

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 25.05.07.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 28.11.08 Bulletin 08/48.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement public à caractère industriel et commercial — FR, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS — FR et UNIVERSITE JOSEPH FOURIER (GRENOBLE 1) — FR.

⑦2 Inventeur(s) : REVOL CAVALIER FREDERIC, BLOCK MARC et GUILLOU HERVE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET ORES.

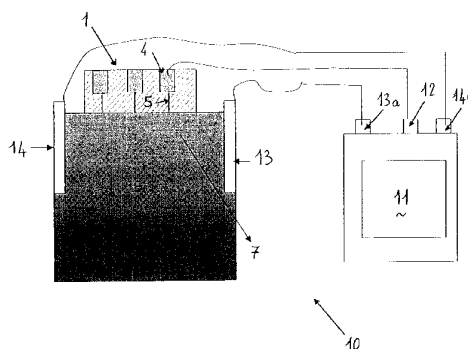
⑤4 PROCÉDE DE FIXATION SUR UN MICROSYSTEME DE COMPOSES A LIAISONS PEPTIDIQUES, TELS QUE DES PROTEINES, ET MICROSYSTEME INCORPORANT CES COMPOSES.

⑤7 La présente invention concerne un procédé de fixation d'un ou plusieurs composé(s) à liaisons peptidiques, tels que des protéines, sur un microsystème de type comportant un réseau d'électrodes recouvrant un substrat, et un tel microsystème incorporant ces composés.

Le procédé de fixation selon l'invention se rapporte à un microsystème (1) comportant un réseau d'électrodes recouvrant un substrat, et il comprend la séquence d'étapes suivantes:

a) un dépôt électrolytique sur l'une au moins de ces électrodes d'une couche polymérique à base d'au moins un polymère conducteur électronique hydrophobe, via une mise en contact de la ou des électrode(s) avec un électrolyte (7) comprenant un monomère à polymériser, puis

b) une mise en contact de la couche polymérique hydrophobe ainsi obtenue avec un milieu peptidique contenant le(s)dit(s) composé(s) à fixer, pour immobiliser ce(s) dernier(s) sur ledit réseau essentiellement par des liaisons hydrophobes.



**PROCEDE DE FIXATION SUR UN MICROSYSTEME DE
COMPOSES A LIAISONS PEPTIDIQUES, TELS QUE DES PROTEINES, ET
MICROSYSTEME INCORPORANT CES COMPOSES.**

5 La présente invention concerne un procédé de fixation d'un ou
plusieurs composé(s) à liaisons peptidiques, tels que des protéines, sur un
microsystème de type comportant un réseau d'électrodes recouvrant un
substrat, et un tel microsystème incorporant ces composés. L'invention
s'applique notamment à la fabrication de biopuces à réseaux micrométriques
10 de protéines multiples.

De manière connue, les microsystèmes à réseaux de
protéines adsorbées à leur surface, parfois appelés puces à protéines
lorsqu'ils atteignent une miniaturisation submillimétrique, sont à la base de
15 nombreux tests de détection de composés biochimiques divers à l'aide
d'anticorps, avec un vaste champ d'application comme par exemple les
dosages enzymatiques dans le domaine du diagnostic médical et, plus
récemment, du suivi alimentaire. On a ainsi réalisé la structuration de
protéines sur des substrats solides, pour développer à leur surface des motifs
20 composés d'une alternance de protéines et de zones dépourvues de
protéines. Pour ces tests en phase solide, la miniaturisation a permis des
économies d'échelle importantes et une diminution sensible des temps de
mise en œuvre. Ces réseaux de protéines peuvent être par exemple utilisés
en recherche fondamentale dans l'analyse haut débit des interactions
25 protéines/protéines.

Ces dernières années, la réalisation de réseaux
micrométriques de protéines (i.e. à l'échelle cellulaire et subcellulaire) a
permis de réaliser des zones adhésives et antiadhésives pour les cellules
biologiques qui imposent des contraintes mécaniques modifiant
30 considérablement la physiologie de ces dernières (voir en particulier l'article
de Didier Falconnet et al., Surface engineering approaches to micropattern
surfaces for cell-based assays, Biomaterials 27 (2006) 3044-3063). Des

résultats pionniers dans ce domaine ont été obtenus principalement par les groupes de recherche de Donald Ingber et Georges Whitesides, montrant que la géométrie contrôle par exemple la surface ou la mort cellulaire programmée, ainsi que la prolifération cellulaire. Encore plus récemment, des travaux ont montré que la géométrie imposée par le substrat contrôlait l'orientation de la division cellulaire (voir en particulier l'article de Manuel Thery et al., the extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis, Nature Cell Biology, vol. 7, n°10, octobre 2005) ainsi que l'extension de lamellipodes, suggérant un rôle majeur des tensions mécaniques dans le contrôle de la migration cellulaire orientée.

La réalisation de surfaces microstructurées fait principalement appel à deux techniques qui sont basées toutes deux sur la photolithographie, et qui comprennent la photolithographie dure et la photolithographie molle.

Dans la photolithographie dure, la structuration de la surface est réalisée par irradiation ultraviolette d'une couche de résine photosensible, mise en œuvre à travers un masque qui reproduit le ou les motifs désirés. Cette irradiation altère chimiquement la résine, qui peut alors être sélectivement solubilisée par des solutions alcalines. Un inconvénient majeur de cette méthode est que les réactifs standards utilisés sont généralement toxiques et dénaturent ainsi les biomolécules.

Dans la photolithographie molle, le groupe de recherche de Georges Whitesides a utilisé des surfaces microstructurées à base de PDMS (polydiméthylsiloxane), pour générer la structuration de molécules organiques adsorbées sur un substrat solide. On réalise dans ce cas des transferts de contact, des molécules d'intérêt du « tampon » de PDMS vers la surface, uniquement sur les surfaces en contact. Cette technique de micro-impression est bien adaptée à la structuration de biomolécules et permet de structurer des surfaces non planes. Les « tampons » de PDMS peuvent être gravés pour former des micro-canaux permettant d'amener des fluides sur des zones définies du substrat (voir l'article de Daniel T. Chiu et al., Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic

systems, PNAS, 14 mars 2000, vol. 97, n°6, 2408-2413). Cette technique permet de réaliser sur le substrat des pistes formées de différentes protéines.

La fixation d'espèces biologiques via des polymères conducteurs électroniques (« PCE » en abrégé en anglais) est une technique utilisée depuis plusieurs années. Par exemple, la fixation d'ADN sur les électrodes d'une biopuce peut être obtenue par la polymérisation électrochimique d'un monomère de pyrrole modifié. L'intérêt d'utiliser un polymère conducteur, tel que le polypyrrole, un polymère du ferrocène ou la polyaniline, est de pouvoir le déposer facilement par application d'un potentiel électrique sur une électrode métallique. Cette méthode permet de choisir une ou plusieurs électrodes de fixation parmi toutes les électrodes présentes sur le substrat de la biopuce (voir le document WO-A-94/22889, qui décrit la chimie du pyrrole permettant la fixation covalente d'un brin d'ADN sur le pyrrole). Avec cette méthode, il est nécessaire d'assurer la liaison chimique du composé biologique avec le monomère conducteur, avant polymérisation.

Le document FR-A-2 784 466 décrit un autre procédé de fixation via un polymère conducteur d'une sonde chimique ou biologique, telle qu'un brin d'ADN, sur un microsystème de type à micro-cuvettes pourvues d'électrodes. Ce procédé consiste essentiellement à :

- synthétiser un premier composé organique comprenant une première fonction d'accrochage avec ces électrodes qui est constituée d'un monomère conducteur, tel que du pyrrole, et une seconde fonction d'accrochage avec un second composé organique,
- synthétiser ce second composé comprenant une fonction d'accrochage couplée à celle du premier composé et incluant un réactif, puis
- fixer sur ces électrodes le premier composé via sa première fonction d'accrochage et placer le second composé dans chaque micro-cuvette pour y obtenir les sondes précitées fixées aux électrodes par le couplage précité de ces fonctions d'accrochage.

On notera que ces méthodes utilisent des composés que l'on vient modifier chimiquement pour leur associer un monomère conducteur avant la polymérisation, ce qui permet de fixer par des liaisons covalentes les composés sur le polymère conducteur et ainsi d'assurer une quantification
5 satisfaisante des composés fixés sur une surface donnée.

Un inconvénient majeur de ces procédés de fixation connus via des polymères conducteurs est que la synthèse chimique utilisée pour assurer la liaison directe ou indirecte entre un composé biologique et le monomère est longue, difficile et coûteuse. Dès lors que l'on veut déposer
10 plusieurs espèces biologiques différentes sur une biopuce, le coût de ces étapes de préparation devient ainsi très important.

De plus, cette technique est utilisable pour des brins d'ADN chimiquement stables et supportant les diverses étapes de la synthèse chimique, mais d'autres composés biologiques beaucoup plus fragiles comme
15 les protéines présentent une stabilité souvent peu compatible avec les étapes chimiques nécessaires à leur fixation sur des monomères conducteurs.

Lorsque l'on veut s'affranchir de ces étapes de synthèse chimique, on peut utiliser de façon connue un robot muni de têtes
20 piézoélectriques, qui délivre des microgouttes de solutions protéiques à des emplacements précis du microsystème (voir l'article précité de Daniel T. Chiu et al.). On utilise par exemple un polymère tel que la polylysine qui adsorbe efficacement les composés biologiques par des liaisons électrostatiques, ou bien un silane bifonctionnel ou hydrophobe reliant la protéine à fixer au
25 substrat. Les « spots » ou plots déposés présentent en général une dimension caractéristique allant de 30 à 50 μm . La méthode séquentielle du dépôt de microgouttes ne permet pas de réaliser rapidement des structurations sur des surfaces étendues.

L'utilisation des « tampons » de PDMS dans la technique de
30 lithographie molle décrite ci-dessus permet d'obtenir des plots de petites dimensions. Néanmoins, un inconvénient de cette technique est que si l'on veut déposer plusieurs composés biologiques différents à la surface du

substrat, on doit utiliser différents « tampons » à aligner les uns par rapport aux autres. Bien que la maîtrise précise de cet alignement dépende essentiellement de la taille des plots et de leur espacement, il apparaît que les repositionnements de « tampons » inférieurs à une vingtaine de microns sont
5 difficilement maîtrisables lors des transferts de contact avec cette technique de lithographie molle. En effet, la précision de l'alignement de ces « tampons » est insuffisante pour assurer un motif précis sur des surfaces macroscopiques de dimensions millimétriques, surfaces compatibles avec l'analyse à haut débit d'un grand nombre d'échantillons, ce qui constitue un
10 obstacle technologique important pour la multi-structuration ou « multipatterning » des protéines en réseaux.

Dans l'autre utilisation précitée des « tampons » de PDMS pour créer des micro-canaux pour les solutions protéiques, il apparaît que la taille des motifs excède largement celle des cellules.

15 Quant à la lithographie dure, elle présente la précision requise mais, comme on l'a indiqué ci-dessus, cette technique fait appel à une réaction chimique indésirable lors de la solubilisation des zones de résine photo-activée qui est incompatible avec les fonctions biologiques des protéines préalablement déposées sur le substrat.

20

Un but de la présente invention est de proposer un procédé de fixation d'un ou plusieurs composé(s) à liaisons peptidiques, tels que des protéines, sur un microsystème comportant un réseau d'électrodes recouvrant un substrat, qui permette de remédier aux inconvénients précités.

25 A cet effet, le procédé de fixation selon l'invention comprend la séquence d'étapes suivantes:

a) un dépôt électrolytique sur l'une au moins de ces électrodes d'une couche polymérique à base d'au moins un polymère conducteur électronique de type hydrophobe, via une mise en contact de la ou
30 des électrode(s) avec un électrolyte comprenant un monomère à polymériser, puis

b) une mise en contact de la couche polymérique ainsi obtenue avec un milieu peptidique contenant le(s) composé(s) à fixer, pour immobiliser ce(s) dernier(s) sur le réseau essentiellement par des liaisons hydrophobes.

5

On notera que ce procédé de fixation selon l'invention est caractérisé par la fixation directe desdits composés à au moins un polymère conducteur, sans étape de réaction chimique de ces composés avec le monomère conducteur à polymériser, contrairement à l'état de l'art précité, et
10 que la mise en œuvre successive de plusieurs séquences de ces deux étapes a) et b) permet d'assurer la réalisation du réseau à l'échelle micrométrique.

Avantageusement, on répète cette séquence d'étapes a) et b) autant de fois qu'il y a de composés différents à fixer sur les électrodes du réseau, tels que des protéines multiples.

15

A titre de polymère conducteur hydrophobe utilisable dans cette étape a), on peut citer tout homopolymère ou copolymère obtenu par polymérisation électrochimique d'un monomère conducteur hydrophobe ou de plusieurs comonomères dont l'un au moins est conducteur et hydrophobe, respectivement. On peut par exemple citer le monomère 1-n-octylpyrrole, le 3-
20 heptylpyrrole ou le 3-méthylpyrrole. En variante, on peut utiliser un monomère autre que le pyrrole, tel que le thiophène ou l'aniline.

De préférence, le (co)monomère conducteur hydrophobe est constitué d'un pyrrole et, à titre encore plus préférentiel, ledit polymère conducteur est constitué d'un polypyrrole.

25

Selon une autre caractéristique de l'invention, l'on immobilise le(s)dit(s) composé(s) à l'étape b) par adsorption non spécifique, en immergeant la ou les électrode(s) recouverte(s) de ladite couche polymérique hydrophobe dans ledit milieu, tel qu'une solution protéinique, pour former un film à base de ce(s) composé(s) qui recouvre ladite couche.

30

On notera que, malgré l'énergie moindre qui caractérise les liaisons hydrophobes entre les composés physio-adsorbés par le procédé de l'invention et lesdites couches polymériques en comparaison des liaisons

covalentes mises en jeu dans l'art antérieur, la fixation des composés par ces liaisons non covalentes implique un coût d'industrialisation du microsystème obtenu qui est nettement inférieur au coût souvent rédhibitoire lié à la fixation de ces composés par des liaisons covalentes du fait de la synthèse et/ou des
5 modifications chimiques requises.

Grâce au procédé selon l'invention, on peut étudier des systèmes biologiques complexes tels que des cellules, en réalisant des réseaux micrométriques contenant un arrangement de protéines multiples à l'échelle subcellulaire. En effet, la structuration à l'échelle micrométrique de
10 réseaux à plusieurs protéines permet d'introduire au sein d'une même cellule une asymétrie au niveau des structures adhésives et la ségrégation spatiale de récepteurs engagés sur le substrat. Cette ségrégation permet d'analyser les propriétés des différents récepteurs de l'adhérence cellulaire.

On notera également qu'une telle résolution n'est pas obtenue
15 avec les procédés de fixation connus de protéines sur des microsystèmes.

Selon un autre aspect de l'invention, les plots ou « spots » incluant lesdits composés sont fabriqués collectivement par les techniques de la micro-fabrication, en une seule étape de lithographie, aucun désalignement
20 n'étant possible entre les différents plots du microsystème et seule la résolution technologique permettant de définir la taille et l'espacement entre les plots du réseau.

On notera en outre que les réseaux à protéines multiples qui peuvent être obtenus par le procédé de l'invention (la séparation spatiale des
25 protéines étant réalisée à l'étape du dépôt électrochimique) constituent un outil de choix pour étudier la signalisation croisée entre récepteurs, notamment. Celle-ci peut être générée par des interactions latérales directes des récepteurs au sein de superstructures moléculaires, ou bien sur des récepteurs spatialement distants. En outre, la répartition asymétrique des
30 récepteurs est un mécanisme majeur par lequel la cellule va se polariser, i.e. adopter une morphologie et une architecture interne elles-mêmes asymétriques. Cette polarisation est le plus souvent le préalable à la

différenciation cellulaire, qui peut être contrôlée par la symétrie du substrat en ingénierie tissulaire.

A titre de substrat utilisable pour fabriquer le microsystème
5 selon l'invention, on peut citer tout substrat minéral ou organique, biocompatible et pouvant être de type actif ou passif (i.e. avec ou sans système électronique intégré, respectivement).

Selon une autre caractéristique avantageuse de l'invention concernant plus particulièrement la fixation de protéines à titre de composés à
10 liaisons peptidiques, la surface utile des plots du réseau, i.e. des électrodes recevant ces protéines, présente une dimension caractéristique inférieure à 10 μm , le réseau ainsi obtenu étant compatible avec une fixation de cellules biologiques entre les surfaces utiles des électrodes recevant ces protéines.

Selon une autre caractéristique de l'invention, le procédé de
15 fixation peut comprendre en outre, antérieurement à l'étape a) précitée, un dépôt d'une couche isolante de passivation entre les électrodes du réseau et en recouvrement partiel sur ces dernières, la couche de passivation étant ouverte sur chaque électrode de sorte à définir la surface utile de celle-ci.

De préférence, ladite couche de passivation est à base d'un
20 polymère photosensible, tel qu'un polyimide, ou bien à base d'un nitrure de silicium ou d'un oxyde de silicium (tout matériau électriquement isolant et usinable à l'échelle du micromètre peut être utilisé).

Selon une autre caractéristique de l'invention, l'on met en
25 œuvre l'étape a) précitée du procédé de fixation en appliquant un potentiel électrique adapté à la ou aux électrode(s) se trouvant à l'état immergé dans un bain à base dudit électrolyte en solution, pour l'obtention de ladite couche polymérique hydrophobe. Avantageusement, ledit bain peut comprendre en outre au moins un sel électrolytique pour assurer le transport ionique dans
30 ladite solution en cours de dépôt dudit polymère.

Pour cet électrolyte en solution, on peut utiliser tout solvant permettant, d'une part, la solubilisation du monomère conducteur hydrophobe

et, d'autre part, ne perturbant pas les composés déposés à la surface du microsystème. On peut par exemple utiliser à titre de solvant de l'eau, de l'éthanol ou bien un mélange des deux.

A titre de sels électrolytiques, on peut citer les sels classiquement utilisés en électrochimie comme par exemple ceux de formule KCl, LiClO₄, NaCl et NaSO₄, de concentration avantageusement comprise entre 10⁻³ M et 10⁻¹ M.

Selon une autre caractéristique de l'invention, l'on peut mettre en œuvre l'étape a) précitée en connectant cette ou ces électrode(s) immergée(s) à une électrode de travail d'un potentiostat, lequel est en outre pourvu d'une électrode de référence et d'une contre-électrode qui sont toutes deux également immergées dans ledit bain, via au moins une prise de contact électrique émergeant dudit bain et préalablement formée sur ledit substrat, qui relie la ou les électrode(s) immergée(s) à l'électrode de travail du potentiostat.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, l'on immerge dans ledit bain ladite électrode de référence et ladite contre-électrode de part et d'autre dudit microsystème.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, l'on intègre ladite électrode de référence et ladite contre-électrode au substrat du microsystème, préalablement à l'étape a) précitée, ce qui permet d'intégrer directement la cellule électrolytique au microsystème et également de minimiser la quantité d'électrolyte nécessaire à la polymérisation (il suffit en effet que le bain électrolytique recouvre la zone du substrat où sont situées les électrodes à revêtir de la couche polymérique).

On notera que l'application d'un potentiel électrique sur une ou plusieurs électrode(s) du substrat permet de choisir le ou les plot(s) sur le(s)quel(s) le polymère conducteur sera déposé et les composés adsorbés.

On notera également qu'aucun masquage des plots de fixation n'est nécessaire, puisque c'est l'application d'un potentiel électrique sur les électrodes choisies du microsystème qui va permettre le dépôt localisé dudit polymère conducteur.

Selon un exemple particulièrement avantageux de réalisation de l'invention, l'on met en oeuvre cette étape a) simultanément sur un ou plusieurs groupe(s) d'électrodes dudit réseau.

Selon cet exemple de l'invention, lors de l'étape de fabrication
5 préalable dudit microsystème, on peut relier ledit ou chaque groupe d'électrodes à une ligne commune de remontée du courant qui est connectée électriquement à ladite ou à chaque prise de contact électrique, en vue de fixer simultanément ladite couche polymérique sur les électrodes du ou de chaque groupe puis lesdits composés sur le réseau, selon un arrangement qui
10 est prédéterminé par la structure du microsystème.

En variante selon cet exemple de l'invention, lors de l'étape a), on peut relier les prises de contact électrique, qui sont respectivement connectées aux électrodes immergées du ou de chaque groupe, à une ligne commune de sortie électrique qui est elle-même connectée à l'électrode de
15 travail du potentiostat, en vue de fixer simultanément ladite couche polymérique sur les électrodes du ou de chaque groupe puis lesdits composés sur le réseau, selon un arrangement variable qui est alors indépendant de la structure du microsystème.

On notera que cette variante permet de choisir parmi
20 l'ensemble des électrodes présentes sur le substrat, celles correspondant aux plots de composés à fixer, et donc de réaliser par exemple différents réseaux de protéines avec une même biopuce de départ.

Toujours en référence audit exemple de l'invention, l'on peut incorporer au substrat du microsystème un circuit microélectronique de
25 multiplexage conçu pour déterminer le(s) groupe(s) d'électrodes destiné(s) à recevoir le potentiel électrique adapté, pour l'obtention de ladite couche polymérique hydrophobe sur chaque électrode dudit ou de chaque groupe.

Dans ce cas, l'on peut obtenir simultanément suite à l'étape b) précitée plusieurs arrangements correspondant respectivement à différents
30 composés fixés sur lesdits groupes d'électrodes et formant par exemple autant de biopuces à protéines multiples.

On notera que l'utilisation d'un substrat en silicium permet de réaliser ledit circuit microélectronique de multiplexage, et que l'avantage de ce circuit devient prépondérant dès lors que l'on a plusieurs dizaines de plots (i.e. d'électrodes) à relier ensemble pour l'étape de polymérisation électrochimique.

On notera également que le procédé de l'invention permet de réaliser plusieurs réseaux de composés différents en même temps. Comme les techniques de micro-fabrication collectives permettent de réaliser plusieurs puces identiques sur un même substrat, la présente invention permet de déposer le(s) polymère(s) conducteur(s) sur toutes les puces d'un même substrat, dès lors que l'on utilise un substrat en silicium muni d'un multiplexeur. Par la connexion de toutes les électrodes et des puces sur lesquelles on désire déposer ce(s) polymère(s) conducteur(s), on peut ainsi fabriquer simultanément plusieurs centaines de biopuces à protéines.

15

Un microsystème selon l'invention est de type à réseau micrométrique de composés à liaisons peptidiques, tel qu'une biopuce à réseau de protéines multiples, ce microsystème comportant un réseau d'électrodes qui recouvrent un substrat et qui sont au moins en partie surmontées d'une couche polymérique conductrice hydrophobe à laquelle sont fixés lesdits composés.

Selon la présente invention, lesdits composés, tels que des protéines, sont fixés par adsorption à la surface de ladite couche essentiellement via des liaisons hydrophobes, et cette fixation est susceptible d'être obtenue par le procédé précité selon l'invention.

25

Parmi les protéines utilisables, on peut notamment citer :

- les protéines de la matrice extracellulaire telles que le fibronectine, la vitronectine, les collagènes, les laminines, ainsi que les fragments des protéines précitées ; et

30

- les anticorps monoclonaux (tous les anticorps testés à ce jour ayant gardé leur fonctionnalité).

On notera que la solution utilisée pour ledit milieu peptidique, tel qu'un milieu protéinique, doit être aqueuse et est incompatible avec la présence de détergents. Afin de faciliter le mouillage de la couche polymérique hydrophobe, on peut ajouter 10 % d'éthanol si nécessaire. On
5 utilise de préférence à titre de tampon le « PBS » (« Phosphate Saline Buffer » ou tampon phosphate salé), et les concentrations protéiques utilisées pour le recouvrement de la couche polymérique hydrophobe peuvent varier de 1 µg/ml à 20 µg/ml.

Concernant les épaisseurs pouvant être obtenues selon
10 l'invention pour la couche hydrophobe et pour le film protéinique le recouvrant, on notera que les cellules ne « ressentent » pas le relief du support sur des épaisseurs inférieures ou égales à 50 nm. Les électrodes étant avantageusement constituées de cavités formées dans ladite couche de passivation, le polymère hydrophobe comblera au plus ces cavités. Quant à
15 l'épaisseur du film protéinique déposé, elle peut varier de 5 nm à 10 nm.

Les caractéristiques précitées de la présente invention, ainsi que d'autres, seront mieux comprises à la lecture de la description suivante de plusieurs exemples de réalisation de l'invention, donnés à titre illustratif et non limitatif, ladite description étant réalisée en relation avec les dessins
20 joints, parmi lesquels :

la figure 1 est une vue schématique de dessus illustrant un microsystème de départ fabriqué par une technique de micro-fabrication et sur les électrodes duquel on se propose de mettre en œuvre le procédé de fixation selon l'invention,

25 la figure 2 est une vue schématique en coupe de ce microsystème de départ selon le plan II-II de la figure 1,

la figure 3 est une vue schématique en coupe d'un détail de la figure 2,

la figure 4 est une vue schématique de côté d'un dispositif
30 pour la mise en œuvre de la première étape du procédé de fixation selon l'invention, ce dispositif étant appliqué au microsystème de la figure 1,

la figure 5 est une vue schématique de dessus du microsystème obtenu à l'issue de cette première étape au moyen du dispositif de la figure 4,

la figure 6 est une vue schématique de dessus illustrant la seconde étape du procédé de fixation selon l'invention appliquée au microsystème de la figure 5,

la figure 7 est une vue schématique de dessus d'un microsystème obtenu à l'issue de cette seconde étape et pourvu d'un plot de composés fixés au-dessus d'une électrode,

la figure 8 est une vue schématique de dessus d'un microsystème obtenu à l'issue d'une pluralité de séquences successives appliquées au microsystème de la figure 1, incluant chacune la mise en œuvre de ces première et seconde étapes illustrées aux figures 4 et 6,

la figure 9 est une vue schématique de dessus d'un premier mode de réalisation selon l'invention pour appliquer simultanément la première étape de la figure 4 à un groupe d'électrodes prédéterminé, et

la figure 10 est une vue schématique de dessus d'un second mode de réalisation selon l'invention pour appliquer simultanément la première étape de la figure 4 à un groupe d'électrodes déterminé *a posteriori*.

Comme illustré à la figure 1, on utilise un microsystème de départ 1 qui est destiné à former une biopuce à réseau de protéines multiples et qui comporte initialement, au terme d'une étape préalable de micro-fabrication, un réseau d'électrodes métalliques 2a, 2b sur un substrat ou support 3 (voir figure 2, un nombre réduit d'électrodes 2a, 2b étant représenté pour des raisons de clarté, étant entendu que le microsystème 1 peut en comprendre une multitude). On réalise ces électrodes 2 de manière connue, par exemple via une photolithographie et gravure du métal. On notera que la taille des électrodes 2 et leur espacement sur le substrat 3 ne dépend que de la résolution des techniques de fabrication et peut atteindre avantageusement quelques dixièmes de microns. Les électrodes 2 sont respectivement reliées à des prises de contact électrique 4 par des lignes 5 de remontée du courant.

De plus, comme illustré aux figures 1 à 3, on dépose sur ce réseau d'électrodes 2 une couche de passivation isolante 6 que l'on grave partiellement en vue de la première étape du procédé selon l'invention consistant à déposer un polymère conducteur électronique uniquement sur ces électrodes 2a, 2b. Ce dépôt de la couche de passivation 6 permet d'éviter le dépôt de ce polymère conducteur sur la totalité de la connectique métallique incluant notamment les prises 4 et les lignes 5, il permet de définir la surface utile de chaque électrode 2a, 2b destinée à recevoir le polymère conducteur (l'ouverture de la couche de passivation 6 sur chaque électrode 2a, 2b déterminant cette surface utile).

Cette couche de passivation 6 peut être réalisée en un polymère photosensible, comme par exemple un polyimide, ou bien en un nitrure de silicium ou un oxyde de silicium.

Pour mettre en œuvre cette première étape selon l'invention, on procède, comme illustré à la figure 4, à un trempage du microsystème 1 de la figure 3 dans une solution électrolytique 7 contenant le monomère conducteur hydrophobe à polymériser, tel que du pyrrole ou un de ses dérivés, et en outre un sel électrolytique (par exemple du perchlorate de lithium) prévu pour assurer le transport ionique dans la solution 7 en cours de dépôt du polymère. On utilise à cet effet un dispositif de dépôt électrochimique 10 constitué d'un potentiostat 11 qui est pourvu d'une borne ou électrode de travail 12 destinée à être connectée à la ou à chaque prise de contact électrique 4 de l'électrode 2a, 2b correspondante du microsystème 1, lorsque cette dernière est immergée dans la solution électrolytique 7. Ce potentiostat 11 est également pourvu, de manière usuelle, d'une électrode de référence 13 et d'une contre-électrode 14 toutes deux destinées à être immergées dans la solution 7 (l'électrode de référence 13 et la contre-électrode 14 sont connectées aux deux autres bornes 13a et 14a du potentiostat 11).

Comme cela est visible à la figure 4, le trempage du microsystème 1 dans le bain constitué de la solution 7 est tel que les prises de contact 4 émergent de ce bain pour l'application d'un potentiel électrique déterminé (de 0,8 V à 1,5 V par rapport à la référence, pendant un temps de 1

seconde à 10 secondes) sur l'électrode immergée 2a via l'électrode de travail 12 du potentiostat 11, et que l'électrode de référence 13 et la contre-électrode 14 sont partiellement immergées à proximité immédiate du microsysteme 1, pour polymériser par électrolyse le monomère conducteur sur l'électrode 2a.

5 Comme illustré à la figure 5, on obtient ainsi, après avoir retiré le microsysteme 1 du bain électrolytique puis l'avoir rincé, un dépôt d'une couche polymérique hydrophobe 15 (d'épaisseur comprise entre 100 nm et 1 µm) sur l'électrode 2a ainsi connectée au potentiostat 11.

Pour mettre en œuvre la seconde étape du procédé de
10 fixation selon l'invention, on procède ensuite, comme illustré à la figure 6, à une immersion du microsysteme 1 obtenu à la figure 5 dans une solution 16 contenant la protéine que l'on se propose de déposer sur la surface utile ou plot de l'électrode 2a préalablement recouverte de la couche polymérique hydrophobe 15.

15 Après rinçage, on obtient le film protéinique 17 illustré à la figure 7 qui recouvre le plot de l'électrode 2a en surmontant la couche polymérique hydrophobe 15 et dans lequel les molécules de la protéine déposée sont fixées par adsorption au polymère conducteur par des liaisons hydrophobes.

20 En répétant cette séquence d'étapes respectivement destinées à former la couche polymérique 15 et le film protéinique 17, il est possible de déposer autant de protéines différentes qu'on le souhaite sur les plots sélectionnés sur le microsysteme 1, comme illustré à la figure 8 où sont représentés à titre d'exemple quatre films 17a-17d de protéines différentes
25 surmontant respectivement quatre électrodes 2a-2d du microsysteme 1, formant ainsi une biopuce incorporant différentes protéines.

Pour réaliser un réseau de protéines multiples, on peut choisir de déposer la couche polymérique hydrophobe 15 sur plusieurs électrodes
30 2a-2c en même temps.

A cet effet, comme illustré à la figure 9, on peut relier lors de l'étape préalable de micro-fabrication ces électrodes 2a-2c entre elles et à une

ligne commune 18 de remontée du courant électrique vers une prise de contact 4, de sorte à appliquer simultanément un même potentiel électrique à ces électrodes 2a-2c via l'électrode de travail 12 du potentiostat 11.

5 En variante, comme illustré à la figure 10, on peut relier les prises de contact 4 respectives des électrodes 2a-2c entre elles par une ligne commune 19 de sortie électrique au moment de procéder à la première étape de dépôt électrolytique, toujours en vue d'appliquer un même potentiel à ces électrodes 2a-2c. Cette variante permet notamment de choisir l'emplacement des plots de protéines à fixer parmi l'ensemble des électrodes présentes sur
10 le substrat 3, et donc de réaliser différents réseaux protéiques avec une même biopuce de départ.

Exemple de protocole de réalisation d'une biopuce à réseau de protéines multiples :

15

Le protocole de fabrication ci-après d'une biopuce selon l'invention est donné à titre d'exemple. La succession des étapes décrites permet d'obtenir une fixation (« patterning ») de différentes protéines sur la surface de la biopuce. On va décrire les étapes successives aboutissant à la
20 fixation de deux protéines sur la puce. Bien évidemment, si l'on poursuivait les étapes décrites ci-après, il serait possible de fixer plus de deux protéines.

La fabrication de la biopuce ayant été décrite ci-dessus en relation avec le microsystème selon l'invention, on a fait figurer dans le tableau 1 ci-après les étapes biologiques utilisées lors de la fonctionnalisation
25 de la puce.

Tableau 1 :

N° ETAPE	Produit utilisé	Protocole d'utilisation
1	« BSA » (« Bovin serum albumine » ou Sérum Albumine Bovine en français)	Concentration 2 mg/ml. Immersion de la puce pendant une heure à 37° C.
2	lavage « PBS » (tampon phosphate salé)	Concentrations : Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 1,5mM, NaCl 137 mM, KCl 3 mM, pH 7,2
3	Rinçage eau déionisée	Jusqu'à résistivité supérieure à 10 M Ω
4	Dépôt d'un polypyrrole (octadécylpyrrole)	Concentrations : 20 mM dans Perchlorate de lithium aqueux 0,1 M. Dépôt électrochimique potentiostatique 1,2 V / « SCE » (électrode au calomel saturé) pendant 5 secondes
5	Fixation protéine N° 1	1 heure à 37° C « PBS » solution contenant 10 % d'éthanol.
6	3 Lavages « PBS »	5 minutes
7	« BSA » (Sérum Albumine Bovine)	1 heure à 37° C
8	« Pluronic F127 »	Solution aqueuse à 4 % (m/v) durée 1 heure et température 37° C
9	3 lavages « PBS »	5 minutes
10	Rinçage eau déionisée	Jusqu'à résistivité supérieure à 10 M Ω
11	Dépôt d'un polypyrrole (octadécylpyrrole)	Concentration : 20 mM dans Perchlorate de lithium aqueux 0,1 M. Dépôt électrochimique potentiostatique 1,2 V / « SCE » pendant 5 secondes
12	Fixation protéine N° 2	1 heure à 37° C « PBS » solution contenant 10 % d'éthanol.
13	3 lavages « PBS »	5 minutes
14	« BSA » (Sérum Albumine Bovine)	1 heure à 37° C
15	« Pluronic F127 »	Solution aqueuse à 4 % (m/v) durée 1 heure et température 37° C
16	3 Lavages « PBS »	5 minutes
17	Rinçage eau déionisée	Jusqu'à résistivité supérieure à 10 M Ω .

Dans ce tableau 1, les étapes 4 à 10 et les étapes 11 à 17
5 représentent respectivement une première et une seconde fixation de protéines.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fixation d'un ou plusieurs composé(s) à liaisons peptidiques, tels que des protéines, sur un microsystème (1) comportant un réseau d'électrodes (2a-2d) recouvrant un substrat (3), caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'étapes suivantes:

a) un dépôt électrolytique sur l'une au moins de ces électrodes d'une couche polymérique (15) à base d'au moins un polymère conducteur électronique de type hydrophobe, via une mise en contact de la ou des électrode(s) avec un électrolyte (7) comprenant un monomère à polymériser, puis

b) une mise en contact de la couche polymérique hydrophobe ainsi obtenue avec un milieu peptidique (16) contenant le(s)dit(s) composé(s) à fixer, pour immobiliser ce(s) dernier(s) sur ledit réseau essentiellement par des liaisons hydrophobes.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on immobilise le(s)dit(s) composé(s) à l'étape b) par adsorption non spécifique, en immergeant la ou les électrode(s) (2a-2d) recouverte(s) de ladite couche polymérique hydrophobe (15) dans ledit milieu (16), tel qu'une solution protéinique, pour former un film (17, 17a-17d) à base de ce(s) composé(s) qui recouvre ladite couche.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit microsystème (1) forme un réseau de type micrométrique présentant un arrangement de protéines multiples.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la surface utile des électrodes (2a-2d) recevant lesdites protéines présente une dimension caractéristique inférieure à 10 μm , ledit réseau étant compatible avec une fixation de cellules biologiques entre les surfaces utiles des électrodes recevant ces différentes protéines.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre, antérieurement à l'étape a), un dépôt d'une couche isolante de passivation (6) entre lesdites électrodes (2a-2d) et en

recouvrement partiel sur ces dernières, la couche de passivation étant ouverte sur chaque électrode de sorte à définir la surface utile de celle-ci.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite couche de passivation (6) est à base d'un polymère photosensible, tel qu'un polyimide, ou bien à base d'un nitrure de silicium ou d'un oxyde de silicium.

7. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on met en œuvre l'étape a) en appliquant un potentiel électrique adapté à la ou aux électrode(s) (2a-2d) se trouvant à l'état immergé dans un bain à base dudit électrolyte (7) en solution, pour l'obtention de ladite couche polymérique hydrophobe (15).

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit bain comprend en outre au moins un sel électrolytique pour assurer le transport ionique dans ladite solution en cours de dépôt dudit polymère.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que l'on met en œuvre l'étape a) en connectant cette ou ces électrode(s) (2a-2d) immergée(s) à une électrode de travail (12) d'un potentiostat (11), lequel est en outre pourvu d'une électrode de référence (13) et d'une contre-électrode (14) qui sont toutes deux également immergées dans ledit bain (7), via au moins une prise de contact électrique (4) émergeant dudit bain et préalablement formée sur ledit substrat (3) qui relie la ou les électrode(s) immergée(s) à ladite électrode de travail.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on immerge dans ledit bain (7) ladite électrode de référence (13) et ladite contre-électrode (14) de part et d'autre dudit microsystème (1).

11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on intègre ladite électrode de référence (13) et ladite contre-électrode (14) au substrat (3) dudit microsystème (1), préalablement à l'étape a).

12. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on met en œuvre l'étape a) simultanément sur un ou plusieurs groupe(s) d'électrodes (2a-2d) dudit réseau.

13. Procédé selon les revendications 9 et 12, caractérisé en ce que, lors de l'étape de fabrication préalable dudit microsystème (1), on relie ledit ou chaque groupe d'électrodes (2a-2d) à une ligne commune de remontée du courant (18) qui est connectée électriquement à ladite ou à
5 chaque prise de contact électrique (4), en vue de fixer simultanément ladite couche polymérique (15) sur les électrodes du ou de chaque groupe puis lesdits composés sur ledit réseau, selon un arrangement qui est prédéterminé par la structure du microsystème.

14. Procédé selon les revendications 9 et 12, caractérisé en
10 ce que, lors de l'étape a), on relie lesdites prises de contact électrique (4), qui sont respectivement connectées aux électrodes (2a-2d) immergées dudit ou de chaque groupe, à une ligne commune de sortie électrique (19) qui est elle-même connectée à l'électrode de travail (12) dudit potentiostat (11), en vue de fixer simultanément ladite couche polymérique (15) sur les électrodes du ou
15 de chaque groupe puis lesdits composés sur ledit réseau selon un arrangement variable qui est indépendant de la structure du microsystème (1).

15. Procédé selon la revendication 7 et une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que l'on incorpore au substrat (3) dudit microsystème (1) un circuit microélectronique de multiplexage conçu
20 pour déterminer le(s) groupe(s) d'électrodes (2a-2d) destiné(s) à recevoir ledit potentiel électrique adapté, pour l'obtention de ladite couche polymérique hydrophobe (15) sur chaque électrode dudit ou de chaque groupe.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'on obtient simultanément suite à l'étape b) plusieurs arrangements
25 correspondant respectivement à différents composés fixés sur lesdits groupes d'électrodes (2a-2d) et formant par exemple autant de biopuces à protéines multiples.

17. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on répète la séquence d'étapes a) et b) autant de fois
30 qu'il y a de composés différents à fixer sur les électrodes (2a-2d) dudit réseau.

18. Microsystème (1) à réseau micrométrique de composés à liaisons peptidiques, tel qu'une biopuce à réseau de protéines multiples, ledit

microsystème comportant un réseau d'électrodes (2a-2d) qui recouvrent un substrat (3) et qui sont au moins en partie surmontées d'une couche polymérique conductrice hydrophobe (15) à laquelle sont fixés lesdits composés, caractérisé en ce que lesdits composés sont fixés par adsorption à la surface de ladite couche essentiellement via des liaisons hydrophobes.

1/4

Fig. 1

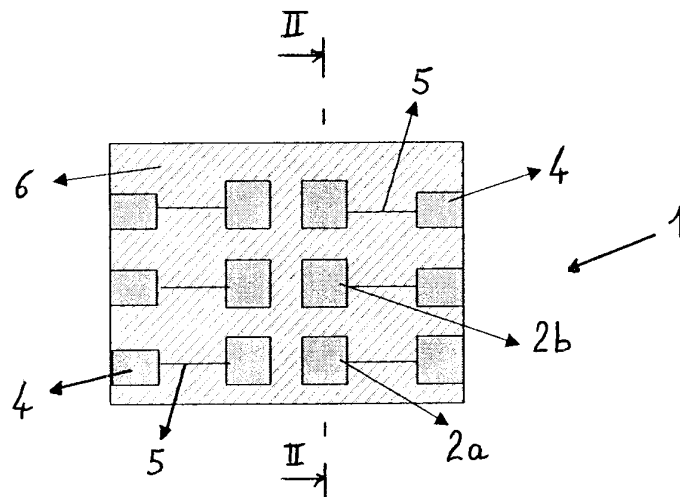


Fig. 2

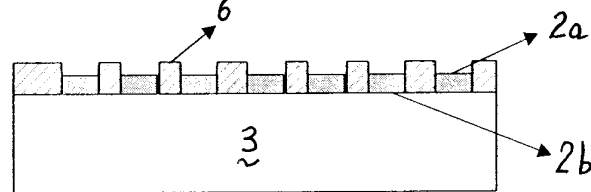
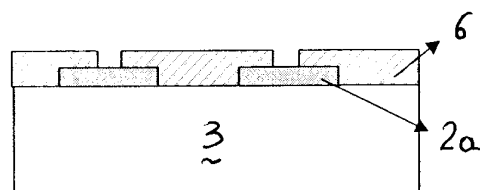
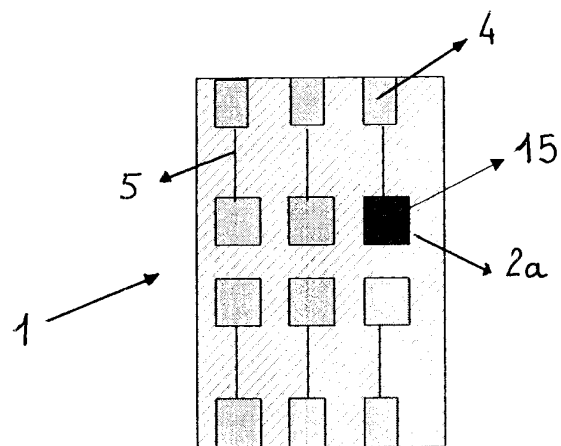
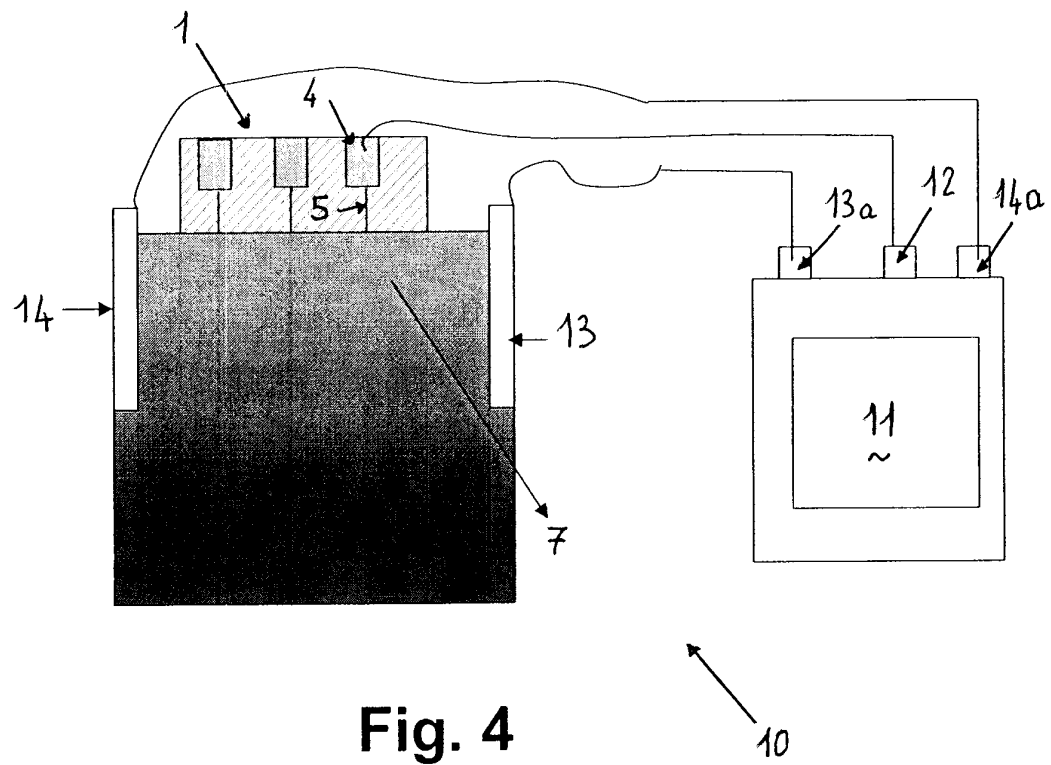
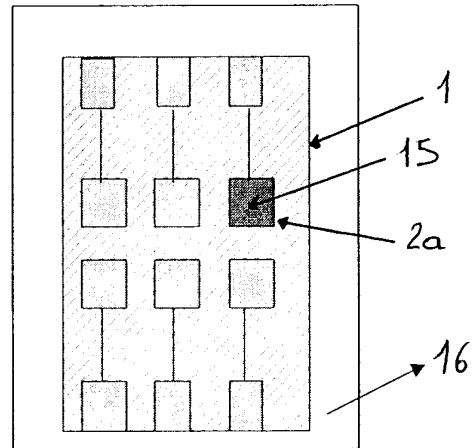
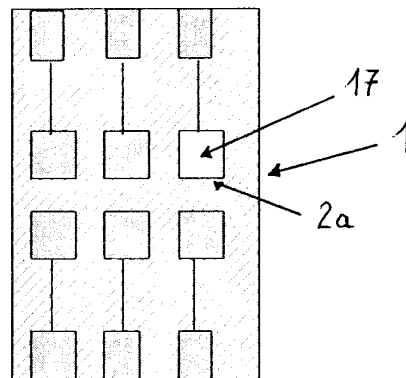
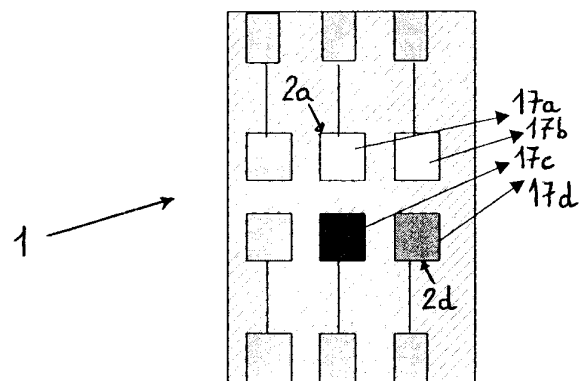


Fig. 3



2/4



3/4**Fig. 6****Fig. 7****Fig. 8**

4/4

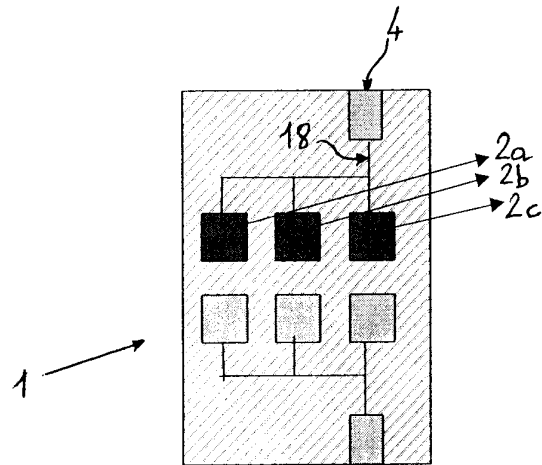


Fig. 9

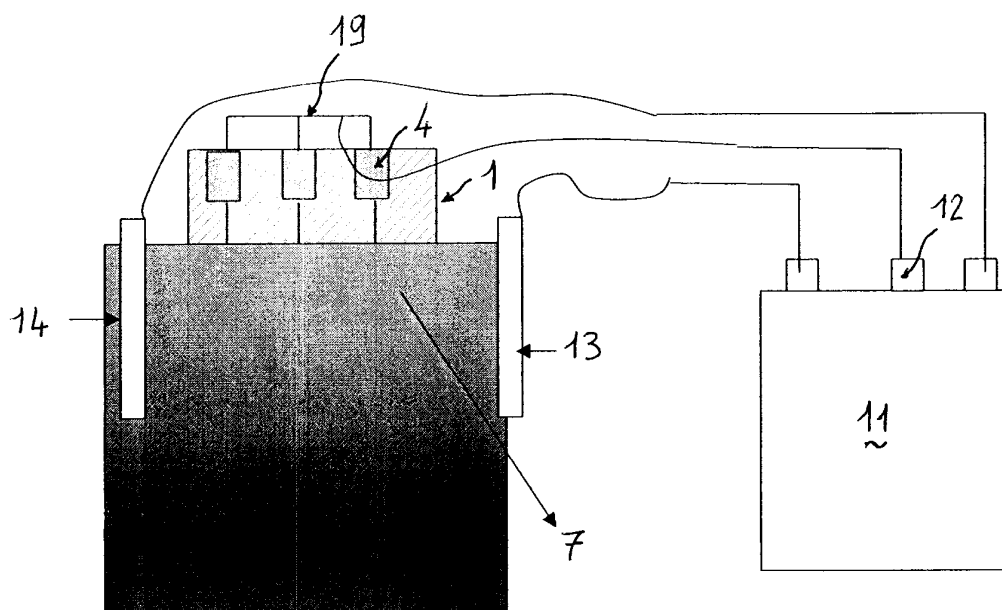


Fig. 10



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 693188
FR 0703722

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	EP 1 616 939 A (NAT INST FOR ENVIRONMENTAL STU [JP]; MOCHITATE KATSUMI [JP]) 18 janvier 2006 (2006-01-18) * le document en entier *	1-18	B01L3/00 C07K17/00 G01N33/543
A	EP 0 402 917 A (BIOCIRCUITS CORP [US]) 19 décembre 1990 (1990-12-19) * le document en entier *	1-18	
A	WO 03/072752 A (MIRAGENE INC [US]) 4 septembre 2003 (2003-09-04) * le document en entier *	1-18	
A	FR 2 784 466 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 14 avril 2000 (2000-04-14) * le document en entier *	1-18	
A	US 6 090 545 A (WOHLSTADTER JACOB [US] ET AL) 18 juillet 2000 (2000-07-18) * le document en entier *	1-18	
A	FR 2 781 886 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 4 février 2000 (2000-02-04) * le document en entier *	1-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) B01J G01N C07K B01L
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 janvier 2008		Skowronski, Maik	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0703722 FA 693188

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **16-01-2008**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1616939	A	18-01-2006	WO 2004085606 A1	07-10-2004
			US 2006263878 A1	23-11-2006

EP 0402917	A	19-12-1990	AT 145064 T	15-11-1996
			CA 2019039 A1	15-12-1990
			DE 69029060 D1	12-12-1996
			DE 69029060 T2	30-04-1997
			JP 2874964 B2	24-03-1999
			JP 3128449 A	31-05-1991
			US 5156810 A	20-10-1992

WO 03072752	A	04-09-2003	AU 2003212471 A1	09-09-2003
			EP 1520037 A2	06-04-2005

FR 2784466	A	14-04-2000	EP 1121588 A1	08-08-2001
			WO 0022425 A1	20-04-2000
			JP 2002527747 T	27-08-2002

US 6090545	A	18-07-2000	AU 720625 B2	08-06-2000
			AU 5420596 A	02-10-1996
			BR 9607193 A	11-11-1997
			CA 2213854 A1	19-09-1996
			CN 1186513 A	01-07-1998
			CN 1661115 A	31-08-2005
			CZ 9702844 A3	14-10-1998
			EA 1198 B1	25-12-2000
			EP 0821726 A1	04-02-1998
			HU 9801679 A2	28-10-1998
			JP 11502617 T	02-03-1999
			JP 2006047321 A	16-02-2006
			NZ 306051 A	29-11-1999
			TW 555852 B	01-10-2003
			WO 9628538 A1	19-09-1996
			US 6066448 A	23-05-2000

FR 2781886	A	04-02-2000	EP 1101102 A2	23-05-2001
			WO 0007728 A2	17-02-2000
			JP 2002522749 T	23-07-2002
			US 6630359 B1	07-10-2003
