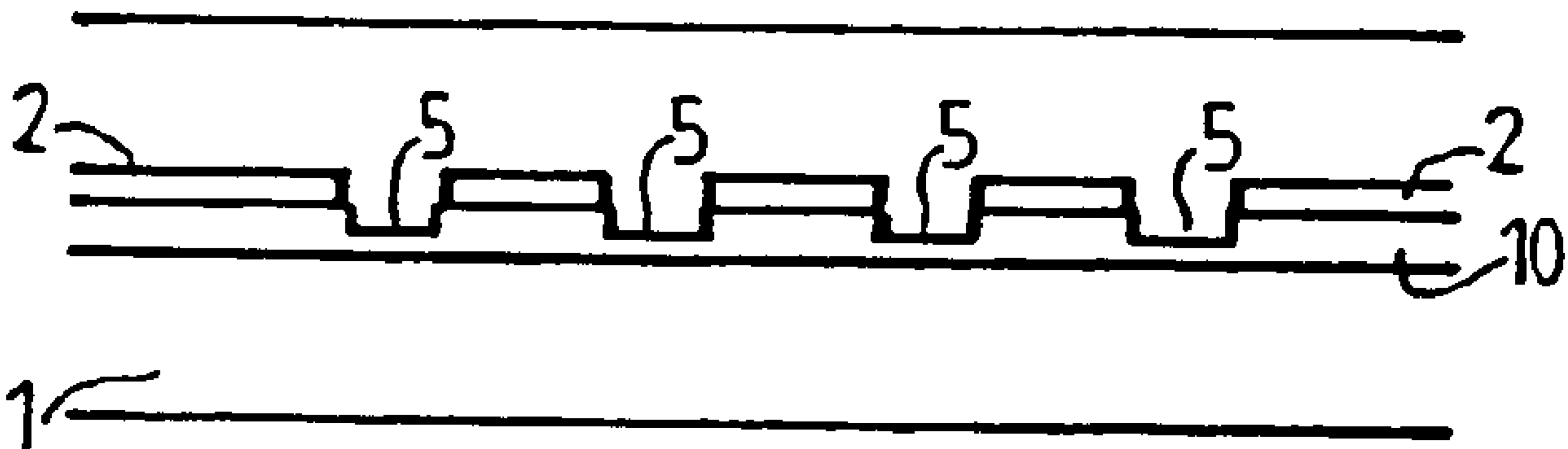




(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2002/07/05
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2003/01/30
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2012/01/10
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2004/01/06
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2002/002365
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2003/008975
(30) Priorité/Priority: 2001/07/11 (FR01/09245)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *G01N 33/543* (2006.01),
G01N 21/64 (2006.01)
(72) Inventeurs/Inventors:
MARTIN, JEAN-RENE, FR;
GARRIGUES, MICHEL, FR;
CHAUVET, JEAN-PAUL, FR;
BRAS, MARLENE, FR;
BESSUEILLE, FRANCOIS, FR;
SOUTEYRAND, ELIANE, FR;
...
(73) Propriétaires/Owners:
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR; ...

(54) Titre : BIOPUCE ET SON PROCEDE DE FABRICATION
(54) Title: BIOCHIP AND THE PRODUCTION METHOD THEREOF



(57) Abrégé/Abstract:

L'invention est relative à une biopuce comprenant un substrat présentant une surface principale réfléchissante caractérisée en ce que la surface principale présente des sites rendus sensibles à une détection de fluorescence par une couche transparente d'épaisseur $(2k+1)\lambda/4$, avec k entier positif ou nul, λ désignant une longueur d'onde comprise entre une longueur d'onde λ_0 d'excitation de fluorescence, et une longueur d'onde λ_1 d'émission de fluorescence. Elle peut être fabriquée en déposant sur un substrat une couche transparente d'épaisseur $m\lambda/2$ et en réalisant dans cette couche des puits ou des plots d'épaisseur $(2k+1)\lambda/4$ pour former les sites sensibles.



(72) Inventeurs(suite)/Inventors(continued): CABRERA, MICHEL, FR; CLOAREC, JEAN-PIERRE, FR

(73) Propriétaires(suite)/Owners(continued): ECOLE CENTRALE DE LYON, FR

(74) Agent: ROBIC

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
30 janvier 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/008975 A2(51) Classification internationale des brevets⁷ :**G01N 33/543**

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/02365

(22) Date de dépôt international : 5 juillet 2002 (05.07.2002)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

01/09245

11 juillet 2001 (11.07.2001) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). **ECOLE CENTRALE DE LYON** [FR/FR]; 36, avenue Guy de Collongue, B.P. 163, F-69131 Ecully Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **MARTIN, Jean-René** [FR/FR]; 66, rue de Bellevue, F-69380 Lozanne (FR). **GARRIGUES, Michel** [FR/FR]; 15, rue des Alouettes, F-69890 La Tour de Salvagny (FR). **CHAUVET, Jean-Paul** [FR/FR]; 17, chemin de la Ferlatière,

F-69370 Saint Didier au Mont d'OR (FR). **BRAS, Marlène** [FR/FR]; 14, avenue de la Constellation, F-69160 Tassin la Demi Lune (FR). **BESSUEILLE, François** [FR/FR]; 38, rue des Jardins, F-69830 Saint Georges (FR). **SOUTEYRAND, Eliane** [FR/FR]; 17, route de Seur, F-41120 Cellettes (FR). **CABRERA, Michel** [FR/FR]; 42, rue Villon, F-69008 Lyon (FR). **CLOAREC, Jean-Pierre** [FR/FR]; 11, rue Mourguet, F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataires : **CABINET ORES** etc.; 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

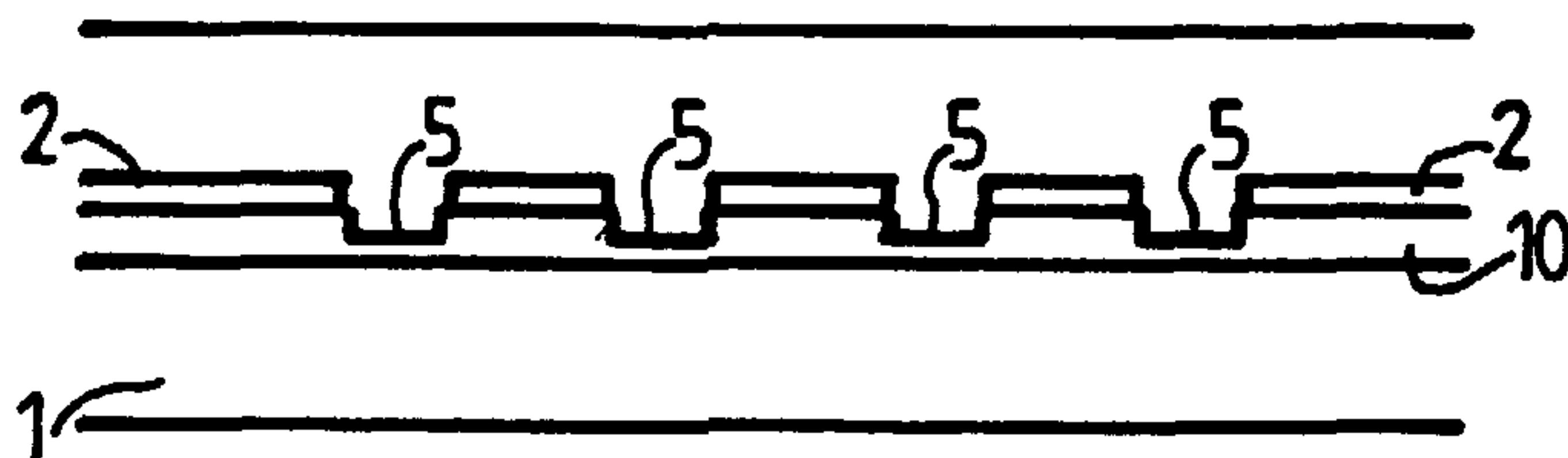
(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: BIOCHIP AND THE PRODUCTION METHOD THEREOF

(54) Titre : BIOPUCE ET SON PROCEDE DE FABRICATION

bumps of thickness $(2k+1)\lambda/4$ in said layer in order to form sensitive areas.

(57) Abrégé : L'Invention est relative à une biopuce comprenant un substrat présentant une surface principale réfléchissante caractérisée en ce que la surface principale présente des sites rendus sensibles à une détection de fluorescence par une couche transparente d'épaisseur $(2k+1)\lambda/4$, avec k entier positif ou nul, λ désignant une longueur d'onde comprise entre une longueur d'onde λ_0 d'excitation de fluorescence, et une longueur d'onde λ_1 d'émission de fluorescence. Elle peut être fabriquée en déposant sur un substrat une couche transparente d'épaisseur $m\lambda'/2$ et en réalisant dans cette couche des puits ou des plots d'épaisseur $(2k+1)\lambda/4$ pour former les sites sensibles.

(57) Abstract: The invention relates to a biochip comprising a substrate having a main reflective surface. The inventive biochip is characterised in that the main surface is provided with areas that are made sensitive to fluorescence detection by a transparent layer of thickness $(2k+1)\lambda/4$, wherein k is a positive integer or zero, λ denotes a wavelength that is included between a fluorescence excitation wavelength λ_0 and a fluorescence emission wavelength λ_1 . Said biochip can be produced by depositing a transparent layer of thickness $m\lambda'/2$ on a substrate and creating pits or



WO 03/008975 A2

WO 03/008975 A2



Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

BIOPUCE ET SON PROCEDE DE FABRICATION

La présente invention a pour objet une biopuce d'un type permettant une détection de sondes biologiques ou biochimiques par fluorescence, ainsi que son procédé de fabrication.

5 Les biopuces sont des outils d'analyse très performants dans les domaines touchant à la biologie moléculaire. Leur technologie d'élaboration est progressivement, en train de se mettre en place. Leur utilisation permettra d'accélérer la Recherche et débouchera, en particulier, sur de nouvelles techniques de diagnostic.

10 Une biopuce est un ensemble de systèmes de substances biologiques de reconnaissance, telles que les molécules biologiques, fonctionnant en parallèle. Parmi les biopuces, les puces à ADN sont celles qui actuellement sont les plus développées et sur lesquelles sont fondées de grands espoirs pour décupler les efforts de reconnaissance dans le domaine
15 de la Génétique Moléculaire.

Physiquement, les biopuces sont des structures constituées d'un support solide sur lequel sont distribuées des zones distinctes, en général de dimensions microscopiques, supportant des substances biologiques sondes identiques de reconnaissance, chaque zone ou site
20 comprenant un seul type de substances, pouvant être d'origine biologique ou biochimique. La reconnaissance est assurée par une interaction affine spécifique entre la substance sonde fixée sur le support et la substance cible contenue dans la solution à analyser. La lecture de la biopuce est réalisée par le marquage de la substance cible, au moyen d'un marqueur, le plus souvent,
25 fluorescent. Lors de la reconnaissance, la substance cible apporte sur la zone supportant la substance sonde, son marqueur. La connaissance de la nature de la sonde permet de connaître la substance cible avec laquelle l'interaction affine s'est réalisée.

L'invention vise à améliorer, d'une part, la qualité technique
30 de la biopuce et d'autre part à améliorer la qualité de la lecture par fluorescence.

La fixation de molécules, telles que des oligonucléotides ou des brins d'ADN, sur le support, pour la réalisation de la biopuce, fait appel à des réactions chimiques ayant lieu à la surface du solide. Le plus souvent, la
35 molécule biologique sonde à fixer est en solution. Selon les propriétés de surface relatives du support et de la solution, qui contient les sondes à fixer,

la solution déposée peut avoir la propension à s'étaler sur le substrat en rendant impossible l'obtention de zones d'intérêt de taille contrôlée et de faible dimension.

De la même façon, la synthèse directe localisée de molécules biologiques, telles que les oligonucléotides, peut être réalisée par le dépôt localisé, sur la surface du substrat, d'une partie des réactifs et notamment des phosphoramidites. Ces divers réactifs sont le plus souvent en solution dans un solvant tel que l'acétonitrile. Ce solvant a la propriété d'être très mouillant, ce qui entraîne, si l'on ne prend pas les précautions nécessaires, un étalement des réactifs sur la surface. Ainsi, ces propriétés empêchent d'obtenir la maîtrise de l'aire de synthèse et donc la définition géométrique des zones d'intérêt.

D'autre part, l'analyse est réalisée en mettant en contact la biopuce avec une solution qui contient les molécules cibles marquées, préalablement ou postérieurement au contact, avec un groupement fluorescent (ou éventuellement marquées de manière radioactive). La reconnaissance résulte d'un couplage biochimique relativement fort entre la sonde et l'analyte (par la formation de liaisons hydrogène, par exemple). L'analyte est ainsi fixé sur le plot de reconnaissance et peut être identifié par la connaissance de la sonde couplée, immobilisée sur ce plot ou site.

Parallèlement à cette reconnaissance spécifique, les molécules cibles peuvent, selon la nature du support, se fixer de manière non sélective sur celui-ci (le plus souvent par un processus d'adsorption). Ce phénomène parasite a pour effet de diminuer le rapport signal sur bruit de la lecture.

La présente invention a pour objet d'apporter une solution à ces problèmes pour améliorer la qualité biologique de la puce en jouant sur sa qualité optique.

De plus, selon une variante avantageuse, l'amélioration de la qualité physicochimique de la puce par une double fonctionnalisation localisée, peut permettre une meilleure définition géométrique des sites supportant les molécules biologiques sondes, tout en assurant l'identité de la taille des sites et leur alignement et en diminuant notablement l'adsorption non sélective des biomolécules cibles.

L'invention concerne ainsi une biopuce comprenant un substrat présentant une surface principale réfléchissante caractérisée en ce

que la surface principale présente des sites localisés recouvert d'une couche transparente favorisant la fluorescence, de sorte que les sites sont rendus sensibles à une détection de fluorescence émise par des molécules cibles marquées par un matériau fluorescent, dans laquelle la couche transparente
5 présente une épaisseur optique $(2k+1)\lambda/4$, avec k entier positif ou nul et λ désignant une longueur d'onde comprise entre une longueur d'onde λ_0 d'excitation de fluorescence du matériau fluorescent et une longueur d'onde λ_1 d'émission de fluorescence du matériau fluorescent, et en ce qu'en dehors des sites sensibles, la surface principale est recouverte d'une couche transparente
10 d'épaisseur différente de celle de la couche transparente recouvrant les sites sensibles, l'épaisseur en dehors des sites sensibles étant de $m\lambda'/2$ avec m entier positif et λ' désignant une longueur d'onde comprise entre λ_0 et λ_1 .

La biopuce peut être caractérisée en ce que la surface principale présente des sites rendus sensibles à une détection de fluorescence
15 par une couche transparente d'épaisseur optique $(2k+1)\lambda_1/4$, avec k entier positif ou nul, ce qui permet de favoriser l'émission fluorescente.

Préférentiellement, la surface principale est, en dehors des sites sensibles, recouverte d'une couche transparente d'épaisseur $m\lambda_0/2$, ce qui permet d'empêcher l'excitation de la fluorescence.

20 Selon un mode de réalisation avantageux, mettant en œuvre une silanisation localisée, la biopuce est caractérisée en ce qu'en dehors des sites sensibles, la surface du substrat est recouverte d'une première couche mince, notamment une monocouche de molécules, d'une première substance A comportant une chaîne hydrocarbonée de type $(CH_2)_p$ avec $1 < p < 30$ portant à
25 une extrémité un groupement d'accrochage, tel qu'un silane ou silanol, permettant la formation d'une liaison covalente avec le substrat et à l'autre extrémité une fonction chimique stable et inerte, par exemple CH_3 ou ses dérivés halogénés. Préférentiellement la première substance A est un silane hydrophobe.

30 Selon un mode de réalisation préféré, la biopuce est caractérisée en ce que les sites sensibles sont recouverts d'une deuxième couche mince, notamment une monocouche de molécules, d'une deuxième substance B présentant à une extrémité un groupement permettant une fixation par liaison covalente sur le substrat, par exemple une fonction silane ou silanol,
35 et à l'autre extrémité un groupement apte à fixer de façon covalente une molécule sonde, par exemple la fonction acide $COOH$ ou alcool OH .

Préférentiellement, ladite deuxième substance B est un silane hydrophile.

La biopuce peut être caractérisée en ce que la surface du substrat est recouverte d'une couche de ladite substance B, et en ce qu'en
5 dehors des sites sensibles, cette couche est recouverte d'une couche d'arrêt C inerte vis-à-vis de l'accrochage des substances biologiques.

L'invention concerne également un procédé de fabrication d'une biopuce telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il met en œuvre :

a) le dépôt sur le substrat de la couche transparente
10 d'épaisseur optique $m \lambda/2$; et

b) la réalisation dans ladite couche transparente de puits ou de plots dans lesquels l'épaisseur optique de la couche transparente est égale à $(2k+1)\lambda/4$, pour former lesdits sites sensibles.

Suivant les valeurs de k et de m, on pourra réaliser les sites
15 sensibles sous forme de puits ou de plots.

Préférentiellement, le procédé ci-dessous comprend en outre :

c) le dépôt par transfert sélectif d'une première couche mince d'une première substance A comportant une chaîne hydrocarbonée de type $(CH_2)_p$ avec $1 < p < 30$ portant à une extrémité un groupement d'accrochage
20 permettant la formation d'une liaison covalente avec le substrat et à l'autre extrémité une fonction chimique stable et inerte ; et

d) l'immersion du substrat dans une solution contenant une deuxième substance B présentant à une extrémité un groupement permettant une fixation sur le substrat par liaison covalente et à l'autre extrémité un
25 groupement apte à fixer de façon covalente une molécule sonde.

Dans le cas où les zones sensibles sont des plots, le procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

c') une double silanisation localisée par dépôt sélectif de la substance B sur les plots, ce dépôt étant éventuellement d'un traitement
30 thermique ; et

d') de l'immersion du support dans une solution contenant la substance A.

Selon un autre mode de réalisation, la double silanisation localisée est réalisée comme suit (après b) :

35 e) une couche de substance B est déposée sur la totalité de la surface du substrat par exemple par immersion dans la solution contenant la

substance B. La fonction destinée à fixer la substance sonde est ensuite déprotégée et activée.

f) une monocouche de molécules d'une substance d'arrêt C est ensuite déposée localement sur la surface, de manière à laisser les zones
5 sensibles nues.

Les molécules de la substance C comportent à une extrémité, une fonction qui réagit sur la fonction activée de la substance B. L'autre extrémité de la molécule comporte un groupement très inerte chimiquement, tel
10 que le groupement méthyl ou encore un groupement méthyl substitué par le fluor. Ainsi, seules les zones sensibles activées seront aptes à fixer les substances sondes, la surface à l'extérieur des zones sensibles étant définitivement rendue inerte vis à vis de l'accrochage des substances biologiques.

15 Entre les groupements fonctionnels de la molécule de la substance C, il peut exister un chaîne organique telle qu'une chaîne aliphatique de type $(CH_2)_q$ où $0 < q < 30$.

Il est important de noter que les couches de fonctionnalisation ont des épaisseurs de l'ordre de 1 à 10 nanomètres et possèdent donc une
20 épaisseur optique négligeable vis à vis de la couche transparente et ne jouent ainsi aucun rôle direct, sur les propriétés optiques de la biopuce.

Eventuellement, c et/ou d, et/ou e, et/ou f, et/ou g, et/ou h peut être suivi d'un traitement thermique facilitant la silanisation.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention
25 apparaîtront mieux à la lecture de la description qui va suivre en liaison avec les dessins ci-annexés dans lesquels les figures 1a à 1e illustrent un premier mode de réalisation du procédé de fabrication. Un mode préféré est illustré par les figures 1a à 1d, et 2a à 2c. Une variante est illustrée par la figure 3.

Le Brevet des Etats-Unis US 6,008,892 décrit une structure
30 mettant à profit les propriétés optiques des lames minces : lorsqu'une couche transparente dont l'épaisseur optique est égale à un quart de la longueur d'onde ou un multiple impair du quart de la longueur d'onde, repose sur un substrat réfléchissant (ou partiellement réfléchissant), l'émission de lumière par une source fluorescente émettant à cette longueur d'onde est maximale. Selon ce
35 procédé, la surface complète du substrat est traitée de manière homogène, pour augmenter l'émission de fluorescence. La fluorescence parasite due aux

substances biologiques adsorbées en dehors des zones sensibles est donc exacerbée de la même manière, que celles des zones sensibles, ce qui n'apporte aucune amélioration dans le rapport signal/bruit entre les zones sensibles et les zones non sensibles.

5 La présente invention remédie à cet inconvénient, grâce à une structuration de l'épaisseur de la couche transparente du substrat, qui permet d'exacerber la fluorescence des zones sensibles, et au contraire d'inhiber la fluorescence en dehors des zones sensibles.

La structure optimisée selon l'invention est réalisée, à partir
 10 d'une couche 10 d'épaisseur optique $\lambda/2$ (ou plus généralement $m\lambda/2$) du matériau transparent déposée sur la surface 6 d'un substrat 1 réfléchissant à la longueur d'onde de lecture, par exemple une couche 10 en silice, ou en nitrure de silicium, sur un substrat en silicium, ou une couche d'oxyde métallique sur un substrat en métal, par exemple TiO_2 sur titane, ZrO_2 sur Zirconium, etc... (Figure
 15 1a). Sur cette couche 10 est déposé un film 2 de résine photosensible (Figure 1b). La résine est insolée au travers d'un masque 3 qui permet d'ouvrir dans la résine 2, après révélation, des ouvertures 4 destinées à la formation des sites sensibles de la puce (Figure 1c). Une attaque chimique est alors conduite pour atteindre une épaisseur optique du film égale à $(2k+1)\lambda/4$ (Figure 1d) dans des
 20 zones localisées pour former des puits 5 constituant les sites sensibles de la puce.

Préférentiellement, on favorise l'émission de fluorescence par les sites sensibles en choisissant une couche transparente d'épaisseur optique $(2k+1)\lambda_1/4$. On favorise préférentiellement l'inhibition de l'excitation de la
 25 fluorescence en dehors des sites sensibles en choisissant une couche transparente d'épaisseur optique $m\lambda_0/2$.

Après élimination de la résine 2, un film d'un silane 15 comportant en extrémité, un groupement fonctionnel apte à immobiliser la molécule biologique peut être avantageusement déposé dans les puits 5 (Figure
 30 1e). La structure est ensuite portée en température pour favoriser la réaction de silanisation. L'épaisseur de cette couche mince (généralement monomoléculaire) ne change pas de manière sensible les propriétés optiques de la structure.

Les molécules biologiques sondes sont ensuite fixées sur les
 35 différents sites sensibles par voie ex situ ou in situ. La surface supérieure libre de la couche subit enfin, un traitement qui a pour effet de neutraliser les

groupements fonctionnels actifs qui n'ont pas réagi au cours de la phase précédente. Si toutefois, les molécules se fixent à l'extérieur des plots par débordement de la solution de dépôt, par exemple, le signal de fluorescence à l'extérieur du plot est de l'ordre de 200 fois plus faible que celui provenant de l'intérieur du plot et n'aura pas d'incidence, dans la plupart des cas sur la lecture.

Ainsi, la différence de chemin optique entre l'intérieur et l'extérieur des puits améliore le rapport signal sur bruit de la lecture de fluorescence en permettant de minimiser le signal de fluorescence hors des puits et en optimisant le signal de fluorescence dans les puits.

Il est possible d'obtenir une amélioration de la biopuce par l'amélioration conjointe de la qualité optique et de la qualité physicochimique du substrat.

Le substrat est micro-usiné par attaque chimique afin de réaliser les sites sensibles dans la couche comme décrit précédemment (Fig. 1a à 1d). Une opération de transfert est ensuite réalisée.

Après attaque chimique puis élimination de la résine (Fig. 1d), la puce est mise en contact avec une surface de transfert sur laquelle est disposée une fine couche 21 d'un solvant contenant une substance de type A, par exemple, un silane hydrophobe (Fig. 2a). Le silane hydrophobe est ainsi transféré sur la surface supérieure de la puce pour former une mince couche 22 (Fig. 2b). Le dépôt de silane peut être encore réalisé par un dispositif d'encrage avec la solution contenant le silane. Un traitement thermique favorise la réaction de silanisation de la surface de la puce. Une deuxième étape de silanisation conduite, par exemple en plongeant la puce dans une solution contenant le deuxième silane, permet la silanisation par une mince couche 23 du fond des puits initialement nu (le deuxième silane ne se fixe pas sur le premier) (Fig. 2c). Le deuxième silane spécifique comporte à son extrémité libre un groupement fonctionnel connu en soi qui permet soit une liaison covalente avec la substance biologique afin de réaliser l'immobilisation de ladite substance biologique, soit le départ de la synthèse in-situ de la molécule biologique sonde : cette réaction de départ correspond également à l'établissement d'une liaison covalente.

L'épaisseur des couches minces 22 et 23 (tout au plus quelques couches moléculaires) est insuffisante pour modifier sensiblement les propriétés optiques de la surface qui cumule ainsi les propriétés de sélectivité procurées par les deux techniques.

Le procédé met ainsi en œuvre un confinement physicochimique. Il consiste à délimiter les zones destinées à recevoir les sondes de caractère hydrophile, en déposant localement les molécules destinées à former une monocouche hydrophobe dans la région entre les sites
5 sensibles, par micro-transfert. L'intérieur des sites sensibles est ensuite silanisé en utilisant un silane apte à permettre l'immobilisation des sondes préalablement synthétisées ou la synthèse in-situ des molécules biochimiques. Le micro-transfert de la mono-couche hydrophobe est réalisé grâce à l'utilisation d'une surface de transfert qui peut être plane, ou bien être constitué par un
10 micro-tampon présentant des régions de transfert en relief.

La surface de transfert est mise en contact avec une solution contenant le silane hydrophobe. Une fine pellicule 22 de solution est alors transférée par contact en des endroits localisés de la couche 10 du substrat 1.
15 Le substrat 1 est ensuite porté à une température de l'ordre de 100°C, afin de faciliter la réaction de silanisation. Grâce à un protocole spécifique et au choix d'une molécule appropriée, il est possible d'obtenir une monocouche organisée et compacte (SAM pour Self Assembled Monolayer). Les zones n'ayant pas reçu de silane sont alors traitées de manière à être recouvertes d'un autre
20 silane qui possède à son extrémité libre un groupement fonctionnel, permettant la synthèse in situ d'oligonucléotides (groupement hydroxyle, par exemple) ou permettant l'immobilisation de molécules biologiques pré-synthétisés ou d'origine biologique, à l'aide d'un groupement fonctionnel approprié (acide, par exemple). La réaction de greffage du second silane a lieu sur les groupements
25 silanol de la silice ou du verre constituant le substrat mais elle ne peut pas avoir lieu sur la monocouche du premier silane fixé. Ainsi, seules les zones destinées à servir de sites sensibles seront fonctionnalisées.

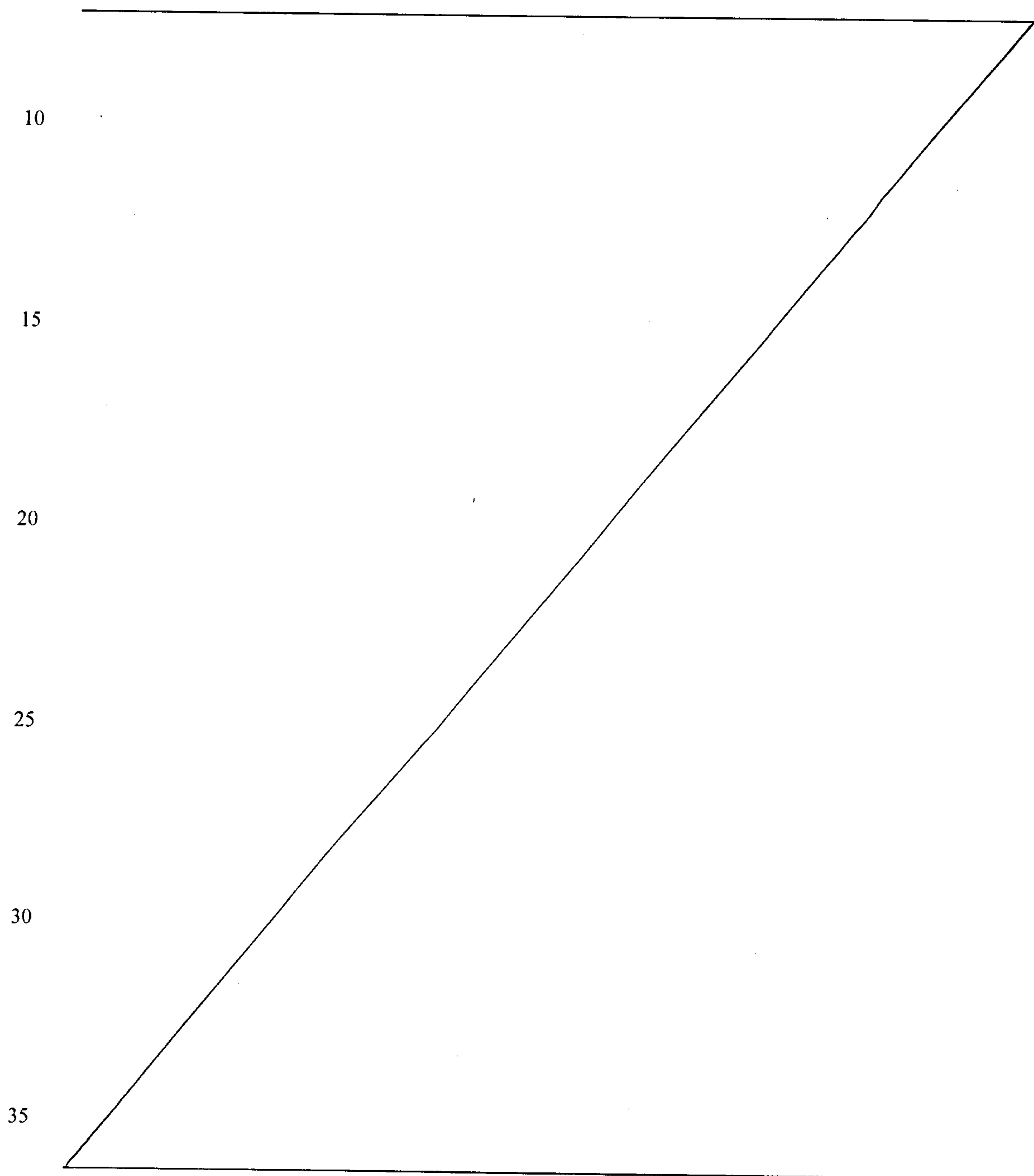
De plus, le silane hydrophobe limite très fortement l'adsorption non sélective et de ce fait, améliore très sensiblement, le rapport signal sur bruit
30 de la lecture par fluorescence (ou éventuellement par marquage radioactif), c'est-à-dire, en augmentant le rapport du signal vrai sur les zones supportant les

8a

sondes biologiques au signal éventuel provenant des zones nues sur lesquelles pourraient se produire une adsorption non sélective.

Il est en général possible de réaliser la même fonction avec des substances autres que le silane.

5 Il est en effet possible de déposer sur la partie supérieure du support, en dehors des sites sensibles une couche physiquement et



chimiquement inerte qui limite l'adsorption et la fixation des biomolécules sondes lors de la fabrication des biopuces et l'adsorption ou la fixation des biomolécules cibles lors de l'analyse biologique, ce qui améliore le rapport signal/bruit de la mesure.

5 Cette couche inerte est constituée d'une molécule comportant une chaîne hydrocarbonnée de type $(CH_2)_p$ avec $1 < p < 30$ ou un enchaînement polymérique, par exemple poly-éthylène-glycol ou autre ou un assemblage de différentes portions de chaînes, portant à une extrémité, un groupement permettant la formation d'une liaison covalente avec le support
10 par exemple une liaison silane ou silanol, l'autre extrémité portant une fonction chimique stable et inerte telle que CH_3 ou ses dérivées halogénés substitués de tout ou partie des hydrogènes de la chaîne aliphatique $(CH_2)_p$ et de CH_3 . La couche formée peut être monomoléculaire ou polymérique selon la nature du premier groupement terminal. Le dépôt de la couche peut
15 se faire avantageusement par contact avec une surface plane, préalablement recouverte d'une solution de cette molécule.

Il convient ensuite de déposer sur les sites sensibles une monocouche de molécules qui présentent une fonctionnalité différente à chacune de leurs extrémités : l'une permet sa fixation par liaison covalente
20 sur le substrat, telle que la fonction silanol, et l'autre permet de fixer de façon covalente la biomolécule sonde par exemple la fonction acide $COOH$ ou alcool OH . Cette monocouche permet alors d'immobiliser des biomolécules présynthétisées ou d'origine naturelle, ou encore de synthétiser, in situ dans les puits, les biomolécules sondes (oligonucléotides, PNA, protéine, etc...)

25 Un autre procédé est décrit en liaison avec les figures 3.

La surface du substrat est recouverte d'une couche 30 de la substance B, puis une couche 31 de la substance d'arrêt C est déposée localement en dehors des sites sensibles, ici les puits 5.

D'une manière préférée, l'efficacité de détection des sites
30 sensibles est obtenue en utilisant deux techniques qui ont un effet complémentaire : l'effet physique associé à la différence de hauteur entre l'intérieur et l'extérieur des sites et l'effet physicochimique lié aux différences de propriétés de surface entre l'intérieur et l'extérieur des sites. De ce fait, la géométrie et la position relative des sites sensibles obtenues par une
35 technique de type micro-technologie est parfaitement définie. Ceci contribue à la qualité de la puce et à l'amélioration de sa lecture.

Enfin, l'association des deux techniques, la structuration tridimensionnelle du support et la préparation de la surface pour permettre un accrochage préférentiel dans les sites sensibles, par exemple par double silanisation, permet d'améliorer la qualité de la puce et l'optimisation de sa lecture, en jouant sur quatre aspects qui sont mis en œuvre séparément ou conjointement ::

- l'amélioration de la définition géométrique de la puce grâce à l'utilisation des techniques de masquage et ou de transfert,
- la diminution de la taille des sites sensibles grâce aux effets conjugués du confinement physicochimique et de l'usinage des sites.
- la diminution de l'adsorption non spécifique sur la zone entre les plots, grâce au dépôt par exemple d'une monocouche de silane hydrophobe par microtransfert,
- l'amélioration de la qualité de lecture optique de la puce grâce à l'optimisation des épaisseurs de la couche support transparente.

REVENDICATIONS

1. Biopuce comprenant un substrat présentant une surface principale réfléchissante caractérisée en ce que la surface principale (6) présente des sites localisés (5) recouvert d'une couche transparente favorisant la fluorescence, de sorte que les sites sont rendus sensibles à une détection de fluorescence émise par des molécules cibles marquées par un matériau fluorescent, dans laquelle la couche transparente présente une épaisseur optique $(2k+1)\lambda/4$, avec k entier positif ou nul et λ désignant une longueur d'onde comprise entre une longueur d'onde λ_0 d'excitation de fluorescence du matériau fluorescent et une longueur d'onde λ_1 d'émission de fluorescence du matériau fluorescent, et en ce qu'en dehors des sites sensibles (5), la surface principale (6) est recouverte d'une couche transparente d'épaisseur différente de celle de la couche transparente recouvrant les sites sensibles, l'épaisseur en dehors des sites sensibles étant de $m\lambda'/2$ avec m entier positif et λ' désignant une longueur d'onde comprise entre λ_0 et λ_1 .
2. Biopuce selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite couche transparente qui recouvre les sites (5) rendus sensibles à une détection de fluorescence a une épaisseur optique égale à $(2k+1)\lambda_1/4$ avec k entier positif ou nul.
3. Biopuce selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'en dehors des sites sensibles, la surface principale (6) est recouverte d'une couche transparente d'épaisseur $m\lambda_0/2$.
4. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'en dehors des sites sensibles (5), la surface (6) du substrat (1) est recouverte d'une couche mince (22) d'une première substance A comportant une chaîne hydrocarbonée de type $(CH_2)_p$ avec $1 < p < 30$ portant à une extrémité un groupement d'accrochage, permettant la formation d'une liaison

covalente avec le substrat et à l'autre extrémité une fonction chimique stable et inerte.

5 5. Biopuce selon la revendication 4, dans laquelle la couche mince de molécules d'une première substance A est une monocouche de molécules.

6. Biopuce selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle le groupement d'accrochage est un silane ou un silanol.

10 7. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, dans laquelle ladite première substance A est un silane hydrophobe.

8. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, dans laquelle la fonction chimique stable et inerte est le CH₃ ou les dérivés halogénés de CH₃.

15

9. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que les sites sensibles (5) sont recouverts d'une couche mince (23) d'une deuxième substance B présentant à une extrémité un groupement permettant une fixation sur le substrat par liaison covalente et à l'autre extrémité un
20 groupement apte à fixer de façon covalente une molécule sonde.

10. Biopuce selon la revendication 9, dans laquelle la couche mince d'une seconde substance B est une monocouche de molécules.

25 11. Biopuce selon la revendication 9 ou 10, dans laquelle le groupement permettant une fixation sur le substrat par liaison covalente est une fonction silane ou silanol.

30 12. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans laquelle ladite deuxième substance B est un silane hydrophile.

13. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, dans laquelle le groupement apte à fixer de façon covalente une molécule sonde est un groupement présentant la fonction acide COOH ou alcool OH.

5 14. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la surface du substrat est recouverte d'une couche d'une deuxième substance B telle que définie dans l'une quelconque des revendications 9 à 13, et en ce qu'en dehors des sites sensibles (5), ladite couche de ladite deuxième substance B est recouverte d'une substance d'arrêt C inerte vis à vis de
10 l'accrochage des substances biologiques.

15. Procédé de fabrication d'une biopuce selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) le dépôt sur le substrat (1) de la couche transparente (10)
15 d'épaisseur $m\lambda'/2$; et

b) la réalisation dans ladite couche transparente de puits ou des plots (5) dans lesquels l'épaisseur de la couche transparente est égale à $(2k+1)\lambda/4$, pour former lesdits sites sensibles.

20 16. Procédé selon la revendication 15 pour la fabrication d'une biopuce selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, dans le cas où les zones sensibles sont des puits, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :

c) le dépôt par transfert sélectif de la première couche mince de la première substance A (22) comportant une chaîne hydrocarbonée de type
25 $(CH_2)_p$ avec $1 < p < 30$ portant à une extrémité un groupement d'accrochage permettant la formation d'une liaison covalente avec le substrat et à l'autre extrémité une fonction chimique stable et inerte ; et

d) l'immersion du substrat dans une solution contenant la deuxième substance B présentant à une extrémité un groupement permettant
30 une fixation sur le substrat par liaison covalente et à l'autre extrémité un groupement apte à fixer de façon covalente une molécule sonde.

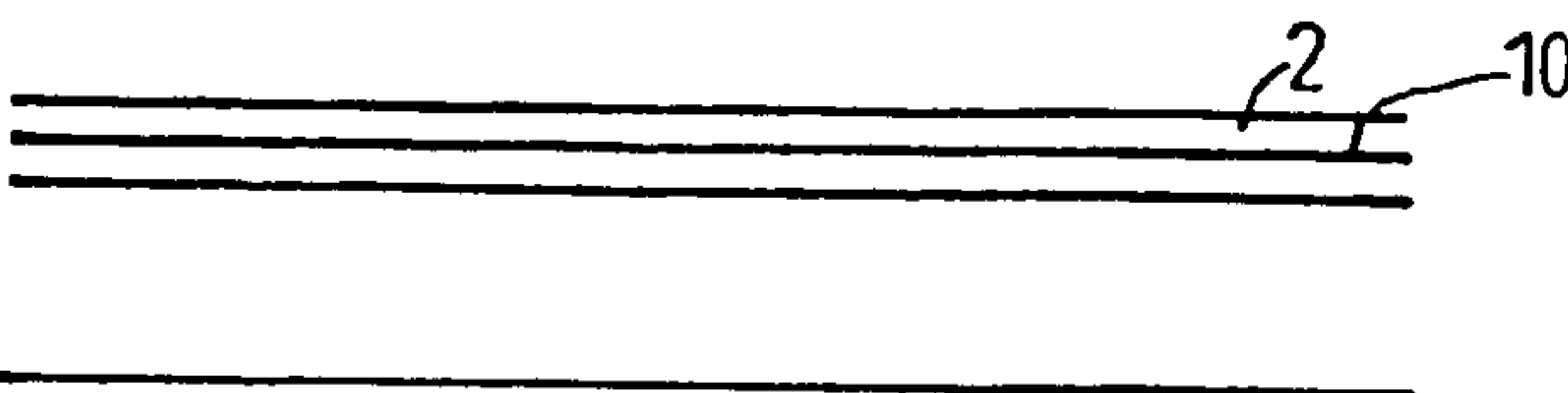
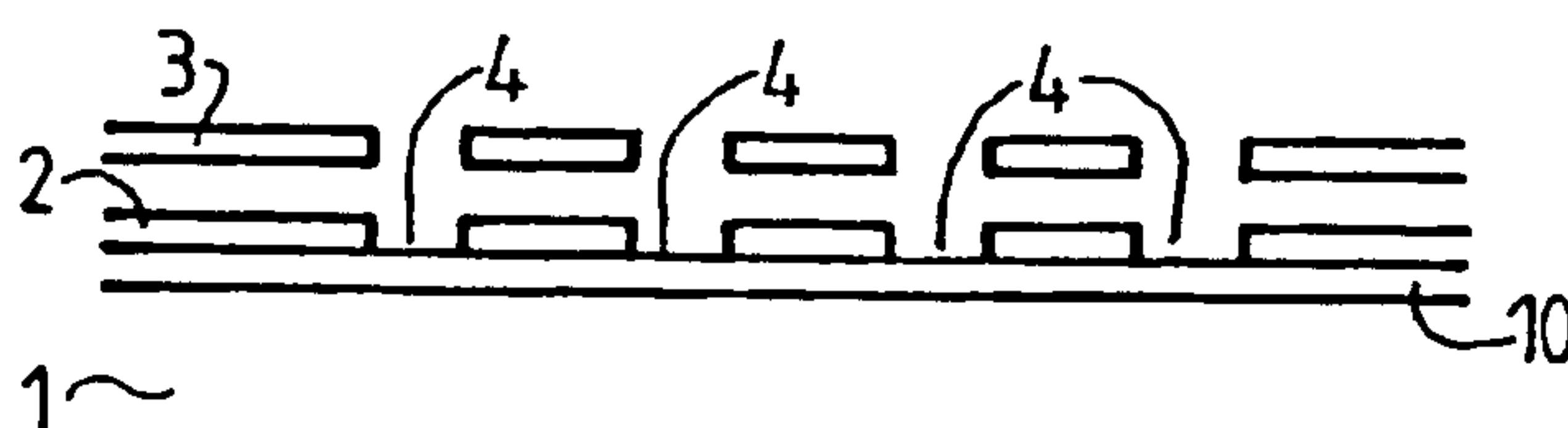
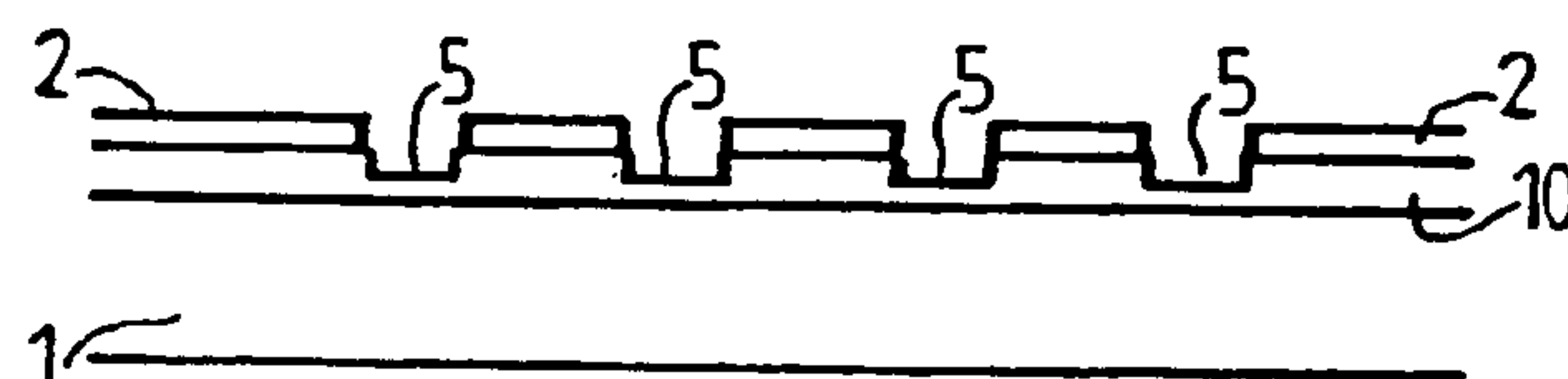
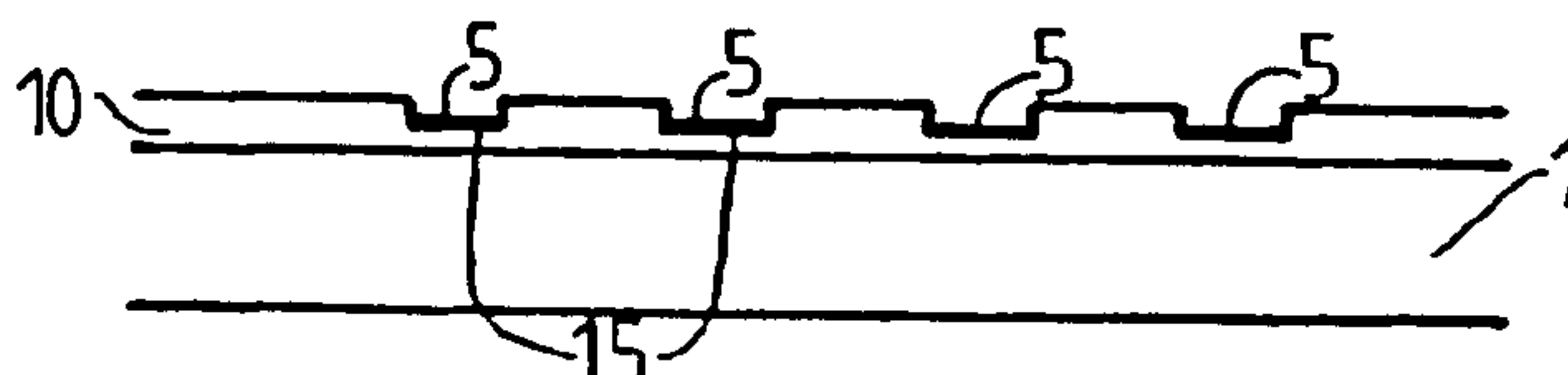
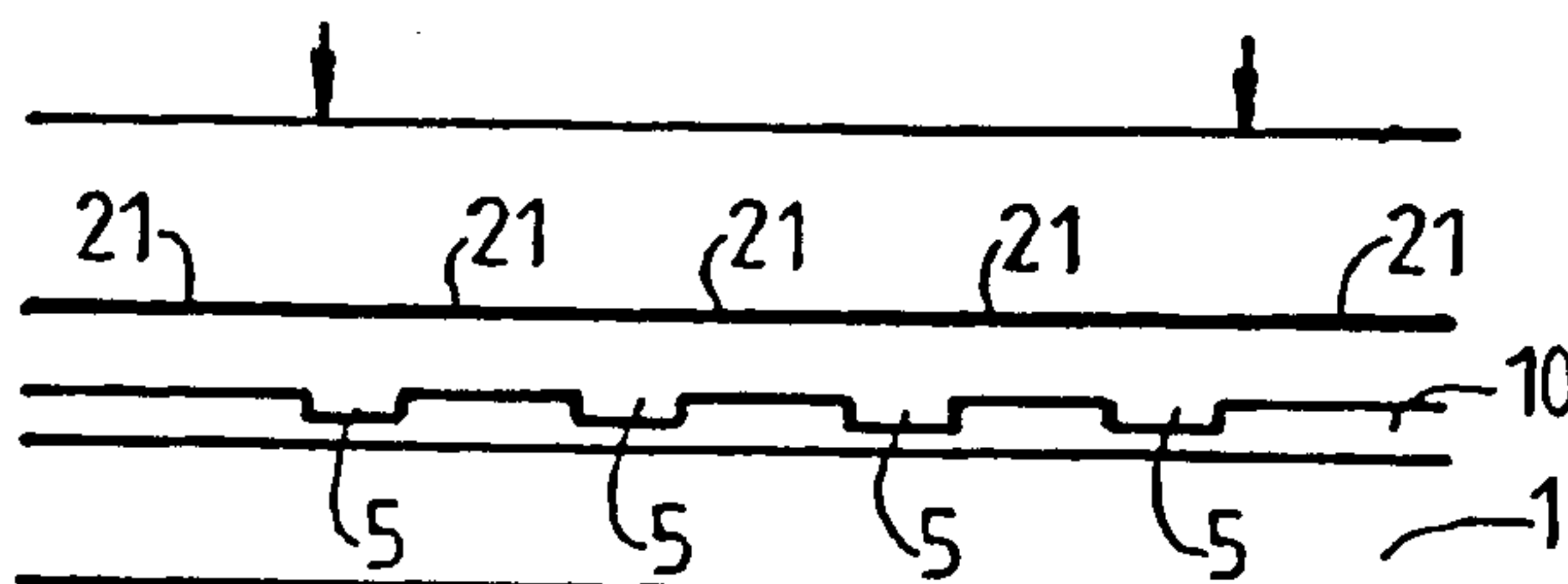
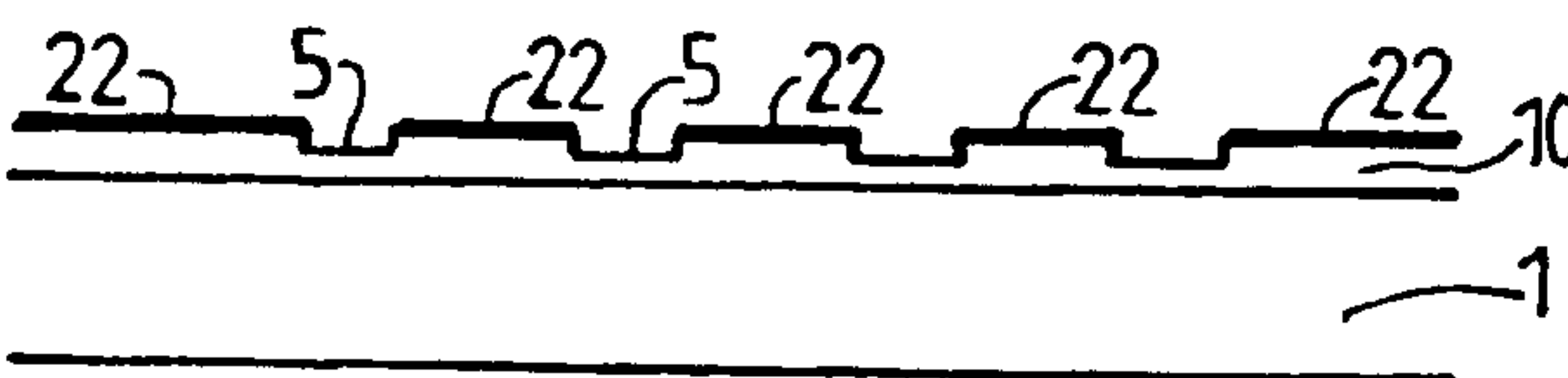
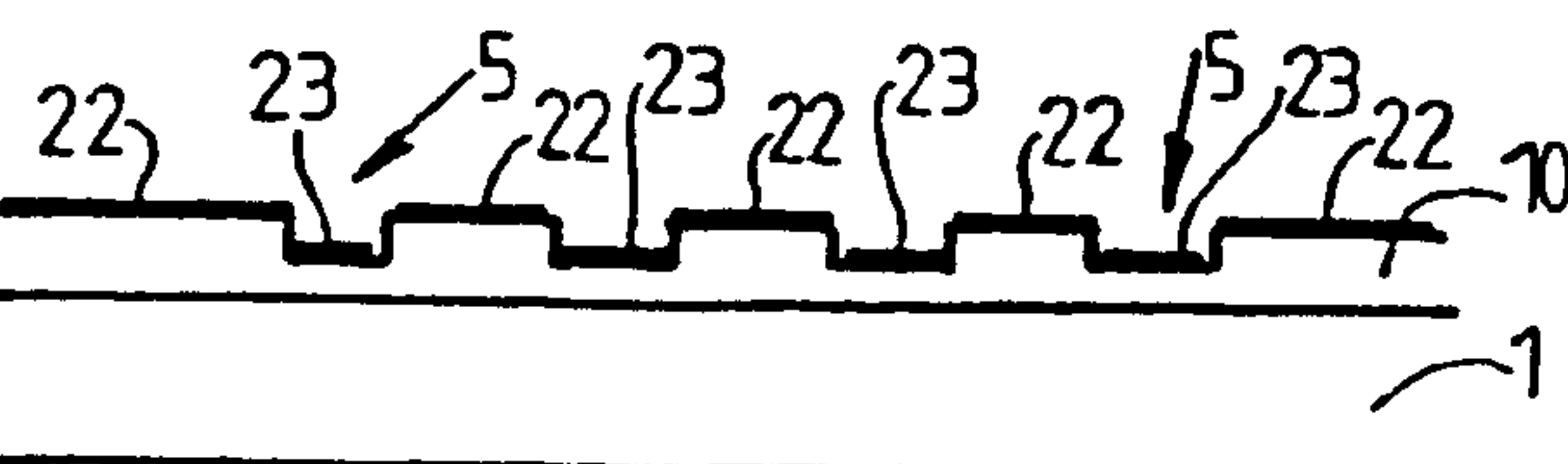
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que c et/ou d est suivi d'un traitement thermique facilitant la formation d'une liaison covalente.

18. Procédé selon la revendication 15 pour la fabrication d'une biopuce selon
5 la revendication 14, caractérisé en ce qu'il présente après b) :

e) le dépôt sur toute la surface (6) du substrat (1) de la couche mince (30) de la deuxième substance B et l'activation de la substance B ; et

f) le dépôt d'une couche (31) en dehors desdits sites sensibles (5) de la substance d'arrêt C inerte vis-à-vis de l'accrochage des
10 substances biologiques.

1 / 1

FIG.1aFIG.1bFIG.1cFIG.1dFIG.1eFIG.2aFIG.2bFIG.2cFIG.3