnaires, ostéoarticulaires, cutanées et sous-cutanées, et d'espèces du complexe *Mycobacterium avium-intracellulare*, responsables d'infections généralisées chez les patients atteints du sida. La société Bio-Mérieux s'est associée à Affymetrix [110] [111] et leur programme de recherche commun sur les puces à ADN a permis de mettre au point une puce capable de répondre simultanément à deux questions du diagnostic biologique des infections à mycobactéries : l'identification de l'espèce, et son profil de résistance à la rifampicine (l'antibiotique de référence de la trithérapie recommandée en première intention pour le traitement de la tuberculose). Dans le contexte de l'émergence de souches multirésistantes, les réponses à ces questions sont devenues cruciales pour la mise en œuvre immédiate d'un traitement adapté. L'identification des espèces de mycobactéries repose sur le génotypage d'une région du génome bactérien présentant un fort polymorphisme, la région de l'ARN ribosomal 16S. Cette région, utilisée dans plusieurs tests de diagnostic moléculaire déjà commercialisés, est considérée comme « l'étalon or » de la spécificité d'espèces pour les mycobactéries. Une approche similaire permet de définir le profil de résistance à la rifampicine des espèces du complexe *M. tuberculosis*. On sait en effet, que dans 90 % des cas, cette résistance est conférée par des mutations très localisées, situées dans la région du gène codant pour une ARN-polymérase bactérienne, le gène *rpoB*. Les oligonucléotides spécifiques de l'une ou l'autre de ces régions présentées à la surface de la puce GeneChip® permettent d'identifier précisément l'espèce présente dans un prélèvement pulmonaire et renseigne, en cas de *Mycobacterium tuberculosis*, sur la présence d'éventuelles mutations du gène *rpoB*, conférant une résistance à la rifampicine. Le résultat est obtenu en 5 heures, contre deux à trois semaines par les méthodes traditionnelles. Une fiabilité de 100 % pour chacune des réponses recherchées a été obtenue par cette approche méthodologique. Soixante-dix souches représentant 27 espèces de mycobactéries d'intérêt clinique, ont été testées. Les séquences de toutes ces espèces ont été correctement identifiées. Par ailleurs, parmi les souches de *M. tuberculosis* testées, les 15 souches résistantes à la rifampicine ont été reconnues comme telles ;
- les bactéries : la résistance des bactéries aux antibiotiques est aujourd'hui une des principales causes de gravité des maladies infectieuses, telles que, par exemple, les septicémies à *staphylococcus*, entérobactéries ou *pseudomonas*, ... L'augmentation des infections à bactéries multi-résistantes, en particulier aux staphylocoques responsables d'infections endémiques en milieu hospitalier est une préoccupation majeure. Dans ce domaine des

infections nosocomiales, la société Bio-Mérieux et d'autres laboratoires étudient des biopuces regroupant des sondes spécifiques des ARN bactériens. Anthony et ses collaborateurs (2000) ont mis au point une puce sur laquelle est fixée la région de l'ADN ribosomique 23S variable entre espèces. Ces puces ont pour but l'identification des souches bactériennes en vue d'un diagnostic biologique précis et rapide (<4h) permettant une prescription précoce et ciblée pour un traitement parfaitement adapté ;

- les maladies sexuellement transmissibles telles que les infections à *Chlamydiae* et *N. Gonorrhoeae* ;
- les puces VIH diffèrent selon les sociétés qui les ont mises au point. La puce mise au point par Affymetrix, commercialisée début 1996 permet de rechercher, parmi une portion restreinte du millier de paires de bases du génome du VIH-1, les mutations conférant au virus une résistance vis-à-vis des inhibiteurs de la transcriptase inverse et des antiprotéases. Elle donne un résultat en cinq heures seulement.

Les travaux de MJ Kozal et al (1996) du département de biologie moléculaire de la société Affymetrix, Santa Clara, California, USA, portant sur le polymorphisme du gène de la protéase du HIV-1 est une illustration de la technique de recherche de mutation. La protéase du HIV-1 est une protéine homodimérique composée de deux monomères de 99 acides aminés essentiels à la maturation des précurseurs de polypeptides viraux. Protéine essentielle du cycle viral, elle constitue la cible de plusieurs médicaments (les inhibiteurs de protéases). Des analyses du polymorphisme ont permis de montrer que sous la pression de sélection déterminée par l'utilisation des antiprotéases, environ 20 des 90 acides aminés pouvaient subir une mutation qui, dans certains cas, pouvait réduire la sensibilité virale aux traitements. L'équipe de Kozal a utilisé une puce à ADN afin de réaliser des analyses génotypiques de la séquence du gène de la protéase sur 167 échantillons viraux provenant de patients n'ayant jamais été traités aux antiprotéases. Le système utilisé est constitué d'une puce de verre de $1,28 \text{ cm}^2$ portant 12224 oligonucléotides différents organisés en tétrades. Les résultats montrent que 47.5 % des acides aminés de la protéase sont variables. Ces changements, qui concourent à l'acquisition d'une résistance, résultent d'un polymorphisme naturel et contribuent à la résistance aux antiviraux observée chez les patients non traités aux antiprotéases.

Une biopuce, objet de recherche chez Bio-Mérieux, rendra possible un test quantitatif de mesure de la charge virale, particulièrement utile aujourd'hui avec le développement des trithérapies.

ANNEXE B

Partenaires du projet Européen et du réseau
d'Excellence

B.1 Partenaires engagés dans le réseau d'Excellence Nano-To-Life

Regional clusters

Regional cluster	Location	Staff	Labs	Sub-partners (contact point)
NanoBio	Grenoble, France	130	18	CEA-Grenoble (Léti + DRDC + DRFMC), CNRS, INSERM, Université Joseph Fourier, Institut de Biologie Structurale, Institut Albert Bonniot, SMEs (Chatelain, J. Chabbal, M. Robert-Nicoud, J. Garin, L. Lafanechère, S. Ricard-Blum, P. Marche, P. Boisseau, M. van der Rest)
NATT Bio	Toulouse, France	40	11	CNRS, Institut des Protéines et Biologie Structurale, INRA, University (C. Vieux, M. Winterhalter, JM François, E. Trevisiol)
BioAnalytik Münster	Münster, Germany	300	12	Westfälische Wilhelms Universität, ICB, CenTech, BioAnalytik-Muenster, SMEs (KM Wehring, P. Fuchs, K. Camman, H. Arlinghaus, A. Benninghoven)
NanoBioNet	Sarrebrücken, Germany	200	65	3 associated clusters, 38 industry partners, 3 IPR partners, 7 finance partners, 9 technology transfer partners, 5 business centres as partners, 3 training & education partners (P. Zalud)
Institute for Nanotechnology	Newcastle, UK	30	25	University of Newcastle (C. Mac Neil, K. Snowdon)

Other Scientific Partners

Name (contact point)	Location	Staff	Name (contact point)	Location	Staff
Institute of Macromolecular Chemistry (E. Brynda)	Prag, Czech Republic	15	BSRC Alexander Fleming (G. Panayotou)	Vari, Greece	6
Risoe National Laboratory (I. Jakobsen)	Risoe, Denmark	10	IMBB FORTH (D. Kafetzopoulos)	Heraklion, Greece	4
European Synchrotron Research Facility (C. Riekel)	Grenoble, France	6	Institute of Physical Chemistry (I. Mavridis)	Aghia Paraskevi, Greece	8
CHRS (D. Choquet)	Bordeaux, France	5	Ionina University (M. Sakarellos)	Ionina, Greece	5
Institut Européen de Chimie et Biologie (A. Brisson)	Bordeaux, France	6	NMRC (P. Galvin, H. Berney)	Cork, Ireland	30
CEA (X. Gidrol)	Evry, France	26	Tel Aviv University (Y. Shacham)	Tel Aviv, Israel	20
Institut Fresnel (H. Rigneault)	Marseille, France	7	Genova University (R. Raiteri)	Genova, Italy	6
Université Claude Bernard (L. Blum)	Lyon, France	5	Lund University (E. Csöregi)	Lund, Sweden	8
IBCP (T. Coleman*)	Lyon, France	5	EPFL (P. Renaud, H. Vogel, J. Brugger)	Lausanne, Switzerland	100
Ecole Normale Supérieure (B. Le Plouffe, D. Bensimon, C. Place, F. Heslot, J. Zyss)	Cachan/Paris/Lyon, France	18	Hôpital Orthopédique (P. Batard)	Lausanne, Switzerland	1
Reims University (L. Nabiev)	Reims, France	12	Oxford University (JF Ryan, G. Ratcliffe, D. Vaux, D. Fricker)	Oxford, UK	9 + 30 (network)
Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry (P. Schwille)	Göttingen, Germany	3	Greenwich University (I Bruce)	London, UK	30
Institut für Physiologische Chemie (WEG Müller)	Mainz, Germany	2	Cranfield Biotechnology Centre (D. Cullen)	Silsoe, UK	
Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering (U. Meyer)	St Ingbert, Germany	100	Horticulture Research International (R. Napier)	Warwick, UK	
Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology (M. Stitt)	Golm, Germany	5			

Industry

ApiBio (M. Cuzin)	Grenoble, France	CSEM (M. Liley)	Neuchâtel, Switzerland	Evotec Technologies (R. Guenther)	Hamburg, Germany
ProteinExpert (T. Rousselle)	Grenoble, France	Ayuda Biosystem (M. Reuschel)	Lausanne, Switzerland	Molecular Profiles (C. Madden)	Nottingham, UK
IdealtPharma (S. Petit)	Lyon, France	Diagnoswiss (J. Rossier)	Lausanne, Switzerland	Oqham (D. Cullen)	Münster, Germany
Motorola (JN Patillon)	Gif, France	GenEx (P. Meyer)	Lausanne, Switzerland	Ion-Toff (A. Benninghoven)	Münster, Germany
GenOptics	Gif, France	IMT (U. Staufner)	Neuchâtel, Switzerland	Xantec (E. Geldig)	Münster, Germany
Ortothis (A. Honegger)	Lausanne, Switzerland	CMP Cientifica (A. Correia)	Madrid, Spain		

Non Profit Organisations

VDI	Düsseldorf, Germany	9	D. Wechsler
Institute of Nanotechnology	Stirling, UK	17	O. Saxl
INASMET	San Sebastian, Spain	20	JL Viviente
CMP Cientifica	Madrid, Spain		A. Correia

Fig. B.1 : Partenaires du projet Nano-To-Life

B.2 Partenaires engagés dans le projet Européen NaPa

- Technical Research Centre of Finland (VTT)** R FIN 3000 step&stamp imprinting
- Bergische Universität Wuppertal (BUW)** HE D 1600 multilayer NIL
- Centre Suisse d'Électronique et de Microtechnique (CSEM)** R CH 280 nanodispersing, scanning probes
- Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL)** HE CH 5500 nanostencil
- International Business Machines Corporation**, Research, Zurich Research Laboratory (IBM ZRL) I CH 200 soft lithography&selfassembly
- Centre National de la Recherche Scientifique, Délégation Regionale Ile de France, Ouest et Nord (LAAS CNRS)** R F 470 soft lithography, bioapplications, training
- micro resist technology GmbH (MRT)** I (SME) D 31 materials
- University College Cork - National University of Ireland, Cork (NMRC-UCC)** R IE 240 simulation
- SUSS MicroTec AG (SUSS)** I D 750 Tools for NIL and soft lithography
- AMO GmbH (Gesellschaft für angewandte Mikro- und Optoelektronik mbH) (AMO)** I (SME) D soft lithography, UV
- CEMES-CRNS (CEMES)** R F 102 static and dynamic stencil
- Fundación Cidetec (Cidetec)** I (SME) ES 39 materials for NIL
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM-CSIC)** HE ES 2500 scanning probes combined with CMOS
- EV Group, E. Thallner GmbH (EV Group)** I AUT 320 tools for soft lithography
- C.R.F. Societa' Consortile per Azioni (CRF)** I I 1200 3D nanopatterning
- Institute of Microelectronics technology**, Russian Academy of Sciences (IMT) HE RU 295 modeling and investigation of surfaces
- Fundacion Inasmet (Inasmet)** I (SME) I 210 functionalisation of surfaces
- Instituto per i Processi Chimico Fisici sezione di Bari Consiglio Nazionale delle Ricerche - Italy (IPCF CNR Italy)** HE I 7 nanoparticles
- Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA-LETI)** R F 200 mm dia stamps for NIL
- Linköpings Universitet (LiU)** HE S biocompatible materials
- Centre national de la recherche scientifique, Délégation Regionale Ile de France, Ouest et Nord (LPN CNRS)** R F 80 nanostructures for bioapplications
- Laboratoire des Technologies de la Microelectronique (LTM CRNS)** R F 34 large area NIL, evaluation
- Lund University (LU)** HE S 6000 alignment
- University of Twente, MESA+ Research Institute (MESA+)** HE NL 350 new inks for soft lithography
- Technical University of Denmark (MIC/DTU)** HE DK 110 photonic devices
- Nanocomms I** (SME) IE 7 volume embossing of nanostructures for
- nanoplus Nanosystems and Technologies GmbH (nanoplus GmbH)** I (SME) D 17 DFB laser demonstrator
- NPL Management Ltd (NPLML)** R UK 720 simulation, nanorheology
- Obducat (Obd)** I (SME) S 38 tools, alignment
- Paul Scherrer Institut (PSI)** R CH 1200 nanoengineering of materials

Instituto Nazionale Fisica della Materia (INFN) R I 300 master stamp fabrication
Fundación Tekniker (Tekniker) I (SME) ES 200 nanoreplication of biocompatible polymers
University of Glasgow (Uni.Glasgow) HE UK 5000 bioapplications
Warsaw University of Technology (WUT) HE POL 40 nanorheology and nanotribology
Rijksuniversiteit Twente (UTWENTE) HE NL 2700 pulsed laser deposition, stencil

Conception et réalisation d'un micro-système robotisé de dépôt de produits biologiques par micro-leviers en silicium pour l'élaboration de biopuces

RÉSUMÉ :

Les biopuces permettent d'analyser en quelques heures des milliers de séquences (ADN ou protéines) et d'identifier quels gènes répondent à l'action d'une molécule ou sont impliqués dans une maladie. Le travail présenté porte sur la conception et la réalisation d'un système miniaturisé et robotisé de dépôt de produits biologiques par micro-leviers en silicium pour la réalisation de biopuces. Après un descriptif détaillé des différentes techniques pour fabriquer des biopuces, nous expliquons notre démarche et nos objectifs. La combinaison d'une plate-forme de positionnement ayant une précision de 50nm et de micro-leviers en silicium est retenue. La méthode de fabrication est basée sur l'utilisation de ces micro-leviers en silicium et la mise en place d'une technique de dépôt par contact direct entre ces outils et le support de la biopuce. Le dépôt s'effectue par capillarité. L'originalité de notre travail repose sur les dimensions géométriques (dépôts de quelques microns en diamètre), sur l'utilisation de volumes très faibles (quelques picolitres) donc la réalisation de nombreux spots avec un seul chargement de levier. Un autre avantage réside dans le fait qu'il est possible de produire ces leviers en masse, à faible coût en utilisant une technique de réalisation très simple. L'étude se poursuit sur la validation de cette approche suivant différents aspects : un aspect biologique démontrant la possibilité de réaliser des puces à ADN et à protéines et de déposer différents produits avec un seul et même levier ; un aspect mécanique démontrant la compatibilité de notre approche avec les micro- et nano-technologies (utilisation des micro-leviers, positionnement et taille). Puis, le problème du chargement des microleviers est traité : une technique d'électromouillage est tout d'abord utilisée mais son efficacité reste limitée. Elle évolue vers la diélectrophorèse, technique connue pour permettre de transporter des liquides en modifiant l'équilibre des charges, où l'application du champ électrique se fait par des électrodes en aluminium passivées placées le long des leviers. Enfin, l'intégration de piézorésistances sur les leviers permet de détecter le contact avec le support. Ainsi, après le contrôle actif du chargement, on peut réaliser un contrôle actif du dépôt, en garantissant une uniformité dans la force d'appui et le temps de contact.

Design and fabrication of a robotized silicon-cantilever-based microsystem for biological sample deposition to elaborate biochips

ABSTRACT:

Biochips allow to analyze thousands of samples (DNA, proteins) in hours and therefore to know which gene responds to the action of a certain molecule or takes part of a certain disease. Our work is focused on the design and fabrication of a miniaturized and robotized silicon-cantilever-based microsystem for biological sample deposition to elaborate biochips. After an overview of the different methods to fabricate biochips, we describe our goals. The association of a 50 nm precision positioning system and silicon micro-cantilevers was retained. The method is based on direct contact between those cantilevers and the biochip support. The deposition is made through capillary forces. The originality of our work relies on geometric dimensions (spots of a few microns in diameter), the use of minimal amount of biological samples (picoliters), enabling a lot of depositions with a single loading process. Another advantage relies on the mass production process of our cantilevers which makes our system particularly cost effective. Our study focuses on the checking of our approach on different aspects: a biological one showing our capability to realize DNA and proteins chips and deposit various liquids with a single cantilever; a mechanical one demonstrating our system's compatibility with micro- and nano-technologies (use of cantilevers, positioning and size). Then, the loading process of the cantilevers is highlighted: an electrowetting method is firstly used. Then dielectrophoresis which is well known to manipulate liquids is developed through the use of an electric field applied between aluminum passivated electrodes implemented along the cantilevers. Finally piezoresistors located along the cantilevers allow the detection of the contact with the support. Therefore we have an active control of both the loading process and the deposition process in order to warranty uniformity of contact force and contact time.

