



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1998/06/11
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1998/12/17
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2009/06/09
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1999/12/14
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1998/001213
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1998/057157
(30) Priorité/Priority: 1997/06/11 (FR97/07530)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *G01N 27/416* (2006.01),
C12Q 1/25 (2006.01), *C12Q 1/68* (2006.01),
G01N 33/53 (2006.01), *G01N 33/543* (2006.01)

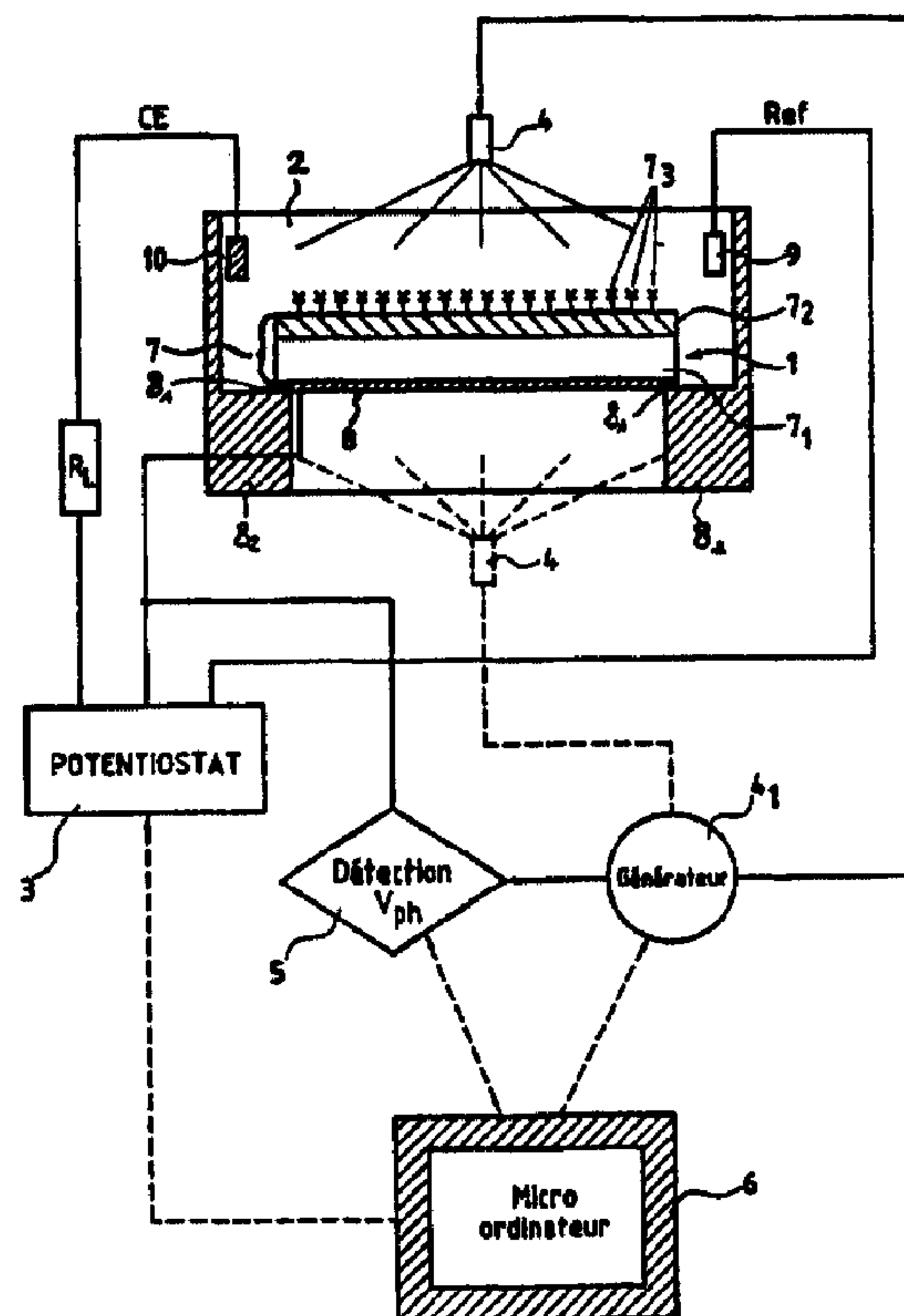
(72) Inventeurs/Inventors:
MARTIN, JEAN-RENE, FR;
SOUTEYRAND, ELIANE, FR

(73) Propriétaires/Owners:
ECOLE CENTRALE DE LYON, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS), FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PROCEDE D'IDENTIFICATION ET/OU DE DOSAGE DE SUBSTANCES BIOLOGIQUES, PRESENTES DANS UN LIQUIDE CONDUCTEUR, DISPOSITIF ET CAPTEUR D'AFFINITE UTILES POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING AND/OR ANALYSING BIOLOGICAL SUBSTANCES, PRESENT IN A CONDUCTIVE LIQUID, DEVICE AND AFFINITY SENSOR USED FOR IMPLEMENTING SAID METHOD



(57) Abrégé/Abstract:

L'invention a pour but de fournir un procédé perfectionné d'identification et/ou de dosage de polynucléotides PN présents dans un milieu liquide conducteur. Ce procédé consiste à faire intervenir un capteur d'affinité comprenant une structure multicouche semi-



(57) Abrégé(suite)/Abstract(continued):

conducteur/isolant/sondes = polynucléotides PNc complémentaires aux PN du milieu. Selon ce procédé, on sélectionne des sondes PNc non marquées, on polarise le semi-conducteur, on l'éclaire périodiquement, on mesure les variations du potentiel de bande plate induites par un phénomène d'effet de charge directement et essentiellement lié aux appariements spécifiques entre PN et PNc, et enfin on interprète les signaux recueillis en terme d'identification et/ou de dosage des PN. L'invention concerne également le dispositif et le capteur utile pour la mise en oeuvre de ce procédé. Application: analyse en biologie moléculaire, e.g. diagnostic de maladies virales ou génétiques.

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 27/30, 27/416	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/57157 (43) Date de publication internationale: 17 décembre 1998 (17.12.98)
--	-----------	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01213

(22) Date de dépôt international: 11 juin 1998 (11.06.98)

(30) Données relatives à la priorité:
97/07530 11 juin 1997 (11.06.97) FR

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): ECOLE CENTRALE DE LYON [FR/FR]; 26, avenue Guy de Collongue, Boîte postale 163, F-69131 Ecully Cedex (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CN [FR/FR]; RS), 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MARTIN, Jean-René [FR/FR]; 66, rue Bellevue, F-69380 Lozanne (FR). SOUTEYRAND, Eliane [FR/FR]; 18, chemin du Moulin-Carron, F-69130 Ecully (FR).

(74) Mandataire: ROPITAL-BONVARLET, Claude; Cabinet Beau de Loménie, 51, avenue Jean Jaurès, Boîte postale 7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).

(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée*Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.*

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING AND/OR ANALYSING BIOLOGICAL SUBSTANCES, PRESENT IN A CONDUCTIVE LIQUID, DEVICE AND AFFINITY SENSOR USED FOR IMPLEMENTING SAID METHOD

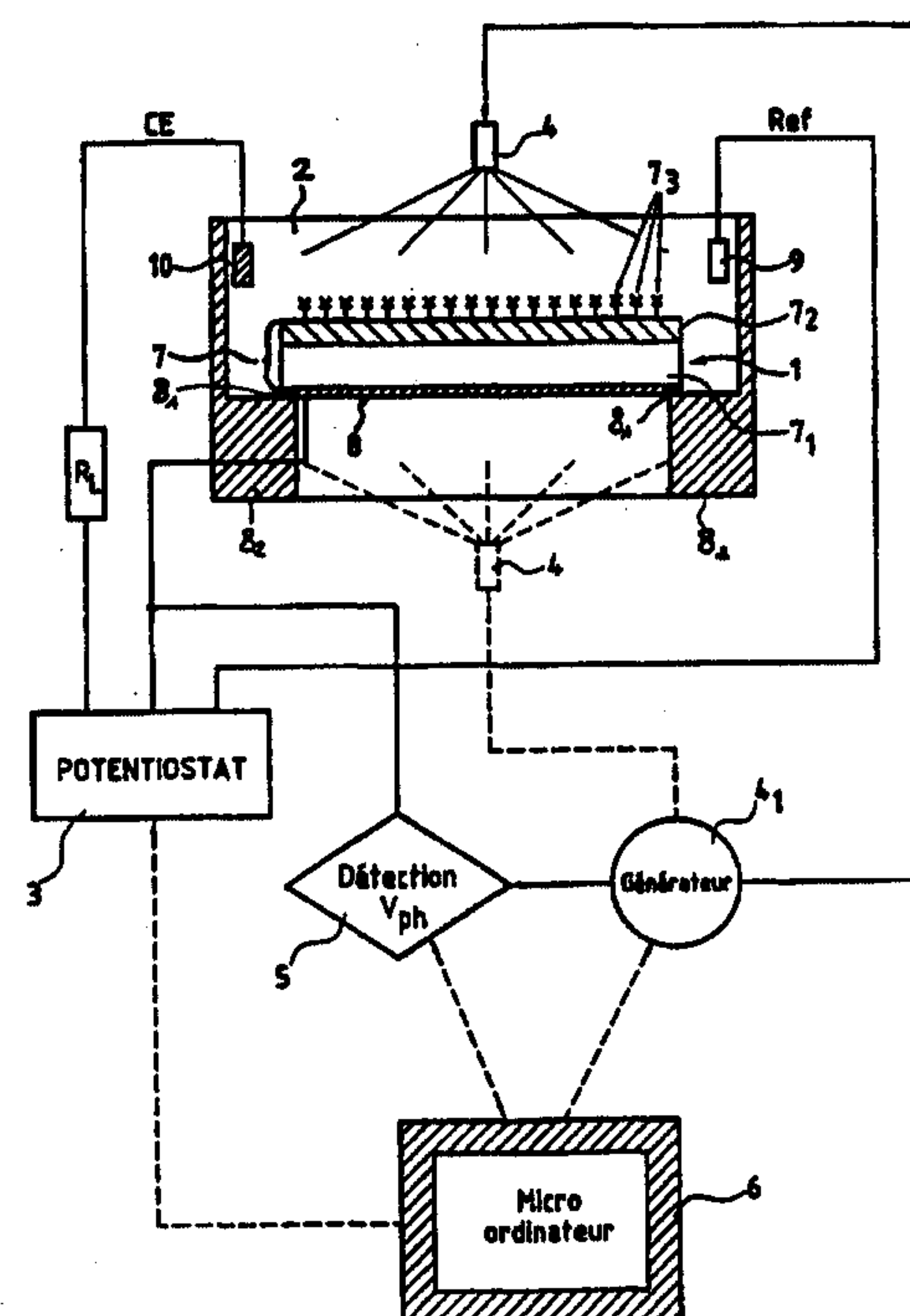
(54) Titre: PROCEDE D'IDENTIFICATION ET/OU DE DOSAGE DE SUBSTANCES BIOLOGIQUES, PRESENTES DANS UN LIQUIDE CONDUCTEUR, DISPOSITIF ET CAPTEUR D'AFFINITE UTILES POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE

(57) Abstract

The invention concerns an improved method for identifying and/or analysing polynucleotides PN present in a conductive liquid medium, using an affinity sensor comprising a multilayer structure *semiconductor/insulant/probe* = *polynucleotides PNc complementary to the medium PN*. The method consists in selecting non-marked PNc; polarising the semiconductor; periodically lighting it; measuring the flat band potential variations induced by loading effect phenomenon directly and essentially related to specific pairings between PN and PNc; and finally interpreting the signals collected at the end of the identification and/or analysis of PN. The invention also concerns the device and the sensor used for implementing the method. It is applicable to molecular biology analysis, e.g. diagnosis of viral or genetic diseases.

(57) Abrégé

L'invention a pour but de fournir un procédé perfectionné d'identification et/ou de dosage de polynucléotides PN présents dans un milieu liquide conducteur. Ce procédé consiste à faire intervenir un capteur d'affinité comprenant une structure multicouche *semi-conducteur/isolant/sondes* = *polynucléotides PNc complémentaires aux PN du milieu*. Selon ce procédé, on sélectionne des sondes PNc non marquées, on polarise le semi-conducteur, on l'éclaire périodiquement, on mesure les variations du potentiel de bande plate induites par un phénomène d'effet de charge directement et essentiellement lié aux appariements spécifiques entre PN et PNc, et enfin on interprète les signaux recueillis en terme d'identification et/ou de dosage des PN. L'invention concerne également le dispositif et le capteur utile pour la mise en oeuvre de ce procédé. Application: analyse en biologie moléculaire, e.g. diagnostic de maladies virales ou génétiques.



PROCEDE D'IDENTIFICATION ET/OU DE DOSAGE DE SUBSTANCES BIOLOGIQUES, PRESENTES DANS UN LIQUIDE CONDUCTEUR, DISPOSITIF ET CAPTEUR D'AFFINITE UTILES POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE

5

DOMAINE TECHNIQUE :

Le domaine de l'invention est celui de la détection de produits, de préférence biologiques («affins»), tels que les acides nucléiques, ou bien encore les biopolymères de nature protéique.

10

Plus précisément, la présente invention concerne, d'une part, un procédé d'analyse qualitative et/ou quantitative de substances biologiques SBC, de préférence des polynucléotides PN présentes dans un milieu liquide (solution ou gel) conducteur LC, par l'intermédiaire de mesures optoélectrochimiques et, d'autre part, les dispositifs et les capteurs d'affinité destinés à la mise en oeuvre de ce procédé.

15

Les substances biologiques, plus particulièrement mais non limitativement, visées par l'invention sont les polynucléotides PN. Sous ce terme général, on englobe conformément à l'invention, les molécules composées d'au moins deux nucléotides (oligonucléotides et polynucléotides stricto sensu), dont notamment les acides nucléiques ARN ou ADN et toute structure génétique en comprenant. L'invention concerne également les composés susceptibles d'être impliqués dans des réactions de couplage immunologique [Antigène Ag/anticorps Ac], voire de reconnaissance Enzyme/Substitut E/S.

20

25

ART ANTERIEUR :

Pour détecter, identifier ou doser ces molécules, on a exploité leurs propriétés de bioaffinité, à savoir leur aptitude singulière à s'apparier spécifiquement avec leurs complémentaires, selon des mécanismes d'hybridation génétique PN/PN_c, (PN_c = PolyNucléotide complémentaire) de couplage immunologique Ag/Ac ou de reconnaissance E/S.

30

C'est ainsi que, dans le domaine immunologique, on connaît des méthodes qui sont fondées sur le couplage antigène/anticorps et qui font intervenir une étape de révélation des couples formés à l'aide de marqueurs radioactifs, enzymatiques, fluorescents, colorés ou analogues. De telles méthodes sont longues et complexes à

35

mettre en oeuvre. De plus, les réactifs utilisés sont peu disponibles et onéreux. Enfin, ces méthodes ne permettent pas des mesures en continu et encore moins in vivo.

Ces techniques ont été transposées avec leurs défauts au domaine de la détection de séquences nucléiques, qui doivent ainsi nécessairement être marquées pour pouvoir
5 être dosées et/ou identifiées.

Dans un autre registre, il a été proposé de s'attacher à la détection des signaux physiques de toute nature, susceptibles d'être induits par les réactions biochimiques d'hybridation nucléotidique ou couplage immunologique. Pour ce faire, il convient, tout d'abord, d'isoler un type de signaux particuliers et caractéristiques,
10 puis d'adopter un transducteur apte à convertir lesdits signaux en une grandeur physique mesurable. Ces signaux peuvent être, par exemple, la production d'une espèce chimique, une variation d'épaisseur, d'indice optique, de masse ou bien encore une variation de propriétés électriques. Les transducteurs peuvent donc être des capteurs électrochimiques, piézoélectriques, optiques ou électriques. Toute la
15 difficulté réside dans la mise en évidence des signaux spécifiques de l'appariement et dans la mise au point d'un transducteur correspondant fiable, sensible et fidèle.

L'invention décrite dans la demande de brevet français n° 94 08688 s'insère parfaitement dans cet état de la technique fondé sur la détection des signaux électriques, induits par des hybridations PN/PNc ou par des réactions antigène-
20 anticorps, dans un milieu liquide conducteur de l'électricité.

Cette demande de brevet décrit un procédé d'analyse qualitative et/ou quantitative de substances biologiques, en particulier, des polynucléotides, des antigènes, des anticorps, des enzymes, des substrats, dans lequel on met en oeuvre une structure multicouches comprenant une plaquette de semi-conducteur recouverte d'un isolant
25 dont la surface est fonctionnalisée par l'une des espèces des paires de substances biologiques sus-visées, appariables spécifiquement. Selon ce procédé, on polarise le semi-conducteur contenant des polynucléotides PN à doser ou à identifier, on recueille les variations des signaux électriques induites par un phénomène d'effet de charge directement et essentiellement lié aux appariements des substances biologiques
30 visées avec leurs ligands complémentaires fixés sur l'isolant, éventuellement par l'intermédiaire d'une membrane sensible.

Cette technique de mesure par transduction électrique ne nécessite pas d'intermédiaire de réaction, pas plus que de marqueur spécifique ni de réaction enzymatique. Elle donne satisfaction mais reste néanmoins perfectible en ce qui concerne la simplicité de
35 mise en oeuvre et l'accès à une possibilité de réalisation de séries de mesures rapides

de différents substrats, sans utiliser autant de capteurs qu'il existe de natures différentes de substrats à analyser.

Selon cette technique, le phénomène d'effet de charges peut être appréhendé par mesure d'impédance électrochimique d'une structure *semi-conducteur/isolant/membrane sensible/liquide conducteur*. Selon une variante, la caractérisation de l'effet de champ dû à la variation de la charge superficielle induite par l'appariement, peut être réalisée à l'aide d'un transistor à effet de champ polarisé et sur lequel on mesure les variations du potentiel grille/source induit par l'effet de champ.

Il existe par ailleurs, des propositions techniques d'identification et/ou de dosage de molécules biologiques, qui combinent

- d'une part, des moyens de révélation des substances à doser faisant appel à des marqueurs radioactifs, enzymatiques, fluorescents, colorés, modificateurs de potentiel redox ou de pH, ou analogues,
- et d'autre part, des moyens de transduction électrochimiques ou optoélectrochimiques.

Malheureusement, une telle combinaison n'est pas de nature à supprimer les inconvénients liés aux techniques basées sur la révélation, ni à améliorer les techniques d'analyse électrochimique.

C'est ainsi que les brevets américains N° 4 591 550 et 5 500 188 divulguent un procédé et un dispositif pour la détermination et le dosage d'une ou plusieurs substances contenues dans un milieu liquide gazeux ou solide et capables de modifier les caractéristiques de photoréponse d'un élément photosensible, comprenant des moyens de reconnaissance desdites substances. Ces derniers impliquent un mécanisme de révélation par un ou plusieurs produits traceurs susceptibles de modifier les caractéristiques physicochimiques du milieu d'analyse (pH, potentiel redox) et/ou susceptibles d'être mis en évidence par un marqueur radioactif coloré ou fluorescent.

Il s'agit donc d'une technique hybride associant des moyens de transduction optoélectrochimique et des moyens de révélation physicochimiques.

Le dispositif mis en oeuvre dans ce procédé connu comprend un ou plusieurs capteurs constitués chacun par une plaquette de semi-conducteur (silicium recouvert d'une couche d'isolant SiO₂ ou nitrure de silicium), la surface de cette dernière étant éventuellement fonctionnalisée par des moyens de reconnaissance des substances à doser et/ou à identifier. Ce dispositif est également pourvu de moyens de polarisation de la structure semi-conducteur/isolant (e.g. circuit d'application d'une tension de polarisation, ledit circuit comprenant d'une part, une contre-électrode et une électrode de référence et étant relié, d'autre part, à la structure semi-conducteur/isolant). Le

dispositif comporte, en outre, des moyens d'irradiation du ou des éléments photosensibles ainsi que des moyens de mesure de signaux électriques résultants, de détection et/ou d'identification des substances considérées.

Il est à noter que chaque élément photosensible comprenant la structure semi-conducteur/isolant est nécessairement associé à des moyens d'éclairement, des
5 moyens de polarisation et des moyens de mesure. Il s'ensuit une extrême complexité du dispositif dans ses variantes visant la multidétection de substances différentes, à la fois sur le plan de la structure en tant que telle et sur le plan de la prise en charge et du traitement des mesures et des signaux résultants.

10 La couche d'isolant des éléments photosensibles selon cet art antérieur, est fonctionnalisée dans le cas où les substances à analyser sont des systèmes affins PN/PNc, E/S, Ag/Ac. Dans ce cas, les ligands de reconnaissance fonctionnalisant la couche d'isolant sont systématiquement marqués. Cela est illustré notamment pour l'analyse d'ADN ou ARN, dans laquelle les ligands complémentaires de
15 reconnaissance sont marqués avec le biotine (Cf. colonne 14 lignes 49 à 63 de l'US-A-5 500 188). Dans de telles configurations, on doit donc supporter tous les inconvénients liés à ces techniques de révélation par marqueur. Il convient d'ailleurs d'observer que celles qui font intervenir l'absorption ou l'émission de radiations lumineuses, risquent de surcroît de perturber l'irradiation d'activation prévue selon ce
20 procédé.

Dans l'hypothèse où il ne s'agit pas de systèmes affins sous-tendant une fonctionnalisation spécifique de l'isolant des capteurs, les moyens traceurs sont e.g. des variations de pH ou de potentiel Redox. Il doit être considéré que ces moyens ne
25 sont pas des plus fiables car il existe bon nombre de facteurs dans le milieu d'analyse, qui est par exemple un liquide conducteur, susceptibles d'interférer sur ces paramètres, sans que cela ne soit lié au dosage et à l'identification des substances visées.

De plus, bien qu'il n'exclut pas le fait que le signal mesuré au sortir de leur capteur puisse être le photopotentiel, la photoconductance, la photocapacitance ou la
30 photoinductance, ou des combinaisons de celles-ci (colonne 3, lignes 36 et 37-US-A-5 500 188), il est précisé lignes 41 à 43 colonne 3 de ce même brevet que le signal mesuré est la résultante d'un changement d'un courant continu d'un courant alternatif ou de l'effet d'un courant continu sur un courant alternatif. Cette préférence quant à la prise en compte du photocourant comme signal résultant, ressort également de
35 manière claire et exclusive des exemples de ces brevets US, dans lesquels on prend en compte soit le courant nécessaire pour maintenir un potentiel constant entre l'élément

sensible et la référence (colonne 19 lignes 4 à 7), soit les variations de ce courant, qui correspondent aux changements de l'environnement chimique au voisinage de l'isolant de l'élément sensible (colonne 19 lignes 43 à 45) soit le potentiel requis pour maintenir un courant constant (colonne 19 lignes 62 à 65), soit la variation du courant d'alimentation des moyens d'irradiation nécessaires pour maintenir un potentiel constant entre la structure de mesure et la référence (colonne 20 lignes 42 à 49). Cela ressort également des passages colonne 26 lignes 7 à 9 et lignes 30 à 34.

Il apparaît donc que le signal central pris en considération dans le procédé et le dispositif selon les brevets US-A-4 591 550 et 5 500 188, est le **photocourant** mesuré de manière directe ou indirecte. Or, la relation entre l'éclairement et ce photocourant est mal définie et englobe plusieurs phénomènes physiques. Il en résulte donc une incertitude sur l'interprétation des mesures.

Force est donc de constater, que cette proposition technique hybride évoquée ci-dessus, ne donne nullement satisfaction en matière d'analyse qualitative et/ou quantitative de substances, en particulier biologiques, et plus particulièrement encore polynucléotidiques. Les Demandeurs en veulent d'ailleurs pour preuve qu'il n'existe à ce jour sur le marché aucune application industrielle et commerciale de l'invention décrite dans ces brevets US N° 4 591 550 et 5 500 188.

20 **BREF EXPOSE DE L'INVENTION :**

Aussi, pour poser la problématique à la base de la présente invention, les inventeurs se sont fixés notamment comme objectif essentiel de fournir un procédé d'identification et de dosage de substances biologiques, de préférence de polynucléotides, ce procédé devant intégrer *notamment* les spécifications suivantes :

- spécificité,
- haute sensibilité,
- commodité de mise en oeuvre,
- «applicabilité» à une grande variété de substances biologiques, et notamment aux substances polynucléotidiques,
- faible coût de revient,
- miniaturisation possible de façon à permettre des mesures analytiques, in situ et/ou in vivo, de façon continue ou discontinue ;
- grande fiabilité
- bonne reproductibilité

- accès à la multidétection, c'est-à-dire l'identification et/ou le dosage de substances différentes (polynucléotides hétéroclites) contenues dans un seul et même milieu d'analyse,
- application au diagnostic de maladies virales, génétiques, dès lors qu'il s'agit de multidétection simple à mettre en oeuvre à interpréter vis-à-vis de polynucléotides.

10 Pour satisfaire à ces objectifs, parmi d'autres, les inventeurs ont eu le mérite de mettre en évidence, de façon tout à fait surprenante et inattendue, que les appariements spécifiques entre des molécules de préférence biologiques et plus préférentiellement encore entre des brins polynucléotidiques complémentaires, induisent une modification de la charge électrique superficielle dans une structure multicouches, semi-conducteur Sc/isolant Is fonctionnalisé superficiellement. Cette modification intervient plus précisément à l'interface avec un milieu liquide conducteur LC, ledit effet de charge constituant le signal de base d'identification et de dosage, perçu de manière directe ou indirecte par des moyens de transduction optoélectrochimiques.

La mise en pratique de ce concept original et avantageux s'est exprimé au travers de la présente invention, qui a donc pour objet un dispositif d'identification et/ou de dosage de substances biologiques présentes dans un milieu liquide conducteur, comprenant :

- une chambre pour le milieu liquide conducteur ;
- 20 - un capteur d'affinité disposé dans ladite chambre ; ledit capteur d'affinité comprenant :
 - un matériau semi-conducteur ayant une surface inférieure et une surface supérieure ;
 - ledit matériau semi-conducteur ayant un contact ohmique disposé sur la surface inférieure ;
 - une couche d'isolant disposée sur la surface supérieure dudit matériau semi-conducteur ;
 - une pluralité de sondes en contact avec ledit milieu liquide conducteur ;
 - 30 • ladite pluralité de sondes étant disposée sur la surface de ladite couche d'isolant ;

- ladite pluralité de sondes comprenant une substance biologique de reconnaissance qui est capable de s'hybrider spécifiquement avec une substance biologique chargée, présente dans le milieu liquide conducteur, où des appariements spécifiques des substances biologiques chargées avec leurs substances biologiques de reconnaissance complémentaires sont formés, lesdits appariements spécifiques modifiant la charge électrique de la surface du capteur d'affinité ;

- 10 - des moyens de polarisation du matériau semi-conducteur par rapport au liquide conducteur ;
- des moyens d'éclairement du matériau semi-conducteur ;
- des moyens de mesure du photopotential V_{ph} aux bornes du capteur d'affinité ;
- des moyens de transformation des signaux détectés en variations de potentiel de bande plate V_{fb} qui sont induits par un phénomène d'effet de charge associé avec lesdits appariements modifiant la charge électrique de la surface du capteur d'affinité ; et
- des moyens de calcul et d'interprétation des ΔV_{fb} en termes
- 20 d'identification et/ou de dosage des substances biologiques chargées.

L'invention concerne aussi le capteur d'affinité défini ci-dessus.

L'invention concerne aussi le procédé d'identification et/ou de dosage de substances biologiques présentes dans un milieu liquide conducteur, utilisant un dispositif comprenant :

- une chambre pour le milieu liquide conducteur ;
 - un capteur d'affinité disposé dans ladite chambre ; ledit capteur d'affinité comprenant :
 - un matériau semi-conducteur ayant une surface inférieure et une surface supérieure ;
 - ledit matériau semi-conducteur ayant un contact ohmique disposé sur la surface inférieure ;
- 30

7a

- une couche d'isolant disposée sur la surface supérieure dudit matériau semi-conducteur ;
 - une pluralité de sondes en contact avec ledit milieu liquide conducteur ;
 - ladite pluralité de sondes étant disposée sur la surface de ladite couche d'isolant ;
 - ladite pluralité de sondes comprenant une substance biologique de reconnaissance qui est capable de s'hybrider spécifiquement avec une substance biologique chargée, présente dans le milieu liquide conducteur, où des appariements spécifiques des substances biologiques chargées avec leurs substances biologiques de reconnaissance complémentaires sont formés ;
- 10
- des moyens de polarisation du matériau semi-conducteur par rapport au liquide conducteur ;
 - des moyens d'éclairement du matériau semi-conducteur ;
 - des moyens de mesure du photopotential V_{ph} aux bornes du capteur d'affinité ;
 - des moyens de transformation des signaux détectés en variations de
- 20
- potentiel de bande plate V_{fb} qui sont induits par un phénomène d'effet de charge associé auxdits appariements modifiant la charge électrique de la surface du capteur d'affinité ; et
 - des moyens de calcul et d'interprétation des variations ΔV_{fb} en termes d'identification et/ou de dosage des substances biologiques chargées ;
- dans lequel le procédé comprend :
- une fourniture à titre de sonde des substances biologiques de reconnaissance non-marquées ;
 - une mise en contact de la substance biologique chargée avec la substance biologique de reconnaissance non-marquée, où des
- 30
- appariements spécifiques des substances biologiques chargées avec leurs substances biologiques de reconnaissance complémentaires

7b

sont formés, ledit appariement spécifique modifiant la charge électrique de la surface du capteur d'affinité ;

- une polarisation du matériau semi-conducteur de sorte que le niveau de Fermi corresponde approximativement au, ou passe par le niveau intrinsèque en surface du matériau semi-conducteur ;
- une soumission du matériau semi-conducteur à un éclairage périodique comprenant des photons dont l'énergie est supérieure à l'énergie de la bande interdite du matériau semi-conducteur ;
- une mesure du photopotential V_{ph} aux bornes du capteur d'affinité ;
- 10 - une détermination de l'impédance complexe du capteur d'affinité à partir du photopotential V_{ph} , une détermination des variations ΔV_{fb} du matériau semi-conducteur qui sont induites par un phénomène d'effet de charge avec lesdites appariements spécifiques des substances biologiques chargées avec leurs substances biologiques de reconnaissances complémentaires ; à l'exclusion :
 - (iii) des variations résultant d'éventuels effets de charges et/ou de transferts de charges provoqués par des réactions chimiques catalysées par des enzymes et dans lesquelles se produit une consommation d'une partie des substances à détecter ; et
 - 20 (iv) des variations de la photoréponse liées à l'apparition dans le milieu liquide conducteur d'au moins un produit traceur susceptible d'être révélé au travers de variations de pH ou de potentiel redox, et/ou au travers de marqueurs absorbant ou émettant des radiations ; et
- une identification et/ou un dosage des substances biologiques chargées dans le milieu liquide conducteur par l'interprétation des signaux reçus.

Un tel mode de mesure par transduction optoélectrochimique répond aux spécifications recherchées de simplicité, sensibilité, spécificité, fiabilité et

30 reproductibilité.

Par ailleurs, la technique selon l'invention présente également l'avantage

7c

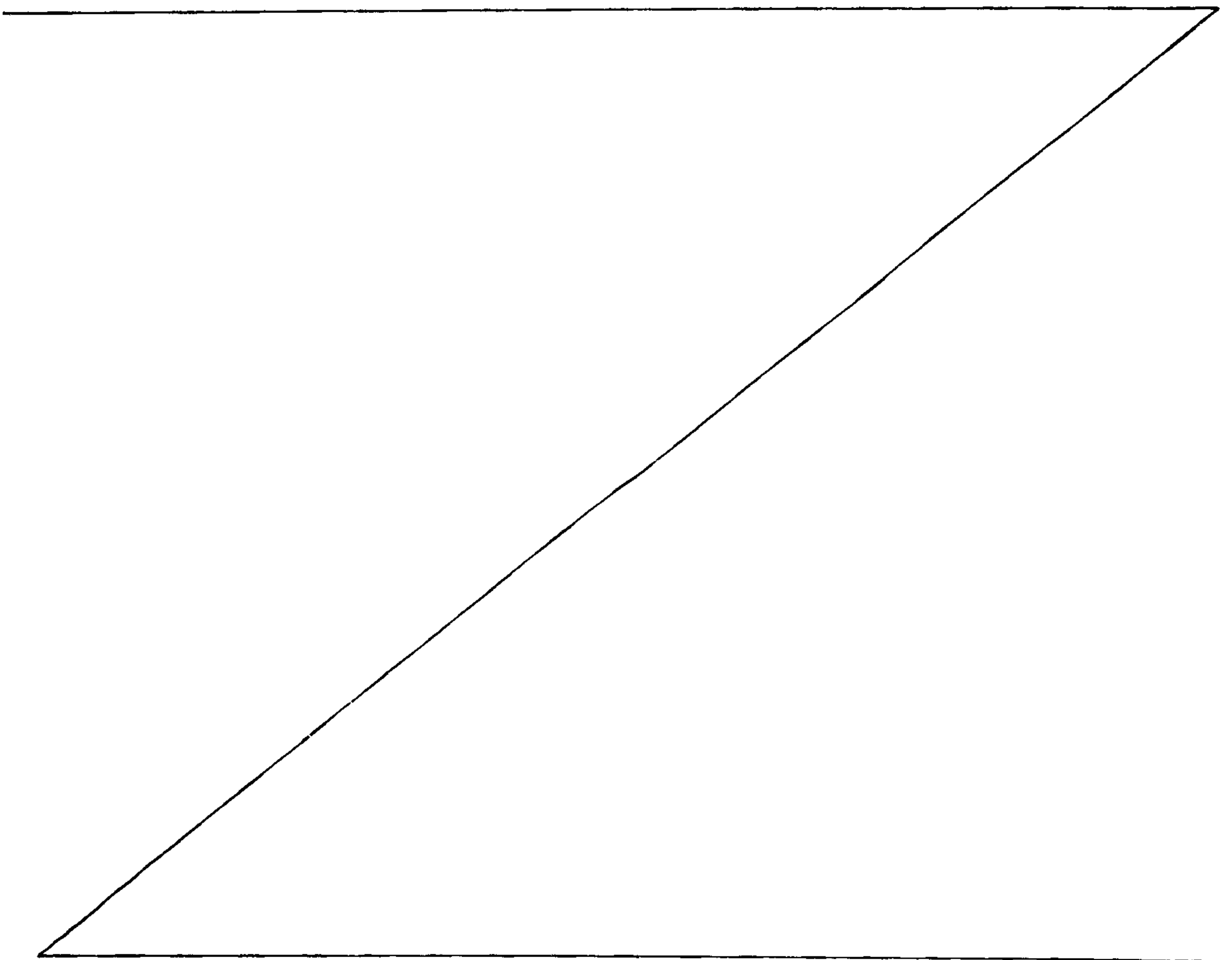
d'être réversible. En effet, on peut aisément réaliser le désappariement des espèces complémentaires ayant réagi spécifiquement au niveau de la membrane sensible de la structure semi-conductrice. La membrane sensible peut être ainsi régénérée après chaque utilisation et ce à de multiples reprises.

De tels résultats avantageux étaient, a priori, difficilement prévisibles.

10

En particulier, cette technique s'est révélée être d'une efficacité remarquable dans le cadre de la reconnaissance de séquences polynucléotidiques par hybridation des monobrins d'acides nucléiques (ligands), qui forment ces séquences, avec des monobrins polynucléotidiques complémentaires, immobilisés sur la couche d'isolant de la structure Sc/Is. Ainsi, selon un mode préféré de mise en oeuvre du procédé selon l'invention les SBC sont des polynucléotides PN et les SBR sont des polynucléotides PNc.

La présente invention permet d'envisager, notamment, la reconnaissance de séquences nucléotidiques, par exemple en vue de la détection de maladies génétiques, de la détection et la caractérisation de virus, de bactéries et de parasites ou pour l'établissement de cartes génétiques, l'étude de l'expression et/ou de la mutation des gènes.



Outre, l'hybridation nucléotidique, il est envisageable d'exploiter d'autres appariements spécifiques que sont par exemple, les mécanismes biochimiques de couplage immunologique, voire de complexation enzyme/substrat, pour peu que l'appariement entraîne une variation de charges électriques à la surface de Is.

5

EXPOSE DETAILLE DE L'INVENTION :

Le principe d'analyse qui gouverne le procédé selon l'invention est exclusivement optoélectrique ou optoélectrochimique. Cela signifie que l'on a à faire
10 à une reconnaissance biochimique affine, c'est-à-dire qui ne fait pas intervenir de réactions chimiques ou enzymatiques et qui se déroule sans production ou consommation d'espèces chimiques intermédiaires. En outre, la révélation de cette reconnaissance biochimique affine ne se fait pas au travers d'une détection indirecte à l'aide de moyens physicochimiques de révélation : traceurs colorés, fluorescents,
15 radioactifs, potentiels redox, pH. Conformément à l'invention, la reconnaissance biochimique s'opère essentiellement, voire exclusivement par une transduction optoélectronique soustendant la polarisation de la structure Sc/Is par rapport à LC, ainsi que l'éclairement périodique de ladite structure.

Au sens de l'invention, l'expression « électriquement chargées » signifie
20 que lors de l'interaction affine de la PN_c avec la PN, la charge électrique de surface est modifiée.

La première étape - a - du procédé selon l'invention consiste à mettre exclusivement en oeuvre des sondes So , en particulier des PN_c , non marqués, c'est-à-dire non porteurs de moyens de révélation physicochimiques (fluorescence,
25 colorimétrie, radioactivité, potentiel redox, pH).

Dans le cas d'une structure fonctionnalisée en surface par des sondes constituées par des monobrins polynucléotidiques PN_c par exemple d'ADN, l'hybridation de ces derniers avec les brins à doser ou à identifier dans le milieu LC entraîne un accroissement de charges sur la surface de la structure. Ceci conduit à une
30 modification de la répartition des porteurs de charge dans la zone de charge d'espace du semi-conducteur, afin de satisfaire au nouvel équilibre thermodynamique de la structure. Cette nouvelle répartition se traduit par une modification de la courbure des bandes du semi-conducteur dans sa zone interfaciale en contact avec le diélectrique. Le potentiel de bandes plates V_{bp} est le potentiel qu'il faut appliquer au semi-
35 conducteur par rapport au milieu LC (électrolyte) en contact avec le diélectrique Is pour obtenir une courbure nulle des bandes du Sc. Conformément à l'invention, on

mesure cette grandeur physique V_{bp} ou sa variation ΔV_{bp} , de manière à caractériser l'état d'équilibre de la structure. Ainsi, la modification de la charge de surface correspond à une variation de V_{bp} , qui est elle-même une signature de l'hybridation PN/PNc.

- 5 Pour qu'il y ait variation de la courbure de bandes du Sc et donc de V_{bp} , il convient conformément à l'étape b du procédé selon l'invention, de créer une courbure de bande initiale du Sc, en procédant à l'ajustement des niveaux de fermi du Sc et du milieu LC, de préférence par l'imposition d'une tension de polarisation V_p continue à la structure Sc/Is - PNc, par rapport au milieu LC.

- 10 Conformément à un premier mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, l'ajustement du niveau de Fermi du semi-conducteur Sc sensiblement à son niveau intrinsèque en surface, s'opère en imposant une tension de polarisation V_p au Sc par rapport au LC, selon un balayage entre une tension négative et une tension positive limites, choisies de telle sorte que le niveau de Fermi du Sc passe par son
15 niveau intrinsèque en surface, V_p évoluant ainsi avantageusement dans une gamme de tension correspondant au régime de désertion et de faible inversion du Sc.

Cette polarisation continue est associée, d'une part à l'éclairement périodique selon l'étape c et d'autre part, à une mesure des variations de V_{bp} suivant l'étape d. Cette mesure est effectuée comme suit :

- 20 ➤ recueil du photopotential (V_{ph}) aux bornes du Sc (entre Sc et LC) et/ou du photocourant (I_{ph})
➤ calcul des impédances optoélectrochimiques en phase Z_{op} et/ou en quadrature Z_{oq} pour chaque valeur de V_p ,
➤ réalisation de la (ou des) courbe(s) Z_{op} et/ou Z_{oq} et/ou V_{ph} et/ou
25 I_{ph} en fonction de V_p ,
➤ et suivi du déplacement de cette (ou ces) courbe(s) parallèlement à l'axe des abscisses (potentiels V_p), ledit déplacement correspondant aux variations de V_{bp} recherchées.

- Les impédances optoélectrochimiques Z_{op} et Z_{oq} permettent d'accéder aux
30 propriétés énergétiques de la structure Sc/Is-So ainsi que de sa zone interfaciale avec le LC, et notamment aux différents effets de charge pouvant intervenir aux interfaces. Ces impédances optoélectrochimiques Z_{op} et Z_{oq} sont liées au photopotential V_{ph} et au courant I_{hv} , générés suite à l'excitation lumineuse périodique du Sc, par ailleurs soumis à une polarisation continue. En effet, l'éclairement modulé - c - du Sc par des
35 photons d'énergie supérieure ou égale à la largeur de sa bande interdite, génère des paires électrons-trous, porteurs de charge. Ces derniers sont séparés sous l'effet du

champ électrique existant dans la zone de charge d'espace du semi-conducteur Sc (dans la zone en contact avec le diélectrique Is). Ce phénomène entraîne l'apparition de Ihv périodique dans le semi-conducteur Sc, ce qui conduit aux bornes de la structure Sc/Is-So à un photopotentiel Vph périodique ou à un photocourant Iph périodique.

Il est donc possible d'utiliser indifféremment Vph et/ou Iph et/ou les composantes impédimétriques Zop et/ou Zoq, en tant que paramètres de transduction des phénomènes énergétiques d'effet de charge, directement liés aux appariements auxquels on s'intéresse.

Dans le cas où la puissance de l'éclairement selon l'étape c est faible, les impédances optoélectrochimiques Zop et Zoq sont des fonctions de transfert reliant Vph à Ihv induit par l'éclairement modulé. Plus précisément, les impédances optoélectrochimiques Zop et Zoq de la région de la zone de charge d'espace du Sc sont directement proportionnelles aux valeurs efficaces des composantes en phase et en quadrature du Vph mesuré. Le coefficient de proportionnalité dépend de l'intensité ou de la puissance, de l'éclairement.

Le photopotentiel est donc l'image de l'impédance opto-électrochimique de la structure.

Dans cette variante, on préfère que l'éclairement soit non seulement faible mais également sensiblement sinusoïdal.

Dans le cas où l'éclairement mis en oeuvre à l'étape c est fort, on accède aux variations de Vbp, dans le cadre de l'étape d, de préférence :

- en recueillant Vph et/ou Iph,
- en établissant la courbe $Vph = f(Vp)$ et/ou $Iph = f(Vp)$,
- et en suivant le déplacement de cette (ou ces) courbe(s) parallèlement à l'axe des abscisses (potentiels Vp), ledit déplacement correspond aux ΔVbp recherchées.

En effet, à fort éclairement, si la charge de surface varie du fait de l'appariement des PN du LC avec les PNc des sondes So de la structure Sc/Is, il s'ensuit une modification du Vbp qui se traduit par un glissement de la courbe de la valeur efficace du photopotentiel Vph et/ou du photocourant Iph, parallèlement à l'axe des potentiels de polarisation de la structure.

Selon l'invention, les notions de faible et fort éclairement sont définies comme suit :

- le faible éclairement est un éclairement qui conduit à une perturbation du second ordre de la structure par rapport à l'équilibre thermodynamique dans

l'obscurité. Il est de préférence inférieur ou égal à $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ et préférentiellement à $1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

- le fort éclairement est un éclairement qui perturbe fortement l'équilibre thermodynamique de la structure dans l'obscurité. Il est de préférence supérieur à $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

Dans les variantes à faible et à fort éclairement évoquées ci-dessus, pour la description du premier mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, les calculs de Z_{op} et/ou Z_{oq} , le pilotage et l'acquisition des mesures, ainsi que le traçage des courbes Z_{op} et/ou Z_{oq} et/ou V_{ph} et/ou $I_{ph} = f(V_p)$, se font par l'intermédiaire d'un microordinateur, selon des procédures connues en soi (notamment calcul des impédances selon la loi d'Ohm).

Conformément à un deuxième mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on adopte la méthodologie suivante :

Δ dans l'étape b : on fixe le niveau de Fermi du Sc sensiblement au niveau intrinsèque en surface du Sc, en imposant une tension de polarisation V_{pi} correspondant environ à l'abscisse du point d'inflexion de la courbe $V_{ph} = f(V_p)$ ou $Z_{oq} = f(V_p)$ ou $I_{ph} = f(V_p)$, V_{ph} , Z_{oq} et I_{ph} étant tels que définis supra (p.9 l.4 à 7), de telle sorte que l'ordonnée de ce point d'inflexion corresponde environ à $V_{ph} \text{ max}/2$, $Z_{oq} \text{ max}/2$ ou $I_{ph} \text{ max}/2$;

Δ et dans l'étape d, on appréhende les variations ΔV_{bp} de V_{bp} :

(i) par la mesure de l'évolution de V_{ph} et/ou I_{ph} et/ou Z_{oq} , dans le cas où les variations ΔV_{bp} sont faibles et en considérant que V_{bp} varie linéairement avec V_{ph} , alors $\Delta V_{bp} = K \Delta V_{ph}$, où K représente la pente de la courbe $V_{ph} = f(V_p)$ au point d'inflexion ;

(ii) et/ou par la prise en compte des variations de la tension de polarisation ΔV_p , rendues nécessaires pour réguler et maintenir constant $V_{ph} \text{ max}/2$, $Z_{oq} \text{ max}/2$ ou $I_{ph} \text{ max}/2$, cet ajustement ΔV_p étant le reflet de ΔV_{bp} .

Il s'agit donc selon ce mode de mise en oeuvre de polariser la structure Sc/Is de telle sorte que le niveau de Fermi soit au voisinage de la position intrinsèque du semi-conducteur. Le potentiel imposé V_{pi} est voisin du potentiel correspondant au point d'inflexion de la courbe d'allure sigmoïdale du photopotential V_{ph} , du photocourant I_{ph} ou de l'impédance optoélectrochimique en quadrature Z_{oq} en fonction du potentiel de polarisation V_p .

Au sens de l'invention, on entend par « voisinage » du niveau de Fermi par rapport au niveau intrinsèque en surface du Sc, la position voisine du milieu de la bande interdite du semiconducteur à sa surface au contact de l'isolant Is, dans une plage telle que le semiconducteur se trouve en surface en situation de désertion ou
 5 faible inversion, de telle sorte que le photopotential V_{ph} , et/ou le photocourant I_{ph} , et/ou l'impédance optoélectrochimique en quadrature Z_{oq} varie beaucoup avec le potentiel de polarisation V_p .

Par suite, « V_{pi} correspondant environ au potentiel du point d'inflexion », doit s'entendre, selon l'invention, par une plage d'incertitude de $\pm 0,5$ Volt.

10 L'ordonnée du point d'inflexion de ces courbes V_{ph} , I_{ph} ou $Z_{oq} = f(V_p)$ est avantageusement choisie comme paramètre de référence à maintenir constant dans le cadre de cette régulation par ajustement de V_p . La référence est en pratique donnée par la valeur maximale qu'atteint V_{ph} , I_{ph} ou Z_{oq} dans chacune des courbes sigmoïdales caractéristiques.

15 V_{ph} max, I_{ph} max et Z_{oq} max correspondent en d'autres termes à la valeur maximale du photopotential, du photocourant et de l'impédance optoélectrochimique en quadrature, respectivement, lorsque le semi-conducteur est en régime de forte inversion.

20 Dans la mesure où la détermination de la valeur de consigne V_{pi} passe par la prise en compte de l'abscisse et de l'ordonnée du point d'inflexion d'au moins l'une des courbes V_{ph} ou Z_{oq} ou $I_{ph} = f(V_p)$, il est prévu dans ce deuxième mode de mise en oeuvre d'établir au moins l'une desdites courbes, de préférence comme décrit supra pour le premier mode de mise en oeuvre.

25 La variante (i) de l'étape d selon ce deuxième mode de mise en oeuvre consiste à suivre ΔV_{bp} par la mesure de la variation de V_{ph} , I_{ph} ou Z_{oq} , après calibration. Cela revient à établir la courbe V_{ph} et/ou I_{ph} et/ou $Z_{oq} = f(t)$ et de considérer que toute variation ΔV_{ph} , ΔI_{ph} ou ΔZ_{oq} correspond à une variation ΔV_{bp} . La variante (i) est utilisable dans le cas d'une variation modérée du V_{bp} permettant d'établir une relation simple (linéaire par exemple) entre ΔV_{ph} et ΔV_{bp} .

30 En pratique, on préfère recourir à la variante (ii) de l'étape d selon le deuxième mode de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention. Dans cette variante, on maintient V_{ph} max/2 constant en ajustant la polarisation V_p de la structure, de préférence par l'intermédiaire d'une régulation électronique. Le ΔV_p de régulation correspond au ΔV_{bp} que l'on cherche à mesurer.

Selon une disposition avantageuse de l'invention, la régulation électronique que l'on peut mettre en oeuvre dans le cadre de la variante (ii) de prise en compte de ΔV_p , s'effectue de la façon suivante :

- on détecte v_{ph} ,
- 5 - on amplifie éventuellement le signal v_{ph} ,
- on redresse éventuellement ce signal de manière à disposer d'un signal continu v'_{ph} ,
- on compare ce signal v'_{ph} continu à un signal de référence U correspondant sensiblement à la valeur de $v'_{ph} \max/2$ (ordonnée de point d'inflexion de la courbe $v'_{ph} = F(V_p)$ soit $v'_{ph} \max/2$),
- 10 - on recueille la différence $\Delta(v'_{ph}-U)$ entre v'_{ph} et U ,
- on amplifie éventuellement $\Delta(v'_{ph}-U)$,
- on applique $\Delta(v'_{ph}-U)$ éventuellement amplifiée entre Sc et LC en complément de V_p ,
- 15 - on enregistre $\Delta(v'_{ph}-U)$.

L'intérêt d'une telle procédure de régulation résulte du fait que le potentiel électriquement imposé est directement et linéairement l'image des variations de V_{bp} provoquées par les interactions à la surface du diélectrique Is . Il est donc indépendant des propriétés de la structure et permet d'obtenir une bonne sensibilité et

20 une excellente reproductibilité de mesure.

Selon la nomenclature adoptée dans le présent exposé, V_{ph} désigne aussi bien le photopotential primaire v_{ph} mesuré entre Sc et LC que v'_{ph} correspondant à v_{ph} redressé et éventuellement amplifié.

S'agissant de l'étape c d'éclairement, qui est commune aux deux modes

25 de mise en oeuvre évoqués ci-dessus, il y a lieu de préciser que ledit éclairement peut être effectué en regard de n'importe quelle zone des faces externes de la structure $Sc/Is-So$, y compris sur son épaisseur le cas échéant, voire sur la totalité de l'extérieur de cette structure.

En d'autres termes, l'éclairement périodique de la structure Sc/Is est donc effectué

30 soit en regard de la ou des faces externes du Sc , soit en regard de la ou des faces externes de l'isolant Is , soit en regard de toutes les faces externes de la structure.

Dé préférence, pour l'étape c, on choisit la longueur d'onde de l'éclairement λ de telle sorte qu'elle soit supérieure ou égale à $\lambda_0 = \frac{1240}{E(\text{énergie bande interdite})}$ nm, de

préférence comprise entre 100 et 3000 nm, E étant l'énergie de la bande interdite de

35 Sc exprimée en électron-volt.

Ce seuil λ_0 est fonction de la nature du semi conducteur.

Selon un troisième mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on peut éliminer radicalement les réponses non spécifiques, en mettant en oeuvre une mesure différentielle, selon laquelle, on fait intervenir dans le capteur d'affinité au moins une autre structure **Sc/Is** de référence, dans laquelle **Is** n'est pas fonctionnalisé par **So**, et en suivant la différence entre les **Vbp** mesurées par les 2 capteurs, ainsi que la variation de cette différence.

Dans ce troisième mode de mise en oeuvre la structure **Sc/Is-So** de mesure et la structure **Sc/Is** de référence sont mises au contact du même milieu **LC**. Elles sont polarisées de la même façon, de préférence au moyen d'une même contre-électrode, une électrode de référence n'étant pas nécessaire. Enfin, conformément à l'étape c, elles sont soumises à un même éclairage de lumière modulée.

Par ailleurs, les moyens d'interprétation des signaux recueillis mis en oeuvre dans l'étape d sont choisis de manière à permettre le suivi de la différence entre les potentiels de bande plate **Vbp0** et **Vbp1** propres aux deux structures **Sc/Is** et **Sc/Is-So**, respectivement.

Cette disposition permet d'obtenir une mesure très précise et en continu de la variation du **Vbp1** de la structure **Sc/Is-So** fonctionnalisé, en s'affranchissant des phénomènes parasites pouvant apparaître et qui sont liés à d'autres paramètres que l'appariement et, en particulier, que l'hybridation **PN/PNc**.

Un quatrième mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention est caractérisé, en ce que, dans une étape préalable **ao**, on fonctionnalise différentes zones de la surface d'une couche d'isolant **Is** d'une même structure **Sc/Is**, par plusieurs sondes **So** différentes de par la nature des **PNc** qui les composent, et on réalise ensuite à l'aide de cette structure l'analyse de **LC** contenant un ou différents substrats **PN** :

- par éclairagements successifs des zones de la surface de l'**Is**, lesdites zones étant chacune fonctionnalisée par une même **So** (**PNc** identiques), la nature des **So** variant d'une zone à l'autre,
- et par recueil et interprétation des ΔVbp .

Ce quatrième mode de mise en oeuvre correspond à la multidétection de substrats, en particulier de **PN**, de natures différentes, dans le domaine de la génétique. La multidétection selon l'invention permet d'accéder à des méthodes de détection simple et rapide de maladies virales et de maladies génétiques. Il est également envisageable de réaliser des vérifications de compatibilité tissulaire, de même que des cartographies de populations hétérogènes de polynucléotides, par exemple de génômes. Cela constitue en outre un outil pour l'étude de la mutation des gènes, de l'expression des gènes, ou du séquençage génomique.

L'intérêt de la multidétection selon ce quatrième mode de mise en oeuvre réside dans la simplicité méthodologique et structurelle du procédé et du dispositif correspondants.

De manière commune aux troisième et quatrième modes de mise en oeuvre évoqués ci-dessus, à savoir respectivement la mesure différentielle et la multidétection, il y a lieu de noter que l'étape de mesure directe ou indirecte de ΔV_{bp} peut être réalisée conformément à la procédure décrite pour le premier mode de mise en oeuvre dans l'une ou l'autre de ces variantes à faible ou à fort éclaircissement, de même que selon la procédure propre au deuxième mode de mise en oeuvre, quelle que soit la variante (i) ou (ii) retenue.

L'invention est une méthode de mesure fondée sur la reconnaissance de la variation du potentiel de bandes plates (ΔV_{bp}) d'une structure Sc/Is-So possédant une zone sensible faite de sondes So à base de substances biologiques de reconnaissance SBR (e.g. des PNc) aptes à réagir spécifiquement avec des substances biologiques électriquement chargées SBC (e.g. des PN) dans un milieu LC.

Avantageusement, les substrats à analyser sont des PN, de préférence choisis dans la liste suivante :

nucléotides, oligonucléotides, polynucléotides, acides nucléiques (ADN ou ARN) ainsi que les analogues et les mélanges desdits substrats.

Conformément à l'invention, les sondes So mises en oeuvre dans le procédé sont des moyens de reconnaissance spécifique, en particulier des PNc, non-marqués, c'est-à-dire non porteurs de moyens de révélation de l'appariement PN/PNc (fluorescence, colorimétrie, radioactivité).

Bien que l'on privilégie des substances biologiques du type séquence polynucléotidique (ARN, ADN, gène, plasmide ou tout autre matériel génétique), cela n'exclut pas pour autant d'autres substances biologiques du type antigène, haptène, anticorps ou, de manière générale, toute espèce d'un couple formé par une macromoléculaire biologique et son complément spécifique. Comme exemples de couples ou de paires d'appariement spécifique, on peut citer : antigène-anticorps, haptène-anticorps, ADNc/ADN, ARNc/ARN, poly dT-ARNm, eucaryote, lectineglycoconjugué, marqueur de cellules (ou de microorganismes)-cellules (ou microorganisme), HcG- récepteur tissulaire et T3 - TGB (thyroxin binding protein).

Le procédé selon l'invention passe tout d'abord par l'immobilisation d'au moins un type de ces espèces biologiques PNc réactives pour constituer la ou les

sondes **So**. Celle-ci peut se faire directement sur la couche isolante ou à l'aide d'un matériau intermédiaire (composés d'espacement par exemple), accolé à l'isolant **Is** et apte à recevoir par liaison physique (e.g. adsorption-absorption) et/ou chimique (e.g. liaison covalente), les ligands biologiques spécifiques **PNc**.

5 Selon l'invention, il est parfaitement envisageable de prévoir une des sondes **So** hétérospécifiques, formées d'espèces biologiques **PNc** de natures différentes, aptes à réagir avec leurs complémentaires.

Le milieu liquide conducteur **LC** utilisé peut être toute solution tampon compatible avec les substances biologiques considérées **PN**. Ce milieu liquide **LC**
10 possède avantageusement une conductivité équivalente à celle d'une solution aqueuse de **NaCl** ayant une concentration pouvant aller de 0,005M à 3M et préférentiellement de l'ordre de 0,1 M.

Le pH du milieu liquide peut être compris entre 0 et 12, de préférence entre 6 et 8 de façon à favoriser les appariements par bioaffinité. La stringence du milieu liquide peut
15 également être ajustée pour favoriser l'hybridation.

Les interactions non spécifiques, par échange d'ions ou par interactions hydrophobes, peuvent être supprimées en tout ou partie à l'aide de tampon de force ionique appropriée. (e.g. Tris-HCl/Tris-base).

Avantageusement, la température de mesure peut être comprise entre 0 et
20 50°C. Elle est contrôlée plus précisément de façon à favoriser les réactions biochimiques concernées.

La présente invention a également pour objet un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé tel que décrit supra, ledit dispositif étant caractérisé en ce qu'il comprend :

- 25 - au moins un capteur d'affinité formé par au moins une structure **Sc/Is-So** dans laquelle la ou les sondes **So** comprennent des ligands **SBR** aptes à s'hybrider spécifiquement avec les substances biologiques **SBC** à analyser, contenues dans le milieu liquide conducteur **LC**, en provoquant un phénomène d'effet de charge, à
30 l'origine des ΔV_{bp} du **Sc**,
- des moyens de polarisation du **Sc** par rapport au **LC**,
- des moyens d'éclairement du **Sc** du capteur,
- des moyens de mesure du photopotential V_{ph} ou du photocourant I_{ph} ,
- 35 - des moyens de transformation des signaux recueillis en variation de V_{bp} ,

- et des moyens de calcul et d'interprétation des ΔV_{bp} en termes d'identification et/ou de dosage des substances biologiques **SBC**.

Grossièrement, ce dispositif comprend donc

- d'une part une ou des structures multicouches semi-conductrices
5 simples, assimilables à des électrodes de mesure,
- de deuxième part, une source de lumière modulée pour l'éclairement de cette ou ces structures,
- et de troisième part, des périphériques électroniques de polarisation électrique, de mesure, de calcul et d'interprétation.

10 Les mesures du photopotentiel V_{ph} et/ou des impédances optoélectrochimiques en phase Z_{op} et/ou en quadrature Z_{oq} sont réalisées dans une configuration de circuit ouvert c'est-à-dire que le circuit de mesure doit comporter une très forte impédance de charge.

Les mesures de photocourant I_{ph} sont réalisées avantageusement dans une
15 configuration de circuit fermé (court-circuit).

Ces moyens techniques relèvent de technologies classiques et parfaitement maîtrisées par les hommes de l'art.

En outre, ce dispositif bénéficie d'un faible coût de revient. Il peut être produit aisément à l'échelle industrielle et offre une grande fiabilité et une bonne
20 reproductibilité de mesure.

De surcroît, le caractère déjà miniaturisé voire « miniaturisable » des capteurs d'affinité constituant le dispositif, ouvre des perspectives prometteuses notamment pour certaines applications in vivo ou in vitro.

De manière préférée, mais non limitative, l'électrode de mesure (c'est-à-
25 dire la structure multicouches **Sc/Is-So**) du capteur d'affinité du dispositif, est formée par au moins une plaquette de **Sc**, de préférence en silicium, recouverte sur l'une de ses faces d'au moins une couche **Is** d'isolant de préférence en silice, à la surface de laquelle sont fixées au moins une sonde **So** sensible comprenant au moins un ligand d'appariement biospécifique, de préférence des polynucléotides **PNc** de
30 reconnaissance spécifique par hybridation,

ce capteur comportant également au moins un contact ohmique permettant la connexion de la structure **Sc/Is-So**, notamment, avec les moyens de polarisation et/ou les moyens de mesure de V_{ph} .

Le dispositif comprend outre cette structure **Sc/Is-So**, au moins une
35 électrode auxiliaire, éventuellement prévue sur la couche **Is** de la Structure **Sc/Is-So**.

Avantageusement, la couche de matériau diélectrique bloquant Is est par exemple, une couche d'oxyde et/ou de nitrure ou tout autre matériau minéral ou organique de faible épaisseur, empêchant ou limitant les phénomènes faradiques.

Cette structure est associée à un milieu liquide conducteur contenant les substances SBC à doser à détecter ou à identifier LC.

En pratique, le silicium choisi à titre de semi-conducteur est du type n ou p moyennement dopé, de préférence à hauteur de 10^{15} à 10^{19} cm⁻³, de préférence 10^{16} cm⁻³. L'épaisseur de la plaquette de silicium est, par exemple, comprise entre 0,01 et 2 mm.

La couche isolante Is est avantageusement constituée de silice ou de nitrure de silicium. Elle a pour fonction d'annihiler d'éventuels processus faradiques qui pourraient perturber les mesures, par l'intermédiaire de signaux électriques parasites. Cette couche Is permet également d'éviter les difficultés liées à une possible corrosion du matériau semi-conducteur par le milieu conducteur LC en contact.

L'épaisseur de cette couche Is est comprise entre 1 et 500 nanomètres, de préférence entre 1 et 50, et plus préférentiellement encore est de l'ordre de 10 nanomètres.

La couche diélectrique Is supporte les sondes So PNc, lesquelles constituent ce qu'on pourrait dénommer membrane bio-réceptrice en contact avec le milieu LC.

DESCRIPTION DES FIGURES :

- La Figure 1 est une représentation schématique du dispositif d'analyse qualitative et/ou quantitative de substances biologiques, de préférence polynucléotidiques PN présent dans un milieu liquide conducteur LC, conforme à l'invention.

- Les Figures 2 et 3 sont des vues en coupe transversale droite, de variantes de réalisation du capteur d'affinité montré à la Figure 1.

- La Figure 4 représente le schéma du circuit électrique de mesure des impédances optoélectrochimiques Zop, Zoq du capteur d'affinité selon l'invention, conformément au premier mode de mise en oeuvre du procédé, dans sa variante faible éclaircissement.

- La Figure 5 représente le schéma synoptique d'une forme d'exécution particulière du dispositif de mesure selon l'invention correspondant à la variante ii de la deuxième forme de mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

- La **Figure 6** est une représentation schématique en coupe transversale droite d'une forme d'exécution du dispositif selon l'invention, à savoir le capteur différentiel correspondant au troisième mode de mise en oeuvre du procédé.

5 - La **Figure 7** annexée est un schéma de principe de la structure multicapteur $Sc/Is-So_1$ à So_n .

- La **figure 8** annexée montre les courbes Zop et $Zoq = F(Vp)$ obtenues.

- La **Figure 9** correspond aux courbes d'impédances obtenues à chaque étape d'élaboration d'une structure active fonctionnalisée pour la reconnaissance de brins simples d'ADN.

10 - La **Figure 10** est une courbe $Vph = F(Vp)$ obtenue à l'exemple 3 pour illustrer un premier mode de mise en oeuvre du procédé à fort éclaircissement.

- La **Figure 11** donne la réponse en ΔVp de la structure fonctionnalisée pour la détection d'oligonucléotides. Exemple 4 - 2ème mode de mise en oeuvre - variante (ii) -

15 ***

La présente invention sera comprise à la lumière de la description qui suit, d'exemples de réalisation du dispositif et de mise en oeuvre du procédé qu'elle concerne, en référence aux dessins annexés. Ces illustrations non limitatives font ressortir de nombreux avantages et variantes de l'invention.

20 ***

La **Figure 1** montre le dispositif selon l'invention qui comprend un capteur d'affinité 1 formé par une structure 7 $Sc/Is-So$ au contact, par sa face supportant les So , avec un milieu liquide conducteur LC, désigné par la référence 2. Ce dispositif
25 comporte également des moyens de polarisation 3, des moyens d'éclaircissement 4, des moyens 5 de mesure de Vph , et une unité 6 de calcul et de commande comprenant des moyens de transformation des signaux recueillis en variation de Vbp et des moyens de calcul et d'interprétation des ΔVbp en terme d'identification et/ou de dosage des substances biologiques électriquement chargées à analyser, également désignées **SBC**.

30 Le capteur d'affinité 1 est constitué par une structure 7 $Sc/Is-So$, elle-même formée par une plaquette Sc de silicium 7.1, une couche d'isolant Is en silice 7.2 et des sondes So désignées par la référence 7.3, fixées sur la surface de l'isolant Is 7.2 pour fonctionnaliser cette dernière. Selon une variante, on peut déposer éventuellement à la surface, une couche fonctionnelle permettant de mieux accrocher les sondes So . Le
35 capteur d'affinité 1 est pourvu sur sa face externe opposée à celle porteuse des sondes So 7.3, d'un contact ohmique 8 relié aux moyens de polarisation 3. Le contact

ohmique 8 est isolé du milieu LC 2 par l'intermédiaire d'un joint 8₁ périphérique. Ce dernier coopère par contact étanche avec un support isolant 8₂ sur lequel repose en somme le capteur 1. Avantageusement, ces sondes sont constituées par des Substances Biologiques de Reconnaissance spécifique (SBR) des SBC. Dans le

5 présent exemple, les SBC et les SBR sont des polynucléotides PN et PNC.

Une électrode de référence 9 et une contre-électrode 10 baignent également au sein du milieu 2 conducteur LC avec le capteur d'affinité 1. Ces deux électrodes 9 et 10 sont connectées aux moyens de polarisation 3.

Conformément à une caractéristique préférée de l'invention, une résistance de charge

10 élevée est prévue dans le circuit potentiostatique de mesure. Avantageusement, cette résistance élevée R_L est insérée dans la connexion reliant la contre-électrode aux moyens de polarisation 3. En pratique, la résistance R_L est préférablement supérieure à 100 k Ω , de préférence 50 M Ω et plus préférentiellement encore est de l'ordre de 100 M Ω .

15 Les Figures 2 et 3 montrent chacune une variante de réalisation du capteur d'affinité 1 dans laquelle la structure 7 constitue le fond d'une cellule de mesure comprenant des parois 1₁ et un joint 1₂ assurant l'étanchéité entre le fond 7 et lesdites parois 1₁.

Les éléments communs aux Figures 1 à 3 sont désignés par les mêmes

20 références.

La variante de la Figure 2 se distingue de celle de la Figure 3 en ce que la zone sensible comprenant les sondes So 7₃ est délimitée dans la première alors qu'elle ne l'est pas dans la seconde (toute la surface de l'IS comporte des sondes So 7₃).

Les moyens de polarisation 3 du dispositif selon l'invention sont, de préférence,

25 constitués par un potentiostat adapté, ayant par exemple une forte constante de temps (supérieure à 1 s). Il permet la polarisation de la structure tout en ne perturbant pas le photopotentiel V_{ph}.

Dans l'exemple montré sur le schéma synoptique de la Fig. 1, qui correspond à une réalisation préférée de l'invention, les moyens d'éclairement 4 comportent au moins

30 une source de lumière, en l'occurrence une, disposée

- soit en regard de la membrane bioréceptrice 7.3. formée par les sondes So fixées sur l'isolant Is 7.2,

- soit en regard de la face du Sc 7.1 opposée à la face 7.3. porteuse du contact ohmique 8 (hypothèse symbolisée par des pointillés sur le schéma de la

35 Figure 1),

- soit en regard de tout ou partie de l'extérieur de la structure 7.

Cette source lumineuse 4 est, par exemple, constituée par un laser tel qu'un laser hélium-néon ayant une longueur d'onde d'émission égale = 632,8 nm.

Avantageusement, le faisceau lumineux traverse un modulateur acousto-optique (non représenté sur Fig.1) dont le contrôleur est piloté par un générateur basse fréquence, désigné par la référence 4.1 sur la Fig.1.

Un filtre non représenté permet d'ajuster la puissance lumineuse à des valeurs inférieures, égales ou supérieures, au seuil déterminant les plages de faible éclaircissement et de fort éclaircissement. De préférence, la puissance lumineuse est de l'ordre ou inférieure ou égale à $1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ pour les conditions de faible éclaircissement et supérieure à $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ pour le fort éclaircissement.

Les moyens 5 de mesure de V_{ph} sont, en pratique, constitués, par exemple, par un adaptateur d'impédance présentant une impédance d'entrée comprise entre $10^8 \Omega$ et $10^{12} \Omega$, plus préférentiellement de l'ordre de $10^{10} \Omega$.

Les moyens de mesure 5 comprennent également un organe de détection synchrone piloté par le générateur basse fréquence 4.1. qui, on l'a vu ci-dessus, détermine par ailleurs, la modulation de l'éclaircissement. Cet organe de détection synchrone donne les composantes en phase et en quadrature de V_{ph} .

Le micro-ordinateur 6 comprend les moyens de transformation des signaux recueillis en variation de V_{bp} ainsi que les moyens de calcul et d'interprétation ΔV_{bp} , en termes d'identification et/ou de dosage des substances biologiques en l'occurrence des polynucléotides PN.

Le schéma du circuit électrique de mesure est représenté sur la Fig. 4.

Dans la variante à faible éclaircissement, les impédances optoélectrochimiques Z_{op} et Z_{oq} sont les fonctions de transfert reliant V_{ph} à l'intensité de l'éclaircissement.

Comme le montre la Fig. 4, l'effet de l'éclaircissement peut être représenté par un générateur de courant en parallèle avec la région de charge d'espace dont l'impédance, notée Z_{sc} , inclut les paramètres liés à la surface. Z_d , est l'impédance du diélectrique. Elle peut être représentée par une capacitance pure. R_{e1} et R_{e2} sont les impédances de la solution électrolytique, respectivement, entre l'électrode de travail et l'électrode de référence, et entre l'électrode de référence et la contre-électrode. Z_p est la résistance interne du potentiostat. R_L est la résistance de charge introduite dans le circuit potentiostatique de mesure. Son rôle est de conférer au circuit de mesure les propriétés de circuit quasi ouvert vis-à-vis du photopotential, tout en permettant la polarisation de la structure ; sa valeur doit donc être suffisamment élevée par rapport aux autres impédances intervenant dans la mesure. V_{ph} est le photopotential mesuré et V_i est le photopotential qui apparaît aux bornes du semi-conducteur. D'après le

schéma électrique, le courant total I_{hv} généré par l'éclairement a deux composantes : I_1 qui traverse le semiconducteur et I_2 qui circule dans le circuit de mesure. On peut alors écrire les relations suivantes :

$$I_{hv} = I_1 + I_2 = (V_1 / Z_{sc}) + (V_1 / (R_L + R_{e1} + R_{e2} + Z_d + Z_p))$$

- 5 si $R_L \gg R_{e1} + R_{e2} + Z_d + Z_p$ alors : $V_{ph} = V_1$ et $I_{hv} = (V_{ph} / Z_{sc}) + (V_{ph} / R_L)$
d'où $Z_{sc} = V_{ph} / I_{hv}$.

Ainsi, les impédances optoélectrochimiques en phase et en quadrature de la région de la zone de charge d'espace du semi-conducteur sont directement proportionnelles aux composantes du photopotential mesuré : le coefficient de proportionnalité dépend de l'intensité de l'éclairement.

La mesure des impédances optoélectrochimiques peut donc être utilisée pour la détection du processus d'appariement, en particulier d'hybridation de **PN/PNc**, lequel processus étant le reflet quantitatif et qualitatif des **SBC (PN)** à analyser.

15 Les **Exemples 1 et 2** ci-après illustrent la *variante faible éclairement* du *premier mode* de mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

S'agissant de la *variante fort éclairement* de ce premier mode, il consiste à accéder aux variations du potentiel de bande plate V_{bp} du **Sc**, consécutives au phénomène de reconnaissance biologique, par l'intermédiaire de la valeur efficace de V_{ph} (ou selon une variante de I_{ph}). Dans ce cas, l'éclairement modulé - de préférence à basse fréquence - utilisable n'est pas nécessairement sinusoïdal, mais peut être simplement périodique. Ainsi, dans le dispositif de la **Figure 1**, si la charge de surface varie avec la présence de l'espèce cible **PN** dans le milieu **LC** désigné par la référence **2**, cela entraîne un ΔV_{bp} , qui se traduit par un glissement de la courbe de la valeur efficace de V_{ph} , parallèlement à l'axe des potentiels de polarisation de la structure.

25 L'**exemple 3** ci-après illustre cette *variante fort éclairement* du **premier mode** de mise en oeuvre du procédé de l'invention, à l'aide du dispositif adapté.

Selon le **deuxième mode** de mise en oeuvre du procédé de l'invention, on polarise la structure **Sc/Is-So**, de telle sorte que le niveau de fermi du **Sc** soit au voisinage de la position intrinsèque en surface du **Sc**. Le potentiel V_p alors imposé est voisin du potentiel correspondant au point d'inflexion de la courbe d'allure sigmoïdale de la valeur efficace de V_{ph} , de I_{ph} ou de Z_{oq} .

La mesure de la variation de la valeur efficace de V_{ph} de I_{ph} ou de Z_{oq} après calibration, permet d'accéder au ΔV_{bp} .

Selon la *variante (ii)*, on ajuste la valeur efficace de V_{ph} à une valeur proche de sa valeur $\frac{V_{ph.max}}{2} = V_{phi}$ en jouant sur la polarisation continue initiale, qui sera une valeur de consigne V_{pi} . On maintient ensuite constante la valeur efficace

de V_{phi} , I_{phi} ou de Z_{oqi} , en ajustant V_p par rapport à la valeur de consigne V_{pi} de la structure, au moyen d'une régulation électronique. Cet ajustement de la polarisation est directement l'image de ΔV_{bp} . Les valeurs efficaces de V_{ph} , de I_{ph} et de Z_{oq} sont respectivement $\frac{V_{ph.max}}{2}$, $\frac{I_{ph.max}}{2}$, $\frac{Z_{oq.max}}{2}$. Elles représentent chacune

5 sensiblement l'ordonnée du point d'inflexion de la courbe correspondante.

L'exemple 4 illustre le deuxième mode de mise en oeuvre sans fort éclairnement dans la variante (ii).

Pour la mise en oeuvre de cette variante (ii), on a recours à une forme particulière d'exécution du dispositif selon l'invention caractérisé en ce qu'il comprend des
10 moyens d'évaluation de la variation du signal V_{ph} ou I_{ph} , ou Z_{oq} par rapport à une référence U imposée par une polarisation V_p se surajoutant à l'éclairnement ainsi que des moyens de correction et de régulation de la variation par action sur les moyens de polarisation.

La Figure 5 annexée présente le schéma synoptique d'un exemple de cette forme
15 particulière d'exécution du dispositif selon l'invention. Dans cet exemple, on choisit V_{ph} comme signal traceur.

Comme le montre cette Figure 5, dans laquelle les éléments communs avec ceux de la Figure 1, sont repérés par les mêmes références, le photopotential v_{ph} est détecté aux bornes du capteur d'affinité 1 (cellule de mesure) au moyen d'un adaptateur
20 d'impédance 14 présentant une forte impédance d'entrée de manière à ne pas perturber la structure. Le signal est ensuite amplifié au moyen d'un amplificateur alternatif basse fréquence 15, transformé en un signal continu v'_{ph} grâce à une détection synchrone 5 et à un circuit RC 16 qui permet de diminuer le bruit et de stabiliser la régulation.

25 Le signal continu v'_{ph} est amplifié au moyen d'un amplificateur continu 17, de gain G_{17} . G_1 est le gain de l'ensemble amplificateurs 15 et 17 et détection synchrone 5. Le signal continu v'_{ph} amplifié est ensuite comparé à un signal de référence U à l'aide d'un amplificateur différentiel 18. U est ajusté à la valeur de V_{pi} qui donne au photopotential une valeur moitié du photopotential correspondant à la forte inversion
30 ($V_{ph.max}/2$). La différence de valeur résiduelle $\Delta(v'_{ph}-U)$ de ces deux signaux est amplifiée par l'amplificateur différentiel 18 de gain G_2 et la tension de sortie $\Delta(v'_{ph}-U)$ est appliquée à la structure 1 en même temps que la polarisation continue V_p imposée par un générateur de tension 19 couplé à un sommateur 20. Un générateur de signal basse fréquence 4.1. (BF) permet, après amplification à l'aide d'un
35 amplificateur 2.1., de commander la diode 4 dont le faisceau excite la structure 1 et également de référencer la détection synchrone 5. Le microordinateur 6, qui est

notamment relié à un organe 22 d'acquisition de la variable $\Delta(v'_{ph}-U)$, permet de suivre et d'enregistrer la variation de polarisation de la structure ΔV_p occasionnée par la variation du potentiel de bandes plates (ΔV_{bp}).

5 L'intérêt d'un tel montage est que le potentiel électroniquement imposé est directement et linéairement l'image des variations du potentiel de bandes plates V_{bp} , provoquées par les interactions à la surface du diélectrique. Il est donc indépendant des propriétés de la structure et permet d'obtenir une bonne sensibilité et une excellente reproductibilité.

La cellule (capteur) est semblable à celle décrite supra en référence à la Figure 1.

10 La mesure du photopotential étant réalisée au moyen d'un circuit de mesure possédant une forte impédance d'entrée, il est possible d'admettre un contact ohmique de médiocre qualité. Pour mesurer le photopotential du semiconducteur par rapport à la solution, une électrode possédant un potentiel constant par rapport à la solution est nécessaire. Cependant, du fait de la forte impédance du circuit de mesure,
15 il est possible d'utiliser une pseudo-électrode de référence constituée par un métal noble tel que le platine, par exemple. L'électrode peut être indépendante ou être réalisée par dépôt, sous forme d'une grille ou d'un anneau externe, sur la surface du diélectrique de façon à satisfaire à la miniaturisation du capteur.

L'éclairement de la structure peut être obtenu au moyen d'une diode laser ou d'une
20 diode électroluminescente émettant dans le domaine de longueur d'onde du visible ou du très proche infra-rouge, entre 400 et 1000 nm avec une puissance lumineuse de l'ordre de 0,1 à 100 $\mu W/cm^2$. Il est tout à fait technologiquement concevable d'envisager l'éclairement de la structure par la face arrière et même d'intégrer au capteur la partie génératrice de la lumière. Ces possibilités techniques permettraient de
25 disposer d'un capteur de très faibles dimensions, dont seule la face avant serait au contact de la solution et qui serait ainsi, de part la nature des matériaux qui la composent, très peu sensible à l'agression chimique.

Il est tout à fait possible d'utiliser comme signal traceur I_{ph} . Dans ce cas, l'adaptateur d'impédance 14 est remplacé par un convertisseur courant/tension.

30 Les formes d'exécution du dispositif selon l'invention représentées aux Fig. 1 et 5 décrites supra sont dénommées arbitrairement GENOPTEL.

Conformément à une autre forme d'exécution du dispositif selon l'invention, correspondant au **troisième mode** de mise en oeuvre du procédé, ledit dispositif est caractérisé en ce que le capteur d'affinité comprend au moins une
35 structure **Sc/Is-So** et au moins une structure de référence **Sc/Is** non fonctionnalisée par **So**, de manière à pouvoir réaliser une mesure différentielle.

Cette forme d'exécution que l'on appellera DIGENOPT est représentée à la **Figure 6**. Elle correspond au cas où l'on a un capteur d'affinité **1** ou cellule de mesure comprenant avantageusement deux structures **Sc/Is 31** et **32** quasi identiques, l'une étant fonctionnalisée par **So**, l'autre non. Ces deux structures (ou électrodes) sont
 5 mises en contact avec le même milieu **2 LC** et sont polarisées au moyen d'une même contre-électrode **33**. Une électrode de référence n'est pas nécessaire. Elles sont éclairées de manière identique par une lumière modulée fournie par une diode **4**. L'acheminement de la lumière vers le milieu **LC 2** se fait par l'intermédiaire d'un conducteur optique **34**, ménagé au travers du corps **35** du capteur **1**.

10 Les deux structures **Sc/Is 31** et **32** (électrodes) sont montées chacune à la pointe d'un élément **36** vissable dans le corps **35** du capteur **1**.

Le corps **35** comprend une cavité fermée latéralement par les électrodes **31** et **32**, contenant le milieu **LC - 2 -**.

Des joints **37** sont prévus pour assurer l'étanchéité entre les différentes parois. La
 15 paroi du dessus recoît les moyens d'éclairage **4** et **34**. Le fond est traversé par la contre-électrode **33**. Les périphériques électroniques adaptés permettent de suivre la différence de leur V_{bp} respectif = $V_{bp1} - V_{bp0}$.

On terminera l'illustration non limitative du dispositif de l'invention, en décrivant une dernière forme d'exécution, mais non la moindre, qui est celle selon
 20 laquelle le dispositif est caractérisé en ce que le capteur d'affinité comprend au moins une structure **Sc/Is-So**, dans laquelle les sondes **So** sont de différentes natures, les sondes **So** de même nature étant regroupées dans une même zone de la couche d'**Is**, chaque zone étant circonscrite par rapport aux autres de manière à pouvoir être éclairée séparément partiellement ou en totalité par les moyens d'éclairage.

25 Cette forme d'exécution arbitrairement désignée par l'expression **GENMAP**, a été rendue possible en raison du fait que le principe de la mesure selon l'invention est telle que le photopotential et/ou le photocourant dépend du flux de lumière mais est pratiquement indépendant de l'aire de la surface éclairée. Il est donc ainsi envisageable de réaliser sur la même structure **Sc/Is** des régions différemment fonctionnalisées qui
 30 répondent de manière spécifique à différentes espèces cibles (e.g. PN_1 à PN_n), la lecture de l'appariement ou de l'hybridation étant effectué au moyen d'un faisceau lumineux par scrutation successive ou de manière simultanée par plusieurs faisceaux lumineux.

Une telle structure **Sc/Is** est assimilable à un multicapteur biologique donnant accès à
 35 la multidétection.

Les différentes zones de la surface de l'Is peuvent être délimitées ou non physiquement.

La lecture multizone par les moyens d'éclairement permet d'accéder au potentiel de bande plate local de chaque zone fonctionnalisée spécifiquement :

- 5 - soit par mesure de l'impédance optoélectrochimique selon le premier mode de mise en oeuvre - variante faible ou fort éclairage,
- soit par mesure de la valeur efficace de V_{ph} -variante (i) du deuxième mode de mise en oeuvre,
- soit par prise en compte des variations de V_p permettant la régulation et
- 10 le maintien de V_{ph} à une valeur proche de sa valeur moyenne (variante ii du deuxième mode de mise en oeuvre).

En d'autres termes, l'acquisition de V_{bp} peut s'effectuer selon l'un quelconque des modes de mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

- 15 La **Figure 7** annexée est un schéma de principe de la structure multicapteur $Sc/Is-So_1$ à So_n . On a repris les mêmes références que sur la **Figure 1** pour désigner les moyens d'éclairement 4, les sondes So_1 à So_n repérées par la référence 7.3, la couche Is 7.2. et la plaquette de semi-conducteur Sc référencée par 7.1. On retrouve également le contact ohmique 8.

20 **APPLICATION INDUSTRIELLE :**

- 25 Ce type de dispositif ouvre la voie des applications nombreuses et variées dans le domaine de la génétique : détection de maladies virales, et de maladies génétiques, vérification de la compatibilité cellulaire, réalisation de cartes de génomes, expression ou mutation de gènes etc.

L'intérêt de ce dispositif comparativement aux autres dispositifs utilisés pour la multidétection, réside dans sa simplicité de réalisation et dans la simplicité du mode de lecture associé à la reconnaissance directe du processus d'hybridation.

- 30 Selon un autre de ces aspects, l'invention concerne également les capteurs d'affinité, c'est-à-dire les structures $Sc/Is-So$ de mesure et Sc/Is de référence, telles que décrites supra.

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention et de faire ressortir tous ses avantages et ses variantes, tant sur le plan du procédé que sur celui du dispositif.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : MESURE DES IMPEDANCES OPTOELECTROCHIMIQUES A L'AIDE DU DISPOSITIF DE L'INVENTION COMPRENANT UNE STRUCTURE Sc/Is ELEMENT DE BASE DU BIOCAPTEUR

5 *1.1. APPAREILLAGE*

Le dispositif mis en oeuvre dans cet exemple correspond à celui représenté à la Fig.1.

La structure Sc/Is comprend :

10 - un semiconducteur ayant une épaisseur de 0,03mm est du Silicium dopé p à hauteur d'environ 10^{15} cm^{-3} , avec en face arrière une couche Au/Cr assurant le contact ohmique.

- et un isolant Is est de la silice d'une épaisseur de 10 nm obtenue par oxydation thermique.

1.2. MILIEU LIQUIDE LC : SOLUTION TAMPON TRIS IM.

15 Cette solution tampon de pH 7.1 est composée de 10 mM TrisHCl (Sigma) et 50 mM NaCl.

1.3. LES CONDITIONS EXPERIMENTALES SONT LES SUIVANTES :

la fréquence des modulations de la lumière est de 316 Hertz.

20 La source lumineuse est un laser hélium-néon émettant un éclairage de longueur d'onde $\lambda = 632,8 \text{ nm}$.

La puissance lumineuse est de $0,6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$

1.4. RESULTATS

25 La **figure 8** annexée montre les courbes d'impédances optoélectrochimiques Z_{op} et Z_{oq} en fonction de V_p obtenues pour la structure décrite précédemment.

30 Dans le domaine de polarisation négative, l'impédance en quadrature est due à la capacité de la zone de charge d'espace du semi-conducteur, celle-ci est directement liée au dopage du semiconducteur. Dans le domaine de polarisation positive, l'impédance en quadrature est très faible car le semi-conducteur est en situation d'accumulation et la capacité de la zone de charge d'espace est très élevée. Dans le domaine de polarisation intermédiaire, le semiconducteur passe successivement de la situation d'inversion, à la désertion, puis à l'accumulation, lorsque la polarisation augmente. L'impédance en phase présente un pic dans le domaine intermédiaire. Ce pic est dû à la présence d'états d'interface situés entre le

35 semiconducteur et la couche d'oxyde. Ainsi, les impédances optoélectrochimiques donnent les informations énergétiques sur le semi-conducteur et sur les états de

surface du semiconducteur mais ne donne pas d'informations sur la couche diélectrique. Cependant, elles permettent de déterminer le potentiel de bandes plates du semiconducteur. La valeur du potentiel de bandes plates est corrélée à la position de la courbe d'impédance en quadrature par rapport à l'axe des potentiels. C'est le paramètre qui permet de caractériser la charge de surface de la structure.

EXEMPLE 2 : APPLICATION DES MESURES D'IMPEDANCES SELON L'EXEMPLE A LA DETECTION BIOLOGIQUE : PN = ADN (OLIGO dT) 1ER MODE DE MISE EN OEUVRE-VARIANTE FAIBLE ECLAIREMENT

2.1. LE DISPOSITIF

Le dispositif utilisé, y compris la structure Sc/Is et le milieu conducteur LC, sont les mêmes qu'à l'exemple 1, à la différence près que la structure Sc/Is est fonctionnalisée par des sondes So constituées par des nucléotides PNc complémentaires à des espèces cibles PN contenues dans LC.

2.2. FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DE L'ISOLANT IS PAR DES SONDES SO CONSTITUES PAR DES OLIGONUCLEOTIDES dT DE 20 BASES

Après hydroxylation de la surface de Si/So₂, on dépose une couche polymérique d'APTS (AminoPropylTriéthoxySilane). Les brins d'oligonucléotides (dT) sont greffés sur la surface par bromation : cette méthode permet de fixer à l'APTS le nucléotide sans utiliser les sites intervenant dans l'hybridation. Enfin l'hybridation est obtenue après avoir laissé la structure au contact d'une solution contenant des brins complémentaires poly (dA) à ceux fixés sur la surface.

2.3. RESULTATS

La Figure 9 correspond aux courbes d'impédances obtenues à chaque étape d'élaboration d'une structure active fonctionnalisée pour la reconnaissance de brins simples d'ADN.

Les courbes de la Figure 9 montrent le déplacement lié à l'hybridation des brins complémentaires PNc /PN d'ADN.

EXEMPLE 3 : ANALYSE DE POLYNUCLEOTIDES (PN) A L'AIDE DU DISPOSITIF SELON L'INVENTION (FIG 1) - 1ER MODE DE MISE EN OEUVRE DU PROCEDE - VARIANTE FORT ECLAIREMENT

La Fig. 10 représente la courbe $V_{ph} = f(V_p)$ GENOPTRODE

EXEMPLE 4 : ANALYSE DE POLYNUCLEOTIDES (PN) A L'AIDE D'UNE VARIANTE DU DISPOSITIF SELON L'INVENTION (FIGURE 5), SELON LE DEUXIEME MODE DE MISE EN OEUVRE DU PROCEDE - VARIANTE (ii)

4.1. LE DISPOSITIF

5 Le dispositif utilisé est celui décrit en **Figure 5**. La cellule de mesure et le capteur d'affinité sont ceux représentés sur la **Figure 2**. La lumière modulée est fournie au moyen d'une diode électroluminescente ; la puissance lumineuse utilisée est de 10 mW/cm².

4.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES ET FONCTIONNALISATION

10 Le liquide conducteur LC est une solution aqueuse de 10 mM tris(hydromethyl)aminomethane hydrochloride (Sigma) et 50 mM NaCl ; l'ensemble de la solution est à pH 7.1. La mesure est faite à température ambiante, soit 22° C, dans l'obscurité.

La structure Sc/Is-So est telle que décrite dans les exemples précédents.

15 Dans cet exemple, les sondes sont des PNc, et plus précisément des oligos dT de 20 bases, déposées sur la zone comme représenté en 7.3 de la figure 2 à partir d'une solution composée de 20 µl de solution aqueuse de n-bromosuccinimide en concentration de 0,01 M ajoutée à 1 ml de solution aqueuse 1M NaHCO₃ contenant des oligos (dT)₂₀ en concentration de 1mg/ml. La structure est laissée une nuit en

20 contact avec la solution des Pnc, puis abondamment rincée avec le liquide LC, puis montée sur la cellule de mesure. Cette cellule est alors remplie de LC et la chaîne de mesure initialisée.

4.3 RESULTATS

La **Figure 11** donne la réponse en ΔV_p au cours du temps de la structure fonctionnalisée Sc/Is-So où les sondes sont des oligo dT.

25

La courbe A correspond à la réponse obtenue lorsque le capteur est en contact avec une solution LC à laquelle on a ajouté des cibles (polynucléotides dC en concentration de 1µg/ml) non complémentaire aux sondes fixées sur le capteur.

La courbe B correspond à la réponse obtenue lorsque le capteur est en

30 contact avec une solution LC à laquelle on a ajouté des cibles (polynucléotides dA en concentration de 1 µg/ml) complémentaires aux sondes fixées sur le capteur.

REVENDICATIONS

1. Un dispositif d'identification et/ou de dosage de substances biologiques présentes dans un milieu liquide conducteur, comprenant :

- une chambre pour le milieu liquide conducteur ;
- un capteur d'affinité disposé dans ladite chambre ; ledit capteur d'affinité comprenant :

- un matériau semi-conducteur ayant une surface inférieure et une surface supérieure ;
- 10 • ledit matériau semi-conducteur ayant un contact ohmique disposé sur la surface inférieure ;
- une couche d'isolant disposée sur la surface supérieure dudit matériau semi-conducteur ;
- une pluralité de sondes en contact avec ledit milieu liquide conducteur ;
- ladite pluralité de sondes étant disposée sur la surface de ladite couche d'isolant ;
- 20 • ladite pluralité de sondes comprenant une substance biologique de reconnaissance qui est capable de s'hybrider spécifiquement avec une substance biologique chargée, présente dans le milieu liquide conducteur, où des appariements spécifiques des substances biologiques chargées avec leurs substances biologiques de reconnaissance complémentaires sont formés, lesdits appariements spécifiques modifiant la charge électrique de la surface du capteur d'affinité ;
- des moyens de polarisation du matériau semi-conducteur par rapport au liquide conducteur ;
- des moyens d'éclairement du matériau semi-conducteur ;
- des moyens de mesure du photopotential V_{ph} aux bornes du capteur d'affinité ;
- 30

- des moyens de transformation des signaux détectés en variations de potentiel de bande plate V_{fb} qui sont induits par un phénomène d'effet de charge associé avec lesdits appariements modifiant la charge électrique de la surface du capteur d'affinité ; et
- des moyens de calcul et d'interprétation des ΔV_{fb} en termes d'identification et/ou de dosage des substances biologiques chargées.

2. Le dispositif selon la revendication 1, dans lequel ledit matériau semi-conducteur est un matériau semi-conducteur en silicium.

10 3. Le dispositif selon la revendication 1 ou 2, dans lequel ladite couche d'isolant est une couche d'isolant en silice ou en nitrure de silicium.

4. Le dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel ladite substance biologique de reconnaissance est un polynucléotide.

5. Le dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant en outre une électrode auxiliaire.

6. Le dispositif selon la revendication 5, dans lequel ladite électrode auxiliaire est disposée sur la couche d'isolant.

20 7. Le dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comprenant des moyens d'évaluation de la variation dans le signal V_{ph} par rapport à une référence U, ainsi que des moyens de correction de cette variation dans le signal V_{ph} par action sur les moyens de polarisation.

8. Le dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, comprenant en outre une structure de référence non fonctionnalisée par une sonde ou par des sondes.

9. Le dispositif selon la revendication 1, dans lequel les sondes sont de différents types, et dans lequel les sondes de même type sont regroupées

dans une même zone sur la couche d'isolant pour permettre l'éclairement de manière séparée et/ou successive.

10. Un capteur d'affinité tel que défini dans la revendication 1.

11. Procédé d'identification et/ou de dosage de substances biologiques présentes dans un milieu liquide conducteur, utilisant un dispositif comprenant :

- une chambre pour le milieu liquide conducteur ;
- un capteur d'affinité disposé dans ladite chambre ; ledit capteur d'affinité comprenant :

- 10
 - un matériau semi-conducteur ayant une surface inférieure et une surface supérieure ;
 - ledit matériau semi-conducteur ayant un contact ohmique disposé sur la surface inférieure ;
 - une couche d'isolant disposée sur la surface supérieure dudit matériau semi-conducteur ;
 - une pluralité de sondes en contact avec ledit milieu liquide conducteur ;
 - ladite pluralité de sondes étant disposée sur la surface de ladite couche d'isolant ;
- 20
 - ladite pluralité de sondes comprenant une substance biologique de reconnaissance qui est capable de s'hybrider spécifiquement avec une substance biologique chargée, présente dans le milieu liquide conducteur, où des appariements spécifiques des substances biologiques chargées avec leurs substances biologiques de reconnaissance complémentaires sont formés ;
- des moyens de polarisation du matériau semi-conducteur par rapport au liquide conducteur ;
- des moyens d'éclairement du matériau semi-conducteur ;
- des moyens de mesure du photopotential V_{ph} aux bornes du capteur d'affinité ;
- 30

- des moyens de transformation des signaux détectés en variations de potentiel de bande plate V_{fb} qui sont induits par un phénomène d'effet de charge associé auxdits appariements modifiant la charge électrique de la surface du capteur d'affinité ; et
- des moyens de calcul et d'interprétation des variations ΔV_{fb} en termes d'identification et/ou de dosage des substances biologiques chargées ;

dans lequel le procédé comprend :

- une fourniture à titre de sonde des substances biologiques de reconnaissance non-marquées ;
- 10 - une mise en contact de la substance biologique chargée avec la substance biologique de reconnaissance non-marquée, où des appariements spécifiques des substances biologiques chargées avec leurs substances biologiques de reconnaissance complémentaires sont formés, ledit appariement spécifique modifiant la charge électrique de la surface du capteur d'affinité ;
- une polarisation du matériau semi-conducteur de sorte que le niveau de Fermi corresponde approximativement au, ou passe par le niveau intrinsèque en surface du matériau semi-conducteur ;
- une soumission du matériau semi-conducteur à un éclairage périodique
- 20 comprenant des photons dont l'énergie est supérieure à l'énergie de la bande interdite du matériau semi-conducteur ;
- une mesure du photopotential V_{ph} aux bornes du capteur d'affinité ;
- une détermination de l'impédance complexe du capteur d'affinité à partir du photopotential V_{ph} , une détermination des variations ΔV_{fb} du matériau semi-conducteur qui sont induites par un phénomène d'effet de charge avec lesdites appariements spécifiques des substances biologiques chargées avec leurs substances biologiques de reconnaissances complémentaires ; à l'exclusion :
- (i) des variations résultant d'éventuels effets de charges et/ou de transferts
- 30 de charges provoqués par des réactions chimiques catalysées par des enzymes et dans lesquelles se produit une consommation d'une partie des substances à détecter ; et

- (ii) des variations de la photoréponse liées à l'apparition dans le milieu liquide conducteur d'au moins un produit traceur susceptible d'être révélé au travers de variations de pH ou de potentiel redox, et/ou au travers de marqueurs absorbant ou émettant des radiations ; et
- une identification et/ou un dosage des substances biologiques chargées dans le milieu liquide conducteur par l'interprétation des signaux reçus.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel les appariements spécifiques de la substance biologique chargée comprennent un complexe enzyme-substrat.

10 13. Procédé selon la revendication 11, dans lequel les appariements spécifiques de la substance biologique chargée comprennent un complexe immunologique.

14. Procédé selon la revendication 11, dans lequel la substance biologique chargée est un polynucléotide et la substance biologique de reconnaissance est un polynucléotide.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, dans lequel on polarise le matériau semi-conducteur en imposant une tension de polarisation V_b selon un balayage entre une tension négative et une tension positive limitées ; et dans lequel ΔV_{fb} est mesurée en détectant le photopotential V_{ph} aux bornes du matériau semi-conducteur; en calculant ou non les impédances optoélectrochimiques en phase Z_{op} et/ou en quadrature Z_{oq} , pour chaque valeur de V_b ; en établissant la courbe Z_{op} et/ou Z_{oq} et/ou V_{ph} en fonction de V_b ; et en suivant le déplacement de cette courbe parallèlement à l'axe des abscisses, ledit déplacement correspondant aux variations de V_{fp} recherchées.

20

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, dans lequel l'éclairement périodique est un éclairage faible approximativement sinusoïdal.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, dans lequel l'éclairement périodique est un éclairement fort.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 17, dans lequel les variations V_{fb} sont obtenues en détectant V_{ph} et en établissant la courbe $V_{ph}=f(V_b)$; et en suivant le déplacement de cette courbe parallèlement à l'axe des abscisses, ledit déplacement correspondant aux valeurs ΔV_{fb} recherchées.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 18, dans lequel le niveau de Fermi du matériau semi-conducteur est fixé
 10 approximativement au niveau intrinsèque en surface du matériau semi-conducteur, en imposant une tension de polarisation V_b correspondant environ à l'abscisse du point d'inflexion de la courbe $V_{ph} = f(V_b)$, ou la courbe $Z_{oq} = f(V_b)$; où l'ordonnée de ce point d'inflexion correspond à environ $V_{phmax}/2$, et $Z_{oqmax}/2$; et dans lequel les variations de ΔV_{fb} et V_{fb} sont obtenues (i) par la mesure de l'évolution de V_{ph} et/ou Z_{oq} ; et/ou (ii) par la prise en compte des variations de la tension de polarisation ΔV_b , rendues nécessaires pour maintenir constant $V_{phmax}/2$ ou $Z_{oqmax}/2$, cet ajustement étant le reflet de ΔV_{fb} .

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 19, comprenant la détection du signal de photopotential V_{ph} , optionnellement,
 20 l'amplification du signal V_{ph} ; optionnellement le redressement de ce signal de manière à disposer d'un signal continu V'_{ph} , la comparaison de ce signal continu V'_{ph} à un signal de référence U correspondant approximativement à la valeur de $V'_{phmax}/2$; l'obtention de la différence $\Delta(V'_{ph}-U)$ entre V'_{ph} et U , optionnellement l'amplification de $\Delta(V'_{ph}-U)$, l'application de $\Delta(V'_{ph}-U)$ optionnellement amplifiée ou non entre le matériau semi-conducteur et le milieu liquide conducteur en complément de V_b , et l'enregistrement de $\Delta(V'_{ph}-U)$.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 20, dans lequel la longueur d'onde de l'éclairement λ est supérieure ou égale à un seuil λ_0 , où

$$\lambda_0 = \frac{1240}{E(\text{énergie bande interdite})} \text{ nm} .$$

22. Procédé selon la revendication 21, dans lequel la longueur d'onde est entre 100 et 3000 nm.

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 22, comprenant en outre l'utilisation d'une structure de référence comprenant un matériau semi-conducteur et une couche d'isolant, où ladite couche d'isolant n'est pas fonctionnalisée par une sonde, et le suivi de la différence entre les variations V_{bp} mesurées par les deux capteurs, et la variation de cette différence.

10 24. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 23, dans lequel la couche d'isolant est fonctionnalisée par différents types de polynucléotides en tant que substance biologique de reconnaissance, et dans lequel le milieu liquide conducteur comprend différents types de polynucléotides en tant que substance biologique chargée ; et dans lequel lesdites sondes de même type sont regroupées dans une même zone sur la couche d'isolant pour permettre l'éclairement de manière séparée et/ou successive.

25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 24, dans lequel la substance biologique chargée est sélectionnée dans le groupe constitué de nucléotides, d'oligonucléotides, de polynucléotides, d'acides nucléiques et de mélanges de ceux-ci.

20 26. Procédé selon la revendication 24, dans lequel au moins un capteur d'affinité est utilisé sans compartimentation de la surface du capteur d'affinité.

1/7

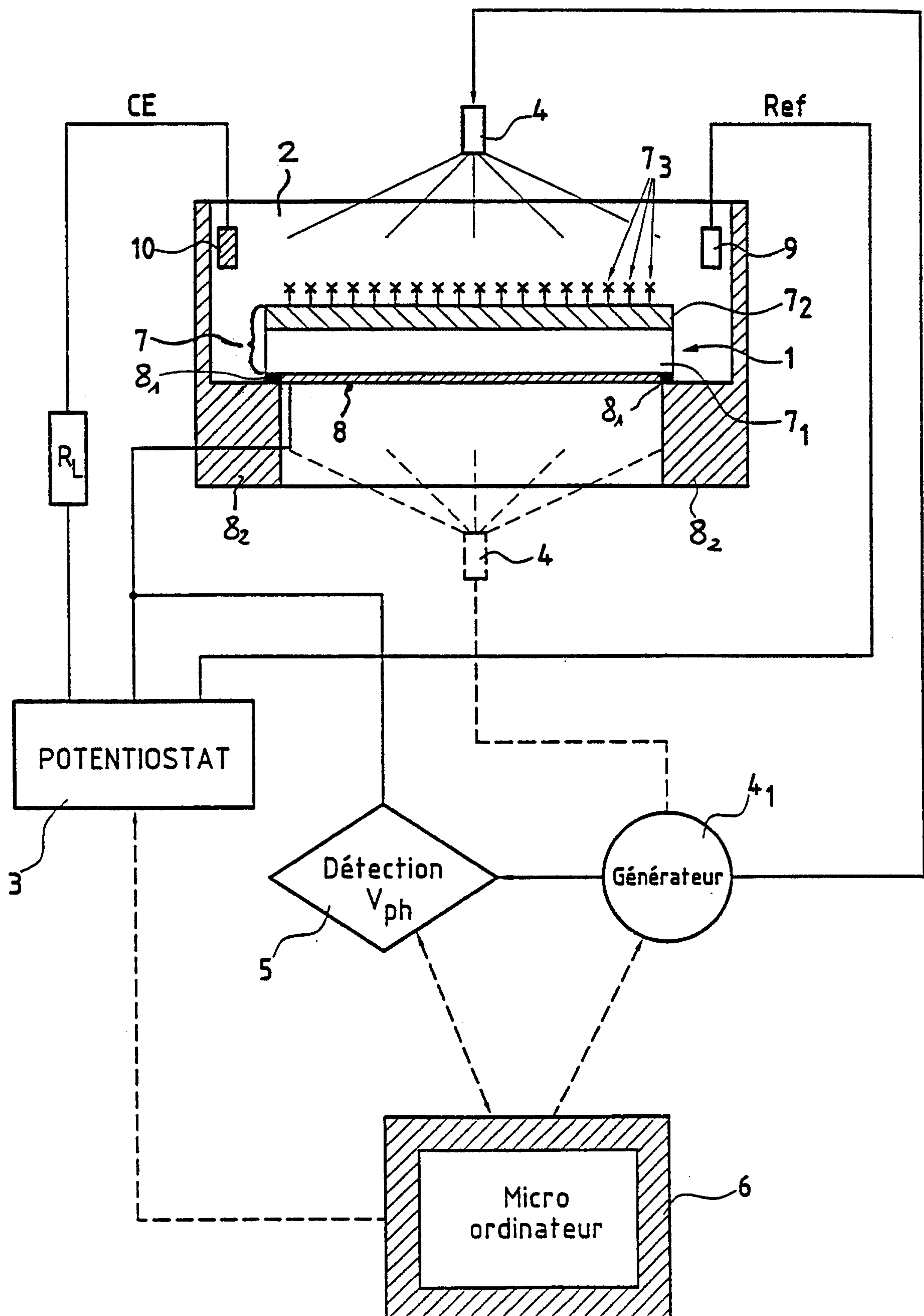


FIG.1

2/7

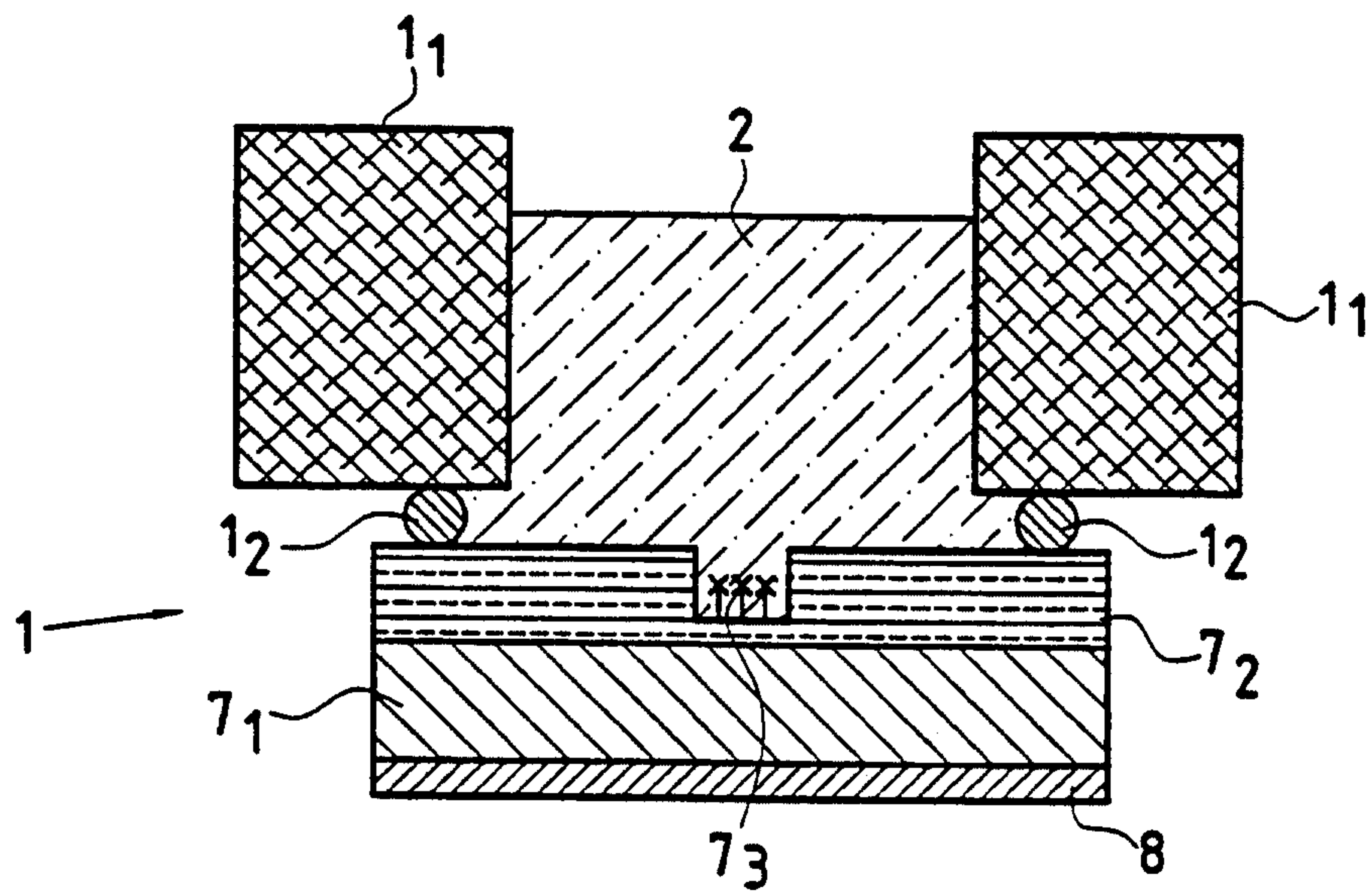


FIG. 2

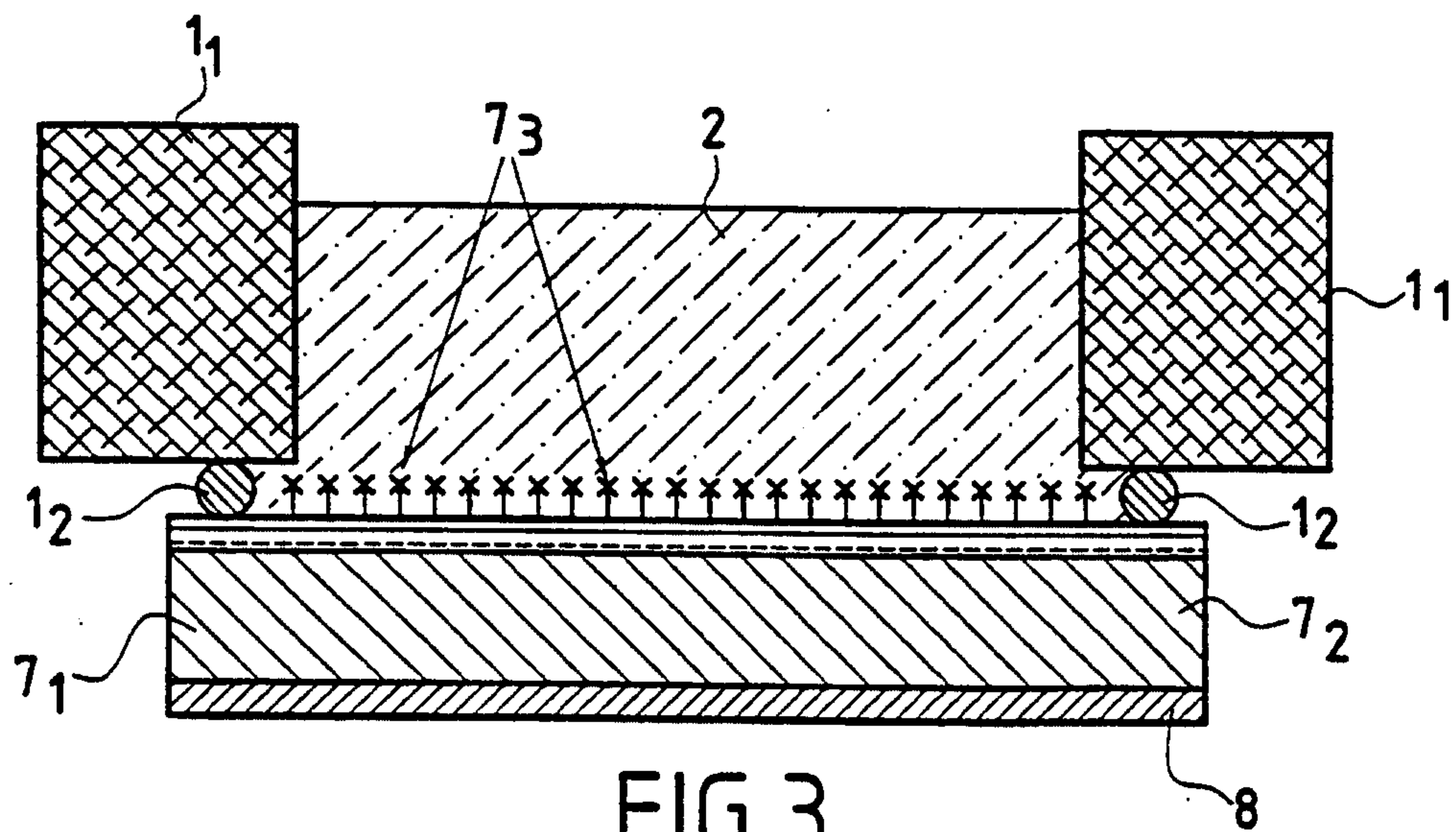


FIG. 3

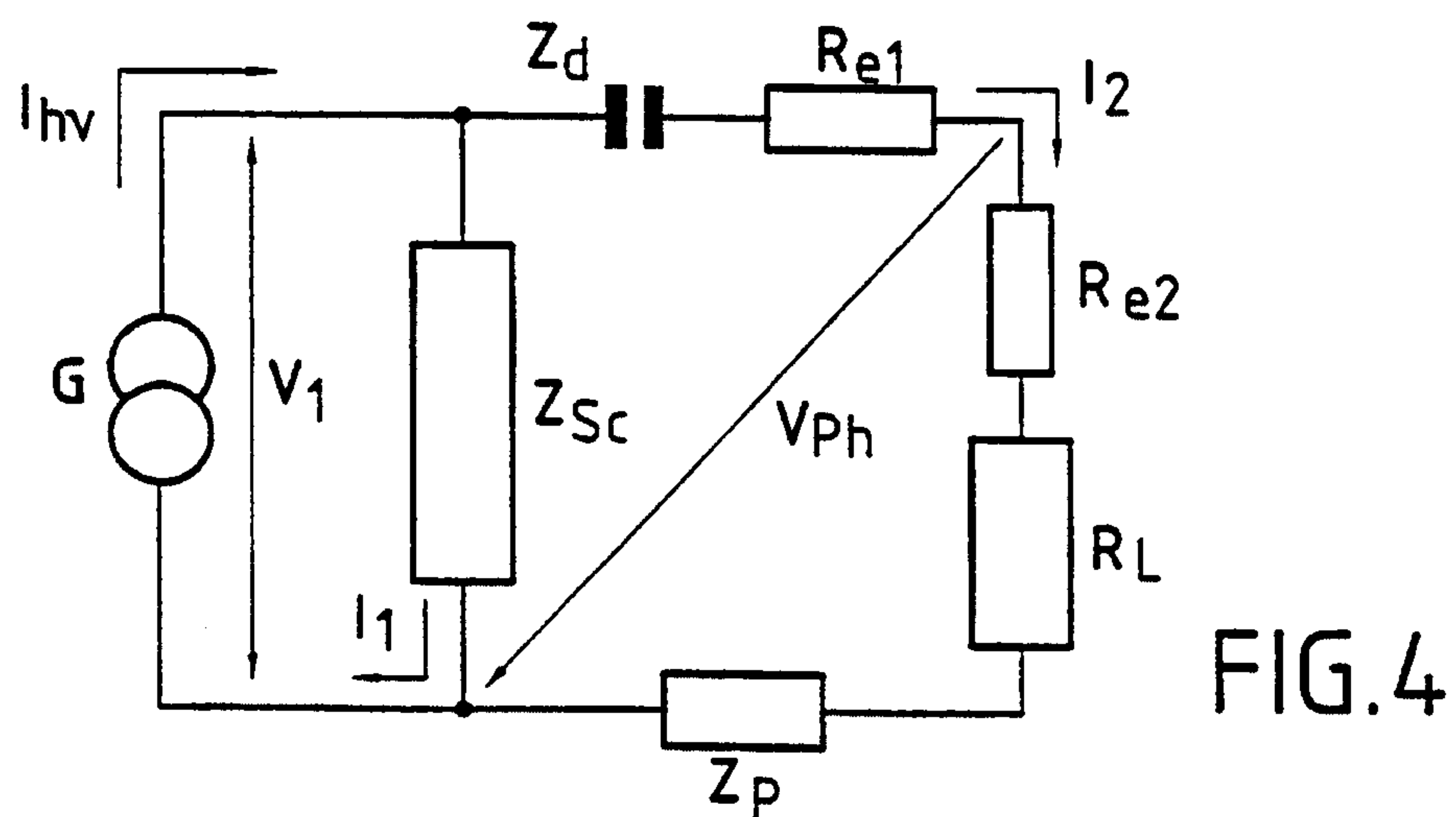


FIG. 4

3/7

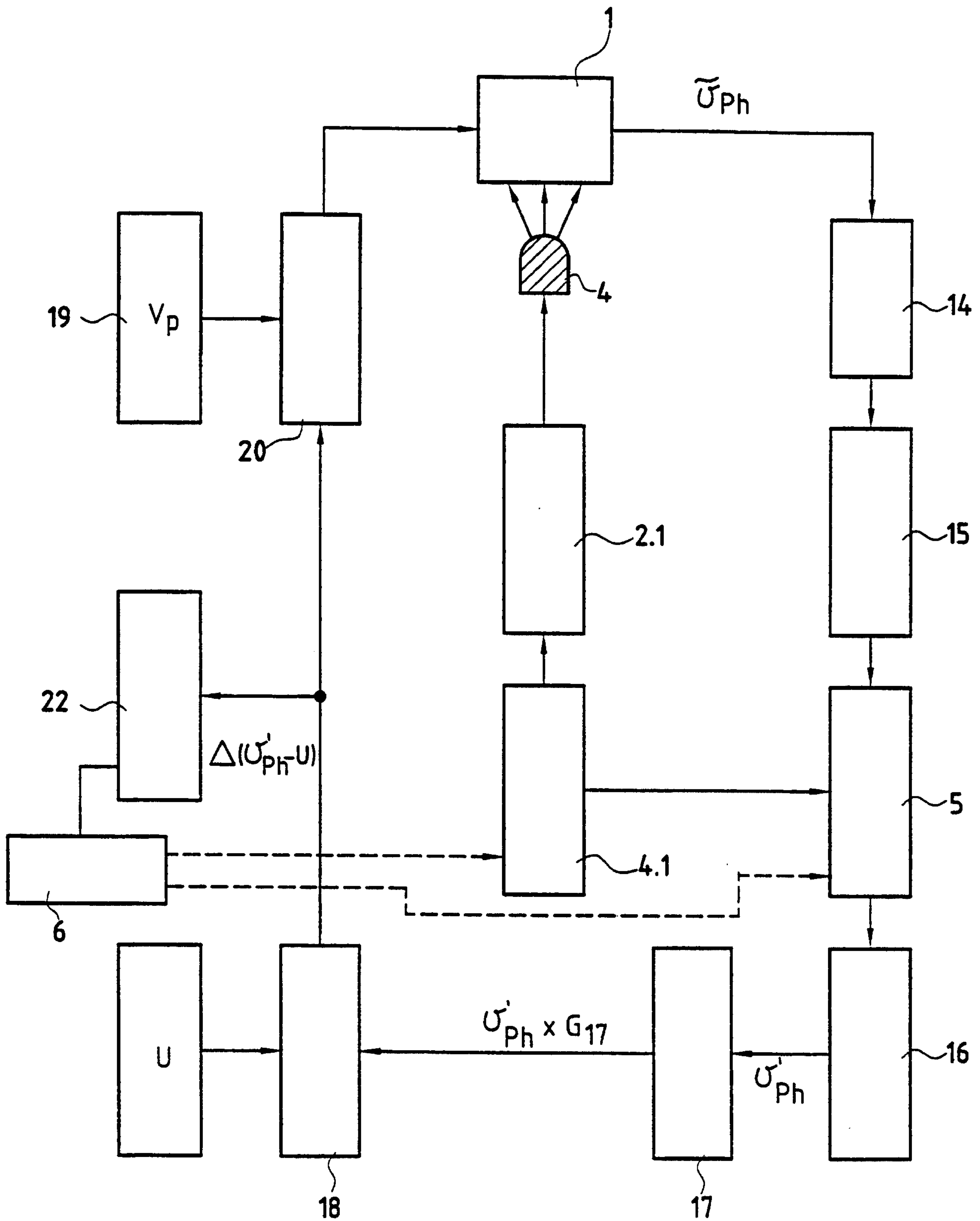


FIG.5

4/7

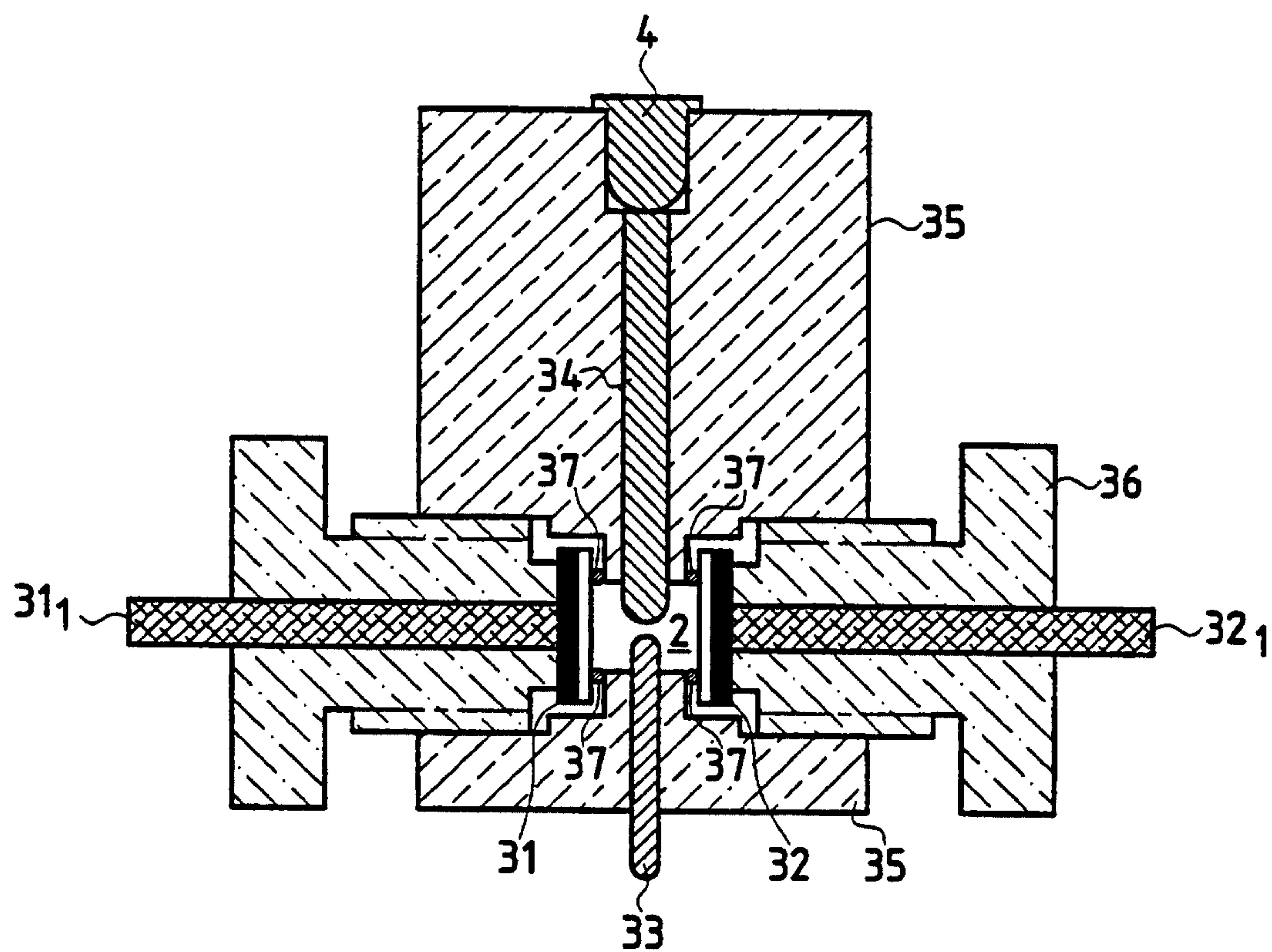


FIG. 6

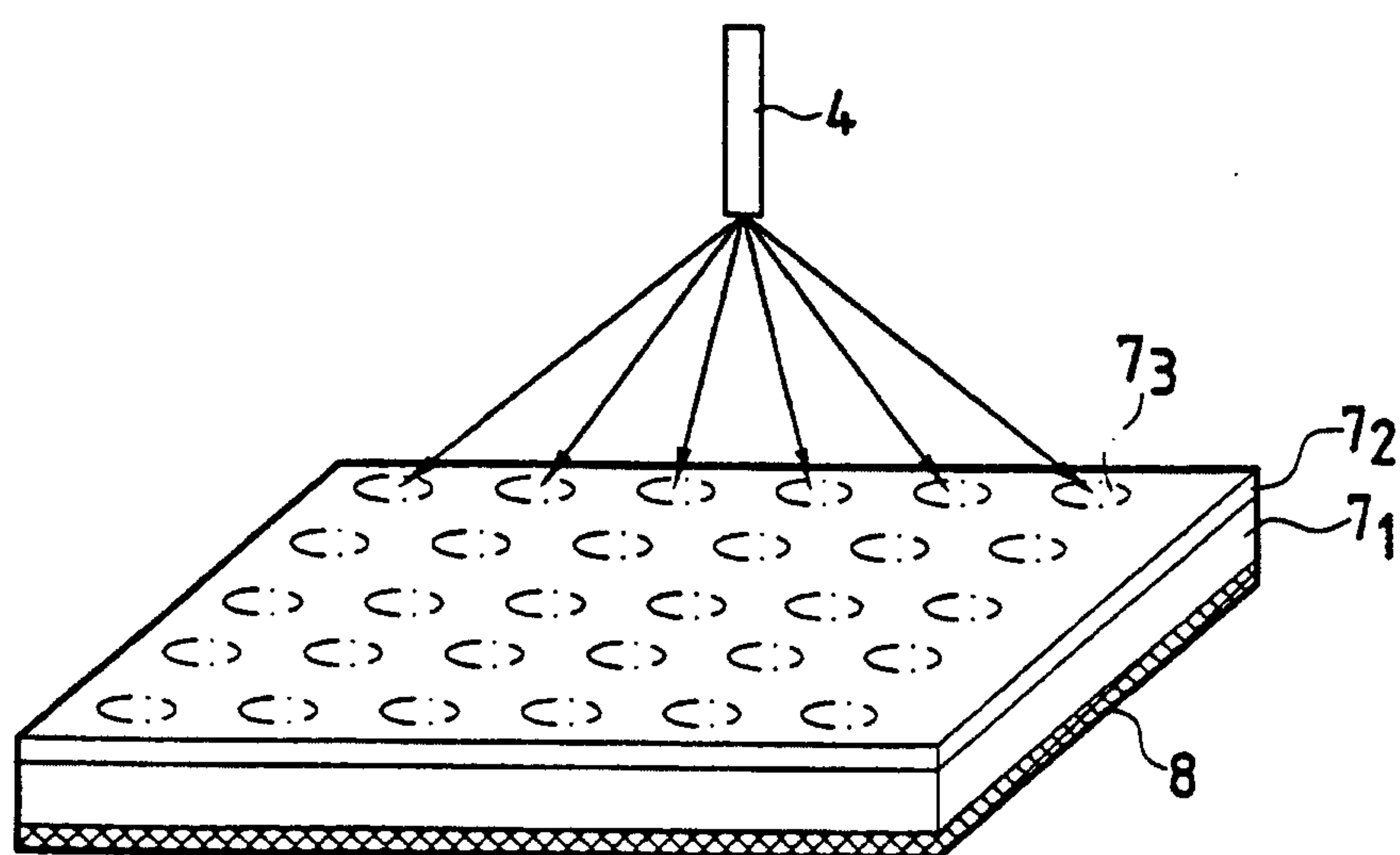
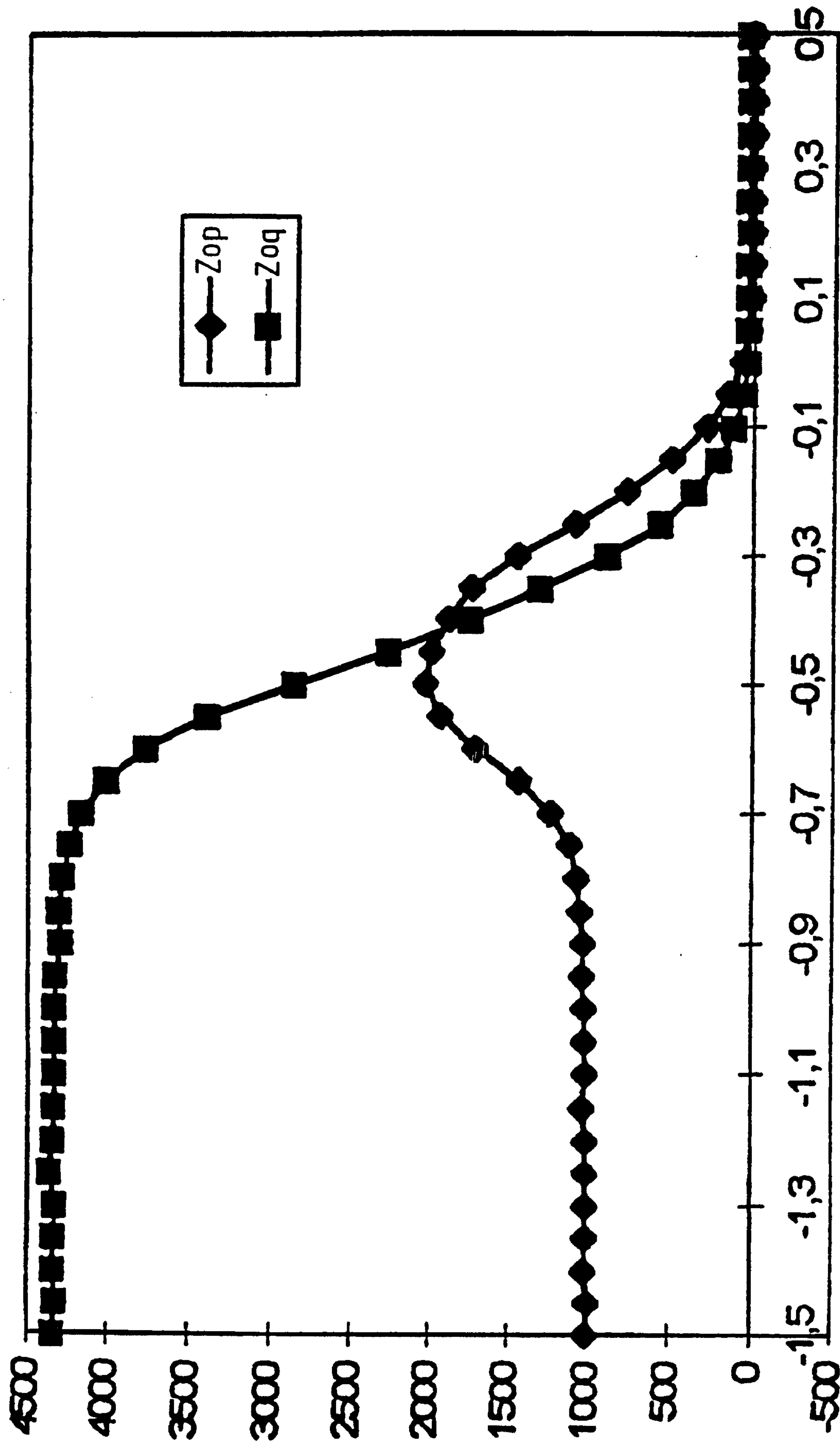


FIG. 7

5/7



Potentiel de polarisation Vp

FIG.8

6/7

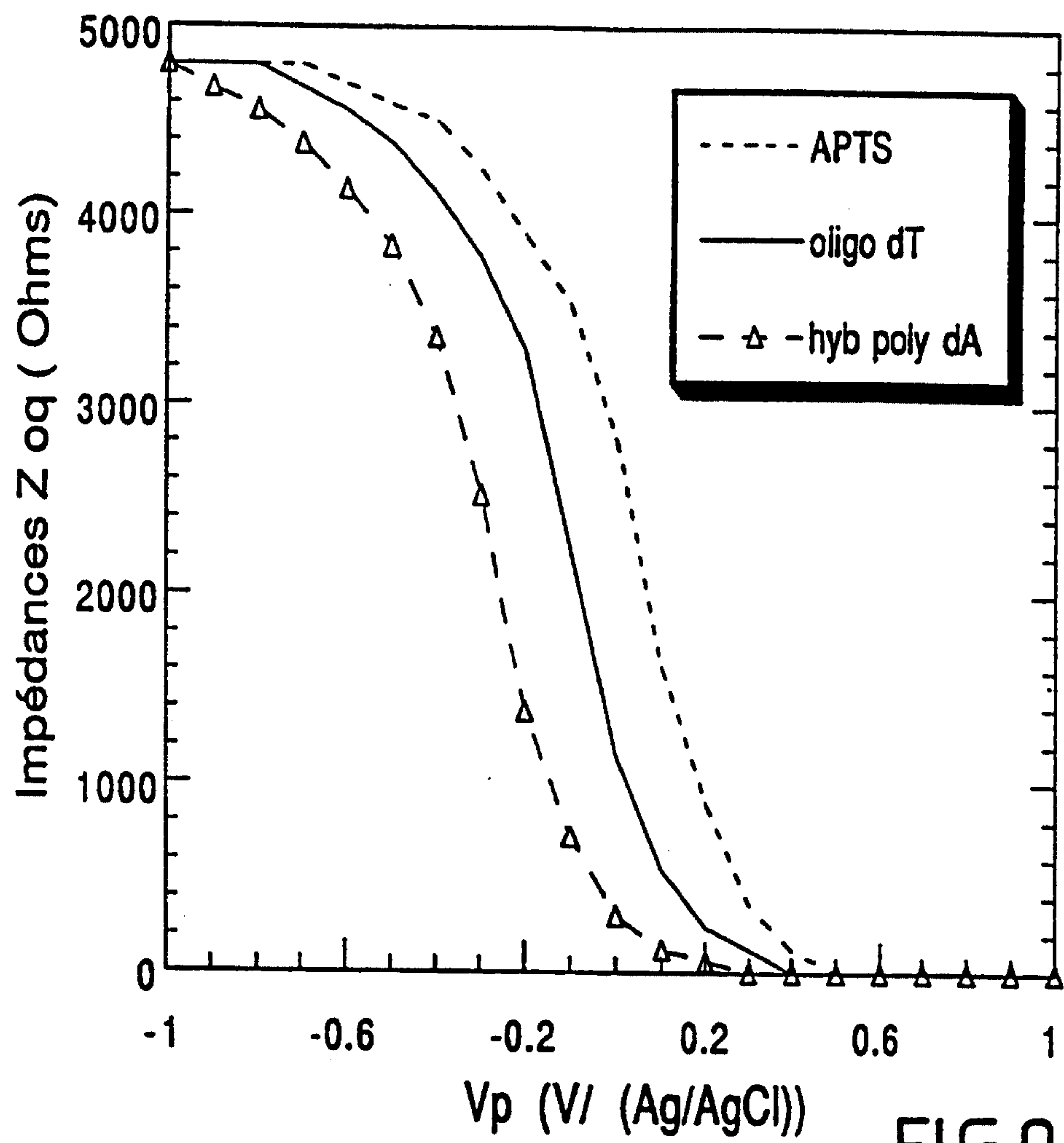


FIG.9

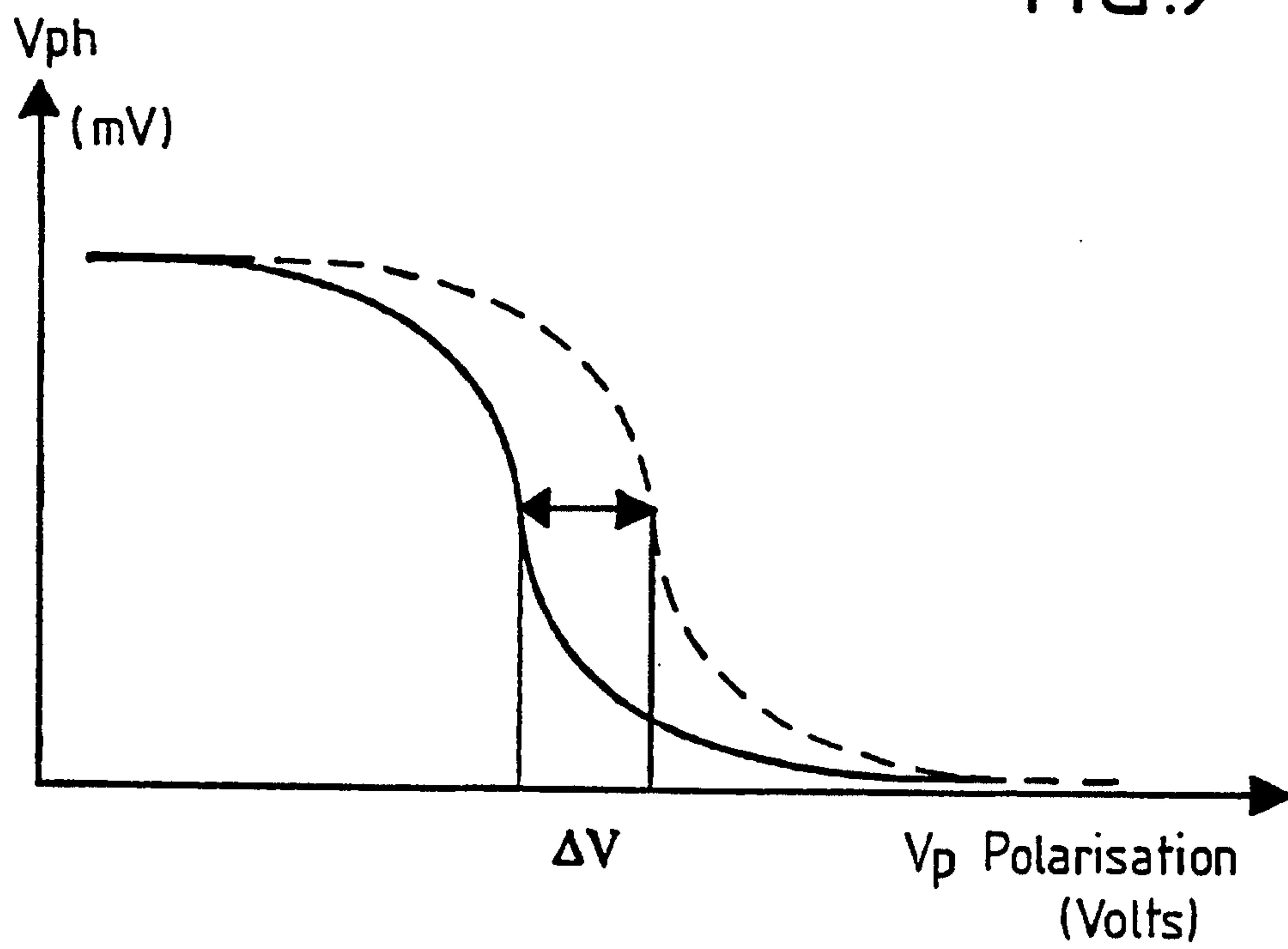


FIG.10

7/7

