



HAL
open science

Détection de molécules d'ADN sur transistors à effet de champ

François Pouthas

► **To cite this version:**

François Pouthas. Détection de molécules d'ADN sur transistors à effet de champ. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2004. Français. NNT: . tel-00110318

HAL Id: tel-00110318

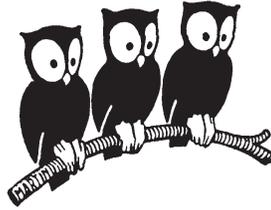
<https://theses.hal.science/tel-00110318>

Submitted on 27 Oct 2006

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.

DÉPARTEMENT DE PHYSIQUE
DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

(Spécialité Physique des Liquides)

présentée par :

FRANÇOIS POUTHAS

pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

sujet de la thèse :

**Détection de molécules d'ADN
sur transistors à effet de champ**

soutenue le 4 mai de l'an 2004 devant la commission d'examen :

M.	U. Bockelmann	Directeur de thèse
M.	D. Chatenay	Rapporteur
M.	J.-F. Joanny	Examineur
Mme	M.-C. Potier	Examineur
M.	J.-L. Viovy	Rapporteur

Table des matières

1	Introduction	1
2	PUCES à ADN et techniques alternatives pour la détection de l'hybridation	3
2.1	L'analyse du génome	3
2.1.1	Les acides nucléiques	3
2.1.2	Appariement entre bases : hybridation	3
2.1.3	Gènes, transcription et traduction de l'information génétique	6
2.1.4	Séquençage et Projet Génome	6
2.2	Puces à ADN	7
2.2.1	Principe des puces à ADN	7
2.2.2	Technologies mises en jeu	7
2.2.3	Fabrication des puces à ADN	9
2.2.4	Détection standard de l'hybridation sur puces à ADN : la fluorescence	12
2.3	Techniques alternatives pour la détection de l'hybridation et application aux puces à ADN	13
2.3.1	Techniques "optiques" et "opto-électroniques"	13
2.3.2	Techniques "mécaniques" et "électro-mécaniques"	14
2.3.3	Techniques "électrochimiques"	15
2.4	Détection de biomolécules sur des structures semiconductrices et application à la détection de l'hybridation	15
3	Détection de biomolécules sur des réseaux de transistors à effet de champ	19
3.1	Détection de charges à la surface de transistors à effet de champ	19
3.2	Structures des transistors à effet de champ	21
3.2.1	Réseau de 96 transistors	22
3.2.2	Réseau de 62 transistors	23
3.3	Principe de la mesure électronique	23
3.3.1	Dispositif électronique de mesure	23
3.3.2	Caractéristiques des transistors et corrections	25
3.3.3	Etude des variations du courant (ΔI_{SD}) ou de la tension (ΔU_{SE}) lors d'un apport de charge : deux méthodes d'analyse	26
3.4	Dépôt des solutions étudiées	27
3.4.1	Microdépôts	27
3.4.2	Macro-dépôts	29
4	Détection électronique de la polylysine	31
4.1	La polylysine, un polymère positivement chargé permettant la fixation de l'ADN	31
4.1.1	Structure de la molécule	31
4.1.2	Un fixateur pour les ADN sondes	32
4.2	Variation de courant (ΔI_{SD}) et de tension (ΔU_{SE}) pour une expérience modèle	33
4.3	Reproductibilité des mesures	35

4.3.1	Ensemble statistique et moyennage des pics	35
4.3.2	Variabilité intra-dépôt	36
4.3.3	Variabilité inter-dépôts	37
4.3.4	Effet de sel	38
4.4	Variation de la concentration en polylysine	38
4.4.1	Expériences à une concentration de 1 mM en KCl	38
4.4.2	Expériences à une concentration de 0.01 mM en KCl	40
4.5	Variation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure	43
4.5.1	Exemple d'une double série en sel avec dépôts de polylysine	44
4.5.2	Modélisation et interprétation des variations en sel	45
4.6	Vers une couche stable de polylysine pour la fixation future des ADN sondes . . .	48
4.6.1	Etude de l'incubation partielle du réseau avec des macrodépôts de polylysine	48
4.6.2	Incubation globale du réseau	50
5	Détection d'ADN simple brin sur des réseaux de transistors préalablement recouverts de polylysine	53
5.1	Microdépôts d'oligonucléotides	53
5.2	Macrodepôts d'oligonucléotides	55
5.3	Reproductibilité des mesures électroniques	55
5.4	Variation de la concentration en ADN	56
5.4.1	Expériences en microdépôts	56
5.4.2	Expériences en macrodépôts	59
5.5	Variation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure	60
6	Détection électronique d'ADN double brin issus de PCR et application à la détection d'une mutation	65
6.1	Détection d'ADN double brin issu d'une synthèse par PCR	66
6.1.1	Une optimisation nécessaire	66
6.1.2	Test des tampons de purification	66
6.1.3	Test de purification des oligonucléotides	67
6.1.4	Influence du substrat	68
6.1.5	Détection d'un ADN de 1009 paires de base	68
6.1.6	Détection d'autres ADN issus de PCR	69
6.2	De la détection électronique de fragments PCR à la détection d'une mutation . .	70
6.2.1	Protocole biologique : allèle-spécifique PCR	71
6.2.2	Détection électronique : mise en évidence de la mutation	73
6.2.3	Applications potentielles	75
7	Le long cheminement vers une détection électronique de l'hybridation de l'ADN	77
7.1	Fixation covalente d'ADN "présilanisés" et hybridation	77
7.1.1	Protocole de fixation	78
7.1.2	Séquences des oligonucléotides sondes et cibles	79
7.1.3	Protocole d'hybridation	79
7.1.4	Hybridation spécifique et variation de concentration	80
7.1.5	Réhybridation et fixation covalente	82

7.1.6	Réhybridation spécifique	84
7.1.7	Fixation covalente de longues molécules d'ADN	84
7.1.8	Premières mesures électroniques	85
7.2	Couplages complémentaires : interaction biotine/ streptavidine	87
7.2.1	Détection directe	88
7.2.2	Détection en utilisant des nanoparticules d'or recouvertes d'une couche d'argent	88
7.3	Détection d'une hybridation en utilisant une fixation de polylysine	89
7.3.1	Influence du bloqueur	90
7.3.2	Détection électronique d'une hybridation entre oligonucléotides	91
8	Conclusion	97
A	Modélisation du système FET/Biomolécules/Electrolyte	99
A.1	Modélisation du système en l'absence de biopolymères pour un électrolyte 1:1	99
A.2	Adsorption de biopolymères chargés et variation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure	103
B	Compléments sur l'analyse des caractéristiques dc des transistors	109
B.1	Caractéristiques électroniques des transistors et influence des résistances en série	109
B.1.1	Caractéristiques dc des transistors	109
B.1.2	Influence des résistances en série	111
B.2	Détermination des résistances en série et correction pour le réseau de 96 transistors	112
B.2.1	Détermination des résistances par une approximation géométrique des connexions	112
B.2.2	Détermination des résistances par une analyse des caractéristiques des transistors	115
B.2.3	Correction des caractéristiques	119
B.3	Caractéristiques pour le réseau de 62 transistors	121
B.4	Variations des caractéristiques lors d'un apport de charge pour différents points de fonctionnement	124
C	Détection de fluorescence	127
C.1	Montage optique de fluorescence	127
C.2	Fluorescence et réseaux de transistors	129
C.2.1	Effet de l'épaisseur d'oxyde	129
C.2.2	Moyennage sur les surfaces actives	130
D	Protocoles biologiques de PCR	133
D.1	Introduction à la PCR	133
D.2	PCR sur le λ BstE-II	135
D.3	PCR sur un gène de souris	136
D.4	Synthèse de longs fragments d'ADN (10 kb)	137

Chapitre 1

Introduction

Développées dans le cadre d'un projet pluridisciplinaire il y a une dizaine d'années, les puces à ADN sont devenues un outil majeur dans le domaine de la génétique pour l'étude de l'expression des gènes, la détection de mutations, la découverte de médicaments ou les diagnostics médicaux. Cette nouvelle technique d'analyse génétique utilise le principe de reconnaissance entre deux brins complémentaires d'ADN (hybridation) et permet d'étudier en parallèle plusieurs milliers de séquences d'ADN ou d'ARN. Actuellement, la détection de l'hybridation sur puces requiert un marquage préalable des molécules d'ADN à l'aide de fluorophores. La détection par fluorescence s'avère très sensible, mais un procédé sans étape de marquage simplifierait la lecture, réduirait la durée et le coût des tests sur puces et permettrait une détection en "temps réel" de l'hybridation.

De nombreuses méthodes alternatives fondées sur des principes de détection différents (mécanique, électrochimique, optique) ont été proposées. Parmi ces approches, l'utilisation de transistors à effet de champ permettant la détection de biomolécules chargées et de leurs interactions apparaît prometteuse. Ce type de capteurs, initialement introduit par P. Bergveld [55], a été essentiellement utilisé pour la détection de protéines. L'application à une détection de l'hybridation de l'ADN a été mise en évidence par Souteyrand et al [64] sur un transistor unique. Cependant, la technique des puces à ADN nécessite une analyse massivement parallèle et requiert donc l'intégration d'un grand nombre de capteurs par puce. C'est pourquoi l'utilisation de réseaux de transistors à effet de champ proches de la technologie CMOS apparaît intéressante en vue d'une application future à une détection électronique de l'hybridation sur puces à ADN.

C'est dans le but d'étudier la faisabilité d'une détection électronique de l'hybridation sur des réseaux de transistors, qu'un nouveau projet de recherche a été lancé au LPMC en 2000. De nombreuses questions se posent lorsque l'on aborde un tel sujet. Comment détecter un apport de charge à la surface du réseau de transistors ? La sensibilité des structures utilisées sera-t-elle suffisante pour mettre en évidence de manière reproductible la détection de molécules d'ADN et leur hybridation ? Comment doit-on fixer les ADN à la surface ? Sachant que les charges à l'interface sont écartées par l'électrolyte de mesure, est-il néanmoins possible de parvenir à détecter des biomolécules chargées dans des conditions salines proches des conditions physiologiques ?

Les différentes étapes de traitement chimique des surfaces ne risquent-elles pas de masquer les signaux électroniques propres à l'ADN ? Nous présentons dans la suite les expériences effectuées sur ce sujet et les réponses que nous avons pu apporter aux différentes questions posées ainsi qu'à celles nées au cours de notre travail.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré aux puces à ADN et aux techniques alternatives envisageables afin de détecter l'hybridation sur puces. Le chapitre suivant présente le principe de mesure utilisé pour la détection électronique de biopolymères adsorbés à la surface de réseaux de transistors à effet de champ. Les chapitres 4, 5 et 6 regroupent les résultats obtenus sur la détection de deux biopolymères modèles ayant en solution aqueuse une charge globale opposée : la polylysine et l'ADN. Enfin le dernier chapitre retrace le cheminement suivi pour parvenir à une détection électronique de l'hybridation sur les réseaux de transistors. Des compléments plus détaillés de certains aspects abordés dans ces différents chapitres ont été regroupés dans les appendices.

Chapitre 2

PUCES à ADN et techniques alternatives pour la détection de l'hybridation

2.1 L'analyse du génome

2.1.1 Les acides nucléiques

Les molécules d'ADN (acide désoxyribonucléique) et d'ARN (acide ribonucléique) constituent le support de l'hérédité et permettent la réplication, la transcription et la traduction de l'information génétique chez les organismes vivants. Ces acides sont appelés nucléiques en raison de leur abondance dans les noyaux cellulaires où ils ont été isolés pour la première fois en 1869 par Miescher sous le nom de "nucléine"[1]. Ces molécules sont des polymères formés par l'assemblage d'unités élémentaires appelées nucléotides (voir figure 2.1). Chaque nucléotide est composé d'un sucre (le désoxyribose pour l'ADN et le ribose pour l'ARN), d'un groupement phosphate et d'une base azotée. Il existe quatre types de bases différentes : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G) pour l'ADN. Pour l'ARN l'uracile (U) remplace la thymine. Le stockage de l'information génétique est contenu dans le code à 4 lettres (ATCG) formé par l'empilement de ces bases le long de la molécule que l'on appelle séquence génétique.

2.1.2 Appariement entre bases : hybridation

Tandis que l'ARN se présente sous la forme d'une molécule simple brin, l'ADN dans sa forme simple brin n'apparaît que marginalement au cours du cycle cellulaire. La forme la plus stable de l'ADN, décrite par Watson et Crick [2], est celle constituée de deux brins complémentaires enroulés en une double hélice représentée sur la figure 2.2. Cette structure double brin résulte essentiellement de la propriété des bases à s'apparier entre elles de manière stable et spécifique. L'association entre bases s'effectue par des liaisons hydrogène. Le nombre possible de ces liaisons hydrogène ainsi que des gênes stériques entre bases ne permettent que deux couples de paire de base. L'adénine s'associe avec la thymine pour former la paire "AT" et la cytosine s'associe

avec la guanine pour former la paire "CG" (cf. figure 2.4). La molécule d'ADN double brin est stabilisée à la fois par l'appariement des bases et par l'empilement de celles-ci le long de l'axe de la molécule, à travers des interactions de Van der Waals. Ces deux facteurs s'opposent à la répulsion électrostatique entre les groupements phosphates (porteurs de charge négatives) et empêchent la séparation spontanée des brins dans les conditions physiologiques. Contrairement à l'ADN, l'ARN se présente comme un simple brin dans son milieu physiologique. Fréquemment, ce brin unique forme des structures complexes en s'appariant partiellement avec lui même (structure secondaire et tertiaire¹). La reconnaissance spécifique entre des séquences complémentaires est appelée hybridation (figure 2.3). L'hybridation entre deux simples brins d'ADN de séquences complémentaires donne lieu à la double hélice. L'hybridation complète ou partielle entre un simple brin d'ADN et un simple brin d'ARN est également possible.

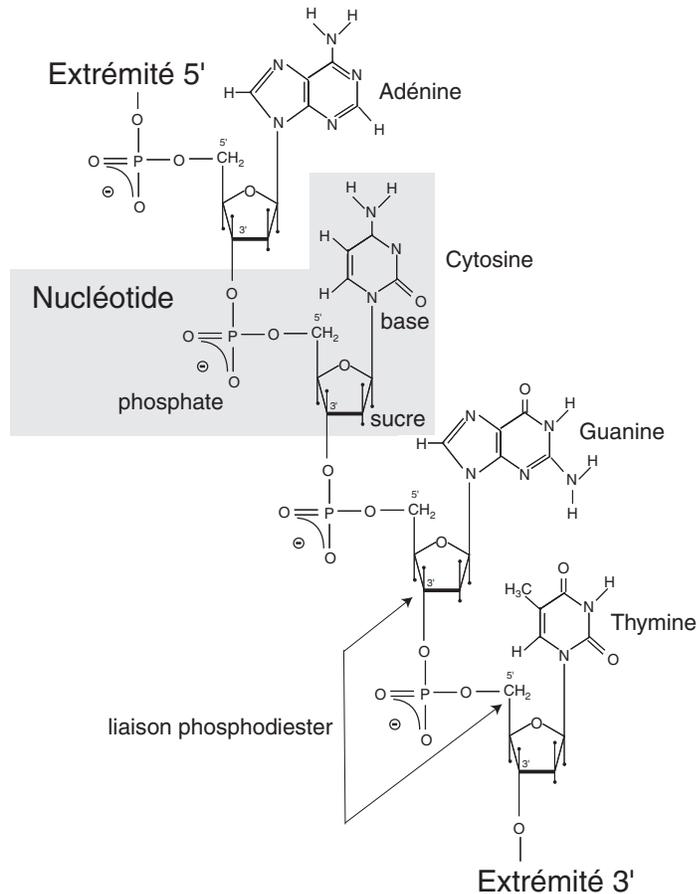


FIGURE 2.1: Représentation schématique de la structure chimique d'un simple brin d'ADN constitué de quatre nucléotides portant chacun une base différente. Les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiester qui s'établissent entre les carbones 3' et 5' de deux désoxyriboses successifs. Les brins sont ainsi orientés et on repère le sens par le carbone 3' ou 5' se trouvant à l'extrémité du brin. Cette orientation permet de définir le sens de lecture pour la séquence génétique. On prend par convention le sens 5'→3' du brin codant pour un gène.

¹C'est le cas des ARN de transfert qui possèdent une structure en forme de trèfle mais aussi d'ARN beaucoup plus longs comme les ARN ribosomiaux.

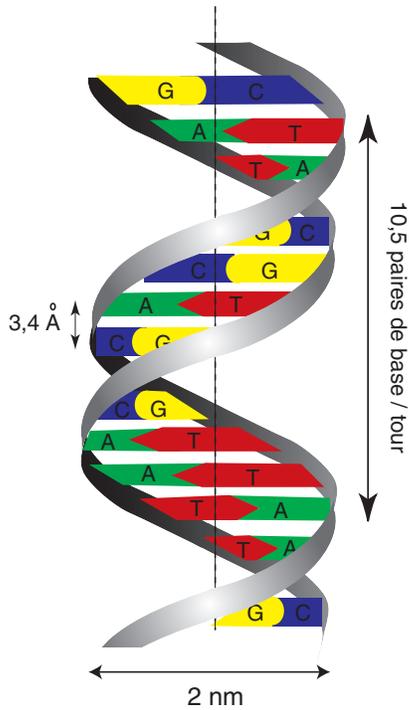


FIGURE 2.2: Structure en double hélice de la molécule d'ADN. Les caractéristiques de la forme la plus courante d'ADN (ADN-B) sont : 2 nm de rayon, 3,4 Å entre base et 10,5 bases par tour.

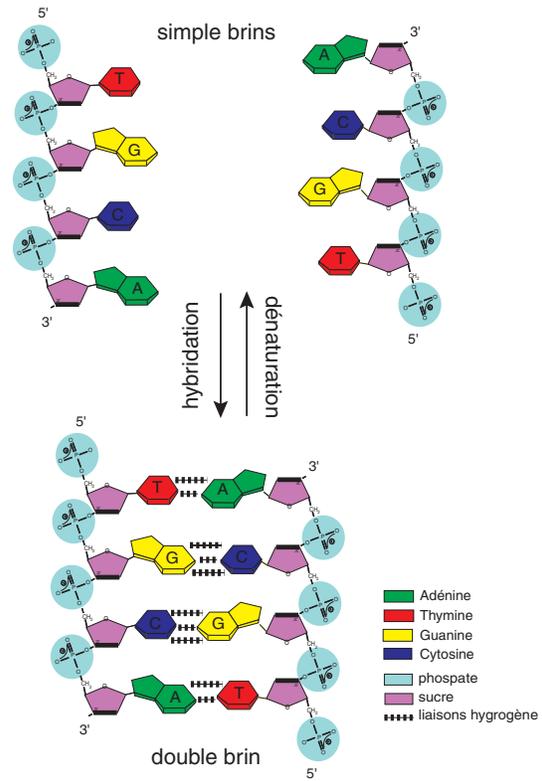


FIGURE 2.3: Hybridation de la molécule d'ADN. Les deux brins complémentaires s'associent pour former un double brin. L'appariement se fait au niveau des bases. Dans le duplex d'ADN, les brins sont orientés en sens contraire (5' → 3' et 3' → 5'). La réaction inverse (passage du double brin au simple brin) s'appelle la dénaturation.

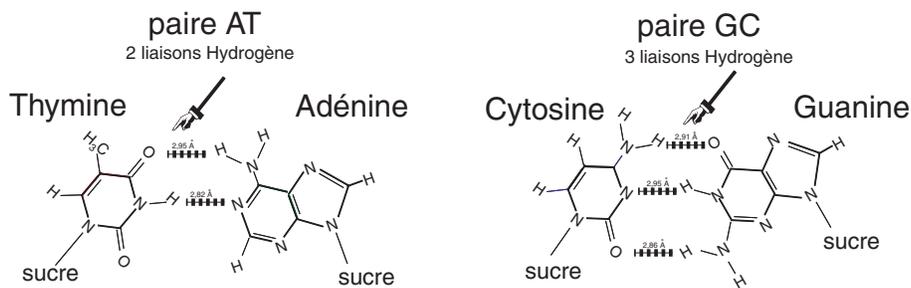


FIGURE 2.4: Structure moléculaire des bases et appariement entre bases complémentaires par des liaisons hydrogène. Les bases C et G sont associées par trois liaisons hydrogène et les bases A et T par deux liaisons seulement. La paire GC a donc une plus grande stabilité que la paire AT.

2.1.3 Gènes, transcription et traduction de l'information génétique

L'ADN est la forme de stockage de l'information génétique de pratiquement tous les organismes vivants². Cette information (représentée sur le chromosome par une suite linéaire de gènes séparés par des régions intergéniques) est utilisée lors de l'expression génétique, c'est à dire pour la synthèse des protéines. Un gène est tout d'abord copié sous forme d'une molécule complémentaire d'ARN (transcription). La copie sous forme d'ARN est ensuite traduite par les ribosomes qui assemblent les acides aminés pour former la protéine (traduction). Les ARN codant pour la synthèse des protéines sont appelés ARN messagers ; d'autres ARN (de transfert et ribosomiaux) interviennent également au cours de l'étape de traduction de l'ARN messenger en protéine. Le contrôle et la catalyse de ces différents processus s'effectuent principalement par la reconnaissance et les interactions spécifiques entre acides nucléiques et protéines. La réplication est catalysée par des protéines nommées ADN-polymérase et la transcription par les ARN-polymérase. D'autres protéines interviennent dans ces processus : des répresseurs, des activateurs ou des facteurs de transcription qui bloquent ou stimulent l'action des polymérase en fonction des besoins de la cellule (régulation de l'expression génétique).

2.1.4 Séquençage et Projet Génome

Chaque protéine cellulaire est le fruit de l'expression d'un gène et l'ensemble de ces protéines est à la base de l'édification et du maintien des cellules de l'organisme. L'organisme entier peut être considéré comme résultant de l'activité des gènes qui constituent son génome. L'analyse de génomes entiers a réellement débuté il y a une quinzaine d'années avec le lancement du Programme International Génome Humain [3, 4]. Celui-ci avait pour but d'analyser la structure du génome humain (ainsi que celle d'organismes modèles), de déterminer la localisation de l'ensemble des gènes présents et d'en établir la séquence complète. Ce projet a suscité de nombreux débats lors de son lancement quant à son opportunité, son coût et sa faisabilité³ [3]. Cependant, des progrès dans l'automatisation des méthodes d'analyse ont permis de parvenir au séquençage entier d'organismes modèles (levures, vers ...) et de chromosomes humains [4, page 1959]. Le défi actuel semble résider dans la compréhension de l'ordre sous-jacent (ère post-génomique) c'est à dire la classification des gènes selon leur fonction en déterminant les séquences codantes et régulatrices, les variations polymorphiques à l'intérieur d'une espèce ou encore l'expression des gènes lors du développement de réponses physiologiques ou de maladies. L'approche gène par gène doit dans ce cas être remplacée par une "vision globale" permettant d'analyser simultanément des milliers d'informations génétiques lors d'un processus biologique. C'est dans ce contexte qu'une nouvelle technique d'analyse génétique massivement parallèle, les puces à ADN, apparaît d'un grand intérêt [5, 6].

²Seuls quelques virus possèdent un génome constitué d'ARN.

³Le génome humain contient plus de 3 milliards de paires de bases et, compte-tenu des technologies disponibles à l'époque, le séquençage représentait une tâche lente et coûteuse. D'autres personnes estimaient qu'il aurait été préférable de concentrer les efforts et fonds de recherche sur la découverte de gènes que l'on pensait liés aux maladies plutôt que de considérer l'ensemble du génome.

2.2 Puces à ADN

Une puce à ADN est une matrice ordonnée d'échantillons d'ADN simple brin permettant d'analyser simultanément jusqu'à plusieurs milliers de séquences génétiques. Ce nouvel outil d'analyse génétique associe le processus biologique de reconnaissance spécifique entre simple brin d'ADN (hybridation) et des compétences et techniques issues de différents domaines : biologie moléculaire, biochimie, microtechnologies... Après avoir décrit le principe des puces à ADN (figure 2.5), nous mettrons dans la suite l'accent sur les différentes technologies mises en jeu pour la fabrication et l'analyse sur puces à ADN.

2.2.1 Principe des puces à ADN

Les puces à ADN sont constituées d'un support de petite taille (environ 1 cm^2 , en plastique, en verre ou en silicium) sur lequel sont synthétisées ou greffées en des endroits prédéfinis des molécules d'ADN simple brin (oligonucléotides ou fragments de gènes) dont on connaît la séquence. L'utilisation d'outils issus de la microtechnologie permet de réaliser un réseau dense et régulier de quelques milliers (jusqu'à une centaine de milliers) de microsursfaces par centimètre carré⁴ contenant des échantillons d'ADN simple brin de séquences différentes. Ce réseau de microsursfaces, chacune d'elles ayant une dimension de l'ordre de $(100\ \mu\text{m})^2$, constitue une matrice ordonnée d'échantillons d'ADN de séquences différentes et parfaitement déterminées. Les molécules d'ADN fixées à la surface de la puce sont appelées sondes pour leur capacité à analyser ("sonder") des acides nucléiques de séquences inconnues. Ces molécules d'ADN simple brin sont en effet capables de reconnaître spécifiquement des acides nucléiques (ADN ou ARN) simple brin de séquence complémentaires en formant par hybridation le duplex d'ADN. Lorsqu'une puce à ADN est mise en contact avec une solution contenant des ADN simple brin de séquences inconnues, appelés cibles, l'hybridation entre cibles et sondes ne s'effectue sur la surface qu'aux endroits où se trouvent les séquences complémentaires. La détection localisée des différentes microsursfaces où s'est produite l'hybridation sur le support solide constituant la puce permet ainsi d'identifier les séquences génétiques présentes dans l'échantillon d'acides nucléiques analysé (échantillon de cibles).

Les puces à ADN permettent en une seule opération et de façon massivement parallèle de rechercher des mutations, de faire un typage local complet ("miniséquencage") où d'étudier et de quantifier l'expression de milliers de gènes.

2.2.2 Technologies mises en jeu

De la fabrication des puces à l'interprétation des résultats, les différentes étapes intervenant dans la technique des puces à ADN utilisent un grand nombre de technologies différentes. Ces technologies sont interdisciplinaires et regroupent des compétences en biologie moléculaire et biochimie (synthèse des sondes, préparation des échantillons biologiques, marquage des cibles), chimie des surfaces (fixation des sondes), micromécanique (système de microdéposition des sondes), physique (technique de détection de l'hybridation), bio-informatique ("dessin" des sondes et analyse des résultats). Des articles, regroupant l'ensemble de ces technologies, ont ainsi été publiés

⁴L'analogie avec le terme puce utilisé en électronique repose probablement sur la forte densité de sondes sur la surface, tout comme celles des composants électroniques dans le silicium.

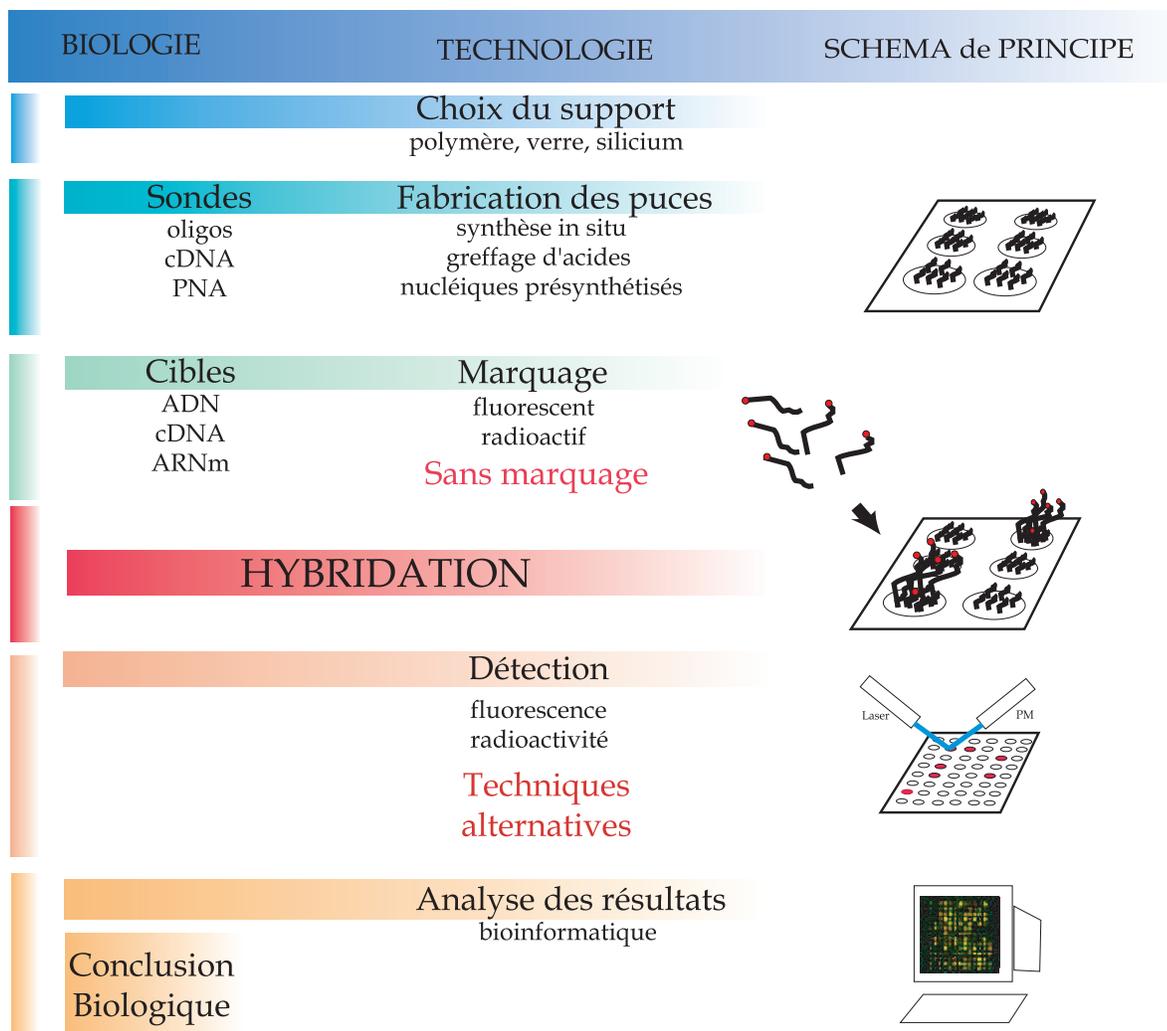
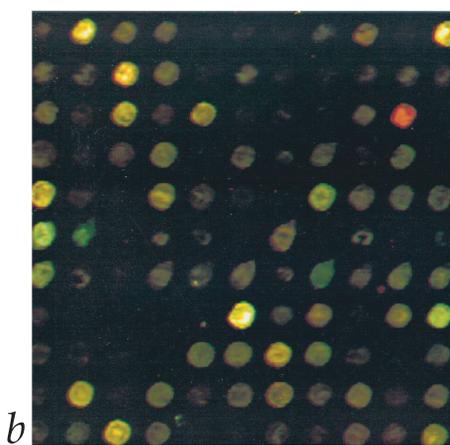
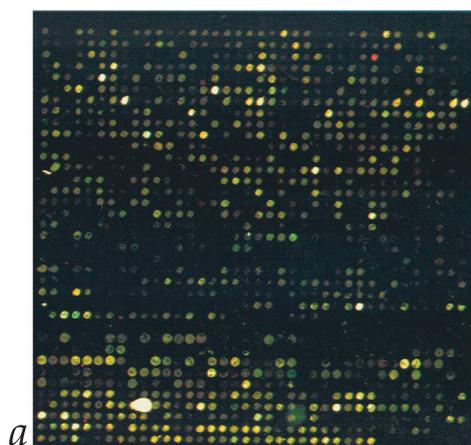


FIGURE 2.5: Principe des puces à ADN et technologies mises en jeu.

FIGURE 2.6: (a) Image de fluorescence à deux couleurs d'une partie d'une puce à ADN ($38 \times 38 = 1444$ dépôts). (b) grossissement d'une région de $11 \times 11 = 121$ dépôts. Dimension d'un dépôt (rayon $\sim 100 \mu m$). Images extraites de [7].

dans des revues spécifiques à chacun de ces domaines [7, 8, 9, 10, 11]. Plusieurs options technologiques sont envisageables pour chaque étape intervenant lors de la conception d'une puce et plusieurs combinaisons entre ces différentes options sont finalement possibles. Les caractéristiques des puces à ADN (taille, nombre de dépôts de sondes, diversité et pureté des sondes, coût) sont dépendantes des domaines d'applications biologiques souhaités et sont les facteurs qui déterminent le choix des différentes options technologiques utilisées pour la fabrication des puces à ADN.

2.2.3 Fabrication des puces à ADN

La première étape est le choix du support sur lequel seront fixées les molécules d'ADN suivant un réseau régulier et dense de microsursaces de faibles dimensions. Deux approches différentes sont ensuite possibles pour fabriquer les puces à ADN. Dans la première, les molécules d'ADN servant de sondes sont directement synthétisées sur la surface ; cette technique est appelée synthèse "in-situ". Dans la seconde approche, les sondes sont préalablement préparées (ADNc) ou synthétisées (oligonucléotides) puis elles sont greffées sur la puce en utilisant différentes méthodes de fixation.

a) Choix du support

Plusieurs types de supports ont été envisagés pour les puces à ADN. On peut citer les membranes de nylon [12] utilisées depuis des années en biologie moléculaire pour les "southern-northern- et les dot-blot"⁵, ainsi que d'autres polymères tels que les polypropylènes [13] ou les polyacrylamides [14]. Ces derniers sont encore employés bien que les surfaces de verre soient devenues le support majoritairement utilisé [15]. Cette prédominance des surfaces de verre s'explique par plusieurs raisons. D'une part, leur coût est faible car il s'agit souvent de simples lamelles de microscope. D'autre part, ce substrat solide et non-poreux est compatible avec les techniques de microdéposition de sondes. Enfin, du fait de sa transparence, le verre facilite la lecture de la puce par fluorescence.

Les derniers types de support envisagés sont ceux employés couramment dans la microélectronique : le silicium [16] et son oxyde [17] ou encore l'or et le platine⁶. Ces supports sont importants pour les développements futurs car ils pourraient permettre la conception de biopuces avec une détection directe de l'hybridation sans recourir au marquage préalable des cibles nécessaire pour une détection de fluorescence.

b) Technique de synthèse "in-situ"

C'est la stratégie qui a été choisie par la Société Affymetrix [18] qui fut pionnière dans le domaine des puces et est actuellement le leader économique mondial de cette approche. L'élaboration de puces de haute densité par Affymetrix est basée sur le travail de Steve Fodor et de ses collègues⁷ [19, 20] qui combine des techniques de photolithographie utilisées par l'industrie microélectronique avec la synthèse d'oligonucléotides par cycle en utilisant une chimie phosphoramidite. La synthèse des sondes s'effectue par empilements successifs des quatre bases

⁵Techniques basées sur l'hybridation qui ont précédé celles des puces.

⁶L'or et le platine sont actuellement utilisés pour des mesures électrochimiques et opto-électronique de l'hybridation de l'ADN (cf. paragraphe 2.3).

⁷Cette technique fut initialement développée pour la synthèse de peptides [19].

(A,T,C,G). Des groupements photolabiles fixés sur chaque base protègent les groupements réactifs qui interviennent dans la liaison entre nucléotides. L'illumination de la puce à travers un masque, dont on peut varier la géométrie à volonté, permet de déprotéger sélectivement les microsurfaces désirées de la puce. On peut alors fixer en ces zones prédéfinies un nucléotide donné qui possède un groupement photolabile chargé de protéger la liaison avec le nucléotide suivant. L'utilisation successive de différents masques photolithographiques de formes définies permet la synthèse combinatoire des oligonucléotides⁸. La première puce développée sur ce principe comportait 256 séquences différentes d'oligonucléotides de 8 bases sur une surface de 1.28 cm * 1.28 cm et était synthétisée par 16 cycles de réactions chimiques en 4 heures [20]. Actuellement, les puces commerciales d'Affymetrix peuvent comporter jusqu'à 400 000 séquences d'oligonucléotides différentes ; chaque séquence occupe une surface de $(20 \mu m)^2$ pour une surface totale de la puce d'environ 2 cm².

L'avantage majeur de cette approche réside dans la possibilité de fabrication de puces de haute densité, celles-ci pouvant être fabriquées par centaines en parallèle comme pour les microprocesseurs. L'inconvénient principal⁹ de cette technique réside dans la fiabilité de la méthode de synthèse. Le rendement effectif de la synthèse photolithographique est seulement de 95 % pour chaque étape, ce qui signifie que 5% des bases ne s'accrochent pas correctement [21]. Par exemple, pour des puces d'oligonucléotides de 25 bases, seulement 28 % des oligonucléotides, en moyenne, seront synthétisés correctement. Ceci limite la longueur des oligonucléotides à une trentaine de bases pour ce type de puces.

Pour des puces de plus faible densité, une technique alternative a été développée par Milner et al [23] et consiste en une synthèse in-situ chimique sur des surfaces de verre. Des puces comportant 2000 séquences différentes d'oligonucléotides de 17 bases ont ainsi été fabriquées en utilisant un synthétiseur commercial d'oligonucléotides couplé à une cellule de réaction en téflon. Cette cellule réactionnelle permet d'adresser les réactifs de synthèse sur des surfaces de quelques μm^2 et peut être déplacée pour générer la matrice de sondes.

c) Technique de greffage d'acides nucléiques présynthétisés

Cette technique consiste à immobiliser sur la surface de la puce, de manière reproductible et robuste, des ADN présynthétisés (oligonucléotides) ou des fragments longs d'ADN préalablement préparés. Un avantage de cette méthode est la possibilité de fixer sur la puce des oligonucléotides parfaitement définis¹⁰ et purifiés, ces sondes pouvant être plus longues (50 à 70 bases). Cette méthode permet aussi la fixation de fragments longs d'ADN, il est ainsi possible de réaliser des puces dont les sondes sont directement des copies de gènes (ADNc). Cette stratégie de fabrication nécessite une technique pour adresser¹¹ chaque sonde en des endroits prédéfinis sur la puce ainsi qu'une méthode de fixation des ADN sur la surface.

⁸Par exemple, pour une sonde longue de 8 bases il existe 4⁸ séquences différentes, soit 65 536 combinaisons. On peut obtenir l'ensemble de ces combinaisons en 32 étapes si on utilise une méthode de synthèse en bandes orthogonales et en 16 étapes si on utilise une méthode de synthèse binaire. Une technique dérivée de celle-ci utilise un réseau digital de micromiroirs pour former l'image virtuelle de l'ensemble des masques [21, 22].

⁹Un autre inconvénient est le prix prohibitif de telles puces. Le prix d'un système complet (une station microfluidique, un scanner et l'ensemble des programmes nécessaires au fonctionnement et à l'analyse des résultats) permettant d'utiliser la puce GeneChip d'Affymetrix avoisine les 175 000 \$ [8].

¹⁰Le rendement de la synthèse "ex-situ" étant d'environ 99%.

¹¹L'adressage est défini comme la capacité à fixer de façon précise les molécules en un site précis.

c.1) Méthode d'adressage des sondes sur la puce

La méthode d'adressage la plus répandue utilise des robots dont les micropointes mécaniques peuvent délivrer, en des endroits prédéfinis, des microgouttelettes de faible volume (de 0.1 nl à 10 nl). Le dépôt des sondes se fait par contact mécanique entre la pointe et la surface¹². Les premiers robots utilisant ce principe ont été développés dans le milieu universitaire par l'équipe de P. Brown [24, 25]. Ce type d'appareil est maintenant commercialisé par différentes sociétés¹³. Cette méthode permet de déposer jusqu'à 10 000 dépôts d'ADN sur des puces de quelques cm^2 . Le diamètre d'un dépôt est de l'ordre de 100 μm et l'espacement entre dépôts de sondes de 100 à 200 μm (figure 2.6). Des systèmes utilisant des pointes piezoélectriques permettent de projeter les microgouttelettes (100 pl à 1 nl) à la surface et d'éviter ainsi tout contact mécanique [28].

D'autres méthodes reposent sur un adressage lumineux à l'aide de techniques photolithographiques [29] ou encore un adressage électrochimique sur des surfaces d'or [30, 31] comme la technique développée par une société française (Cis-Bio) en collaboration avec le LETI¹⁴ de Grenoble. Le substrat est du silicium sur lequel sont déposées de microélectrodes carrées en or. Une solution de pyrole contenant des oligonucléotides présynthétisés (sur lesquels ont été préalablement fixés un pyrole) est répandue à la surface de la puce. En appliquant un courant électrique à l'une des électrodes, l'électropolymérisation entre la solution de pyrole et le pyrole fixé sur les oligonucléotides conduit à la fixation de ces sondes sur l'électrode polarisée. Cette méthode requière une surface conductrice (Au, Pt ...) et un multiplexage des différentes électrodes par un réseau de connecteurs permettant d'adresser chaque microélectrode successivement. Une puce test de 128 électrodes de $(50 \mu m)^2$ a été utilisée pour la détection de mutations [31]. Cependant, cette méthode est relativement fastidieuse car elle nécessite une électropolymérisation pour chaque type de sonde. Une technique dérivée de celle-ci utilise un robot pour contrôler et adresser directement les solutions sur une surface d'or et la détection après hybridation peut alors être réalisée par des méthodes "opto-électroniques" [32].

c.2) Méthode de fixation des sondes sur la puce

Il existe différentes alternatives possibles pour immobiliser des sondes présynthétisées sur le support solide constituant la puce. Dans nos expériences, nous avons employé deux méthodes de fixation différentes.

La première utilise des interactions électrostatiques entre la surface (négativement chargée), un polymère (la polylysine, positivement chargée), et les ADN (négativement chargés). Cette méthode est décrite dans l'introduction du chapitre 4. Bien que cette fixation soit encore utilisée, elle est actuellement remplacée dans la plupart des applications sur puces par des fixations covalentes plus solides et assurant une meilleure accessibilité des brins sondes lors de l'hybridation.

Pour les fixations covalentes, une silanisation préalable de la surface doit d'abord être effectuée. Le silane utilisé possède nécessairement deux groupements chimiques terminaux dont l'un sur une extrémité (mono, di ou tri- fonctionnel du silane) doit être capable d'interagir avec les

¹²C'est la méthode que nous avons utilisée pour le dépôt de nos échantillons (cf. chapitre 3.4).

¹³Voir par exemple le robot MicroGrid développé par BioRobotics[26]. Une comparaison des performances de différents robots commerciaux est donnée dans l'article de D. Bowtell [27, Table 4].

¹⁴Laboratoire d'Electronique de Technologie et d'Instrumentation (<http://www-leti.cea.fr/fr/index-fr.htm>).

groupements hydroxyles de la surface de verre¹⁵. Le groupement chimique à l'autre extrémité possède une fonction (hydroxyle, thiol, amine ou carboxyle) capable de réagir avec les ADN sondes. Dans cette méthode, les brins sondes doivent être modifiés par un ou plusieurs groupements chimiques réactifs à celui du silane. Ceci peut être effectué lors de la synthèse pour des oligonucléotides ou à l'aide d'une PCR ("Polymerase Chain Reaction") pour les fragments longs d'ADN. Il est aussi possible d'utiliser des molécules intermédiaires (espaceurs) qui réagissent d'abord avec le silane et permettent ensuite la fixation des molécules d'ADN [33]. La diversité des groupements chimiques possibles conduit à un grand nombre de méthodes de fixation différentes dont certaines sont comparées dans les références [34, 35]. Le rendement et la spécificité de l'hybridation sont fonction des différents types de silanes et espaceurs utilisés ainsi que de la nature et de la densité en sondes. Des études ont d'ailleurs été menées par l'équipe de Southern pour caractériser l'influence de ces différents paramètres sur l'efficacité de l'hybridation [36, 37].

La méthode de fixation covalente testée et décrite au chapitre 7 diffère des approches précédemment décrites. En effet, dans cette méthode les sondes sont tout d'abord "silanisées" et sont ensuite greffées directement sur la surface de verre sans modification préalable de celle-ci.

2.2.4 Détection standard de l'hybridation sur puces à ADN : la fluorescence

Actuellement la détection de l'hybridation sur puces à ADN est le plus souvent réalisée par fluorescence¹⁶. Pour ce faire, les acides nucléiques à étudier sont préalablement marqués par des fluorochromes, le plus souvent au cours d'une amplification par PCR. Après avoir hybridé et lavé la puce, les régions où l'hybridation s'est produite sont repérées avec un système de fluorescence composé d'une ou de deux sources lasers, d'un microscope confocal et d'un détecteur sensible à la fluorescence (photomultiplicateur ou caméra CCD). À l'aide de l'image en fluorescence de la puce (figure 2.6) il est alors possible de déterminer avec quelles sondes le produit d'amplification s'est hybridé. L'utilisation de deux marqueurs fluorescents différents permet une lecture à deux couleurs de la puce. Les tests peuvent donc être réalisés en même temps sur deux échantillons différents de cibles. Cette technique de double marquage est couramment utilisée pour quantifier l'expression de gènes provenant d'échantillons biologiques issus de cellules ou organismes différents ou ayant été exprimés à différents moments du développement cellulaire.

Cheung et al [7] donnent un seuil limite de détection inférieur à 10^{-18} moles (attomoles) de fluorophores dans un dépôt de $100 \mu\text{m}$ de diamètre pour un système de fluorescence développé dans leur équipe. Ceci correspond à détecter une densité surfacique de l'ordre de 80 fluorophores/ μm^2 ($8 \cdot 10^9$ fluorophores/ cm^2). Des systèmes commerciaux ont aussi été développés

¹⁵La formation d'une monocouche est attendue en utilisant un silane mono-fonctionnel. Néanmoins la présence d'un seul groupement terminal conduit dans ce cas à une faible réactivité des silanes avec la surface. L'utilisation de silanes di- ou tri-fonctionnel permet d'augmenter le rendement de la réaction avec la surface. Mais l'interaction possible entre différents silanes donne alors naissance à une couche tridimensionnelle sur la surface.

¹⁶D'autres techniques de détection (enzymatique, radioactive) dérivées de méthodes classiques d'analyses biologiques (tests immunologiques, techniques de "dot blot") sont encore employées. L'utilisation d'isotopes radioactifs (^{125}I , ^{32}P ou ^{33}P) comme marqueurs permet une détection sensible et quantitative de l'hybridation sur membrane ou même directement à la surface d'une caméra CCD [38]. Mais la faible résolution de lecture ($\sim 300 \mu\text{m}$) ainsi que les problèmes associés à l'utilisation de marqueurs radioactifs (coût élevé, approvisionnement, sûreté, stabilité) limitent l'utilisation de cette technique à des puces de faible densité et expliquent de ce fait la prédominance de la technique de fluorescence.

pour permettre une lecture rapide de fluorescence sur des lamelles de verre de taille standardisée. Les descriptions et performances de plusieurs "scanners" commerciaux sont données dans l'article de D. Bowtell [27, table 5]). Les valeurs des seuils de sensibilité de ces différents scanners sont comprises entre 0.5 et 35 fluorophores/ μm^2 (5 à 350 10^7 fluorophores/ cm^2)¹⁷. Les valeurs de densité surfacique données correspondent à une détection dans des dépôts de l'ordre de $(100 \mu\text{m})^2$, la sensibilité par capteur (dépôt) est donc de l'ordre de 10^{-2} à 1 attomoles.

2.3 Techniques alternatives pour la détection de l'hybridation et application aux puces à ADN

Bien que la technique de fluorescence soit très efficace car très sensible, la recherche d'autres modes de détection de l'hybridation sur puces représente un défi intéressant [39, 40]. Ceux-ci permettraient, éventuellement, de se passer des étapes de marquage, un suivi en temps réel de l'hybridation, une diminution des quantités de biomatériau utilisé tout en assurant une miniaturisation accrue et une augmentation de la fiabilité. Plusieurs possibilités fondées sur des principes différents ont été proposées. Cependant, aucune ne regroupe toutes les caractéristiques précédentes. De plus, aucun capteur intégré utilisant ces nouveaux principes de détection n'a pu encore être développé à grande échelle. Nous présentons dans la suite quelques unes des techniques alternatives dont nous discuterons les principes ainsi que les limitations.

2.3.1 Techniques "optiques" et "opto-électroniques"

Un suivi en temps réel de l'hybridation, sans marquage préalable des cibles, peut être réalisé par une détection "opto-électronique" en utilisant la résonance de plasmon de surface (SPR) [41, 42]. Ce principe optique¹⁸ repose sur la modification de l'indice de réfraction d'une solution se trouvant au contact d'une fine couche métallique due à l'adsorption des molécules cibles sur la surface lors de l'hybridation. Pour amplifier les quantités de matériel biologique disponible et permettre une détection sur plusieurs surfaces, Jin-Lee et al [42] ont utilisé un système microfluidique et sont parvenus à détecter l'hybridation de 20 femtomoles d'ADN. Cette méthode est, comme la fluorescence, relativement complexe et coûteuse et ne devrait pas conduire à la conception de puces de haute densité et ce, d'autant plus que les surfaces de ce type de capteur (de l'ordre 0.1 à 1 mm^2) sont grandes devant les tailles des dépôts sur puces (500 à $10^4 \mu\text{m}^2$). La méthode optique la plus probante pour une application sur puces à ADN fait intervenir un marquage préalable des molécules cibles à l'aide de nanoparticules d'or. L'hybridation de ces molécules à la surface de la puce modifie les propriétés optiques de la surface. La détection par contraste optique (en transmission ou réflexion) permet alors de caractériser l'hybridation des cibles [43]. En utilisant une solution qui permet la croissance d'une couche d'argent à la surface des billes d'or¹⁹, la détection peut même être réalisée avec un scanner couleur commercial [44]. Ce type de méthode permet de discriminer des mutations ponctuelles pour des oligonucléotides (27

¹⁷Nous donnons ici à la fois les valeurs de densités surfaciques par cm^2 et par μm^2 car aucune de ces unités n'est vraiment privilégiée dans les différents articles sur les puces à ADN.

¹⁸Cette technique fut initialement développée par la société Biacore pour caractériser des interactions entre protéines (voir le site internet de publication : <http://www.biacore.com/lifescience/publications.lasso>).

¹⁹Nous avons aussi utilisé ce type de protocole dans nos expériences (pour plus de détail se reporter au chapitre 7.2.2).

bases) avec une spécificité trois fois supérieure à celle obtenue en fluorescence. Après couplage à l'argent, cette détection optique est environ cent fois plus sensible qu'une détection fluorescente sur le même système biologique. Cette méthode a plusieurs avantages pour une application à des puces de forte densité. D'une part elle permet la détection sur des surfaces de faible dimensions ($\sim 20 \mu m^2$). D'autre part, les marqueurs utilisés ont une bonne stabilité contrairement aux fluorophores qui peuvent être "détériorés" par la lumière. Ceci permet d'utiliser des sources lumineuses de forte puissance pour révéler l'hybridation. Le désavantage majeur de cette approche est évidemment la nécessité de marquer les molécules cibles.

2.3.2 Techniques "mécaniques" et "électro-mécaniques"

Deux approches utilisant des capteurs micromécaniques ont été envisagées pour détecter l'hybridation de l'ADN sur des surfaces. La première approche consiste à mesurer le changement de masse intervenant lors de l'hybridation des molécules cibles à la surface d'un capteur mécanique sur lequel ont été préalablement greffées les sondes. La détection se fait en mesurant le décalage de la fréquence de résonance du capteur micromécanique oscillant dans le milieu liquide. Cette méthode utilise le plus souvent un cristal piézoélectrique²⁰ pour une lecture "électro-mécanique" directe de l'hybridation [45, 46]. Okahata et al [46] rapportent une sensibilité de l'ordre du ng/cm^2 sur un capteur d'environ $5 mm^2$. L'hybridation est réalisée sur des oligonucléotides d'une vingtaine de paires de base ce qui correspond à détecter de l'ordre de 10^{11} molécules/ cm^2 soit environ 10 femtomoles à la surface du capteur. Ce type de détection est sensible et permet en outre une mesure en temps réel de l'hybridation. Par contre, la surface relativement importante des microbalances de quartz ($\sim mm^2$) constitue une limitation importante pour une application sur puces à ADN. C'est pour cette raison qu'une détection similaire a été développée sur des microleviers de plus faible dimension (\sim du centième de mm^2). Une détection²¹ (en mode AC) permet de mesurer, comme dans la méthode employée pour les microbalances de quartz, le décalage de la fréquence de résonance du système. La surface du capteur étant réduite, la sensibilité de ces microleviers est inférieure à celle des microbalances et nécessite le plus souvent une amplification. Su et al [47] utilisent ainsi un marquage à l'aide de nanoparticules d'or recouvertes d'argent pour augmenter le changement de masse due à l'hybridation des cibles. La mise en évidence d'une hybridation spécifique entre oligonucléotides (~ 30 bases) a été démontrée à l'aide de cette méthode jusqu'à une concentration de 23 pM en cible. La seconde approche pour détecter l'hybridation sur ce type de microlevier est de mesurer directement la déflexion du levier sans le faire osciller (mode DC). La déflexion du levier, en mode continu, est attribuée à un changement de la contrainte surfacique résultant d'interactions électrostatiques et hydrophobes ainsi que de gênes stériques lors de l'hybridation [48, 49, 50]. Une dérive lente des leviers nécessite une approche différentielle sur plusieurs capteurs. McKendry et al [50] ont ainsi utilisé un réseau de 8 microleviers (chacun ayant une surface de $0.05 mm^2$) pour détecter des mutations sur des oligonucléotides de 12 bases. La sensibilité par capteur est d'environ 80 femtomoles en cible pour une densité surfacique en sondes de l'ordre de 10^{13} sondes/ cm^2 . L'ensemble de ces méthodes micromécaniques permet une détection sensible de l'hybridation mais aussi d'autres interactions biologiques (protéines/ADN, antigènes/anticorps). Des difficultés persistent néanmoins pour une intégration à grande échelle. D'une part, la surface de ce type de capteur est relativement importante comparée aux dimen-

²⁰Cette technique est dénommée QCM en anglais pour Quartz Crystal Microbalance.

²¹La déflexion du microlevier est ici caractérisée en mesurant la réflexion d'un faisceau laser sur la surface à l'aide d'un capteur optique (photodiode).

sions des dépôts sur puces. D'autre part, les surfaces n'étant pas planaires, les techniques de microdéposition utilisées pour la fabrication des puces ne sont pas directement applicables.

2.3.3 Techniques "électrochimiques"

Les méthodes alternatives pour une détection de molécules d'ADN et de leur hybridation fondées sur des propriétés électrochimiques présentent un avantage majeur. En effet, les réactions électrochimiques conduisent à un signal électronique directement mesurable sans avoir recourt à un système de lecture complexe. Les stratégies électrochimiques envisagées sont fondées sur l'oxydation ou la réduction des bases d'ADN, l'utilisation de molécules oxydo-reductrices (fixées sur les cibles, ou s'intercalant spécifiquement dans la double hélice), l'amplification électrochimique de nanoparticules ou encore sur le transport de charge à travers l'ADN. Une description détaillée de ces différentes approches est donnée dans plusieurs articles [51, 52, 53, 54]. La sensibilité, les avantages et désavantages des différentes approches résumés dans [54, table1] ont été reportés sur la figure 2.7.

2.4 Détection de biomolécules sur des structures semi-conductrices et application à la détection de l'hybridation

Les premières structures semiconductrices appliquées à une détection d'espèces chimiques et de molécules biologiques furent introduites par P. Bergveld dans les années 1970 sous le nom d'ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor). Ces structures, qui possèdent une interface du type électrolyte/oxyde/semiconducteur, sont sensibles à l'apport de biomolécules chargées à l'interface électrolyte/oxyde. L'adsorption d'espèces chargées sur la surface d'oxyde conduit, en effet, à une modification du potentiel d'interface et à un réarrangement des porteurs de charge dans le semiconducteur (cf. chapitre 3). Une mesure de la variation de la conductivité du transistor permet alors de rendre compte de l'adsorption ou de l'interaction entre molécules sur la surface de l'oxyde. Bergveld a ainsi démontré, par une mesure de la variation du courant circulant dans le transistor, une dépendance en pH et en sel de telles structures ainsi que la possibilité de détecter l'activité électrophysiologique d'un muscle déposé à la surface d'un transistor [55]. Depuis ce travail pionnier la plupart des études sur des capteurs FET ont été consacrées à des mesures de pH, d'espèces chimiques [56, 57, 58], à des caractérisations d'interactions antigènes/anticorps [59, 60] de populations cellulaires [61], ainsi qu'à des études de l'activité électrique de cellules neuronales [62]²².

L'ADN est un polyélectrolyte négativement chargé du fait de la présence de groupements phosphates ionisés sur chaque brin constituant la double hélice²³. L'utilisation d'un capteur

²²La diversité : des systèmes étudiés (espèces chimiques, protéines, cellules); des surfaces utilisées (nature de l'oxyde [58], surfaces modifiées avec une membrane sélective [56] ou avec des enzymes [60]) et; des techniques de détection employées (étude des variations de courant [55], de tension [59, 57, 58] ou mesure d'impédance et spectroscopie d'impédance [56, 60]), rend difficile la comparaison entre ces différents travaux.

²³En milieux aqueux salin, les ions en solution écrantent partiellement ces charges négatives. Selon le modèle de condensation développé par Manning [63] il se forme une couche condensée d'ions. Ceci conduit alors à une densité de charge de $0.24 e^-$ /base dans le cas de l'ADN double brin et de $0.56 e^-$ /base pour un ADN simple brin

semiconducteur suffisamment sensible pour détecter la modification de charge induite lors de l'adsorption ou de l'hybridation de molécules d'ADN pourrait donc permettre une détection électronique directe (sans marquage) in-situ (temps réel) de l'hybridation de l'ADN.

Souteyrand et al [64] ont mis en évidence la possibilité d'utiliser une structure semiconductrice passive²⁴ (0.07 cm^2) pour une détection de l'hybridation entre oligonucléotides (18 bases). En mesurant l'impédance de la structure semiconductrice (en mode ac) ils sont parvenus à détecter une hybridation spécifique en utilisant des quantités d'ADN de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$ ($\equiv 100 \text{ nM}$). Ils ont aussi obtenus des résultats similaires sur un capteur FET unique ($20\mu\text{m} \times 500\mu\text{m} = 10^4\mu\text{m}^2$) par une mesure directe de la variation de tension appliquée à la structure en régulant le courant circulant dans le transistor. Plus récemment l'équipe de Manalis [65, 66] a utilisée des structures semiconductrices passives ($50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} = 2500\mu\text{m}^2$) placées à l'extrémité de microleviers pour caractériser l'adsorption de biomolécules chargés. L'article de Fritz et al [66], publié en octobre 2002, décrit une détection électronique différentielle (en utilisant 2 capteurs) et en temps réel de l'hybridation entre oligonucléotides (12 bases). La sensibilité de détection a été estimée à 3×10^4 oligonucléotides/ μm^2 ce qui correspond à environ 0.1 femtomole d'ADN par capteur. Ces résultats ayant été publiés au cours de ma thèse nous en discuterons les similitudes et les différences dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

Le potentiel pour la miniaturisation d'une telle détection électronique a été récemment mis en évidence en utilisant des nanostructures semiconductrices (ayant un diamètre de quelques nm et une longueur de l'ordre du μm) tels que des nanofils de silicium dopés [67, 68] ou des nanotubes semiconducteurs [69]. Cui et al [67] rapporte une caractérisation d'espèces chimiques en solution (pH, ions Ca^{2+}) ainsi qu'une détection in-situ et en temps réel de l'interaction entre la biotine et la streptavidine par une mesure du changement de la conductance d'un nanofil de silicium dopé. Une détection de l'interaction biotine/streptavidine a aussi été mise en évidence en utilisant des nanotubes fonctionnalisés [69]. Ces approches peuvent être appliquées à une détection de l'hybridation. Cette année, Hahm et al [68] ont, en effet, montré la faisabilité d'une détection spécifique et très sensible de l'hybridation de l'ADN sur des nanofils semiconducteurs. En fonctionnalisant ces nanostructures avec des acides nucléiques peptidiques (PNA)²⁵, ils rapportent une détection en temps réel de l'hybridation pour des séquences d'ADN de 30 bases jusqu'à une concentration de 10 fM. Ces méthodes utilisant des nanostructures sont extrêmement sensibles (la détection de molécules uniques ne semblant pas impossible). Mais la fabrication d'un réseau dense, ordonné de nanostructures ayant des propriétés électroniques similaires reste encore à démontrer (les tests actuels étant réalisés sur des structures uniques).

dans un électrolyte 1:1. Ces valeurs sont faiblement dépendantes du sel pour des molarités en sel comprises entre 0.1 mM et 100 mM. La charge effective déterminée à l'aide de ce modèle correspond à celle d'un polyélectrolyte supposé infiniment long et cylindrique.

²⁴Il s'agit ici d'une structure de silicium dopée similaire à une structure MOS. La variation de charge à l'interface conduit à un réarrangement des porteurs dans le silicium (déplétion ou accumulation). Cette variation dans la structure semiconductrice peut être mesurée en caractérisant la variation d'impédance de la structure semiconductrice en mode ac.

²⁵Les PNA (Peptide Nucleic Acid) sont des analogues structuraux d'oligonucléotides. Ils sont constitués d'un squelette polyamide sur lequel est greffé une base nucléique. Grâce à leur homomorphisme structurel avec l'ADN, les PNA sont capables de s'hybrider avec des séquences d'ADN et d'ARN et ceci même avec une plus grande affinité et stabilité que les complexes ADN/ADN ou ADN/ARN. De plus les PNA ont l'avantage d'être non chargés. Ils n'induisent alors aucune modification des propriétés électroniques des nanostructures lors de la fonctionnalisation.

Nous avons regroupé dans le tableau ci-dessous les sensibilités, les avantages et les désavantages des différentes techniques de détection de l'hybridation de l'ADN évoquées précédemment²⁶.

FLUORESCENCE		< attomoles		
TECHNIQUES ALTERNATIVES		sensibilité	avantages	désavantages
<u>optique (2.3.1)</u>				
SPR		20 femtomoles [42]	sans marquage, suivi en temps réel	grandes surfaces coût élevé, lecture complexe
contraste optique		3 à 100 fois [44] plus sensible que la fluorescence sur le même système biologique	lecture simple, faibles surfaces	marquage or (et argent)
<u>mécanique (2.3.2)</u>				
microbalances de quartz		10 femtomoles [46]	lecture simple, suivi en temps réel	surfaces importantes, non compatible directement avec les techniques classiques de dépôt
microleviers		80 femtomoles [50]	sans marquage, suivi en temps réel	difficilement parrallélisable
<u>électrochimiques (2.3.3) [54]</u>				
oxydation ou réduction des bases d'ADN	directe	femtomoles	sans marquage, détection sur différents supports	ne peut être parrallélisé
	indirecte	attomoles	sans marquage	substrat de sondes difficile à préparer
indicateur oxydo-reducteur		femtomoles	détection de cibles différentes	nécessite le plus souvent une modification chimique
amplification à l'aide de nanoparticules utilisant des réactions électrochimiques		femtomoles à 10 ⁻⁶ femtoles	très sensible, différents marquages possibles permettant une détection de cibles différentes sur le même capteur	nombreuses étapes, fiabilité et solidité des structures
transport de charge par l'ADN		femtomoles	sans marquage, sensible à des mésappariements, possibilité de parrallélisation	préparation biochimique de l'échantillon de cible
<u>structures semiconductrices (2.4)</u>				
passives	[64]	jusqu'à une concentration de 100 nM en cibles	sans marquage	surfaces relativement grandes comparées aux dépôts sur puces
	[66]	0.1 femtomoles	sans marquage, suivi en temps réel	surfaces non compatibles directement avec les techniques classiques de dépôt difficilement parrallélisable
actives (FET) [64]		jusqu'à une concentration de 100 nM en cibles	sans marquage, suivi en temps réel	surfaces peuvent être réduites compatible avec technologie CMOS
nanofils dopés [68]		jusqu'à une concentration de 10 fM en cibles	très sensible sans marquage	surfaces non compatibles directement avec les techniques classiques de dépôt parrallélisation à démontrer

FIGURE 2.7: Comparaison entre différentes techniques de détection de l'hybridation de l'ADN. Les valeurs de sensibilité correspondent à la sensibilité par capteur pour des oligonucléotides de 12 à 30 bases et sont donc directement comparables entre elles. 1 femtomole d'ADN double brin de 20 bases correspond à environ 13 pg.

²⁶La sensibilité par capteur n'ayant pas été caractérisée pour l'ensemble de ces techniques nous donnons aussi pour certaines de ces méthodes les concentrations en cibles limites pouvant être utilisées.

Chapitre 3

Détection de biomolécules sur des réseaux de transistors à effet de champ

3.1 Détection de charges à la surface de transistors à effet de champ

Nos expériences ont pour objectif l'étude des variations des caractéristiques électroniques d'un réseau de transistors à effet de champ induites par l'apport de biomolécules chargées à la surface de ce réseau.

Le principe de la mesure est présenté sur la figure 3.1. Chacun des trois capteurs, schématiquement représentés sur cette figure, est un transistor à effet de champ dont la structure se rapproche de celle d'un MOSFET (Metal-Oxide-Semiconductor Field Effect Transistor). Dans un substrat de silicium de type n, deux régions de type p sont localement induites par dopage. Il s'agit de la source et du drain désignés par S et D. Le substrat est recouvert par une couche d'oxyde de silicium qui est amincie entre la source et le drain. Cette région constitue la zone active du capteur. Contrairement au MOSFET, qui possède une grille métallique au dessus de la couche d'oxyde, notre capteur n'en possède pas et est mis directement en contact avec un électrolyte. On peut définir par analogie au MOSFET, notre capteur comme un EOSFET : Electrolyte-Oxide-Semiconductor FET puisque le rôle de la grille métallique est joué par l'électrolyte de mesure¹. Lorsqu'une tension positive U_{SE} est appliquée entre le substrat de silicium et une électrode de référence Ag/AgCl, il se forme une zone de déplétion sous la surface d'oxyde de silicium. Le substrat étant de type n, il y a appauvrissement en électrons (porteurs majoritaires) et enrichissement en trous (porteurs minoritaires). Si la tension U_{SE} atteint une valeur seuil $U_{SE}^{(T)}$, il se crée alors un canal d'inversion de porteurs minoritaires, c'est à dire de trous. En polarisant la source par rapport au drain (id. en appliquant une tension U_{SD}), il y a apparition d'un courant I_{SD}

¹Différents termes peuvent être employés pour qualifier ces structures. Initialement introduites par Bergveld [55] sont le nom d'ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor). Le terme EISFET (Electrolyte-Insulator-Semiconductor FET) a aussi été employé dans les références [70] et [71].

dans le canal bidimensionnel de trous. La conductivité de ce canal d'inversion dépend de l'état de charge de l'interface électrolyte/oxyde de silicium. Nous pouvons donc mesurer l'apport de biomolécules chargées à la surface du capteur en mesurant la variation du courant I_{SD} après et avant l'apport de charge.

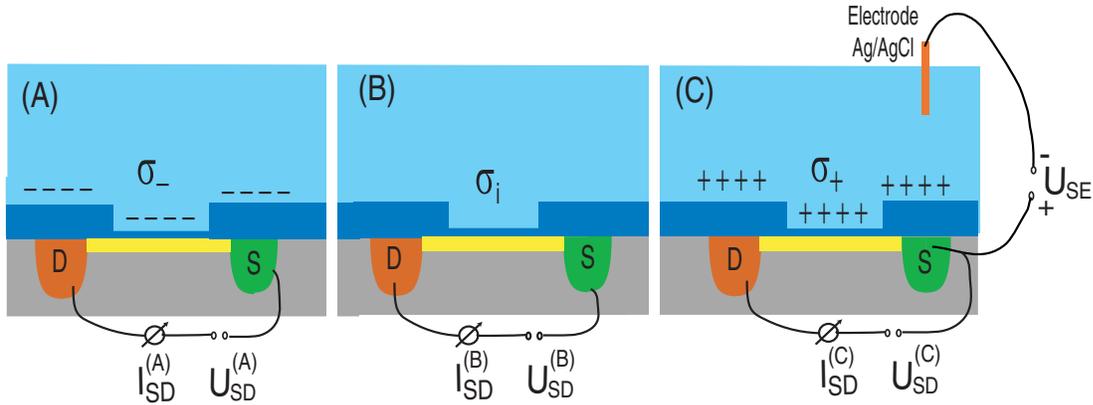


FIGURE 3.1: Schéma de principe de la mesure différentielle d'une variation de charges sur des transistors à effet de champ. (A) apport de charges négatives, (B) capteur de référence, (C) apport de charges positives.

Sur la figure 3.1 nous avons représenté trois capteurs : un sert de référence (B) (c'est l'état initial du capteur), un a vu un apport de charges positives (C) et l'autre un apport de charges négatives (A). Sans entrer dans une modélisation théorique du capteur nous pouvons prévoir l'évolution du courant dans ces deux cas :

- Lorsque l'on apporte des charges positives à l'interface celles-ci tendent à repousser les trous dans le substrat, diminuant ainsi la conductivité du canal d'inversion. Nous nous attendons donc à une diminution du courant $\Delta I_{SD} = I_{SD}^{(C)} - I_{SD}^{(B)} < 0$. A contrario, pour conserver le courant constant il faut augmenter la conductivité du canal, ceci peut être réalisé en polarisant de manière plus importante le substrat vis à vis de l'électrode. Si l'on travaille à $I_{SD} = cte$ et $U_{SD} = cte$, il faut augmenter U_{SE} : $\Delta U_{SE} > 0$.
- De manière analogue, lorsque l'on apporte des charges négatives à l'interface, celles-ci tendent à attirer les trous, augmentant ainsi la conductivité du canal. On s'attend donc à une augmentation du courant $\Delta I_{SD} = I_{SD}^{(A)} - I_{SD}^{(B)} > 0$. Si l'on veut conserver le courant constant il faut alors diminuer la tension de polarisation entre la source et l'électrode : $\Delta U_{SE} < 0$.

Un point important de notre méthode est l'utilisation d'un réseau de capteurs. Ceci permet une mesure différentielle entre une région sur laquelle ont été déposées les biomolécules et une région sans biomolécules. En mesurant les différences de courant entre ces deux zones, on limite les variations du signal mesuré dues à d'autres effets (changement de pH, salinité).

3.2 Structures des transistors à effet de champ

Grâce à une collaboration avec l'équipe de P. Fromherz du Max-Planck-Institut *für* Biochemie (Martinsried, Allemagne) nous avons pu utiliser deux types de structures, l'une possédant 96 transistors et l'autre possédant 62 transistors. Ces deux structures n'ont pas été développées spécifiquement pour notre expérience, mais ont été fabriquées pour une étude électronique de l'activité électrique de neurones greffés sur des transistors à effet de champ [72, 73]. Les protocoles de fabrication de ces deux structures sont décrits dans [74] et [75]. Bernard Straub qui nous a fourni le réseau de 96 transistors, s'est intéressé à l'étude du couplage direct entre des canaux ioniques et un transistor à effet de champ [76, 77]. Le transport actif d'ions à travers des canaux ioniques d'une cellule unique greffée sur un FET engendre une différence de concentration ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et, conduit à un potentiel extracellulaire entre la cellule et la puce qui modifie le courant source-drain du transistor. Günther Zeck qui a préparé la structure de 62 transistors, a caractérisé l'interface complexe entre des réseaux neuronaux et une puce de silicium [75, 62]. Une paire de neurones a ainsi été interfacée électroniquement sur ce "chip" pour permettre la stimulation et la détection. Une tension peut être appliquée au premier neurone par un stimulateur capacitif de la puce électronique. Le signal est alors transmis dans le réseau neuronal et provoque un potentiel d'action au niveau du second neurone. La génération de ce potentiel d'action est détectée par une modulation du courant source-drain d'un transistor se trouvant sous le second neurone.

Les deux types de réseaux sont fabriqués sur des plaquettes de silicium de 12 mm * 12 mm. Ces structures sont du type EOSFET (voir 3.1), avec un substrat dopé-n et un canal d'inversion de trous. Les transistors sont en montage source commune, c'est à dire que l'ensemble des transistors possède une source au même potentiel. Les structures sont collées sur un socle en céramique possédant des connecteurs en or. Les "bondings" entre les contacts métalliques sur le substrat et les connecteurs en or du socle sont réalisés en aluminium. Un bassin en polypropylène est collé sur le support en céramique pour permettre de déposer l'électrolyte de mesure en isolant les contacts. L'épaisseur de l'oxyde aminci au niveau de la zone active du capteur est identique pour les deux structures et a une valeur de $d_{ox} = 10 \text{ nm}$.

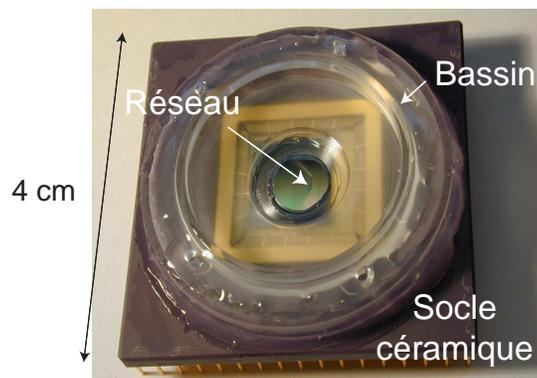


FIGURE 3.2: Photographie du réseau de 96 transistors avec son support de céramique et son bassin en plexiglas.

Pour réaliser l'ensemble des expériences présentées dans cette thèse, nous avons utilisé 8 structures de 96 transistors et 10 structures de 62 transistors. Ces structures doivent être nettoyés

entre chaque expérience pour supprimer l'ensemble des molécules organiques déposées à la surface des transistors. Nous les nettoyons d'abord deux fois à l'acide sulfochromique pendant deux minutes. Nous utilisons ensuite une solution de soude/éthanol ($60 \mu\text{l NaOH 16N}$, $220 \mu\text{l H}_2\text{O}$, $420 \mu\text{l}$ éthanol) que nous laissons en incubation pendant cinq minutes à la surface des transistors. Nous rinçons ensuite les FETs avec de l'eau déionisée, et finalement nous les séchons sous un jet d'air comprimé. Au bout d'un certain temps, les structures se détériorent. En particulier la colle époxy permettant la fixation du bassin se dissout progressivement. De même la surface d'oxyde s'abîme probablement et la stabilité des caractéristiques des transistors s'en trouve progressivement diminuée. Cependant, les structures s'avèrent être réutilisables dans de bonnes conditions de stabilité environ une trentaine de fois.

Ces structures nous ont permis de valider la possibilité de la détection envisagée. Récemment, notre équipe a commencé une collaboration avec le LPN (Marcoussis) dans le but de disposer de structures supplémentaires et d'optimiser celles-ci en fonction de nos besoins.

3.2.1 Réseau de 96 transistors

Le premier réseau possède 96 transistors linéairement espacés de $21 \mu\text{m}$, soit une longueur totale d'environ 2 mm pour l'ensemble du réseau. Les connecteurs de drains ainsi que ceux de la source commune (deux connecteurs pour la source) sont réalisés directement dans le substrat de silicium par implantation de bore p^+ . La géométrie des connecteurs est représentée sur la figure 3.3. Le calcul des résistances en série, induites par ces connexions, peut être effectué en considérant leur géométrie (voir appendice B.2.1) ou en ajustant les caractéristiques expérimentales des transistors (voir appendice B.2.2). La détermination de ces résistances est nécessaire pour réaliser la correction des caractéristiques mesurées (voir 3.3.2).

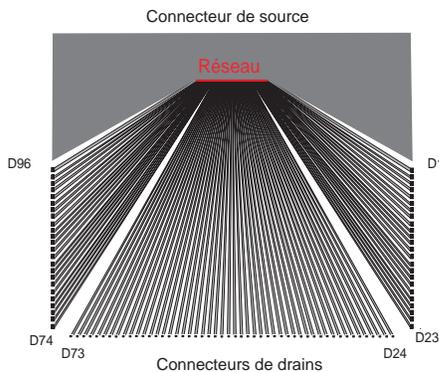


FIGURE 3.3: Réseau linéaire de 96 transistors (rouge) avec ses connecteurs de drains [1 ; 96] (gris clair) et la source commune (gris foncé).

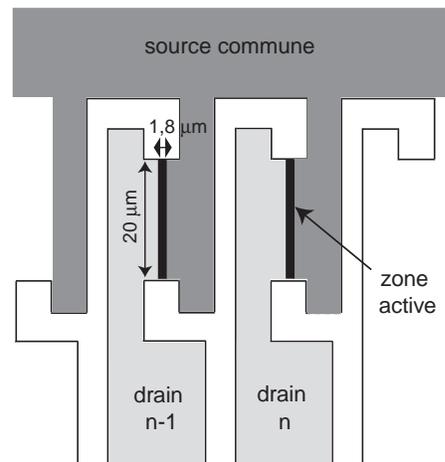


FIGURE 3.4: Détail de la structure de deux transistors du réseau de 96 transistors. Surface de la zone active $36 \mu\text{m}^2$. Les zones en blanc correspondent aux régions non implantées.

La géométrie latérale des transistors est représentée sur la figure 3.4. Leur zone active est de $1,8 \mu\text{m}$ de longueur sur $20 \mu\text{m}$ de largeur.

3.2.2 Réseau de 62 transistors

La structure de ce réseau comprend 62 transistors répartis sur deux lignes parallèles. Ces lignes sont espacées de $500 \mu\text{m}$ l'une de l'autre et possèdent chacune 31 transistors. Comme pour le réseau de 96 transistors, les connexions des drains et de la source commune sont réalisées par dopage dans le substrat de silicium. La géométrie générale du réseau est représentée sur la figure 3.5. Il existe sur chaque ligne deux types de transistors possédant des zones actives de dimensions différentes (figure 3.6) :

- le premier type de capteur possède une zone active de longueur $L = 4 \mu\text{m}$ et de largeur $l = 10 \mu\text{m}$. Il y a 24 transistors de ce type pour chaque ligne de transistors (31 transistors).
- le second type de transistor possède une zone active de $3 \mu\text{m}$ de longueur sur $8 \mu\text{m}$ de largeur. Ces capteurs sont au nombre de 7 par ligne de transistors, et sont répartis tous les quatre transistors le long du réseau.

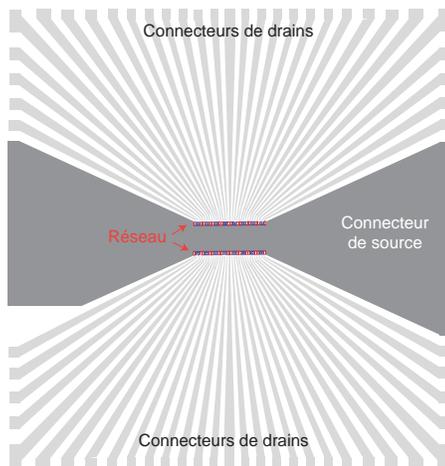


FIGURE 3.5: Réseau de 62 transistors (rouge). Les deux lignes de 31 transistors ont une longueur de $1,5 \text{ mm}$ et sont espacées de $500 \mu\text{m}$. Les connecteurs de drains sont représentés en gris clair et le connecteur de source en gris foncé.

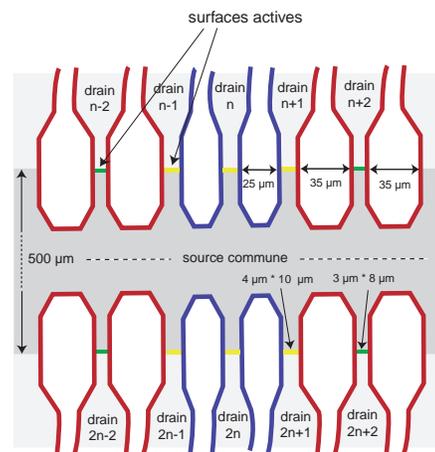


FIGURE 3.6: Détail de la géométrie du réseau de 62 transistors. Les deux types de transistors sont représentés. (1) : $L = 4 \mu\text{m}$ et $l = 10 \mu\text{m}$. (2) : $L = 3 \mu\text{m}$ et $l = 8 \mu\text{m}$.

3.3 Principe de la mesure électronique

3.3.1 Dispositif électronique de mesure

Le dispositif expérimental de mesure est schématiquement représenté sur la figure 3.7. L'électronique de mesure est la même pour tous les transistors du réseau. Un premier étage permet de polariser un transistor unique et de mesurer le courant source-drain correspondant. La mesure de l'ensemble du réseau est assurée par multiplexage via des unités de commutations qui permettent de mesurer chaque transistor l'un après l'autre.

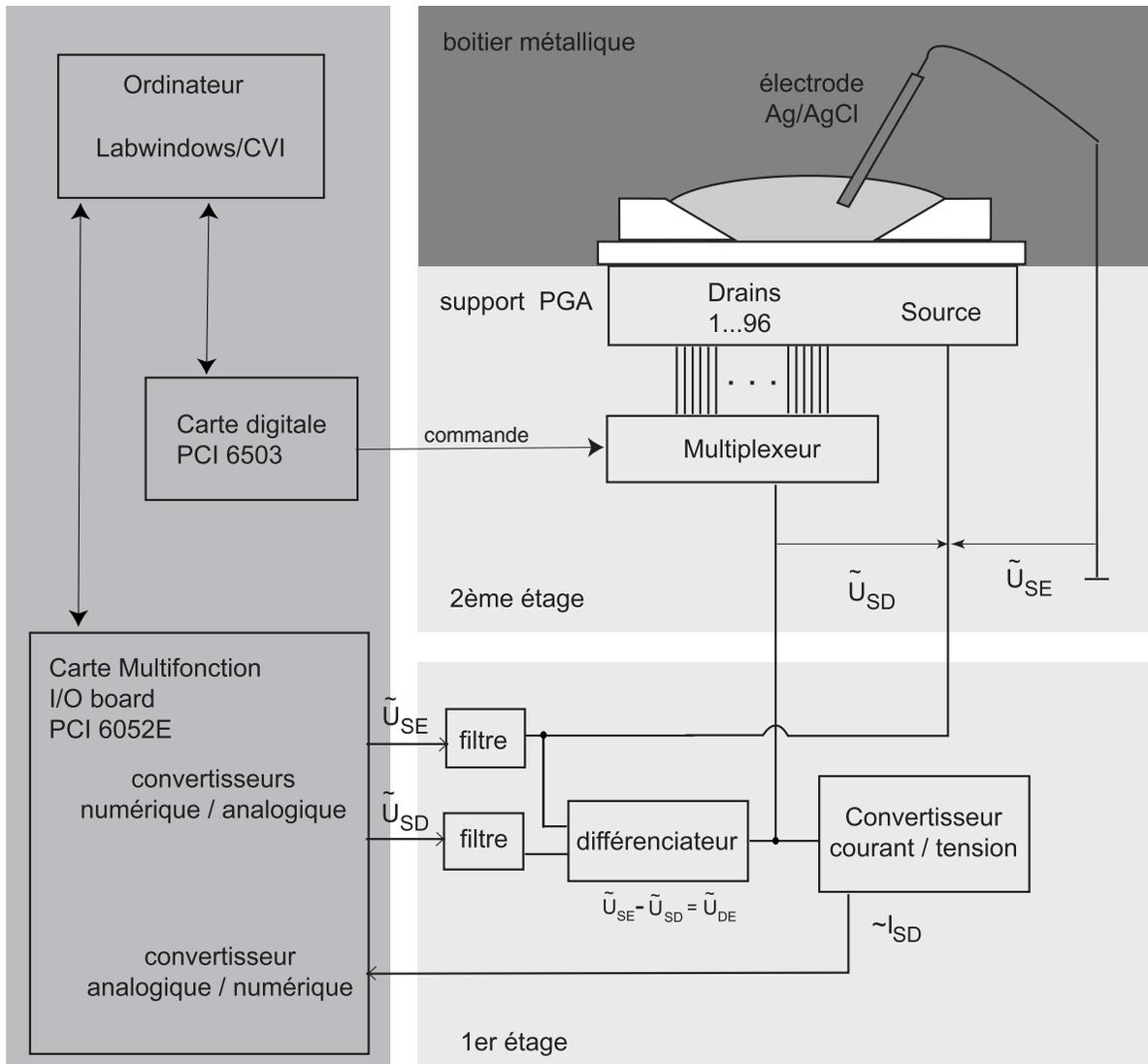


FIGURE 3.7: Schéma de principe de l'électronique de mesure.

Le premier étage permet de mesurer la caractéristique $I_{SD}(\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD})$ pour un transistor donné. Les tensions de polarisation \tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD} sont générées par une carte digitale/analogique (PCI 6052E) et sont filtrées à l'entrée du premier étage de la carte électronique pour diminuer le bruit induit par l'environnement du PC. Le circuit analogique possède un différenciateur qui permet de référencer les potentiels du drain et de la source par rapport à celui de l'électrode (on impose respectivement la tension \tilde{U}_{SE} à la source et la tension \tilde{U}_{DE} au drain). Le courant de drain est converti en tension par un convertisseur courant-tension et est mesuré par une voie analogique/digitale² de la carte PCI utilisée pour générer les tensions d'entrée (PCI 6052E).

²La carte possède un convertisseur 16 bits assurant une résolution d'une dizaine de pA, bien au-dessus des variations temporelles de l'électronique analogique, de l'ordre de quelques dixièmes de μA .

Au niveau du second étage de la carte électronique, un support PGA à force d'insertion nulle permet d'enficher et de connecter les réseaux de transistors. Cet étage possède un ensemble de commutateurs mécaniques et analogiques permettant d'adresser successivement l'ensemble des 62 ou 96 transistors de chaque réseau. Les opérations de commutation sont contrôlées par des voies digitales d'une seconde carte PCI (PCI 6503). Le réseau ainsi que le second étage de mesure sont placés dans un boîtier métallique assurant une isolation électronique et lumineuse de l'échantillon à mesurer.

L'acquisition des caractéristiques $I_{SD}(\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD})$ associées à chaque transistor du réseau est contrôlée par un programme écrit sous l'environnement LabWindows CVI. Ce programme génère des rampes de tension pour \tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD} . A chaque point de polarisation, c'est à dire pour chaque couple de tension (\tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD}), le courant source-drain mesuré est moyenné sur une durée d'environ 3 ms (1000 points de mesure). Lorsque l'ensemble des caractéristiques a été enregistré pour un transistor donné, on passe au transistor suivant en contrôlant le multiplexeur. Le temps de mesure complet du réseau dépend de la densité de points de polarisation souhaitée, typiquement entre 5 et 15 minutes³. Le dispositif de mesure électronique a été développé au LPMC en collaboration avec David Darson.

3.3.2 Caractéristiques des transistors et corrections

Typiquement nous faisons varier les tensions de polarisation \tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD} par pas de 0.1 V dans l'intervalle [0V;2V] pour le réseau de 96 FETs (et [0V;3V] pour le réseau de 62 FETs). La figure 3.8 représente les caractéristiques I_{SD} en fonction de \tilde{U}_{SE} mesurées pour différentes tensions \tilde{U}_{SD} pour un transistor donné du réseau de 96 FETs.

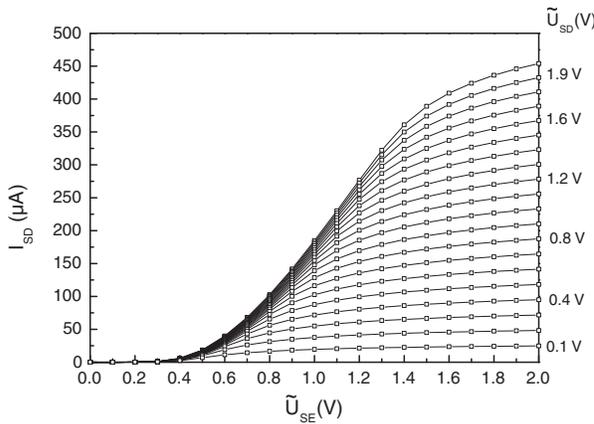


FIGURE 3.8: Caractéristiques mesurées $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE})$ pour différents \tilde{U}_{SD} (pour un transistor du réseau de 96 FETs).

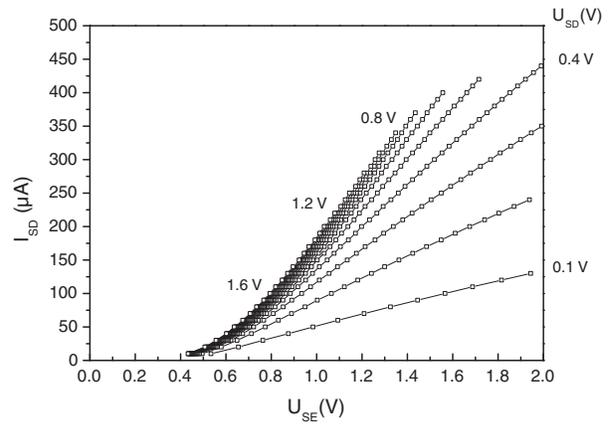


FIGURE 3.9: Caractéristiques corrigées $I_{SD} = f(U_{SE})$ pour différents U_{SD} . (à partir des caractéristiques de la figure 3.8).

³Par exemple les variations de \tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD} par pas de 0.1 V sur l'intervalle [0;2V] représentent 400 points de polarisations par transistor soit 38 400 points de mesure pour le réseau complet (de 96 transistors). L'ensemble de ces points de mesure peuvent être obtenus en 15 minutes.

Avant étudier les variations des caractéristiques des transistors lors d'un apport de charge, nous devons corriger les caractéristiques mesurées pour tenir compte des résistances en série engendrées par les connexions implantées dans le substrat entre les connecteurs métalliques et les transistors. Les tensions réellement imposées au niveau des transistors (U_{SE} et U_{SD}) se déduisent de celles au niveau des connecteurs métalliques (\tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD}) en retranchant les tensions aux bornes des résistances en série. Nous réalisons cette correction à l'aide d'un programme écrit sous l'environnement LabWindows CVI. Ce programme permet par interpolation de passer des caractéristiques bidimensionnelles mesurées $I_{SD}(\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD})$ aux caractéristiques corrigées $I_{SD}(U_{SE}, U_{SD})$ pour l'ensemble du réseau. La figure 3.9 représente les caractéristiques corrigées d'un transistor : $I_{SD} = f(U_{SE})$ pour différentes tensions U_{SD} obtenues à partir des caractéristiques mesurées de la figure 3.8. La méthode de correction nécessite une détermination préalable des valeurs des résistances en série. La détermination de ces résistances ainsi qu'une analyse détaillée de leur influence sur les caractéristiques sont données dans l'appendice B.

3.3.3 Etude des variations du courant (ΔI_{SD}) ou de la tension (ΔU_{SE}) lors d'un apport de charge : deux méthodes d'analyse

Deux possibilités peuvent être envisagées pour analyser la variation des caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE}, U_{SD})$ lors d'un apport de charge (figure 3.10). La première, directe, consiste à calculer pour un point de fonctionnement (U_{SE}, U_{SD}) donné, la différence entre les courants I_{SD} mesurés après et avant l'apport de charge (variation du courant ΔI_{SD}). Dans la seconde méthode, on détermine la variation de la tension ΔU_{SE} due à l'apport de charge en interpolant les caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE})$ pour une tension U_{SD} donnée et une valeur constante du courant I_{SD} .

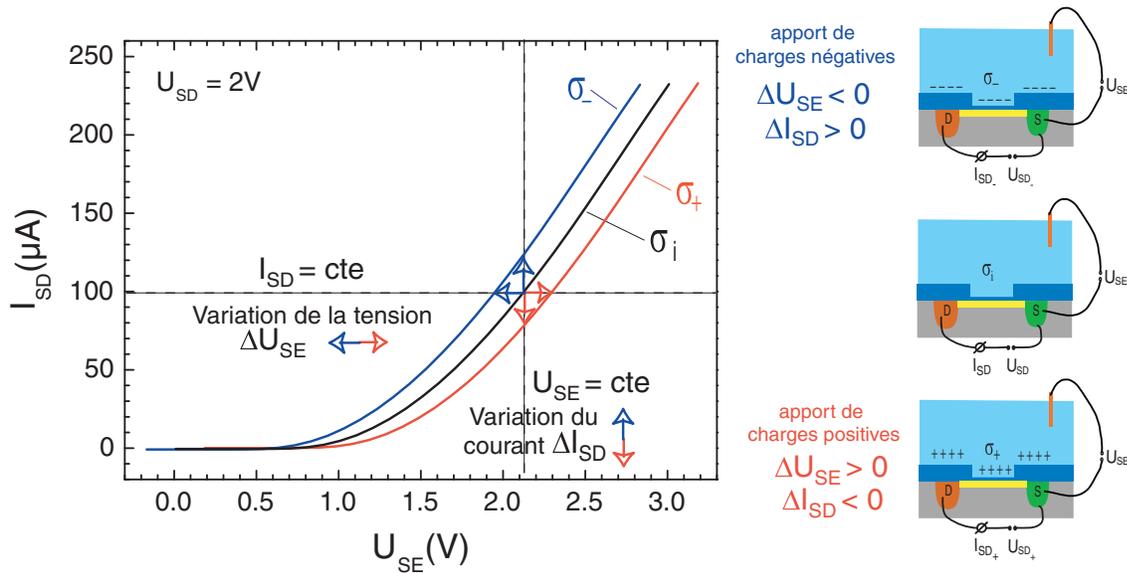


FIGURE 3.10: Modification des caractéristiques des transistors lors d'un apport de charges (positives et négatives) : interprétation en terme de variation de courant et de tension.

Pour un apport de charges positives, nous nous attendons comme cela a été discuté au paragraphe 3.1 à une diminution du courant ($\Delta I_{SD} < 0$) et une augmentation de la tension ($\Delta U_{SE} > 0$); l'effet inverse ($\Delta I_{SD} > 0$ et $\Delta U_{SE} < 0$) est attendu pour un apport de charges négatives. Nous verrons au chapitre 4.2 un exemple de ces deux méthodes d'analyse dans le cas d'un apport de charges positives pour une expérience modèle. C'est la méthode de variation de tension (ΔU_{SE}) qui sera ensuite conservée pour l'analyse de nos résultats.

3.4 Dépôt des solutions étudiées

Nous utilisons deux méthodes différentes pour le dépôt des solutions à mesurer sur le réseau de transistors. L'une consiste à déposer des micro-gouttelettes de volume inférieur au nanolitre à l'aide de micropointes; nous parlerons dans ce cas de microdépôts. L'autre consiste à incuber des gouttes de volume de l'ordre du dixième de microlitre à l'aide d'une micropipette manuelle et nous parlerons alors de macrodépôts.

3.4.1 Microdépôts

Pour réaliser le dépôt de micro-gouttelettes à la surface du réseau de transistors, nous utilisons les micropointes développées pour le dépôt des sondes dans la technique des puces à ADN. Ces pointes métalliques possèdent une extrémité conique munie d'une fente dont la taille caractéristique est de l'ordre de $40 \mu m$. L'obtention des microdépôts se décompose en deux étapes distinctes (figure 3.11). La première étape consiste à remplir la cavité centrale avec la solution de dépôt. Ceci s'effectue par capillarité en amenant la micropointe au contact d'une goutte macroscopique de ce liquide (environ $1 \mu l$). Chaque microgoutte est alors obtenue par contact mécanique entre la pointe et la surface.

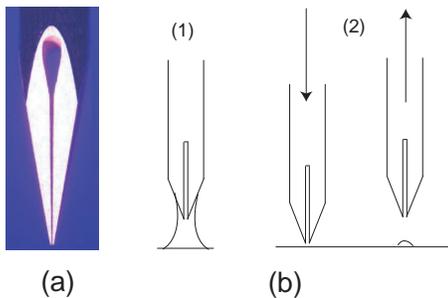


FIGURE 3.11: (a) photographie d'une pointe.
(b) principe du microdépôt.

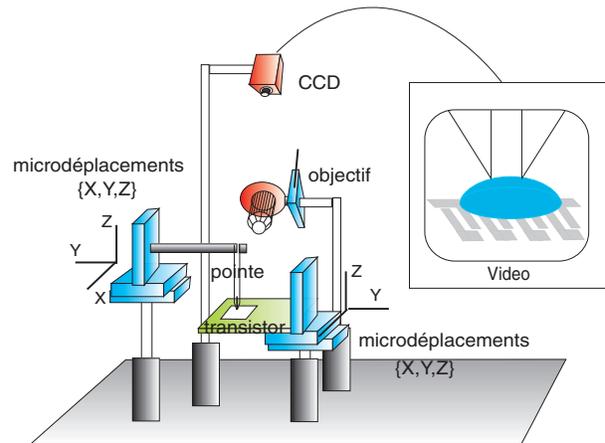


FIGURE 3.12: Montage de microdépôt

Contrairement aux expériences de puces à ADN où le dépôt des sondes s'effectue sur des lamelles de taille standardisée et où la zone des dépôts n'a pas à être localisée de manière absolue (ce qui permet l'utilisation de robots) il est pour nous impératif de pouvoir déposer nos micro-gouttelettes sur le réseau de transistors. Nous avons construit au laboratoire un "spotteur"

manuel qui permet de déposer les solutions à un endroit prédéterminé avec une précision de l'ordre de quelques micromètres par visualisation à l'aide d'un objectif et d'une caméra CDD.

Le montage expérimental nécessaire aux dépôts des gouttelettes est représenté sur la figure 3.12. La pointe est fixée sur un support muni de vis micrométriques assurant un déplacement dans les trois dimensions de l'espace. On peut ainsi amener la pointe au niveau de la focale d'un objectif de microscope (olympus 4X). La micropointe peut être visualisée à l'aide d'une caméra CCD alignée sur l'axe optique de cet objectif incliné à une distance d'environ 30 cm. Après avoir obtenu l'image de l'extrémité conique de la pointe en réglant sa position avec le système de microdéplacements, la pointe est maintenue immobile au cours du dépôt et c'est l'échantillon qui est déplacé et mis en contact avec la pointe. Pour ce faire, le réseau de transistors est déposé sur une plaque munie de microdéplacements permettant de déplacer l'échantillon selon trois axes avec une précision suffisante pour mettre en contact la surface avec la pointe au niveau d'un transistor donné du réseau. Nous pouvons, en effet, grâce à la visualisation inclinée, voir à la fois l'extrémité de la pointe et la surface de la puce électronique⁴ et il nous suffit donc de déplacer et de rechercher le transistor souhaité en observant l'image sur l'écran vidéo. L'utilisation d'un objectif 4X assure un grossissement suffisant pour observer distinctement chaque transistor du réseau et sa longue distance focale (environ 4 cm) permet de déplacer, sans contrainte, l'échantillon sous ce dispositif.

Entre chaque dépôt de solutions différentes, la pointe est démontée de son support et nettoyée par 4 bains successifs de 30 secondes dans un sonicateur contenant une solution de rinçage⁵. Après un bain final dans de l'eau déionisée, la pointe est séchée sous un jet d'air chaud et peut de nouveau être utilisée.

Les ordres de grandeurs des volumes déposés ainsi que les diamètres moyens des microdépôts dépendent de la pointe choisie. Nous avons utilisé trois types de pointes différentes dont les caractéristiques sont répertoriées dans le tableau suivant :

pointe	diamètre moyen	volume déposé	volume pipeté	fournisseur
Microquill 2000	100 μm	0,5 nl	0,4 μl	Majer Precision[79]
SMP3B	110 μm	0,9 nl	0,6 μl	Telechem[78]
SMP8B	295 μm	3,7 nl	0,6 μl	Telechem

TABLEAU 3.1: Spécifications des micropointes utilisées. Les diamètres moyens de dépôt dépendent de la mouillabilité de la surface.

Les deux premières pointes servent exclusivement pour l'échantillon de 96 transistors. Elles permettent de déposer entre 6 et 8 gouttelettes distinctes sur ce réseau. La figure 3.13 montre une image d'un dépôt de quatre micro-gouttelettes sur une partie du réseau. La taille d'un dépôt étant de l'ordre de 100 μm , chaque gouttelette recouvre environ cinq transistors. La dernière pointe qui permet un dépôt de diamètre plus grand, peut être utilisée indifféremment pour les deux réseaux. Le dépôt ($\sim 300 \mu m$) recouvre alors une quinzaine de FETs pour le réseau de 96 transistors et seulement 4 à 5 FETs pour le réseau de 62 transistors.

⁴L'objectif 4X utilisé possède en effet une profondeur de champ de l'ordre d'une dizaine de microns suffisante pour observer à la fois la pointe et la structure de transistors.

⁵Micro Cleaning Solution, Catalog # MCS-1, ArrayIt [78].

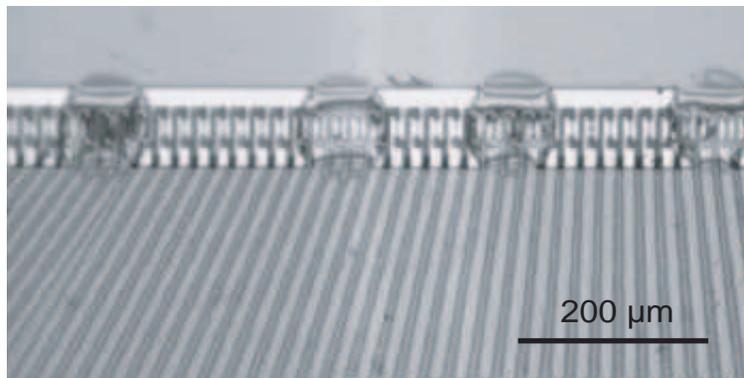


FIGURE 3.13: Microdépôts sur un réseau de 96 transistors.

3.4.2 Macro-dépôts

Nous avons aussi employé une méthode de macrodépôt sur le réseau de transistors. Les "macro-gouttes" ont un volume de l'ordre de $0,2 \mu\text{l}$ et sont déposées sur une extrémité du réseau de façon à couvrir quelques dizaines de transistors. Les dépôts s'effectuent manuellement à l'aide d'une pipette pouvant pomper un volume maximum de $2,0 \mu\text{l}$. Sur un réseau linéaire de transistors il est possible de déposer deux macro-gouttes (figure 3.14) et de comparer ainsi directement et dans les mêmes conditions expérimentales une solution contenant des biomolécules et une solution référence qui n'en contient pas. Le volume relativement important des macro-gouttes permet d'éviter le séchage des dépôts même pour des incubations longues (supérieures à 15 minutes en chambre humide).

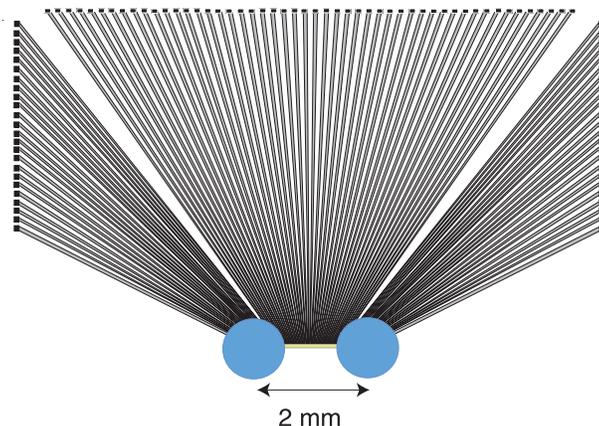


FIGURE 3.14: Macro-dépôts sur un réseau de 96 transistors. Voir la figure 6.9 du chapitre 6.2 pour un schéma d'un dépôt de 4 macro-dépôts sur l'échantillon de 62 transistors.

Chapitre 4

Détection électronique de la polylysine

Nos premières études sur transistors ont porté sur une détection électronique de l'adsorption d'un biopolymère : la polylysine. Nous avons choisi ce biopolymère pour deux raisons. D'une part, du fait de sa charge positive, il constitue un polymère modèle pour l'étude de l'effet de champ induit par l'adsorption de molécules positives à la surface des structures de transistors. D'autre part, la polylysine, qui a la propriété de s'adsorber fortement sur des surfaces d'oxyde de silicium négativement chargées, est couramment utilisée pour la fixation des ADN sondes dans la technologie des puces à ADN.

Après avoir introduit la structure de la polylysine et ses applications pour la technologie des biopuces, nous décrirons les études effectuées sur ce biopolymère : détection, reproductibilité, variation de concentration en biopolymère déposé, variation en sel de l'électrolyte de mesure et enfin les incubations globales du réseau pour la fixation future des ADN sondes.

4.1 La polylysine, un polymère positivement chargé permettant la fixation de l'ADN

4.1.1 Structure de la molécule

La polylysine est un polymère dont le motif monomérique est la lysine, un des 20 acides aminés entrant dans la composition des protéines. Les liaisons covalentes entre monomères sont des liaisons peptidiques. La charge de la polylysine est essentiellement due aux groupes amines NH_2 (un groupe par monomère) qui, à pH neutre, sont positivement chargés en solution (couple $R - NH_3^+ / R - NH_2$, $pK_a = 10,2$ le long de la chaîne latérale).

La solution de polylysine utilisée pour l'ensemble de nos expériences est le produit couramment choisi dans les protocoles de puces à ADN¹. Bien que la longueur des chaînes peptidiques ne soit pas monodisperse dans cette solution, nous pouvons néanmoins déterminer la concentra-

¹Poly-(L)-lysine : P8920, Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA.

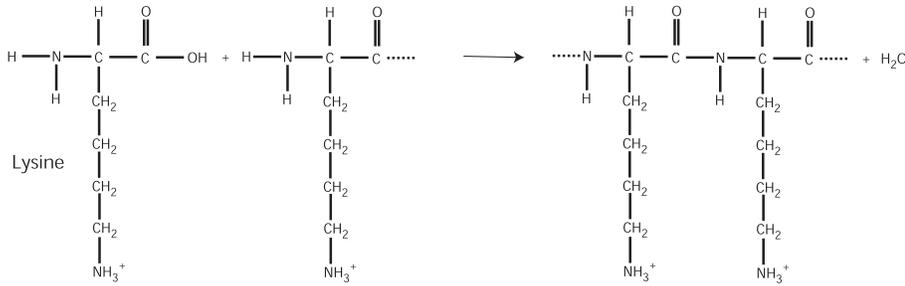


FIGURE 4.1: Structure chimique de la lysine et réaction peptidique entre monomères conduisant à la formation d'un polypeptide : la polylysine.

tion en monomères pour les solutions utilisées dans nos expériences. La solution de base dont la concentration sera notée c_0 dans la suite, est une dilution de la solution commerciale à 0.01% w/v ($\equiv 0.1\text{mg/ml}$) dans un tampon phosphate (PBS 0.1X)². La concentration en monomères lysine est d'environ 800 μM pour cette dilution.

4.1.2 Un fixateur pour les ADN sondes

Bien qu'il existe de nombreuses méthodes différentes pour greffer les ADN sondes dans la technologie des puces à ADN, la fixation électrostatique via la polylysine fut une des premières stratégies envisagées. L'équipe de Pat Brown, à Stanford a développé cette méthode dont on peut trouver les protocoles dans [80],[24] et [25]. Le principe de cette fixation est basé sur la charge positive de la polylysine. La première étape consiste à fixer la polylysine sur la surface de verre. A pH neutre ou basique, le verre est négativement chargé car une partie des groupes silanols (SiOH) sont dissociés (SiO^-). La présence des groupements (SiO^-) à la surface du verre, ainsi que les groupements positivement chargés (NH_3^+) de la polylysine, permettent d'immobiliser de manière électrostatique une couche de ce polymère à la surface du verre. L'oxyde de silicium possédant similairement au verre des groupements silanols ionisés, la fixation d'une couche de polylysine peut donc être réalisée de manière équivalente sur les réseaux de transistors à effet de champ. La seconde étape du protocole correspond à la fixation des ADN sondes sur cette couche positive. Cette fixation est, elle aussi, assurée par des interactions électrostatiques entre les groupements amines positifs de la polylysine et les groupements phosphates négativement chargés le long de l'ADN³.

Ce type de fixation est encore utilisé par de nombreuse équipes, bien qu'il soit de plus en plus remplacé par des fixations covalentes via une silanisation du verre et des modifications sur l'ADN. Parallèlement aux études électroniques, nous avons développé une telle fixation en utilisant des ADN "présilanisés" dont nous décrirons les résultats dans le chapitre 7.1.

²dilution par 100 d'une solution de PBS 10X (15 ml H_2O , 5.8 ml Na_2HPO_4 1M, 4.2 ml NaH_2PO_4 1M, 75 ml NaCl 2M, pH=7)

³Une étape postérieure au dépôt des ADN sur la polylysine permet de rendre cet attachement partiellement covalent. Un rayonnement UV (60mJ, Stratalinker) est appliqué sur la lamelle de verre pendant quelques minutes. Bien que n'étant pas essentielle, cette étape permet d'accroître la quantité d'ADN sonde fixé dans chaque dépôt, en particulier pour de faibles concentrations des solutions de dépôts, selon [80]. Cette étape n'étant pas indispensable nous ne l'avons pas utilisé lors de nos études sur la détection électronique de l'ADN simplifiant ainsi au maximum le protocole de fixation des sondes sur la polylysine.

4.2 Variation de courant (ΔI_{SD}) et de tension (ΔU_{SE}) pour une expérience modèle

L'adsorption électrostatique de polylysine sur la surface d'un transistor est équivalente à un apport de charges positives proche de la surface et conduit à une modification des caractéristiques en continu (dc) des transistors. Deux méthodes peuvent être utilisées pour analyser la variation des caractéristiques des transistors (cf. chapitre 3.3.3). Nous présentons dans ce paragraphe les deux méthodes d'analyse des caractéristiques des transistors : en terme de "variation de courant ΔI_{SD} " et de "variation de tension ΔU_{SE} " pour une expérience représentative de la détection de microgouttelettes de polylysine adsorbées sur un réseau linéaire de 96 transistors.

Après avoir préparé le capteur électronique, conformément au protocole de nettoyage décrit dans le chapitre 3.2, nous mesurons une première fois les caractéristiques de l'ensemble des transistors du réseau. Nous rinçons ensuite la structure à l'eau déionisée⁴ et nous la mesurons une deuxième fois. La différence entre ces deux mesures nous donne alors une référence de variation pour le réseau avant l'apport de polylysine. Nous déposons ensuite une solution de polylysine de concentration de référence c_0 à la surface du réseau à l'aide du montage de microdéposition locale (cf. chapitre 3.4) au niveau des drains 67, 77 et 90. Après 15 minutes en atmosphère humide, le réseau est séché au four pendant 5 minutes à 50°C. La structure est ensuite rincée avec de l'eau déionisée puis séchée avec de l'air comprimé et mesurée une nouvelle fois. L'électrolyte utilisé pour l'ensemble des mesures électroniques de cette expérience est une solution de KCl de concentration 0.1 mM.

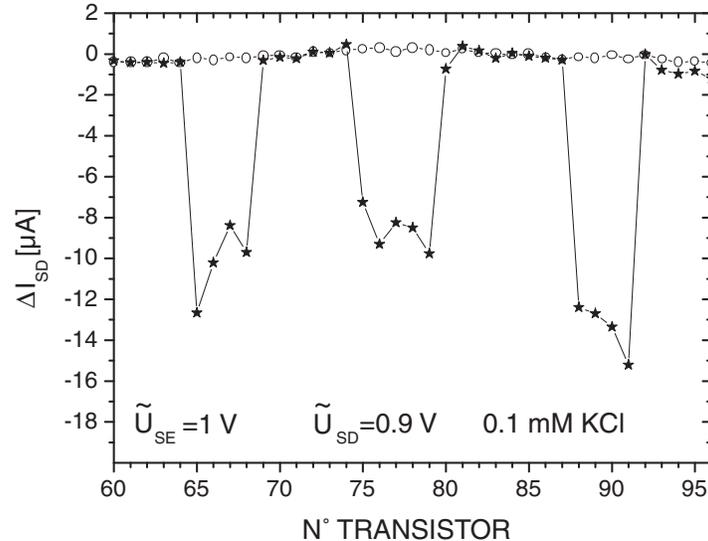


FIGURE 4.2: Variation du courant I_{SD} pour un dépôt de 3 gouttelettes de polylysine en fonction du numéro de transistor. Les cercles représentent la variation entre les deux mesures effectuées avant le dépôt de polylysine. Les étoiles représentent la variation entre une mesure après le dépôt et une mesure avant le dépôt de polylysine. La variation est calculée pour $\tilde{U}_{SE} = 1V$ et $\tilde{U}_{SD} = 0.9V$. Pour ce point de fonctionnement les courants mesurés sont compris entre 130 μA et 180 μA .

⁴Sans précision complémentaire les rincages s'effectuent toujours avec de l'eau déionisée.

La figure 4.2 représente les variations de courant pour la partie du réseau où se trouvent les dépôts et pour un point de fonctionnement particulier. La courbe représentée par les cercles correspond à la différence de courant entre les deux mesures effectuées avant le dépôt de polylysine. Elle nous permet de calculer une référence de variation de courant pour les drains représentés (de 60 à 96) : $\Delta I_{SD} = 0.1\mu A \pm 0.2\mu A$. La courbe en étoile représente la différence de courant entre la mesure effectuée après le dépôt et la mesure effectuée avant le dépôt. Elle présente trois pics centrés autour des transistors 67, 77 et 89. Ces transistors sont ceux qui ont été exposés à la polylysine lors du dépôt. Chaque pic comporte 4 ou 5 points et ceci est bien corrélé à la dimension des microdépôts. En effet, la pointe utilisée (SMP3, cf chapitre 3.4) permet de déposer des gouttelettes de $100\mu m$ de diamètre qui recouvrent donc environ 4 à 5 transistors. La variation est négative ce qui signifie une diminution du courant lors de l'apport de polylysine. Ceci est en accord avec l'apport de charges positives au niveau de la surface des FETs : répulsion des porteurs (trous) dans le substrat, donc diminution de la conductivité et chute du courant I_{SD} . Les variations de courant observées sont de l'ordre de 10 à $15\mu A$, mais ces variations sont dépendantes du point de fonctionnement choisi (ici $\tilde{U}_{SE} = 1V$ et $\tilde{U}_{SD} = 0.9V$).

La deuxième approche consiste à étudier la variation du potentiel U_{SE} . Nous pouvons par l'intermédiaire de notre programme de correction, calculer l'évolution de cette tension U_{SE} pour un courant I_{SD} fixe et une tension U_{SD} donnée.

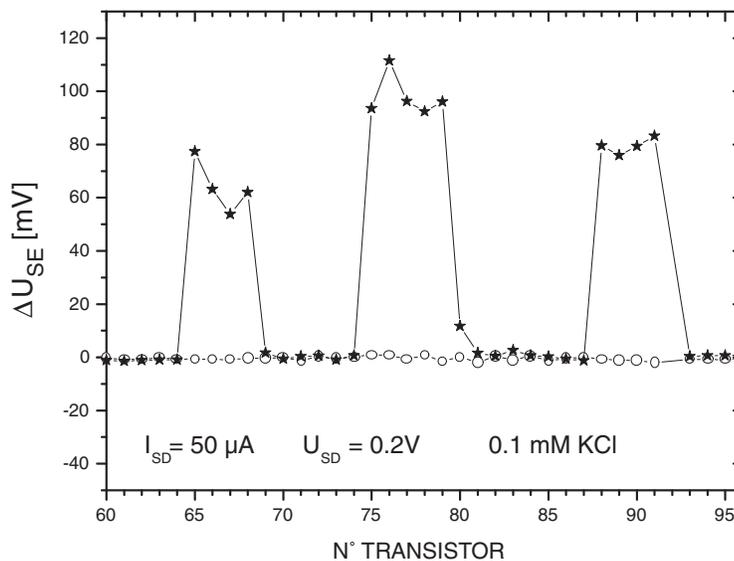


FIGURE 4.3: Variation de la tension U_{SE} en fonction du numéro de drain. Les cercles représentent la variation pour un rinçage avant le dépôt de polylysine. Les étoiles représentent la variation entre une mesure après le dépôt et une mesure avant le dépôt de polylysine. La variation est calculée pour $I_{SD} = 50\mu A$ et $U_{SD} = 0.2V$

La figure 4.3 représente l'évolution de la variation de tension (ΔU_{SE}) en fonction du numéro de transistor. La courbe de référence présentant les variations ΔU_{SE} du réseau avant le dépôt (courbe représentée par des cercles) montre une faible variation du potentiel U_{SE} : $\Delta U_{SE} = 0,5 \pm 0,7mV$. Pour la courbe en étoile, correspondant à la variation de tension après le dépôt, nous retrouvons les mêmes pics centrés au niveau des drains 67, 77 et 89. La tension U_{SE}

augmente lors de l'apport d'une couche de polylysine : sa variation est, pour cette expérience, de l'ordre de 60 mV à 80 mV.

4.3 Reproductibilité des mesures

L'expérience décrite précédemment est représentative des résultats obtenus sur la détection de polylysine. Avant d'étudier les variations de concentration en polylysine (4.4) ainsi que l'influence de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure (4.5), nous avons regroupé dans cette partie l'ensemble des résultats relatifs à la détection de microdépôts de concentration de référence c_0 en polylysine.

4.3.1 Ensemble statistique et moyennage des pics

Nous avons réalisé 20 expériences en utilisant des structures de transistors différentes et diverses micropointes. Plusieurs microgouttelettes ayant parfois été déposées par structure, les données collectées représentent un ensemble de 35 microdépôts de polylysine de concentration c_0 .

Pour étudier statistiquement l'ensemble de ces expériences, il faut déterminer une méthode générale d'analyse du signal électronique correspondant à un microdépôt. Le choix de la méthode d'analyse doit être identique pour les deux réseaux (62 et 96 transistors), l'ensemble des micropointes et doit représenter de manière correcte l'intensité par dépôt. Un microdépôt recouvrant plusieurs transistors, le pic électronique correspondant à chaque dépôt est donc défini par plusieurs points de mesure. Ces points de mesure sondent la répartition latérale de la quantité de polylysine à l'intérieur d'un dépôt. Nous avons considéré deux approches différentes pour analyser les données : une répartition uniforme ou une répartition radiale non uniforme de polylysine à l'intérieur d'un microdépôt.

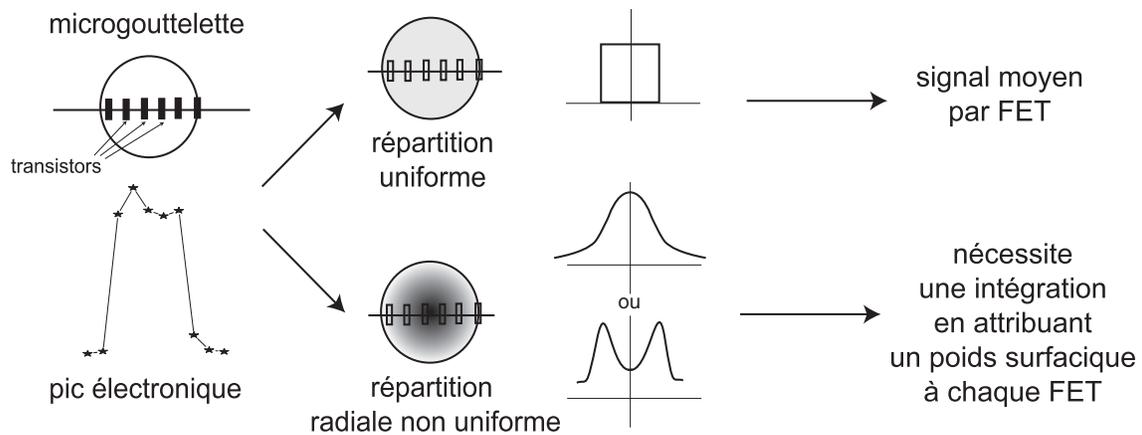


FIGURE 4.4: Méthode d'analyse des pics de polylysine : approche homogène ou répartition radiale ?

Si nous supposons une répartition uniforme, la quantité de polylysine adsorbée à la surface de chacun des transistors correspondant au dépôt est identique. Nous pouvons alors attribuer un signal moyen par dépôt en calculant la moyenne des points expérimentaux définissant un pic élec-

tronique⁵ (ie. la moyenne des signaux électroniques de l'ensemble des transistors correspondant au dépôt).

L'autre hypothèse (la répartition radiale) pourrait permettre de rendre compte des effets d'in-homogénéité à l'intérieur d'un dépôt tels qu'une diminution progressive ou une sur-concentration des solutions en bord de goutte⁶. Cette hypothèse nécessite une intégration en attribuant un poids surfacique variable pour les points de mesure du centre vers l'extérieur du dépôt.

Après avoir développé ces deux analyses, l'hypothèse de répartition uniforme a définitivement été choisie pour les raisons suivantes. D'une part, la faible densité en point de mesure pour un dépôt (4 à 5 FETs pour la plupart des expériences) rend les résultats d'une intégration relativement dépendant des répartitions des transistors sous le dépôt. D'autre part, dans les expériences où nous avons une résolution plus grande pour les dépôts (~ 15 FETs) la distribution des points de mesure, c'est à dire la répartition de la quantité de polylysine, n'est pas nécessairement radiale (cf 4.4.1) et s'avère différente d'un dépôt à l'autre. Dans notre dispositif de microdéposition, le dépôt s'effectue par contact mécanique entre la pointe et la surface sans contrôle précis du temps et de la force de contact et la quantité de polylysine déposée peut ainsi varier. De plus, le temps de séchage des solutions étant très rapide, des inhomogénéités de concentration à l'intérieur d'un dépôt apparaissent. Nous avons récemment acheté un robot⁷ dont la pointe piézoélectrique permet de "projeter" des microgouttelettes à la surface sans contact mécanique et dont l'enceinte permet un contrôle du taux d'humidité lors du dépôt. Ce dispositif devrait améliorer la reproductibilité des dépôts.

Nous avons donc finalement utilisé pour l'analyse de nos résultats l'hypothèse de répartition homogène et avec cette méthode nous avons calculé l'ensemble des signaux moyens⁸ pour les 35 microdépôts de polylysine de notre échantillon statistique. Ces données sont répertoriées sur la figure 4.5 et sont classées en fonction des différentes expériences (de 1 à 20) ainsi que des différentes molarités en sel utilisées pour la mesure électronique (10 mM, 1 mM, 0.1 mM, 0.01 mM). A partir de l'ensemble de ces mesures, nous pouvons caractériser statistiquement les variabilités du signal à l'intérieur d'un dépôt (intra-dépôt), entre différents dépôts (inter-dépôts) sur une même structure ou sur des structures différentes.

4.3.2 Variabilité intra-dépôt

Sur la figure 4.5 les barres d'erreur pour chaque dépôt correspondent à l'écart quadratique moyen des points de mesure à l'intérieur d'un dépôt. Statistiquement ces barres d'erreurs sont relativement importantes par rapport au signal moyen (environ 25%). Les différences peuvent être attribuées à un séchage imparfait des solutions ou à des répartitions radiales non prises en compte à l'aide de notre méthode de moyennage homogène ou encore à des caractéristiques non identiques des transistors voisins (cette dernière variation étant relativement faible, voir

⁵Nous supprimons dans cette moyenne les points expérimentaux dont le signal est inférieur à 25% du signal maximal dans le dépôt. Ceci permet d'éliminer les faibles signaux aux extrémités d'un pic correspondant à des transistors en bord de goutte et donc partiellement recouverts de polylysine.

⁶La sur-concentration des solutions vers l'extérieur d'un dépôt est attribuée à l'effet marangoni, et est souvent observée dans les images de fluorescence sur puces à ADN.

⁷Nanospotter, GeSiM [81].

⁸Le calcul est réalisé par un programme automatisé d'analyse de pic écrit sous l'environnement LabWindowsCVI.

paragraphe 4.6.2).

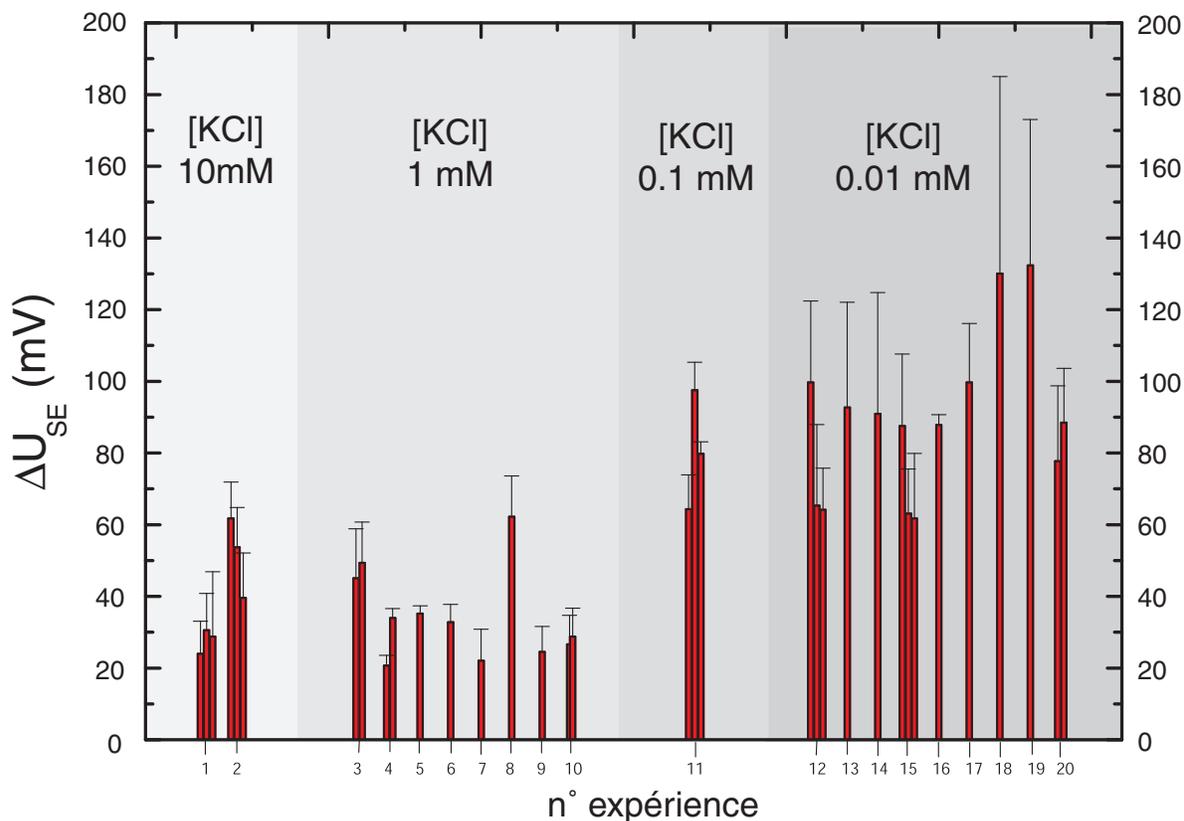


FIGURE 4.5: Ensemble des moyennes de pic pour la concentration c_0 pour des expériences à 10, 1, 0.1, 0.01 mM en KCl.

4.3.3 Variabilité inter-dépôts

Pour certaines expériences, nous avons déposé plusieurs microgouttelettes par structure (expérience 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 15 et 20). Les écarts entre les différents dépôts sur une même structure sont de l'ordre de 25% du signal moyen et peuvent s'expliquer par la variabilité dans la taille des gouttelettes après séchage : nous observons des variations de 10 à 30 % du diamètre moyen des dépôts. La densité surfacique de polylysine ne peut pas être considérée comme identique entre les différents microdépôts réalisés sur une même structure. Cette variabilité s'ajoute à celle liée à la détermination des signaux moyens de pics.

Pour des expériences différentes (sur des structures différentes ou sur une même structure après un nouveau nettoyage) il faut aussi considérer l'état initial de charge de la structure, c'est à dire la densité initiale en groupements SiO^- au niveau de la surface active. En effet, l'adsorption de polylysine étant contrôlée électrostatiquement par l'interaction entre les charges SiO^- et les charges positives de la polylysine, les quantités de polylysine adsorbées peuvent varier d'une structure à l'autre.

4.3.4 Effet de sel

Malgré la variabilité importante des signaux électroniques, il est possible de dégager une tendance générale quant à la sensibilité du système de détection en fonction de la quantité de sel présente dans l'électrolyte de mesure. Nous remarquons sur la figure 4.5 une augmentation progressive des signaux de polylysine lors de la diminution de la molarité en sel utilisée pour la lecture électronique. Les moyennes pour les différentes concentrations de KCl sont regroupées dans le tableau 4.1. Cependant, entre les concentrations de 10mM et 1mM en KCl, nous n'ob-

10 mM	1 mM	0.1 mM	0.01 mM
40 mV \pm 17 mV	33 mV \pm 13 mV	80 mV \pm 17 mV	105 mV \pm 22 mV

TABLEAU 4.1: Dépendance au sel des signaux de polylysine

servons pas d'augmentation pour le signal de polylysine. Les résultats de l'échantillon statistique ayant été obtenus sur des structures différentes, les fluctuations entre structure ainsi qu'entre dépôts peuvent masquer l'augmentation du signal liée à une diminution de la concentration en sel de l'électrolyte. L'influence de cette concentration en sel sera étudiée de manière plus approfondie au paragraphe 4.5 où nous décrirons les séries de mesures effectuées sur une même structure en augmentant progressivement la quantité de KCl, ceci permettant d'observer directement sur un même dépôt l'effet de la concentration en sel.

4.4 Variation de la concentration en polylysine

Après avoir considéré les microdépôts de polylysine de concentration c_0 , nous présentons dans cette partie les expériences réalisées en variant la concentration en polylysine déposée. Plusieurs séries d'expériences ont été effectuées en utilisant deux concentrations en sel différentes pour l'électrolyte de mesure : 1 mM et 0.01 mM.

4.4.1 Expériences à une concentration de 1 mM en KCl

Dans cette première série d'expérience, nous utilisons pour électrolyte de mesure une solution de KCl de molarité 1 mM. Nous déposons à la surface des réseaux de transistors quatre solutions différentes : une solution de polylysine de concentration c_0 , une dilution par cinq et par dix de cette concentration, ainsi que la solution de PBS 0.1X, utilisée pour les dilutions de polylysine.

Dans l'expérience présentée sur la figure 4.6, les quatre solutions sont déposées avec une pointe SMP8B (cf. chap 3.4) en quatre zones du réseau de 96 transistors. Les variations de tension (ΔU_{SE}) sont positives pour les quatre solutions et chacun des pics électroniques comporte environ une quinzaine de points de mesure, ce qui est en accord avec le diamètre moyen des dépôts spécifié pour la pointe utilisée ($\sim 300 \mu m$). Les différents pics de polylysine ne présentent pas le même profil de répartition des points de mesure, c'est à dire de quantité de polylysine à l'intérieur de chaque dépôt. Le dépôt de concentration $c_0/5$ apparaît uniforme et possède des bords de goutte très nettement marqués. Le dépôt de concentration $c_0/10$ est par contre relativement inhomogène, mais les transitions en bord de dépôt restent cependant très nettes. Le pic correspondant à la concentration c_0 est asymétrique et présente une décroissance lente en

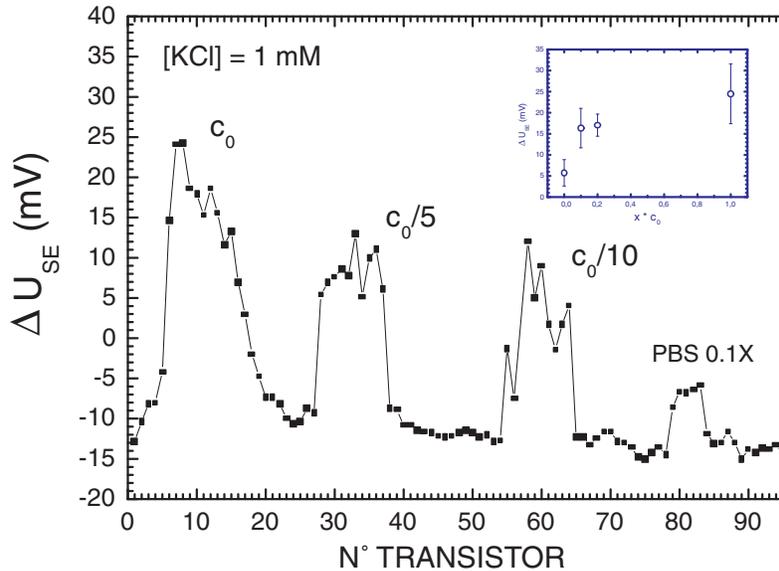


FIGURE 4.6: Effet de la variation de la concentration en polylysine. En insert, la moyenne des pics de polylysine en fonction de la concentration en polylysine.

bord de goutte sur sa partie droite. Les variabilités observées entre ces dépôts peuvent s'expliquer par des conditions de séchage non contrôlées et ne permettent pas de trancher quand à une répartition radiale ou uniforme pour la quantité de polylysine dans chaque dépôt. En conservant l'hypothèse d'uniformité, nous pouvons calculer un signal moyen pour l'ensemble de ces dépôts. La courbe en insert dans la figure 4.6 représente la variation de ce signal moyen en fonction de la concentration en polylysine ($x \cdot c_0$). Nous observons une augmentation progressive du signal électronique en fonction de la concentration en polylysine déposée.

Le tampon PBS 0.1X donne un signal non-négligeable ($\sim 5 \text{ mV}$). Cette solution possède une concentration en sel de l'ordre de 20 mM. Il semble que le séchage du PBS modifie l'état de charge à la surface même avec un rinçage des transistors après dépôt. Des dépôts d'autres solutions salines (1 et 10 mM en KCl) provoquent des signaux équivalents. Des expériences en macrodépôts montrent que lorsque les gouttelettes ne sont pas séchées sur la surface, de telles solutions salines n'induisent aucun signal significatif (cf. 4.6). Il s'agit donc bien d'un effet de séchage : il pourrait rester des espèces ioniques fortement adsorbées, non supprimées lors du rinçage et écrantant la charge négative de l'oxyde. Cet effet similaire à une adsorption de polymères positivement chargés restreint le domaine de détection de polylysine car il donne un seuil limite pour le signal électronique en dessous duquel nous ne pourrions plus distinguer la présence effective de biopolymère.

Cette expérience a été reproduite sur trois autres structures. Les résultats de l'ensemble des quatre expériences sont représentés sur la figure 4.7. Les variations en concentration de polylysine extraites de chaque expérience sont présentées ainsi que la moyenne calculée sur ces quatre expériences. Les résultats obtenus sont comparables à l'expérience présentée précédemment et montrent une augmentation du signal électronique en fonction de la quantité de polylysine déposée. Les intensités mesurées pour des dépôts de même concentration peuvent varier de plus de 50 % entre les différentes expériences. Cependant, il apparaît une saturation nette pour la

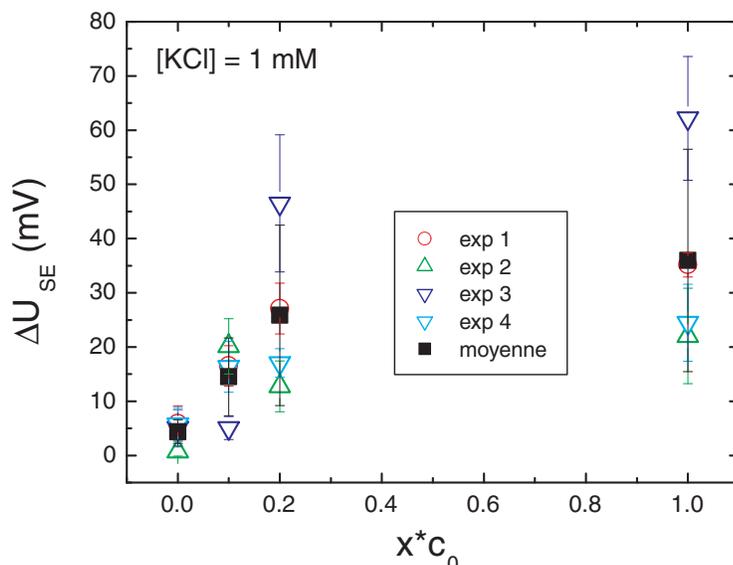


FIGURE 4.7: Variation du signal électronique en fonction de la concentration en polylysine pour quatre expériences similaires.

concentration c_0 : la quantité de polylysine doit être pour cette concentration supérieure à la quantité maximale pouvant être adsorbée à l'interface $\text{SiO}_2/\text{électrolyte}$. Nous discuterons ce point en détail dans le paragraphe suivant.

4.4.2 Expériences à une concentration de 0.01 mM en KCl

Nous avons réalisé des expériences similaires en utilisant une concentration de 0.01 mM en KCl. Dans l'expérience présentée ci-dessous nous déposons des solutions de concentration $c_0 * 2$, c_0 , $c_0/2$, $c_0/4$, $c_0/8$ ainsi que la solution de PBS 0.1X (figure 4.8). Ces dépôts sont effectués en utilisant une même pointe (SMP3B), mais nous observons cependant une variabilité dans la taille des pics mesurés en électronique (la taille d'un pic étant définie pour l'ensemble des points supérieurs au niveau de bruit). Cette variabilité pourrait être due à une répartition radiale avec une diminution de la quantité de polylysine du centre vers l'extérieur des dépôts. Pour de basses concentrations, les quantités de polylysine déposées seront insuffisantes en bord de dépôt pour être détectées, d'où une diminution des tailles des pics électroniques. Une autre interprétation possible de ces variations de tailles proviendrait des conditions de séchage ou de mouillage différentes pour l'ensemble de ces solutions. Le séchage rapide des solutions de faible concentration en polylysine aurait tendance à contracter les microgouttelettes et à condenser les charges apportées sur de plus petites surfaces. Pour les concentrations c_0 et $c_0 * 2$, nous observons une saturation nette des pics électroniques (~ 175 mV), celle-ci étant attribuée à la quantité maximale de polymères positivement chargés pouvant s'adsorber à la surface de l'oxyde. Comme dans les expériences à 1 mM en KCl, nous observons un signal significatif pour la solution de PBS 0.1X (~ 25 mV pour cette expérience). Cette valeur constitue un seuil limite pour la détection de solutions de polylysine de faible concentrations.

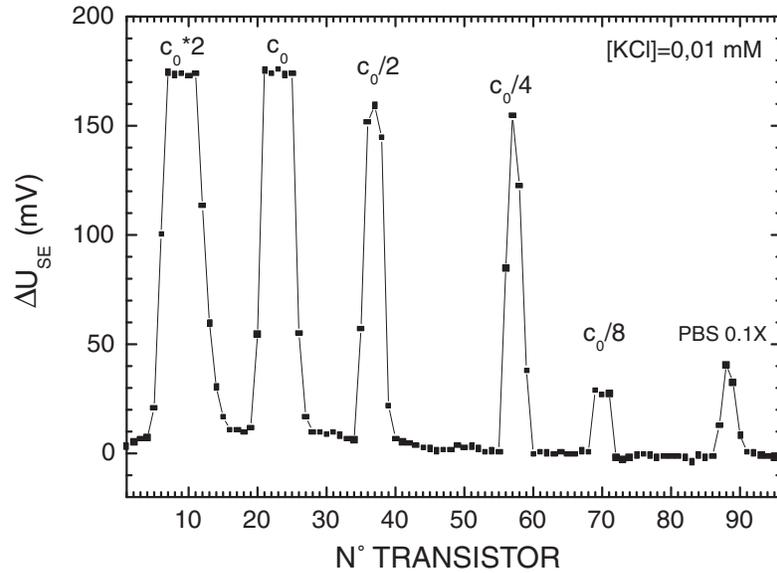


FIGURE 4.8: Effet de la variation de la concentration en polylysine sur un réseau de 96 transistors.

En utilisant l'approche de moyennage uniforme pour analyser les différents pics électroniques de cette expérience, nous obtenons un signal moyen qui apparaît très rapidement comme saturé lorsque la concentration en polylysine croît (courbe en cercle vide sur la figure 4.9).

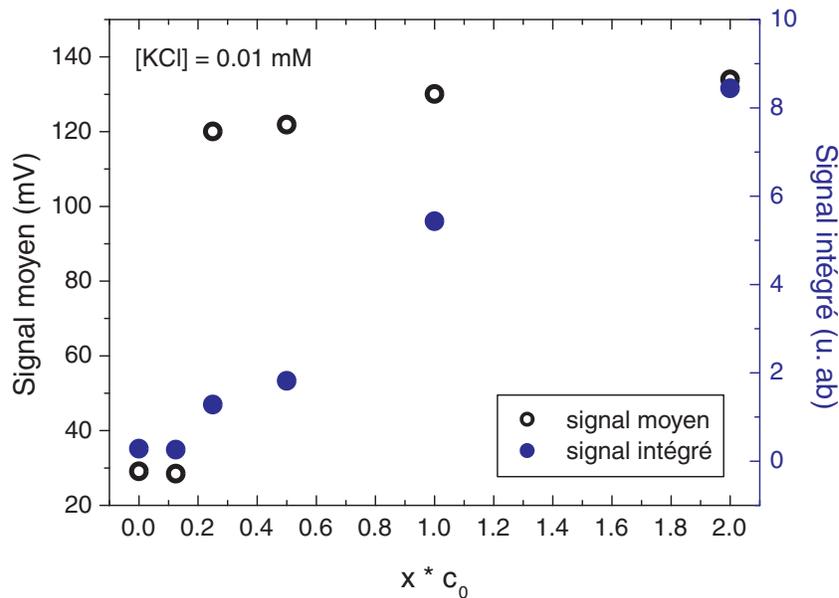


FIGURE 4.9: Deux approches différentes pour l'analyse des résultats de l'expérience 4.8 : variation du signal moyen par pic (mV) ou du signal intégré (unité arbitraire) en fonction de la concentration en polylysine.

Dans ce calcul nous ne tenons pas compte de la taille variable des pics électroniques⁹. Nous devons, pour tenir compte de ces effets, multiplier la valeur moyenne du signal par la surface des pics électroniques, ce qui revient à intégrer de manière uniforme le signal électronique par pic. Nous obtenons pour l'expérience précédente, une évolution linéaire de ce signal intégré en fonction de la concentration en polylysine (courbe en cercle plein de la figure 4.9). Ces deux approches sont différentes dans leur interprétation : le signal moyen permet de donner une valeur par dépôt indépendamment des dimensions du dépôt, tandis que l'intégration représente une valeur intégrée pour une surface correspondant à celle du pic électronique. Dans l'approche par intégration, la surface considérée est celle mesurée en électronique et ne représente pas nécessairement la surface réelle du dépôt. Par conséquent on ne peut pas dire que cette approche est meilleure que celle de la valeur moyenne. Nous conserverons donc pour l'analyse statistique de l'ensemble des expériences de variation de concentration l'approche en valeur moyenne, tout en gardant à l'esprit qu'une intégration permettrait d'obtenir une dynamique¹⁰ plus grande en tenant compte des variabilités entre les surfaces des différents pics.

Nous avons reproduit l'expérience précédente plusieurs fois en utilisant des concentrations de polylysine comprises entre $10^{-3} * c_0$ et $3 * c_0$. Les résultats pour ces différentes expériences sont données à la figure 4.10 ainsi que la moyenne pour l'ensemble de ces expériences.

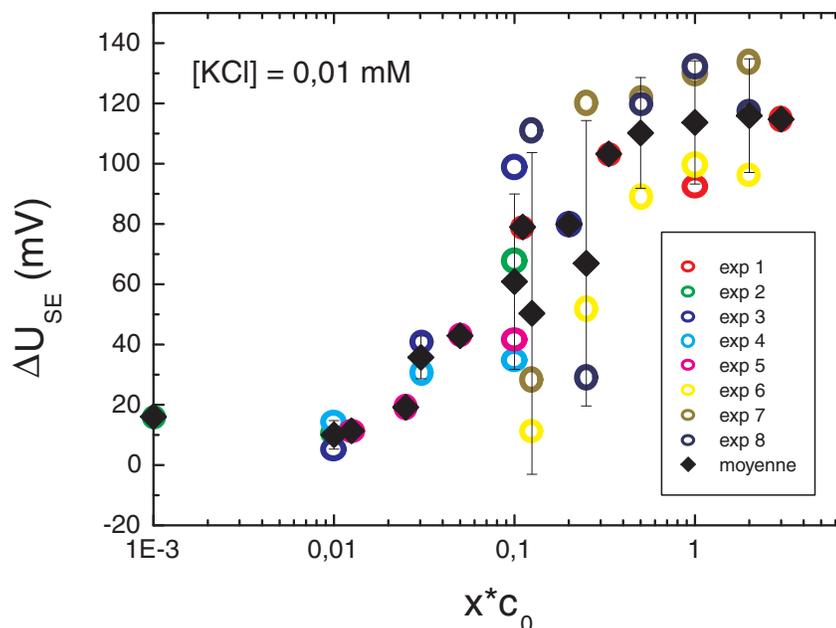


FIGURE 4.10: Effets de la variation de concentration de polylysine et moyenne sur plusieurs expériences. Les valeurs pour chaque concentration correspondent au signal moyen par dépôt.

⁹Le signal par dépôt correspond à la moyenne des points de mesure pour un pic électronique et ne fait donc pas intervenir la surface des dépôts.

¹⁰Bien que le signal intégré semble nous donner une dynamique plus grande pour la détection de concentration de polylysine, celui-ci conduit par contre à une variabilité plus importante entre les différentes expériences de notre échantillon statistique que le signal moyen donné en figure 4.5

Bien que les différences entre expériences soient relativement importantes, nous observons une région correspondant à une augmentation du signal en fonction de la concentration en polylysine déposée. Cette zone dynamique s'étend sur une échelle de deux ordres de grandeur pour des concentrations de polylysine comprises entre $0.01 * c_0$ et c_0 . La courbe présente ensuite une saturation pouvant être attribuée à l'adsorption maximale de polylysine à l'interface $\text{SiO}_2/\text{électrolyte}$.

La concentration c_0 correspond à une solution de $800 \mu\text{M}$ en monomères lysines. Les dépôts sont réalisés à l'aide de pointes permettant un dépôt dont le volume est proche du nanolitre ($v \simeq 1\text{nl}$) et dont le diamètre moyen est de l'ordre de $100 \mu\text{m}$. La densité surfacique en groupements lysines pour une concentration c_0 déposée de polylysine est donc de :

$$\sigma_{c_0} = \frac{v * c_0 * N_A}{\pi \frac{d^2}{4}} \simeq 5.10^7 \text{ lysines}/\mu\text{m}^2 = 50 \text{ lysines}/\text{nm}^2$$

(avec $N_A = 6.02 \cdot 10^{23}$: nombre d'Avogadro). La valeur σ_{c_0} peut être comparée à la densité surfacique maximale en monomères lysines pouvant être adsorbés sur une surface d'oxyde. Latour et al[82] ont caractérisé expérimentalement¹¹ cette valeur pour l'adsorption de différentes solutions de polylysine sur des microbilles de silice. Leurs résultats dans un tampon PBS montrent que la saturation d'adsorption se produit pour une concentration constante de monomères par unité de surface¹² : $\sigma_{sat} \simeq 20 \text{ lysines}/\text{nm}^2$. La valeur de σ_0 étant proche de σ_{sat} , la saturation des pics électroniques (figure 4.8) ou des signaux moyens (figure 4.10) pour des concentrations c_0 ou supérieures à c_0 peut donc bien être attribuée à une saturation d'adsorption.

A partir de la densité surfacique σ_{c_0} correspondant à une concentration de polylysine c_0 , nous pouvons estimer la sensibilité du capteur à la détection de polylysine. Les signaux observés sur des solutions de PBS 0.1X limite la détection à des concentrations en polylysine supérieures à $0.01 * c_0$, c'est à dire pour des densités surfaciques supérieures à $5.10^5 \text{ lysines}/\mu\text{m}^2$ ($\sigma_{c_0}/0.01$). Par capteur FET, la quantité minimale de groupement lysines adsorbées pouvant être détectée est donc de l'ordre de 10^7 monomères lysines¹³. Cette valeur correspond au seuil de détection dans l'expérience, où la quantité minimale détectable est limitée par les signaux parasites mesurés sur la solution référence de PBS et ne représente donc pas la sensibilité propre du capteur aux charges apportées par la polylysine.

4.5 Variation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure

Une première tendance sur la diminution du signal électronique lorsque l'on augmente la concentration en sel a été mise en évidence dans le paragraphe 4.3.4. Le principe des expériences,

¹¹Les valeurs des quantités de polymères adsorbés sont obtenues par une quantification de la concentration de polylysine restant dans le surnageant d'un mélange polylysine/microbilles de silice après 2 heures de réaction.

¹²Leurs données ([82], figure 3) permettent de donner une estimation de la concentration de monomères par unité de surface, cette valeur étant indépendante du degré de polymérisation des différentes solutions de polylysine testées.

¹³Les surfaces actives des transistors sont comprises entre $24 \mu\text{m}^2$ et $40 \mu\text{m}^2$ selon le réseau considéré. Le seuil de détection est donc de l'ordre de $40 \mu\text{m}^2 * 5.10^5 \text{ lysines}/\mu\text{m}^2 \approx 10^7$ monomères lysines.

décrites ci-dessous, est d'étudier cet effet sur une même structure. Pour cela nous varions la concentration en sel de l'électrolyte de mesure par ajout progressif de sel dans le bain de mesure. Nous avons réalisé une dizaine d'expériences en augmentant typiquement la concentration en sel par décade de 0.01 mM jusqu'à 100 mM.

4.5.1 Exemple d'une double série en sel avec dépôts de polylysine

Pour réaliser la double série en sel présentée ci-dessous, nous avons utilisé une des lignes du réseau de 62 transistors. Nous débutons cette expérience de manière identique à celle présentée comme exemple au paragraphe (4.2). Après avoir nettoyé la structure, nous mesurons une première fois les caractéristiques des transistors de ce réseau avant le dépôt local de polylysine en utilisant une concentration en KCl de 0.01mM. Cette mesure servira de référence pour le calcul des variations de la tension U_{SE} pour l'ensemble des étapes suivantes.

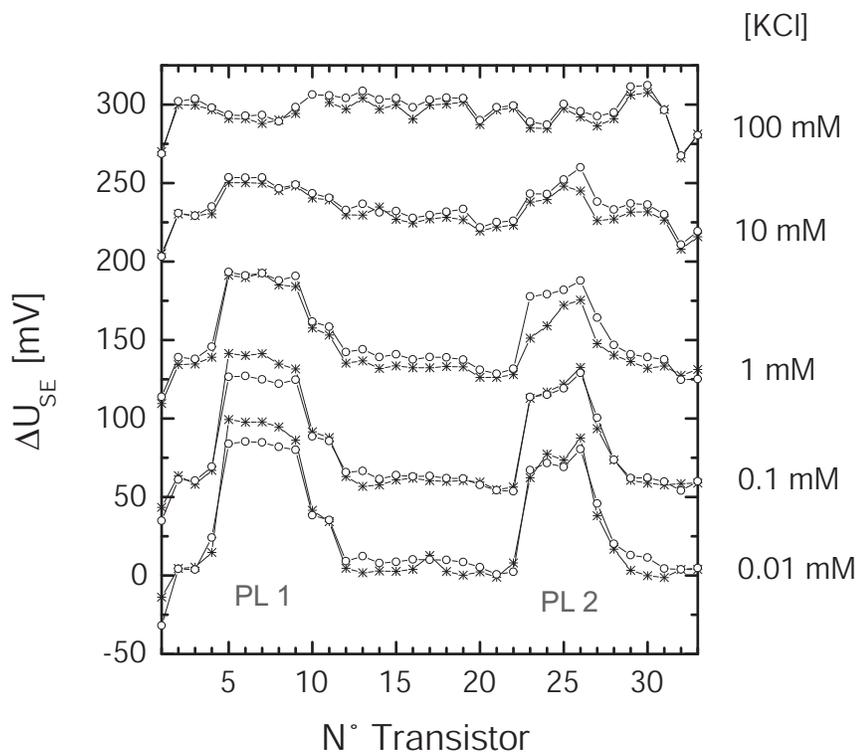


FIGURE 4.11: Effet de variation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure. Les étoiles représentent la première série en sel et les cercles la seconde variation en sel. L'état de référence est la surface avant dépôt mesurée à 0.01 mM en KCl.

Nous déposons ensuite à la surface de cette structure, deux microdépôts de polylysine (concentration c_0) au niveau du transistor 7 et du transistor 25 en utilisant une pointe SMP8B. Cette pointe permet un dépôt de microgouttelettes de $300 \mu\text{m}$ de diamètre recouvrant environ 5 transistors pour ce réseau. Après le dépôt, nous rinçons la structure et la séchons sous un jet d'air comprimé. Nous mesurons une nouvelle fois l'ensemble des caractéristiques des transistors en utilisant une concentration de 0.01mM en KCl. La différence entre la mesure effectuée après le dépôt et celle avant le dépôt présente deux pics positifs correspondant aux zones où ont été

déposées les micro-gouttelettes de polylysine (première courbe en bas de la figure 4.11 : étoiles). Les intensités moyennées pour ces pics, $105 \text{ mV} \pm 8 \text{ mV}$ pour le premier dépôt (transistor : 5 à 9), et $88 \text{ mV} \pm 15 \text{ mV}$ pour le second dépôt (transistor : 23 à 26), correspondent aux valeurs typiques pour une concentration c_0 de polylysine et une mesure à 0.01 mM en sel.

Après cette première mesure à bas sel, nous injectons une solution concentrée de KCl dans l'électrolyte de mesure, pour obtenir une concentration finale en sel de 0.1 mM , puis nous mesurons une nouvelle fois le réseau¹⁴. La différence entre cette mesure à 0.1 mM est celle faite avant le dépôt à 0.01 mM (mesure de référence) présente toujours les mêmes pics mais la courbe s'est déplacée vers le haut. Nous avons poursuivi l'expérience en augmentant par décade la concentration en sel de l'électrolyte jusqu'à 100 mM . Cette première série en sel est représentée par l'ensemble des courbes en étoiles sur la figure (4.11). Après cette première série en sel, nous rinçons la surface à l'eau déionisée puis nous déposons un nouvel électrolyte (0.01 mM en KCl) pour revenir à bas sel et recommencer une nouvelle variation en sel. Cette deuxième série en sel correspond à l'ensemble des courbes représentées par des cercles sur la figure (4.11). Nous observons une bonne reproductibilité entre ces deux séries en sel. En particulier, les deux variations montrent un décalage global des courbes vers le haut et une diminution progressive des pics de polylysine. La diminution des pics en fonction du sel ne peut être attribuée à une désorption de polymères. En effet la bonne reproductibilité entre les deux variations en sel, et la quasi-superposition des courbes au niveau des pics de polylysine tend à montrer que la quantité de molécules adsorbées est conservée au cours de cette expérience.

4.5.2 Modélisation et interprétation des variations en sel

Pour rendre compte de ces effets en sel, nous avons développé un modèle simple unidimensionnel du système électrolyte/biomolécules/FET dont la description complète est donnée dans l'appendice A. Dans ce modèle à courant I_{SD} fixé, la variation de la tension U_{SE} est donnée par la somme de trois termes correspondant aux différents sauts de potentiel dans la partie aqueuse du système :

$$\Delta U_{SE} = \frac{kT}{e} \ln(a(Cl^-)) + \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}}} \right) + C \quad (4.1)$$

Le premier terme correspond au saut de potentiel entre l'électrolyte de mesure et le corps métallique de l'électrode. Celui-ci fait intervenir l'activité des ions chlores $a(Cl^-)$ qui en première approximation¹⁵ correspond à la concentration en $[KCl]$ introduite. Le second terme correspond au saut de potentiel à travers la couche diffuse d'ions écrantant une charge¹⁶ effective σ_{eff} du système (selon le modèle de Gouy-Chapmann). Cette charge effective inclut à la fois la charge d'interface et la charge du canal de trous ($\sigma_{eff} = \sigma_{int} + \sigma_S$). La constante C permet de rendre compte de la modification de la couche condensée due à l'adsorption de biopolymères¹⁷. Nous

¹⁴Nous attendons 5 minutes après avoir injecté la solution concentrée de sel avant de réaliser cette nouvelle mesure électronique.

¹⁵Si l'on néglige la solubilité de l'électrode à bas sel et la correction de l'activité pour les hautes concentrations en sel (cf. appendice A.2).

¹⁶Pour simplifier l'écriture nous appelons charge une quantité qui est en fait la densité surfacique de charge.

¹⁷La différence entre les constantes pour une surface recouverte de biopolymères (C_{abs}) et pour une surface nue (C_{nue}) correspond à la différence de saut de potentiel à travers la couche condensée de biopolymères $\Delta\phi_{CC}^{abs}$ ou

supposons dans notre modèle que les paramètres (σ_{eff} et C) sont indépendants du sel. Ceci nous permet alors d'analyser de manière simple les évolutions en sel obtenus ci-dessus.

Pour donner une estimation de la charge effective σ_{eff} des transistors ayant vu l'apport de charge et de ceux n'ayant pas vu cet apport, nous moyennons le signal pour chacune des courbes de la figure (4.11) en distinguant trois régions : le premier pic de polylysine (PL1 : FETs 5 à 9), le second pic de polylysine (PL2 : FETs 23 à 26), et enfin la surface d'oxyde de silicium "nue" (SiO_2 : FETs [2 à 3]∪[12 à 21]∪[30 à 31]).

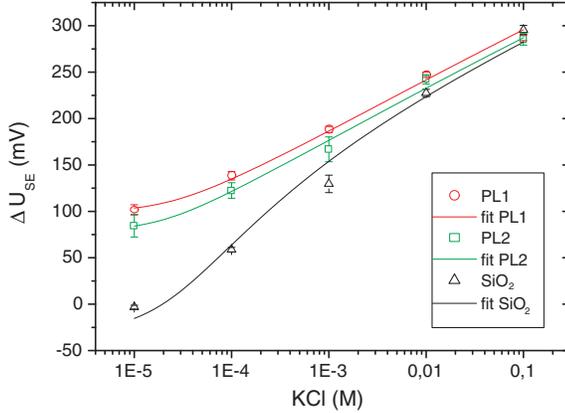


FIGURE 4.12: **Première série en sel** : points expérimentaux et ajustement des évolutions ΔU_{SE} en fonction du sel. Voir texte pour les définitions des zones PL1, PL2 et SiO_2 .

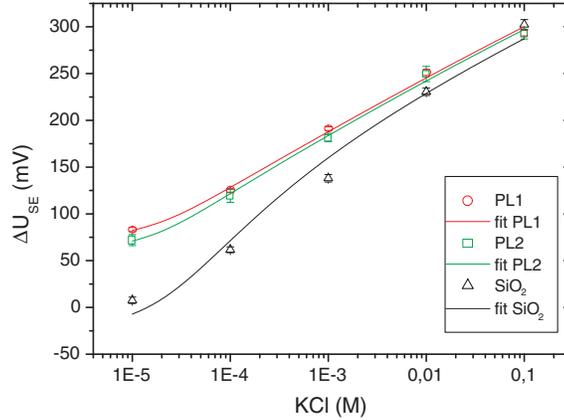


FIGURE 4.13: **Deuxième série en sel** : points expérimentaux et ajustement des évolutions ΔU_{SE} en fonction du sel.

Nous pouvons alors représenter l'évolution de la différence de tension ΔU_{SE} en fonction de la concentration en sel pour les deux séries en sel et pour les trois régions considérées (figure 4.12 et 4.13). Les cercles, carrés et triangles correspondent respectivement au premier pic de polylysine, au second pic de polylysine, et à la surface d'oxyde de silicium¹⁸. Nous pouvons ajuster ces points expérimentaux par l'expression 4.1 donnant l'évolution de ΔU_{SE} en fonction de la concentration en $[\text{KCl}]$. Cette analyse fait intervenir deux paramètres d'ajustement (σ_{eff} et C) dont les valeurs sont données dans le tableau 4.2 pour les trois régions différentes considérées et pour chaque série en sel.

zones	Première série en sel		Deuxième série sel	
	σ_{eff} (C/m^2)	C	σ_{eff} (C/m^2)	C
Surface "nue" : SiO_2	$(-14 \pm 0.6) \cdot 10^{-4}$	350 ± 12	$(-13 \pm 0.6) \cdot 10^{-4}$	354 ± 13
Pic de polylysine : PL1	$(2 \pm 0.9) \cdot 10^{-4}$	361 ± 4	$(-0.6 \pm 0.7) \cdot 10^{-4}$	366 ± 4
Pic de polylysine : PL2	$(0.9 \pm 1) \cdot 10^{-4}$	352 ± 5	$(-1.5 \pm 0.7) \cdot 10^{-4}$	363 ± 3

TABLEAU 4.2: Paramètres (σ_{eff} et C) correspondant aux ajustements des évolutions en sel des figures 4.12 et 4.13 selon l'expression 4.1.

d'ions condensés pour la surface nue $\Delta\phi_{CC}^{nue}$: $C_{abs} - C_{nue} = \Delta\phi_{CC}^{abs} - \Delta\phi_{CC}^{nue}$.

¹⁸Les barres d'erreurs correspondent à la déviation standard des points servant au calcul de la moyenne par pic ou de la moyenne correspondant à la surface nue.

L'adsorption de biopolymères tend à neutraliser la charge effective du système. Les valeurs obtenues pour les surfaces d'oxyde recouvertes de polylysine (légèrement positives pour la première série 0.9 et $2 \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$ ou légèrement négatives pour la seconde série -0.6 et $-1.5 \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$) sont un ordre de grandeur plus faibles que celle de la surface nue pour laquelle nous obtenons une charge effective négative (-14 et $-13 \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$). Cette charge négative pour la surface nue résulte de la présence de groupements silanols négativement chargés à la surface de l'oxyde. Un apport de charges positives, lié à l'adsorption de polylysine à l'interface, tend donc à réduire la charge d'interface initialement négative. La limite obtenue ici (une neutralisation de la charge initiale) pourrait être reliée à une limitation de la quantité de polylysine pouvant s'adsorber à la surface. Des modèles prévoient en effet une adsorption électrostatique de polymères jusqu'à une neutralisation de la charge d'interface [83, 84]. Les valeurs des constantes (C , tableau 4.2) sont relativement proches lorsque l'on compare les surfaces de polylysine et la surface nue. Il semble donc que l'on puisse attribuer le signal électronique correspondant à l'adsorption de polylysine essentiellement comme une variation d'écrantage dans la couche diffuse due à la modification de la charge effective du système¹⁹ (la variation dans la couche condensée restant faible).

Nous avons réalisé plusieurs expériences qui montrent des effets similaires. Mais les valeurs des charges effectives obtenues pour la surface d'oxyde "nue" et recouverte de polylysine sont tout de même sujettes à des variations relativement importantes. Sur 7 séries en sel nous obtenons une moyenne de $(-13 \pm 12) \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$ pour la surface d'oxyde et de $(2.2 \pm 4.7) \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$ pour la surface de polylysine. Ces variations pourraient être dues à des différences de densités de groupements chargés à la surface de l'oxyde ainsi qu'à des différences de densité de porteurs de charge dans le semiconducteur. En effet la charge effective ajustée est fonction à la fois de la charge d'interface (σ_{int}) et de la charge dans le semiconducteur (σ_S). Cette charge effective dépend, à travers la charge dans le semiconducteur, du point de fonctionnement (I_{SD}, U_{SD}) choisi pour calculer la variation ΔU_{SE} . Nous avons entrepris des premières études pour caractériser la dépendance des signaux électroniques au point de fonctionnement (cf. appendice B.4). Ces études sont encore préliminaires et nécessiteront probablement une caractérisation plus précise des transistors pour accéder à la charge dans le semiconducteur²⁰.

¹⁹Un apport de polylysine correspond à une augmentation de la charge effective ($\sigma_{eff} \nearrow$) et, conduit à une variation positive du saut de potentiel dans la couche diffuse ($\Delta\phi_{CD} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-] 8kT \epsilon_0 \epsilon_r H_2O}} \right) \nearrow$) d'où une augmentation de la tension U_{SE} (i.e. $\Delta U_{SE} > 0$).

²⁰Nous travaillons en effet dans une région où le canal de trous est pincé. La charge dans le semiconducteur (σ_S) ne peut être directement reliée au point de fonctionnement (I_{SD}, U_{SD}) sans faire intervenir des paramètres internes aux transistors.

4.6 Vers une couche stable de polylysine pour la fixation future des ADN sondes

Dans les paragraphes précédents, nous avons étudié l'adsorption de polylysine après déposition et séchage de microgouttelettes de ce polymère. Dans le but de développer la fixation des ADN sondes, nous nous sommes aussi intéressés à l'incubation partielle et globale du réseau avec de la polylysine. Dans ces expériences et, contrairement aux microdépôts, la solution de polylysine déposée à la surface du capteur ne sèche pas. Après une incubation pendant une durée comprise entre 15 minutes et plusieurs heures, la structure est directement rincée et mesurée. Ceci permet d'éviter le séchage des gouttes et les signaux parasites qui en découlent. Dans un premier temps, nous présenterons les résultats relatifs à une incubation partielle du réseau en utilisant des macrodépôts puis nous décrirons les expériences relatives à l'incubation complète du réseau.

4.6.1 Etude de l'incubation partielle du réseau avec des macrodépôts de polylysine

Nous montrons ici une expérience représentative de l'étude de l'adsorption de polylysine pour une incubation partielle du réseau. La structure utilisée pour cette expérience est celle qui comporte 62 transistors répartis sur deux lignes. Les numéros de transistors de la première ligne seront indexés de 1 à 31, tandis que les transistors de la seconde ligne seront numérotés de 32 à 62 (cf. figure 4.14).

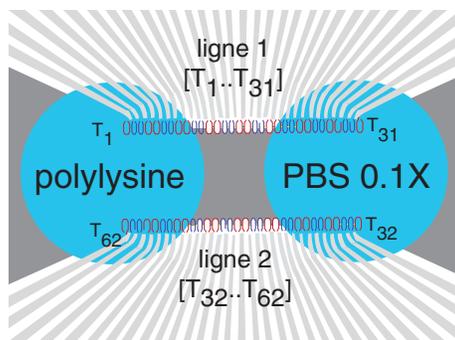


FIGURE 4.14: Macrodépôts de polylysine et de PBS 0.1X à la surface du réseau de 62 transistors.

Tout d'abord, nous mesurons les fluctuations de l'ensemble des transistors avant le dépôt. Cette courbe de référence, correspondant à la différence entre deux mesures séparées par un rinçage, est représentée par des cercles sur la figure 4.15. Elle montre une variation faible de la tension U_{SE} : $\Delta U_{SE} = 4.0 \text{ mV} \pm 1.4 \text{ mV}$. Nous déposons alors deux solutions (PBS 0.1X et polylysine) de volume $0,3 \mu\text{l}$ à la surface de ce réseau (cf. figure 4.14). La première goutte recouvrant la partie droite de la structure, est une solution de PBS 0.1X. Le deuxième dépôt, sur la partie gauche du réseau, correspond à la solution de polylysine de concentration c_0 . Après incubation

pendant un quart d'heure en atmosphère humide, le capteur est directement rincé et mesuré de nouveau. La courbe en étoiles représente les variations du réseau entre cette mesure effectuée après le dépôt et la mesure réalisée avant le dépôt. Nous observons deux régions présentant une variation positive de la tension U_{SE} . Ces deux zones correspondent aux transistors qui ont vu l'apport de polylysine.

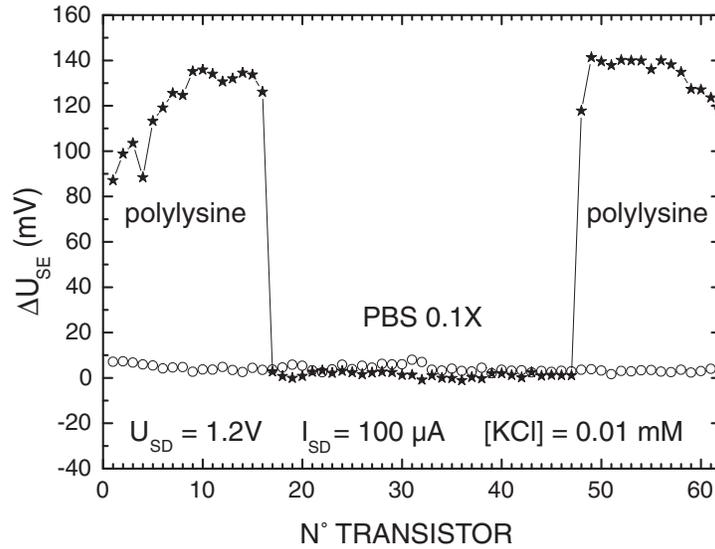


FIGURE 4.15: Signal électronique correspondant à l'incubation de macrodépôts de polylysine et de PBS 0.1X sur le réseau de 62 transistors. Les mesures sont effectuées dans un électrolyte de KCl de molarité 0.01mM.

Le décalage calculé pour l'ensemble de ces deux régions est de $126 mV \pm 15 mV$. La moyenne sur 8 expériences similaires donne une variation significative et positive de la tension U_{SE} : $\Delta U_{SE} = 119 mV \pm 19 mV$ pour l'incubation comparé au signal de fluctuations avant incubation $\Delta U_{SE} = 5,5 mV \pm 5 mV$. Pour l'ensemble de ces manipulations, l'électrolyte de mesure est une solution de KCl de molarité 0.01mM. La valeur moyenne pour l'incubation de polylysine est proche des valeurs observées pour les expériences en microdépôts de concentration c_0 ; le décalage, moyenné sur l'ensemble des mesures à 0.01 mM en KCl, a été donné au paragraphe 4.3.4 et vaut $105 mV \pm 22 mV$. Ce résultat était attendu puisque dans les deux cas (microdépôts/macrodépôts) nous formons une couche de polylysine tendant à rendre positive la surface d'oxyde de silicium. Par contre sur la partie centrale (transistors 20 à 45) et dans la limite du bruit ($\sim 2 mV$), nous n'observons pas de décalage significatif de l'incubation de PBS 0,1X. Ce résultat diffère de celui obtenu sur les microdépôts. En effet, nous observions un signal pouvant même être relativement fort pour cette solution, comme le montre par exemple le pic d'environ 25 mV correspondant à la solution de PBS 0.1X dans l'expérience de variation de concentration en polylysine au paragraphe 4.4.2. Nous avons imputé ce signal parasite au séchage de la solution saline sur la surface d'oxyde. Le résultat obtenu ici confirme cette hypothèse car dans cette expérience présente et, contrairement à celle réalisée avec des microdépôts, la solution de PBS 0.1X ne sèche pas sur la surface.

La stabilité de la couche de polylysine peut être étudiée en mesurant la variation des signaux électroniques après un nouveau rinçage du capteur. La perte mesurée pour le signal de polylysine de $7\text{mV} \pm 5\text{mV}$ est faible devant les décalages de polylysine. Ce résultat confirme la stabilité de la couche de polylysine²¹. Cette propriété avait déjà été mise en évidence dans les expériences montrant la possibilité d'effectuer plusieurs séries successives en variant la concentration en sel sans désorption significative de polymère (cf. paragraphe 4.5).

4.6.2 Incubation globale du réseau

Les expériences précédentes, nous ont montré la cohérence entre les résultats de microdéposition et les résultats obtenus sur une incubation partielle du réseau. Ici, nous présentons les résultats statistiques de l'incubation complète du réseau par une goutte macroscopique de polylysine recouvrant l'ensemble des transistors. Contrairement aux expériences précédentes, l'approche différentielle entre une zone qui a vu l'apport de biomolécules et une zone qui ne l'a pas vu n'est évidemment plus possible. Nous pouvons néanmoins confirmer les effets induit par la couche de polylysine en observant le décalage complet de la caractéristique après et avant l'apport de polylysine. Nous avons reproduit ces expériences un grand nombre de fois lors des expériences concernant l'ADN. En effet, cette étape d'incubation en polylysine doit être réalisée avant chaque dépôt d'ADN.

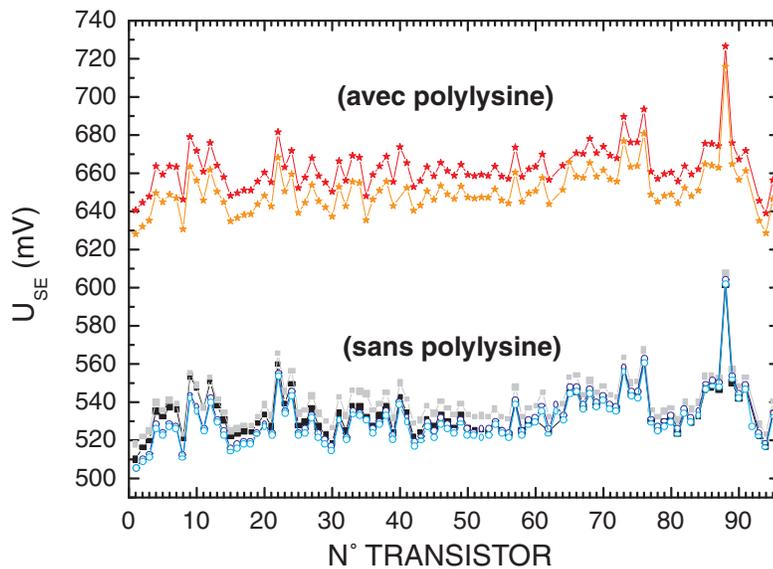


FIGURE 4.16: Incubation complète d'un réseau de 96 transistors par une solution de polylysine. Les tensions U_{SE} sont calculées pour le point de fonctionnement $I_{SD}=100\mu\text{A}$ et $\tilde{U}_{SD}=1.0\text{V}$. Les mesures sont effectuées dans un électrolyte de KCl de molarité 0.01mM .

Pour illustrer cette étude statistique nous présentons une expérience typique correspondant à une incubation globale de polylysine. Nous avons choisi ici de représenter le signal direct pour la tension U_{SE} . Nous n'effectuons plus la différence entre deux mesures, mais nous traçons la

²¹Plus précisément de la couche de polylysine qui donne lieu au signal électronique positif. Il pourrait en effet se produire une désorption de polylysine qui ne contribuait initialement pas ou faiblement à ce décalage électronique.

tension U_{SE} pour chaque mesure en choisissant un point de fonctionnement donné (ici, $\tilde{U}_{SD} = 1V$ et $I_{SD} = 100 \mu A$). Après nettoyage de la structure, nous caractérisons une première fois le réseau : la courbe en noir (fig. 4.16) représente la tension U_{SE} en fonction du numéro des transistors pour cette étape. Nous rinçons le réseau et le mesurons une nouvelle fois : courbe en gris clair. La différence entre ces deux mesures est comme dans toutes les expériences précédentes faible et vaut : $6 \text{ mV} \pm 2 \text{ mV}$. Après rinçage du réseau, nous incubons 1 ml de PBS 0.1X pendant 1 heure en atmosphère humide. Nous rinçons le capteur et le mesurons deux fois de suite (courbe en bleu foncé et bleu clair). Nous ne voyons pas de différence nette entre ces mesures après incubation de PBS et l'état initial de la structure. Les décalages sont de l'ordre de $2 \text{ mV} \pm 4 \text{ mV}$ et comparables aux valeurs précédentes. L'ensemble de ces deux mesures confirme une nouvelle fois que la solution de PBS 0.1X utilisée pour la dilution de polylysine n'engendre aucun signal sur les transistors lorsqu'elle ne sèche pas. Nous incubons alors le transistor dans une solution de polylysine de 1ml de volume pendant une heure en atmosphère humide. La structure est alors lavée et mesurée. La courbe en rouge foncé (représentant l'état du capteur après cette étape) est décalée par rapport à l'ensemble des courbes précédentes. La moyenne de ce décalage est de $133 \text{ mV} \pm 4 \text{ mV}$. La stabilité de cette couche de polylysine peut être mise en évidence en mesurant une nouvelle fois le réseau recouvert de polylysine après un rinçage avec de l'eau déionisée. La courbe en rouge clair (mesurée après cette étape de rinçage) n'est en effet que très peu décalée par rapport à la courbe précédente (de l'ordre de -10 mV). Nous avons confirmé par l'ensemble de ces mesures la détection électronique d'une couche de polylysine et sa stabilité pour une incubation sur l'intégralité du réseau.

Nous donnons dans la suite l'ensemble des résultats obtenus pour un échantillon statistique d'une centaine d'expériences. La figure 4.17 représente la répartition des décalages après incubation de polylysine, ainsi que les décalages entre deux mesures séparées par un rinçage après la fixation de la couche de polylysine. Les décalages dus à l'incubation de polylysine sont centrés autour d'une valeur moyenne de 100 mV avec une répartition relativement large (déviations standard de 50 mV). Ceci est probablement dû aux variabilités entre les différentes structures utilisées. De plus, les préparations de polylysine sont parfois réalisées pendant toute une nuit et des dérives lentes de l'électronique de mesure peuvent ajouter une indétermination aux valeurs mesurées dans ces expérimentations²². Pour le rinçage de cette couche, nous obtenons une répartition centrée autour de 0 mV ce qui indique une bonne stabilité de la couche de polymères adsorbés. Les valeurs moyennes des décalages ainsi que les variabilités sont données dans le tableau 4.3.

	Moyenne Réseau	Variabilité Réseau	Variabilité FET/FET voisins	Nombre d'expériences
Incubation PL	100 ± 56	15 ± 10	2.6 ± 1.8	105
Rinçage PL	-0.2 ± 22	4.5 ± 6.0	1.0 ± 1.2	99

TABLEAU 4.3: Statistiques sur les signaux d'incubation de polylysine pour les deux réseaux et stabilité de la couche de polylysine.

Dans ce tableau nous donnons aussi les valeurs des variabilités calculées sur l'ensemble du réseau ainsi que celle calculée de FET à FET. La variabilité le long du réseau correspond à la

²²L'incubation globale ne permet pas une mesure différentielle. Une dérive lente de l'électronique de mesure ou de faibles variations en pH ou en sel peuvent se superposer aux effets de charges apportées par la polylysine.

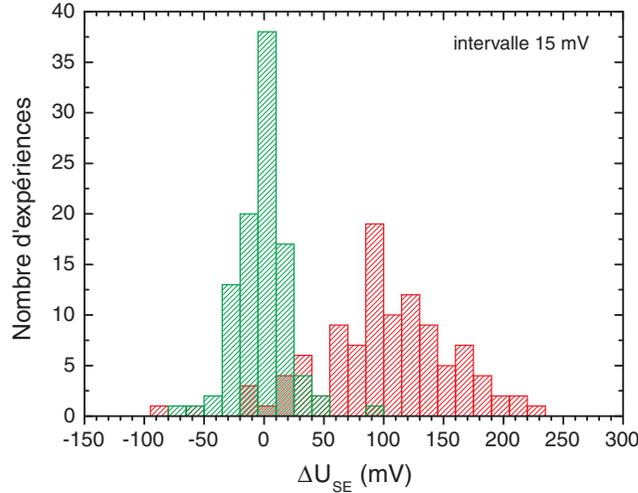


FIGURE 4.17: En rouge l'histogramme de 105 variations de la tension U_{SE} liées à la fixation d'une couche de polylysine (variations entre une mesure après incubation et une mesure avant incubation). En vert la répartition des différences ΔU_{SE} entre deux mesures séparées par un rincage après la fixation de polylysine pour un total de 99 expériences.

déviations standard des signaux électroniques calculée sur l'ensemble des transistors d'un même réseau. Pour la couche de polylysine (Incubation PL), on obtient une variabilité relativement grande des signaux électroniques ($15 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$). Ces différences importantes des signaux électroniques entre transistors semblent indiquer des variabilités dans l'état de surface d'une même structure. En calculant la moyenne des différences entre deux transistors voisins (Variabilité FET/FET voisins) on obtient une variabilité plus faible ($2.6 \text{ mV} \pm 1.8 \text{ mV}$) ce qui semble montrer que les variations des états de surface d'une même structure se font à relativement grande échelle et de manière graduelle le long d'un réseau, d'où l'intérêt des microdépôts et du différentiel "local". Pour la stabilité de la couche de polylysine (Rincage PL) le phénomène est équivalent à celui observé en incubation. La variabilité mesurée le long du réseau est 4 à 5 fois plus grande que les variations entre deux transistors voisins. Cette valeur entre FET voisins permet de donner un ordre de grandeur du seuil de détection de l'ordre du millivolt pour des solutions déposées sur cette couche de polylysine.

Des résultats similaires ont été obtenus sur l'incubation de polylysine par l'équipe de Manalis [65, 66] en utilisant une détection électronique sur des structures semiconductrices passives (cf. chapitre 2.4). Ils détectent des variations comprises entre 15 mV [66] et 50 mV [65] pour une incubation de polylysine de concentration 0.1 mg/ml (c.a.d équivalente à c_0) dans un tampon en sel d'environ 15 mM. Ces résultats sont donc similaires avec ceux obtenus sur une détection de microdépôts de concentration c_0 en polylysine avec un électrolyte de molarité 10 mM ($\sim 40 \text{ mV}$) présentés au paragraphe 4.3.4. En utilisant un canal microfluidique ils peuvent aussi obtenir un suivi temporel de l'adsorption de basses concentrations de polylysine ($5 \mu\text{g/ml} \equiv 0.05c_0$). Nous n'avons pas effectué ce type d'expériences mais celles-ci pourraient être réalisées pour une incubation de l'ensemble du réseau²³.

²³En travaillant à un point de fonctionnement donné nous pouvons en effet suivre l'évolution temporelle du courant à l'échelle de la ms pour un transistor donné et à l'échelle de quelques secondes pour le réseau complet.

Chapitre 5

Détection d'ADN simple brin sur des réseaux de transistors préalablement recouverts de polylysine

Les études précédentes, menées sur la fixation de polylysine, nous ont permis de démontrer la possibilité de détecter électroniquement des polymères positivement chargés sur des réseaux de transistors. Cette étude avait aussi pour but de préparer et de caractériser électroniquement une couche de polylysine adsorbée sur l'intégralité du réseau pour la fixation des ADN sonde. L'ADN (simple ou double brin) est un polyélectrolyte négativement chargé et ne peut être fixé directement sur l'oxyde de silicium. En revanche, l'utilisation d'une couche intermédiaire de polylysine possédant des groupements positivement chargés permet de fixer électrostatiquement les ADN sur les réseaux conformément au protocole de fixation en polylysine sur puces (cf. chapitre 4.1.2 et [80, 24]). Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la détection de courts fragments d'ADN simple brin de l'ordre de 20 bases. Les expériences sur de longs fragments d'ADN double brin (produits PCR) seront présentées dans le chapitre suivant. Afin de comparer les signaux électroniques aux signaux de fluorescence nous utilisons parfois des oligonucléotides modifiés possédant un fluorophore (Cy5) en bout de chaîne¹.

5.1 Microdépôts d'oligonucléotides

La première étape du protocole de fixation des ADN correspond à l'incubation complète du réseau dans une solution de polylysine et a été décrite en détail au chapitre précédent. Pour l'expérience présentée à la figure 5.1, nous observons un décalage positif de la tension U_{SE} de l'ordre de 120 mV entre la mesure effectuée après l'incubation de polylysine (courbe en cercles) et celle réalisée avant incubation de polylysine (courbe en étoiles). On remarque aussi que, pour cette expérience, les variations apparentes de la tension U_{SE} le long du réseau pour l'état initial

¹Les oligonucléotides utilisés dans ces expériences ont été synthétisés par différents fournisseurs (Thermo Hybaid, MWG ...)

s'atténuent après l'incubation en polylysine.

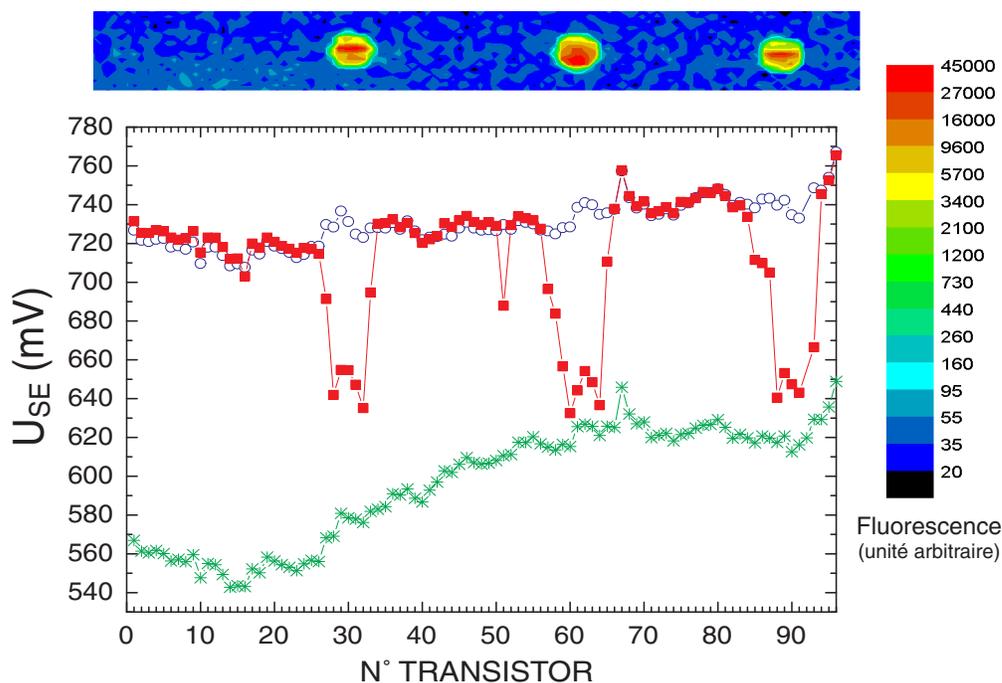


FIGURE 5.1: Fixation d'oligonucléotides à la surface d'un réseau de transistors recouvert de polylysine. Les courbes en étoile et en cercle représentent respectivement l'état du capteur avant et après l'incubation de polylysine . La courbe en carré correspond à la mesure après dépôt d'ADN. Les mesures sont réalisées dans un électrolyte de KCl 0.01mM. Une image de fluorescence des trois dépôts d'ADN est donnée au dessus de la courbe électronique.

Nous déposons alors sur cette couche de polylysine trois microdépôts d'oligonucléotides (20 bases)² de concentration $50 \mu M$ au niveau des FETs 28, 62 et 90. Ces oligonucléotides étant dilués dans de l'eau, nous avons aussi déposé comme référence trois microdépôts d'eau au niveau des transistors 15, 50, et 75. Après 15 minutes en atmosphère humide, l'échantillon est séché au four pendant 5 minutes à $50^\circ C$ avant d'être rincé avec de l'eau déionisée. Nous pouvons alors mesurer les caractéristiques du réseau après le dépôt (courbe en carré de la figure 5.1). Nous n'observons aucun décalage significatif pour les microdépôts d'eau (sauf peut-être le transistor isolé n°50) et des pics négatifs pour les trois dépôts d'ADN (~ -70 mV). La diminution de la tension U_{SE} correspond bien à un apport de charges négatives lors de l'adsorption des ADN sur la couche de polylysine. Nous avons utilisé dans cette expérience des oligonucléotides possédant un fluorophore en bout de chaîne, et en utilisant le montage de fluorescence décrit dans l'appendice C.1 nous pouvons obtenir une image de fluorescence des dépôts d'ADN. Le signal observé en électronique est bien corrélé à la localisation spatiale des dépôts obtenue par fluorescence.

²Cy5-5'-AAC GTC AGC CCT GCC GCC TG-3' synthétisés par Thermo Hybaid.

5.2 Macro dépôts d'oligonucléotides

Nous pouvons également détecter des oligonucléotides en incubant des macrogouttelettes ($0,5 \mu\text{l}$) pendant un quart d'heure à la surface des réseaux préalablement recouverts de polylysine. Dans l'expérience dont les résultats sont présentés à la figure 5.2 nous avons déposé sur la partie

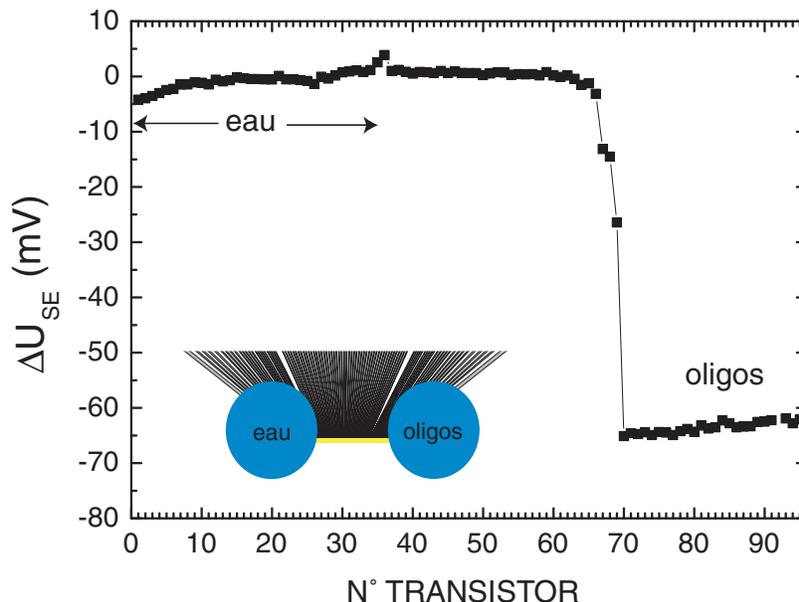


FIGURE 5.2: Variation de la tension U_{SE} pour une incubation d'oligonucléotides en macrodépôts sur un réseau couvert de polylysine.

gauche du capteur une solution d'eau et sur la partie droite une solution d'oligonucléotides non marqués diluée dans de l'eau ($100 \mu\text{M}$, 18 bases)³. Dans cette expérience et contrairement à la précédente, après une incubation des solutions pendant un quart d'heure en atmosphère humide nous rinçons directement les échantillons sans procéder à l'étape de séchage. Nous observons un décalage du signal électronique d'environ -65 mV pour le dépôt d'ADN et un faible signal pour le dépôt d'eau ($\sim -3 \text{ mV}$) par rapport à la zone centrale de polylysine. Cette expérience, dont les résultats sont similaires à ceux obtenus en microdépôts, confirme la détection de molécules d'ADN adsorbées sur une couche de polylysine pour des oligonucléotides non fluorescents.

5.3 Reproductibilité des mesures électroniques

Nous avons reproduit cette expérience plusieurs fois en microdépôts et macrodépôts en testant différentes solutions de dilutions pour les oligonucléotides. Les résultats moyennés sur l'ensemble de ces expériences sont donnés dans le tableau 5.1.

Les solutions d'oligonucléotides utilisés dans ces expériences sont de concentration élevée ($50 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$). La quantité d'ADN apportée lors du dépôt est dans ce cas supérieure à la quan-

³5'-GCG TGC TTC ACC CAT CTC-3' synthétisé par MWG.

	Microdépôts	Macrodépôts
eau	-14 mV \pm 10 mV (8)	-2.9 mV \pm 2.4 mV (2)
KCl (0.01 mM)	-1.8 mV \pm 1 mV (1)	-3.3 mV \pm 5 mV (9)
TrisHCl (10 mM)	//////////	-2.6 mV \pm 1.4 mV (1)
PBS 0.1X (\sim 20 mM)	14.5 mV \pm 9 mV (6)	//////////
oligos (c=50 μ M)	-61 mV \pm 14 mV (19)	-67 mV \pm 12 mV (1)
oligos (c=100 μ M)	-58 mV \pm 22 mV (5)	-65 mV \pm 11 mV (8)

TABLEAU 5.1: Moyenne du signal électronique (ΔU_{SE}) pour les oligonucléotides et les différentes solutions de dilution en microdépôts et macrodépôts sur un réseau recouvert de polylysine. Le nombre de dépôts moyennés est donné entre parenthèses.

tité d'ADN pouvant être réellement adsorbée à l'interface⁴. Cette saturation d'adsorption conduit à des signaux électroniques équivalents pour les deux concentrations d'ADN en microdépôts et en macrodépôts (\sim - 65 mV).

Pour les différentes solutions de dilution, nous obtenons en macrodépôt un signal électronique comparable aux fluctuations mesurées entre deux rincages pour une couche de polylysine (de l'ordre de quelques mV selon les expériences du chapitre 4.6.2). Par contre en microdépôt, les décalages induits par les solutions de dilution sont 4 à 5 fois plus importants. Nous attribuons cette différence au séchage rapide des solutions en microdépôt qui conduit probablement à une modification plus importante de la couche de polylysine (conformation, réarrangement de la couche...) que pour une incubation en macrodépôt. Ce signal observé sur les solutions de dilution est le facteur qui limite la détection de basses concentrations d'ADN. Dans nos expériences, nous utilisons des oligonucléotides commerciaux provenant de différents fournisseurs. Ceux-ci n'utilisant pas les mêmes protocoles de synthèse et de purification, les quantités résiduelles en sel dans les solutions commerciales d'oligonucléotides sont différentes. Mais ces quantités de sel étant bien inférieures à celles des solutions de dilution tel que le PBS 0.1X (20 mM) et le TrisHCl (10 mM), nous ne distinguons aucune différence pour les signaux électroniques entre oligonucléotides de différents fournisseurs.

5.4 Variation de la concentration en ADN

Pour estimer la sensibilité du système à la détection de molécules d'ADN, nous avons déposé des solutions de concentration variable en oligonucléotides (20 bases) à la surface du réseau de transistors.

5.4.1 Expériences en microdépôts

Nous avons d'abord réalisé des expériences en utilisant des microdépôts. Comme pour les variations de concentration en polylysine, une des difficultés de telles expériences réside dans le contrôle précis des microdépôts et de leur reproductibilité.

⁴Un dépôt de 100 μ M conduirait à fixer plus de 5 molécules par nm^2 , quantité supérieure à la densité maximale d'oligonucléotides pouvant être compactés dans une monocouche $<$ 1,3 molécules par nm^2 (voir l'estimation du paragraphe 5.4).

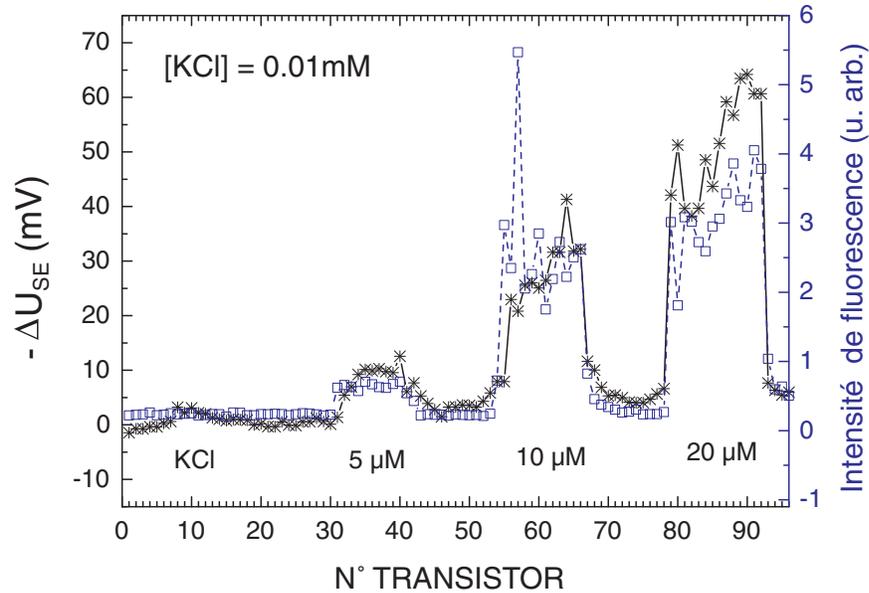


FIGURE 5.3: Signal électronique (courbe en étoiles) et de fluorescence (courbe en carrés) pour des microdépôts d'oligonucléotides de différentes concentrations. Une solution de KCl 0.01 mM ainsi que des solutions de concentrations 5, 10 et 20 μM en oligonucléotides ont été déposées respectivement au niveau des transistors 10, 35, 60 et 85. La mesure électronique est réalisée dans un électrolyte de KCl 0.01 mM. La mesure de fluorescence est réalisée à sec après la mesure électronique. Chaque point de cette courbe correspond à une moyenne de fluorescence sur chaque transistor.

Dans l'expérience présentée en figure 5.3, nous avons déposé trois solutions d'oligonucléotides fluorescents de concentration 5, 10 et 20 μM diluées dans une solution de KCl 0.01 mM. Cette solution a aussi été déposée à la surface du réseau. La courbe en étoiles de la figure 5.3 présente le signal électronique mesuré après dépôt (différence entre une mesure après et avant dépôt). Nous avons représenté ici la variation $-\Delta U_{SE}$ pour comparer directement celle-ci au signal de fluorescence (courbe en carré bleu, sur la figure 5.3)⁵. Nous observons une bonne corrélation entre l'intensité de fluorescence et celle du signal électronique. Les valeurs moyennes des pics électroniques sont respectivement -8 ± 3 mV pour la concentration de 5 μM , -25 ± 6 mV pour 10 μM et -45 ± 10 mV pour 20 μM . Dans cette expérience, la solution de KCl 0.01 mM (dans laquelle sont dilués les oligonucléotides) induit un signal de -3 ± 1 mV. Ce signal "parasite" déjà observé pour des solutions d'eau et de PBS servant aux dilutions des ADN limite la détection pour les basses concentrations en oligonucléotides.

Nous avons reproduit ce type d'expériences plusieurs fois en variant la concentration en oligonucléotides de 1 μM à 100 μM . Les résultats de l'ensemble de ces expériences ainsi que l'évolution de la valeur moyenne pour chaque concentration sont donnés à la figure 5.4. Nous observons une variabilité importante entre les différentes séries de concentration. Même pour une expérience sur une surface donnée, les variations en fonction de la concentration ne sont pas toujours claires. Trois raisons essentielles déjà évoquées précédemment peuvent expliquer de telles variations (cf. 4.4). D'une part, le calcul des signaux moyens correspondant aux pics électroniques ne tient pas

⁵La courbe de fluorescence est obtenue en moyennant la fluorescence sur les surfaces actives conformément à la méthode décrite dans l'appendice C.1

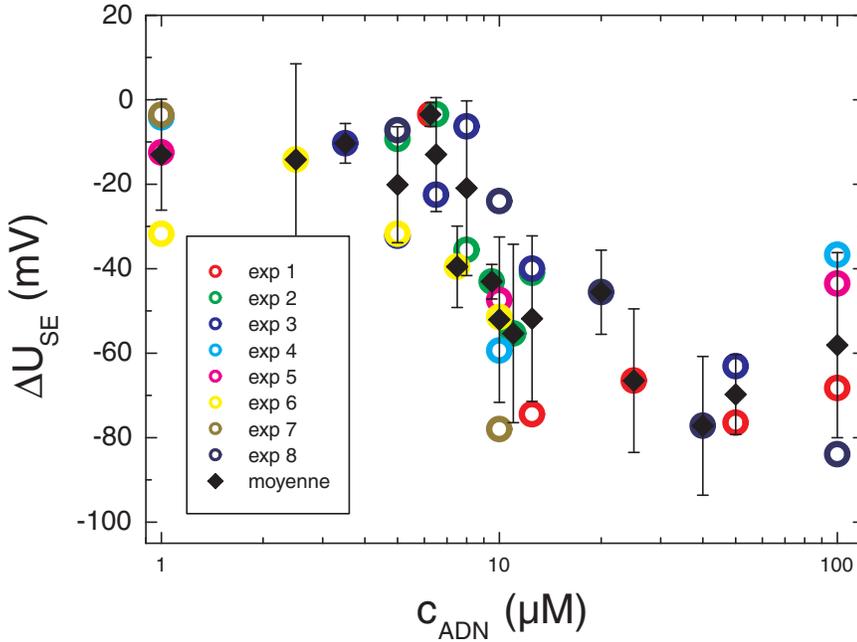


FIGURE 5.4: Variation du signal électronique en fonction de la concentration en oligonucléotides pour des expériences réalisées sur différents réseaux (exp 1 à 8) et la moyenne calculée sur l'ensemble de ces expériences. Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard sur l'ensemble des mesures pour une concentration donnée. Dans le cas d'une seule mesure, elles correspondent à l'incertitude sur le signal moyen.

compte des effets d'inhomogénéité à l'intérieur d'un dépôt. D'autre part, le manque de reproductibilité entre microdépôts conduit à des variations des volumes déposés ainsi que des surfaces couvertes par les dépôts ceci engendre donc des variations concernant les densités surfaciques. Enfin, les expériences étant réalisées sur différents réseaux n'ayant pas nécessairement des états de surface similaires, les quantités de polylysine adsorbées ainsi que les quantités d'ADN peuvent varier d'une structure à l'autre. Malgré ces variabilités nous détectons de manière reproductible des concentrations autour de $10 \mu M$ et le signal semble saturer pour des concentrations supérieures à $40 \mu M$. En supposant que toutes les molécules d'ADN sont fixées sur la couche de polylysine lors du dépôt, nous obtenons pour un microdépôt de concentration $c = 10 \mu M$, de diamètre $d \simeq 100 \mu m$ et de volume $v \simeq 1 nl$ une densité de surface :

$$\sigma = \frac{v * c * N_A}{\pi \frac{d^2}{4}} \simeq 6.10^5 \text{ molécules}/\mu m^2 = 0.6 \text{ molécules}/nm^2$$

Cette valeur de σ est proche de la densité maximale en sondes pouvant être compactée dans une monocouche⁶ (0,15-1,3 molécules par nm^2) et des densités en sondes utilisées dans la techniques des puces à ADN ($\sim 10^5$ sondes/ μm^2).

⁶En supposant les ADN fixés selon leur longueur sur la couche de polylysine la densité maximale d'oligonucléotides de 20 bases pouvant être adsorbés dans une monocouche est alors donnée par $\sigma_1^{mc} = \frac{1}{L * l}$, où L est la longueur d'un oligonucléotide ($L \simeq 20 * 0.34 = 6.8 nm$) et l son diamètre ($l \simeq 1nm$). On obtient une première valeur σ_1^{mc} : $\sigma_1^{mc} = 0.15 \text{ molécules}/nm^2$. En supposant les ADN fixés par une extrémité à la surface on obtient une seconde valeur σ_2^{mc} : $\sigma_2^{mc} = \frac{4}{\pi l^2} = 1.3 \text{ molécules}/nm^2$.

Une densité surfacique de $\sigma = 6.10^5$ molécules/ μm^2 correspond à fixer environ 2.10^7 oligonucléotides par transistor, c'est à dire environ 0.03 femtomole d'ADN (ou encore 4.10^8 bases d'ADN) par FET. Ces chiffres représentent des surestimations de la quantité minimale d'ADN détectable car nous supposons ici que l'ensemble des molécules déposées sont fixées sur la couche polylysine et nous choisissons une valeur limite de détection de $10 \mu M$. Cette valeur pourrait être réduite si nous arrivions entre autre à diminuer les signaux parasites provenant des solutions de dilution avec un contrôle plus précis des conditions de microdéposition.

5.4.2 Expériences en macrodépôts

Nous pouvons aussi faire varier les concentrations en oligonucléotides pour des incubations de macrogouttelettes ($0.5 \mu l$). Nous donnons sur la figure 5.5 l'ensemble des signaux électroniques pour des macrodépôts de concentration en ADN variant de 100 nM à $100 \mu M$ ainsi que l'ensemble des signaux correspondant au tampon de dilution.

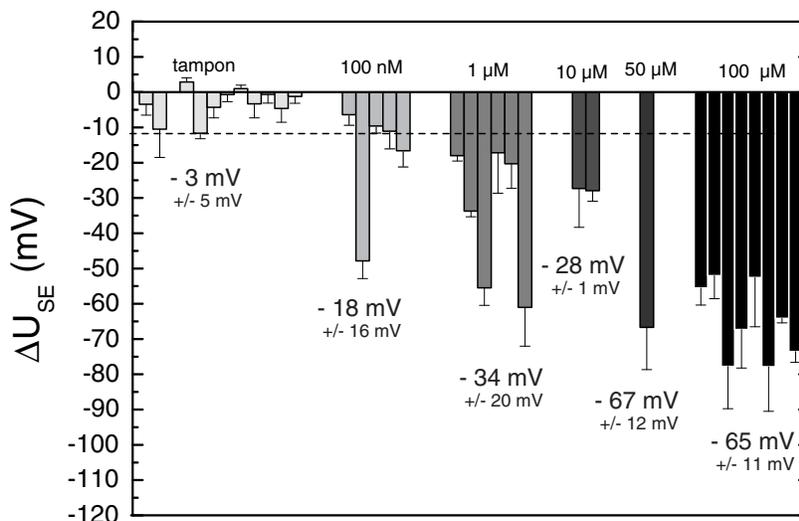


FIGURE 5.5: Ensemble des données collectées pour des incubations de macrogouttelettes d'oligonucléotides et des tampons de dilution. La valeur moyenne ainsi que la déviation standard sont indiquées pour chaque concentration.

Par comparaison au signal maximal obtenu sur un dépôt de tampon (~ -12 mV), nous ne pouvons affirmer la détection de concentration de 100 nM en oligonucléotides car 3 expériences sur 5 donnent une valeur inférieure à cette limite. Par contre, pour l'ensemble des macrodépôts de concentrations supérieures ou égales à $1 \mu M$ nous obtenons un signal électronique plus grand que ce seuil. La sensibilité en concentration pour des macrodépôts de volume $0.5 \mu l$ est donc de l'ordre du μM . Cette sensibilité accrue en concentration vis à vis des microdépôts peut s'expliquer simplement par le rapport volume/surface entre les macrodépôts et les microdépôts. En effet la quantité surfacique d'ADN disponible pour une goutte de volume v , de concentration c se déposant sur une surface s est : $\sigma = \frac{c*v}{s}$. En supposant des dépôts hémisphériques on obtient une densité variant proportionnellement au rayon du dépôt ($\sigma = \frac{c*r}{3}$). Pour des macrodépôts de $0,5 \mu l$ les rayons sont de l'ordre du millimètre c'est à dire 10 fois supérieures au rayon typique des microdépôts. La densité surfacique d'ADN pour un macrodépôt de concentration $1 \mu M$ correspond

donc à celle d'un microdépôt de $10 \mu M$ (seuil limite de détection pour un microdépôt). Nous observons pour ces expériences en macrodépôts des variabilités relativement importantes dans les signaux électroniques pour les faibles concentrations en ADN déposé. L'adsorption d'ADN est dépendante de l'état de charge de la couche de polylysine qui est difficilement contrôlable pour des préparations sur des structures de transistors différentes. Nous obtenons comme pour les expériences en microdépôts, des variabilités dans les seuils de détection et des différences importantes des signaux électroniques pour des macrodépôts de même concentration.

5.5 Variation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure

Les détections d'oligonucléotides présentées dans les paragraphes précédents ont toutes été réalisées à bas sel (concentration de 0.01 mM en KCl). La détection de molécules d'ADN adsorbées sur la couche de polylysine est fonction de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure. Nous pouvons de manière analogue aux expériences menées sur la polylysine étudier ces effets en augmentant la concentration en sel par ajout progressif d'une solution concentrée de KCl dans l'électrolyte de mesure.

Dans l'expérience dont les résultats sont présentés sur la figure 5.6, cinq microdépôts de concentrations différentes en oligonucléotides ont été déposés à la surface du réseau de 96 transistors. Des solutions de concentration 6.25, 12.5, 25, 50 et $100 \mu M$ en ADN (oligonucléotides 20 bases) ont été déposées respectivement au niveau des transistors 18, 32, 48, 62 et 80. Nous commençons cette série en sel par une mesure à 0.01 mM en KCl. Le dépôt de concentration $6,25 \mu M$ présente un signal électronique très faible (~ -3 mV). Cette faible valeur comparée à celle correspondant au dépôt de concentration double ($12,5 \mu M$) induit un doute quant à ce dépôt. Le pic correspondant à la concentration $25 \mu M$ présente des effets de bords importants (sur-concentration en bord de goutte) et la valeur moyenne pour ce pic (~ -50 mV) est donc inférieure aux trois autres dépôts qui saturent à une valeur d'environ -70 mV. Comme souligné dans le paragraphe précédent, les variabilités des quantités d'ADN réellement déposées font apparaître des difficultés pour obtenir des mesures reproductibles en fonction de la concentration en ADN.

Nous pouvons alors réaliser une série en sel sur ce réseau en augmentant la concentration en KCl par décade jusqu'à une concentration finale de 10 mM. Nous observons une montée générale du signal ΔU_{SE} et une diminution progressive des intensités des pics d'ADN. Pour une concentration de 10 mM les décalages pour l'ADN sont de l'ordre de 25 mV. A partir de ces courbes, l'évolution de ΔU_{SE} en fonction de la concentration en sel peut être déduite pour l'ensemble des différents pics d'ADN ainsi que pour la surface de polylysine⁷ (figure 5.7). La variation de la tension de la tension ΔU_{SE} est ajustée en utilisant la relation 4.1 présentée au chapitre précédent. Cet ajustement permet d'obtenir une charge effective de l'interface pour la couche de polylysine ainsi que pour l'ensemble des dépôts d'oligonucléotides (encadré, figure 5.7).

⁷Les signaux électroniques pour chaque dépôt d'ADN sont moyennés ainsi que ceux des zones vierges de tout dépôt (surface de polylysine "nue").

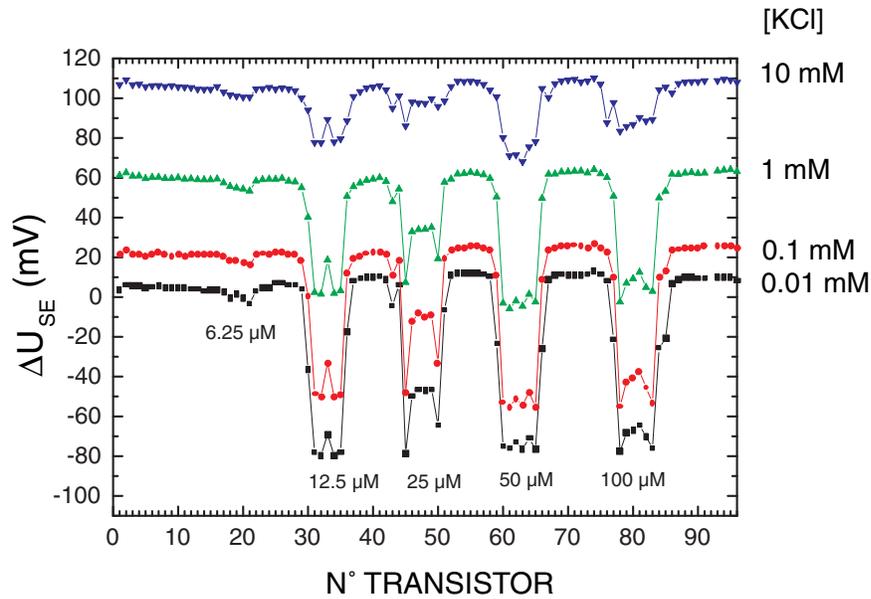


FIGURE 5.6: Série en sel sur des microdépôts d'oligonucléotides de différentes concentrations (6.25, 12.5, 25, 50 et 100 μM) déposés à la surface d'un réseau de 96 transistors préalablement recouvert d'une couche de polylysine. La concentration en sel de l'électrolyte de mesure a été variée de 0.01 mM à 10 mM. La mesure de référence correspond à la mesure effectuée avant le dépôt sous 0.01 mM en KCl.

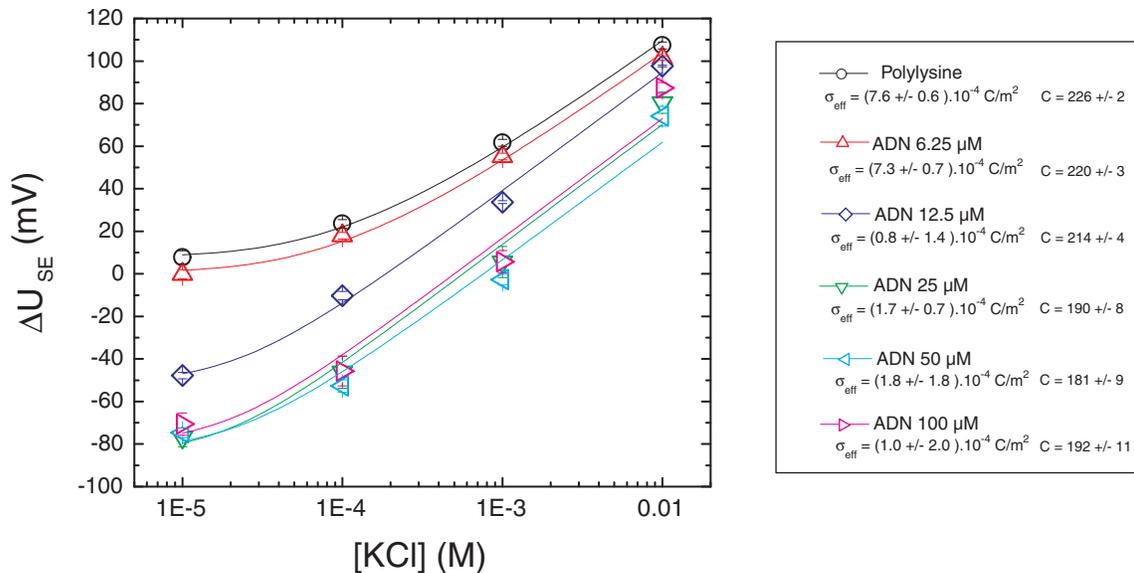


FIGURE 5.7: Evolution de ΔU_{SE} en fonction de la concentration en sel pour l'ensemble des dépôts d'ADN et la surface de polylysine "nue". Les courbes continues représentent l'ajustement des points expérimentaux selon la relation 4.1 du chapitre 4.5.2. Les valeurs obtenues par cet ajustement pour les charges effectives (σ_{eff}) et les constantes (C) sont données dans l'encadré.

Les charges effectives pour les dépôts d'ADN de concentration 12.5, 50 et 100 μM sont similaires ($\sim 1.5 \times 10^{-4} C/m^2$) et inférieures à celle de la surface de polylysine nue ($7.6 \times 10^{-4} C/m^2$). Les pics électroniques correspondant à ces dépôts étant saturés (cf. figure 5.6) les quantités d'ADN fixées à la surface lors de ces dépôts sont donc proches de la quantité maximale d'ADN pouvant être adsorbée sur la surface de polylysine (quantité saturante). Aucune différence n'est alors attendue pour les charges effectives de ces différents dépôts. Pour le dépôt de 25 μM , le pic n'étant pas saturé, la quantité d'ADN adsorbée est inférieure à la quantité saturante. Nous obtenons bien pour ce dépôt une charge effective ($1.5 \times 10^{-4} C/m^2$) plus faible que celles des trois dépôts précédents. Enfin nous obtenons pour le dépôt de 6.25 μM , pour lequel la quantité d'ADN adsorbée peut être supposée faible, une charge effective ($7.3 \times 10^{-4} C/m^2$) proche de celle de la surface de polylysine nue. L'apport de charges négatives, liée à l'adsorption d'ADN, tend donc à neutraliser la charge effective initiale de la surface "nue" similairement à l'adsorption de polylysine sur la surface d'oxyde. Mais les constantes ajustées diffèrent ici entre la surface de polylysine et les dépôts d'ADN. Ceci tend à indiquer une modification de la couche condensée de biopolymères. Les signaux électroniques sont donc dus à la fois à une variation de l'écrantage de l'interface par l'électrolyte (due à une modification de la charge effective de l'interface) ainsi qu'à une modification dans la couche condensée.

Après cette première série, nous pouvons revenir à bas sel en rinçant la structure avec de l'eau déionisée et recommencer une nouvelle série en sel en variant la concentration de 0.01 mM à 10 mM. Les résultats de cette seconde série en sel sont présentés sur la figure 5.8a. Les signaux électroniques avant la première série en sel, après la première série en sel et après la seconde série en sel ont été reportés sur la figure 5.8b.

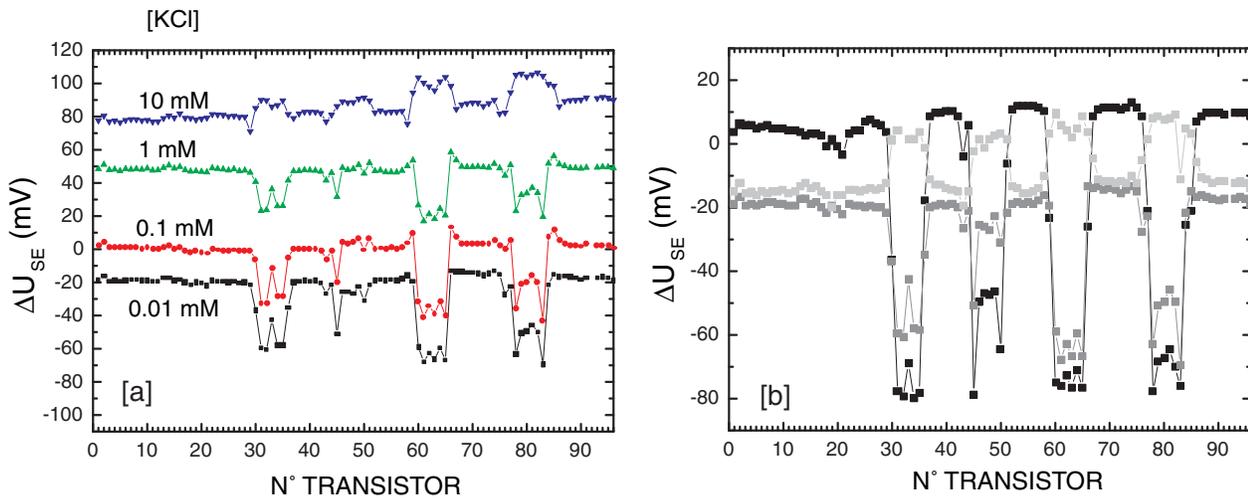


FIGURE 5.8: [a] : Seconde série en sel [0.01mM;10mM]. [b] Comparaison des signaux électroniques à 0.01 mM en KCl : avant les séries en sel (noir) ; après la première série en sel (gris foncé) ; après la seconde série en sel (gris clair).

Les signaux électroniques (à 0.01 mM) correspondant aux dépôts d'ADN après la première série en sel (gris foncé, fig. b) sont inférieures aux signaux électroniques avant la première série en sel (noir, fig.b). Contrairement aux séries en sel sur la polylysine il existe une modification des signaux électroniques après une augmentation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure et un retour à bas sel. Sur la seconde série en sel nous observons même une inversion

des pics d'ADN pour la mesure à 10 mM en KCl (fig. a). Cette inversion est encore présente pour la mesure à 0.01 mM réalisée après rinçage de la structure avec de l'eau déionisée (gris clair, fig.b). La diminution de la hauteur des pics pourrait être attribuée à une perte d'ADN au cours de la série en sel ou au moment du rinçage à l'eau déionisée. Mais comment expliquer dans ce cas l'inversion des pics ? Il faut sans doute envisager une modification de conformation de la couche d'ADN adsorbés sur la polylysine. En effet en augmentant le sel les interactions entre la polylysine et l'ADN sont modifiées du fait d'un écrantage des charges de ces deux polymères. Ceci pourrait alors conduire à une conformation différente de la couche d'ADN sur la polylysine après une augmentation en sel. Un tel phénomène ne pourra être décrit de manière détaillée qu'en étudiant la conformation des polymères à l'interface⁸. Le modèle décrit au chapitre précédent ne peut rendre compte de ces inversions. Pour parvenir à décrire de manière plus satisfaisante ces expériences il faudra introduire dans le modèle l'épaisseur finie de la couche de biopolymères et considérer la conformation des polymères en fonction du sel. Ceci conduira à une nouvelle définition de la charge effective (σ_{eff}) et de la constante (C) qui devront être fonction du sel⁹.

⁸Un suivi de fluorescence pourrait aussi permettre de déterminer si il existe une perte ou non d'ADN à l'interface lors de ces séries en sel.

⁹Nous observons déjà sur la première série en sel un ajustement des points expérimentaux pas totalement satisfaisant pour les dépôts d'ADN. Cet ajustement suppose en effet une charge effective et une constante indépendante du sel.

Chapitre 6

Détection électronique d'ADN double brin issus de PCR et application à la détection d'une mutation

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode d'amplification enzymatique permettant de fabriquer en grande quantité de multiples copies d'un segment spécifique d'ADN (cf. appendice D). Le but des expériences décrites dans ce chapitre est de mettre en évidence la possibilité de détecter des molécules d'ADN double brin issues d'une synthèse par PCR. L'apport d'une telle démarche par rapport aux études menées précédemment avec les oligonucléotides est triple. Tout d'abord, cela constituerait, avec notre système de mesure électronique, la première détection de molécules d'ADN double brin. Pour l'instant, nous avons mis en évidence uniquement la détection de courts fragments d'ADN simple brin (oligonucléotides ~ 20 bases). Ensuite, l'achat d'oligonucléotides commerciaux ne nous donne pas accès à la connaissance complète du milieu dans lequel évoluent ces molécules. En réalisant nous mêmes la synthèse de produits PCR et leur purification, nous pouvons contrôler de manière précise les solutions dans lesquelles sont éluées les ADN synthétisés. L'utilisation de produits issus de PCR permet alors la mise en évidence de la sensibilité du système aux molécules d'ADN et non à d'autres espèces présentes dans le milieu. Enfin, compte-tenu des nombreuses possibilités offertes par la synthèse PCR, cette étude apparaît comme une étape préliminaire en vue d'applications futures de notre capteur. Nous avons couplé cette détection avec un protocole biologique de PCR spécifique à la détection de mutation démontrant ainsi la possibilité d'utiliser notre capteur comme un système d'analyse de produits génomiques complexes [85]. Cette étude sur les produits PCR est aussi une étape préliminaire importante pour les études futures de l'hybridation entre des oligonucléotides et des fragments PCR ou encore entre fragments PCR.

6.1 Détection d'ADN double brin issu d'une synthèse par PCR

6.1.1 Une optimisation nécessaire

La réaction de PCR requiert un grand nombre de réactifs : sels, oligonucléotides, bases, ADN substrat, polymérase. A l'issue de la PCR, tous les réactifs n'ayant pas été consommés, on effectue une étape de purification permettant d'éliminer du milieu réactionnel sels, nucléotides non-incorporés, et amorces afin de ne conserver que les ADN synthétisés. Chacun de ces produits est susceptible de donner un signal électronique sur les transistors, même en très faible quantité. Pour illustrer le cheminement expérimental suivi pour arriver à une détection électronique spécifique de produits PCR, nous détaillons dans la suite les tests préalables effectués sur les divers produits utiles à la synthèse et à la purification des fragments d'ADN. Les expériences d'optimisation ont été réalisées en utilisant un fragment d'ADN double brin ($\sim 1\text{kb}$) issu d'une synthèse PCR sur le substrat $\lambda\text{BstE-II}$ digéré.

6.1.2 Test des tampons de purification

Nous avons d'abord testé l'influence des différents tampons utilisés lors de la purification des fragments d'ADN synthétisés. Le "kit" de purification sur colonne que nous utilisons (QIAquick, QIAGEN) comporte trois étapes : une étape de fixation de l'ADN sur une membrane selective utilisant le tampon PB, une étape de lavage sur cette membrane grâce à un tampon PE (mélange éthanolé permettant l'élimination des sels et autres fragments résiduels) et enfin une étape de récupération de l'ADN où toutes les molécules d'ADN synthétisées sont alors éluées dans un tampon EB (TrisHCl 10mM, pH=8.5).

Pour tester l'influence de l'ensemble de ces tampons, nous avons déposé successivement plusieurs macrodépôts contenant ces différentes solutions sur une même structure préalablement recouverte de polylysine. De manière à comparer ces signaux électroniques à un signal d'ADN, nous avons aussi incubé une solution d'oligonucléotides (100 μM , 20 bases) diluée dans le tampon EB. Les résultats sont présentés dans le tableau ci dessous :

	PE	PB	EB	oligos dans EB
décalage (mV)	-2.5 ± 1.1	-3.6 ± 1.4	-2.6 ± 1.4	-126 ± 8

TABLEAU 6.1: Bruit lié aux tampons utilisés dans le protocole de purification et comparaison à un signal d'oligonucléotides (100 μM , 20 bases) élué dans du TrisHCl 10 mM (tampon EB).

Nous avons déjà évoqué les signaux parasites engendrés par différentes solutions salines sur une couche de polylysine (cf. paragraphe 5.3). Les résultats obtenus ici confirment que le signal reste faible pour l'ensemble des tampons de purification : les décalages sont en effet de l'ordre de $-3 \text{ mV} \pm 2 \text{ mV}$. Cette valeur correspond au seuil de détection pour les fragments PCR et, comme pour les oligonucléotides, limite la possibilité de mesurer de faibles concentrations de produits PCR. Le macrodépôt correspondant à la solution concentrée d'oligonucléotides induit un décalage de l'ordre de -120 mV , valeur 20 à 40 fois supérieure au décalage moyen associé au dépôt du EB pur. Ces résultats montrent que les produits de purification sont compatibles avec

notre technique de détection électronique et que nous pouvons conserver la solution EB comme tampon d'éluion des ADN en fin de PCR.

6.1.3 Test de purification des oligonucléotides

Un autre test préliminaire est nécessaire pour s'assurer qu'après purification des produits synthétisés par PCR, les oligonucléotides servant d'amorces ne sont plus quantitativement présents dans le milieu et n'induiront donc aucun signal électronique significatif. La spécification du kit de purification précise que pour des fragments de longueur inférieure à 40 bases, le taux d'élimination est supérieur à 99%. Pour tester la purification des oligonucléotides, nous avons donc réalisé une solution mère d'oligonucléotides (oligos[0]) de concentration $50 \mu\text{M}$ et de longueur 20 bases (dilution dans le buffer EB) à partir de laquelle nous avons obtenu trois tubes correspondant à cette même solution purifiée à l'aide du kit une, deux et trois fois (oligos[1], oligos[2], oligos[3]).

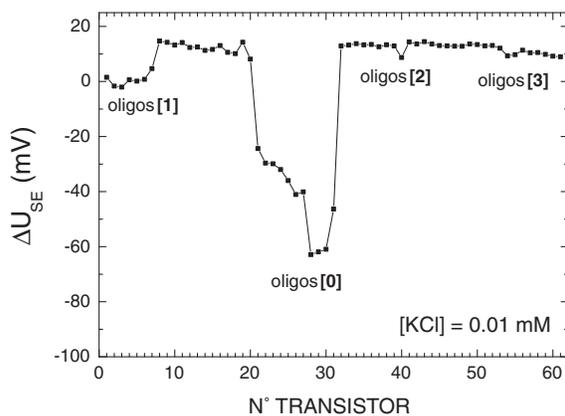


FIGURE 6.1: Signal électronique pour des macrodépôts d'oligonucléotides purifiés.

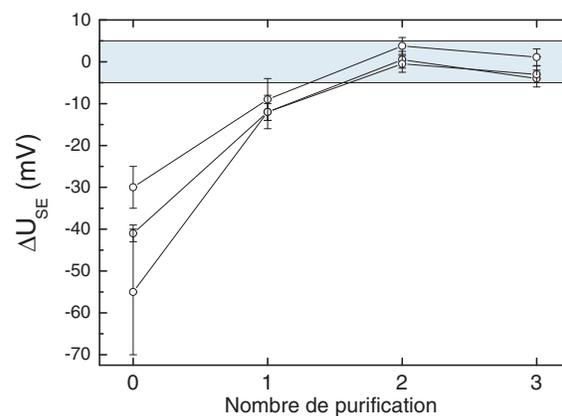


FIGURE 6.2: Evolution du signal électronique en fonction du nombre de purifications pour trois expériences différentes.

La figure 6.1 représente la détection de ces quatre solutions sur le capteur comportant 62 transistors. Nous observons un signal significatif pour la solution non purifiée ainsi que pour la solution purifiée une fois à l'aide du kit. Des expériences similaires ont été réalisées sur deux autres structures. La figure 6.2 montre l'évolution du signal électronique en fonction du nombre de purification pour l'ensemble de ces expériences : après deux et trois purifications le signal électronique est comparable aux signaux des tampons ($\pm 5 \text{ mV}$) par contre il reste un décalage significatif pour la solution purifiée une seule fois ($\sim -15 \text{ mV}$). Pour une concentration initiale de $50 \mu\text{M}$, il devrait, selon les spécifications, rester environ $0,5 \mu\text{M}$ d'oligonucléotides. Cette concentration est proche de la limite de détection pour des macrodépôts d'oligonucléotides (cf. 5.3). Bien que les concentrations en amorce utilisées pour les PCR soient inférieures à $1 \mu\text{M}$ (bien inférieures à celle utilisée pour ce test de purification) nous préférons dans nos expériences purifier les produits PCR deux fois de suite pour réduire au maximum les quantités résiduelles en oligonucléotides, bases¹ et enzymes.

¹La concentration en base lors de la PCR est de l'ordre de $200 \mu\text{M}$ et correspondrait en terme de base à

6.1.4 Influence du substrat

Nous devons aussi considérer la présence de l'ADN substrat² à partir duquel sont amplifiés les fragments PCR. L'avantage de la technique PCR réside dans la possibilité d'obtenir à partir d'une faible quantité de substrat de multiples copies d'ADN (cf. appendice D). Nous pouvons donc réduire suffisamment les quantités d'ADN substrat pour être sûr que celui-ci n'induit aucun signal électronique. Pour le substrat λ BstE-II, nous observons un signal significatif pour une concentration de 20 ng/ μ l et aucun signal pour des concentrations \leq 400 pg/ μ l (cf. tableau 6.2). La concentration de 400 pg/ μ l est déjà élevée pour une PCR et peut être réduite d'un facteur 1000 sans difficulté.

concentration substrat	20 ng/ μ l	400 pg/ μ l	40 pg/ μ l	4 pg/ μ l
décalage (mV) (n expériences)	-71 \pm 20 (4)	-7 \pm 2 (3)	-9 \pm 2 (2)	-5 \pm 3 (2)

TABLEAU 6.2: Signaux électroniques pour le substrat λ BstE-II

Nous pouvons comparer la quantité détectée pour le substrat λ BstE-II à la sensibilité en concentration d'oligonucléotides. Dans ces expériences, nous détectons une concentration de 20 ng/ μ l en ADN double brin et ne détectons pas la concentration de 400 pg/ μ l. En terme de bases, ces deux concentrations correspondraient respectivement à des solutions de 3 μ M et 60 nM en oligonucléotides de 20 bases. Cette "fenêtre" de concentration correspond à la zone limite de détection en macrodépôts pour des oligonucléotides (cf. 5.4.2). Nous obtenons donc des seuils de sensibilité concordant entre l'ADN double brin et l'ADN simple brin. Pour étudier les dépendances du signal électronique en fonction de la structure de l'ADN (double brin ou simple brin), il faudrait affiner les valeurs correspondant aux deux échantillons (oligonucléotides/substrat). Nous avons déjà évoqué les variabilités des seuils de détection pour des expériences sur les oligonucléotides (cf. 5.4), ce type de variations (\sim un ordre de grandeur) est donc un facteur limitant la comparaison précise entre des échantillons d'ADN simple et double brin. Sans contrôler de manière plus précise l'adsorption d'ADN, il nous est pour l'instant impossible de mettre en évidence une différence en fonction de la structure de l'ADN.

6.1.5 Détection d'un ADN de 1009 paires de base

Les tests préalables menés sur la purification et l'influence du substrat permettent d'envisager une détection spécifique de produits PCR. Nous avons effectué les premières détections sur un fragment double brin de 1009 paires de base issu d'une PCR sur le substrat λ BstE-II digéré (le protocole de cette PCR est donné en appendice D.2).

Pour confirmer la spécificité aux produits synthétisés, nous réalisons une PCR sur deux tubes A et B. Ces deux solutions possèdent le même contenu nécessaire à la PCR (amorces, enzymes, sels, nucléotides, substrat) excepté pour un des quatre nucléotide qui est manquant dans la solution B. Après avoir thermocyclé ces solutions et les avoir purifiées deux fois à l'aide de la colonne QIAquick, nous déposons les deux solutions à la surface d'un réseau préalablement recouvert de

une solution de concentration de 10 μ M d'oligonucléotides (20 bases). De même que pour les oligonucléotides, nous pouvons donc affirmer qu'après une double purification des produits PCR, les quantités résiduelles en bases n'induiront aucun signal électronique sur les transistors.

²Contrairement aux autres produits utiles à la PCR, les substrats d'ADN ne sont pas purifiés en fin de PCR.

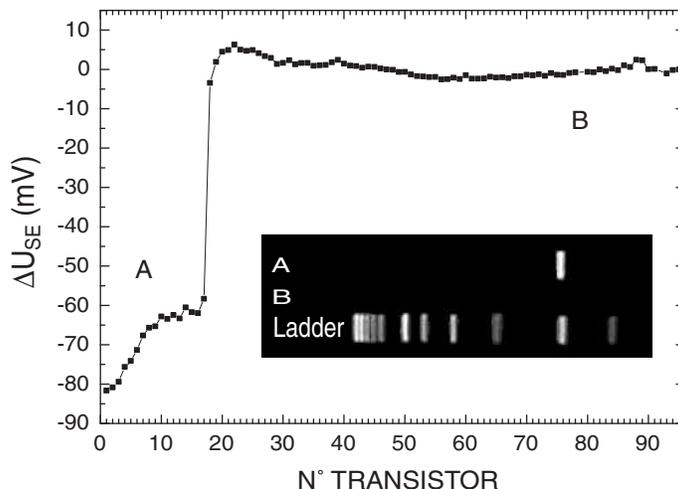


FIGURE 6.3: Détection électronique d'un ADN double brin A (déposé sur la partie gauche du réseau) et comparaison à une référence B (déposée sur la partie droite du capteur). La détection électronique est réalisée dans un électrolyte de mesure de 0.01 mM en KCl. En insert, la quantification sur gel des deux produits A et B vis à vis d'une référence (1kb ladder Promega).

polylysine. Nous obtenons un signal électronique spécifique pour la solution correspondant aux produits issus du tube A ($-71 \text{ mV} \pm 9 \text{ mV}$) vis à vis de la solution issue du tube B ($-3 \text{ mV} \pm 3$). La seule différence entre ces deux tubes est la présence de l'ADN double brin synthétisé par PCR à partir de la solution A. Le tube B sert ici de référence car la base manquante interdit la production de fragments PCR à partir de cette solution. Une quantification sur gel (cf. insert figure 6.3) donne une valeur approximative de $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ pour la concentration en ADN synthétisé à partir du tube A.

Dans cette expérience, nous avons donc montré la possibilité de détecter de manière spécifique sur notre capteur des fragments d'ADN double brin issus d'une PCR vis à vis d'une référence cyclée avec les mêmes produits et dans les mêmes conditions mais n'ayant pas abouti à la génération d'un fragment PCR. La moyenne sur une dizaine d'expériences similaires confirme ces résultats : nous obtenons une détection spécifique de l'ADN double brin ($-90 \text{ mV} \pm 20 \text{ mV}$) comparé à la référence (de l'ordre de -3 mV).

6.1.6 Détection d'autres ADN issus de PCR

Nous avons reproduit ce type d'expériences sur d'autres échantillons d'ADN. La figure 6.4 présente la détection d'un fragment PCR correspondant à un gène de souris (ADNc, 600 pb)³. Dans cette expérience nous utilisons des bases fluorescentes lors de la PCR et nous observons pour la zone fluorescente correspondant à la solution contenant les ADN synthétisés un signal électronique spécifique de la présence d'ADN contrairement à la zone où a été déposée la solution de référence (produit thermocyclé avec une base en moins). De manière similaire, la figure 6.5 présente la détection spécifique d'un fragment de 10 000 paires de bases⁴.

³Cette PCR est réalisée à partir d'un plasmide et son protocole est donné en appendice D.3

⁴Le protocole de cette PCR est lui aussi donné à l'appendice D.4

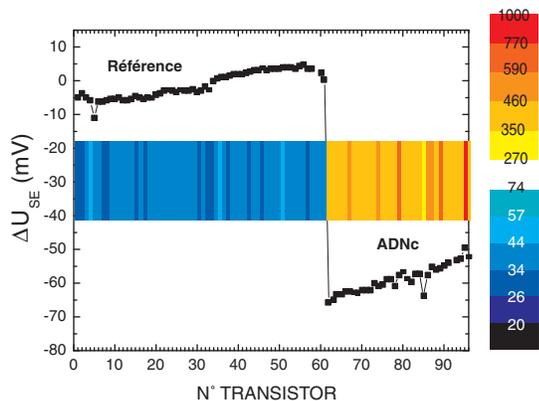


FIGURE 6.4: Détection électronique d'un ADNc correspondant à un gène de souris. Le code de couleur correspond au signal de fluorescence (unités arbitraires).

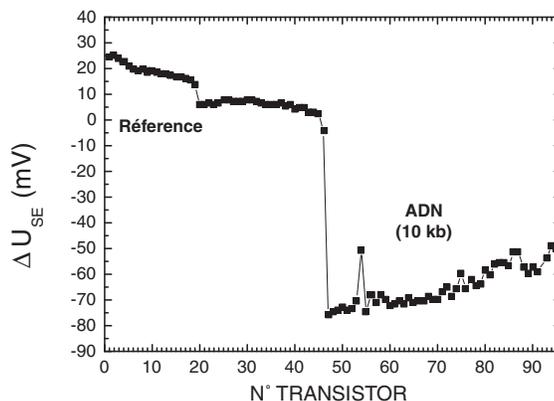


FIGURE 6.5: Détection électronique d'un ADN de 10 000 paires de base (ADN 10 kb). La référence correspond à un tube cyclé et purifié dans lequel on avait préalablement supprimé une base.

Ces premières études sur les fragments PCR ont été réalisées en déposant de fortes concentrations en fragments PCR ($\sim 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$). La surface est alors saturée d'ADN et nous observons un signal électronique saturé équivalent pour les fragments PCR de différentes longueurs. Nous avons commencé des expériences en variant la concentration en produits PCR pour étudier les dépendances en fonction de la longueur de l'ADN. Ces expériences nécessitent une quantification précise par fluorescence des ADN adsorbés et nous n'avons pour l'instant pu aboutir à des résultats concluants.

6.2 De la détection électronique de fragments PCR à la détection d'une mutation

De nombreux tests biologiques utilisent des protocoles de PCR pour amplifier et analyser des échantillons complexes d'ADN. En effectuant une PCR sur l'ensemble des ADN d'une banque⁵, on peut déterminer ceux d'entre eux qui contiennent une séquence particulière d'ADN. Le résultat d'un tel test est "en tout ou rien" (test positif ou négatif) : la présence finale d'un fragment PCR (test positif) démontre l'existence de la séquence recherchée dans l'ADN analysé, tandis que l'absence de produits PCR (test négatif) démontre l'inexistence de cette séquence dans l'ADN considéré. La PCR intervient dans la majorité des protocoles biologiques pour la détection de mutations et pour l'étude de changements d'une base unique dans une séquence génétique⁶[86, 87]. Par exemple, dans la technique dénommée allèle-spécifique PCR⁷, des amorces sélectives à la séquence mutée sont utilisées dans la PCR pour amplifier de manière spécifique les allèles mutantes de gènes. Nous venons de montrer la possibilité de détecter, sur notre capteur, des fragments de PCR (test positif) vis à vis d'une référence cyclée avec les mêmes produits et dans

⁵Par exemple une banque d'ADNc regroupant l'ensemble des clones de gènes d'un organisme vivant.

⁶Ce type de polymorphisme d'une base est couramment appelé "SNP" en anglais (Single Nucleotide Polymorphism).

⁷traduction littérale du terme anglais : allele-specific PCR.

les mêmes conditions mais n'ayant pas abouti à la génération d'un fragment PCR (test négatif). Nous allons dans la suite appliquer ce type de détection à des produits issus d'une allèle-spécifique PCR et montrer la possibilité de détecter un changement d'une base unique dans un substrat génomique humain.

6.2.1 Protocole biologique : allèle-spécifique PCR

Nous avons travaillé sur une mutation particulière du gène CX-26. Cette mutation dénommée 35delG consiste en la délétion d'une base unique (une base "G") entraînant l'apparition d'un codon stop dans la séquence du gène codant pour la protéine humaine connexine 26 (cf figure 6.6). Des études génétiques récentes ont montré que des mutations de ce gène sont responsables de surdités isolées prélinguales⁸, et que la mutation 35delG est présente chez 70% des sujets atteints dans les populations européennes [88, 89]. Les substrats utilisés dans ces expériences nous ont été fournis par l'équipe de D. Weil et C. Petit à l'Institut Pasteur. Ces produits provenant de différents patients ont été séquencés par ailleurs pour déterminer la présence ou l'absence de la mutation 35delG⁹.

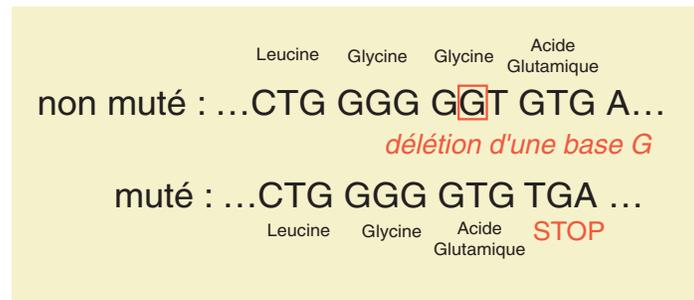


FIGURE 6.6: Mutation 35delG du gène CX-26.

Le protocole biologique se décompose en deux parties : une première étape de préamplification du fragment d'ADN correspondant au gène CX-26 et une deuxième étape permettant de détecter de manière spécifique la présence de la mutation : allèle-spécifique PCR (cf figure 6.7).

Préamplification du gène CX-26

Nous amplifions tout d'abord sélectivement un fragment de 940 paires de base correspondant au gène CX-26¹⁰. Cette amplification est réalisée par une PCR en utilisant les amorces et les conditions de thermocyclage décrites dans [88] et [90] en utilisant une ADN polymérase à haute fidélité (PwO polymérase, Roche Diagnostics) et dans un tampon de 1.5 mM MgSO₄. Les produits PCR ainsi synthétisés sont ensuite purifiés en utilisant le kit de purification sur colonne (QIAQuick, QIAGEN) et servent de substrat pour une allèle-spécifique PCR après dilution d'un

⁸Une surdité isolée signifie qu'elle n'est associée à aucun autre symptôme (on peut aussi la qualifier de non syndromique) et prélinguale signifie qu'elle est présente chez l'enfant avant l'âge d'acquisition du langage parlé (pour plus de détail voir le rapport d'activité de l'équipe de C. Petit <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR1999/Gds.html>).

⁹Plus précisément, la région correspondante au gène CX-26 a été séquencée pour déterminer toutes les mutations affectant ce gène.

¹⁰code accession M86849, chromosome 13q11-12.

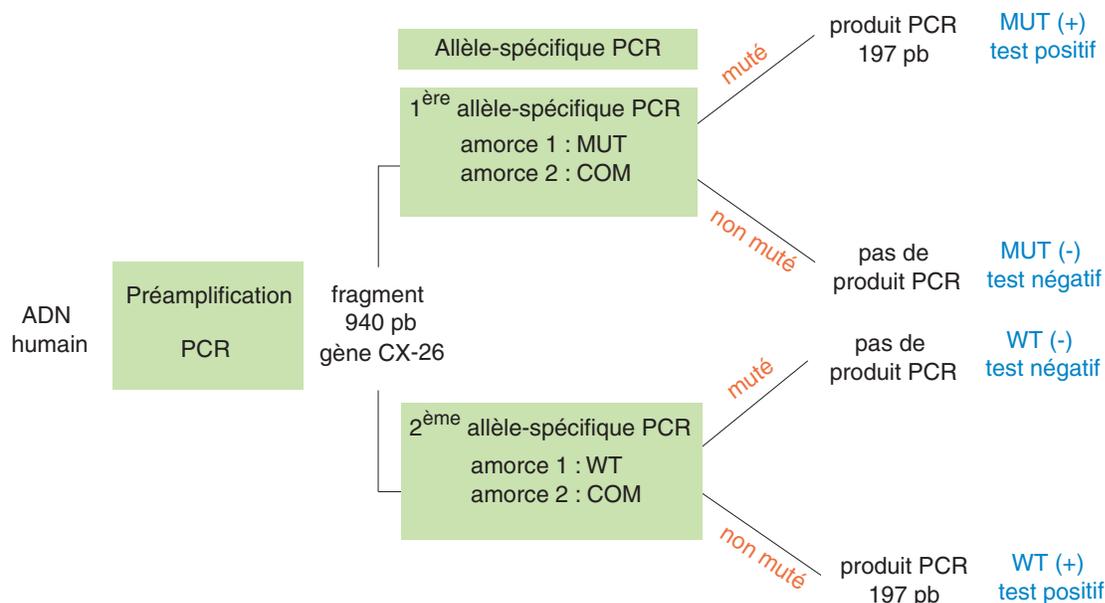


FIGURE 6.7: Protocole biologique pour la détection de la mutation 35delG du gène CX-26

facteur 10^4 . Nous effectuons cette étape de préamplification et de dilution pour réduire les quantités de substrats génomiques et être sûr que les quantités résiduelles de substrat génomique n'induiront aucun signal électronique lors de la détection des produits issus de l'allèle-spécifique PCR.

Allèle-spécifique PCR

Pour détecter la mutation 35delG, nous réalisons sur ce fragment de 940 paires de base un protocole d'allèle-spécifique PCR en utilisant des amorces sensibles à la mutation 35delG. Les séquences utilisées pour les amorces ainsi que les conditions de thermocyclage sont identiques à celles décrites par Lucotte et al [91]. Typiquement, nous réalisons deux allèle-spécifique PCR sur chaque substrat. La première utilise une amorce spécifique pour la détection de la mutation (MUT) et une amorce conjointe (COM). Cette réaction génère un produit PCR de 197 paires de base (test positif) si le substrat présente la mutation et ne génère en principe aucun¹¹ produit (test négatif) si la mutation n'est pas présente dans le substrat (voir figure 6.7). La seconde allèle-spécifique PCR utilise une amorce spécifique à la séquence non mutée (WT) avec la même amorce conjointe (COM) que dans le cas précédent. Cette réaction engendre un produit PCR de 197 paires de base en l'absence de mutation et n'engendre aucun produit PCR en présence de la mutation. Les résultats de ces deux allèle-spécifique PCR permettent de déterminer le caractère génétique du patient (ou génotype) pour la mutation 35delG : homozygote normal, hétérozygote ou homozygote¹² pour la mutation (cf. tableau 6.3 ci-dessous).

¹¹De faibles quantités de produits sont tout de même amplifiés, la spécificité de la PCR n'étant pas de 100%.

¹²Chaque gène existe en deux exemplaires (un par chromosome), l'un d'origine paternel, l'autre d'origine maternelle. Chaque gène peut posséder différentes séquences dites allèles (de 2 à plusieurs centaines). Si les deux allèles du gène sont identiques, le génotype est homozygote pour ce gène. Si les deux allèles sont différentes, le génotype est dit hétérozygote.

1ère allèle-spécifique	2ème allèle-spécifique	caractère génétique du patient
MUT (-)	WT(+)	homozygote normal
MUT (+)	WT(+)	hétérozygote pour la mutation
MUT (+)	WT(-)	homozygote pour la mutation

TABLEAU 6.3: Correspondance entre les tests (positifs/négatifs) et le caractère génétique du patient

Pour un volume final de 50 μl , les réactifs sont employés dans les proportions suivantes : 1 μl d'ADN substrat issu de la préamplification, 1 μl de TAQ polymérase (1U/ μl , Roche Diagnostics) et des quantités de 30 pmol pour les amorces et 5 nmol pour chaque base. Les solutions produites à la fin de ce protocole sont ensuite purifiées sur colonne et élués dans le tampon EB (10 mM Tris-HCl pH=8,5) du kit de purification.

6.2.2 Détection électronique : mise en évidence de la mutation

Nous souhaitons, dans un premier temps, déterminer la présence de la mutation sur au moins une des allèles chromosomiques de deux patients différents (p1 et p2). Pour cela nous réalisons la première allèle-spécifique PCR (amorces MUT et COM) en utilisant les fragments d'ADN préamplifiés à partir des substrats génomiques de ces deux patients. Après la réaction et la purification des produits, nous appelons MUTp1 la solution obtenue à partir de l'ADN génomique du premier patient et MUTp2 la solution obtenue à partir de l'ADN du second patient. Pour tester la présence de produits PCR dans ces deux solutions, nous avons incubé deux macrodépôts contenant ces solutions sur la surface d'un réseau de 96 transistors préalablement couvert de polylysine. La courbe de la figure 6.8 présente la variation ΔU_{SE} après dépôt de ces deux solutions.

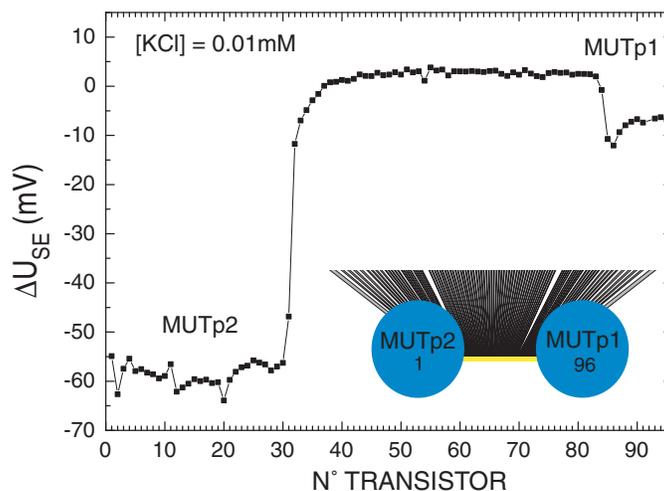


FIGURE 6.8: Signaux électroniques de deux produits issus d'une allèle-spécifique PCR à partir de substrats génomiques humains de deux patients différents.

La partie gauche (~ 30 premiers transistors) correspondant au patient 2 montre un décalage de l'ordre de -60 mV par rapport à la partie centrale. Ceci indique la présence d'un produit PCR final. Le test MUTp2 est positif : ce patient possède donc au moins une allèle mutée. Sur la

partie droite (12 derniers transistors), le dépôt est une solution issue de l'allèle spécifique PCR sur l'ADN du patient 1. Le décalage est de l'ordre de -10 mV. Dans la limite du bruit de notre expérience, ce décalage n'est pas significatif de la présence d'un produit PCR. Nous pouvons conclure que le test MUTp1 est négatif et que ce patient ne possède aucune allèle mutée. Cette détermination électronique peut être vérifiée sur gel.

Pour déterminer le caractère génétique complet de ces deux patients, nous avons effectué la seconde allèle-spécifique PCR avec les amorces WT et COM. A la fin du protocole biologique nous obtenons deux nouvelles solutions. Nous noterons WTp1 la solution résultant de cette allèle-spécifique PCR sur le substrat génomique du patient 1 et WTp2 celle correspondant au second patient. En utilisant un réseau de 62 transistors, nous pouvons déposer sur une même puce ces deux solutions ainsi que les solutions MUTp1 et MUTp2. La configuration d'un tel dépôt est schématiquement représentée sur la figure (6.9a) et la mesure électronique après incubation de ces solutions sur la figure (6.9b).

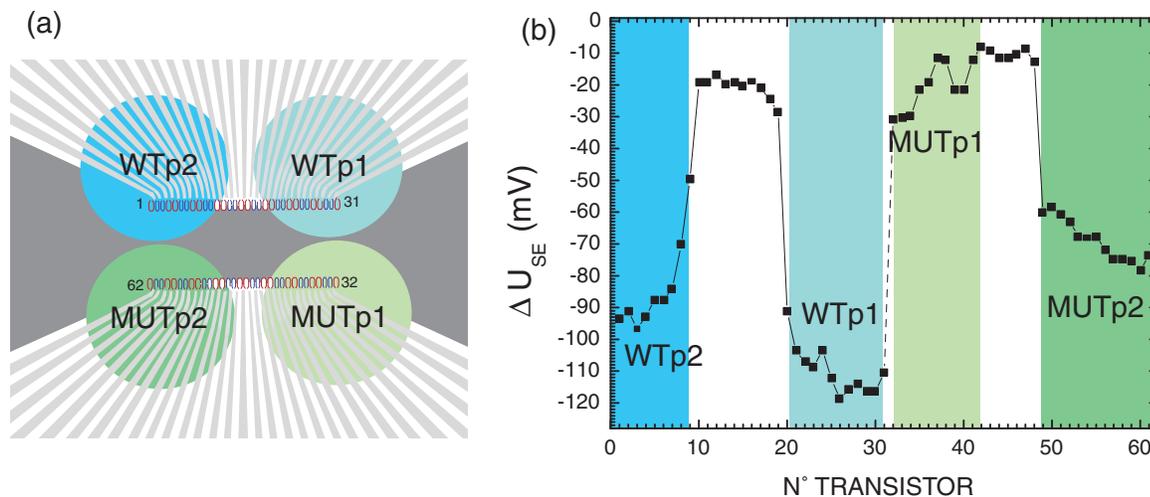


FIGURE 6.9: (a) Macrodépôts des quatre solutions WTp1, WTp2, MUTp1 et MUTp2 (voir texte pour les définitions). (b) Signal électronique obtenu après incubation.

Sur la courbe de la figure 6.9b, nous observons des décalages négatifs correspondant aux dépôts des solutions WTp2, WTp1 et MUTp2, tandis que l'on n'observe pas de signal significatif pour la solution MUTp1. L'ensemble des valeurs mesurées pour les signaux de ces quatre solutions dans cette expérience ainsi qu'une moyenne sur un ensemble d'expériences différentes sont regroupés dans le tableau 6.4.

	patient 1		patient 2	
	MUTp1	WTp1	MUTp2	WTp2
décalage en mV pour la fig. 6.9	-11 ± 8	-90 ± 8	-59 ± 8	-71 ± 5
moyenne en mV (pour n expériences)	-2 ± 10 (4)	-77 ± 21 (3)	-59 ± 8 (1)	-66 ± 7 (2)
test (+/-)	-	+	+	+
caractère génétique	homozygote normal		hétérozygote muté	

TABLEAU 6.4: Résultat de l'expérience sur deux patients

Dans l'expérience présentée ainsi que pour la moyenne de l'ensemble des manipulations, nous obtenons un signal significatif de la présence de produits PCR pour les solutions WTp1, WTp2 et MUTp2 compris entre -90mV et -60mV. Seule la solution MUTp1 ne montre pas de décalage significatif. Nous en déduisons donc un test négatif pour cette solution et des tests positifs pour l'ensemble des autres solutions. Le test MUTp1 étant négatif, le premier patient possède deux allèles non mutés et il est donc homozygote normal. Le test MUTp2 étant positif, le second patient possède au moins une allèle mutée. Le test WTp2 s'avérant lui aussi positif ceci montre que la seconde allèle ne présente pas la mutation. Le caractère génétique du second patient est donc hétérozygote pour la mutation : il présente une mutation sur une et une seule allèle (l'autre allèle étant non mutée).

6.2.3 Applications potentielles

Cette approche, complémentaire aux études menées sur les fragments PCR, est intéressante car elle permet de démontrer la compatibilité du système de détection utilisé avec des produits génomiques plus complexes que ceux utilisés lors de l'optimisation de notre méthode de détection, et ayant une signification biologique puisqu'ils permettent de mettre en évidence la délétion d'une base unique dans une séquence génétique humaine. Cette méthode de détection est aussi intéressante car elle pourrait être couplée aux nouvelles techniques de PCR sur surface. Les progrès dans les techniques de microfluidiques permettent en effet actuellement de réaliser des PCR confinées spatialement sur des micropuces en utilisant des polymères [92, 93, 94], des plastiques ou du verre [95, 96]. L'intérêt de développer de tels "microlaboratoires sur puce"¹³ réside à la fois dans la diminution des quantités de "matériel" biologique utilisé et dans l'accélération des protocoles biologiques¹⁴. Les structures semiconductrices que nous utilisons ayant une surface plane, il serait envisageable de combiner de tels microdispositifs avec les réseaux de transistors à effet de champ. Ceci pourrait conduire à une puce électronique miniaturisée permettant un criblage rapide et parallélisé de séquences d'ADN pour l'étude de mutations ou de polymorphisme d'une base unique ("SNP").

¹³En anglais ces types de technologie sont regroupées sous le terme "Lab on a Chip".

¹⁴Augmentation de la rapidité des cycles de thermocyclage pour la PCR.

Chapitre 7

Le long cheminement vers une détection électronique de l'hybridation de l'ADN

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre introductif de ce manuscrit, l'idée initiale qui a guidé l'ensemble de mon travail était la possibilité de détecter l'hybridation de la molécule d'ADN par un changement de charge lors de l'interaction spécifique entre un simple brin et son brin complémentaire en utilisant comme capteur des réseaux de transistors à effet de champ. Plusieurs difficultés ont retardé l'obtention d'une détection électronique reproductible de l'hybridation et nous présentons dans ce chapitre le cheminement expérimental suivi pour parvenir à la détection électronique de l'hybridation entre molécules d'ADN.

7.1 Fixation covalente d'ADN "présilanisés" et hybridation

Dans un premier temps, nous avons envisagé d'utiliser une technique alternative à celle utilisant la polylysine pour la fixation des sondes oligomères sur la surface des transistors à effet de champ. Nous présentons dans ce paragraphe les résultats obtenus en fluorescence et en électronique en utilisant cette méthode de fixation.

Nous avons choisi de tester une technique de fixation covalente basée sur un protocole récent décrit par Kumar et al [97]. Cette méthode permet de greffer de manière covalente des fragments d'ADN (oligonucléotides ou produits PCR) présilanisés en tube sur une surface d'oxyde de silicium non traitée. Ce principe de fixation diffère de la plupart des méthodes publiées sur la fixation covalente des ADN sondes dans la technique des puces à ADN. En effet, dans la plupart de ces méthodes, les surfaces sont préalablement fonctionnalisées chimiquement pour créer des groupements actifs qui permettront ensuite aux ADN sondes modifiés de réagir avec la surface. Dans la méthode décrite par Kumar et al, une "présilanisation" des acides nucléiques permet de greffer directement ces molécules sur une surface de verre sans modification préalable de celle-ci. L'avantage d'utiliser une surface de verre non modifiée réside dans la diminution du bruit de

fond¹ observé après hybridation. La comparaison de cette méthode à celles nécessitant une modification de la surface montre que le bruit de fond lors de l'hybridation est de 3 à 20 fois plus faible pour cette méthode (cf. [97]). Cependant, un désavantage apparaît pour la fabrication de puces de moyenne et haute densité car il faut réaliser une silanisation préalable de chaque sonde (n silanisations pour n sondes) contrairement aux méthodes plus classiques qui ne requièrent qu'une étape de silanisation globale des surfaces.

Le choix de développer une méthode covalente alternative à la fixation électrostatique via la polylysine s'explique par deux raisons principales. D'une part, une fixation covalente a l'avantage d'être plus solide que l'adsorption électrostatique via la polylysine et permet potentiellement de réhybrider successivement plusieurs fois une même puce. D'autre part, dans l'approche covalente les ADN sondes sont fixés par une extrémité. Ceci permet de rendre plus accessible les bases des brins-sondes aux molécules cibles hybridantes par rapport à la technique de polylysine dans laquelle les molécules sondes d'ADN sont fixées par de nombreux points d'attachement qui conduisent à des gênes stériques lors de l'hybridation.

Les études sur la fixation ont été menées en fluorescence en utilisant le montage décrit dans l'appendice C.1 pendant la période consacrée à l'élaboration du montage électronique et aux premières caractérisations des FETs. Les résultats présentés dans la suite ont été obtenus au cours de ma première année de thèse et sont aussi le fruit du travail de deux stagiaires que j'ai encadré sur ce sujet : Bertrand Francois [98] a travaillé sur l'hybridation entre oligonucléotides dans des microdépôts sur des surfaces de transistors et Stéphane Afchain [99] a travaillé sur la fixation de fragments PCR. Cedric Gentil a également participé à l'optimisation du montage optique lors de son stage de DEA [100].

7.1.1 Protocole de fixation

Le protocole de fixation se décompose en deux étapes.

La première étape consiste à "silaniser" les ADN sondes. Nous utilisons pour ce faire des fragments d'ADN thiolé (ADN possédant un groupement thiol (SH) en bout de chaîne) que nous faisons réagir *in vitro*, à température ambiante, avec du mercaptosilane [(3-mercaptopropyl)-triméthoxysilane]. Il se forme par oxydoréduction un pont disulfure entre l'ADN et le silane (cf. figure 7.1). Cette réaction s'effectue en tube, pendant une heure à température ambiante, dans une solution de acétate de sodium (30mM, pH=4,3) en faisant réagir 250 μ M de silane avec des concentrations variables en ADN de 100 nM à 50 μ M.

La fonction silane ainsi introduite à l'extrémité de la molécule d'ADN peut ensuite réagir avec la surface de silice pour se lier de manière covalente (cf. figure 7.1). Cette réaction s'effectue lors du dépôt des molécules sondes sur la plaque de silice². Nous laissons réagir 15 minutes les solutions à la surface, en atmosphère humide, puis nous séchons au four les échantillons pendant

¹Le terme bruit de fond correspond à la fluorescence parasite observée après hybridation sur les lamelles en dehors des dépôts. Celle-ci est due à la fluorescence intrinsèque des surfaces modifiées ainsi qu'à l'adsorption non spécifique des cibles d'ADN sur ces surfaces lors de l'hybridation.

²Les surfaces sont préalablement préparées selon le protocole suivant : nettoyage à l'acide sulfochromique pendant 2 minutes, puis incubation 4 minutes dans une solution diluée de soude/éthanol (60 μ l NaOH 16N, 220 μ l H_2O , 420 μ l éthanol) pour activer les groupements silanols. Après rinçage et séchage, les échantillons sont prêts pour le dépôt.

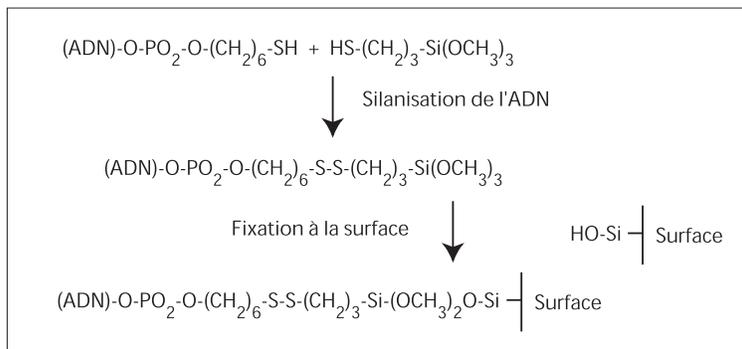


FIGURE 7.1: Fixation covalente d'acides nucléiques "présilylés"

5 à 10 minutes à 50°C. Nous plongeons ensuite les surfaces dans de l'eau bouillante pendant 30 secondes pour enlever la solution de fixation ainsi que les ADN n'ayant pas été fixés. Les échantillons sont alors séchés par un jet d'air comprimé.

7.1.2 Séquences des oligonucléotides sondes et cibles

Nous avons utilisé deux oligonucléotides commerciaux de 20 bases, thiolé en 5', possédant deux séquences différentes : Thi-ARS3 et Thi-ARS5 (tableau 7.1). Pour vérifier le caractère covalent de la liaison molécules/surface, nous avons aussi utilisé ces mêmes oligonucléotides non modifiés : ARS3 et ARS5. Les hybridations sont effectuées avec les deux séquences complémentaires : ARS3sens et ARS5sens, modifiés avec un fluorophore Cy5 en bout de chaîne 5'. Pour plus de facilité, nous appellerons dans la suite 3* et 5* ces oligonucléotides.

Noms	Séquences	T_m
Thi-ARS3	Thiol -5'-CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC-3'	61.5 °C
Thi-ARS5	Thiol -5'-CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT-3'	64 °C
ARS3	5'-CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC-3'	61.5 °C
ARS5	5'-CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT-3'	64 °C
ARS3sens-Cy5 (3*)	Cy5 -5'-GGC GGA GAG TCA GTT CGC GG-3'	61.5 °C
ARS5sens-Cy5 (5*)	Cy5 -5'-AAC GTC AGC CCT GCC GCC TG-3'	64 °C

TABLEAU 7.1: Séquences et température de fusion (T_m) des oligonucléotides sondes et cibles utilisées. La température T_m correspond théoriquement à la température pour laquelle la moitié des molécules double brin sont dénaturées.

7.1.3 Protocole d'hybridation

La solution d'hybridation contenant les molécules cibles fluorescentes est une solution tampon de SSC 5X³ contenant 0,1% de Tween-20. Le Tween-20 est un amphiphile qui permet de favoriser l'hybridation entre brins complémentaires tout en diminuant l'adsorption non spécifique. Les concentrations en molécules cibles utilisées dans les expériences varient entre 1 nM et 1 μM. Nous déposons entre 20 et 50 μl de solution hybridante à la surface des transistors. Ceux-ci sont

³SSC 5X ≡ NaCl 750mM, citrate de sodium 75mM, pH=7.

ensuite placés dans une chambre d'hybridation⁴ à 37°C pour une durée variant entre 10 minutes et plusieurs heures. En réalisant des séries d'hybridations successives de durées différentes sur une même puce, nous avons pu mettre en évidence une cinétique rapide pour cette hybridation entre oligonucléotides. Pour des temps courts (entre 10 minutes et 1 heure) nous observons une augmentation du taux d'hybridation, celui-ci atteignant une valeur d'environ 50% pour des durées de l'ordre d'une trentaine de minutes. Afin de minimiser les variations dues à cette cinétique dans les expériences suivantes, les hybridations sont réalisées sur des durées grandes devant le temps caractéristique de la réaction (pendant plus de 4 heures). Une fois l'hybridation terminée, on rince les échantillons avec des solutions salines qui permettent d'éliminer l'ADN non hybridé sans perturber celui qui l'a été. Nous effectuons trois rinçages de 1 minute avec une solution de SSC 5X et 0,1% de Tween-20, puis deux rinçages de 10 minutes avec du SSC 1X et 0,01 % de Tween-20. Finalement on sèche les transistors sous un jet d'air comprimé. Nous pouvons alors observer le signal de fluorescence pour déterminer les différents taux d'hybridation. Les expériences suivantes ont toutes été réalisées sur des surfaces de transistors exceptées les expériences du paragraphe 7.1.7 pour lesquelles nous avons aussi utilisé des lamelles tests d'oxyde de silicium⁵.

7.1.4 Hybridation spécifique et variation de concentration

La première série d'expériences consistait à vérifier, pour ce type de fixation et pour notre choix de séquences de bases, la spécificité de la réaction d'hybridation et de quantifier le degré de cette spécificité. Nous avons utilisé les deux sondes Thi-ARS3 et Thi-ARS5 et nous les avons hybridés par les oligonucléotides complémentaires de séquences 3* et 5*. La figure 7.2 présente l'ensemble des données collectées pour l'hybridation de macrodépôts (0,5 μ l) sur des surfaces de transistors. La concentration de fixation en sondes pour ces expériences est de 50 μ M. Nous observons une forte spécificité pour la réaction d'hybridation. En effet, le signal de fluorescence pour la séquence hybridée par son complémentaire est 20 à 1000 fois supérieur au signal de fluorescence pour la séquence hybridée par le non complémentaire (rapport (spec)/(non spec) de la figure 7.2).

Ces résultats pour des macrodépôts de sondes ont été confirmés en utilisant des microdépôts. Pour les expériences dont les résultats sont présentés à la figure 7.3, nous gardons fixe la concentration en molécules sondes et nous varions la concentration en molécules cibles de 1 nM à 1 μ M lors de l'hybridation. Nous observons pour l'ensemble de ces concentrations en molécules hybridantes une spécificité de 2 à 3 ordres de grandeur entre les microdépôts hybridés par leur complémentaire (séquence 5/hybridé par 5*) vis à vis des microdépôts non spécifiques (séquence 3/hybridé par 5*). Lorsque la solution d'hybridation est très concentrée (de 10 nM à 1 μ M) toutes les molécules sondes fixées vont être hybridées par leur complémentaire en excès dans la solution. Il apparaît alors une saturation schématiquement représentée par un palier sur la figure 7.3. Cette saturation disparaît pour des concentrations inférieures à 10 nM lorsqu'il y a moins de molécules cibles en solution que de molécules sondes fixées. Un calcul d'ordre de grandeur permet, à partir de cette concentration ($c_{lim} = 10$ nM), d'estimer la densité de molécules sondes fixées à la surface (σ_{sondes}). En supposant l'ensemble des molécules sondes d'un dépôt de surface

⁴Chambre hermetique et obscure (isolante de la lumière) spécialement conçue pour permettre une hybridation longue sur les échantillons de transistors sans séchage de la solution hybridante.

⁵Lamelles de silicium oxydées thermiquement et dont l'épaisseur d'oxyde est optimisée pour un champ local maximal à l'interface oxyde/air ($d_{ox} \simeq 100$ nm).

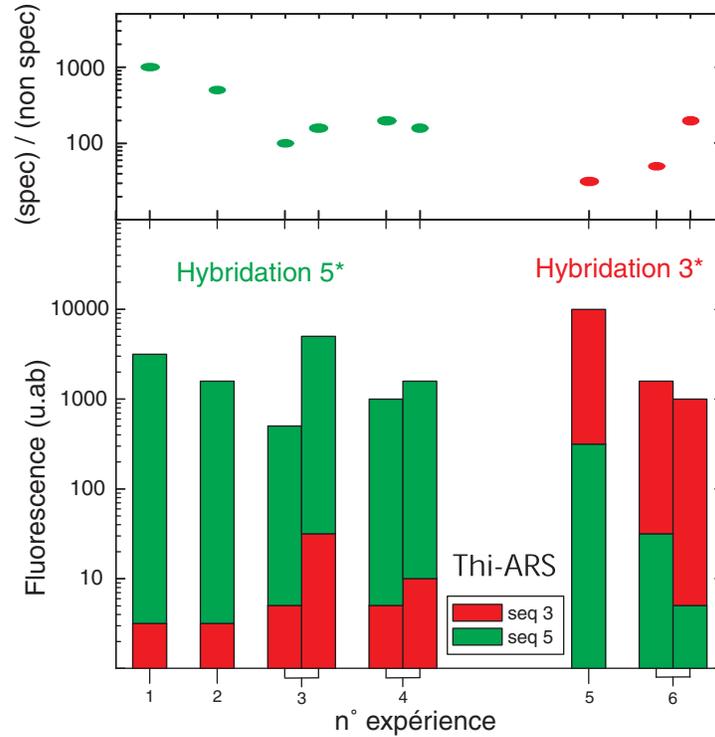


FIGURE 7.2: Signaux de fluorescence (en échelle logarithmique) correspondant à l'hybridation spécifique et non spécifique dans des macrodépôts sur différentes surfaces de transistors (n° expérience). Au dessus, est représenté le rapport spécifique versus non spécifique pour l'ensemble de ces dépôts.

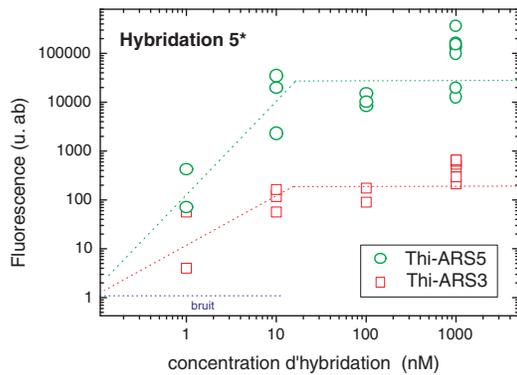


FIGURE 7.3: Variation du signal d'hybridation en fonction de la concentration en molécules cibles hybridantes (pour une concentration fixe des sondes de $50 \mu\text{M}$ dans des microdépôts.)

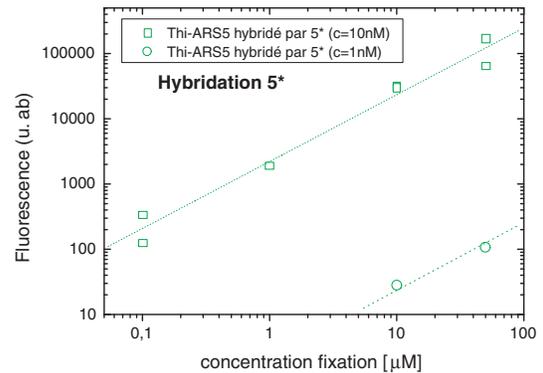


FIGURE 7.4: Variation du signal d'hybridation en fonction de la concentration de fixation des sondes pour des microdépôts (et pour deux concentrations d'hybridation ; $c=10 \text{ nM}$ et $c=1 \text{ nM}$)

$s \simeq (100 \mu\text{m})^2$ hybridées par les ADN cibles de la solution ($v=10 \mu\text{l}$), nous obtenons une densité surfacique de sondes :

$$\sigma_{sondes} = \frac{c_{lim} v N_A}{s} \simeq 6.10^6 \text{sondes}/\mu\text{m}^2 = 6.10^{14} \text{sondes}/\text{cm}^2$$

Cette valeur est surestimée par rapport à la densité surfacique obtenue par quantification de fluorescence par Kumar et al [97] : $\sigma = 2.10^5 \text{sondes}/\mu\text{m}^2$. Cette surestimation semble montrer que seulement une fraction des molécules cibles vont s'hybrider et non la totalité de la solution. Il existe une assez grande variabilité dans les signaux de fluorescence pour différents dépôts hybridés par une même concentration en molécules cibles. Ces fluctuations qui peuvent atteindre un ordre de grandeur, s'expliquent principalement du fait de variabilités importantes des propriétés des différentes surfaces de transistors (état chimique, mouillabilité, optique⁶) conduisant à des taux de greffage variables en sondes et des différences de lecture en fluorescence.

Nous avons aussi étudié les variations des signaux d'hybridation en fonction de la concentration en ADN sondes dans les dépôts. Pour ce faire, nous déposons sur une même puce des solutions de concentrations différentes en molécules sondes (de $0,1 \mu\text{M}$ à $50 \mu\text{M}$) et nous hybridons cette puce avec une concentration donnée en molécules cibles. Deux séries sont représentées à la figure 7.4. La première série a été effectuée en utilisant une concentration de 10 nM en molécules cibles lors de l'hybridation. Dans ce cas, les molécules cibles de la solution d'hybridation sont en excès par rapport aux molécules sondes fixées. L'ensemble des molécules de chaque dépôt peut être hybridé par l'ADN cible et on obtient alors un signal de fluorescence proportionnel à la concentration de fixation. La variabilité entre dépôts identiques (pour une même concentration de fixation) est moins importante dans cette expérience car les dépôts sont réalisés sur une même puce. De nombreux paramètres extérieurs (structure, condition d'hybridation, mesure optique) sont identiques pour l'ensemble de ces microdépôts et les fluctuations sont alors uniquement dues à des problèmes de reproductibilité lors du dépôt. Dans la seconde série, nous utilisons une solution de 1 nM en molécules cibles pour l'hybridation. Dans ce cas, il y a plus de molécules sondes dans les dépôts que de molécules hybridantes et seulement une partie des molécules de chaque dépôt va pouvoir être hybridée. Si la probabilité d'hybridation sur le dépôt est proportionnelle à la quantité de sondes, on s'attend effectivement pour cette concentration en cible à un signal de fluorescence qui est aussi proportionnel à la concentration de fixation.

7.1.5 Réhybridation et fixation covalente

Un avantage d'une fixation covalente réside dans la possibilité d'effectuer sur une même puce plusieurs cycles d'hybridation, dénaturation, réhybridation. Du fait d'une fixation renforcée entre les molécules sondes et la surface nous pouvons dénaturer les duplex d'ADN formés lors de l'hybridation sans perdre trop de molécules sondes fixées^{7,8}. La dénaturation de l'ADN double brin est réalisée en plongeant la surface de la puce dans de l'eau frémissante (environ 100°C) pendant 1 à 2 minutes.

⁶Des variations de l'épaisseur d'oxyde de silicium pour les différentes structures utilisées dans ces expériences peuvent induire des variabilités importantes des signaux de fluorescence (cf. appendice C.1).

⁷Une telle dénaturation n'est pas envisageable avec la technique de fixation électrostatique via la polylysine.

⁸La dénaturation est la réaction inverse de l'hybridation, elle consiste en la séparation d'un double brin (duplex) en deux molécules simple brin.

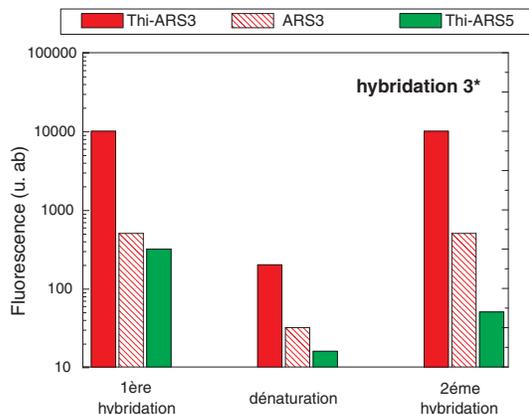


FIGURE 7.5: Séquence d'hybridation, dénatura-tion et réhybridation sur des macrodépôts d'oligonucléotides.

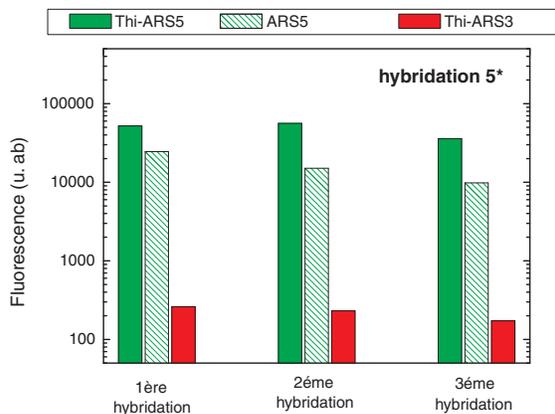


FIGURE 7.6: Réhybridation spécifique sur des microdépôts d'oligonucléotides

Sur la figure 7.5 sont présentées les mesures de fluorescence pour des macrodépôts lors d'une séquence d'hybridation, dénatura-tion et réhybridation. En utilisant dans cette expérience les oligonucléotides Thi-ARS3, ARS3 et Thi-ARS5 comme sondes et la séquence 3* pour l'hybridation, nous pouvons d'une part confirmer la spécificité de la réaction d'hybridation (comparaison Thi-ARS3 et Thi-ARS5 hybridé par 3*) et d'autre part tester le caractère covalent de la liaison (comparaison Thi-ARS3 et ARS3 hybridé par 3*). Nous observons conformément aux résultats précédents une bonne spécificité pour les deux hybridations successives : environ deux ordres de grandeur entre le signal correspondant aux séquences complémentaires (Thi-ARS3 hybridée par 3*) et celui correspondant aux séquences non complémentaires (Thi-ARS5 hybridée par 3*). Le signal pour l'ADN non thiolé (ARS3) est 25 fois moins important comparé au signal pour l'ADN thiolé (Thi-ARS3). En supposant l'adsorption non spécifique équivalente dans les deux cas, nous pouvons conclure que 95 % des molécules sondes sont fixées de manière covalente. La perte de fluorescence lors de la dénatura-tion n'est pas complète et il reste environ 2 % de l'intensité initiale de fluorescence. Cette fluorescence après dénatura-tion est probablement due à des molécules d'ADN adsorbées lors de l'hybridation ou du séchage que l'on ne peut éliminer lors du rinçage à l'eau bouillante.

Cette expérience a été reproduite en microdépôts en utilisant les séquences sondes croisées Thi-ARS5, ARS5 et Thi-ARS3 et en hybridant la puce par la séquence 5*. Nous observons une très bonne spécificité (environ 3 ordres de grandeur pour chaque hybridation). Par contre les dépôts d'oligonucléotides non thiolés présentent des signaux relativement forts par rapport aux dépôts thiolés (environ un cinquième). Le signal important pour ces oligonucléotides ne peut s'expliquer que part une forte adsorption des sondes lors du dépôt conduisant à une fixation non covalente. Le caractère covalent apparaît donc moins bon en microdépôts (~ 80%) qu'en macrodépôts (~ 95%). Nous observons néanmoins une perte d'intensité de fluorescence plus importante lors des hybridations successives pour l'ADN adsorbé (60% d'atténuation entre la première et la dernière hybridation) que pour l'ADN fixé de manière covalente (seulement 20 %). En outre, une analyse plus fine des images de fluorescence après chaque hybridation pour ces microdépôts montre une perte de surface pour les dépôts correspondant aux molécules sondes non thiolés comparativement aux dépôts de molécules sondes thiolés. Ce phénomène n'étant pas pris en compte dans notre calcul des intensités de fluorescence par dépôt, nous surestimons dans

ces expériences la quantité d'ADN fixée de manière non covalente (cf. [98]).

7.1.6 Réhybridation spécifique

Nous venons de montrer la possibilité de réhybrider une même puce plusieurs fois de suite. Dans les expériences précédentes, nous hybridons successivement la puce avec la même séquence hybridante. Nous pouvons aussi réaliser des hybridations en utilisant successivement les deux séquences 3* et 5*.

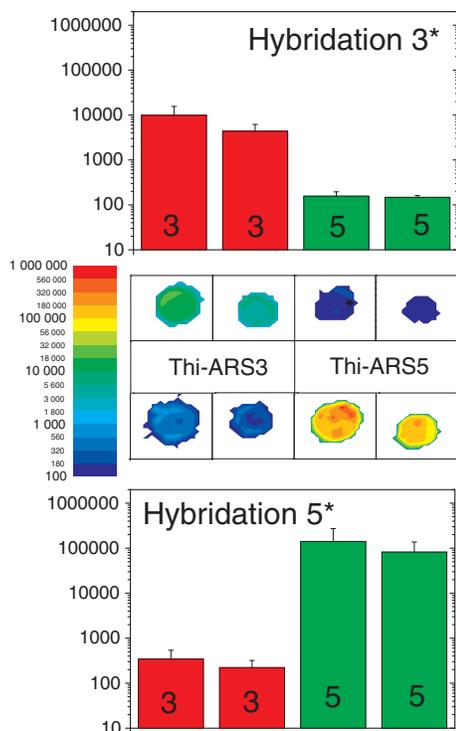


FIGURE 7.7: Réhybridation spécifique sur des microdépôts d'oligonucléotides.

Quatre microdépôts de sondes de concentration $50 \mu M$ (2 dépôts de Thi-ARS3 et 2 dépôts de Thi-ARS5) ont été hybridés par une solution d'ADN de séquence 3* (1 nM) suivie d'une dénaturation puis d'une nouvelle hybridation par la séquence 5* (1 nM). Les images de fluorescence ainsi que les moyennes par dépôt pour ces deux hybridations successives sont données à la figure 7.7. On constate que les hybridations sont spécifiques (2 ordres de grandeur) et que les signaux de fluorescence se sont bien inversés lors de la réhybridation par la séquence 5*.

7.1.7 Fixation covalente de longues molécules d'ADN

En utilisant la méthode de silanisation, nous pouvons aussi fixer de longs fragments d'ADN. En effet, il est possible, à l'aide d'une PCR, de produire des fragments d'ADN double brin possédant une modification thiol à une extrémité d'un des deux brins. Nous utilisons lors de la PCR une amorce possédant un groupement thiol et une amorce non modifiée. Les premiers tests ont été effectués sur un fragment d'ADN de 1009 paires de base issu d'une PCR sur le substrat

λ BstE-II⁹. Afin de tester le caractère covalent de la fixation, nous avons préparé deux fragments différents ; l'un possède une modification thiol en bout de chaîne (on utilise les amorces Thi-ARS5 et ARS3 pour la PCR) et l'autre ne possède aucune modification thiol (on utilise les amorces ARS3 et ARS5). Ces ADN ont été rendus fluorescents en incorporant des dUTP-Cy5 lors de la PCR. Nous noterons dans la suite Thi-1kbCy5 l'ADN thiolé et 1kbCy5 l'ADN non thiolé.

Le protocole de fixation est équivalent à celui utilisé pour les oligonucléotides. Nous faisons d'abord réagir en tube pendant une heure 2 μ l de produits PCR (préalablement concentrés à ~ 90 ng/ μ l) avec 200 μ M de silane dans 8 μ l d'une solution d'acétate de sodium (30mM, pH=4,3). Nous déposons ensuite ces solutions à la surface de nos échantillons et, après quinze minutes de réaction en atmosphère humide, nous séchons les échantillons au four à 50°C pendant cinq minutes. Pour terminer, nous plongeons les surfaces pendant deux minutes dans de l'eau bouillante.

En comparant les intensités de fluorescence après et avant rinçage à l'eau bouillante pour des dépôts de Thi-1kbCy5, nous pouvons évaluer le pourcentage de molécules d'ADN ayant été fixées sur nos échantillons. Les optimisations ont d'abord été réalisées sur des lamelles tests d'oxyde de silicium¹⁰. Nous obtenons pour ces surfaces un taux moyen de fixation de 50 %. En comparant les intensités de fluorescence entre les dépôts de Thi-1kbCy5 et les dépôts 1kbCy5, nous avons estimé à 65 % la quantité d'ADN fixé de manière covalente. Sur les surfaces de transistors les résultats ont été moins bons, seulement 10 % des ADN ont pu être fixés sur les surfaces dont 50 % de manière covalente¹¹. Sur transistors, cette fixation de longs fragments d'ADN est donc quantitativement assez faible et les premières expériences d'hybridation entre fragments PCR avec ce système ne sont pas encore concluantes [99].

7.1.8 Premières mesures électroniques

Les premières mesures électroniques en utilisant cette fixation ne nous ont pas permis de démontrer de manière certaine la détection d'ADN. En effet, bien que nous obtenions des décalages négatifs correspondant à des dépôts d'oligonucléotides silanisés à la surface du réseau, ces décalages sont comparables à ceux induit par la solution de mercaptosilane permettant la fixation des ADN.

Dans l'expérience présentée à la figure 7.8, nous avons déposé trois microdépôts d'une solution de mercaptosilane ne contenant pas d'ADN (au niveau des transistors 10, 40 et 80) ainsi que trois microdépôts d'une solution d'oligonucléotides présilanisés (au niveau des transistors 20, 55 et 90)¹². Les signaux électroniques correspondant à la fixation des ADN (dépôts Thi-ARS5) sont similaires aux signaux observés pour une simple silanisation de la surface (dépôts MS).

Dans cette expérience, nous ne pouvons distinguer la présence des ADN vis à vis de la modification chimique de l'interface induite lors de la silanisation, et donc conclure à une détection

⁹Le protocole complet de cette PCR est donné en appendice D.

¹⁰Le protocole de nettoyage de ces lamelles est identique à celui des surfaces de transistors.

¹¹Les valeurs moyennes sont calculées sur 15 expériences pour les lamelles SiO₂ et 8 expériences pour les surfaces de transistors.

¹²Ces deux solutions sont préparées à partir d'une même solution de 250 μ M en mercaptosilane dans du SoAc (30 mM, pH=4.7). Pour la solution d'ADN nous faisons réagir avant dépôt 50 μ M de ThiARS5 pendant une heure.

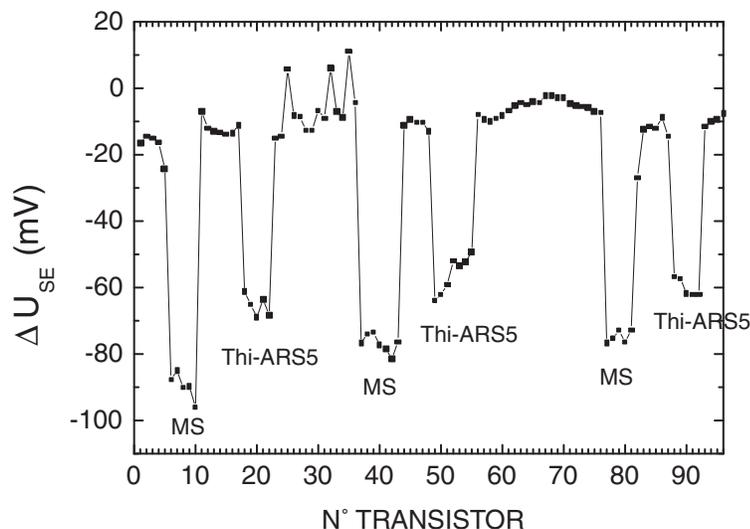


FIGURE 7.8: Détection électronique pour des solutions d'oligonucléotides présilanés (Thi-ARS5) et comparaison à la simple silanisation de la surface (MS). Détection à 1 mM en KCl.

électronique des ADN sondes en utilisant cette méthode de fixation.

Bien que le signal correspondant aux sondes ne soit pas spécifique à l'ADN, l'hybridation pourrait être observable sur un tel système si nous pouvions mettre en évidence un décalage électronique spécifique au niveau des dépôts d'oligonucléotides après hybridation par la séquence complémentaire. Dans l'expérience de la figure 7.9 nous avons déposé trois microdépôts de Thi-ARS3 (transistor 5, 25 et 38) ainsi que trois microdépôts de Thi-ARS5 (transistors 55, 74 et 86). La mesure électronique après dépôt des sondes (fig. 7.9a) réalisée à 1 mM en KCl montre des pics négatifs pour les dépôts d'ADN.

L'hybridation est ensuite effectuée en utilisant la séquence 5* (ARS5sens-Cy5, 1 μM) pendant quatre heures. Après plusieurs rincages successifs¹³ des transistors, nous mesurons une nouvelle fois le réseau en utilisant une solution de KCl de molarité 1 mM. La différence entre la mesure après et avant hybridation (fig. 7.9b) ne montre aucune différence spécifique du signal électronique pour les dépôts ayant été hybridés (Thi-ARS5) versus les dépôts non complémentaires (Thi-ARS3), tandis que la mesure de fluorescence montre elle une spécificité d'environ deux ordres de grandeur. Nous avons réalisé quatre autres expériences d'hybridation dans des conditions similaires (lecture à 10 mM et 1 mM en KCl). Pour ces hybridations nous n'avons pas pu observer de signal électronique spécifique de l'hybridation.

¹³3 rincages SSC 5X 0,1 % Tween-20 (1 min), 2 rincages SSC 5X 0,1 % Tween-20 (10 min), puis des rincages successifs dans du KCl 10 mM et 1 mM.

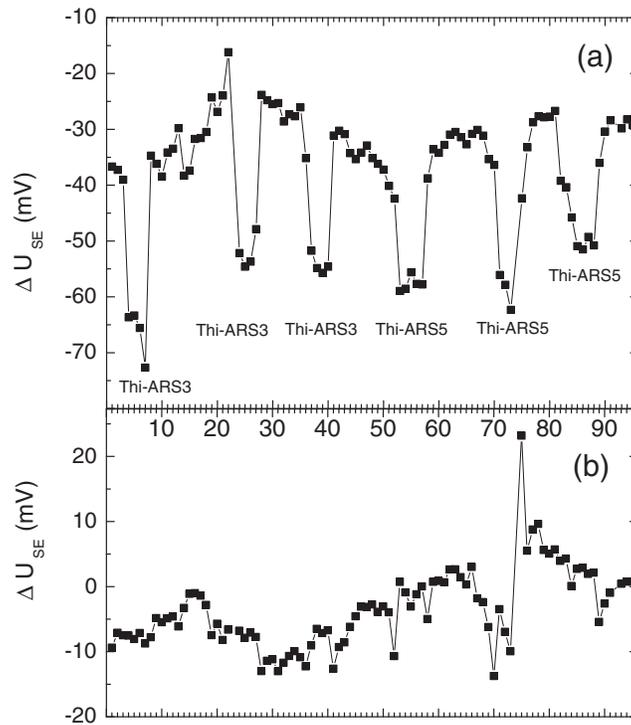


FIGURE 7.9: (a) Signal électronique correspondant aux microdépôts des sondes Thi-ARS3 et Thi-ARS5 (différence entre une mesure effectuée après dépôt et une mesure réalisée avant le dépôt). (b) Signal électronique après hybridation par la séquence 5* (différence après/avant hybridation). L'électrolyte de mesure est une solution de 1 mM en KCl.

7.2 Couplages complémentaires : interaction biotine/streptavidine

Nous avons alors envisagé d'amplifier le signal électronique en utilisant d'autres espèces chargées. Et nous avons alors décidé de tester le couplage biotine/streptavidine soit par une méthode directe soit en utilisant des nanoparticules d'or recouvertes d'argent. En utilisant la fixation d'ADN décrite ci-dessus, nous pouvons en effet greffer de manière covalente des biotines sur des surfaces d'oxyde de silicium et par conséquent obtenir sur les réseaux de transistors un système permettant d'étudier l'interaction spécifique (ligand/récepteur) entre la biotine (ligand) et la streptavidine (recepteur). Pour ces expériences, nous utilisons deux oligonucléotides thiolés l'un possédant une biotine greffée à son extrémité 3' (Thi-ARS5-Biot) et l'autre n'étant pas biotinylé (Thi-ARS5). Nous fixons ces deux oligonucléotides sur les surfaces de nos échantillons et nous procédons ensuite au couplage avec la solution de streptavidine.

7.2.1 Détection directe

Nous avons tout d'abord mis en évidence l'interaction biotine/streptavidine en utilisant une solution de streptavidine fluorescente. Après la fixation des deux oligonucléotides Thi-ARS5 et Thi-ARS5-Biot, nous faisons réagir pendant 10 minutes une solution de streptavidine fluorescente¹⁴, puis nous rinçons trois fois les échantillons avec une solution de PBS 1X pendant une minute. Nous obtenons un signal de fluorescence spécifique à la réaction biotine/streptavidine ; l'intensité de fluorescence est environ 100 fois supérieure pour les dépôts de Thi-ARS5-Biot comparé aux dépôts de Thi-ARS5. Bien que le signal soit spécifique en fluorescence, les mesures électroniques pour une détection à 1 mM en KCl ne nous ont pas permis de mettre en évidence ce couplage direct.

7.2.2 Détection en utilisant des nanoparticules d'or recouvertes d'une couche d'argent

Nous avons ensuite testé un protocole utilisant des nanoparticules d'or (5 nm de rayon) recouvertes de streptavidine. L'utilisation de ce type de microbilles d'or est répandue en immunologie pour l'observation de tissus et d'hybridations "in-situ" par microscopie électronique. Ce couplage est aussi utilisé dans certaines techniques alternatives de lecture des puces à ADN : mesures en microscopie à force atomique (AFM,SFM) [101] ou mesures en transmission et réflexion optique [43, 44]. Les nanoparticules n'étant pas observables directement en microscopie classique, nous effectuons après interaction entre les microbilles d'or recouvertes de streptavidine et les biotines, une étape de croissance à l'argent. Lors de cette réaction en présence d'un agent réducteur (hydroquinone), les nanoparticules d'or ont la propriété de catalyser la réduction d'ions argent présents en solution en métal argent. On obtient ainsi des microbilles d'or recouvertes d'une couche d'argent qui sont dès lors observables par microscopie. Nous détaillons dans la suite le protocole ayant permis d'obtenir l'image des dépôts présentée à la figure 7.10.

Dans cette expérience, nous avons tout d'abord déposé six solutions d'oligonucléotides présérialisés à la surface d'un réseau de 96 transistors : trois microdépôts de Thi-ARS5 sur la partie gauche du réseau au niveau des transistors 12, 22 et 34 ainsi que trois microdépôts de Thi-ARS5-Biot sur la partie droite au niveau des transistors 60, 70 et 89. Nous avons ensuite procédé au couplage avec les nanoparticules d'or recouvertes de streptavidine pendant 10 minutes¹⁵. Puis nous avons rincé les transistors¹⁶. Nous avons alors appliqué la solution permettant la croissance d'une couche d'argent pendant 10 minutes à l'abri de la lumière¹⁷. Après rinçage, nous obtenons les images présentées sur la figure 7.10. Les microbilles à la surface des transistors pour les trois microdépôts possédant des biotines sont bien visibles tandis que nous n'observons aucun changement sur la partie gauche du réseau où se trouvent les dépôts non biotinylés. La mesure électronique après le couplage avec les microbilles d'or et leur croissance à l'argent (fig. 7.10 (c)) ne montre aucun signal spécifique le long du réseau pour ces trois microdépôts.

¹⁴Un volume de 40 μ l contenant 40 μ g de streptavidine diluée dans une solution de PBS 1X.

¹⁵40 μ l d'une dilution par 100 de la solution commerciale (*BBI International, Immunogold conjugate LM.STP5*) dans une solution de PBS 1X, 0,1 % Tween.

¹⁶Trois rincages successifs avec une solution de PBS1X 0,1% Tween, puis un rinçage avec de l'eau déionisée

¹⁷60 μ l d'un mélange des deux solutions du kit (*BBI International, Silver Enhancing Kit for Light, cat. SEKL15, Initiator and Enhancer*).

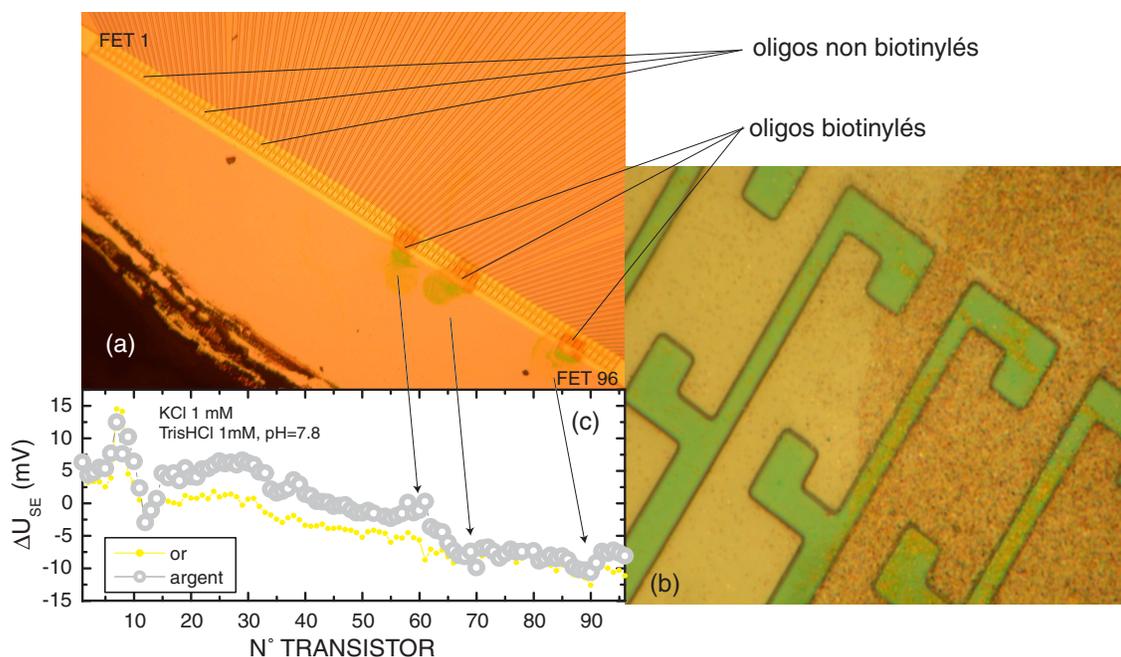


FIGURE 7.10: (a) Interaction spécifique biotine/streptavidine mise en évidence par des nanoparticules d'or recouvertes d'argent dans des microdépôts à la surface d'un réseau de 96 transistors à effet de champ. (b) agrandissement au niveau des FETs en bord d'un des dépôts spécifiques (deuxième dépôt sur la partie droite). (c) Signal électronique après le couplage avec des nanoparticules d'or (cercle jaune) et après la croissance à l'argent (cercle gris). Pour ces courbes, la mesure de référence est celle réalisée après dépôt des sondes et avant le couplage à l'or.

7.3 Détection d'une hybridation en utilisant une fixation de polylysine

Parallèlement aux premières études sur cette fixation covalente, nous avons obtenu les premiers résultats sur la détection de molécules d'ADN fixées électrostatiquement sur une couche de polylysine (chapitre 5 et 6). L'ensemble de ces expériences sur la polylysine ont permis de démontrer de manière reproductible la détection de fragments simple brin et double brin d'ADN. Ces résultats encourageants nous ont donc amené à revenir à la fixation de polylysine pour les études consacrées à l'hybridation. Mais, encore une fois, le protocole d'hybridation en utilisant la fixation de polylysine doit être adapté pour permettre une mesure électronique de l'hybridation. Nous verrons, par exemple, que l'utilisation d'un bloqueur conseillé dans les protocoles en polylysine, influence notre signal électronique. De plus pour obtenir une bonne spécificité, l'hybridation doit être réalisée à suffisamment haut sel ; or il a été décrit de manière détaillée l'influence du sel et la difficulté de détecter des changements de charge pour une quantité de sel supérieur à 10 mM.

7.3.1 Influence du bloqueur

Dans le protocole classique des puces à ADN utilisant la fixation polylysine, une étape postérieure au dépôt des ADN sondes est requise [80, 25]. Cette étape a pour but de modifier les groupements positifs (NH_3^+) de la polylysine n'ayant pas réagi afin de diminuer leur capacité à adsorber des molécules cibles d'ADN lors de l'hybridation. L'utilisation d'une solution d'anhydride succinique permet de transformer les groupements amines de la polylysine en groupements amides en laissant libre un groupe carboxylate à l'autre bout de la chaîne. Ceci conduit à substituer une charge négative à la charge positive initiale de la couche de polylysine. On crée de ce fait un comportement répulsif entre la surface de cette couche et les molécules d'ADN hybridantes (molécules cibles) ce qui limite l'adsorption non spécifique lors de l'hybridation et conduit à un meilleur rapport signal sur bruit pour la détection de l'hybridation (cf. [80]).

Tout comme l'incubation de polylysine, cette étape va être visible électroniquement sur la puce. Pour mettre en évidence cet effet, nous avons étudié la variation de la tension U_{SE} après cette étape "bloquante"¹⁸ sur une surface de polylysine sur laquelle nous avons préalablement déposé de l'ADN. Le signal correspondant au dépôt d'ADN sur la polylysine est représenté par

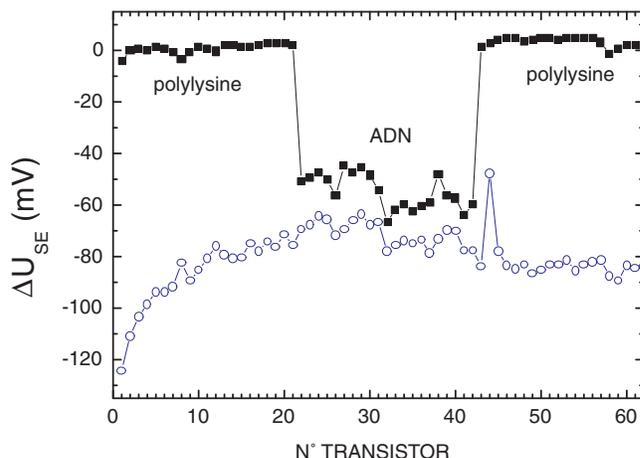


FIGURE 7.11: Effet du bloqueur : les carrés représentent le signal après dépôt d'ADN sur la surface de polylysine. Les cercles correspondent au signal après l'incubation du bloqueur sur cette même surface. Une référence avant dépôt d'ADN est utilisée dans les deux cas.

la courbe en carré sur la figure 7.11 (différence entre une mesure effectuée après le dépôt et une mesure avant le dépôt d'ADN). Nous incubons alors une solution d'anhydride succinique¹⁹ pendant 20 minutes à la surface du réseau, puis nous rinçons le capteur et le mesurons une nouvelle fois. La courbe en cercles correspond à la différence entre cette mesure et la mesure effectuée après l'incubation en polylysine et avant le dépôt d'ADN. On observe un décalage vers le bas de cette courbe vis à vis de la courbe précédente. Cette diminution de la tension U_{SE} peut être interprétée par la "négativation" de l'interface induite par la solution bloquante. Il est à noter ici que cet effet similaire à celui observé lors de l'adsorption de l'ADN diffère de celui-ci car la négativation de l'interface ne se fait pas par un apport de charge mais par une

¹⁸blocking step en anglais. On parle aussi couramment de bloqueur pour la solution d'anhydride succinique.

¹⁹5.8 mg succinic anhydride, 324.7 μl methyl pyrrolidone et 26.4 μl sodium borate (pH=8)

modification directe (chimique) des charges initiales de l'interface. La courbe électronique après cette étape bloquante est uniforme et on ne distingue plus la zone où avait été déposée l'ADN. Les groupes amines n'ayant pas réagi au niveau du dépôt d'ADN sont aussi neutralisés par la solution d'anhydride succinique. Cette surface étant initialement plus négative que la surface de polylysine nue, le décalage induit par la solution bloquante est plus faible au niveau de la surface couverte d'ADN (-16 mV comparé au - 86 mV pour la surface de polylysine (cf. tableau 7.2)). Nous avons reproduit cette expérience plusieurs fois. Les résultats de ces manipulations montrent tous une négativation de l'interface tendant vers un état de charge final homogène entre la surface de polylysine nue et la surface d'ADN. Les décalages induits par la solution bloquante sur ces deux états de surface pour l'ensemble de ces expériences sont répertoriés dans le tableau suivant :

différence	Expérience présentée	Moyenne sur 5 expériences
Bloqueur/surface PLL	-86 mV \pm 10 mV	-84 mV \pm 16 mV
Bloqueur/surface ADN	-16 mV \pm 4 mV	-23 mV \pm 22 mV

TABLEAU 7.2: Moyenne des décalages induits par la solution bloquante

Cet état de charge final peut aussi être comparé à l'état initial du capteur, c'est à dire à la surface d'oxyde de silicium "nue". La différence de tension U_{SE} entre l'état final après l'incubation de la solution d'anhydride succinique et l'état initial (c'est à dire la mesure avant incubation en polylysine) moyennée sur 5 expériences est de 58 mV \pm 30 mV. La solution bloquante tend à négativer l'interface de polylysine et d'ADN, mais sans revenir à un état de charge aussi négatif que pour la surface d'oxyde de silicium.

7.3.2 Détection électronique d'une hybridation entre oligonucléotides

Les optimisations pour l'hybridation (concentration en sel, durée d'hybridation...) ainsi que les détections de cette hybridation ont été réalisées par Cédric Gentil, qui continue actuellement sa thèse sur ce sujet au laboratoire. Pour illustrer le but dans lequel j'ai travaillé durant mes trois années de thèse, je présenterai ici une expérience caractéristique d'une détection électronique de l'hybridation entre oligonucléotides.

Dans un premier temps, nous avons décidé de supprimer l'étape bloquante pour les premières études de l'hybridation entre oligonucléotides. D'une part, nous souhaitons simplifier au maximum le protocole d'hybridation. En omettant cette étape, nous pouvons directement réaliser l'hybridation en injectant la solution contenant les ADN cibles dans l'électrolyte de mesure en évitant ainsi une modification et un rinçage supplémentaire de l'interface qui pourrait induire des variabilités entre les différents dépôts d'ADN sondes. D'autre part, en raison de la plus grande sensibilité de la détection électronique à bas sel, nous devons utiliser un tampon d'hybridation de basse molarité en sel (~ 10 mM) comparé au tampon couramment utilisé pour l'hybridation sur puces à ADN (typiquement 50 mM à 1M en sel)²⁰. La répulsion électrostatique entre brins d'ADN augmente à bas sel et réduit alors fortement la probabilité d'appariement entre brins

²⁰Par exemple dans le protocole d'hybridation sur puces à polylysine de Pat Brown[25], le tampon d'hybridation est une solution de SSC 4X, c'est à dire environ 650 mM en sel.

complémentaires ce qui augmente le temps nécessaire pour parvenir à l'hybridation. Dans ce cas le fait d'avoir une surface positive (polylysine non bloquée) permet de compenser en surface les charges négatives des brins sondes et de réduire ainsi la répulsion entre cibles et sondes lors de l'hybridation. De plus, une surface positive permet d'augmenter localement la concentration en cibles proche de la surface et de réduire ainsi la durée de l'hybridation. Cette méthode d'hybridation entre ADN utilisant des surfaces de charges compensées et de basses concentrations en sel a été étudiée pour des hybridations rapides sur puces [102]. En utilisant une surface de polylysine non bloquée, Fritz et al [66] ont démontré en octobre 2002 la faisabilité d'une détection électronique d'hybridation à bas sel (23 mM) pour des oligonucléotides de 12 bases en utilisant des capteurs semiconducteurs.

Nous utilisons dans nos expériences deux oligonucléotides de séquences différentes : ARS3 et ARS5 (20 bases, cf. 7.1.2). Après avoir préparé le capteur avec une couche de polylysine, deux macrodépôts contenant les solutions d'ADN sondes sont incubées à la surface du réseau. Le volume des gouttes est de $0,3 \mu\text{l}$ et la concentration en oligonucléotides de $1 \mu\text{M}$. La solution ARS3 est déposée sur la partie gauche du réseau (transistor 1 et suivants), et la solution ARS5 sur la partie droite (transistor 96 et précédents). Après quinze minutes d'incubation le réseau est rincé, séché et placé dans une solution de concentration 20 mM en KCl pour une première mesure électronique (sonde 1). Une seconde mesure est effectuée 15 minutes après la première dans le même électrolyte (sonde 2). La différence entre ces deux mesures permet de vérifier que la dérive temporelle n'induit qu'une faible variation entre les deux sondes d'ADN. Le décalage mesuré entre les régions correspondant à ARS3 et ARS5 est d'environ 2 mV.

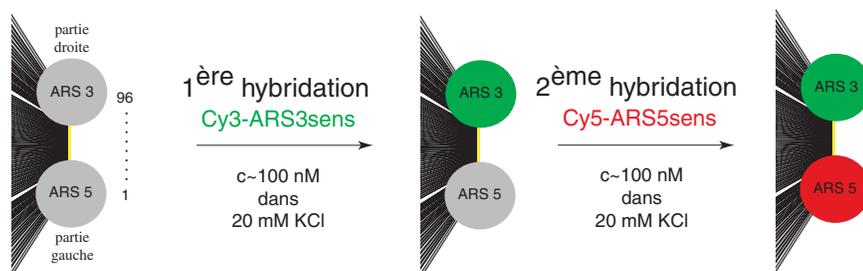


FIGURE 7.12: Deux hybridations successives entre oligonucléotides de séquences différentes sur une puce électronique

Dans un premier temps, nous hybridons cette puce avec des oligonucléotides de 20 bases complémentaire à la séquence ARS3, modifié par un fluorochrome Cy3 en 5' (Cy3-ARS3sens). Ceci est fait par injection d'une solution concentrée de cet oligonucléotide dans l'électrolyte de mesure afin d'obtenir une concentration finale de 100 nM. Après 5 minutes d'hybridation à température ambiante, la réaction est stoppée par rinçage avec une solution de 20 mM en KCl. On peut alors mesurer le réseau de transistor (mesure Hyb1) dans un électrolyte de 20 mM en KCl.

La différence entre cette mesure Hyb1 et la mesure sonde 2 (avant l'hybridation) est représentée sur la figure 7.13. Nous observons sur cette courbe trois parties distinctes. La partie gauche (transistor 1 à 31) de la courbe se décale de -1 mV, tandis que la partie droite (transistor 54 à 96) est décalée de -8.3 mV. Ces deux parties correspondent aux deux zones où ont été déposés

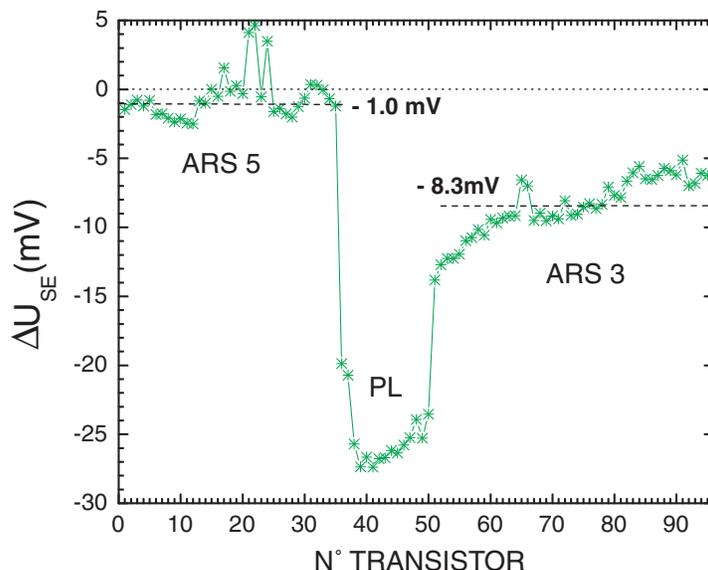


FIGURE 7.13: Signal électronique correspondant à la première hybridation (Cy3-ARS3sens) : différence entre une mesure après hybridation et une mesure avant hybridation. Mesures à 20 mM en KCl. Les régions correspondant aux dépôts de sondes (ARS3 et ARS5) ainsi que la surface de polylysine nue (PL) sont indiquées sur cette figure.

les oligonucléotides. La partie droite est celle où l'on attend l'hybridation entre ARS3 et l'oligonucléotide Cy3-ARS3sens. Elle se décale plus que la région où l'on n'attend pas l'hybridation (partie gauche). La partie centrale se décale de manière importante vis à vis de ces deux régions d'intérêt. Ceci s'explique par l'absence de l'étape bloquante dans le protocole. La surface de polylysine est fortement positive à cet endroit et a donc tendance à adsorber les molécules hybridantes de la solution. Cette interaction non spécifique est probablement également présente sur les régions de sondes mais très peu visible en électronique (seulement - 1 mV). Nous pouvons donc distinguer clairement l'hybridation spécifique entre oligonucléotides.

Pour confirmer cette première hybridation, nous pouvons réaliser l'hybridation croisée sur cette même puce en utilisant la séquence complémentaire à ARS 5. Nous injectons une solution concentrée de Cy5-ARS5sens dans la solution de KCl pour obtenir une concentration finale de 100 nM. Après une hybridation de 5 minutes nous rinçons le capteur avec une solution de KCl 20 mM et nous mesurons de nouveau le réseau de transistors (mesure Hyb2). La différence entre les mesures Hyb2 et Hyb1 permet de donner la variation de la tension ΔU_{SE} pour cette seconde hybridation. Pour comparaison, nous avons représenté sur la figure 7.14 les deux signaux correspondant à chaque hybridation. Les parties centrales ont été supprimées pour plus de clarté. Dans la première hybridation, nous avons déjà décrit le décalage plus important pour la partie droite, où l'on attend l'hybridation. Pour la seconde hybridation, nous observons le phénomène inverse, la partie gauche se décale de -3,3 mV par rapport à la partie droite. Ceci démontre l'hybridation spécifique entre la séquence ARS5 et son complémentaire.

Après ces deux mesures électronique, nous séchons la surface et pouvons scanner la puce en fluorescence à l'aide du montage à deux couleurs décrit dans l'appendice C.1. Avec une longueur d'onde de 532 nm nous excitons le fluorophore Cy3 et collectons la fluorescence correspondante à

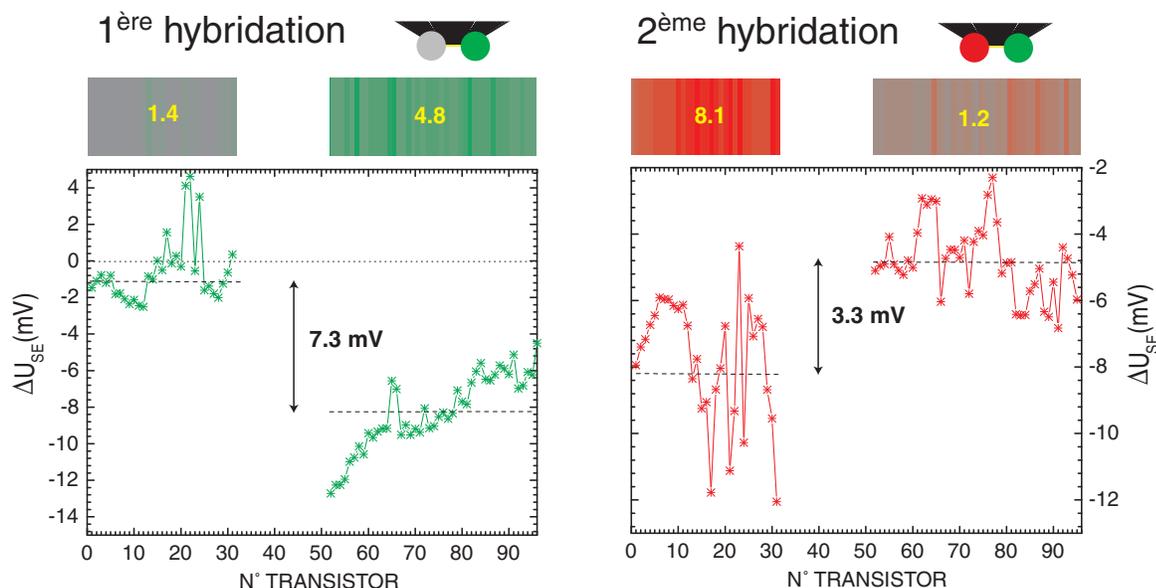


FIGURE 7.14: Comparaison des signaux électroniques des deux hybridations croisées. Au dessus comparaison avec les signaux de fluorescence. Les chiffres correspondent aux valeurs moyennes des signaux de fluorescence sur chacun des dépôts de sondes.

la première hybridation. L'image de fluorescence est donnée au dessus de la courbe électronique. Le signal de fluorescence est environ 4 fois plus important pour la zone hybridée et confirme l'hybridation observée en électronique. En utilisant une longueur d'onde de 633 nm pour exciter les fluorophores Cy5, nous observons 5 fois plus de fluorescence sur la partie gauche correspondant à la zone hybridée lors de la seconde hybridation.

Nous avons prouvé par cette double expérience que l'hybridation spécifique entre oligonucléotides pouvait être détectée électroniquement sur nos réseaux de transistors. Dans cette expérience, les dépôts de sondes ont été réalisés en macrodépôts en utilisant une concentration de $1 \mu M$. Ceci correspond à fixer environ 6.10^5 oligonucléotides/ μm^2 soit 0.03 femtomole d'ADN simple brin par transistor²¹. La quantification du taux d'hybridation n'a pas été réalisée dans cette expérience. Mais en prenant la valeur maximale de 100 % (i.e. l'ensemble des molécules sondes ont été hybridées) nous pouvons donner un seuil de détection de l'hybridation entre oligonucléotides de 0.03 femtomole par transistor et de 6.10^5 oligonucléotides/ μm^2 . Ces valeurs peuvent être comparées à celles obtenues par Fritz et al [66] qui ont utilisés des structures semiconductrices pour une détection de l'hybridation de l'ADN sur des surfaces recouvertes de polylysine. La sensibilité par unité de surface estimée par Fritz et al est de 3.10^4 oligonucléotides/ μm^2 donc inférieure à celle que nous obtenons. Mais ils considèrent un taux d'hybridation de 5%²². En assumant le même taux d'hybridation on obtient une sensibilité par unité de surface de 3.10^4 oligonucléotides/ μm^2 similaire à celle de Fritz. Par contre la sensibilité par capteur est plus

²¹Un macrodépôt de $1 \mu M$ correspond à fixer la même quantité d'ADN par unité de surface que dans un microdépôt de $10 \mu M$ (cf. chapitre 5.4.2). Les valeurs de densité pour les macrodépôts de sondes correspondent donc aux valeurs pour un microdépôt de $10 \mu M$ données au chapitre 5.4.1.

²²Mesure réalisée par radioactivité en quantifiant l'hybridation de cibles sur des surfaces d'oxyde modifiées similairement à celles de leurs capteurs semiconducteurs.

faible dans nos expériences comparée à celle de Fritz ²³ par le simple fait que nous possédons des transistors ayant une surface de $40 \mu m^2$ soit environ cent fois inférieure aux capteurs semi-conducteurs utilisés par Fritz ($2500 \mu m^2$). Le fait que nous ayons convergé en même temps que Fritz vers une méthode de fixation en utilisant une couche de polylysine non bloquée illustre la difficulté lorsque d'autres types de fixation sont envisagés. Les tests préliminaires, que nous avons réalisés sur la fixation par silanisation, montrent en effet une difficulté pour détecter les ADN sondes ainsi que l'hybridation (cf. paragraphe 7.1.8). Des études systématiques devront être entreprises pour caractériser l'influence du silane²⁴. Une approche possible serait d'étudier les modifications induites par différents silanes pour essayer de parvenir à un état de surface proche de la fenêtre de détection permettant d'observer les ADN (i.e proche de l'état après traitement à la polylysine). Les études sur d'autres couplages commencés ici pourraient alors être reprises car les résultats négatifs obtenus sont probablement liés aussi à cet état de surface non parfaitement contrôlé.

²³En prenant un taux d'hybridation de 5%, nous obtenons une sensibilité d'environ 0.002 femtomoles par FET qui est environ cent fois inférieure à celle de Fritz (~ 0.1 femtomole par capteur semiconducteur).

²⁴La difficulté réside dans le fait que le silane modifie chimiquement l'interface (des groupements silanols étant supprimés).

Chapitre 8

Conclusion

Nous avons développé une nouvelle méthode pour détecter électroniquement des biomolécules chargées sur des réseaux de transistors à effet de champ. L'utilisation de réseaux combinée à des méthodes de microdéposition a permis une mesure différentielle de l'adsorption et de l'interaction entre des biopolymères à l'interface solide/liquide. Nous avons montré qu'une analyse des variations des caractéristiques dc des transistors permet en effet de rendre compte de l'apport de charge à l'interface oxyde/électrolyte lors de l'adsorption de biomolécules à la surface des transistors [85, 103].

Nous avons tout d'abord validé la détection électronique en utilisant deux biopolymères modèles portant des charges opposées : la polylysine (adsorbée directement à la surface des transistors) et de courts fragments d'ADN (adsorbés à la surface des transistors préalablement recouverts de polylysine). Les variations des caractéristiques électroniques des transistors ont montrées des effets contraires qui peuvent être reliés à un apport de charges positives pour la polylysine et un apport de charges négatives pour l'ADN. Des variabilités relativement importantes (20-50%) ont été observées dans ces expériences. Nous attribuons ces variabilités à un manque de reproductibilité lors du dépôt pouvant conduire à des inhomogénéités dans la répartition et la quantité de biopolymères déposés ainsi qu'à des variations dans l'état initial de charge des surfaces. Nous avons, en variant la concentration en polymères lors du dépôt, pu mettre en évidence une zone dynamique de détection correspondant à une augmentation du signal électronique en fonction de la concentration en biopolymères déposés jusqu'à une saturation pouvant être attribuée à la quantité maximale de biopolymères s'adsorbant à l'interface. Des signaux électroniques parasites observés sur les solutions servant aux dilutions limitent la détection de basses concentrations en biopolymères. Nous avons estimé à partir de ces expériences des valeurs de sensibilité de 10^7 monomères lysines et de $4 \cdot 10^8$ bases d'ADN par transistor. Nous avons aussi mis en évidence la dépendance des signaux électroniques en fonction de la molarité en sel de l'électrolyte de mesure. La diminution des pics électroniques observée lorsqu'on augmente la concentration en sel a été interprétée à l'aide d'un modèle théorique et peut être reliée à l'écrantage de la charge effective du système électrolyte/biopolymères/FET. L'ajustement des évolutions en sel permet de montrer une tendance vers une neutralisation de la charge d'interface lors de l'adsorption successive de biopolymères. Néanmoins nous observons pour des dépôts d'ADN une inversion

des pics électroniques à haut sel, cette inversion persistant après un retour à bas sel. Nous attribuons ce phénomène à un changement de conformation de la couche condensée de biopolymères adsorbés à l'interface après une augmentation en sel. Nous avons, après ces expériences sur des oligonucléotides commerciaux, optimisé la détection électronique pour des fragments double brin d'ADN issus d'une synthèse par PCR. Une optimisation a été menée pour caractériser l'influence des différents produits nécessaires à cette synthèse. Nous avons alors mis en évidence une détection électronique spécifique de différents fragments PCR vis à vis d'une référence cyclée avec les mêmes produits et dans les mêmes conditions mais n'ayant pas aboutie à la génération d'un fragment PCR (en omettant une base lors du protocole de PCR). Nous avons ensuite couplé cette détection avec un protocole biologique de PCR spécifique à la détection de mutation et montré ainsi la délétion d'une base unique dans une séquence génétique humaine.

La sensibilité pour la détection en molécules d'ADN, de l'ordre de quelques attomoles par transistor, est proche de la sensibilité par dépôt pour des mesures de fluorescence, quelques dixièmes d'attomoles (cf chapitre 2.2.4). La méthode de détection électronique en utilisant des transistors à effet de champ de faibles dimensions apparaît donc comme une technique alternative sensible permettant une détection directe et sans marquage de biomolécules chargées. La parallélisation pour une application¹ à des tests biologiques est envisageable car la technique de fabrication des structures utilisées est proche de la technologie CMOS et permet d'obtenir des réseaux denses de transistors de faibles dimensions. D'autre part, les effets observés sur les séries en sel d'ADN ainsi que les dépendances des signaux électroniques au point de fonctionnement du transistor (cf. appendice B.4) pourraient être étudiés de manière plus détaillée pour parvenir à une description plus pertinente du couplage entre des biomolécules et un capteur semiconducteur. Ce sujet apparaît donc ouvert vers des applications potentielles en biologie et vers une recherche en physique fondamentale permettant une analyse du couplage biomolécules/surface/transistor.

¹Du fait des applications potentielles de ce nouveau mode de détection, nous avons déposé deux brevets sur ce sujet ; le premier protège l'approche différentielle d'une mesure de charge sur des capteurs FETs [104], tandis que le second brevet se rapporte à la détection de l'hybridation sur de tels capteurs [105].

— Appendice A —

Modélisation du système FET/Biomolécules/Electrolyte

En dehors des applications biotechnologiques d'une détection électronique de molécules et d'interactions biologiques sur des réseaux de transistors à effet de champ, le présent travail possède un aspect de physique fondamentale consistant en la compréhension et la modélisation de l'interface entre un capteur électronique (FET) et des molécules biologiques. Nous avons modélisé de manière relativement simple le système afin de décrire l'adsorption de biopolymères et les effets en sel présentés dans cette thèse. Dans un premier temps, nous décrivons un modèle unidimensionnel du système en l'absence de biopolymères à l'interface pour un électrolyte de KCl (électrolyte 1:1). Nous interpréterons alors à partir de ce modèle les effets de l'adsorption de biopolymères, et décrivons l'influence de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure.

A.1 Modélisation du système en l'absence de biopolymères pour un électrolyte 1:1

Les caractéristiques mesurées sont $I_{SD} = f(U_{SD}, U_{SE})$. Bien qu'indirectement relié à la tension U_{SE} , le champ électrique E_{SiO_2} dans l'oxyde est un paramètre qui permet de décrire le couplage entre la partie semiconductrice ($x < 0$) et la partie aqueuse ($x > 0$) du capteur. En négligeant la variation latérale du champ E_{SiO_2} entre la source et le drain, nous pouvons alors décrire le système par un modèle unidimensionnel (figure A.1).

Dans nos expériences, nous calculons à partir du faisceau de caractéristiques mesurées $I_{SD} = f(U_{SE}, U_{SD})$ la variation de la tension U_{SE} pour une valeur donnée du courant I_{SD} et de la tension U_{SD} . Le courant de drain I_{SD} étant déterminé par la valeur de U_{SD} et E_{SiO_2} , si nous imposons une valeur fixe au courant le champ E_{SiO_2} dans l'oxyde reste constant. En négligeant la présence de charge dans l'oxyde, ce champ est relié à la densité de charge σ_S de la couche d'inversion par la relation :

$$E_{SiO_2} = \frac{\sigma_S}{\epsilon_0 \epsilon_r^{SiO_2}} \quad (\text{A.1})$$

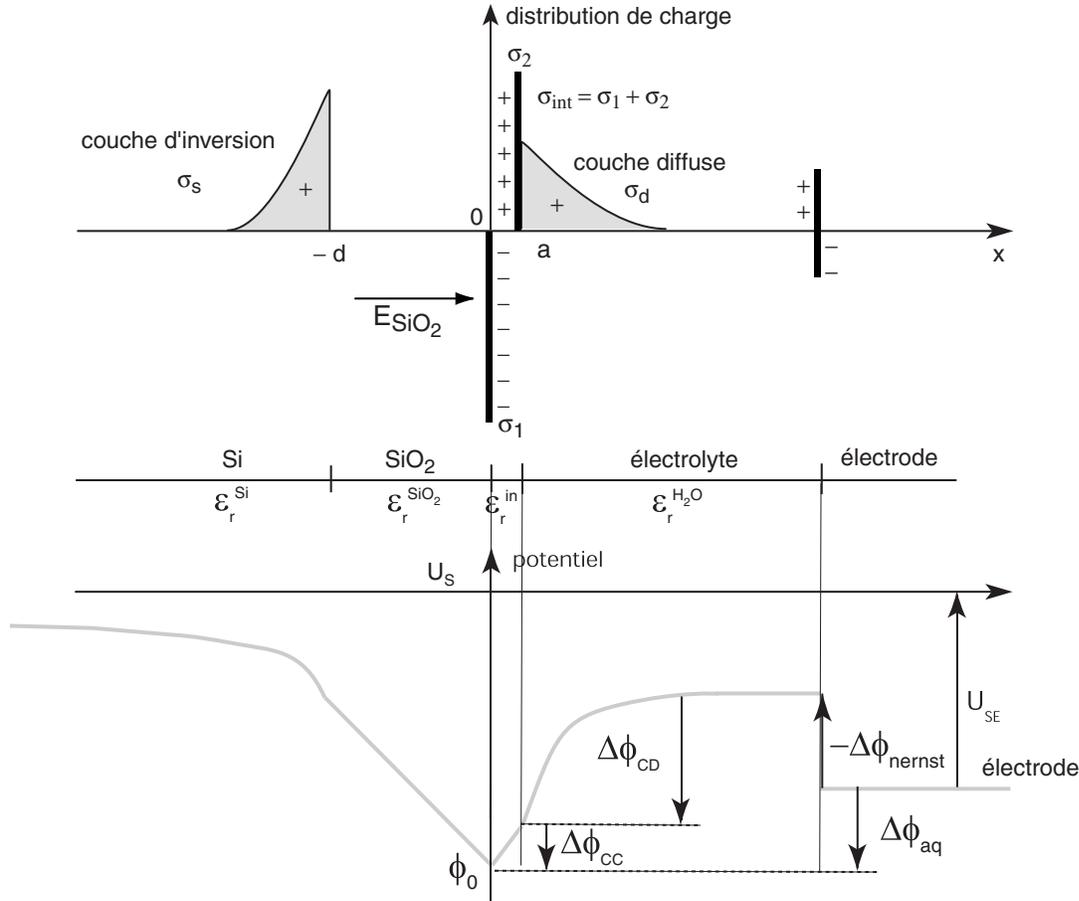


FIGURE A.1: Modèle à une dimension du système FET/électrolyte en l'absence de biopolymères. (a) distribution des charges (b) évolution du potentiel

La valeur du champ électrique E_{SiO_2} permet de déterminer entièrement le saut de potentiel dans la partie semiconductrice et impose une valeur constante pour le potentiel ϕ_0 de l'interface oxyde/électrolyte. En référençant le potentiel ϕ_0 par rapport à la source, la tension U_{SE} peut être écrite sous la forme :

$$U_{SE} = -\phi_0 + \Delta\phi_{aq} \quad (A.2)$$

où $\Delta\phi_{aq}$ correspond au saut de potentiel dans la partie aqueuse, entre la surface d'oxyde de silicium et le corps métallique de l'électrode Ag/AgCl. Nous devons pour déterminer ce saut de potentiel choisir un modèle pour l'interface SiO₂/électrolyte.

En utilisant le modèle classique de double couche [106, 107], l'interface SiO₂/électrolyte peut être décrite par une charge d'interface σ_{int} suivi d'une charge diffuse. La charge d'interface σ_{int} peut être vue comme la somme de deux contributions : une charge négative σ_1 au niveau du plan SiO₂ due principalement aux groupes silanols ionisés SiO^- , et une charge positive plane σ_2 due à la condensation¹ de cations sur un plan dit plan de Helmholtz, la charge d'interface $\sigma_{int} = \sigma_1 + \sigma_2$ restant négative selon [108].

¹En effet, les cations en solution dans l'électrolyte sont attirés par les charges négatives de la surface d'oxyde, une partie de ces ions se condensent au niveau du plan de Helmholtz, les autres formant la couche diffuse.

En écrivant la relation de passage du champ à l'interface SiO_2 /électrolyte ($x=0$), le saut de potentiel $\Delta\phi_{CC}$ à la traversée de la couche d'ions condensés est donné par la relation :

$$\Delta\phi_{CC} = \frac{\sigma_1 + \epsilon_0\epsilon_r^{SiO_2}E_{SiO_2}}{\epsilon_0\epsilon_r^{in}} a = \frac{\sigma_1 + \sigma_S}{\epsilon_0\epsilon_r^{in}} a \quad (A.3)$$

où a est la distance entre la surface et le plan de Helmholtz ($a \simeq 4 \text{ \AA}$), $\epsilon_r^{SiO_2}$ la constante diélectrique relative de l'oxyde de silicium ($\epsilon_r^{SiO_2} \simeq 4$), et ϵ_r^{in} celle de la couche condensée (usuellement plus faible que celle de l'eau "en volume" $\epsilon_r^{H_2O} \simeq 80$).

Dans la couche diffuse, composé d'ions monovalents K^+ et Cl^- , le potentiel $\phi(x)$ est décrit par le modèle de Gouy-Chapman² [106, 107] :

$$\phi(x) - \phi(\infty) = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}}{[Cl^-]8kT}} \left(-\frac{d\phi}{dx} \right) \right) \quad (A.4)$$

où $\phi(x)$ et $-\frac{d\phi}{dx}$ sont respectivement le potentiel et le champ électrique dans la couche diffuse à une distance x de la surface d'oxyde et $\phi(\infty)$ le potentiel dans l'électrolyte en "volume" loin de la surface ($x \gg 0$).

Pour donner la variation de potentiel $\Delta\phi_{CD}$ entre la surface de charge σ_2 ($x=a$) et l'électrolyte en volume, on détermine tout d'abord la valeur du champ électrique en $x=a$:

$$-\frac{d\phi}{dx}(a^+) = \frac{\sigma_{int} + \epsilon_0\epsilon_r^{SiO_2}E_{SiO_2}}{\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}} = \frac{\sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_S}{\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}} \quad (A.5)$$

En définissant σ_{eff} par la somme des densités de charge dans le système pour $x \leq a$:

$$\sigma_{eff} = \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_S \quad (A.6)$$

et en utilisant les équations A.4 et A.5 le saut de potentiel $\Delta\phi_{CD}$ est donnée par la relation :

$$\Delta\phi_{CD} = \phi(a) - \phi(\infty) = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}}} \right) \quad (A.7)$$

La densité de charge dans la couche diffuse σ_d est décrite par la relation inverse de cette équation, dite équation de Grahame [106], elle est donc égale à l'opposé de la charge σ_{eff} :

$$\sigma_d = -\sqrt{[Cl^-]8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}} \sinh \frac{e\Delta\phi_{CD}}{2kT} = -\sigma_{eff} \quad (A.8)$$

Cette relation entre σ_{eff} et σ_d n'est autre que la relation d'électroneutralité pour le système FET/ électrolyte, la somme des différentes densités de charge ($\sigma_s, \sigma_1, \sigma_2, \sigma_d$) présentent dans ce système étant nulle :

$$\sigma_{eff} = -\sigma_d \quad \Rightarrow \quad \sigma_S + \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_d = 0 \quad (A.9)$$

²solution de l'équation de Poisson Boltzmann dans une géométrie 1d.

A l'autre interface solide/liquide, le saut de potentiel entre l'électrolyte et l'électrode d'argent est donné par l'opposé du potentiel de Nernst de l'électrode Ag/AgCl [109] :

$$-\Delta\phi_{Nernst} = \frac{kT}{e} \ln \left(\frac{a(Cl^-)}{a(Cl^-)_{PZC}} \right) \quad (\text{A.10})$$

dans cette relation $a(Cl^-)$ est l'activité des ions chlores, et $a(Cl^-)_{PZC}$ celle au point de charge zéro [110].

Le saut de potentiel $\Delta\phi_{aq}$ entre la surface d'oxyde et le corps métallique de l'électrode est la somme des trois sauts de potentiel déterminés précédemment ($\Delta\phi_{CC}$, $\Delta\phi_{CD}$, $-\Delta\phi_{Nernst}$). La tension U_{SE} peut donc être écrite sous la forme :

$$U_{SE} = -\phi_0 + \Delta\phi_{aq} = -\phi_0 + \Delta\phi_{CC} + \Delta\phi_{CD} - \Delta\phi_{Nernst} \quad (\text{A.11})$$

$$U_{SE} = -\phi_0 + \frac{\sigma_1 + \sigma_S}{\epsilon_0 \epsilon_r^{in}} a + \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-] 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln \left(\frac{a(Cl^-)}{a(Cl^-)_{PZC}} \right) \quad (\text{A.12})$$

Dans les équations précédentes, nous n'avons pas introduit de dépendance pour la charge d'oxyde (σ_1) et la charge du plan condensé (σ_2) aux concentrations des espèces ioniques en solution.

Un modèle plus complet, tenant compte de ces effets, a été développé conjointement par Siu et al [70] et Fung et al [71]. Celui-ci repose sur les ionisations et les complexations possibles à l'interface oxyde/électrolyte. Dans cette approche, les densités de charges ionisées de la surface d'oxyde de silicium sont déterminées par les équilibres acido-basiques, conduisant à la formation de groupes positivement chargés $SiOH_2^+$ ($SiOH + H_{surf}^+ \rightleftharpoons SiOH_2^+$) ou négativement chargés SiO^- ($SiOH \rightleftharpoons SiO^- + H_{surf}^+$). De même, la condensation des ions pouvant être vue comme la formation de complexes entre ces groupes silanols et les contre-ions en solution, les densités de charge du plan condensé sont contrôlées par deux réactions de complexation : $SiOH_2^+ + Cl_{surf}^- \rightleftharpoons (SiOH_2^+)/Cl^-$ et $SiO^- + K_{surf}^+ \rightleftharpoons (SiO^-)/K^+$. Dans ce modèle, les densités de charge au niveau de l'oxyde (σ_1) et du plan condensé (σ_2) dépendent des constantes d'équilibre des réactions décrites ci-dessus, ainsi que des potentiels de chacune des surfaces considérées. En effet, les concentrations des espèces ioniques intervenant dans les équilibres de l'oxyde (H_{surf}^+) et du plan condensé (Cl_{surf}^- et K_{surf}^+) sont celles proches des surfaces, et peuvent être reliés aux concentrations en "volume" (i.e loin de la surface) par la théorie de Boltzmann : $[X]_{surf} = [X]_{vol} \exp(\pm \frac{e\phi_{surf}}{kT})$ où ϕ_{surf} est le potentiel de la surface considérée (oxyde ou plan de Helmholtz). Le système est alors décrit par un ensemble d'équations dépendantes les unes des autres. La résolution par un calcul numérique de ce système d'équations permet de reconstruire l'ensemble des différentes charges d'interface et sauts de potentiel dans le système. Cette résolution numérique fait intervenir un grand nombre de paramètres et nécessite de caractériser préalablement les transistors en utilisant un capteur similaire possédant une grille métallique (c.a.d du type MOSFET) pour accéder aux paramètres internes des transistors qui interviennent dans le calcul. Ce type de modèle permet en particulier de simuler et d'analyser les dépendances au pH des capteurs FET (pH-ISFETs) [111, 112].

Nous avons choisi de garder une approche ne faisant pas appel aux réactions d'ionisations et de complexations de l'interface oxyde/électrolyte car nous souhaitons rendre compte d'une

manière simple (i.e à l'aide d'un modèle à peu de paramètres) des expériences de variations de sel à la fois pour la surface d'oxyde nue et la surface d'oxyde recouverte d'une couche de biopolymères (polylysine et ADN sur polylysine).

A.2 Adsorption de biopolymères chargés et variation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure

L'équation donnant la tension U_{SE} (en fonction de la charge effective σ_{eff} et de la molarité en sel de l'électrolyte de mesure) pour le système semiconducteur/oxyde/électrolyte en l'absence de biopolymères (surface nue) a été dérivée à partir des sauts de potentiel dans la partie aqueuse du capteur (cf. A.11) :

$$U_{SE}^{nue} = -\phi_0^{nue} + \Delta\phi_{CC}^{nue} + \Delta\phi_{CD}^{nue}(\sigma_{eff}^{nue}, [Cl^-]) - \Delta\phi_{Nernst}([Cl^-])$$

Dans les expériences de variation en sel nous déterminons (à courant I_{SD} constant et pour une tension U_{SD} donnée) la variation de la tension $\Delta U_{SE}^{nue-nue.ref}$ pour différentes concentrations en sel de l'électrolyte en utilisant comme référence une mesure de la surface nue ($U_{SE}^{nue.ref}$) effectuée à une concentration $[Cl^-]_{ref}$ de référence :

$$U_{SE}^{nue.ref} = -\phi_0^{nue.ref} + \Delta\phi_{CC}^{nue.ref} + \Delta\phi_{CD}^{nue.ref}(\sigma_{eff}^{nue}, [Cl^-]_{ref}) - \Delta\phi_{Nernst}([Cl^-]_{ref})$$

En travaillant à une valeur donnée du courant I_{SD} et de la tension U_{SD} le potentiel ϕ_0 de l'interface oxyde/électrolyte reste fixé pour l'ensemble des mesures en sel ($\phi_0^{nue} = \phi_0^{nue.ref} \forall [Cl^-]$). L'évolution de $\Delta U_{SE}^{nue-nue.ref} = f([Cl^-])$ est alors donnée par :

$$\begin{aligned} \Delta U_{SE}^{nue-nue.ref} &= U_{SE}^{nue} - U_{SE}^{nue.ref} = \Delta\phi_{CD}^{nue}(\sigma_{eff}^{nue}, [Cl^-]) - \Delta\phi_{Nernst}([Cl^-]) + C_{nue} \\ \text{avec } C_{nue} &= -\Delta\phi_{CD}^{nue}(\sigma_{eff}^{nue}, [Cl^-]_{ref}) + \Delta\phi_{Nernst}([Cl^-]_{ref}) \end{aligned}$$

En considérant la couche adsorbée de polymères comme une couche condensée³ à la surface de l'oxyde, l'évolution de la tension U_{SE}^{abs} en fonction du sel pour la surface recouverte de biopolymères par rapport à la mesure de référence ($U_{SE}^{ref.nue}$) est donnée par :

$$\Delta U_{SE}^{abs-nue.ref} = U_{SE}^{abs} - U_{SE}^{ref.nue} = \Delta\phi_{CD}^{abs}(\sigma_{eff}^{abs}, [Cl^-]) - \Delta\phi_{Nernst}([Cl^-]) + C_{abs}$$

où σ_{eff}^{abs} est la nouvelle charge effective de l'interface

$$\text{et } C_{abs} = C_{nue} + \Delta\phi_{CC}^{abs} - \Delta\phi_{CC}^{nue}$$

³La couche de biopolymère est dans ce cas modélisée par un plan chargé à une distance d de la surface d'oxyde et par analogie au cas de la surface nue la tension U_{SE}^{abs} est alors donnée par :

$$U_{SE}^{abs} = -\phi_0^{abs} + \Delta\phi_{CC}^{abs} + \Delta\phi_{CD}^{abs}(\sigma_{eff}^{abs}, [Cl^-]) - \Delta\phi_{Nernst}([Cl^-])$$

où $\Delta\phi_{CC}^{abs}$ est le saut de potentiel à travers la couche condensée de biopolymères

et σ_{eff}^{abs} la nouvelle charge effective du système : $\sigma_{eff}^{abs} = \sigma_{int}^{abs} + \sigma_S$.

Dans ce modèle nous supposons aucune dépendance en sel du saut de potentiel à travers la couche condensée. Un modèle plus complet faisant intervenir une épaisseur finie pour la couche de biopolymères adsorbés devra être développé pour interpréter de manière plus précise les inversions observées lors des séries en sel pour les surfaces recouvertes de polylysine et d'ADN.

Les évolutions en sel pour les surfaces nues⁴ et les surfaces recouvertes de biopolymères sont donc décrites par une expression⁵ équivalente faisant intervenir deux paramètres (une charge effective σ_{eff} et une constante C) :

$$\Delta U_{SE} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln(a(Cl^-)) + C \quad (A.13)$$

Dans cette équation apparaissent l'activité et la concentration en ions Cl^- . Nous devons relier ces deux quantités à la concentration en KCl introduite, en tenant compte de la solubilité de l'électrode Ag/AgCl à bas sel et les corrections d'activité à haut sel.

Solubilité

En utilisant la définition du produit de solubilité K_S du précipité ($AgCl_{(s)}$)⁶ et la relation d'électroneutralité⁷, nous pouvons réécrire la concentration en ions Cl^- en fonction de la concentration en ions K^+ , c'est à dire de la quantité de KCl introduite ($[KCl]_{int}$) :

$$[Cl^-] = \frac{1}{2} \left([K^+] + \sqrt{[K^+]^2 + 4K_S} \right) = \frac{1}{2} \left([KCl]_{int} + \sqrt{[KCl]_{int}^2 + 4K_S} \right) \quad (A.14)$$

La correction intervient à bas sel quand la quantité $\sqrt{4K_S} \sim 2.10^{-5}$ n'est plus négligeable devant $[KCl]_{int}$, c'est à dire pour des concentrations en sel de l'ordre de 10^{-5} M (pour $[KCl]_{int}=10^{-5}$ M : $[Cl^-] = 1.9 \cdot 10^{-5}$ M).

Activité

Le coefficient d'activité γ_{Cl^-} des ions Cl^- peut être relié à la concentration en $[Cl^-]$ en utilisant une loi de Debye-Hückel étendue selon [113] :

$$\log(\gamma_{Cl^-}) = \log \left(\frac{a(Cl^-)}{[Cl^-]} \right) = - \frac{A\sqrt{[Cl^-]}}{1 + B\sqrt{[Cl^-]}}$$

où A et B sont deux constantes que l'on peut déterminer à l'aide de données tabulées dans [110] (A=0,509 et B=1,3).

L'activité est alors donnée en fonction de la concentration en Cl^- par :

$$a(Cl^-) = [Cl^-] \cdot 10^{-\frac{A\sqrt{[Cl^-]}}{1+B\sqrt{[Cl^-]}}}$$

⁴Cette modélisation s'applique aussi pour une couche d'ADN adsorbée à la surface de polylysine. Dans ce cas la surface "nue" correspond à la surface de polylysine en l'absence d'ADN.

⁵Dans cette expression l'activité $a(Cl^-)_{PZC}$ n'est plus apparente. En effet en faisant la différence entre les mesures à différentes concentrations en sel et la mesure de référence le terme $\ln(a(Cl^-)_{PZC})$ est supprimé.

⁶ $K_S = a(Ag^+)a(Cl^-) = \gamma_{Ag^+}[Ag^+]\gamma_{Cl^-}[Cl^-]$, K_S valant $1,77 \cdot 10^{-10}$

⁷ $[Cl^-] = [K^+] + [Ag^+]$

Ces corrections interviennent ici à relativement haut sel. Pour des valeurs de $[Cl^-]$ de (1mM, 10mM, 100 mM et 1M), l'activité $a(Cl^-)$ est respectivement égale à $(0.960, 0.902, 0.77, 0.607) * [Cl^-]$. En utilisant la relation A.14 on obtient alors l'activité en fonction de la concentration en $[KCl]_{int}$ introduite :

$$a(Cl^-) = \frac{1}{2} \left([KCl]_{int} + \sqrt{[KCl]_{int}^2 + 4K_S} \right) \cdot 10^{-\frac{A \sqrt{\frac{1}{2} \left([KCl]_{int} + \sqrt{[KCl]_{int}^2 + 4K_S} \right)}}{1+B \sqrt{\frac{1}{2} \left([KCl]_{int} + \sqrt{[KCl]_{int}^2 + 4K_S} \right)}}} \quad (A.15)$$

Simulation et ajustement des dépendances en sel

A partir de l'équation A.13 donnant l'évolution de $\Delta U_{SE} = f[Cl^-]$:

$$\Delta U_{SE} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-] 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln(a(Cl^-)) + C$$

et des relations A.14 et A.15, nous pouvons simuler⁸ la variation de ΔU_{SE} en fonction du sel pour des systèmes de charges effectives σ_{eff} différentes (cf. figure A.2).

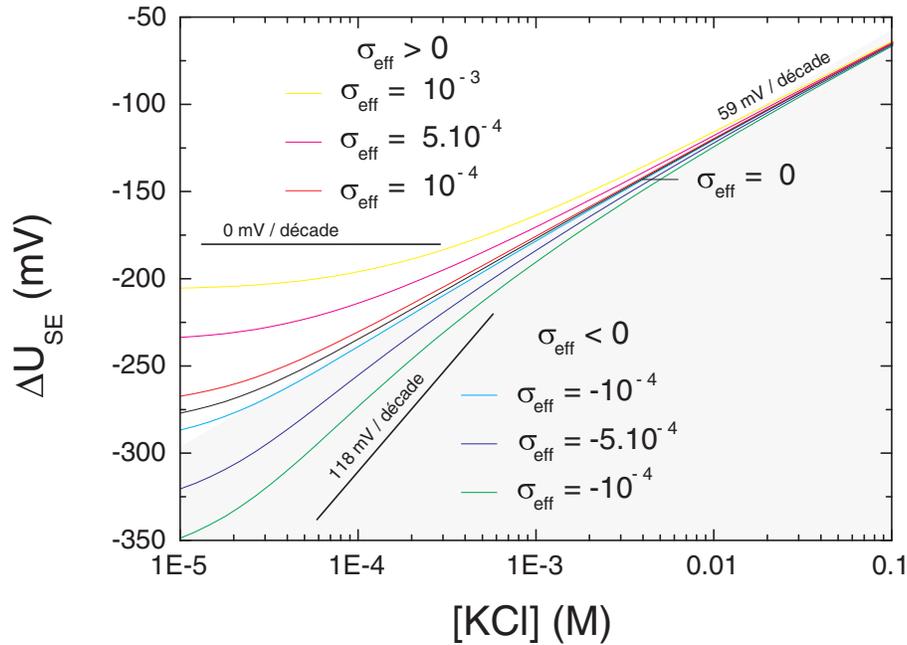


FIGURE A.2: Variation de ΔU_{SE} en fonction de la concentration en sel dans l'électrolyte de mesure pour différentes valeurs de la charge effective.

La variation en sel est due à deux effets : un effet de l'électrode Ag/AgCl et un effet d'écrantage dans la couche diffuse. L'effet de l'électrode correspond à la variation du saut de potentiel entre

⁸Pour cette simulation la valeur de la constante C correspond à une concentration $[Cl^-]_{ref}$ de 1M.

l'électrolyte et le corps métallique de l'électrode ($-\Delta\phi_{Nernst}$) :

$$-\Delta\phi_{Nernst} = \frac{kT}{e} \ln(a(Cl^-)) + cte$$

En négligeant les corrections pour l'activité ce terme peut se réécrire en fonction de la concentration en $[KCl]$ introduite :

$$-\Delta\phi_{Nernst} = \frac{kT}{e} \ln([KCl]_{int}) + cte$$

L'augmentation de la concentration en sel tend à accroître la valeur de ce terme, d'où une augmentation de ΔU_{SE} . Par décade et à température ambiante, cette variation est de l'ordre de $\frac{kT}{e} \ln(10) \approx 59$ mV.

La dépendance en sel est aussi due à une modification de l'écrantage de la charge σ_{eff} du système par l'électrolyte de mesure, cette dépendance étant donnée par la variation du saut de potentiel dans la couche diffuse :

$$\Delta\phi_{CD} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]} 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}} \right) = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\alpha \frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]}} \right)$$

$$\text{avec } \alpha = \frac{1}{\sqrt{8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \approx 8.4 \begin{cases} \text{pour } [Cl^-] \text{ exprimée en } mol.l^{-1} \\ \text{et pour } \sigma_{eff} \text{ exprimée en } C/m^2 \end{cases}$$

- Pour une charge effective nulle ($\sigma_{eff} = 0$) :

Ce terme n'intervient pas et, la dépendance en sel est dans ce cas uniquement due à un effet d'électrode. Nous observons bien sur la courbe simulée correspondante une pente moyenne de 59 mV/décade. La courbure observable à bas sel ($< 10^{-4}M$) résulte de la correction liée à la solubilité et, celle à haut sel ($> 10^{-1}M$) de la correction liée à l'activité.

- Pour des charges effectives négatives ($\sigma_{eff} < 0$) :

$\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]}} \nearrow$ quand $[Cl^-] \nearrow$ d'où une augmentation de ΔU_{SE} qui se rajoute à celle relative à l'électrode. La pente maximale correspondant à des charges effectives "fortement"⁹ négatives est de 59 mV/décade soit une pente totale de 118 mV/décade.

- Pour des charges effectives positives ($\sigma_{eff} > 0$) :

$\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]}} \searrow$ quand $[Cl^-] \nearrow$ d'où une diminution de ΔU_{SE} qui contrebalance l'augmentation relative à l'électrode. La pente minimale, pour des charges effectives "fortement" positives, est dans ce cas de -59 mV/décade soit une pente totale nulle.

⁹Plus précisément pour des charges effectives négatives (-) ou positives (+) telles que $\frac{\alpha|\sigma_{eff}^\pm|}{\sqrt{[Cl^-]}} \gg 1$:

$$\Delta\phi_{CD} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\alpha \frac{\sigma_{eff}^\pm}{\sqrt{[Cl^-]}} \right) \approx \mp \frac{kT}{e} (\ln[Cl^-]) \pm \frac{2kT}{e} \ln(2\alpha |\sigma_{eff}^\pm|)$$

Soit pour $\sigma_{eff} < 0$ une pente en fonction du sel similaire à celle correspondant à l'effet d'électrode $\frac{kT}{e} \ln(10) \approx 59$ mV/décade et, pour $\sigma_{eff} > 0$ une pente inverse de $-\frac{kT}{e} \ln(10) \approx -59$ mV/décade.

L'expression utilisée pour simuler ces courbes nous permet d'ajuster les évolutions en sel présentées dans ce manuscrit et d'obtenir une charge effective du système pour une surface d'oxyde nue ou recouverte de biopolymères.

Adsorption de biopolymères

Bien qu'il existe un écart entre les constantes C_{abs} et C_{nue} ajustées à partir des expériences de variation en sel, celui-ci reste relativement faible devant les signaux électroniques mesurés à bas sel. Ceci permet alors d'attribuer le décalage $\Delta U_{SE}^{abs-nue} = U_{SE}^{abs} - U_{SE}^{nue}$ mesuré après l'adsorption de biopolymère essentiellement à une modification dans la couche diffuse d'ions écrantant la charge d'interface σ_{eff} . Le décalage étant donné pour une concentration en sel $[Cl^-]$ par :

$$\Delta U_{SE}^{abs-nue} = U_{SE}^{abs} - U_{SE}^{nue} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}^{abs}}{\sqrt{[Cl^-]8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}}} \right) - \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}^{nue}}{\sqrt{[Cl^-]8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}}} \right) + C_{abs} - C_{nue}$$

L'apport de biopolymères correspond dans cette description à une modification de la charge de l'interface¹⁰ σ_{int} . Un apport de polymères positivement chargés tend à augmenter la densité de charge à l'interface ($\sigma_{int} \nearrow \Leftrightarrow \sigma_{eff}^{abs} > \sigma_{eff}^{nue}$), ceci correspond à une augmentation du saut de potentiel dans la couche diffuse et correspond bien à une variation positive de la tension U_{SE} ($\Delta U_{SE}^{abs-nue} > 0$). A contrario, un apport de polymères négativement chargés tend à diminuer la densité de charge à l'interface ($\sigma_{int} \searrow \Leftrightarrow \sigma_{eff}^{abs} < \sigma_{eff}^{nue}$), ceci conduit alors à une variation négative de la tension U_{SE} ($\Delta U_{SE}^{abs-nue} < 0$).

¹⁰La charge dans le semiconducteur σ_S reste en effet fixée lorsque l'on travaille à courant I_{SD} constant (pour une tension U_{SD} donnée) ou autrement dit pour un potentiel d'interface ϕ_0 constant. La variation de la charge effective ($\sigma_{eff} = \sigma_{int} + \sigma_S$) est alors égale à la variation de la charge d'interface : $\Delta\sigma_{eff} = \sigma_{eff}^{abs} - \sigma_{eff}^{nue} = \sigma_{int}^{abs} - \sigma_{int}^{nue} = \Delta\sigma_{int}$.

— Appendice B —

Compléments sur l'analyse des caractéristiques dc des transistors

B.1 Caractéristiques électroniques des transistors et influence des résistances en série

Par analogie au MOSFET nous pouvons dériver les équations donnant les caractéristiques des transistors EOSFET utilisés dans nos expériences. La présence de résistances en série modifie les caractéristiques dc des transistors. Nous verrons dans la suite deux méthodes différentes pour déterminer ces résistances afin d'obtenir après correction les caractéristiques réelles des transistors.

B.1.1 Caractéristiques dc des transistors

La structure EOSFET des transistors à effet de champ que nous utilisons est similaire à celle d'un transistor MOSFET où le rôle de la grille métallique est remplacé par l'électrolyte de mesure. Pour un MOSFET à canal d'inversion p, lorsque la grille est polarisée négativement par rapport à la source au dessus d'une tension seuil U_T ¹ ($U_{GS} < U_T$ ou id. $U_{SG} > -U_T$), il se crée sous l'oxyde de silicium dans le substrat (de type n) une couche d'inversion de trous (canal p). Dans le modèle dit de contrôle de charge, le courant source/drain I_{SD} du transistor peut alors être approximé par deux équations correspondant à deux régions différentes. La première correspond à la zone de conduction pour des tensions source/drain telles que $U_{SD} < U_{SG} + U_T$:

$$I_{SD} = \beta \cdot [(U_{SG} + U_T)U_{SD} - \frac{U_{SD}^2}{2}]$$

Lorsque la tension U_{SD} atteint la valeur seuil $U_{SDsat} = U_{SG} + U_T$ le canal de trous est alors "pincé"² et le courant I_{SD} n'augmente plus avec la tension U_{SD} . La valeur I_{SDsat} dans cette

¹Cette tension de seuil dépend de paramètres intrinsèques du transistor : niveau de dopage, capacité de l'oxyde.

²Lorsque la tension U_{SD} atteint la valeur seuil U_{SDsat} l'épaisseur de la couche d'inversion tend vers zéro au

zone dite de saturation est donnée par la relation :

$$I_{SD} = I_{SDsat} = \frac{\beta \cdot (U_{SG} + U_T)^2}{2}$$

Le paramètre β introduit dans ces deux équations dépend uniquement des propriétés du transistor ; β étant donné par la relation suivante :

$$\beta = \frac{l}{L} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d_{ox}} \mu_p \quad (\text{B.1})$$

où l et L sont respectivement la largeur et la longueur de la zone active, $\epsilon_0 \epsilon_r$ la permittivité de l'oxyde, μ_p la mobilité des trous et d_{ox} l'épaisseur de l'oxyde de silicium.

Pour des transistors du type EOSFET, la tension de grille U_{GS} peut être remplacée par le potentiel ϕ_0 de l'interface oxyde/électrolyte, la référence de potentiel étant la source. On en déduit alors en fonction de ϕ_0 les caractéristiques des transistors :

$$I_{SD} = \beta \cdot [(\phi_T - \phi_0)U_{SD} - \frac{U_{SD}^2}{2}] \quad (\text{pour } U_{SD} < \phi_T - \phi_0)$$

$$I_{SD} = I_{SDsat} = \frac{\beta \cdot (\phi_T - \phi_0)^2}{2} \quad (\text{pour } U_{SD} > \phi_T - \phi_0)$$

où ϕ_T est le nouveau paramètre de seuil³. Dans l'appendice précédent nous avons relié le potentiel ϕ_0 à la tension imposée entre la source et le corps métallique de l'électrode de mesure U_{SE} par la relation : $U_{SE} = -\phi_0 + \Delta\phi_{aq}$ où $\Delta\phi_{aq}$ est le saut de potentiel dans l'électrolyte de mesure entre la surface d'oxyde et le corps métallique de l'électrode. Nous pouvons donc réécrire une nouvelle fois les équations caractéristiques du transistor en fonction de ces différents paramètres :

$$I_{SD} = \beta \cdot [(U_{SE} - \Delta\phi_{aq} + \phi_T)U_{SD} - \frac{U_{SD}^2}{2}] \quad (\text{pour } U_{SD} < U_{SE} - \Delta\phi_{aq} + \phi_T)$$

$$I_{SD} = I_{SDsat} = \frac{\beta \cdot (U_{SE} - \Delta\phi_{aq} + \phi_T)^2}{2} \quad (\text{pour } U_{SD} > U_{SE} - \Delta\phi_{aq} + \phi_T)$$

Nous pouvons introduire la tension $U_{SE}^{(T)} = \Delta\phi_{aq} - \phi_T$ comme tension U_{SE} seuil à partir de laquelle il y a création de la couche d'inversion. Les caractéristiques de des transistors ($I_{SD} = f[U_{SE}, U_{SD}]$) sont alors respectivement donnés par l'expression B.2 dans la zone de conduction ($U_{SD} < U_{SE} - U_{SE}^{(T)}$) et par l'expression B.3 dans la zone de saturation ($U_{SD} > U_{SE} - U_{SE}^{(T)}$).

niveau du drain. Ce phénomène appelé pincement du canal conduit à la saturation du courant I_{SD} pour des tensions $U_{SD} > U_{SDsat}$.

³Le canal de trous sera créé pour des potentiels ϕ_0 de l'interface oxyde/électrolyte tels que $\phi_0 < \phi_T$. Le paramètre ϕ_T est dépendant des paramètres internes du transistor et pourrait être déterminé sur un transistor test où l'on déposerait une grille métallique.

$$I_{SD} = \beta \cdot [(U_{SE} - U_{SE}^{(T)})U_{SD} - \frac{U_{SD}^2}{2}] \quad (\text{pour } U_{SD} < U_{SE} - U_{SE}^{(T)}) \quad (\text{B.2})$$

$$I_{SD} = I_{SDsat} = \frac{\beta \cdot (U_{SE} - U_{SE}^{(T)})^2}{2} \quad (\text{pour } U_{SD} > U_{SE} - U_{SE}^{(T)}) \quad (\text{B.3})$$

B.1.2 Influence des résistances en série

Nous nous attendons donc à obtenir des caractéristiques $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD})$ similaires à celles d'un transistor MOSFET où la tension source/grille (U_{SG}) est remplacée par la tension source/électrode (\tilde{U}_{SE}). Les figures B.1 et B.2 représentent les caractéristiques mesurées pour un transistor donné du réseau de 96 FETs.

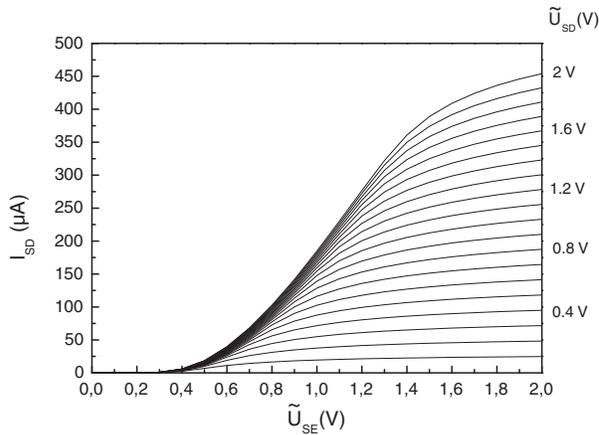


FIGURE B.1: Caractéristiques $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE})$ pour différents $\tilde{U}_{SD} \in [0.1\text{V}; 2\text{V}]$

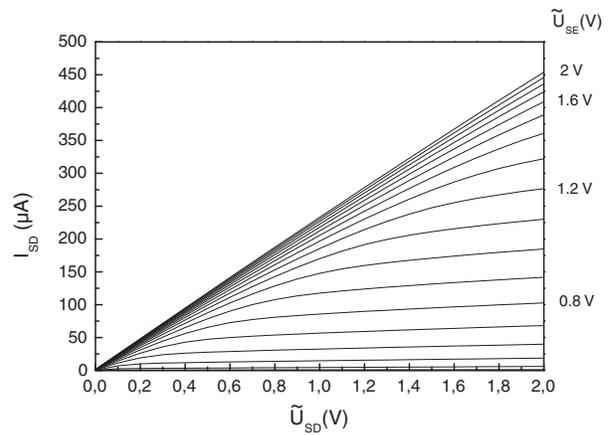


FIGURE B.2: Caractéristiques $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SD})$ pour différents $\tilde{U}_{SE} \in [0.4\text{V}; 2\text{V}]$

Sur la figure B.1 présentant les caractéristiques $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE})$ pour différents \tilde{U}_{SD} , nous observons une saturation du courant I_{SD} lorsque la tension U_{SE} augmente. Cette saturation n'était pas attendue. En effet, pour des tensions $U_{SE} > U_{SE}^{(T)} + U_{SD}$ le courant de drain devrait croître linéairement avec la tension U_{SE} selon l'expression dérivée dans la zone de conduction (cf. equation B.2). Cette modification des caractéristiques dc des transistors peut être attribuée aux résistances en série dues aux connecteurs de drain du réseau. Les tensions (\tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD}) imposées par la carte électronique au niveau de la puce électronique ne sont pas celles réellement imposées aux transistors. Nous développons dans le paragraphe suivant deux méthodes différentes pour caractériser ces résistances et, après avoir décrit la méthode de correction, nous présenterons les caractéristiques "réelles" des transistors.

B.2 Détermination des résistances en série et correction pour le réseau de 96 transistors

B.2.1 Détermination des résistances par une approximation géométrique des connexions

Les connecteurs de drains ainsi que celui de la source commune sont réalisés par dopage du substrat de silicium. L'implantation⁴ d'une impureté de dopage à travers un masque de nitrure, lors de la fabrication des puces électroniques, permet de réaliser une couche conductrice entre le réseau et les connecteurs métalliques [74, 75]. Pour un connecteur de longueur L et de largeur W , on obtient une résistance R qui dépend de ces deux paramètres géométriques et de la résistance⁵ de couche R_{\square} : $R = R_{\square} \frac{L}{W}$. Nous allons donner ci-dessous une estimation des résistances des connecteurs en tenant compte de leurs géométries. Nous déterminerons dans un premier temps les valeurs des résistances pour les connecteurs de drains en utilisant une approximation trapézoïdale de la géométrie des connexions. Nous donnerons ensuite une estimation de la résistance de source.

a) Connecteurs de drains⁶

La figure B.3 représente l'ensemble des connecteurs de drains pour le réseau de 96 transistors. Ceux-ci sont repérés par leurs coordonnées au niveau du réseau $[X_{D_n}; Y_{D_n}]$ et par leurs coordonnées au niveau des connecteurs métalliques $[X_{C_n}; Y_{C_n}]$.

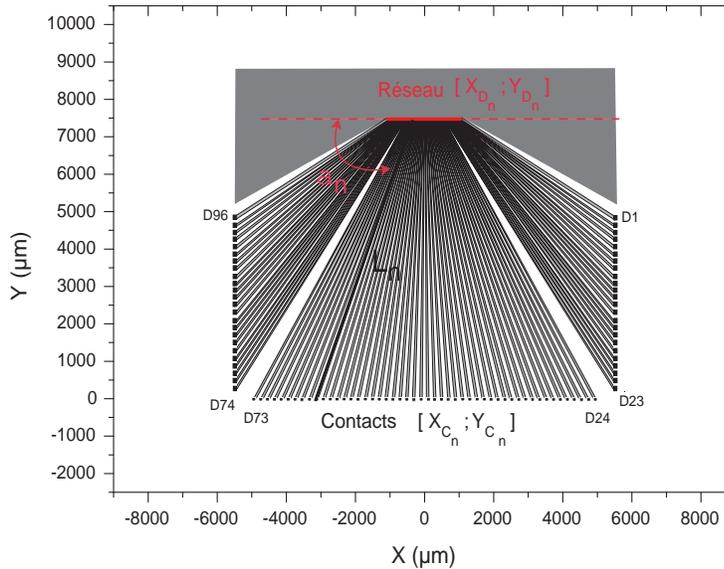


FIGURE B.3: Schéma des connecteurs de drains et de source du réseau de 96 transistors.

⁴Pour nos structures, il s'agit d'une implantation de bore p^+ qui permet de créer localement des connecteurs dans le substrat de type n.

⁵On définit la résistance de couche R_{\square} par le rapport $R_{\square} = \frac{\rho}{e}$ où ρ est la résistivité moyenne de la couche et e l'épaisseur d'implantation. La résistance de couche est égale à celle d'un carré de taille arbitraire, elle s'exprime en ohm/carré (Ω/\square).

⁶La résistance de couche vaut pour ces connecteurs $R_{\square} = 17(\Omega/\square)$.

La longueur des connexions, ainsi que l'angle dépendent du numéro des drains :

$$L_n = \sqrt{(X_{D_n} - X_{C_n})^2 + (Y_{D_n} - Y_{C_n})^2} \quad \text{et} \quad \alpha_n = \arccos\left(\frac{X_{D_n} - X_{C_n}}{L_n}\right) \quad (\text{B.4})$$

La géométrie des contacts est représentée sur la figure B.4. On peut calculer les résistances en approximant chaque connecteur comme un trapèze de longueur L_n , de bases B_{1_n} et B_{2_n} .

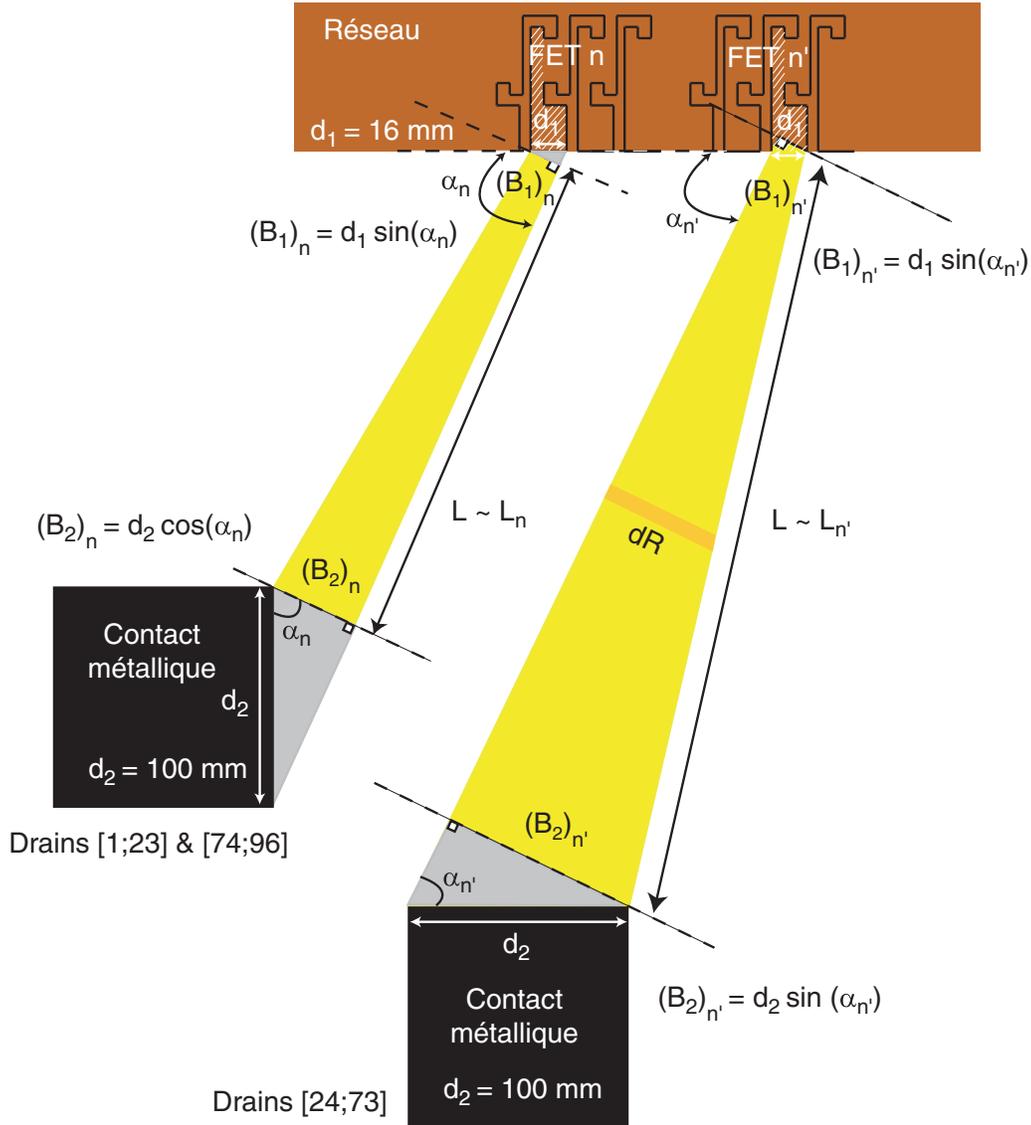


FIGURE B.4: Géométrie de deux connecteurs de drain ; un drain $\in [1;23] \cup [74;96]$ et un drain $\in [24;73]$

La résistance d'un connecteur de drain peut alors être déduite en intégrant la résistance élémentaire $dR = R_{\square} \frac{dx}{y(x)}$ sur la longueur du trapèze :

$$R_n^{\text{trapeze}} = R_{\square} \int_0^{L_n} \frac{dx}{y(x)} = R_{\square} \int_0^{L_n} \frac{dx}{B_{1_n} + \left(\frac{B_{2_n} - B_{1_n}}{L_n}\right)x} \quad (\text{B.5})$$

On obtient après intégration la résistance du n-ième connecteur de drain R_{D_n} :

$$R_{D_n} = R_{\square} \frac{L_n}{B_{2_n} - B_{1_n}} \ln \frac{B_{2_n}}{B_{1_n}} \quad (\text{B.6})$$

Pour relier les bases B_{1_n} et B_{2_n} au paramètre d'angle, il faut considérer deux zones :

- La première concerne les drains [1 à 23] et [74 à 96] où le contact avec le plot métallique s'effectue sur le côté de celui-ci. On relie alors B_{1_n} et B_{2_n} à l'angle α_n par $B_{1_n} = d_1 \sin(\alpha_n)$ et $B_{2_n} = d_2 \cos(\alpha_n)$ où d_1 est la dimension latérale du connecteur au niveau du réseau ($d_1 = 16 \mu m$) et d_2 est la taille du plot métallique ($d_2 = 100 \mu m$).
- la seconde zone concerne les drains [24 à 73] où le contact avec le plot métallique s'effectue sur le bord supérieur de celui-ci. $B_{1_{n'}}$ et $B_{2_{n'}}$ sont liés à l'angle $\alpha_{n'}$ par $B_{1_{n'}} = d_1 \cos(\alpha_{n'})$ et $B_{2_{n'}} = d_2 \sin(\alpha_{n'})$.

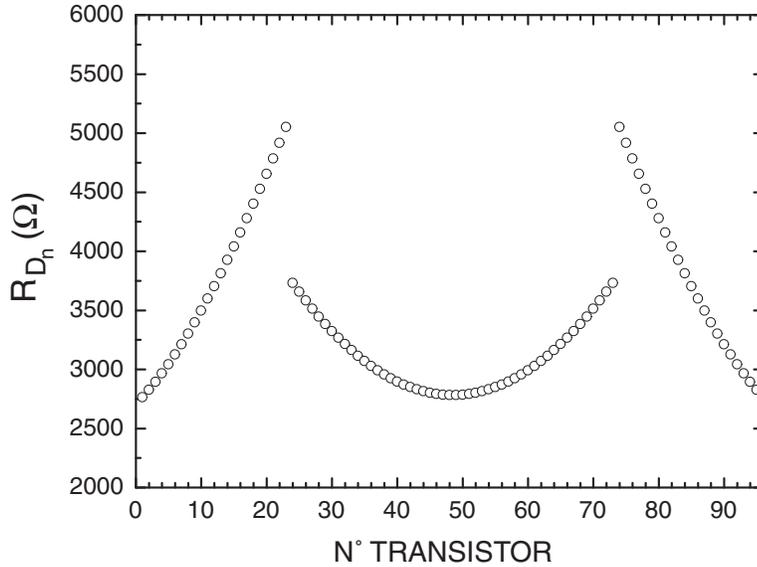


FIGURE B.5: Valeurs des résistances des connecteurs de drains en fonction du numéro de transistors.

La figure B.5 représente la valeur de la résistance de drain en fonction du numéro de transistor. Ces valeurs sont calculées à partir de l'équation (B.6) et des formules (B.4) en utilisant les coordonnées $[X_{D_n}; Y_{D_n}]$ et $[X_{C_n}; Y_{C_n}]$ du réseau. On observe une variation discontinue des résistances en fonction du numéro de transistor. La dépendance continue est due à deux effets complémentaires : la variation de longueur de la connection L_n et la variation de dimension de la base B_{2_n} ⁷. Le saut discontinu de la résistance entre le drain 23 et 24 (ou 73 et 74) est dû au changement d'orientation du contact au niveau du plot métallique (cf. figure B.4), ce qui entraîne une augmentation brutale de la taille de la base B_{2_n} du trapèze ($\{B_{2_{n'}}\}_{24} > \{B_{2_n}\}_{23}$) d'où une nette diminution de la résistance.

Dans ce calcul, nous avons négligé la contribution au niveau du réseau (partie hachurée sur la figure B.4). Cette contribution est inférieure à 50Ω et est de l'ordre des erreurs effectuées

⁷Du drain 1 à 23 L_n augmente et B_{2_n} diminue et du drain 24 à 48 L_n diminue et B_{2_n} augmente.

en approximant les connecteurs par des trapèzes (les surfaces en grisées ne sont pas prises en compte). Les erreurs induites par la contribution au niveau du réseau et par l'approximation trapézoïdale des connexions peuvent être négligées car ces contributions de l'ordre de 50Ω sont faibles devant les valeurs moyennes des résistances ($\sim 3500 \Omega$) et n'influeront que très peu sur les caractéristiques des transistors.

b) Connecteur de source

La source possède deux connecteurs de part et d'autre du réseau (partie en gris foncé sur la figure B.3). On peut estimer la résistance induite par ces connecteurs de manière géométrique comme pour les drains, on obtient par ce calcul une valeur de l'ordre de 100Ω . Nous pouvons aussi déterminer de manière approximative cette résistance en mesurant celle-ci entre les deux points de connexions de part et d'autre de la structure. La mesure⁸ donne une valeur proche de celle estimée par la géométrie : $R_S = 70\Omega$.

B.2.2 Détermination des résistances par une analyse des caractéristiques des transistors

Les caractéristiques du transistor ont été décrites au paragraphe B.1.1. Si l'on considère l'expression dérivée pour notre capteur dans la partie de conduction (cf. equation B.2) :

$$I_{SD} = \beta \cdot [(U_{SE} - U_{SE}^{(T)})U_{SD} - \frac{U_{SD}^2}{2}]$$

Pour des tensions $U_{SD} \ll U_{SE} - U_{SE}^{(T)}$, on peut négliger dans cette équation le terme en U_{SD}^2 . On en déduit alors l'équation caractéristique de la zone de conduction pour de faibles tensions U_{SD} :

$$I_{SD} = \beta(U_{SE} - U_{SE}^{(T)})U_{SD} \quad (\text{B.7})$$

où U_{SD} et U_{SE} sont les tensions au niveau du transistor. Ces deux tensions se déduisent de celles au niveau des connecteurs métalliques \tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD} (valeurs imposées par l'électronique de mesure) en retranchant les tensions aux bornes des résistances de série :

$$\begin{aligned} U_{SE} &= \tilde{U}_{SE} - R_S I_{SD} \\ U_{SD} &= \tilde{U}_{SD} - (R_D + R_S) I_{SD} \end{aligned}$$

On déduit alors à partir de l'équation B.7, l'évolution du courant de drain I_{SD} pour de faibles tensions \tilde{U}_{SD} :

$$I_{SD} = \beta(\tilde{U}_{SE} - R_S I_{SD} - U_{SE}^{(T)})(\tilde{U}_{SD} - (R_S + R_D)I_{SD}) \quad (\text{B.8})$$

Nous pouvons négliger dans cette équation $R_S I_{SD}$ devant \tilde{U}_{SE} . En effet, la faible valeur de R_S ($R_S \simeq 140 \Omega$) ainsi que celles des courants mesurés ($< 50 \mu\text{A}$ pour $U_{SD} = 100 \text{ mV}$) conduisent à une valeur $R_S I_{SD}$ inférieure à 10 mV et donc négligeable devant \tilde{U}_{SE} .

⁸La valeur mesurée est 140Ω et correspond à $2R_S$ pour le transistor au centre du réseau.

L'équation (B.8) peut être réécrite en faisant apparaître une résistance effective $R_{eff}(\tilde{U}_{SE}) = \frac{\tilde{U}_{SD}}{I_{SD}}$ dépendant de \tilde{U}_{SE} :

$$R_{eff}(\tilde{U}_{SE}) = \frac{\tilde{U}_{SD}}{I_{SD}} = \frac{1}{\beta(\tilde{U}_{SE} - U_{SE}^{(T)})} + (R_S + R_D) \quad (\text{B.9})$$

Pour déterminer les résistances en série, il suffit de calculer la résistance effective d'un transistor pour une tension \tilde{U}_{SD} donnée en fonction de \tilde{U}_{SE} (avec $\tilde{U}_{SD} \ll \tilde{U}_{SE}$). Nous pouvons alors ajuster les points expérimentaux avec trois paramètres $R_{TOT} = R_S + R_D$, β et $U_{SE}^{(T)}$ selon l'équation B.9.

a) Résistances en série

La figure B.6 représente le calcul de la résistance effective du dixième transistor d'un des réseaux de 96 transistors. L'évolution de cette résistance est donnée pour $\tilde{U}_{SD} = 100$ mV et $\tilde{U}_{SE} \in [1V; 2V]$. La valeur de la résistance obtenue par cette méthode est $R_{TOT} = R_S + R_D \simeq 3440$ Ω , d'où $R_D = 3370$ Ω (en prenant $R_S = 70$ Ω). Cette valeur est proche de celle estimée par la géométrie pour le transistor 10 : $R_{D10} = 3500$ Ω .

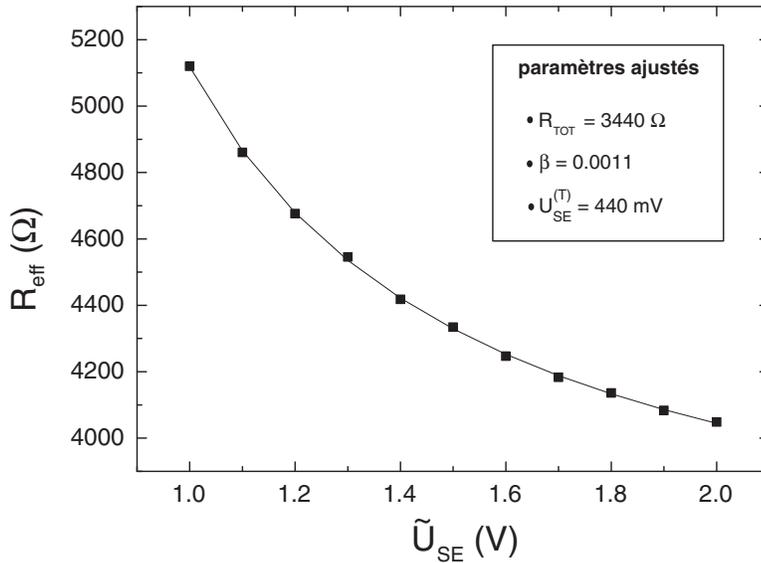


FIGURE B.6: Evolution de la résistance R_{eff} en fonction de \tilde{U}_{SE} pour le dixième transistor d'un réseau de 96 FETs dont les caractéristiques $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD})$ sont celles des figures B.1 et B.2). Les carrés noirs représentent les points expérimentaux (calculés pour $I_{SD} = 100$ mV). La courbe continue est un ajustement à trois paramètres en utilisant l'équation (B.9).

Nous pouvons calculer de la même manière toutes les résistances en série de l'ensemble du réseau. Nous pouvons alors comparer les valeurs obtenues par cette approche aux valeurs dérivées à partir de la géométrie des connections. La figure B.7 présente la comparaison de ces deux méthodes. L'allure des courbes est similaire et les faibles différences observables peuvent

être attribuées aux approximations dans le calcul géométrique⁹ de la première méthode et à l'ajustement à trois paramètres pour la deuxième estimation. Lorsque l'on compare plusieurs réseaux, on observe des différences de l'ordre de 500 Ω au maximum (figure B.8). Cette variabilité entre réseaux pourrait s'expliquer par des différences d'implantation lors de la fabrication des différents circuits. D'autre part comme nous le verrons dans le paragraphe c) la tension de seuil $U_{SE}^{(T)}$ peut varier et modifier de ce fait l'ajustement obtenu pour les résistances.

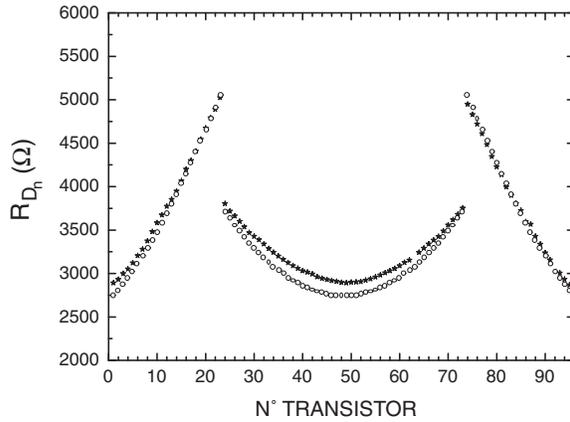


FIGURE B.7: Détermination des résistances des connecteurs de drains. Les ronds représentent l'évaluation géométrique. Les étoiles correspondent à l'évaluation sur les caractéristiques.

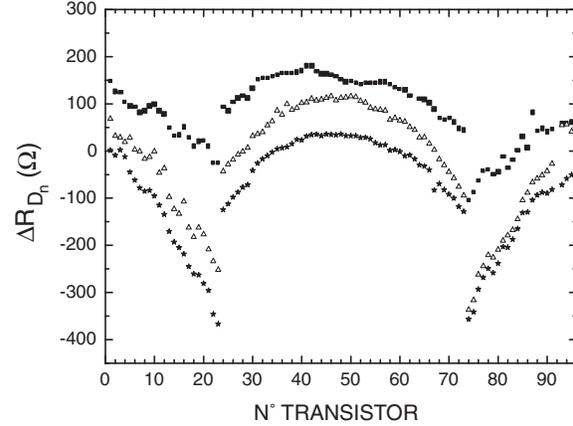


FIGURE B.8: Différence entre les deux méthodes. Les courbes représentent la différence entre l'évaluation sur les caractéristiques et l'évaluation par la géométrie ($\Delta R_{D_n} = R_{D_n}^{caractéristique} - R_{D_n}^{geometrie}$) pour trois réseaux différents.

b) Paramètre β

Un autre paramètre fourni par l'ajustement des courbes est le facteur β . Ce paramètre dépend uniquement des propriétés du transistor et peut être estimé à partir de l'expression B.1 :

$$\beta = \frac{l}{L} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d_{ox}} \mu_p$$

Les grandeurs pour le réseau de 96 transistors sont : longueur de la zone active $L=1,8 \mu m$, largeur $l=20 \mu m$, épaisseur d'oxyde $d_{ox} = 10 \text{ nm}$, permittivité relative de l'oxyde¹⁰ $\epsilon_r = 3,9$ et pour la mobilité des trous¹¹ une valeur $\mu_p = 450 \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$. On obtient ainsi une valeur "théorique" de β : $\beta_{the} = 1,72 \cdot 10^{-3} \text{ AV}^{-2}$. Celle-ci peut être comparée aux valeurs obtenues par ajustement des caractéristiques. Les valeurs moyennées sur l'ensemble des transistors des trois réseaux caractérisés sont répertoriés dans le tableau B.1.

L'ordre de grandeur théorique est proche des valeurs déterminées expérimentalement. Compte

⁹Approximations trapézoïdales ne tenant pas compte des résistances au niveau du réseau. Ces approximations induisent des erreurs de l'ordre de la centaine d'ohm.

¹⁰ ϵ_0 permittivité du vide valant $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ AsV}^{-1} \text{ m}^{-1}$

¹¹La valeur de la mobilité μ_p correspond à celle des trous pour un substrat n ayant un taux d'impureté $N_D = 2 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ correspondant à celui de nos structures [74].

β_{the}	théorique	$1,72 \cdot 10^{-3} AV^{-2}$
β_{exp}	réseau 1	$1,22 \cdot 10^{-3} \pm 0,02 \cdot 10^{-3} AV^{-2}$
β_{exp}	réseau 2	$0,87 \cdot 10^{-3} \pm 0,03 \cdot 10^{-3} AV^{-2}$
β_{exp}	réseau 3	$1,14 \cdot 10^{-3} \pm 0,05 \cdot 10^{-3} AV^{-2}$

TABLEAU B.1: Comparaison des paramètres β_{exp} à la valeur "théorique"

tenu de la grande simplicité du modèle utilisé (modèle à mobilité constante), l'accord avec la valeur expérimentale est assez satisfaisant.

c) Tension de seuil $U_{SE}^{(T)}$

Le dernier paramètre intervenant dans l'analyse des caractéristiques est la tension de seuil $U_{SE}^{(T)}$ à partir de laquelle se crée le canal de trous¹². Cette tension de seuil est donnée (cf. paragraphe B.1.1) par l'expression :

$$U_{SE}^{(T)} = \Delta\phi_{aq} - \phi_T$$

Elle dépend à la fois de paramètres internes du transistor à travers le potentiel de seuil ϕ_T et de l'état de charge de l'interface oxyde/électrolyte à travers $\Delta\phi_{aq}$. Par conséquent, sa valeur absolue n'est pas directement exploitable. En revanche ses variations sont intéressantes.

La variation des caractéristiques dc des transistors lors d'un apport de charge a été étudiée dans le corps de la thèse en calculant la variation de la tension ΔU_{SE} pour un courant I_{SD} fixé et une tension U_{SD} donnée. Nous pouvons retrouver cette variation en étudiant le changement de la tension $U_{SE}^{(T)}$ lors d'un apport de charge. En effet, l'adsorption de polymères chargés à l'interface oxyde/électrolyte modifie le saut de potentiel $\Delta\phi_{aq}$ dans l'électrolyte entre la surface d'oxyde et le corps métallique de l'électrode et conduit alors à une variation de la tension de seuil $\Delta U_{SE}^{(T)}$. Pour ce faire nous devons ajuster les caractéristiques des 96 transistors après et avant l'apport de charge¹³. Nous obtenons alors la variation de $\Delta U_{SE}^{(T)}$ en fonction du numéro de transistor en effectuant la différence des 96 paramètres de seuil correspondant à chaque transistor du réseau.

La figure B.9 représente une comparaison entre ces deux analyses : variation ΔU_{SE} par interpolation à courant fixe (courbe en étoiles) et variation $\Delta U_{SE}^{(T)}$ par ajustement des caractéristiques (courbe en cercles). Cette comparaison a été faite pour l'expérience de variation de concentration en polylysine avec quatre microdépôts (cf. courbe 4.6 au chapitre 4.4.1). Nous retrouvons pour la variation $\Delta U_{SE}^{(T)}$ les quatre pics correspondant aux dépôts de polylysine. La courbe $\Delta U_{SE}^{(T)}$ apparaît néanmoins plus "bruitée" que la courbe ΔU_{SE} . Dans cette nouvelle méthode d'analyse, nous effectuons un ajustement à trois paramètres ($R_{TOT} = R_S + R_D$, β , $U_{SE}^{(T)}$). Les paramètres R_{TOT} et β n'étant pas fixés ceux-ci peuvent prendre des valeurs différentes pour la mesure effectuée après le dépôt et celle réalisée avant le dépôt¹⁴ et induire de ce fait une plus grande indétermination pour la tension de seuil $U_{SE}^{(T)}$. Par contre, dans l'analyse à courant fixe (ΔU_{SE}), nous corrigeons d'abord les caractéristiques à l'aide d'un fichier de résistance qui est le même pour

¹²Sur la caractéristique du transistor présentée à la figure B.1 nous observons un courant I_{SD} pour des tensions $U_{SE} \gtrsim U_{SE}^{(T)} = 440mV$, cette valeur ayant été estimée par ajustement (cf. figure B.6).

¹³Cette analyse pour les 96 transistors est réalisée par un programme d'ajustement automatisé écrit sous l'environnement LabWindows CVI.

¹⁴La variation entre ces deux mesures pour R_{TOT} est de $0,5\% \pm 0,5\%$ et pour β de $2,5\% \pm 2\%$.

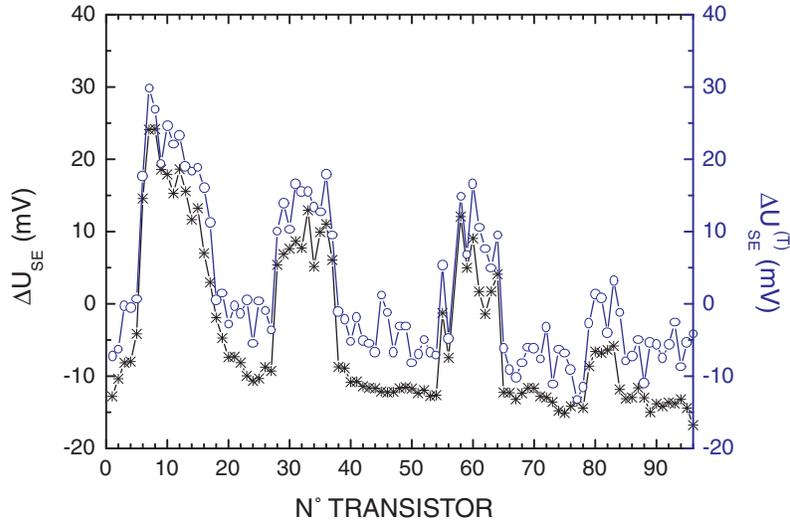


FIGURE B.9: Comparaison entre l'analyse par la variation de ΔU_{SE} à courant constant (courbe en étoiles) et par la variation du paramètre de seuil $\Delta U_{SE}^{(T)}$ (courbe en cercle) pour une expérience de microdépôts de polylysine.

les deux mesures. Le fichier de résistance pour l'analyse ΔU_{SE} correspond à celui évalué par la géométrie et les différences mentionnées précédemment entre cette estimation par la géométrie et celle obtenue sur les caractéristiques (500 Ω au maximum) peut expliquer le fait que les courbes correspondant à ces deux analyses apparaissent décalées de 5 à 10 mV.

On voit donc que $\Delta U_{SE}^{(T)}$ contient sensiblement la même information que ΔU_{SE} à courant constant. Compte tenu de la lourdeur du traitement global des caractéristiques, ce type d'analyse n'a pas été développé plus avant.

B.2.3 Correction des caractéristiques

Les résistances en série modifient les caractéristiques dc des transistors (cf. paragraphe B.1.2). Il faut donc avant d'étudier les variations de la tension U_{SE} lors d'un apport de charge à l'interface corriger les caractéristiques des transistors. Ceci consiste à passer du réseau de caractéristiques mesurées $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD})$ au réseau de caractéristiques réelles du transistor $I_{SD} = f(U_{SE}, U_{SD})$. Les tensions réellement imposées au niveau du transistor (U_{SE}, U_{SD}) se déduisent de celles imposées au niveau des plots métalliques de la puce ($\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD}$) en retranchant la tension aux bornes des résistances en série :

$$U_{SE} = \tilde{U}_{SE} - R_S I_{SD} \quad (\text{B.10})$$

$$U_{SD} = \tilde{U}_{SD} - (R_D + R_S) I_{SD} \quad (\text{B.11})$$

La correction des caractéristiques à partir du fichier de points mesurés $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD})$ est réalisée par un programme écrit sous l'environnement LabWindowsCVI. Nous choisissons d'abord un couple de points $\{U_{SD}^{(i)}, I_{SD}^{(i)}\}$ donné. Selon B.11, la tension $U_{SD}^{(i)}$ choisie correspondrait à une tension $\tilde{U}_{SD}^{(i)}$ imposée à la puce telle que : $\tilde{U}_{SD}^{(i)} = U_{SD}^{(i)} + (R_D + R_S)I_{SD}^{(i)}$. Nous pouvons alors rechercher dans le réseau bidimensionnel $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD})$ la tension $\tilde{U}_{SE}^{(i)}$ qui permettrait

d'obtenir le courant $I_{SD}^{(i)}$ pour la valeur $\tilde{U}_{SD}^{(i)}$ donnée¹⁵. Nous obtenons alors (suivant B.10) la valeur de la tension $U_{SE}^{(i)}$ réellement imposée au transistor $U_{SE}^{(i)} = \tilde{U}_{SE}^{(i)} - R_S I_{SD}^{(i)}$.

Nous avons par cette méthode obtenu un point particulier de la caractéristique réelle $I_{SD}^{(i)} = f(U_{SE}^{(i)}, U_{SD}^{(i)})$. En variant le couple initial de points $\{U_{SD}^{(i)}, I_{SD}^{(i)}\}$, nous pouvons reconstruire le réseau bidimensionnel $I_{SD} = f(U_{SE}, U_{SD})$ correspondant aux caractéristiques réelles des transistors.

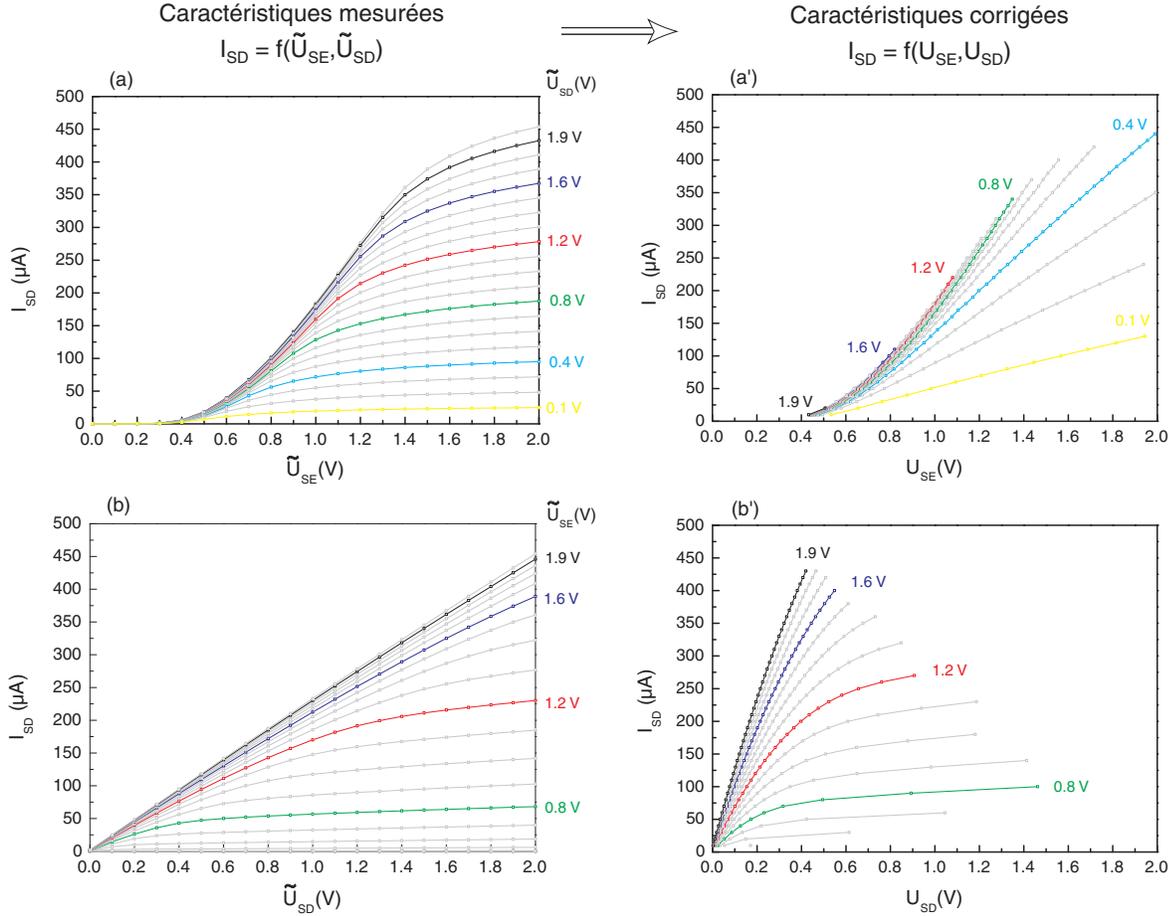


FIGURE B.10: Ensemble des caractéristiques mesurées et corrigées. (a) et (a') correspondent à l'évolution du courant I_{SD} en fonction de \tilde{U}_{SE} (resp. U_{SE}) pour différentes tensions \tilde{U}_{SD} (resp. U_{SD}) pour les caractéristiques mesurées (resp. corrigées). (b) et (b') correspondent aux caractéristiques mesurées (resp. corrigées) $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SD})$ (resp. $I_{SD} = f(U_{SD})$) pour différentes tensions \tilde{U}_{SE} (resp. U_{SE}).

La figure B.10 représente l'ensemble des caractéristiques mesurées et corrigées pour le tran-

¹⁵Pour obtenir $\tilde{U}_{SE}^{(i)}$, nous recherchons $\tilde{U}_{SE}^{(-)}$ et $\tilde{U}_{SE}^{(+)}$ telles que : $I_{SD}^{(-)} = f(\tilde{U}_{SE}^{(-)}, \tilde{U}_{SD}^{(i)}) < I_{SD}^{(i)} < I_{SD}^{(+)} = f(\tilde{U}_{SE}^{(+)}, \tilde{U}_{SD}^{(i)})$ et nous interpolons alors $\tilde{U}_{SE}^{(i)}$ linéairement à partir de $\tilde{U}_{SE}^{(-)}$ et $\tilde{U}_{SE}^{(+)}$:

$$U_{SE}^{(i)} = U_{SE}^{(-)} + (U_{SE}^{(+)} - U_{SE}^{(-)}) \left(\frac{I_{SD}^{(i)} - I_{SD}^{(-)}}{I_{SD}^{(+)} - I_{SD}^{(-)}} \right)$$

sistor du réseau de 96 FETs étudié précédemment. Après correction, nous observons pour les caractéristiques réelles $I_{SD} = f(U_{SE})$ (fig. a') aucune saturation du courant I_{SD} contrairement aux caractéristiques mesurées $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE})$ (fig. a) pour lesquelles la saturation du courant résulte de l'influence des résistances en série.

Les résistances en série modifient aussi les caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SD})$. Sur ces caractéristiques une saturation du courant I_{SD} est attendue lorsque $U_{SD} > U_{SE} - U_{SE}^{(T)}$ (pincement du canal, cf. B.1.1). Sur les caractéristiques non corrigées $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SD})$ (fig. b') nous n'observons aucune saturation du courant en fonction de \tilde{U}_{SD} pour de grandes tensions \tilde{U}_{SE} , tandis que des saturations sont observables sur les caractéristiques corrigées¹⁶(fig. b').

Les caractéristiques pour ce réseau de 96 transistors sont mesurées en variant \tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD} de 0V à 2V par pas de 0.1V. A partir de ces mesures nous ne pouvons reconstruire qu'une partie des caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE}, U_{SD})$ pour les couples $(U_{SE}, U_{SD}) \in [0V; 2V] \otimes [0V; 2V]$ (les tensions corrigées U_{SE} et U_{SD} étant inférieures aux tensions \tilde{U}_{SE} et \tilde{U}_{SD}). Les courbes corrigées apparaissent donc tronquées.

Pour les mesures de la thèse sur le réseau de 96 transistors nous avons utilisé pour corriger les caractéristiques mesurées le fichier des résistances évaluées par la géométrie car celui-ci est identique pour l'ensemble des différents réseaux.

B.3 Caractéristiques pour le réseau de 62 transistors

a) Caractéristiques dc des transistors

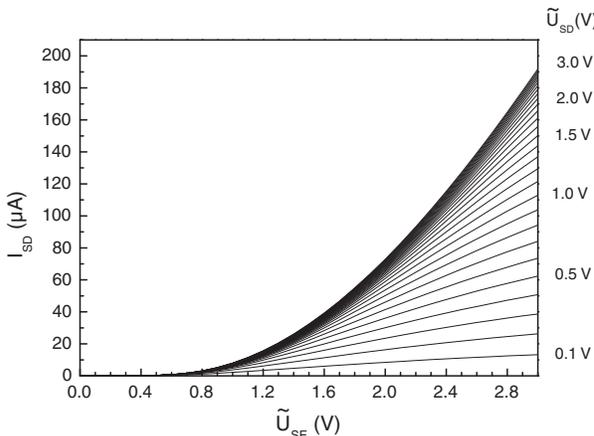


FIGURE B.11: Caractéristiques $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE})$ pour différents $\tilde{U}_{SD} \in [0V; 3V]$

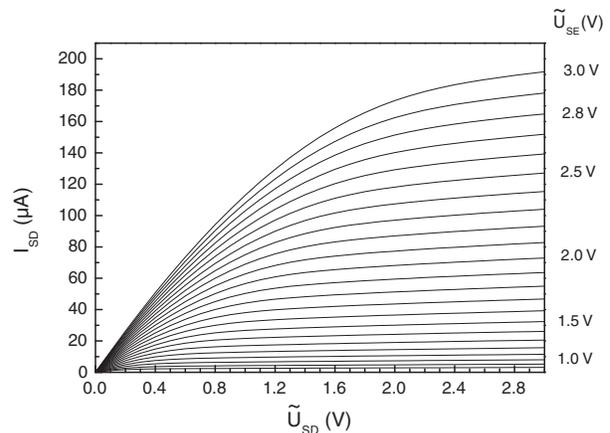


FIGURE B.12: Caractéristiques $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SD})$ pour différents $\tilde{U}_{SE} \in [0.8V; 3V]$

Les figures B.11 et B.12 présentent les caractéristiques mesurées et non corrigées d'un tran-

¹⁶La valeur de $U_{SE}^{(T)}$ pour ce transistor a été estimée par ajustement et vaut $U_{SE}^{(T)} = 0.44V$ (cf. figure B.7). Sur la courbe mesurée à $\tilde{U}_{SE} = 1.6V$ de la figure b, aucune saturation n'est observable pour des tensions U_{SD} de l'ordre de 1.2 V ($U_{SD} > U_{SE} - U_{SE}^{(T)} = 1.6V - 0.44V \simeq 1.2V$). Tandis que sur la caractéristique corrigée (figure b'), pour $U_{SE} = 1.6V$ nous observons déjà une diminution du courant lorsque U_{SD} augmente bien que la caractéristique soit tronquée.

sistor du réseau de 62 FETs. Contrairement aux caractéristiques des transistors du réseau de 96 FETs, les caractéristiques $I_{SD} = f(\tilde{U}_{SE})$ (fig. B.11) ne présentent aucune saturation du courant pour \tilde{U}_{SE} grand devant \tilde{U}_{SD} . Les résistances en série ne semblent avoir pour ce réseau qu'une faible influence sur les caractéristiques dc des transistors. Les caractéristiques B.11 et B.12 de ce transistor ressemblent donc aux caractéristiques corrigées B.10 (a',b') du transistor du réseau de 96 FETs.

b) Détermination des résistances en série par la géométrie des connexions

La géométrie des connecteurs de drain pour ce transistor est plus complexe que celle du réseau de 96 transistors : les connecteurs sont courbés à l'approche du réseau (figure B.13) et la taille des contacts métalliques n'est pas identique pour tous les drains. Pour réaliser une approximation valable, il faudrait intégrer la surface des connexions de manière précise. Nous n'avons pas effectué ce calcul complet puisque les résistances en série n'influent que très peu sur les caractéristiques des 62 transistors de ce réseau. Nous pouvons néanmoins estimer l'ordre de grandeur de ces résistances en utilisant la formule dérivée pour le réseau de 96 transistors et en prenant des valeurs moyennes pour L_n , B_{1_n} et B_{2_n} ($\langle L_n \rangle = 5$ mm, $\langle B_{1_n} \rangle = 30$ μm , $\langle B_{2_n} \rangle = 120$ μm). On obtient ainsi une valeur de l'ordre de 1300 Ω .

Pour la source (en gris foncé sur la fig. B.13) le calcul géométrique donne une valeur de l'ordre de 50 Ω , valeur comparable à celle mesurée ($2R_S$) entre les deux connecteurs métalliques qui donne $R_S = 46$ Ω .

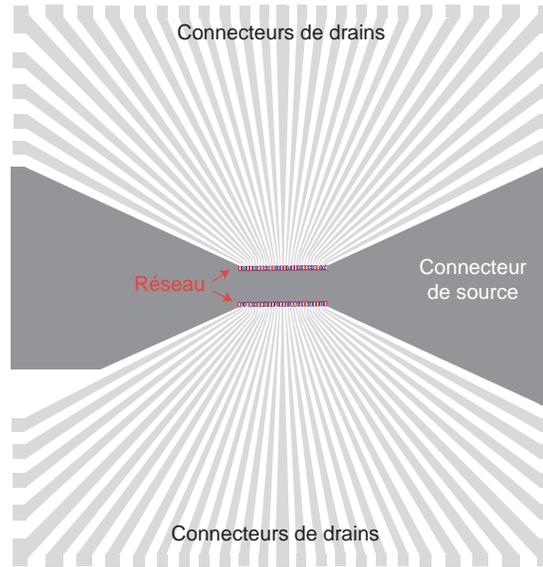


FIGURE B.13: Schéma des connecteurs de drains et de source du réseau de 62 transistors.

c) Détermination des résistances en série et du paramètre β par analyse des caractéristiques des transistors

Nous pouvons étudier les caractéristiques des transistors par une analyse analogue à celle effectuée sur le réseau de 96 transistors. L'ajustement des caractéristiques permet d'accéder aux résistances en série ainsi qu'au paramètre β des transistors du réseau de 62 FETs.

c.1) Résistances en série

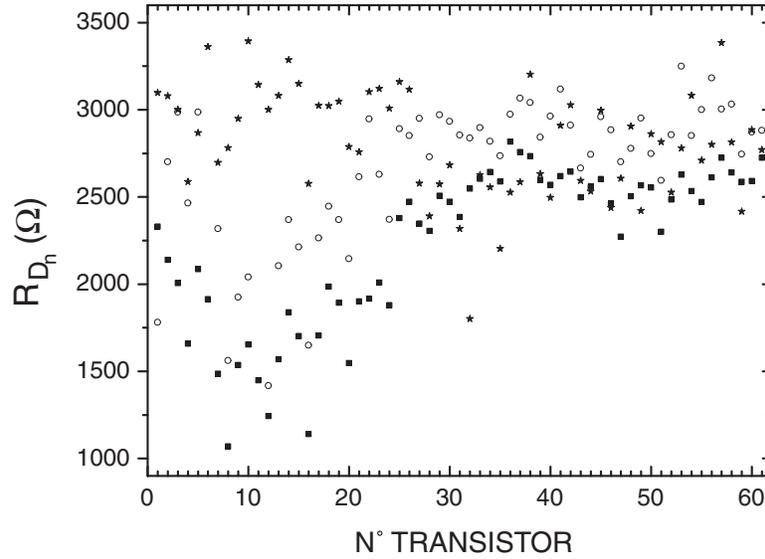


FIGURE B.14: Evaluation des résistances en série pour le réseau de 62 transistors. Les symboles \circ , $*$, \blacksquare représentent les estimations sur trois réseaux différents.

La figure B.14 donne les résistances en série des connecteurs de drains pour chaque transistor du réseau de 62 FETs. L'ajustement des résistances effectives a été réalisé à partir des points expérimentaux $\tilde{U}_{SD}=100$ mV et $\tilde{U}_{SE} \in [2V; 3V]$ pour trois réseaux différents. Contrairement au réseau de 96 transistors, il n'y a pas de variation systématique de la résistance en fonction du numéro de transistor. Les valeurs des résistances moyennées sur chaque réseau sont données dans le tableau B.2. Ces valeurs moyennes ne sont environ que deux fois plus grandes que l'estimation géométrique moyenne.

	R_{exp} (Ω)	β_{exp} (AV^{-2})
réseau 1	2600 ± 300	$1.2 \cdot 10^{-4} \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$
réseau 2	3100 ± 300	$1.2 \cdot 10^{-4} \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$
réseau 3	2700 ± 300	$1.1 \cdot 10^{-4} \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$

TABLEAU B.2: Détermination des résistances moyennes et du paramètre β

La raison pour laquelle ces valeurs de résistances apparaissent comme un nuage de points très dispersés (figure B.14) apparaîtra clairement au paragraphe d. Les résistances en série ayant une influence très faible sur les caractéristiques, l'ajustement de celles-ci ne donne que des mesures très imprécises de ces résistances.

c.2) Paramètre β

Le tableau B.2 regroupe les valeurs expérimentales du paramètre β extraites pour les trois réseaux. Ces valeurs sont à comparer à l'estimation théorique de $\beta = \frac{l}{L} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d_{ox}} \mu_p$ pour les transistors

du réseau de 62 FETs¹⁷. Ce réseau a des capteurs de surfaces actives différentes (cf. 3.2) et nous obtenons pour ces différents transistors les valeurs :

- $\beta = 3,9 \cdot 10^{-4} \text{ AV}^{-2}$ (pour les transistors de longueur $L=4 \mu\text{m}$ et de largeur $l=10 \mu\text{m}$)
- $\beta = 4,1 \cdot 10^{-4} \text{ AV}^{-2}$ (pour les transistors de longueur $L=3 \mu\text{m}$ et de largeur $l=8 \mu\text{m}$)

Les valeurs expérimentales¹⁸ sont comme pour le réseau de 96 FETs plus faibles que la valeur théorique. Cet écart peut être attribué au modèle simplifié basé sur une mobilité constante.

d) Influence des résistances en série

Nous avons au paragraphe B.2.2 donné l'équation du transistor dans la zone de conduction pour de faibles tensions U_{SD} (cf. formule B.7) :

$$I_{SD} = \beta(U_{SE} - U_{SE}^{(T)})U_{SD}$$

Pour les tensions non corrigées ($\tilde{U}_{SE}, \tilde{U}_{SD}$) la relation correspondante peut être obtenue à partir de l'expression B.8 :

$$I_{SD} = \frac{\beta(\tilde{U}_{SE} - U_{SE}^{(T)})\tilde{U}_{SD}}{1 + \beta * (R_S + R_D)(\tilde{U}_{SE} - U_{SE}^{(T)})}$$

Le facteur correctif au dénominateur dans cette expression est en βR . Expérimentalement, ce facteur est 10 fois plus faible pour le réseau de 62 FETs ($\beta_{exp}R_{exp} \simeq 0.3V^{-1}$) que pour le réseau de 96 transistors ($\beta_{exp}R_{exp} \simeq 3V^{-1}$). Ceci explique la faible influence des résistances en série sur les caractéristiques des transistors du réseau de 62 FETs comparativement aux effets importants observés pour le réseau de 96 transistors.

Pour les études sur le réseau de 62 transistors réalisées au cours de cette thèse, nous avons finalement négligé l'influence des résistances en série.

B.4 Variations des caractéristiques lors d'un apport de charge pour différents points de fonctionnement

Un apport de charge associé à l'adsorption de biopolymères modifie les caractéristiques de des transistors. Pour rendre compte de ces effets nous déterminons à partir du réseau de caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE})$ paramétré par U_{SD} , la variation de tension ΔU_{SE} entre la mesure effectuée après et avant l'apport de charge. Cette analyse¹⁹ peut être réalisée pour différentes valeurs du courant I_{SD} et de la tension U_{SD} (figure B.15.a). La figure B.15.b correspond au pic électronique de polylysine²⁰ sur lequel a été effectuée l'analyse détaillée des dépendances de ΔU_{SE} au point de travail (I_{SD}, U_{SD}). Nous observons pour ce pic une diminution progressive

¹⁷Les valeurs pour l'épaisseur d'oxyde et de mobilité sont les mêmes que celles du réseau de 96 FETs ($d_{ox} = 10 \text{ nm}$ et $\mu_p = 450 \text{ cm}^2V^{-1}s^{-1}$)

¹⁸Les valeurs expérimentales de β données dans le tableau B.2 sont moyennées sur l'ensemble du réseau. Nous ne pouvons à partir de l'ajustement des caractéristiques distinguer les deux types de transistors.

¹⁹L'étude a été effectuée pour le réseau de 62 transistors à partir des caractéristiques non corrigées car comme discuté précédemment l'influence des résistances en série sur les caractéristiques des transistors est négligeable pour ce réseau.

²⁰Cette détection a été réalisée dans un électrolyte de 0.01 mM en KCl.

du signal électronique lorsque le courant augmente de $10 \mu\text{A}$ à $100 \mu\text{A}$ pour une tension U_{SD} de 1.2V (variation maximale de 20%). Une analyse des dépendances de ΔU_{SE} pour différentes valeurs de U_{SD} peut être menée sur un transistor appartenant à ce pic de polylysine (transistor 55). Les variations ΔU_{SE} pour ce transistor, calculées pour différentes tensions U_{SD} , sont données en fonction de I_{SD} à la figure B.15.c et en fonction de la tension U_{SE}^{avdpt} correspondant à la mesure avant dépôt sur la figure B.15.d. Nous observons sur la figure B.15.c une dépendance importante de ΔU_{SE} en fonction du courant I_{SD} pour des faibles tensions U_{SD} .

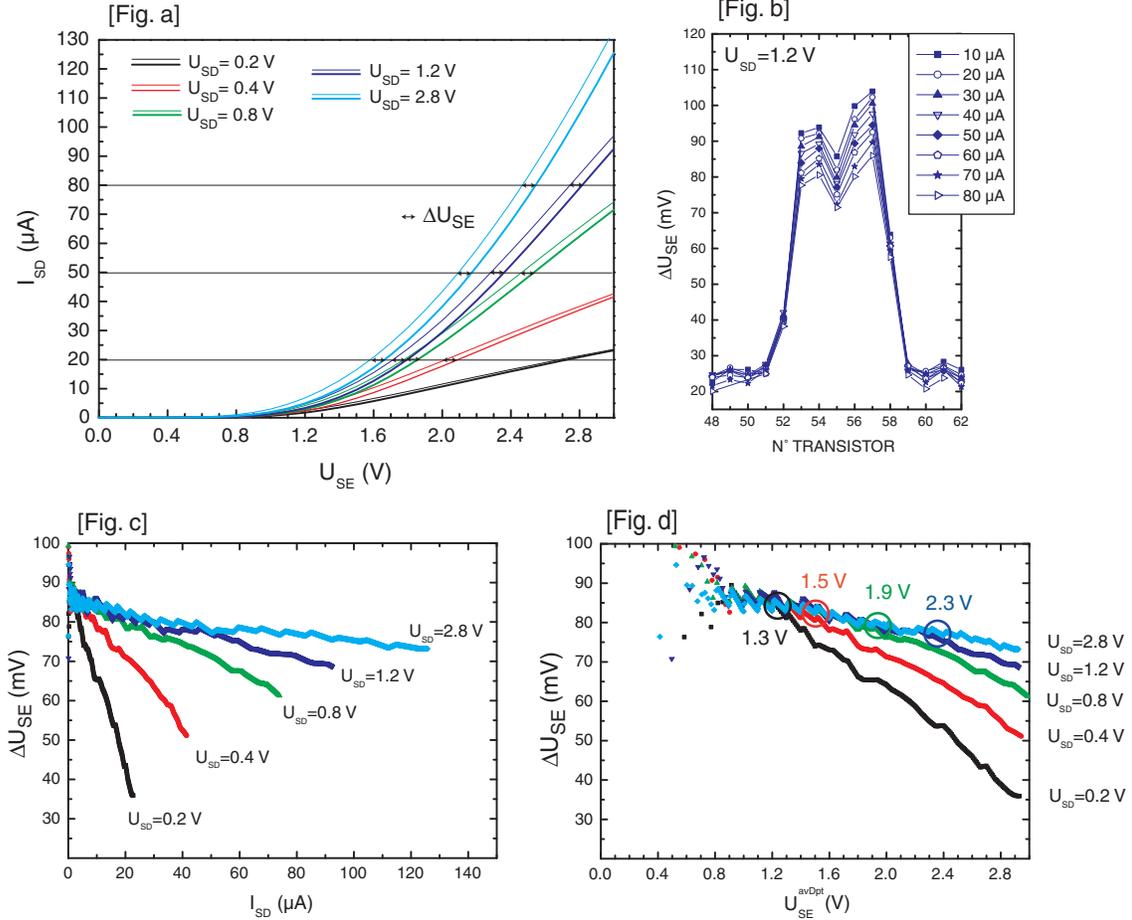


FIGURE B.15: Dépendances des signaux électroniques en fonction du point de fonctionnement. [Fig.a] : variation d'une partie des réseaux de caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE})$ d'un transistor donné lors d'un dépôt de polylysine. Les courbes fines et épaisses représentent respectivement les caractéristiques mesurées avant et après l'adsorption de polylysine. [Fig.b] : pic électronique obtenu en coupant les caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE})$ pour $U_{SD}=1.2\text{V}$ et pour différentes valeurs de I_{SD} . [Fig.c] : variations ΔU_{SE} en fonction de I_{SD} calculées pour différentes valeurs de U_{SD} (pour le transistor 55 de la [Fig.b]). [Fig.d] : variations ΔU_{SE} en fonction de U_{SE}^{avdpt} pour différentes valeurs de U_{SD} pour ce même transistor.

En ajustant les caractéristiques par la méthode décrite au paragraphe B.2.2 nous trouvons pour ce transistor une tension de seuil²¹ $U_{SE}^{(T)} = 1.1\text{V}$. Nous observons sur la figure B.15.d que les variations de ΔU_{SE} en fonction de la tension U_{SE}^{avdpt} sont faibles et similaires pour l'ensemble des

²¹Valeur correspondante à la mesure avant dépôt.

différentes tensions U_{SD} tant que la tension U_{SE}^{avdpt} est inférieure à $U_{SE}^{(T)} + U_{SD}$ (respectivement pour des tensions $U_{SE}^{avdpt} < 1.3, 1.5, 1.9$ et 2.3 V pour $U_{SD}=0.2, 0.4, 0.8,$ et 1.2 V). Cette région correspond à la zone de saturation pour laquelle le canal de trous est pincé. Il semble donc que pour cette région l'inhomogénéité de la densité de charge entre la zone d'inversion (proche de la source) et la zone déplétée (proche du drain) n'est qu'une influence faible sur les signaux électroniques correspondant au dépôt de biopolymères chargés. Du fait de la faible dépendance au point de polarisation des signaux électroniques dans cette région de saturation comparée à la forte dépendance dans la région de conduction linéaire ($U_{SE}^{avdpt} - U_{SE}^{(T)} > U_{SD}$) nous avons traité l'essentiel des données de ce manuscrit pour des valeurs de I_{SD} et U_{SD} correspondant à cette zone de saturation.

L'analyse des dépendances au point de travail des signaux électroniques pour la polylysine, l'ADN et l'hybridation (et ceci pour différentes molarités en sel de l'électrolyte de mesure) est actuellement poursuivie au laboratoire²². Cette étude est en effet importante : d'une part dans le but de rechercher à optimiser les structures d'autre part d'un point de vue fondamental pour une compréhension plus précise de l'interface biomolécules/semiconducteur. Ce travail étant encore préliminaire nous ne le présenterons pas dans ce manuscrit.

²²Cette étude est aussi intéressante pour le réseau de 96 transistors mais rendue plus délicate car l'effet des résistances en série rend plus difficile l'observation des dépendances au point de fonctionnement.

— Appendice C —

Détection de fluorescence

C.1 Montage optique de fluorescence

Le dispositif expérimental pour la détection de fluorescence est schématisé sur la figure C.1. Ce montage permet de réaliser une image de fluorescence à deux couleurs de la surface de nos échantillons. Nous avons opté pour un système d'excitation et de détection ponctuelle¹ où l'image est réalisée par déplacement de la surface sous le faisceau d'excitation.

Notre montage pour les mesures spatialement résolues de fluorescence est basé sur un microscope droit (Olympus, BX50 WI). Les deux sources lasers sont respectivement, pour le rouge un laser HeNe (632.8 nm, Coherent, Puissance 30 mW), et pour le vert un laser Nd :YAG doublé (532 nm, Spectra)². Les bras optiques pour les deux sources excitatrices possèdent un arrangement télescopique qui permet de régler chaque faisceau indépendamment l'un de l'autre. Deux jeux de densités optiques permettent de choisir la puissance souhaitée pour l'excitation laser. Le mélange des deux faisceaux s'effectue au niveau d'une lame dichroïque (lame n°1). Les deux faisceaux entrent alors dans le bâti du microscope où ils sont réfléchis par une seconde lame dichroïque (lame n°2) pour être finalement focalisés au niveau de la surface de l'échantillon par l'objectif du microscope (Olympus, UPlan FL 10X, N.A. 0.3). Les faisceaux lasers ainsi focalisés constituent une source ponctuelle de dimension de l'ordre du μm^2 , et permettent d'exciter localement les deux types de fluorophores utilisés dans nos expériences. Les fluorophores Cy5 sont excités par le laser rouge (HeNe) et les fluorophores Cy3 par le laser vert (NdYag). La fluorescence émise est collectée par l'objectif du microscope et passe à travers la lame dichroïque n°2 puis par le filtre d'émission³ qui permettent de sélectionner les longueurs d'ondes correspondant aux spectres d'émission du fluorophore Cy5 (autour de 670 nm) et du fluorophore Cy3 (autour

¹Dans la technique des puces, cette solution est la plus répandue. Les scanners commerciaux utilisent deux lasers, un montage optique de microscopie confocale et un photomultiplicateur : voir par exemple les systèmes développés par Affymetrix [114] ou par Packard BioChip [115].

²Ce laser (Millenia Vs, 5W) sert comme laser de pompe pour une autre expérience. Nous utilisons une partie du faisceau qui est amené au niveau de notre table optique via une fibre optique. La puissance maximale en sortie de la fibre est de l'ordre de 100 mW.

³Ces deux composants ont été réalisés spécialement (Chroma) pour permettre l'utilisation du Cy3 et Cy5, avec une très bonne réjection de l'excitation laser à 532 et 633 nm.

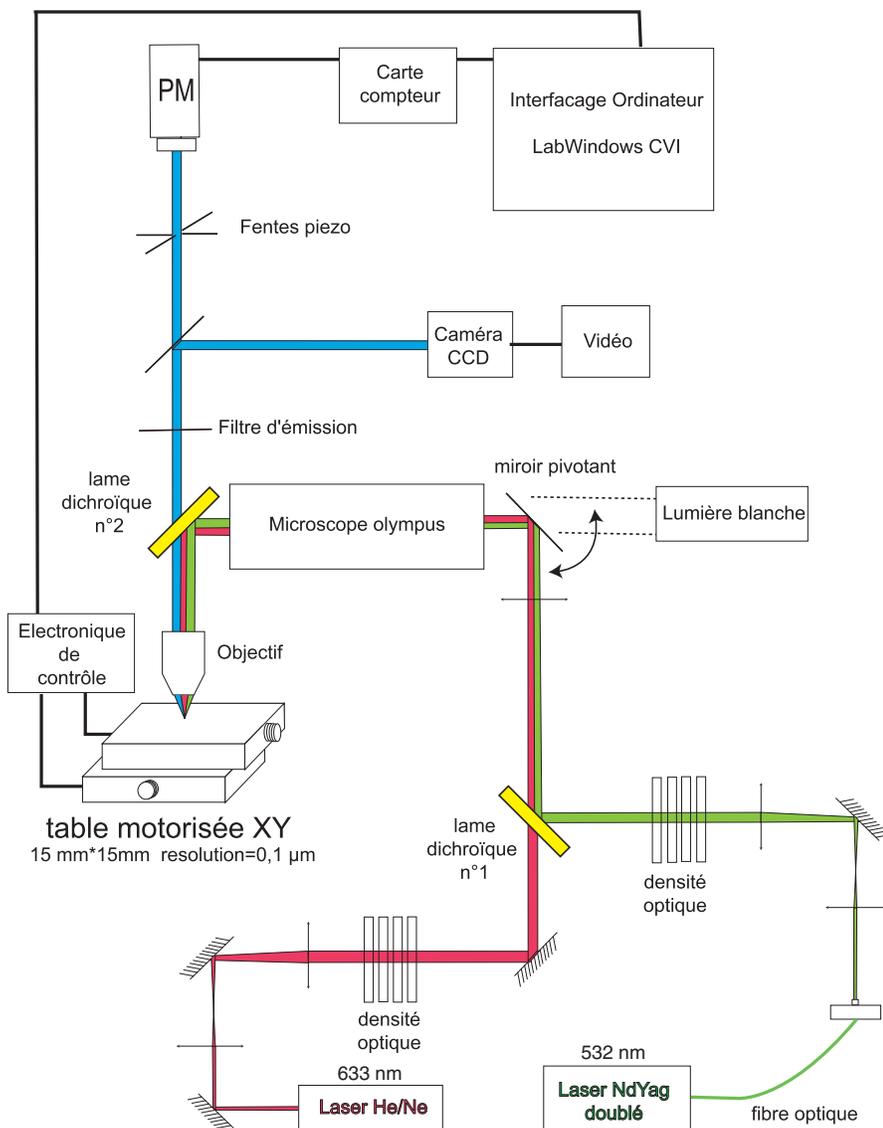


FIGURE C.1: Montage optique à deux couleurs permettant la détection spatialement résolue de la fluorescence sur la surface des échantillons.

de 570 nm). La fluorescence traverse alors un système de deux fentes ajustables (Piezosystem Jena, PZS1) positionnées dans deux plans images en orientation croisée. Cet arrangement des fentes permet de définir spatialement la région de détection de fluorescence, comme un "pinhole" dans la configuration classique de microscopie confocale (pour plus de détail sur le principe de la microscopie confocale, consulter [116] ou [117]). La détection de fluorescence est réalisée par un photomultiplicateur en mode comptage de photons (H7421, Hamamatsu).

La position de la surface de l'échantillon sous le faisceau d'excitation est contrôlée par un double axe motorisé. Il s'agit de deux platines de translation (VXP 25XA, Newport) montées l'une sur l'autre. Chaque platine possède des capteurs de position, et peut être déplacée latéralement sur une distance maximale de 15 mm. Une électronique de contrôle régule par une boucle de rétroaction la position de chaque platine avec une résolution de 100 nm. Pour réaliser

une image de fluorescence de nos échantillons, nous déplaçons la surface en contrôlant l'électronique des platines par un ordinateur via GPIB. Un programme réalisé sous l'environnement LabWindowsCVI, commande le déplacement du système de manière que la source laser ponctuelle explore, par pas successifs de longueur réglable, la surface des réseaux de transistors à effet de champ. L'acquisition pour chaque position d'une intensité moyenne de fluorescence à l'aide du photomultiplicateur permet de reconstruire une image à deux dimensions des dépôts de fluorescence à la surface de nos échantillons.

Une alternative possible à ce montage aurait été une imagerie à deux dimensions fondée sur une excitation en champ large et un détecteur d'image (type CCD intégratrice). Nous avons choisi le système d'excitation et de détection ponctuelle pour plusieurs raisons. D'une part, avec un tel montage nous pouvons modifier la résolution des images de fluorescence en choisissant l'objectif et en adaptant la taille du diaphragme ajustable. D'autre part, la configuration confocale permet une meilleure réjection des signaux parasites. De plus, l'excitation ponctuelle permet d'utiliser des sources lasers de puissance plus faible. En effet, pour obtenir la même puissance par unité de surface en imagerie, il faut augmenter la puissance de la source laser proportionnellement à la surface excitée⁴. Enfin, ce montage nous permet aussi de faire des expériences de molécules uniques (FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy, pour le principe de ces expériences se reporter à [118]). De telles expériences nécessitent un détecteur permettant une acquisition temporelle rapide de fluorescence, ce qui est le cas pour notre photomultiplicateur.

C.2 Fluorescence et réseaux de transistors

Le montage optique décrit ci-dessus permet de réaliser des images de fluorescence pour des molécules d'ADN adsorbées ou hybridées à la surface de nos réseaux de transistors. Après avoir illustré l'influence de l'épaisseur d'oxyde sur l'image de fluorescence d'un dépôt homogène d'ADN, nous décrirons la méthode générale utilisée pour obtenir les images et courbes de fluorescence permettant une comparaison directe entre les signaux de fluorescence et les signaux électroniques.

C.2.1 Effet de l'épaisseur d'oxyde

Les réseaux de transistors, utilisés dans nos expériences, sont fabriqués dans un substrat de silicium recouvert d'une couche d'oxyde de silicium ($d \geq 10$ nm). L'excitation et l'émission de fluorescence pour des molécules fluorescentes adsorbées à la surface du réseau est fonction de l'épaisseur de cette couche d'oxyde. En effet, le substrat de silicium, se trouvant sous l'oxyde, a la propriété de réfléchir la lumière visible et se comporte optiquement comme un miroir. L'interférence entre la lumière incidente et la lumière réfléchie par cette surface conduit à une onde stationnaire pour le champ électromagnétique. L'intensité de ce champ étant modulée selon la distance à la surface miroir, l'excitation d'une couche homogène de fluorophores sur la surface d'oxyde sera fonction de la distance de ces fluorophores à la surface de silicium, c'est à dire de l'épaisseur de la couche d'oxyde. De manière identique, le signal de fluorescence résulte de la superposition de la lumière émise directement et de celle réfléchie par le silicium et son intensité sera

⁴La puissance typique utilisée pour scanner les échantillons est de l'ordre de $10 \mu\text{W}$. Pour une excitation en champ large sur une surface d'un mm^2 il faut augmenter la puissance laser d'un facteur 10^6 pour obtenir une puissance équivalente à celle d'une source ponctuelle de $1 \mu\text{m}^2$ soit une puissance de 10 W .

elle aussi dépendante de l'épaisseur d'oxyde. Ces effets ont été étudiés de manière expérimentale et théorique par l'équipe de P. Fromherz pour une couche mono-moléculaire de fluorophores [119], et peuvent servir à caractériser l'adsorption de cellules ou de membranes biologiques [120, 121].

Dans nos expériences, nous déposons des solutions fluorescentes d'ADN sur le réseau de transistors. La surface d'oxyde n'a pas une épaisseur constante sur le réseau (en particulier au niveau des surfaces actives où l'oxyde de silicium est aminci) et ceci induit des variations de fluorescence pour une couche homogène d'ADN adsorbé à la surface du réseau. On obtient alors une image de fluorescence qui reproduit la structure du réseau (cf. figure C.2).

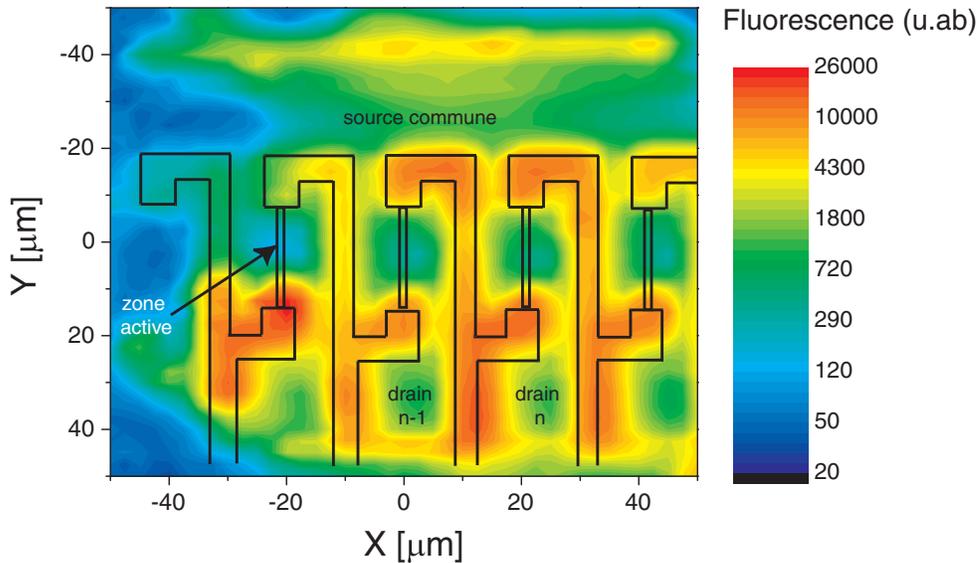


FIGURE C.2: Image en fluorescence d'une couche homogène d'ADN marqués par des fluorophores Cy5 à la surface d'un réseau de transistors à effet de champ et comparaison avec la géométrie du réseau. L'image a été réalisée en utilisant un pas de $2,5 \mu\text{m}$ pour le déplacement en X et Y.

C.2.2 Moyennage sur les surfaces actives

Les mesures électroniques correspondent aux molécules d'ADN se trouvant au niveau des surfaces actives des transistors. Pour comparer ces mesures électroniques aux signaux de fluorescence, nous limiterons donc nos déplacements à ces surfaces lors de la réalisation des images de fluorescence.

Pour le réseau de 96 transistors, les images et courbes de fluorescence sont obtenues en positionnant le faisceau laser un peu au-dessus de la surface active⁵ du transistor numéro 1. L'intégralité du réseau est ensuite "scannée" en utilisant un pas de $21 \mu\text{m}$ horizontalement et un pas de $2 \mu\text{m}$ verticalement (cf. figure C.3). Compte tenu de la structure de ce réseau caractérisé par un espacement régulier des transistors tous les $21 \mu\text{m}$, nous obtenons pour chaque transistor une quinzaine de relevés de fluorescence en évitant de mesurer la fluorescence pour les zones sans intérêt qui séparent les différentes surfaces actives.

⁵La position en X de la surface active est préalablement repérée par visualisation à l'aide de la caméra CCD.

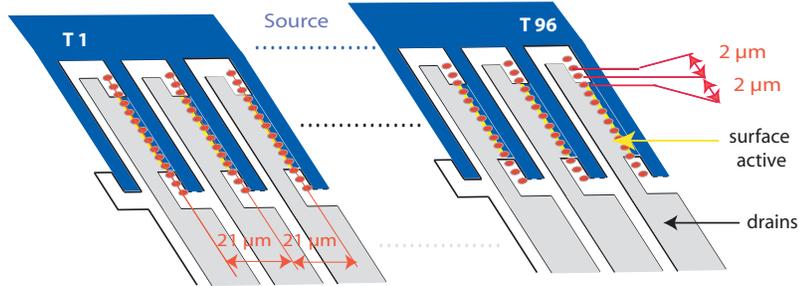


FIGURE C.3: Déplacement de la source laser pour le réseau de 96 transistors. En choisissant un pas de $21 \mu\text{m}$ horizontalement et $2 \mu\text{m}$ verticalement, les surfaces actives de l'ensemble des transistors sont successivement excitées par la source laser ponctuelle.

L'ensemble de ces points de mesure permet de reconstruire une image de fluorescence pour le réseau de transistors. La figure C.4 présente l'image obtenue pour trois microdépôts d'ADN marqués⁶ par des fluorophores Cy5 à la surface d'un réseau de 96 transistors. Les concentrations de dépôt sont respectivement $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ et $20 \mu\text{M}$.

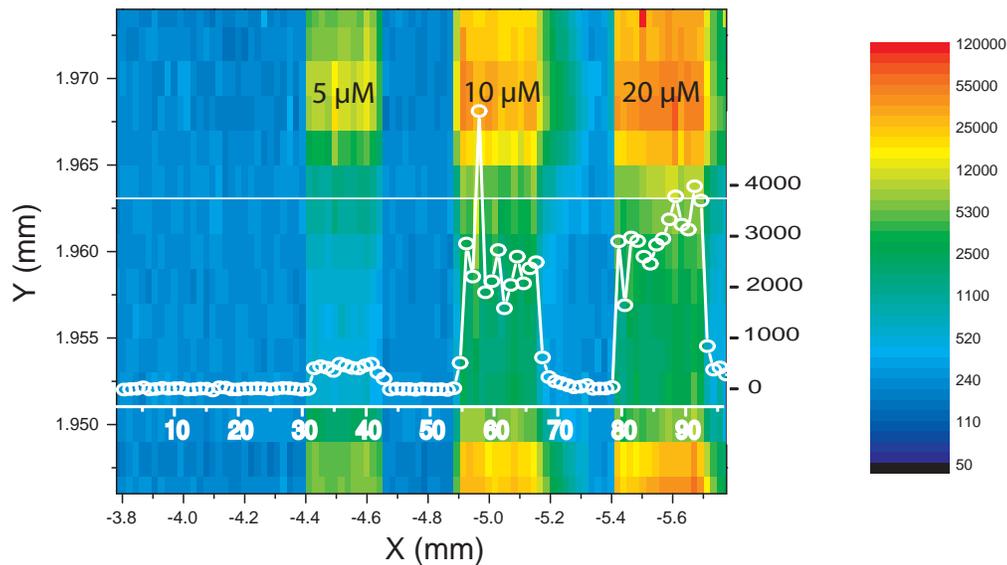


FIGURE C.4: Image et courbe de fluorescence pour le réseau de 96 transistors sur lequel ont été déposés trois microdépôts d'ADN de concentration $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ et $20 \mu\text{M}$.

Dans cette figure, chaque colonne de couleur correspond à un transistor donné (de 1 à 96). Nous observons le long du réseau trois zones fluorescentes; chacune d'entre elles pouvant être

La précision en X est de l'ordre du micron.

⁶Il s'agit d'oligonucléotides de 20 bases possédant un fluorophore Cy5 unique en bout de chaîne (modification en 5').

attribuée à un dépôt d'ADN. L'intensité de fluorescence de ces dépôts est inhomogène et plus intense sur les bords (en haut et en bas). L'inhomogénéité de fluorescence ne peut être reliée pour ces dépôts à une inhomogénéité de la concentration d'ADN : l'intensité de fluorescence est en effet relativement homogène latéralement le long du réseau (cf. courbe blanche sur la figure C.4). L'inhomogénéité de fluorescence est donc due à une variation de l'épaisseur d'oxyde des structures. Les parties extrêmes possèdent en effet une épaisseur d'oxyde plus grande que celle des surfaces actives qui ont été volontairement amincies et nous permettent alors de délimiter la région correspondant aux surfaces actives. En moyennant sur chaque transistor les données de fluorescence correspondant à l'ensemble des mesures dans un intervalle de largeur $12 \mu m$ (6 points de mesure), on peut ainsi obtenir une courbe de fluorescence en fonction du numéro de transistor (courbe en cercles sur la figure C.4). Ces courbes peuvent être directement comparées aux signaux électroniques (voir pour exemple la comparaison avec les signaux électroniques au chapitre 5.4.1).

— Appendice D —

Protocoles biologiques de PCR

D.1 Introduction à la PCR

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode d'amplification enzymatique permettant de fabriquer de multiples copies d'un segment spécifique d'ADN [122, 123, 124]. Cette nouvelle méthode, mise au point en 1984-85 par le Cetus Corp et les scientifiques Kary Mullis¹ et al [125, 126], a eu un impact très important dans le domaine de l'analyse génétique et est devenue une des techniques les plus employées dans les laboratoires de biologie moléculaire.

Le principe de la PCR est schématisé sur la figure D.1. Pour amplifier de manière spécifique un fragment d'un substrat d'ADN, il faut tout d'abord choisir deux courtes séquences d'ADN simple brin (des oligonucléotides de 15 à 40 bases) que l'on nomme amorces. Ces amorces sont choisies de telle sorte que chacune reconnaît une séquence cible de l'ADN double-brin ; ces deux séquences cibles étant localisées sur chacun des deux brins opposés de part et d'autre du segment d'intérêt que l'on désire amplifier. En plus des amorces et du substrat, le mélange réactionnel initial comprend une enzyme appelée ADN polymérase et des nucléotides. Cette réaction s'effectue en trois étapes successives constituant à elles trois un cycle de PCR ; ce cycle est alors répété entre 25 et 35 fois :

[1 : dénaturation] La première étape consiste à dénaturer l'ADN double brin (séparation thermique des deux brins de la double hélice). Cette dénaturation s'effectue en chauffant le mélange ($\sim 94^{\circ}\text{C}$).

[2 : appariement des amorces] Le mélange est alors refroidi, ce qui permet aux amorces de s'hybrider au niveau de leurs séquences cibles. La température choisie pour cette étape dépend de la séquence et de la longueur des amorces ainsi que du contenu en sel du milieu réactionnel. Elle se situe entre 50°C et 65°C .

[3 : élongation] L'ADN polymérase synthétise deux nouveaux brins à partir des deux amorces respectives en utilisant l'ADN simple brin comme matrice et les nucléotides comme briques élémentaires. Cette synthèse s'effectue vers 70°C et nécessite l'utilisation d'une enzyme particulière, une ADN polymérase stable à haute température. Une polymérase

¹Kary Mullis a obtenu le Prix Nobel de Chimie pour l'invention de la PCR en 1993

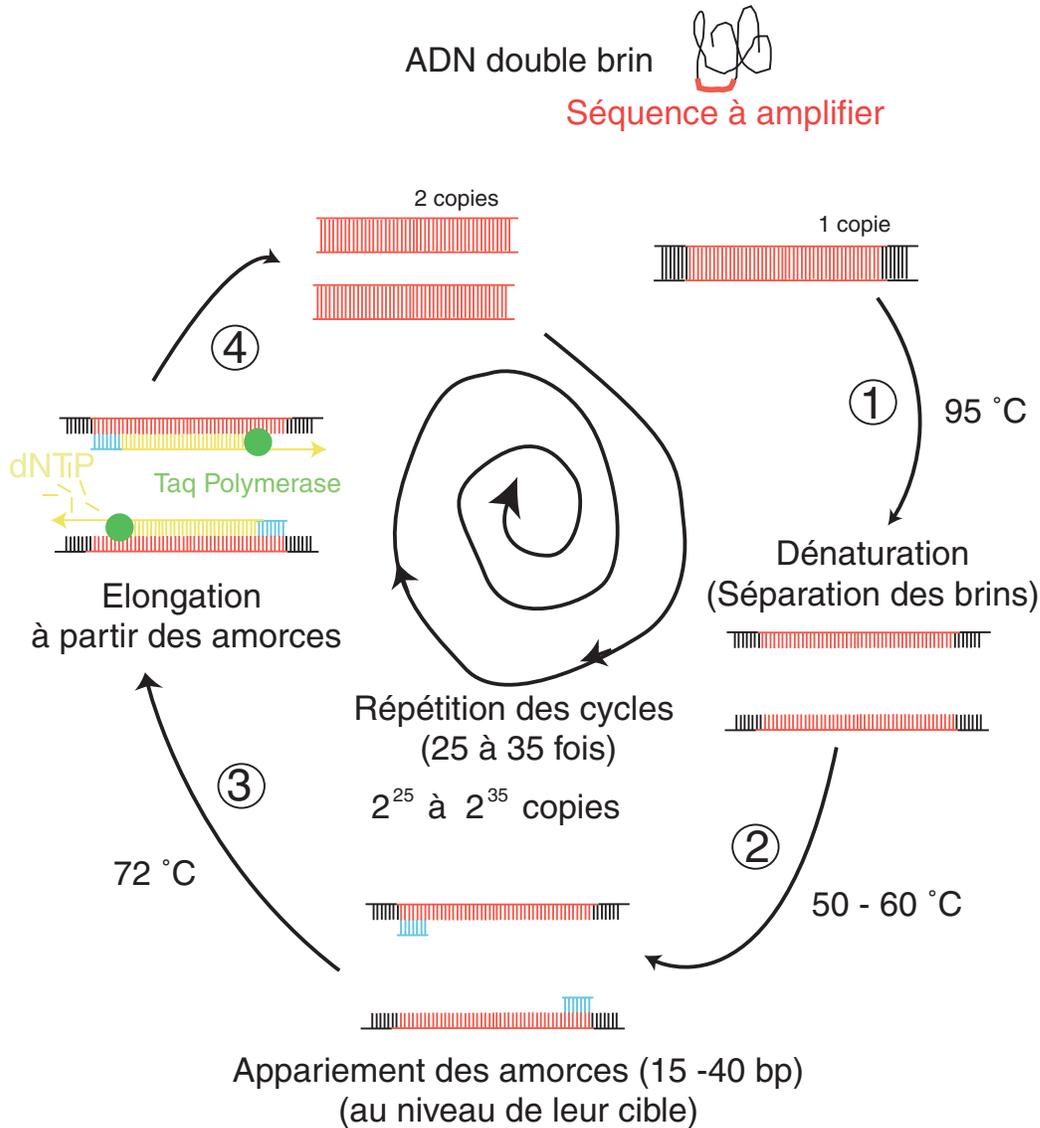


FIGURE D.1: Principe de la PCR

très couramment utilisée, est appelée Taq polymérase en raison de sa source, une bactérie thermo-résistante dénommée *Thermus aquaticus* que l'on trouve dans la mer près des sources chaudes. Le protocole initial de la PCR [125] ne faisait pas intervenir de polymérase thermostable. Il était alors nécessaire d'introduire la polymérase après l'étape de fusion et à chaque cycle car celle-ci était détruite au cycle suivant par les températures élevées nécessaires à la dénaturation. L'utilisation de cette polymérase thermo-résistante a donc permis l'automatisation de la réaction de PCR [127]. Cette réaction s'effectue dans un appareil thermo-controlé dont les cycles de température sont gérés par ordinateur.

[4 : répétition des cycles] A la fin du premier cycle, on dispose donc d'une copie de chaque brin de l'ADN d'intérêt en plus des deux brins de départ, soit 4 brins au total. La répétition du processus permet d'amplifier de manière exponentielle l'ADN souhaité car chaque brin nouvellement synthétisé peut servir de brin matrice pour la réaction. Le nombre théorique

de copies double brins est de 2^n après n cycles. Mais, après un certain nombre de cycles, le manque en nucléotides, amorces ou enzymes vis à vis du nombre croissant de brins matrices d'ADN ne permet plus une augmentation exponentielle de la synthèse. Pour une trentaine de cycles on obtient typiquement 1 million de copies. La réaction de PCR génère aussi des brins de longueurs plus grandes que celle du brin souhaité. Cependant, leur croissance est linéaire en fonction du nombre de cycles et leur nombre reste négligeable vis à vis de l'ADN d'intérêt.

A l'issue de la PCR, tous les réactifs ne sont pas consommés. On effectue une étape de purification permettant d'éliminer du milieu réactionnel sels, nucléotides non-incorporés et amorces, pour ne conserver que les ADN synthétisés.

Les applications de la PCR sont très variées. Cette technique est par exemple une alternative au clonage² car elle permet la production in-vitro d'une quantité significative d'un fragment d'ADN donné de manière plus simple et plus rapide (quelques heures). La PCR permet aussi de déterminer si une séquence recherchée est présente dans un échantillon d'ADN.

D.2 PCR sur le λ BstE-II

On amplifie par PCR un fragment de 1009 paires de bases à partir d'un substrat commercial le λ BstE-II en utilisant deux amorces 5'-CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC (20-mer, ARS3) et 5'-CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT (20-mer, ARS5) et une Taq Polymérase. Le protocole de PCR est réalisé sur un thermocycleur commercial : initiation de 3 min à 94°C, répétition de 30 cycles de dénaturation/ hybridation/extension (30 s à 94°C, 30 s à 57°C, et 2 min à 72°C). Un cycle terminal de PCR est pratiqué à 72°C pendant 3 minutes. Les réactifs utilisés sont dans les proportions suivantes :

Produits	1kb non modifié	1kbCy5	Référence
λ BstE-II (10ng/ μ l)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
ARS 3 (20 μ M)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
ARS 5 (20 μ M)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
dATP (2,5 mM)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
dCTP (2,5 mM)	2 μ l	2 μ l	4 μ l
dGTP (2,5 mM)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
dTTP (2,5 mM)	2 μ l	2 μ l	////////
dUTP Cy5 (0,25 mM)	////////	2 μ l	////////
10X-Mg	10 μ l	10 μ l	10 μ l
MgCl ₂	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Taq	1 μ l	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	65 μ l	63 μ l	65 μ l
	Total 100 μ l	Total 100 μ l	Total 100 μ l

TABLEAU D.1: Protocole de la PCR 1 kb

²Le clonage consiste en l'insertion d'ADN dans un vecteur, ce vecteur étant introduit dans une cellule hôte. La culture de cette cellule et la purification ultérieure du vecteur permettent de produire des quantités quasi illimitées du fragment d'ADN cloné que l'on désire étudier.

Nous synthétisons deux types de fragments PCR : l'un est non modifié et l'autre est modifié par des fluorophores (1kbCy5) en incorporant lors de la PCR 1 base fluorescente toute les 20 paires de base. Le tube référence contient exactement les mêmes produits PCR, excepté pour les bases. Nous supprimons la base (T) du mélange et doublons la concentration en base (C). A partir de ce tube aucun fragment PCR ne pourra être synthétisé, et il servira donc de référence dans nos expériences électroniques sur des produits PCR.

Pour les expériences de fixation avec les silanes (chapitre 7.1.7) nous avons aussi synthétisé un ADN Thi-1kbCy5 en remplaçant l'amorce ARS5 par l'amorce Thi-ARS5, les quantités de produits utilisés étant par ailleurs similaires.

D.3 PCR sur un gène de souris

Nous avons amplifié par PCR un gène de souris. Cette PCR est réalisée à partir du plasmide pCRII-TOPO Map dans lequel a été préalablement inséré le clone de ce gène³. Nous utilisons deux amorces M13 Reverse (5'-GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G-3') et M13 Forward (5'-GCG AGG GTT TTC CCA GTC AC-3'). Le protocole de PCR est réalisé sur un thermocycleur commercial : initiation de 3 min à 94°C, répétition de 30 cycles de dénaturation/hybridation/extension (30 s à 94°C, 30 s à 55°C, et 2 min à 72°C). Un cycle terminal de PCR est pratiqué à 72°C pendant 3 minutes. Les réactifs utilisés sont dans les proportions suivantes :

Produits	ADN non modifié	ADN Cy5	Référence
Plasmide (1/15000)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
M13 Reverse (10 μ M)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
M13 Forward (10 μ M)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
dATP (2,5 mM)	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l
dCTP (2,5 mM)	2,5 μ l	2,5 μ l	5 μ l
dGTP (2,5 mM)	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l
dTTP (2,5 mM)	2,5 μ l	2,5 μ l	////////
dUTP Cy5 (0,25 mM)	////////	2,5 μ l	////////
10X-Mg	5 μ l	5 μ l	5 μ l
MgCl ₂	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Taq	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
H ₂ O	26,5 μ l	24 μ l	26,5 μ l
	Total 50 μ l	Total 50 μ l	Total 50 μ l

TABLEAU D.2: Protocole PCR sur un gène de souris

Le fragment PCR correspondant à ce gène a une longueur de 600 paires de base. Nous avons synthétisé à la fois un fragment non modifié et un fragment fluorescent. Le tube de référence est réalisé en supprimant une des bases lors du protocole de PCR.

³Les plasmides nous ont été fournis par l'équipe de Marie Claude Pottier à l'ESPCI (Neurobiologie et Diversité Cellulaire UMR 7637, <http://www.bio.espci.fr/>).

D.4 Synthèse de longs fragments d'ADN (10 kb)

La synthèse PCR est couramment utilisée pour l'amplification de fragments d'une longueur entre une centaine et quelques milliers de paires de bases. Il existe néanmoins des protocoles permettant de générer des fragments plus longs. Nous avons utilisé ici le kit "Expand Long Template PCR System"⁴ pour produire un ADN de 10 kilobase à partir du substrat d'ADN λ . Les produits sont utilisés dans les proportions suivantes :

Produits	10 kb non modifié	10 kb Cy5	Référence
MIX 1	Total 25 μ l	Total 25 μ l	Total 25 μ l
λ DNA (1ng/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
DigLong10S (20 μ M)	0,75 μ l	0,75 μ l	0,75 μ l
BiotLong10AS (20 μ M)	0,75 μ l	0,75 μ l	0,75 μ l
dATP (10 mM)	1,75 μ l	1,75 μ l	1,75 μ l
dCTP (10 mM)	1,75 μ l	1,75 μ l	3,5 μ l
dGTP (10 mM)	1,75 μ l	1,75 μ l	1,75 μ l
dTTP (10 mM)	1,75 μ l	1,75 μ l	////////
dUTP Cy5 (0,25 mM)	////////	7 μ l	////////
H ₂ O	15,5 μ l	8,5 μ l	15,5 μ l
MIX 2	Total 25 μ l	Total 25 μ l	Total 25 μ l
"Buffer salt 1"	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Enzyme mix	0,75 μ l	0,75 μ l	0,75 μ l
H ₂ O	19,25 μ l	19,25 μ l	19,25 μ l

TABLEAU D.3: Protocole de PCR 10kb

Les solutions MIX 1 et MIX 2 sont ensuite mélangées. La PCR est alors réalisée sur un thermocycleur commercial : initiation de 2 min à 94°C, répétition de 25 cycles de dénaturation/hybridation/extension (10 s à 94°C, 30 s à 63°C, et 8 min à 68°C, pour les quinze derniers cycles cette étape est rallongée de 20 s par cycle). Un cycle terminal de PCR est pratiqué à 68°C pendant 7 minutes. Comme pour les autres PCR, nous réalisons trois tubes différents : l'un correspondant au produit PCR fluorescent, l'autre au produit PCR non modifié et le dernier à la référence.

⁴Le détail des produits utilisés pour ce protocole de PCR est donné dans le site Web de Roche Diagnostics : <http://biochem.roche.com/pack-insert/1681834a.pdf>

Bibliographie

- [1] Miescher, J. F. (1871) *Hoppe-Seyler's Med. Chem. Untersuchungen*. **4** : 441.
- [2] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953) A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, **171**, 737–8.
- [3] Scherer, S. (2001) Le projet de génome humain. *ISUMA*, **2**(3), 11–20.
- [4] Fitch, J. P. and Sokhansanj, B. (2000) Genomic Engineering : Moving Beyond DNA Sequence to Function. *Proceedings of the IEEE*, **88**(12), 1949–71.
- [5] Lander, E. S. (January, 1999) Array of Hope. *Nature genetics supplement*, **21**.
- [6] Lockhart, D. J. and Winzeler, E. A. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, **405**(6788), 827–36.
- [7] Cheung, V. G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A., Kucherlapati, R., and Childs, G. (1999) Making and reading microarrays. *Nature Genetics*, **21**(1 Suppl), 15–9.
- [8] Niemeyer, C. M. and Blohm, D. (1999) DNA Microarrays. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**(19), 2865–9.
- [9] Watson, A., Mazumder, A., Stewart, M., and Balasubramanian, S. (1998) Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**(6), 609–14.
- [10] Anthony, R. M., Brown, T. J., and French, G. L. (2001) DNA array technology and diagnostic microbiology. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **1**(1), 30–8.
- [11] Ramsay, G. (1998) DNA chips : state-of-the art. *Nature Biotechnology*, **16**(1), 40–4.
- [12] Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H., and Erlich, H. A. (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6230–4.
- [13] Maskos, U. and Southern, E. M. (1993) Study of oligonucleotide reassociation using large arrays of oligonucleotides synthesized on a glass support. *Nucleic Acids Research*, **21**, 4663–9.
- [14] G Yershov et al (1996) DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4913–8.
- [15] *Nature genetics supplement*, volume **21** no 1, (January 1999).
- [16] Lenigk, R., Carles, M., and Sucher, Y. I. N. J. (2001) Surface Characterization of a Silicon-Chip-Based DNA Microarray. *Langmuir*, **15**, 2497–01.
- [17] Cloarec, J. P., Deligianis, N., Martin, J. R., Lawrence, I., Souteyrand, E., Polychronakos, C., and Lawrence, M. F. (2002) Immobilization of homooligonucleotide probe layers onto Si/SiO₂ substrates : characterization by electrochemical impedance measurements and radiolabelling. *Biosens. Bioelectron.*, **17**(5), 405–12.
- [18] *Site Internet* : <http://www.affymetrix.com>.
- [19] Fodor, S. P. A., Leightonread, J., Pirrung, M. C., Stryer, L., Tsai, L. A., and Solas, D. (1991) Light directed spacially adressable parallel chemical synthesis. *Science*, **251**, 767–73.

- [20] Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., and Fodor, S. P. (1994) Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(11), 5022–6.
- [21] Blanchard, A. P. and Friend, S. H. (1999) Cheap DNA arrays-it's not all smoke and mirrors. *Nature Biotechnology*, **17**(10), 953.
- [22] Singh-Gasson, S., Green, R. D., Yue, Y., Nelson, C., Blattner, F., Sussman, M. R., and Cerrina, F. (1999) Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nature Biotechnology*, **17**(10), 974–8.
- [23] Milner, N., Mir, K. U., and Southern, E. M. (1997) Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*, **15**(6), 537–41.
- [24] Shalon, D., Smith, S. J., and Brown, P. O. (1996) A DNA micro-array system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.*, **6**, 639–45.
- [25] Brown lab. *Site Internet* : <http://cmgm.stanford.edu/pbrown>,.
- [26] BioRobotics MicroGrid, *Site Internet* : <http://www.biorobotics.com/microgrid.htm>.
- [27] Bowtell, D. D. (1999) Options available—from start to finish—for obtaining expression data by microarray. *Nature Genetics*, **21**(1 Suppl), 25–32.
- [28] Schena, M., Heller, R. A., Theriault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E., and Davis, R. W. (1998) Microarrays : biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.*, **16**(7), 301–6.
- [29] Chrisey, L. A., O'Ferrall, C. E., Spargo, B. J., Dulcey, C. S., and Calvert, J. M. (1996) Fabrication of patterned DNA surfaces. *Nucleic Acids Research*, **24**(15), 3040–7.
- [30] Livache, T., Roget, A., Dejean, E., Barthet, C., Bidan, G., and Teoule, R. (1994) Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Research*, **22**(15), 2915–21.
- [31] Lopez-Crapez, E., Livache, T., Marchand, J., and Grenier, J. (2001) K-ras mutation detection by hybridization to a polypyrrole DNA chip. *Clinical Chemistry*, **47**(2), 186–94.
- [32] Guedon, P., Livache, T., Martin, F., Lesbre, F., Roget, A., Bidan, G., and Levy, Y. (2000) Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.*, **72**(24), 6003–9.
- [33] Beier, M. and Hoheisel, J. D. (1999) Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Research*, **27**(9), 1970–7.
- [34] Zammattéo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L., and Remacle, J. (2000) Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal. Biochem.*, **280**(1), 143–50.
- [35] Lindroos, K., Liljedahl, U., Raitio, M., and Syvanen, A. C. (2001) Minisequencing on oligonucleotide microarrays : comparison of immobilisation chemistries. *Nucleic Acids Research*, **29**(13), e69.
- [36] Shchepinov, M. S., Case-Green, S. C., and Southern, E. M. (1997) Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research*, **25**(11), 1155–61.

- [37] Southern, E., Mir, K., and Shchepinov, M. (1999) Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics*, **21**(1 Suppl), 25–32.
- [38] Lamture et al, J. B. (1994) Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic Acids Research*, **22**(11), 2121–5.
- [39] Wang, J. (2000) From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Research*, **28**(16), 3011–6.
- [40] Pearson, J. E., Gill, A., and Vadgama, P. (2000) Analytical aspects of biosensors. *Ann. Clin. Biochem.*, **37**, 119–45.
- [41] Peterlinz, A., Georgiadis, R. M., Herne, T. M., and Tarlov, M. J. (1997) Observation of hybridization and dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3401–2.
- [42] Jin-Lee, H., Goodrich, T. T., and Corn, R. M. (2001) SPR imaging measurements of 1-D and 2-D DNA microarrays created from microfluidic channels on gold thin films. *Anal. Chem.*, **73**(22), 5525–31.
- [43] Fritzsche, W., Csáki, A., Reichert, J., Möller, R., and Köhler, J. M. (July, 2001) New colloidal gold-based detection scheme for DNA chip technology. *European Microscopy and Analysis*, pp. 5–7.
- [44] Taton, T. A., Mirkin, C. A., and Letsinger, R. L. (2000) Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes. *Science*, **289**, 1757–60.
- [45] Wang, J., Nielsen, P. E., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J. R., Grant, D. H., Ozsoz, M., Beglieter, A., and Mowat, M. (1997) Mismatch-sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance. *Anal. Chem.*, **69**(24), 5200–2.
- [46] Okahata, Y., Niikura, K., Furusawa, H., and Matsuno, H. (2000) A Highly Sensitive 27 MHz Quartz-Microbalance as a Device for Kinetic Measurements of Molecula Recognition on DNA Strands. *Analytical Sciences*, **16**, 1113–9.
- [47] Su, M., Li, S., and Dravid, V. P. (2003) Microcantilever resonance-based DNA detection with nanoparticle probes. *Applied Physics Letters*, **82**(20), 3562–4.
- [48] Fritz, J., Baller, M. K., Lang, H. P., Rothuizen, H., Vettiger, P., Meyer, E., Guntherodt, H., Gerber, C., and Gimzewski, J. K. (2000) Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science*, **288**(5464), 316–8.
- [49] Wu, G., Ji, H., Hansen, K., Thundat, T., Datar, R., Cote, R., Hagan, M. F., Chakraborty, A. K., and Majumdar, A. (2001) Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(4), 1560–4.
- [50] McKendry, R., Zhang, J., Arntz, Y., Strunz, T., Hegner, M., Lang, H. P., Baller, M. K., Certa, U., Meyer, E., Guntherodt, H. J., and Gerber, C. (2002) Multiple label-free biodection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(15), 9783–8.
- [51] Palecek, E. and Fotja, M. (2001) Detecting DNA hybridization and damage. *Anal. Chem.*, **73**(3), 74A–83A.
- [52] Gooding, J. J. (2002) Electrochemical DNA Hybridization Biosensors. *Electroanalysis*, **14**(17), 1149–56.

- [53] Wang, J. (1999) Towards Genoelectronics : Electrochemical Biosensing of DNA Hybridization. *Chem. Eur. J.*, **5**(6), 1681–5.
- [54] Drummond, T. G., Hill, M. G., and Barton, J. K. (2003) Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotechnology*, **21**(10), 1192–9.
- [55] Bergveld, P. (1972) Development, operation, and application of the ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology. *IEEE Trans Biomed Eng*, **BME-19**(5), 342–51.
- [56] Antonisse, M. M., Snellink-Ruel, B. H., Lugtenberg, R. J., Engbersen, J. F., van den Berg, A., and Reinhoudt, D. N. (2000) Membrane characterization of anion-selective CHEMFETs by impedance spectroscopy. *Anal. Chem.*, **72**(2), 343–8.
- [57] Lahav, M., Kharitonov, A. B., and Willner, I. (2001) Imprinting of chiral molecular recognition sites in thin TiO₂ films associated with field-effect transistors : novel functionalized devices for chiroselective and chiro-specific analyses. *Chem. Eur. J.*, **7**(18), 3992–7.
- [58] Vlasov, Y. G., Tarantov, Y. A., and Bobrov, P. V. (2003) Analytical characteristics and sensitivity mechanisms of electrolyte-insulator-semiconductor system-based chemical sensors—a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**(6), 788–96.
- [59] van Kerkhof, J. C., Bergveld, P., and Schasfoort, R. B. M. (1995) The ISFET based heparin sensor with a monolayer of protamine as affinity ligand. *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 269–82.
- [60] Kharitonov, A. B., Wasserman, J., Katz, E., and Willner, I. (2001) The Use of Impedance Spectroscopy for the Characterization of Protein-Modified ISFET Devices : Application of the Method for the Analysis of Biorecognition Processes. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 4205–13.
- [61] Martinoia, S., Rosso, N., Grattarola, M., Lorenzelli, L., Margesin, B., and Zen, M. (2001) Development of ISFET array-based microsystems for bioelectrochemical measurements of cell populations. *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 1043–50.
- [62] Zeck, G. and Fromherz, P. (2001) Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(18), 10457–62.
- [63] Manning, G. S. (1978) The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q. Rev. Biophys.*, **2**, 179–246.
- [64] Souteyrand, Cloarec, J. P., Martin, J. R., Wilson, C., Lawrence, I., Mikkelsen, S., and Lawrence, M. F. (1997) Direct Detection of the Hybridization of Synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect. *J. Phys. Chem. B*, **101**(15), 2980–5.
- [65] Cooper, E. B., Fritz, J., Wiegand, G., Wagner, P., and Manalis, S. R. (2001) Robust microfabricated field-effect sensor for monitoring molecular adsorption in liquids. *Applied Physics Letters*, **79**(23), 3875–7.
- [66] Fritz, J., Cooper, E. B., Gaudet, S., Sorger, P. K., and Manalis, S. R. (2002) Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(22), 14142–6.
- [67] Cui, Y., Wei, Q., Park, H., and Lieber, C. M. (2001) Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science*, **293**(5533), 1289–92.
- [68] Hahm, J. and Lieber, C. M. (2004) Direct Ultrasensitive Electrical Detection of DNA and DNA Sequence Variations Using Nanowire Nanosensors. *Nano Letters*, **4**(1), 51–4.

- [69] Star, A., Gabriel, J. C. P., Bradley, and Gruner, G. (2003) Electronic Detection of Specific Protein Binding Using Nanotube FET Devices. *Nano Letters*, **3**(4), 459–63.
- [70] Siu, W. M. and Cobbold, R. S. C. (1979) Basic properties of the electrolyte- SiO_2 -Si system : physical and theoretical aspects. *IEEE Trans. On El. Dev*, **ED-26**(11), 1805–15.
- [71] Fung, C., Cheung, W., and Ko, W. (1986) A generalized theory of an electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor. *IEEE Trans. On El. Dev*, **ED-33**(1), 8–18.
- [72] Fromherz, P., Offenhäuser, A., Vetter, T., and Weis, J. (1991) A Neuron-Silicon Junction : A Retzius Cell on the Leech on an Insulated-Gate Field-Effect Transistor. *Science*, **252**, 1290–2.
- [73] Weiss, R. and Fromherz, P. (1997) Frequency dependent signal transfer in neuron transistors. *Phys. Rev. E*, **55**, 877–89.
- [74] Kiessling, V., Müller, B., and Fromherz, P. (2001) Extracellular Resistance in Cell Adhesion Measured with a Transistor Probe. *Langmuir*, **16**, 3517–21.
- [75] Zeck, G. Halbleiterchip mit einfachem biologischen neuronalen Netz Doktorat der naturwissenschaften, genehmigten dissertation. TU München (February, 2002).
- [76] Straub, B., Meyer, E., and Fromherz, P. (2001) Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of iono-electronic interfacing. *Nature Biotechnology*, **19**, 121–4.
- [77] Straub, B. Kopplung von Feldeffekttransistoren mit rekombinanten Ionenkanälen Doktorat der naturwissenschaften, genehmigten dissertation. TU München (January, 2001).
- [78] Telechem. *Site Internet* : <http://www.arrayit.com/Products/Printing/Stealth/stealth.html>.
- [79] MajerPrecision. *Site Internet* : <http://www.majerprecision.com/pins.htm>.
- [80] Eisen, M. B. and Brown, P. O. (1999) DNA Arrays for Analysis of Gene Expression. *Methods in Enzymology*, **303**, 179–205.
- [81] GeSiM. Nanoliter Dispensing Products, *Site Internet* : <http://gesim.de>.
- [82] Latour, R. A., Trembley, S. D., Tian, Y., Lickfield, G. C., and Wheeler, A. P. (2000) Determination of apparent thermodynamic parameters for adsorption of a midchain peptidyl residue onto a glass surface. *Biomed. Mater. Res.*, **49**(1), 58–65.
- [83] Sens, P. and Joanny, J. F. (2000) Counterion Release and Electrostatic Adsorption. *Phys. Rev. Lett.*, **84**(21), 4862–5.
- [84] Dobrynin, V., Deshkovski, A., and Rubinstein, M. (2001) Adsorption of Polyelectrolytes at an Oppositely Charged Surface. *Macromolecules*, **34**, 3421–36.
- [85] Pouthas, F., Gentil, C., Côte, D., and Bockelmann, U. (2004) DNA detection on transistor arrays following mutation-specific enzymatic amplification. *Applied Physics Letters*, (84).
- [86] Syvänen, A. C. (2001) Accessing genetic variation : genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Rev. Genet.*, **2**, 930–942.
- [87] Kwok, P. Y. (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **2**, 235–258.
- [88] Denoyelle et al., F. (1997) Prelingual deafness : high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 2173–77.
- [89] Scott et al., A. (1998) Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Human Mutation*, **11**, 387–394.

- [90] Denoyelle, F., Marlin, S., Weil, D., Moatti, L., Chauvin, P., Garabédian, E.-N., and Petit, C. (1999) Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect : implications for genetic counselling.. *The Lancet*, **353**, 1298–303.
- [91] Lucotte, G., Bathelier, C., and Champenois, T. (2001) PCR test for diagnosis of the common GJB2 (connexin 26) 35delG mutation on dried blood spots and determination of the carrier frequency in France.. *Molecular and Cellular Probes*, **15**, 57–9.
- [92] Xia, Y. and Whitesides, G. M. (1998) Soft Lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 550–75.
- [93] Kopp, M. U., de Mello, A. J., and Manz, A. (1998) Chemical amplification : continuous-flow PCR on a chip. *Science*, **280**, 1046–8.
- [94] Liu, J., Enzelberger, M., and Quake, S. (2002) A nanoliter rotary device for polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, **23**, 1531–6.
- [95] Liu, Y., Rauch, C. B., Stevens, R. L., Lenigk, R., Yang, J., Rhine, D. B., and Grodzinski, P. (2002) DNA amplification and hybridization assays in integrated plastic monolithic devices. *Anal. Chem.*, **74**, 3063–70.
- [96] Lagally, E. T., Simpson, P. C., and Mathies, R. A. (2000) Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system.. *Sens. Actuators B*, **63**, 138–46.
- [97] Kumar, A., Larsson, O., Parodi, D., and Liang, Z. (2000) Silanized nucleic acids : a general platform for DNA immobilization. *Nucleic Acid Research*, **28**(14), 71.
- [98] François, B. (2001) Détection de l'hybridation de l'ADN par fluorescence. *Rapport de stage, Magistère des Sciences de la Matière (2ème année, ENS Lyon)*, LPMC ENS.
- [99] Afchain, S. (2001) Fixation et hybridation de longues molécules d'ADN simple brin. *Rapport de stage de DEA (Physique théorique, Paris)*, LPMC ENS.
- [100] Gentil, C. (2001) Détection d'hybridation en volume et à l'interface solide liquide. *Rapport de stage de DEA (Physique des Liquides, Paris)*, LPMC ENS.
- [101] Csáki, A., Möller, R., Straube, W., Köhler, J. M., and Fritzsche, W. (2001) DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy. *Nucleic Acids Research*, **29**(16), e81.
- [102] Belosludtsev, Y., Belosludtsev, I., Iverson, B., Lemeshko, S., Wiese, R., Hogan, M., and Powdrill, T. (2001) Nearly instantaneous, cation-independent, high selectivity nucleic acid hybridization to DNA microarrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **282**(5), 1263–7.
- [103] Pouthas, F., Gentil, C., Côte, D., Zeck, G., Straub, B., and Bockelmann, U. (2004) Spatially resolved electronic detection of biopolymers. *submitted to Phys. Rev. E.*
- [104] Bockelmann, U. and Pouthas, F. (2002) Procédé de détection d'au moins un paramètre caractéristique de molécules sondes fixées sur au moins une zone active d'un capteur. *Patent application (PCT)*.
- [105] Bockelmann, U., Gentil, C., and Pouthas, F. (2003) Procédé de détection électronique d'au moins une interaction spécifique entre des molécules sondes et des biomolécules cibles. *Patent application (PCT)*.
- [106] Bard, A. J. and Faulkner, L. R. (1980) *Electrochemical methods, fundamentals and applications*, Wiley, NY.
- [107] Israelachvili, J. (1985) *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, Londres.

- [108] Persello, J. in "Adsorption on silica surfaces", edited by E. Papier, *Surfactant Science Series, Vol 90*, Marcel Dekker (New York, 2000), p. 297, table 8.
- [109] Larson, I. and Attard, P. (2000) *J. Colloid Interface Sci*, **227**, 152.
- [110] CRC Handbook of Chemistry and Physics, D. R. Lide ed., CRC Press, 1994 (75th Edition).
- [111] Grattarola, M., Massobrio, G., and Martinoia, S. (1992) Modeling H⁺-Sensitive FET's with SPICE. *IEEE Trans. On El. Dev*, **ED-39**(4), 813–8.
- [112] Meixner, L. K. and Koch, S. (1992) Simulation of ISFET operation based on site-binding model. *Sensor and Actuators B*, **6**, 315–18.
- [113] Atkins, P. W. Physical Chemistry, Oxford, 1995 (5th Edition).
- [114] Affymetrix, Scanner. http://www.affymetrix.com/products/instruments/specific/scanner_3000.affx.
- [115] Packard BioChip ScanArray SA5000 . <http://www.packardbiochip.com/>.
- [116] Webb, R. H. (1999) Thoeretical Basis of Confocal Microscopy. *Methods in enzymology*, **307**, 3–20.
- [117] Lichtman, J. (1994) Thoeretical Basis of Confocal Microscopy. *Pour la science*, **204**, 62–7.
- [118] Eigen, M. and Rigler, R. (1994) Sorting single molecules : Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5740–7.
- [119] Lambacher, A. and Fromherz, P. (1996) Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer. *Appl. Phys. A*, **63**, 207–16.
- [120] Braun, D. and Fromherz, P. (1997) Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Appl. Phys. A*, **65**, 341–8.
- [121] Lambacher, A. and Fromherz, P. (2002) Luminescence of Dye Molecules on Oxidized Silicon and Fluorescence Interference Contrast Microscopy of Biomembranes. *J. Opt. Soc. Am. B*, **19**, 1435–53.
- [122] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. Principles of biochemistry, Worth Publishers, second edition.
- [123] Norman, A. and Levenson, C. H. Polymerase Chain Reaction. Chemical and Engineering pp. 36–47 (1990).
- [124] SADR Team (1995-1998) The Polymerase Chain Reaction. <http://bibserv.techfak.uni-bielefeld.de/sadr/index2.html>.
- [125] Mullis, K. B. and Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335–50.
- [126] Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of Beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350–4.
- [127] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scarf, S., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487–91.

Ce travail a porté sur l'étude d'une nouvelle méthode de détection électronique de biopolymères chargés à l'interface solide/liquide en utilisant des réseaux de transistors à effet de champ. Les structures utilisées sont des réseaux d'EOSFET. Ce type de structures semiconductrices opère avec une électrode de référence et possède une surface active dont l'interface est du type électrolyte/oxyde/semi-conducteur. Des micro- ou macro-gouttelettes de solutions contenant des biopolymères chargés sont déposées en des endroits prédéfinis sur les réseaux de transistors. Ces dépôts locaux induisent des variations des caractéristiques courant-tension des transistors ayant été exposés à l'apport de charge. L'étude des variations des caractéristiques dc des transistors après l'adsorption de deux biopolymères de charges globales opposées (la polylysine et l'ADN), ont montré des effets contraires qui correspondent bien à un apport de charges positives pour la polylysine et négatives pour l'ADN. Des expériences de variations en concentration de biopolymères ont permis de mettre en évidence une zone dynamique de détection correspondant à une augmentation du signal électronique en fonction de la concentration en biopolymères déposés jusqu'à une saturation attribuée à la quantité maximale de biopolymères pouvant être adsorbée à l'interface. Des signaux parasites observés sur des tampons servant aux dilutions limitent la détection de basses concentration en biopolymères. Des sensibilités de 10^7 monomères lysines/FET et de 4.10^8 bases d'ADN/FET ont ainsi pu être estimées. Une modélisation de l'écrantage des charges d'interface par l'électrolyte de mesure permet de rendre compte des diminutions des signaux électroniques observés lorsque l'on augmente progressivement la molarité en sel de l'électrolyte de mesure. La détection électronique de l'ADN a été démontrée de manière reproductible pour de courts fragments d'ADN simple brin (oligonucléotides) ainsi que pour des molécules d'ADN double brin issues de synthèses par PCR. En utilisant des ADN marqués par des fluorophores, les signaux électroniques sont comparés avec des mesures de fluorescence locale. La détection d'une mutation ponctuelle a pu être mise en évidence en combinant l'approche électronique avec un protocole d'amplification d'ADN : "allèle spécifique PCR".

Mots clés : détection électronique, transistors à effet de champ, réseaux d'EOSFET, caractéristiques dc, biopolymères chargés, polylysine, ADN, oligonucléotides, fragments PCR, allèle spécifique PCR, mutation.

This work presents a new approach for the electronic detection of charged biopolymers at a solid/liquid interface using field effect transistors arrays. In our experiments, we use arrays of EOSFET. This type of semiconductor transistor is operating with a reference electrode and consists in a gate structure of electrolyte-oxide-semiconductor interfaces. Micro- or macro-droplets containing charged biopolymers solution are locally spotted on the transistors arrays. The localised deposits induce sizeable variations in the dc current-voltage characteristics of the transistors exposed to the molecular charges. The variations of the dc characteristics due to the adsorption of two opposite charged biopolymers (polylysine and DNA) showed opposite effects and can thus be correlated to a contribution of positive charges for polylysine and negative charges for DNA. Experiments on the effect of the variation in the concentration of biopolymers allowed us to identify a dynamical detection zone. In this zone the electronic signals increases with the biopolymers spotting concentration until a saturation corresponding to the maximum biopolymers quantity being able to be adsorbed on the surface. Interfering signals observed on the buffers used for dilutions limit the detection of low biopolymers concentration. Sensibilities of 10^7 lysine monomers/FET and 4.10^8 bases of ADN/FET have been estimated. A modeling of the interface charge screening by the electrolyte may account for the reductions in the electronic signals observed when the electrolyte salt molarity is gradually increased. The electronic detection of DNA was shown in a reproducible way for short ssDNA (oligonucleotides) as well as for dsDNA molecules synthesized by PCR. Using Cy5-modified DNA the electronic signals are compared with local fluorescence measurements. By combining the electronic approach with an allele specific PCR, we demonstrated the detection of a single base pair mutation.

Key words : electronic detection, field effect transistors, EOSFET arrays, dc characteristics, charged biopolymers, polylysine, DNA, oligonucleotides, PCR fragments, allele specific PCR, mutation.