

---

---

**TRAVAIL PRATIQUE  
D'INSTRUMENTATION EN  
BIOTECHNOLOGIE**

---

---

---

---

**REALISATION ETUDE ET UTILISATION  
D'UNE BIOPUCE A ADN SUR SILICIUM**

---

---

## TP Biopuces

- **4 séances (2 jours)**

Plateforme salle blanche	S1 (matin)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lithographie et gravure de l'oxyde SiO<sub>2</sub></li> <li>▪ Gravure du silicium avec KOH</li> <li>▪ Nettoyage des plaques</li> <li>▪ Induction dans le four d'oxydation</li> </ul>
	S2 (ap-m)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Caractérisation des plaques : alphastep, MEB</li> <li>▪ Hydroxylation de la silice de surface</li> <li>▪ Silanisation</li> </ul>
Plateforme biotechnologies	<b>Sous-traitance CIME Nanotech : étuvage, rinçage, séchage des plaques</b>	
	S3 (2 <sup>ème</sup> jour)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activation du silane</li> <li>▪ Greffage des oligonucléotides sondes sur le substrat</li> </ul>
	<b>Sous-traitance CIME Nanotech : traitement post immobilisation</b>	
	S4 (3 <sup>ème</sup> jour)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hybridation</li> <li>▪ Détection et analyse</li> <li>▪ Dénaturation</li> </ul>

**Ecole Nationale Supérieure de  
Physique de Grenoble**

**Centre Interuniversitaire de  
Microélectronique de Grenoble**

**3<sup>ème</sup> année de la Filière Instrumentation pour les Biotechnologies  
2001-2002**

**INSTRUMENTATION EN BIOTECHNOLOGIE :  
REALISATION, ETUDE ET UTILISATION D'UNE BIOPUCE A ADN  
SUR SILICIUM**

Le cycle se déroulera en trois phases :

**Phase 1** ( une journée) – Réalisation du substrat en salle blanche par micro-usinage de cuvettes micro-réacteurs dans le silicium, et fonctionnalisation de la surface gravée.

**Phase 2** (une demi-journée)– Immobilisation, par dépôt de micro-gouttes, des sondes à ADN sur des micro-réacteurs à l'aide d'un robot de dépôt.

**Phase 3** (une bonne demi-journée) – Analyse de l'échantillon par hybridation des cibles marquées sur les sondes. Lecture des résultats sur la puce par microscopie fluorescente, analyse et traitement d'image.

Ce cycle de TP fait appel, pour une bonne part, aux notions de biologie vues en 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> années et également aux cours de 3<sup>ème</sup> année sur les Biocapteurs, la Physico-chimie des surface et les Processus technologiques en microsystème. Il est très fortement recommandé de revoir ces cours pour tout ce qui pourra être utile pour le cycle de TP.

Ce cycle a été mis en place avec l'aide du LETI/CEA de Grenoble.

**PHASE 1: REALISATION DU SUBSTRAT PAR MICRO-USINAGE  
ET FONCTIONNALISATION**

- I – Lithographie sur la couche de silice (480 nm) pour le masque de gravure du Si**
- II – Gravure humide du masque de silice**
- III – Gravure humide du silicium**
- IV – Oxydation de la surface gravée**
- V – Caractérisations du substrat (MEB, ellipsométrie, profilométrie)**
- VI – Fonctionnalisation de la surface de silice (silanisation)**

**Préliminaires**

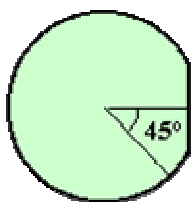
**Quelques détails pratiques:**

- équipez-vous de chaussures de ville (plus pratiques, pour enfiler les chausse, que des chaussures de ski!)
- arrivez **IMPERATIVEMENT** suffisamment en avance (7H50) **POUR POUVOIR PENETRER EN SALLE BLANCHE IMPERATIVEMENT A 8 HEURES PRECISES.**

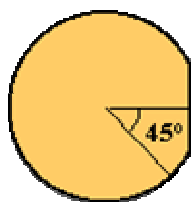
**Précautions à respecter en salle blanche:**

Cette partie du TP se déroulera en salle blanche, milieu dans lequel la chasse est faite aux poussières (classe 100 = 100 particules/pied<sup>3</sup> > 0,5 microns, soit 1530 particules/m<sup>3</sup>, voir annexe D) et où une grande rigueur est de mise:

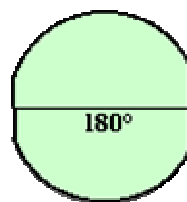
- tenue spéciale obligatoire (avec les cheveux entièrement enfermés par la coiffe) à revêtir dans le sas. Les gants doivent être revêtus dès l'entrée dans la première salle.
- une très grande propreté et un très grand soin, indispensables pour la réalisation de structures micro-électroniques
- travailler avec beaucoup de rigueur, d'une manière posée et réfléchi en sachant toujours où se situe, dans la succession des opérations, celle que l'on est en train d'accomplir.
- ne **JAMAIS** saisir les plaquettes de silicium directement avec les doigts (même gantés), **TOUJOURS AVEC LES PINCES**
- attention à certains produits qui sont dangereux (port de lunettes obligatoire)
- flacons non utilisés toujours fermés, rinçage soigné des récipients après usage, saisir les flacons par le corps et non pas par le bouchon
- au moindre doute, s'arrêter et demander conseil



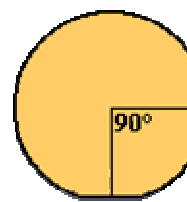
**(111) type n**



**(111) type p**



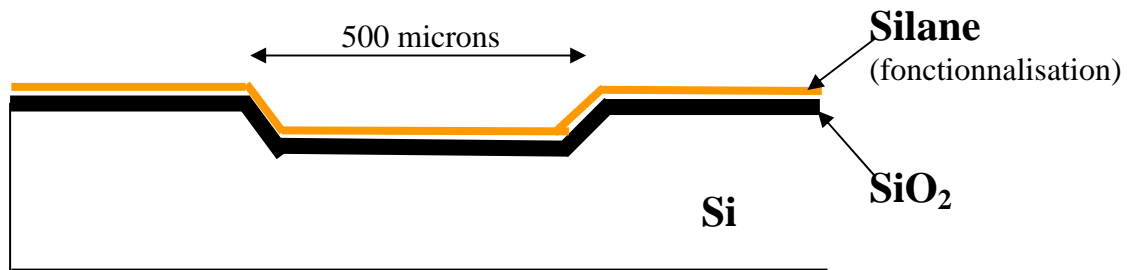
**(100) type n**



**(100) type p**

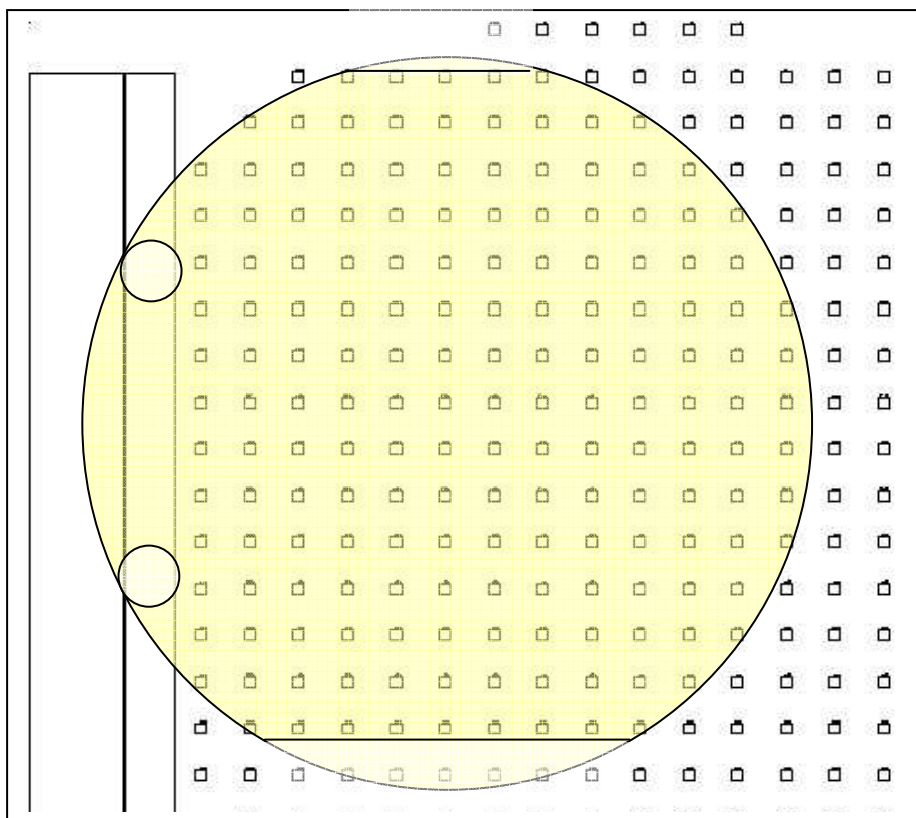
## Objectif

La structure à réaliser servira de substrat pour le greffage et l'hybridation des oligo-nucléotides:

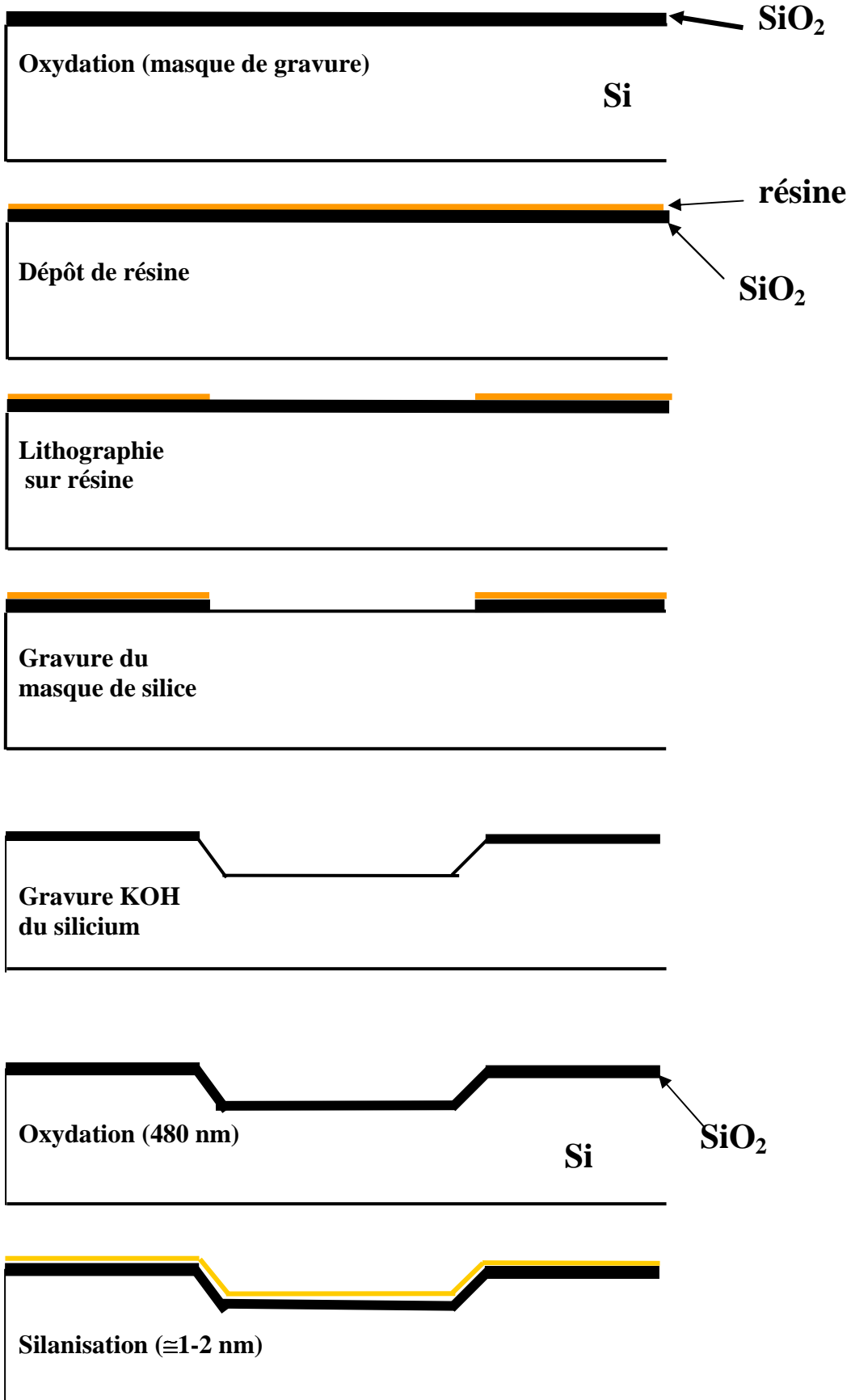


Ce motif se répète à la surface de la plaquette de silicium (<100> 2 pouces) tous les 2,25 mm. Ces micro-cuvettes serviront de micro-réacteurs pour le greffage des sondes ADN (une vingtaine de bases) et l'hybridation avec la cible marquée.

Ces micro-cuvettes devront être positionnées sur la plaquette 2 pouces de manière à ce que les sondes ADN puissent être déposées avec le robot de dépôt (Biorobotics). Lors de la lithographie cela nécessitera un alignement précis du masque qui servira à la gravure de la silice de surface.



### Succession des opérations



## I – LITHOGRAPHIE DE LA SILICE (480 nm)

Les plaquettes de silicium mises à disposition ont été au préalable oxydées (par voie humide) avec une épaisseur de silice d'environ 500 nm. Elles sont orientées <100>.

### 1 - Principe de la lithographie :

Voir ANNEXE VI

### 2 - Opérations à effectuer :

#### 2-1) Dépôt la tournette.

Ouvrir l'azote, l'air comprimé, le vide.

Plaquette 2pouces  $v_g = 5000t/min$  et  $t=30s$ .

- Centrage plaquette avec le positionneur.
- Mettre en rotation puis placer quelques gouttes du promoteur d'adhérence.  
Laisser tourner 30s.
- Mettre la résine au centre tache de  $1cm^2$  environ.
- Lancer dans la foulée

#### 2-2) Recuit résine optique.

plaque chauffante  $T=120^\circ C$

$t=2min30s$ .

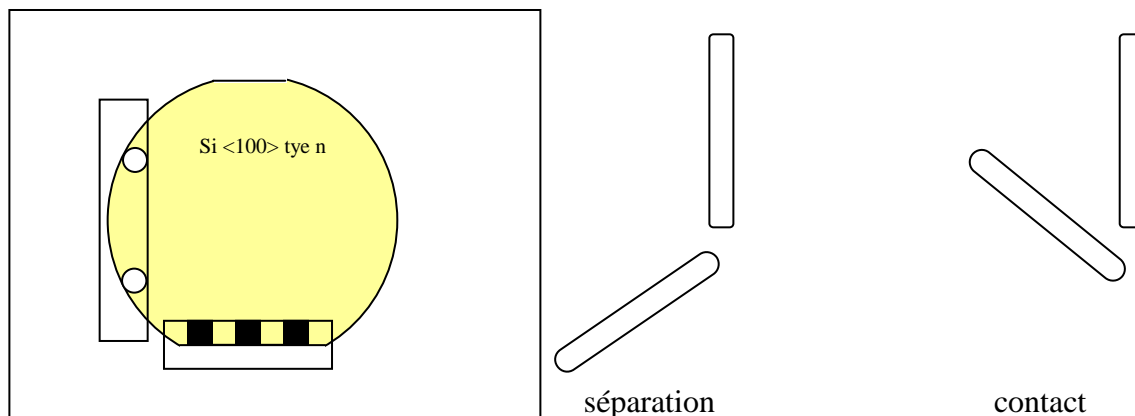
à faire en arrivant placer la consigne à  $120^\circ C$ .

#### 2-2) Insolation

mettre azote et air sur la machine.

MODE CONTACT : NE PLUS TOUCHER.

Mettre le masque face avant sur le chrome.



### 2 alignements :

- Alignement des 2 ergos tangentement au bord du masque.
- Alignement du méplat sur le bas du peigne.
- Enlever le support du masque.
- Supprimer le vide du masque.

Temps d'insolation : de l'ordre de qqs secondes

### 2-3) Développement

- Remplir le bécher de développeur. Minuteur t=90s (1min à 1min 30). Panier en tournant.
- Rinçage eau DI avec 2 bacs de rinçage(vanne ouverture eau DI).
- Séchage centrifugeuse ou sur la plaque.

### 2-4) Durcissement

- T=130°C t=2min 30sec sur plaque. Contrôle litho au microscope optique.

### 2-5) Dépôt de résine face arrière sans utiliser le centreur

### 2-6) Durcir face arrière. ??????????????????????

### 2-7) Observation microscope optique

## II – GRAVURE HUMIDE DU MASQUE DE SILICE

(Consulter l'annexe III)

HF bain thermostaté 30°C. Préparer à coté un bac de rinçage. Gants + masques de protection

Produit existe déjà HF dilué/NH<sub>4</sub>F sinon la résine part aussi.

Mettre sol dans le becher T=30°C. Passer 10s US puis 5min dans le bain thermostaté à 30°C vitesse de gravure 0.1µm/min.

Surveiller petite bande. Démouillage: SiO<sub>2</sub> hydrophyle, Si hydrophobe

Observer même couleur bord et centre des cuvettes. Il vaut mieux surgraver c'est à dire démouillage +20s. Rinçage à l'EDI (12 Mohms.cm). Séchage à la centrifugeuse.

On peut mesurer l'épaisseur d'oxyde résiduelle.

## III – GRAVURE HUMIDE DU SILICIUM

Produit de gravure : KOH (40% en masse – marque STREM CORPORATION)

Masque : silice thermique. Température de gravure :75°C

Mode de chauffage du produit de gravure : bain-Marie liquide (eau). Température affichée :79°C.

Démarrer le chauffage du bain marie et du produit de gravure 1,5H avant utilisation. Vitesse de gravure :37µm/h

### *Procédure de gravure*

1)-Avant de graver le silicium, il faut éliminer la silice native à sa surface en plongeant les plaques dans un bain d'acide fluorhydrique (dilué à 5%) pendant 10s à température ambiante, puis rincer ensuite les plaques dans de l'eau EDI (résistivité >16MΩ.cm) et les sécher ; cependant, les plaques venant juste de subir une gravure d'oxyde pour ouvrir le masque d'oxyde thermique, les cuvette sont a priori sans oxyde natif.

2)-Graver le silicium en KOH. Rincer à l'eau EDI (résistivité >16MΩ.cm).

**3)-Plonger les plaques dans un bain H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1V/2V). ??????????????????**

*Attention réaction très exothermique*

*Mettre l'acide dans l'eau (moyen mnémotechnique: inverse du pastis). Introduire délicatement les plaques*

*Rincer à l'eau désionisée puis sécher les plaques à la centrifugeuse.*

*Conserver ce bain pour la suite.*

### *Mesures*

Mesurer l'épaisseur d'oxyde après gravure KOH

## IV – OXYDATION DE LA SURFACE GRAVEE ET HYDROXYLATION

### 1 - Le principe de l'oxydation thermique :

Voir ANNEXE IV

### 2 - La procédure d'oxydation:

Recette : WETOX 1050°C pendant 50min, donne une épaisseur proche de 500nm.

### 3 - L'hydroxylation (traitement PIRAHNA):

Le rôle de l'hydroxylation est à la fois de créer des liaisons OH sur la surface qui permettront un bon greffage de la couche fonctionnelle (le silane). Elle permet également de supprimer les contaminations organiques à travers l'action de KOH.

1 : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 1 : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Attention réaction très exothermique

Temps de réaction : 15min. Introduire délicatement les plaques

## V – CARACTERISATIONS DU SUBSTRAT (MEB, ELLIPSOMETRIE, PROFILOMETRIE)

Des caractérisations seront effectuées en salle blanche sur les plaquettes au cours des opérations quand cela sera possible. Il s'agira principalement de:

- mesure de l'épaisseur des couches d'oxyde après les différentes opérations (ellipsométrie).

Voir ANNEXE V

Cela permettra de déterminer la sélectivité de la gravure KOH du silicium vis à vis de la silice, et de connaître l'épaisseur de la couche d'oxyde finale sur laquelle seront greffées les séquences d'ADN.

- mesure de la profondeur des cuvettes gravées (profilométrie)

- observation de la gravure au Microscope Electronique à Balayage

## VI – FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DE SILICE (SILANISATION)

Observation de la mouillabilité de la plaque (environ 8 à 9°) avant silanisation

Greffage du silane:

Placer la plaquette dans une solution de  $\gamma$ -APS ((3-aminopropyl)triéthoxysilane) à 10% dans EtOH 95% à température ambiante sous agitation rotamax (boite de pétri, vitesse 25 rpm) pendant **1 nuit**.

Le lendemain matin les plaquettes seront sorties du bain, séchées, rincées à l'EtOH et l'EDI, séchées, et enfin étuvées à 110°C pendant 3H. Ces opérations seront effectuées par le CIME.

## PHASE 2: GREFFAGE DES SONDAS ADN SUR LA SURFACE FONCTIONNALISEE DES MICRO-CUVETTES

Observation de la mouillabilité de la plaque (angle 45-50°)

### Activation du silane (voir schémas des réactions en annexe II)

On reprend les plaquettes préalablement fonctionnalisées. L'activation est une opération qui permet de rendre la couche de silane apte au greffage des sondes ADN.

- 1<sup>er</sup> traitement :

*Ce 1<sup>er</sup> traitement n'est utile que lorsque la plaquette est restée plusieurs jours au contact du CO<sub>2</sub> de l'air après silanisation. Le CO<sub>2</sub> agit sur les terminaisons NH<sub>2</sub>. Il se forme NH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> qui peut être enlevé avec KOH.*

- Placer la plaquette dans KOH (0,1M) dans EDI pendant 15 min
- Rincer la plaque à la pissette EDI (rinçage très important). Sécher la plaque à la soufflette

•

- 2<sup>ème</sup> traitement

- Placer la plaque dans une solution de glutaraldéhyde à 10% dans EDI pendant 1h30 sous agitation dans une boîte de pétri (l'agitation se fait en déposant sur le rotamax les boîtes de pétri contenant la solution).
- Rincer la plaque à l'EDI avec une pissette. Sécher la plaque à la soufflette

### Greffage des sondes sur le substrat à l'aide du robot

On dispose de 3 séquences "sonde" et d'une séquence "cible":

- une séquence dite standard:  $\longrightarrow$  TTTTGGATAAACCCACTCTA
- une séquence standard avec un "mismatch" :  $\longrightarrow$  TTTTGGATAAAGCCACTCTA
- une séquence standard avec deux "mismatch" :  $\longrightarrow$  TTTTGGATAAAGACACTCTA
- un échantillon "cible" inconnu marqué avec le fluorophore Cy3

On répartira les trois sondes connues dans les cuvettes de la puce.

Pour effectuer le dépôt il sera nécessaire de définir avec soin la "grille" de dépôt en fonction du projet envisagé, du nombre et de la nature des sondes à déposer, des caractéristiques dimensionnelles du substrat de silicium et des spots souhaités. Il faudra ensuite programmer le robot en conséquence, placer les microplaques portant les sondes et les substrats structurés et lancer la procédure.

Un pré-positionnement des aiguilles du robot permettra d'ajuster les paramètres du robot pour que les gouttes de sonde soient déposées correctement au fond des cuvettes.

Laisser **1 nuit** à l'air et à température ambiante sous la hotte.

Le lendemain matin un traitement post-immobilisation est effectué:

- à l'aide de NaBH<sub>4</sub> dont le rôle est de réduire la surface (CHO  $\rightarrow$  CH<sub>2</sub>-OH) et de stabiliser la liaison N=C.
- à l'aide ensuite d'un détergent puissant qui élimine toutes les sondes mal ou non greffées.

Ces opérations de post-immobilisation seront effectuées par le CIME.

## PHASE 3 : HYBRIDATION, DETECTION ET ANALYSE DE LA FLUORESCENCE

### I – HYBRIDATION (voir schéma des réactions en annexe II)

Les biopuces sont prêtes à être utilisées. Pour cela on dispose d'un échantillon inconnu avec lequel une solution d'hybridation est préparée dans un tampon d'hybridation.

Cette solution d'hybridation est étalée à l'aide d'une lamelle sur toute la surface de la puce où les sondes ont été déposées. La plaquette est ensuite placée dans une chambre d'hybridation (atmosphère humide) et le tout placé dans l'étuve à 42°C pendant 45 minutes.

Un rinçage est ensuite effectué avec une solution de rinçage de concentration décroissante.

Sécher à la soufflette

Conserver à l'abri de la lumière

### II – PRISE EN MAIN DU MICROSCOPE ET DE LA CAMERA CCD, DETECTION ET ANALYSE DE LA FLUORESCENCE

(Rédigée par P.PELETIE et P.BARRITAUULT, LETI/CEA)

La suite consistera à observer, enregistrer et analyser la fluorescence des microcuvettes.

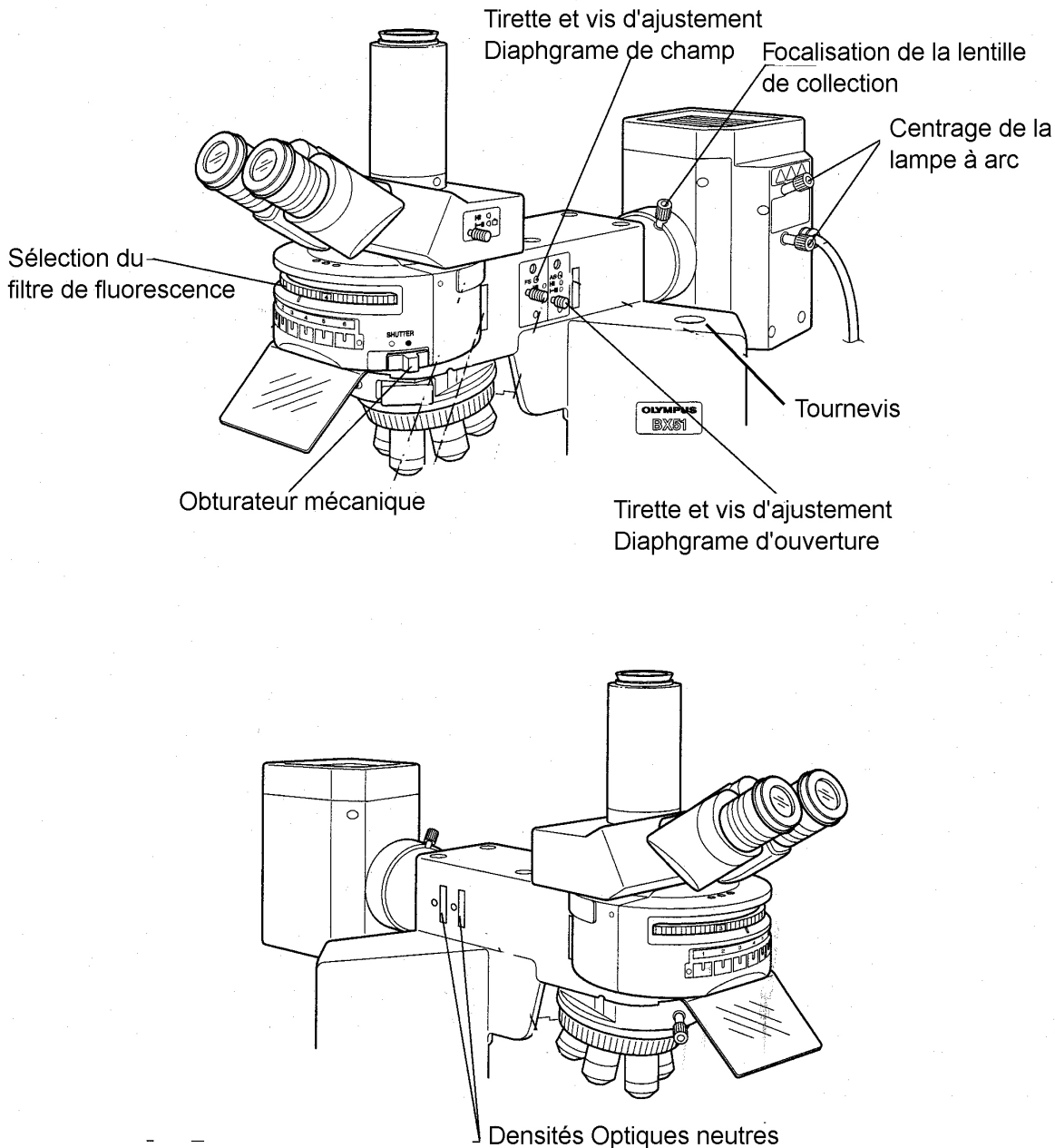
La détermination de la séquence présente dans la cible en résultera.

Au préalable une prise en main d'une part du microscope et d'autre part de la caméra CCD sera nécessaire et permettra d'étudier les caractéristiques de ces deux éléments importants pour l'utilisation des biopuces à ADN

Avant de lire la partie relative à la mise en œuvre expérimentale qui suit, **il est indispensable** de lire la partie concernant les rappels fondamentaux sur la fluorescence, la microscopie, la détection CCD reportée en annexe I.

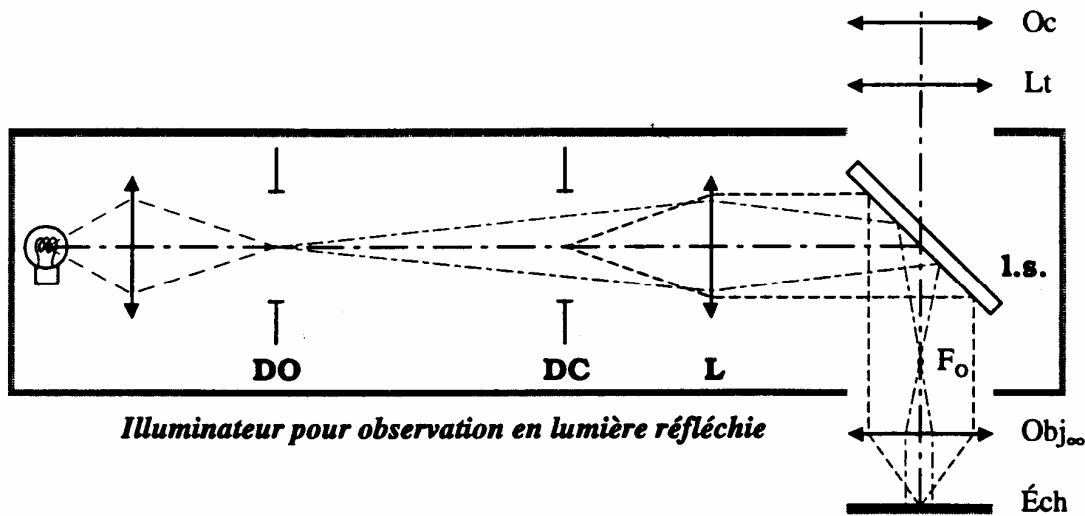
## II-1 Prise en main du microscope

Commençons par décrire et régler le microscope BX41M que vous utiliserez pour analyser la fluorescence des biopuces. Il s'agit d'un microscope en réflexion pouvant également travailler en épi-fluorescence. Il est composé d'un système optique d'éclairage, d'un jeu d'objectifs de microscope, d'un jeu de cubes dichroïques de fluorescence et d'un système de visualisation. Sur la figure 1, on nomme les différentes parties du microscope, sur lesquelles nous reviendrons par la suite.



**Figure 1**

Sur la figure 2, nous présentons un schéma de principe du fonctionnement, d'un point de vue optique, du microscope. Intéressons nous, plus particulièrement à ce schéma.



**DO:** Diaphragme d'Ouverture  
**DC:** Diaphragme de Champ  
**L:** Optique de l'illuminateur  
**l.s.:** lame semi-réfléchissante

**Oc:** Oculaire  
**Lt:** Lentille de tube  
**Obj $\infty$ :** Objectif corrigé à l'infini, de foyer image  $F_o$   
**Éch:** Échantillon observé

*Remarque: La figure est un schéma de principe indiquant les différentes conjugaisons. Des lentilles supplémentaires (usuellement accolées aux deux diaphragmes DO et DC) sont souvent ajoutées en pratique pour améliorer les performances de l'illuminateur.*

## Figure 2

Système d'éclairage : Le système optique d'éclairage de l'échantillon peut paraître assez complexe, il permet, grâce aux différentes conjugaisons (lampe à arc  $\leftrightarrow$  diaphragme d'ouverture  $\leftrightarrow$  infini d'une part, et diaphragme de champ  $\leftrightarrow$  échantillon, d'autre part) d'obtenir un éclairage parfaitement uniforme de l'échantillon. Ce principe d'éclairage porte le nom de Köhler. Nous allons revenir sur l'éclairage Köhler, un peu plus loin, lors de l'étape d'alignement de la lampe à arc, et des diaphragmes d'ouverture et de champ.

Cube séparateur : La présence de la lame semi réfléchissante permet l'observation en réflexion à travers l'oculaire. Il s'agit donc d'un microscope en réflexion, on dit alors que l'on travaille en lumière blanche. Ajoutons que si l'on remplace cette lame semi réfléchissante par un cube dichroïque, on peut alors effectuer des observations en fluorescence : la lame dichroïque réfléchit parfaitement à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore, et elle transmet parfaitement à la longueur d'onde de fluorescence. Au niveau de la figure 1, on passe de la position lumière blanche (n°1 BF) à la position fluorescence (n°3 Cy3) en tournant la molette désignée par « sélection du filtre de fluorescence » sur la figure 1.

*Remarque : Une description plus détaillée des cubes dichroïques est présentée en annexe.*

Jeu d'objectifs : Le microscope est muni de trois objectifs : \*5, \*10, \*20 . Vous commencerez par sélectionner l'objectif \*10.

Système de visualisation : L'observation se fait soit par les oculaires, soit par la caméra, soit par les deux en même temps. On passe de l'un à l'autre en tirant sur la tirette située à droite des oculaires

(figure 1). Pour la phase de prise en main du microscope, vous observerez à l'oculaire : poussez la tirette à fond.

Après cette brève description du principe de fonctionnement du microscope nous allons passer à la phase expérimentale, qui commence par un réglage du microscope.

- Allumer l'alimentation de la lampe à arc (boite blanche Olympus U-RFL-T). Vous prendrez soin de lire les précautions d'utilisation sur le dessus de cette boîte. Vous n'éteindrez pas cette alimentation avant la fin du TP.
- Pour la phase de réglage, vous travaillerez en lumière blanche : la tournette de sélection du filtre de fluorescence est sur 1 : BF (figure 1).
- Poussez à fond les tirettes de réglage des deux diaphragmes (figure 1).
- Positionné l'obturateur mécanique (figure 1) sur la position rond blanc.
- A ce stade, vous devez observer de la lumière à la sortie de l'objectif de microscope.

### 1-1 Réglage du diaphragme de champ

Placez un morceau de feuille de papier blanc quadrillé sur le plateau porte substrat. Effectuez la mise au point sur le quadrillage. La mise au point s'effectue avec la grosse molette située au pied du microscope. **La mise au point s'effectue avec grand soin : assurez-vous de ne pas venir taper l'objectif de microscope sur le porte substrat.**

*Remarque : Si vous avez trop de lumière à travers l'oculaire, vous pouvez mettre en place les deux densités optiques neutres (figure 1) en les poussant à fond.*

Fermez le diaphragme de champ (FS) en tirant sur la tirette correspondante (figure 1). Vous voyez apparaître l'iris du diaphragme dans votre champ de vision. A l'aide du tournevis (figure 1) et des deux vis de réglage du diaphragme de champ, centrez l'iris au milieu de votre champ de vision. Pour parfaire le réglage, on peut augmenter la taille du diaphragme de champ de manière à faire tangenter l'image de l'iris et le bord circulaire du champ de vision défini par l'oculaire (cf figure 3).

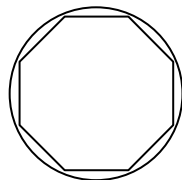


Figure 3

Le diaphragme de champ est alors réglé. Vous pouvez laisser le diaphragme avec l'ouverture décrite sur la figure 3.

On ne manquera pas de noter que le diaphragme de champ est effectivement conjugué avec l'échantillon. On remarquera également que le diaphragme de champ porte bien son nom, puisqu'il permet de définir le champ que vous voulez éclairer au microscope.

### 1-2 Réglage du diaphragme d'ouverture

Retirez la feuille de papier et remplacez là par une surface réfléchissante (plaque de silicium). Effectuez la mise au point sur cette surface. Otez ensuite l'un des deux oculaires et observez l'image du diaphragme d'ouverture (pour cela fermez le diaphragme : tirette (AS) de la figure 1). A l'aide du tournevis et des vis ad hoc, centrez l'iris du diaphragme d'ouverture.

Le diaphragme d'ouverture est alors réglé.

Notons que le diaphragme d'ouverture sert à régler l'ouverture du système c'est à dire, pratiquement, à régler la quantité de lumière envoyée sur l'échantillon. Pour une utilisation

classique du microscope, on règle la tirette du diaphragme d'ouverture à mi-course, pour avoir suffisamment de lumière sans toutefois risquer de détériorer l'échantillon.

### **1-3 Centrage de la lampe à arc et réglage de l'uniformité d'éclairage**

Utilisez toujours l'objectif \*10 et placez le plateau porte échantillon tout en bas. Ouvrez les deux diaphragmes à fond. Vous observez alors sur le plateau (pas à travers l'oculaire) un disque uniformément éclairé.

Pour régler la lampe à arc, on dispose de 3 vis de réglage (figure 1) :

- Une vis de focalisation de la lentille de collection
- Deux vis de centrage de l'arc

Le réglage de l'arc se fait en deux étapes :

#### **Centrage de l'arc**

Tournez légèrement la vis de focalisation de manière à venir imager l'arc sur le plateau.

*Remarque : on obtient une image plus nette si l'on ferme le diaphragme de champ. On pourra enlever les densités optiques si l'on manque de lumière.*

Actionnez les deux vis de centrage. Vous voyez sur le plateau deux images de l'arc. Le cube d'éclairage qui contient l'arc est muni, en son fond, d'un miroir sphérique au centre de courbure duquel se trouve l'arc. Ce que vous observez donc sur le plateau, c'est l'image directement transmise par la lentille de collection d'une part et l'image réfléchi sur le miroir sphérique d'autre part.

Pour optimiser le centrage de l'arc **il ne faut pas superposer les deux images**. En effet si vous superposez les deux images, vous re-concentrez la lumière réfléchi par le miroir sphérique sur l'arc, ce qui a pour effet de détériorer l'arc très rapidement (la durée de vie de l'arc est alors divisée par deux). Pourtant, il est clair que l'éclairage le plus uniforme est obtenu lorsque les deux images de l'arc sont superposées. Il faut donc trouver un compromis entre durée de vie de l'arc et uniformité d'éclairage.

Centrez l'arc de manière à rapprocher les images des deux arcs le plus possible sans toutefois les superposer.

#### **Réglage de l'uniformité d'éclairage**

Repositionnez le bout de papier sur le plateau porte échantillon et faite la mise au point dessus. Ré-ouvrez le diaphragme de champ de manière à éclairer la plus grande zone observable possible (cf. figure 3).

Observez une zone du papier uniformément blanche et régler la focalisation de la lentille de collection de manière à obtenir un éclairage uniforme.

N'oubliez pas de redonner la bonne ouverture au diaphragme d'ouverture pour pouvoir commencer les observations.

Le microscope est alors réglé.

## **II-2 Prise en main de la caméra et du logiciel**

La caméra SPOT montée sur le microscope est une caméra monochrome numérique constituée d'une matrice de 1200\*1600 pixels. Chaque pixel fournit un signal  $I_{x,y}$  codé sur 12 bits (soit 4096 niveaux de gris). Ce signal est linéaire (i.e. proportionnel à l'intensité lumineuse incidente) sur la quasi-totalité de cette plage de fonctionnement, du bruit d'obscurité de la caméra (soit  $I_{x,y} \approx 40$ ) jusqu'à son niveau d'intensité maximal :  $I_{x,y} = 4095$  (le pixel est ensuite saturé). On peut par ailleurs modifier le temps d'intégration de la caméra ( $1\text{ms} < T < \text{qq s}$ ) de manière à pouvoir imager des objets plus ou moins lumineux.

La caméra est associée à un logiciel de traitement d'image : ImageProPlus. Ce logiciel permet l'acquisition d'images, et leur post-traitement (mesure d'intensité moyenne, de distances, de surfaces...mais aussi traitement du signal : filtres, FFT, segmentation...).

Avant d'observer les biopuces, nous allons commencer par apprendre à utiliser les fonctionnalités de base du logiciel ce qui nous permettra de caractériser la caméra SPOT. Nous déterminerons ainsi son bruit d'obscurité puis nous évaluerons son uniformité spatiale, ainsi que sa linéarité en fonction de l'intensité lumineuse incidente mais aussi en fonction du temps d'intégration.

Soulignons l'importance de ces étapes de caractérisation qui sont indispensables pour s'assurer que les mesures réalisées sur biopuces sont significatives.

## 2-1 Acquisition d'une image avec le logiciel ImageProPlus

Sur le microscope, sélectionner le cube dichroïque Cy3 (N°3) et l'objectif \*5. Placer un bout de papier quadrillé sous l'objectif de microscope, et effectuer la mise au point (à travers l'oculaire) sur une croix du quadrillage. Mettez la tirette située sur le côté de l'oculaire en position intermédiaire de manière à observer simultanément avec l'oculaire et la caméra. Allumez l'alimentation de la caméra SPOT. Tournez vous vers le PC et lancer le logiciel ImageProPlus (icône ipwin32).

La première chose qu'il est sage de faire, lorsque l'on commence une nouvelle série d'expérience avec un logiciel d'acquisition d'images, c'est de créer un nouveau répertoire de manière à pouvoir stocker les nombreuses images que vous ne manquerez pas de sauvegarder. Le logiciel ImageProPlus est muni d'un système puissant de gestion de base de données, nous ne l'utiliserons pas ici. Nous nous contenterons de créer un nouveau répertoire à partir du gestionnaire de fichier Windows. Vous placerez votre répertoire sous la racine :


C: TPbiopuce\JourMoisAnnée

Regardons maintenant d'un peu plus près le logiciel ImageProPlus.

### 2-1-1 Fonctions élémentaires du logiciel ImageProPlus.

Au niveau de la barre des menus, vous disposez des fonctions classiques Windows : File, Edit, Window et Help. Vous êtes assurément parfaitement familiers avec toutes ces fonctions, nous n'y reviendrons donc pas. Toutefois, nous décrivons certaines d'entre elles ponctuellement par la suite. Intéressons nous, à présent, à un menu vital du logiciel d'acquisition d'images : **Acquire**

### 2-1-2 Le menu Acquire

Il est divisé en quatre sous-zones. Nous ne nous intéresserons qu'à la première. Les cinq fonctions constituant cette sous-zone sont accessibles directement en cliquant sur l'icône :  Cliquer donc sur cette icône pour accéder au menu de paramétrage de l'acquisition.

### 2-1-3 La fenêtre Diagnostic Spot RT

Si vous n'accédez pas à la fenêtre décrite ci-dessous mais à une fenêtre plus petite, cliquez, dans cette petite fenêtre, sur **Setup**.

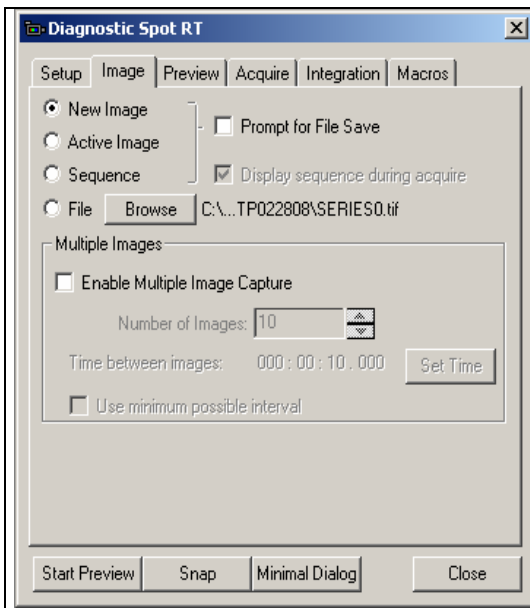


Figure 4

Sur cette fenêtre, on peut régler les différents paramètres pour l'acquisition des images. On s'intéressera plus particulièrement à trois sous-menus : Image, Preview, Acquire. Le principe d'acquisition d'une image est simple. On commence par visualiser en temps réel l'image vue par la caméra. Lorsque l'on a optimisé le réglage, on acquiert une photo.

### Sous-menu : Image

Dans cette fenêtre, on peut sélectionner le type d'image que l'on veut acquérir :

- **Active Image** : à chaque fois que l'on acquiert une nouvelle image, l'image précédente est écrasée.
- **New Image** : l'image précédente n'est pas écrasée.
- **Sequence** : cette fonction permet d'acquérir une série d'images, à intervalles de temps réguliers, de façon automatique. Nous reviendrons sur cette fonction plus tard.
- **File** : ne nous intéresse pas ici.

*Remarque : Si vous cochez Prompt for File Save, le logiciel vous proposera systématiquement de sauvegarder la nouvelle image acquise...ennuyeux ⇒ décocher.*

Décocher **Enable Multiple Image Capture** (Option associée à la fonction **Sequence**) et cocher **New Image**.

### Sous-menus : Preview et Acquire.

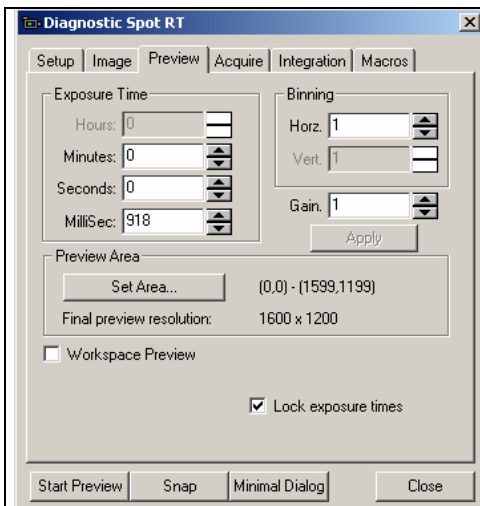


Figure 5

Sur ces deux fenêtres (**Preview** et **Acquire**), on peut régler les temps d'intégrations (**Exposure Time**) correspondant à la visualisation en temps réel (**Preview**) et à l'acquisition (**Acquire**).  
Si l'on coche Lock exposure times, le logiciel prend le même temps d'acquisition pour Acquire et Preview...(cocher).  
On ne s'intéressera pas aux options Binning et gain (qui doivent rester à 1). Le lecteur intéressé pourra toutefois se reporter à l'annexe technique sur les caméras CCD pour plus d'informations.

*Remarque : Si vous n'avez pas accès aux temps d'acquisition dans la fenêtre **Preview**, aller dans le menu **Acquire**, cliquer sur **Auto-Exposure Options** et sélectionner **User-Defined Exposure**.*


Vous pouvez à présent cliquer sur **Minimal Dialog** puis sur **Preview**. Vous visualisez alors en temps réel ce que voit la caméra. Vous pouvez modifier le temps d'intégration de manière à obtenir une bonne luminosité de l'image en fluorescence du bout de papier. Vous pouvez arrêter, à tout moment la pré-visualisation en cliquant sur **stop** et revenir à la fenêtre **Diagnostic Spot RT** en cliquant sur **Setup**. Si vous cliquez sur **Snap**, vous prenez une photo que vous pourrez sauvegarder par la suite (dans votre répertoire en format .tiff).

A ce stade, vous êtes donc capable de prendre une image... Nous allons à présent nous intéresser à l'exploitation de cette image.

## 2-2 Exploitation d'une image.

Ce qui nous intéresse tout particulièrement à partir d'une image de fluorescence, c'est de pouvoir déterminer l'intensité moyenne, l'écart type sur cette image (pour toute l'image ou pour une zone d'intérêt de l'image).

### 2-2-1 Histogramme d'une image.

Sélectionnez une image que vous voulez analyser puis cliquer sur l'icône  .

La fenêtre qui apparaît alors représente l'histogramme de **toute** l'image. Cette fenêtre est munie de plusieurs menus déroulants. Observer l'effet des différentes options dans les menus **Report**, **Update**, **Scaling**.


On remarquera que cocher **Statistics** (menu **Report**) permet de faire apparaître la moyenne et l'écart type associés à l'histogramme et donc à l'image. Cette fonction nous intéresse donc tout particulièrement.

**Note importante** : dans le menu **Report**, on se gardera de cocher **Intensity Cal**, fonction qui permet de faire des calibrations en intensité qui ne nous intéresse pas ici (l'utilisation d'une telle calibration fausserait ici toutes nos mesures sur les biopuces.). La fonction **Spatial Cal** permet quant à elle de faire une calibration métrique de l'image. Mais avant de pouvoir utiliser cette fonction, il faut étalonner le microscope, ce que nous n'avons pas encore fait... (nous effectuerons cette étalonnage plus tard). Pour l'instant, n'utiliser donc pas non plus cette fonction **Spatial Cal**.

A ce stade vous êtes donc capable de déterminer la fluorescence moyenne d'un échantillon et l'écart type associé. Nous allons à présent apprendre à effectuer la même opération sur une zone d'intérêt de l'image.

### 2-2-2 Définition d'une AOI.

Comme son nom l'indique, il s'agit d'une Area Of Interest. L'AOI peut avoir plusieurs formes : rectangle, ellipse, quelconque. On se contentera des formes les plus simples. On crée une AOI en

cliquant sur l'une des icône :  puis en la dessinant sur l'image. On peut effacer l'AOI en re cliquant sur l'icône correspondante. Une fois que cette AOI est définie, on peut, comme dans le cas de l'image entière, obtenir l'histogramme de cette AOI. La moyenne et l'écart type associés correspondent à l'AOI et non plus à l'image entière.

*Remarque : lorsqu'une image, une AOI et un histogramme sont ouverts, on peut déplacer l'AOI à volonté sur l'image puis cliquer sur le menu **Update** (qui porte bien son nom) de l'histogramme afin d'obtenir les valeurs correspondant à la nouvelle position de l'AOI.*

### Sauvegarde d'une AOI.

Il peut être intéressant de sauvegarder une AOI (pour pouvoir la réutiliser d'une image à l'autre par exemple). La procédure est la suivante.

- Tracer votre AOI sur une image.
- Dans la barre générale de menus du logiciel, aller dans **Edit/AOI**. Une fenêtre apparaît. Cliquer sur **Add**.
- Donner un nom personnalisé à votre AOI puis fermé la boîte de dialogue.
- Remarque : Il n'est pas besoin de sauvegarder.
- 

### Rappel d'une AOI

On peut ensuite rappeler son AOI préférée lorsque l'on traite une autre image. La procédure est la suivante : Dans la barre générale de menus du logiciel, aller dans **Edit/AOI**. Une fenêtre apparaît. Sélectionner votre AOI puis cliquer sur **Set**.

A ce stade vous êtes donc capable de déterminer la fluorescence moyenne et l'écart type associé de n'importe quelle zone de l'image. Nous allons finalement nous intéresser à une méthode qui permet de stocker aisément dans un même tableau les valeurs intéressantes correspondant à plusieurs images.

### 2-2-3 Data Collector

Dans le menu déroulant **Measure** sélectionnez **Data Collector** (qui porte décidément bien son nom).

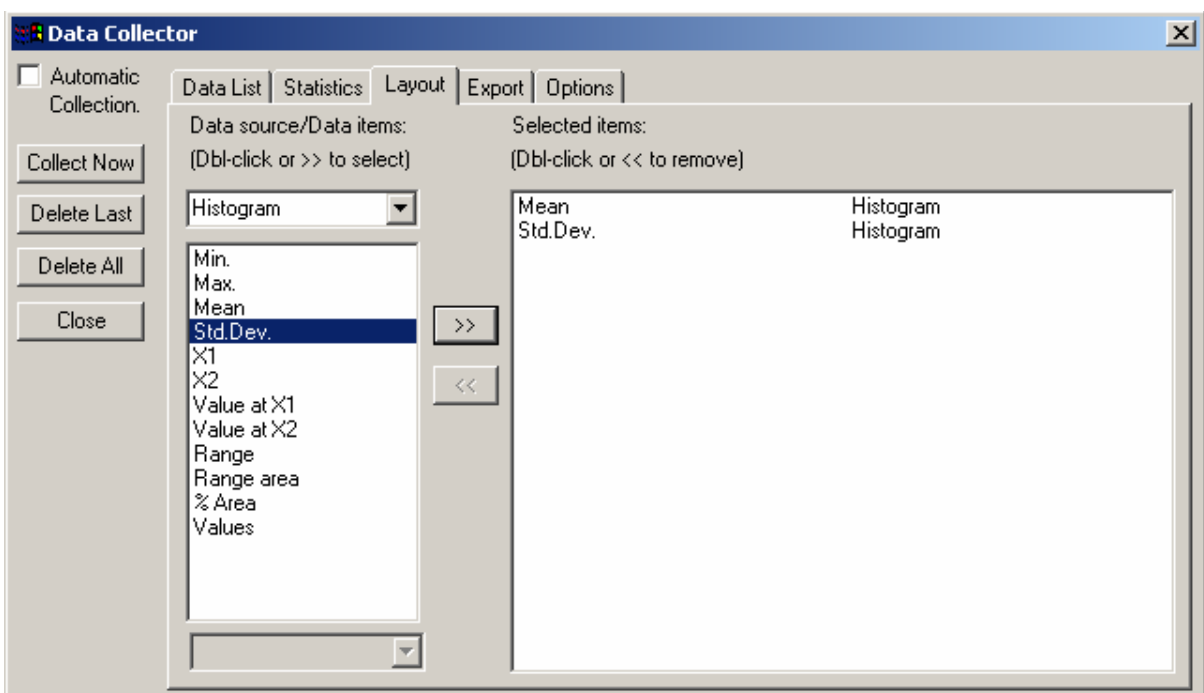


Figure 6

Accédez au menu **Layout** puis, comme indiqué sur la photo ci-dessus, sélectionnez **Mean** et **Std.Dev**. Une fois cette opération effectuée, accédez au menu **Data List**. Si vous cliquez alors sur **Collect Now**, vous enregistrez automatiquement les valeurs de **Mean** et **Std.Dev** correspondant à l'histogramme que vous avez sélectionné. Vous pouvez ensuite passer à un autre histogramme et collecter, dans le même tableau, les nouvelles valeurs.

Cette fonction peut s'avérer très utile lorsque l'on a 50 histogrammes à traiter à la suite. En effet le tableau ainsi constitué est directement exportable sur Excell. Pour cela, aller dans le menu **Export** (fenêtre **Data Collector**) et exporter la **DataList** vers **Excell DDE**.


Vous êtes à présent en mesure de qualifier la caméra.

## II-3 Caractérisation de la caméra Spot

### **3-1 Vérification de l'uniformité de l'éclairage sur l'échantillon.**

Positionnez l'étalon de fluorescence sur le plateau porte échantillon. Il s'agit de la lame de verre colorée de couleur orange ; elle possède la propriété de fluorescer dans la même gamme de longueur d'onde que le Cy3. Effectuez la mise au point dessus et prenez une image. A partir de cette image, évaluez l'uniformité de l'éclairage sur l'échantillon.

*Remarque : on pourra utiliser la fonction **Line Profile** du logiciel ImageProPlus. On accède à cette*

*fonction en cliquant sur l'icône :* 

### **3-2 Vérification de la linéarité de la caméra.**

Nous allons à présent vérifier la linéarité de la caméra en fonction de l'éclairage puis en fonction du temps d'intégration. Pour ce faire, nous utiliserons une autre source lumineuse constituée :

- D'une alimentation (Polytec) réglable par un potentiomètre.
- D'un guide de lumière.
- D'un diffuseur parfait, ou diffuseur lambertien, qui possède la propriété d'avoir une luminance uniforme. L'éclairage produit par cette source sur la caméra est donc parfaitement uniforme.

N'éteignez pas la lampe à arc, vous pouvez la couper en fermant l'obturateur mécanique du microscope.

Repasser en éclairage fond blanc, mettez le diffuseur en place, effectuez la mise au point.

#### **Vérification de la linéarité de la caméra en fonction de l'éclairage.**

Mettez en place le puissance-mètre à la place de l'oculaire. Pour un temps d'intégration fixe, faire varier l'éclairage au potentiomètre. Relevez, pour une dizaine de valeurs, la puissance vue par le puissance-mètre ainsi que l'intensité moyenne vue par la caméra. Tracez l'une en fonction de l'autre.

Vous pouvez recommencer l'opération pour d'autres temps d'intégration.

Vous devez obtenir un faisceau de droites ce qui vous permet de vous assurer de la linéarité de la caméra. L'ordonnée à l'origine de ce faisceau de droites correspond à l' 'offset' de la caméra. Cet offset est dû aux imperfections de la caméra ; pour plus d'informations sur les différents bruits concernant une caméra CCD, le lecteur pourra se reporter à l'annexe.

#### **Vérification de la linéarité de la caméra en fonction du temps d'intégration.**

Placez le potentiomètre pour produire un éclairage moyen. Enregistrez plusieurs images en faisant varier le temps d'intégration. Tracez l'intensité moyenne vue par la caméra en fonction du temps d'intégration.

### **Mesure du courant d'obscurité.**

Le courant d'obscurité se mesure à partir d'une image de noir. Otez donc le diffuseur parfait.

Enregistrez plusieurs images du noir en faisant varier le temps d'intégration. Tracez l'intensité moyenne vue par la caméra en fonction du temps d'intégration.

Vous devez obtenir une droite dont l'ordonnée à l'origine correspond à l'offset de lecture et la pente correspond au courant d'obscurité.

### **Mesure du bruit d'obscurité et du bruit de lecture.**

A partir des mesures effectuées dans le paragraphe 3.2.3, tracez l'écart type (mesure des images de noir) en fonction du temps d'exposition.

Vous devez obtenir une droite dont l'ordonnée à l'origine correspond au bruit de lecture et la pente correspond au bruit d'obscurité.

## **II-4 Etalonnage métrique du microscope.**

Placez vous en lumière blanche, objectif \*5, effectuez la mise au point sur le micromètre objet.

Prenez une image. Dans la fenêtre générale de ImageProPlus, sélectionnez le menu

**Measure/Calibration/Spatial**. Vous voyez alors apparaître une fenêtre de dialogue. A partir de cette fenêtre, vous allez pouvoir calibrer, d'un point de vue spatial le microscope, et ceci pour chacun des trois objectifs. Commencez par effacer toutes les calibrations précédentes (touche **Del. All**). Cliquez ensuite sur **New** puis donnez un nom à votre calibration (5x par exemple).


Sélectionnez ensuite l'unité dans laquelle vous voulez travailler ( $\mu\text{m}$  par exemple). Cliquez ensuite sur **image**. Sur l'image que vous avez prise apparaît un segment. Positionnez-le, et allongez-le éventuellement, de manière à ce qu'il corresponde à un intervalle de votre micromètre. Répondez à la question 'Reference represents how many units' avant de fermer la fenêtre. Les mesures métriques que vous effectuerez par la suite (longueur, diamètre, surface...) sont à présent calibrées pour l'objectif \*5.

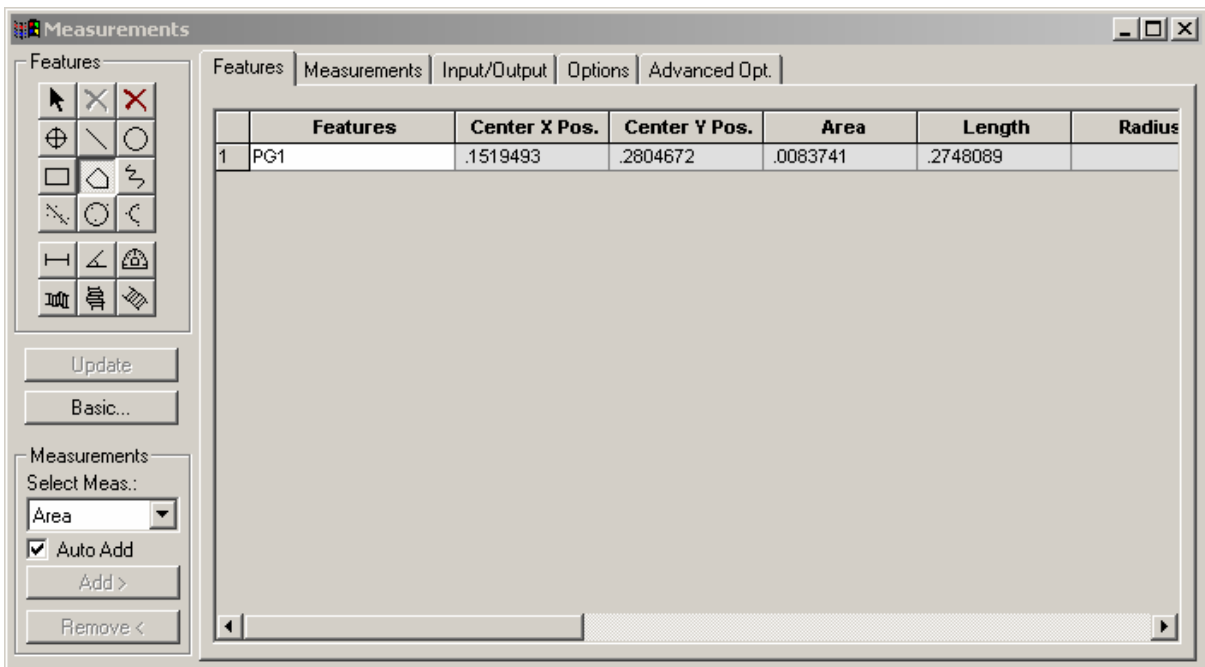
Effectuez la même opération d'étalonnage métrique pour les deux autres objectifs.

Vous pouvez à tout moment choisir votre calibration (selon l'objectif utilisé) dans le menu **Measure/Calibration/Select Spatial**.

## **II-5 Mesure de la densité de puissance sur l'échantillon.**

Toujours en lumière blanche, objectif \*5, fermez le diaphragme de champ de manière à ce qu'il apparaisse sur l'image de la caméra CCD. Prenez une image. A partir de celle-ci, déterminer une

valeur de la surface éclairée. Pour cela, on cliquera sur l'icône .



**Figure 7**

A partir de cette fenêtre Measurements, sélectionnez l'icône correspondant au polygone. Puis sur votre image tracez le contour du diaphragme de champ. Vous avez alors accès à la surface correspondante, dans la fenêtre **Measurements** (cf. Figure 7).

*Remarque : assurez-vous que vous avez sélectionné le calibre correspondant à votre objectif de microscope.*

Retirez le micromètre objet et placez le puissance-mètre sous l'objectif. Déduisez-en la densité de puissance sur l'échantillon.

Mettez en place le cube dichroïque Cy3 et recommencez l'opération.

Que vous inspirent ces résultats ?

Déterminez la densité de puissance pour les deux autres objectifs. Comment évolue la densité de puissance ? Le résultat est-il attendu ?

## II-6 Observation des biopuces.

Mettez votre biopuce en place, effectuez la mise au point (objectif \*5) et prenez une image.

### **6-1 Soustraction du bruit de fond**

Dans le paragraphe précédent, vous avez pu déterminer l'offset de la caméra. Si l'on veut effectuer des mesures précises de fluorescence, il est important de soustraire ce bruit de fond des images de fluorescence, et ceci de manière systématique.

Commençons donc par enregistrer une image de ce fond. Fermez l'obturateur mécanique du microscope. Enregistrez une image. Vous disposez alors de deux images : une image des plots fluorescents et une image du bruit de fond. Vous allez soustraire cette dernière de la première. Allez dans le menu **Process/Operations**. A l'aide de la fenêtre de dialogue qui apparaît vous pouvez effectuer différentes opérations sur les images. A vous de jouer.

Cette opération de soustraction du bruit de fond est indispensable si l'on veut effectuer des mesures précises en fluorescence. Critiquez cette phrase à la vue des niveaux de fluorescence auxquels vous avez à faire.

## 6-2 Uniformité de fluorescence d'un plot

A partir de l'image d'un plot fluorescent, évaluez son uniformité.

## 6-3 Moyenne de fluorescence des plots


Déterminez une valeur moyenne de fluorescence, et un écart-type, pour les différentes séries de plots fluorescents. Commentez vos résultats.

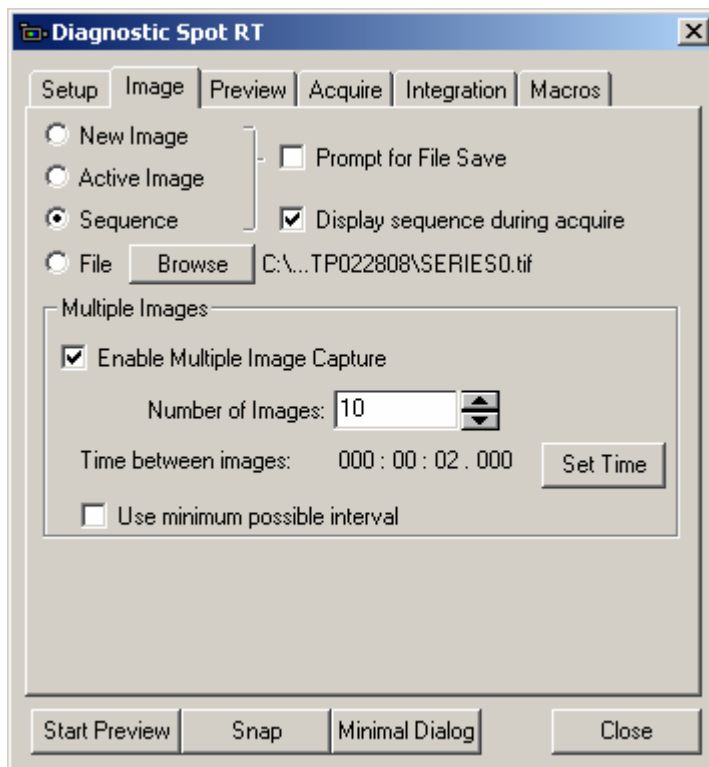
## 6-4 Mise en évidence du photoblanchiment.

Nous allons finalement mettre en évidence un problème important, qui entache d'erreur les mesures de fluorescence sur les biopuces : le photoblanchiment. Pour plus de précisions, voir l'annexe.

### Acquisition d'une séquence d'images

Vous utiliserez l'objectif \*20, dans un premier temps. Effectuez la mise au point sur l'un des plots les plus fluorescents. Fermez l'obturateur avant de lire la suite. Vous allez utiliser la fonction

**sequence** (qui porte bien son nom)... Cliquez sur l'icône  de manière à accéder à la fenêtre de



dialogue représentée sur la figure 8.

**FIGURE 8**

Sélectionnez **Sequence**. Le logiciel est alors configuré pour prendre un certain nombre d'images avec un intervalle de temps défini par l'utilisateur (une image toutes les 2 secondes, pour un total de 10 images, sur la figure 8). On lance la prise séquentielle en cliquant sur **Snap**.

Le phénomène de photoblanchiment est 'relativement' lent. (nous relativiserons ce 'relativement' un peu plus loin). Etalez donc la séquence sur une dizaine de minutes, avec une mesure toutes les 30 secondes.

Une fois les paramètres réglés, prenez la séquence. N'oubliez pas d'ouvrir l'obturateur...

### **Exploitation de la séquence d'images.**

Après la prise de cette séquence, vous avez la possibilité de la revoir comme au cinéma... Que constatez-vous ?

Afin de quantifier ce que vous n'aurez pas manqué de constater, nous allons mesurer la fluorescence moyenne de chacune des photos qui constituent cette séquence. Dans le menu **Acquire/Sequence Tools**, sélectionnez **Extract Frames**. Le résultat obtenu est mieux visualisé si l'on sélectionne ensuite le menu **Window/Cascade Images**. Pour chacune des photos que vous venez de prendre, mesurez la moyenne et l'écart type d'une zone d'intérêt que vous aurez choisie. Tracez la courbe représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps d'exposition. Que constatez-vous ? Commentez.

Recommencez l'opération en utilisant l'objectif \*5. Que constatez-vous ? Commentez.

## ANNEXE I: RAPPELS THEORIQUES

(Rédigée par P.PELETIE et P.BARRITAUULT, LETI/CEA)

### I - Biopuces à ADN et fluorescence

La détection de l'hybridation d'une sonde ADN avec sa cible ne se fait pas aujourd'hui directement (mesure électrique, absorption, UV) parce que les systèmes de détection ne sont pas assez sensibles pour cela.

Aussi la solution quasi-universelle est la détection directe d'un marqueur accroché soit sur la sonde, soit sur la cible.

Au début, on a utilisé des marqueurs radioactifs aujourd'hui remplacés par des traceurs fluorescents qui demandent moins de logistique et requièrent une mise en œuvre moins onéreuse.

Un traceur fluorescent est une molécule qui éclairé par un rayonnement lumineux émet des photons dans une longueur d'onde supérieure aux photos d'excitation.

Il existe **deux grands types de systèmes** pour lire une puce à ADN :

- Le microscope à balayage laser.
- Le microscope équipé d'une caméra refroidie permettant de faire une image de la puce.
  - ✓ Le premier système consiste à balayer un faisceau laser sur la puce (ou balayer la biopuce sous un faisceau fixe), et on lit l'émission de fluorescence sur un détecteur de type photo-multiplicateur.

Ce système est le plus souvent confocal, c'est-à-dire que la présence d'un diaphragme devant le détecteur élimine toute lumière en dehors du plan de mise au point. De plus ce système est très résolu et permet de descendre à des résolutions de quelques microns, il est particulièrement adapté à des puces formées de cellules épaisses en verre ou plastique (qui souvent fluorescent) et avec des couches biologiques gênant l'observation d'un plan où sont accrochés les molécules d'ADN marqués.

- ✓ L'autre type de système est un microscope standard muni d'une caméra CCD refroidie et où l'éclairage est soit un laser de longueur d'onde approprié, soit une lampe blanche (lampe à arc à vapeur de mercure) filtrée pour avoir une bande d'excitation adéquate.

Lorsque la puce est constituée de plots discrets indépendants de taille  $> 50 \mu\text{m}$ , ce dispositif est suffisant et beaucoup moins cher que le microscope confocal à fluorescence et balayage laser.

C'est ce dispositif que vous utiliserez au cours du TP.

### II - Fluorescence

La fluorescence est un phénomène connu et utilisé en chimie analytique en solution homogène la plupart du temps.

Beaucoup de molécules sont fluorescentes et la plupart utilisés en biologie et pouvant se greffer sur des acides nucléiques sont des molécules organiques.

Une molécule fluorescente (cf. diagramme de Jablonski) absorbe un photon d'énergie  $h\nu$  qui

permet à la molécule de passer à un état excité  $E_1$  avec une certaine énergie de vibration et rotation (absorption en  $10^{-15}$  s).

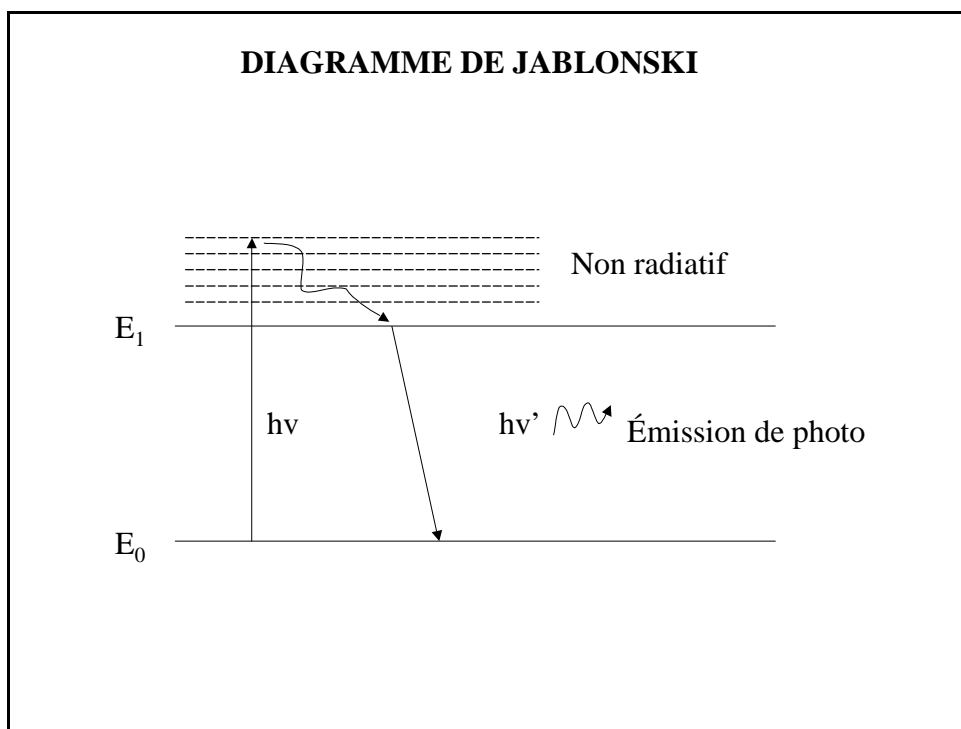
Par des phénomènes non radiatifs, la molécule perd un peu d'énergie et retombe en  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$  s à l'état  $E_1$ , puis revient à l'état fondamental  $E_0$ , en émettant un photon d'énergie  $h\nu'$

$$\nu' \leq \nu \rightarrow \lambda' > \lambda \text{ (loi de Stokes).}$$

La molécule **reste** à l'état  $E_1$  pendant un temps  $\tau$  appelé durée de vie de fluorescence. Ce temps  $\tau$  est de l'ordre de quelques ns.

Deux autres paramètres sont importants à connaître : le coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$  et le rendement de fluorescence  $\rho$ .

### Diagramme de Jablonski



Ainsi pour une intensité  $I_0$  d'excitation, le flux lumineux absorbé dans une solution suit la loi de Beer-Lambert.

$$I_{\text{abs}} = I_0 (1 - e^{-\epsilon lc})$$

$l$  = épaisseur traversée

$c$  = concentration molaire (Moles/l)

Le rendement  $\rho$  est le rapport entre les photons émis et les photons **absorbés**.

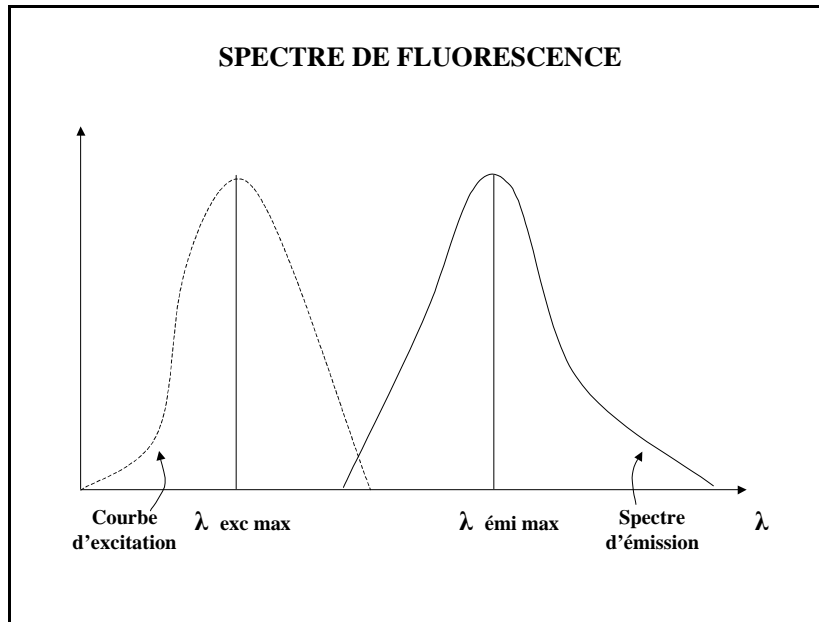
$$\rightarrow I_{\text{fluo}} = \rho I_0 (1 - e^{-\epsilon lc})$$

or  $\epsilon lc$  est très faible devant 1  $\rightarrow 1 - e^{-\epsilon lc} \sim \epsilon lc$ .

$$\rightarrow I_{\text{fluo}} = \rho I_0 \epsilon lc$$

La fluorescence est une méthode beaucoup plus sensible que la mesure d'absorption, il n'en reste pas moins que l'intensité de fluorescence est toujours très faible par rapport à l'intensité d'excitation.

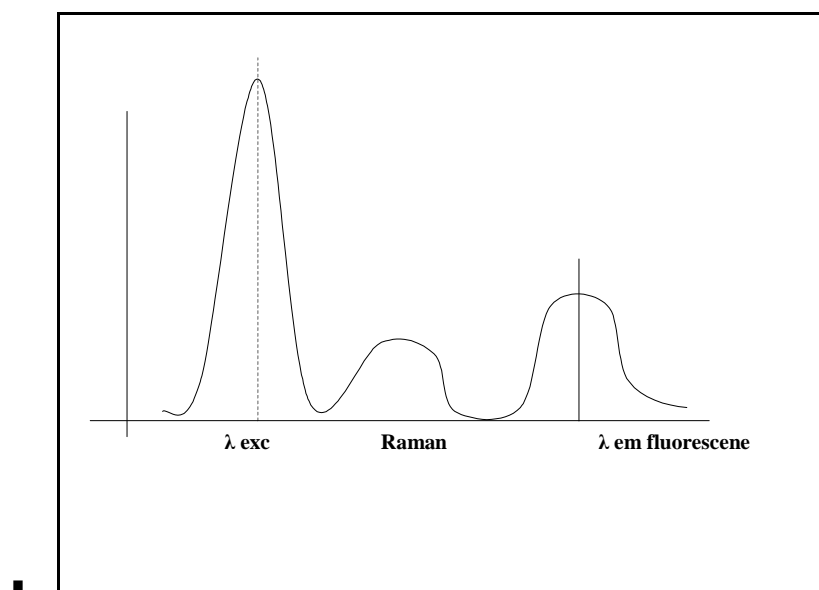
## Spectre de fluorescence



Les 2 spectres sont symétriques si les molécules fluorescentes n'interfèrent pas avec l'environnement et présentent un maximum qui est la longueur d'onde d'excitation et d'émission spécifiée dans les documentations.

## Phénomènes parasites de la fluorescence

- Quand on excite les fluorophores (de préférence avec une bande étroite autour de  $\lambda_{exc\ max}$ ), on aura une diffusion importante à cette longueur d'onde, diffusion plus importante sur surface solide que dans une solution homogène. De plus, entre excitation et émission, on trouve un spectre « parasite » qui est le Raman de la solution dans laquelle se trouve le fluorophore



- Un autre phénomène affaiblissant la fluorescence est le « Quenching » : extinction de tout

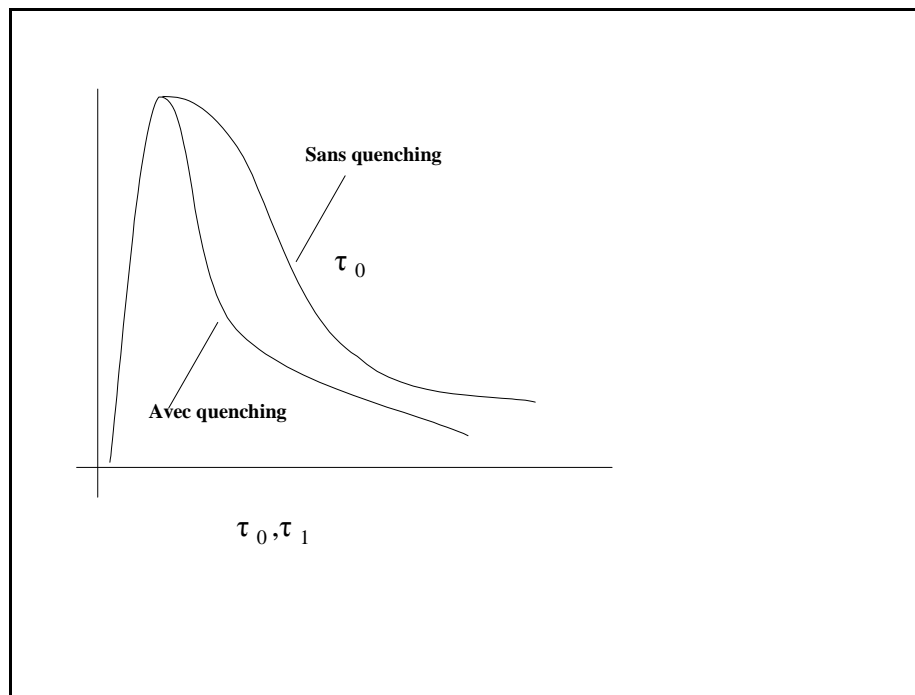
ou partie de la fluorescence par interaction entre le fluorophore et son environnement.

Signalons que ce quenching est toujours présent sur substrat solide, car le fluorophore a tendance à céder ses électrons au substrat.

On peut le mettre en évidence en regardant la décroissance de fluorescence.

Ainsi, en l'absence de quenching, la décroissance de fluorescence suit une loi exponentielle de type  $I = I_0 e^{-t/\tau}$

S'il y a quenching, une partie des molécules verra sa durée de vie fortement atténuée et le résultat sera une loi multi-exponentielle.



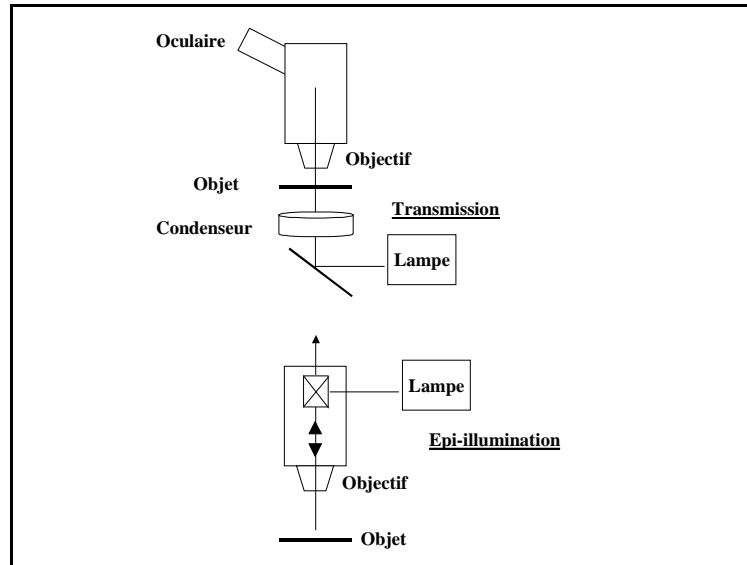
Une déconvolution de ces courbes permet par exemple d'avoir :

- ✓ Sans quenching  $\tau_0 = 3 \text{ ns}$
- ✓ Avec quenching 10 % à  $\tau_0 = 3 \text{ ns}$  (c.a.d. 10% des molécules qui fluorescent  
Normalement)  
80 % à  $\tau_1 = 500 \text{ ps}$  (80% des molécules qui ont une  
fluorescence très faible)  
10 % extinction totale

### III - Microscopie de fluorescence

Un microscope est un instrument d'optique capable de descendre à des résolutions de l'ordre du micron voire un peu en dessous.

On peut travailler en transparence (objets transparents) ou en réflexion (c'est le cas des objets utilisés dans le TP), les voies excitation-émission sont alors communes sur une partie du trajet ; on parle alors d'épi-illumination.



- Les caractéristiques du microscope dépendent fortement de l'objectif qui est l'élément central pour former l'image.

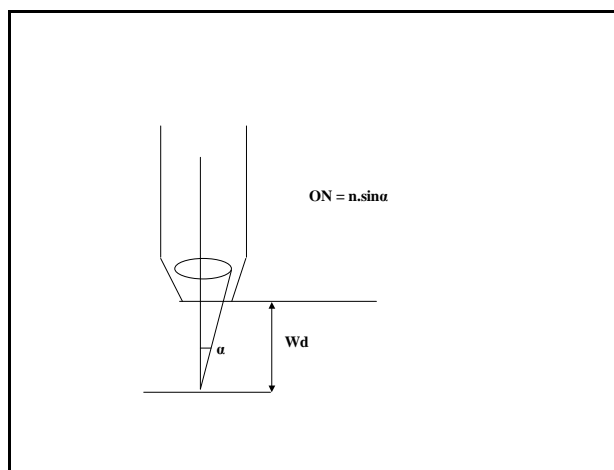
L'objectif est caractérisé par :

- ✓ Son grandissement 10X, 20X, 50X, 100X

$G^{dt}$	10	20	50	100
----------	----	----	----	-----

- ✓ Son ouverture numérique

ON	0,3	0,46	0,8	0,95
----	-----	------	-----	------



✓ Sa distance de travail Wd

10X Wd = 10,1 mm

20X Wd < 5 mm

✓ La résolution au sens critère de Rayleigh est alors  $= \frac{1,22 \lambda}{ON}$

La plupart des objectifs aujourd'hui renvoie l'image à l' $\infty$ , cette image est reprise par une lentille de tube qui forme l'image réelle sur la caméra (ou bien cette image réelle est reprise par les oculaires qui en donnent une image virtuelle).

Ainsi un objectif 10X sera marqué 10X / 0,3

$\infty / 0,07$

0,07 signifie que l'objectif travaille dans des conditions normales avec une lame couvre-objet d'épaisseur 0,07 mm.

## ▪ Éclairage

Pour éclairer correctement en fluorescence on utilise le plus souvent une lampe à vapeur de mercure à arc (quelquefois une lampe Xenon). Ces lampes ont un spectre large permettant de couvrir le spectre depuis l'UV jusqu'au proche IR.

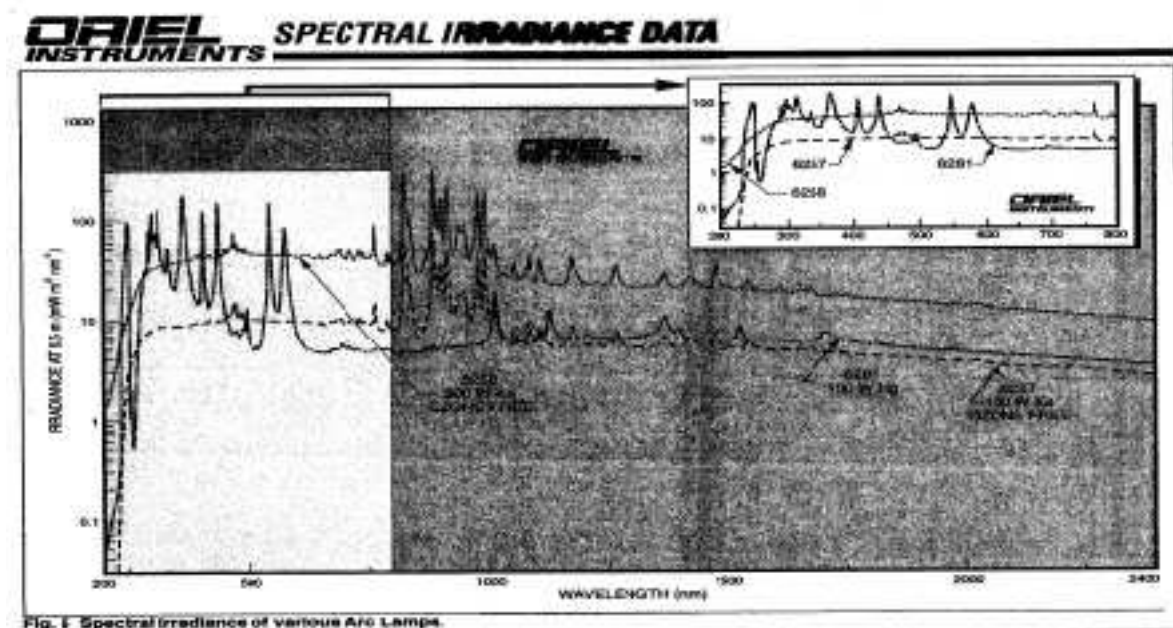


Fig. 1 Spectral irradiance of various AFD Lamps.

Afin d'avoir un éclairage homogène et contrôlé il y a deux diaphragmes sur le trajet et une lentille dite de collimation.

Le diaphragme d'ouverture sert à limiter le flux, en fluorescence il peut **être totalement ouvert** (au détriment de la qualité de l'image).

Le diaphragme de champ sert à limiter le champ d'observation et il apparaît net dans le plan objet. En fluorescence, ce diaphragme **doit être réglé** de façon à illuminer seulement la zone d'observation.

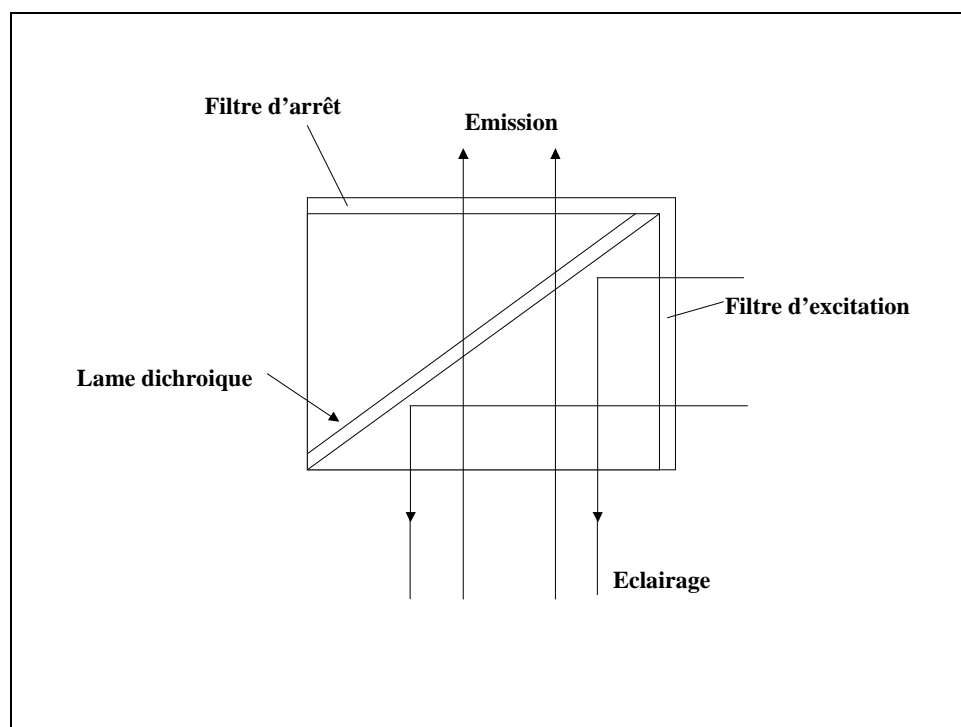
En effet, la lumière hors de la zone utile contribuera à créer un flux parasite.

Nous rappelons que pour travailler correctement, l'éclairage a un rôle important sur la qualité de l'image, même si l'objectif est un des éléments essentiels du microscope.

Enfin la lentille de collimation sert à avoir un champ éclairé assez homogène, en aucun cas on ne doit travailler avec l'image de l'arc intense au centre du champ et les bords de champs sombres.

### Cube dichroïque

Pour séparer l'excitation de l'émission et éviter de projeter sur la caméra une diffusion importante de type Rayleigh, on utilise un cube dichroïque.



Ce cube est formé de 3 éléments :

- ✓ Le filtre d'excitation sert à limiter la bande spectrale utile (est fonction du fluorophore utilisé).
- ✓ La lame dichroïque réfléchit la lumière d'excitation et transmet la lumière d'émission.
- ✓ Le filtre d'arrêt supprime toute longueur d'onde en dessous d'une certaine valeur.

Ainsi pour chaque fluorophore, on trouve un cube dichroïque spécifique.

#### IV - Principaux fluorophores

Les plus utilisés en biologie sont les suivants (lamda en nm):

Les Alexas	Alexa 488	$\lambda_{exc}$ 488	$\lambda_{em}$ 520
	Alexa 532	$\lambda_{exc}$ 532	$\lambda_{em}$ 580
	Alexa 633	$\lambda_{exc}$ 633	$\lambda_{em}$ 680

Les Cyanines	CY2	$\lambda_{exc}$ 488	$\lambda_{em}$ 520
	CY3	$\lambda_{exc}$ 550	$\lambda_{em}$ 580
	CY5	$\lambda_{exc}$ 650	$\lambda_{em}$ 680

Fluorescéine et Calcéine	$\lambda_{exc}$ 490	$\lambda_{em}$ 520
--------------------------	---------------------	--------------------

Les Rhodamines	FAM	} $\lambda_{exc}$ 488	$\lambda_{em}$ 520
	R110		
	JOE		
	ROX		
	TAMRA	$\lambda_{exc}$ 540	$\lambda_{em}$ 580

La phycoérythrine	$\lambda_{exc}$ 480-550	$\lambda_{em}$ 580
-------------------	-------------------------	--------------------

(bande d'absorption très large).

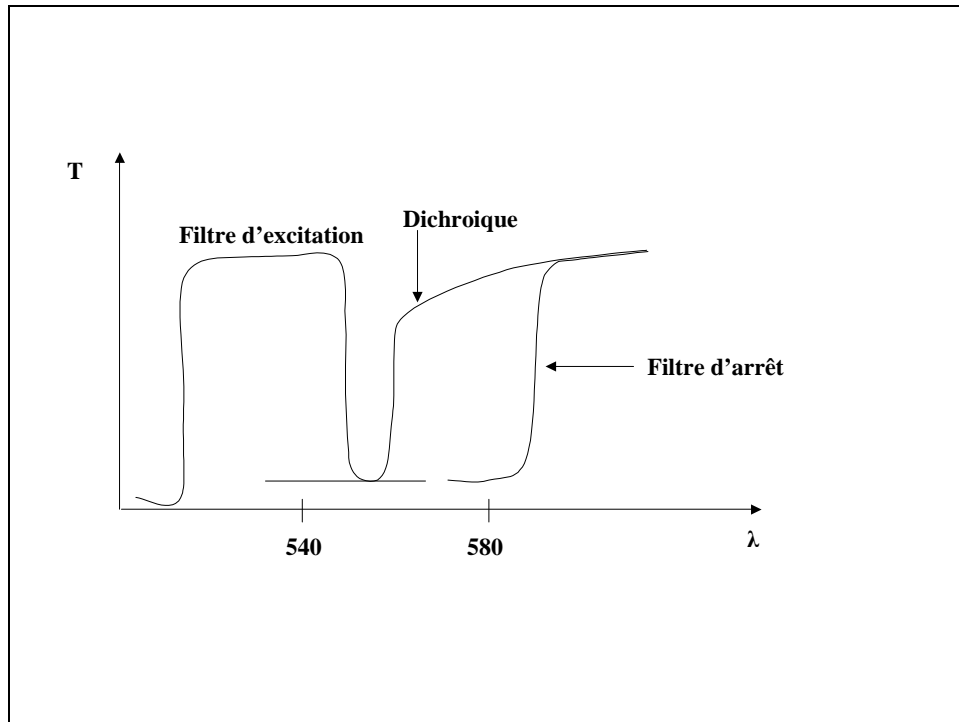
On peut remarquer que la plupart des longueurs d'onde d'excitation sont « calées » sur des raies laser :

- Argon 488, 514 nm
- Krypto 650 nm
- Yag doublé 532 nm
- Laser semi-conducteur 633 nm

Chaque fluorophore est donné avec son coefficient d'absorption et son rendement.

Il est ainsi possible théoriquement de calculer la fluorescence émise dans un volume donné de concentration donné (si il n'y a pas de phénomènes d'absorption de la lumière d'excitation et/ou d'émission et s'il n'y a pas de quenching).

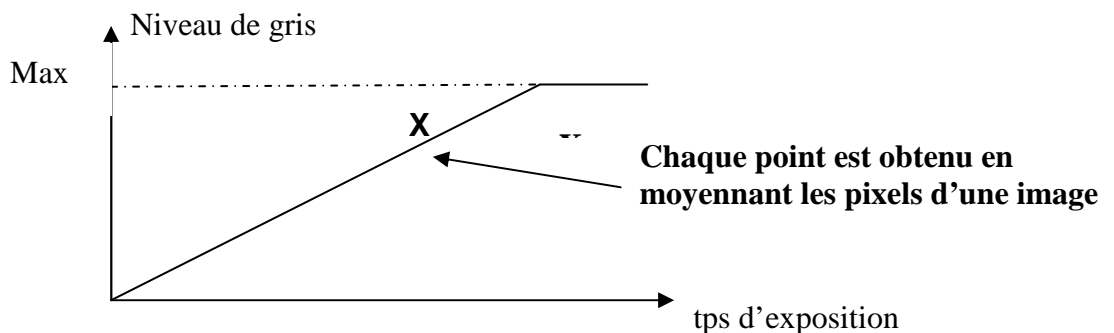
## Exemple de cube dichroïque pour CY3



## V - Caractérisation d'une caméra numérique.

### V-1 Linéarité

On s'assure que le niveau de gris est proportionnel au flux lumineux, en traçant la courbe suivante pour plusieurs valeurs de puissance d'éclairement données :



Remarques :

- Si l'éclairement de la caméra n'est pas parfaitement homogène, il faut mesurer la moyenne d'une région centrale de l'image
- il convient de faire beaucoup de points de mesure dans la région proche de la saturation pour vérifier qu'un éventuel dispositif d'anti-blooming ne pose pas de problème.

S'assurer également que le niveau de gris maximum correspond au maximum de dynamique du convertisseur analogique-numérique. (ex. : niveau de gris maximum = 4095 pour le convertisseur 12 bits de la caméra Spot)

*Interprétation :*

Si la fin de la courbe n'est pas linéaire, cela peut signifier que la caméra est équipée d'un dispositif anti-blooming (anti-aveuglement). Se renseigner auprès du constructeur pour vérifier, sinon, il y a un problème.

**V-2 Pas de quantification :**

C'est une donnée essentielle. C'est le nombre d'électrons par niveau de gris pour un pixel. On montre qu'il correspond au coefficient directeur de la droite:

$$\text{niveau gris} = q \sigma^2$$

avec  $\sigma = \frac{1}{\sqrt{2}} \text{écart-type [image1-image2]}$

Pour cela, en faisant varier l'éclairement, on trace la droite suivante en prenant 2 images pour chaque valeur d'éclairement. Chaque point est obtenu en calculant l'image obtenue par différence de 2 images et en calculant son l'écart type /  $\sqrt{2}$

ordre de grandeur :  $\sim 6 \text{ e-}/\text{niveau}$  (caméra Spot)

On peut calculer alors le rendement quantique de la caméra pour une longueur d'onde donnée :

Soit  $M_q$  le niveau de gris ;  $M_q = (1/q) \cdot N_e = Q_e (1/q) N_{ph}$

Ceci exprime que le niveau de gris est proportionnel au nombre d'électrons par pixel,  $N_e$ , et ce nombre est lui-même proportionnel au nombre de photons reçus,  $N_{ph}$ , par l'intermédiaire du rendement quantique  $Q_e$ .

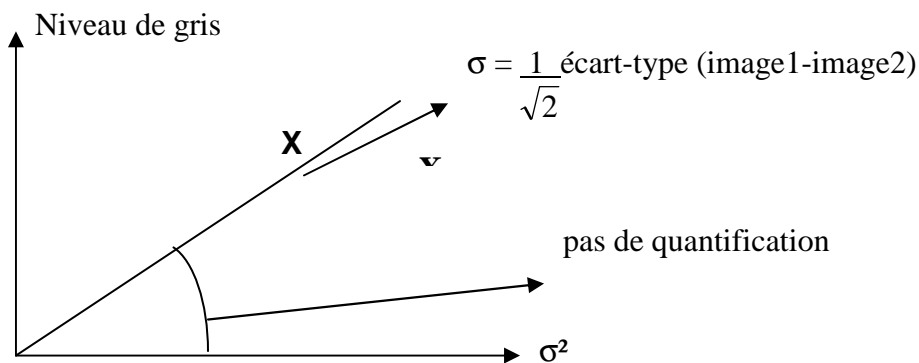
Or les nombres d'électrons et de photons suivent tous deux des lois de Poisson ; donc la variance sur le niveau de gris s'exprime de la manière suivante :

$$\text{Var } M_q = (1/q^2) \text{var } N_e = (1/q^2) N_e \quad \text{et } M_q = (1/q) N_e$$

De ces deux relations on en tire :

$$q = M_q / \text{var } M_q$$

$$\text{et } Q_e = q \cdot M_q / N_{ph}$$



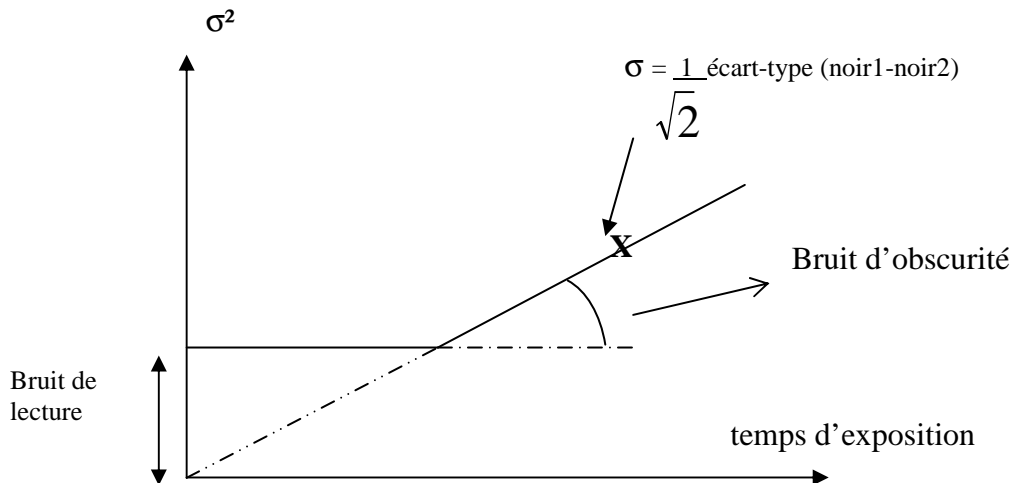
### V-3 Bruits

#### Bruit de lecture

*Il est dû à :*

- l'efficacité du transfert de charge
- +
- amplification analogique

Ce bruit est obtenu en mesurant l'offset de la courbe suivante :



Chaque point est obtenu en calculant l'image obtenue par différence de 2 images de noir et en calculant son l'écart type /  $\sqrt{2}$

og : bruit de lecture  $\sim 40 e^-$  (caméra Spot)  
bruit d'obscurité  $\sim 10 e^-$  /pixel /seconde

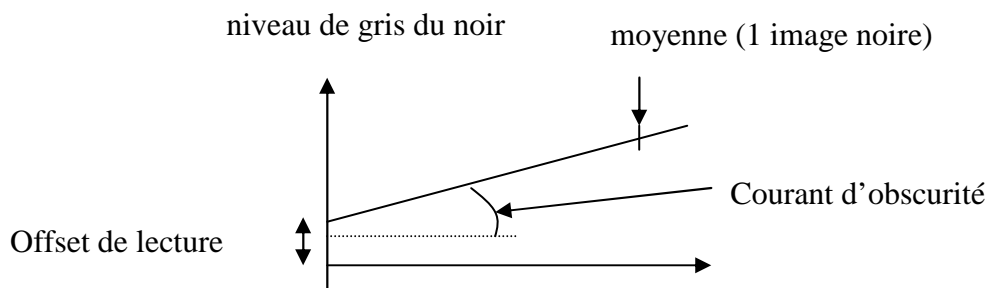
#### Bruit d'obscurité

Selon certaines sources, il s'agit d'électrons arrachés spontanément à la matrice. Selon d'autres du rayonnement de corps noir. Enfin, certains auteurs le considèrent comme le bruit photonique associé au courant d'obscurité

#### Courant d'obscurité

Même courbes que le bruit d'obscurité mais ce n'est pas un phénomène aléatoire ! C'est l'augmentation naturelle du niveau de noir en fonction du temps d'exposition

On le mesure de la manière suivante :



Chaque point est obtenu en calculant la moyenne sur une image de noir à un temps d'exposition donné.

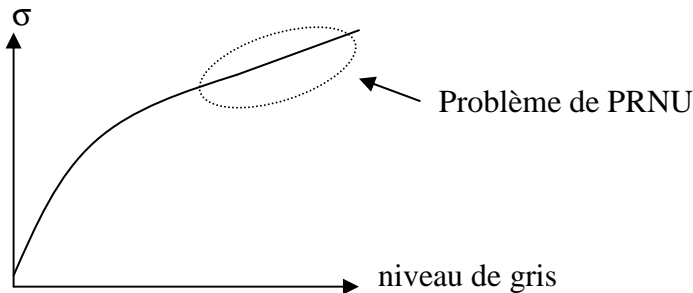
og : 1 e-/pixel/seconde (caméra Spot)

### Offset

Dû aux imperfections de la camera (pré-charge du CCD). On l'obtient en mesurant l'ordonnée à l'origine de la courbe précédente. Ce n'est également pas un phénomène aléatoire.

### Bruit de PRNU

Traduit une différence de sensibilité entre les différents pixels du CCD. Il n'est pas aléatoire. On peut mettre en évidence un problème de PRNU à l'aide de la courbe suivante :



$$\text{Car } \sigma = \sqrt{\sigma^2 \text{ PRNU} + \sigma^2 \text{ photonique}}$$

Or  $\sigma \text{ PRNU}$  varie en fonction du carré des niveaux de gris

et  $\sigma \text{ photonique}$  varie proportionnellement au niveaux de gris

=> une linéarité en fin de courbe traduit un problème de PRNU et nécessite une étude approfondie.

### Bruit photonique

Il est indépendant de la caméra ! Il est dû au fait que toute source régulée émet un nombre de photons par seconde dépendant d'une statistique de Poisson. Il varie en terme d'électrons en

$$\frac{\sqrt{(\text{signal en } e) * \text{pas de quantification}}}{\text{pas de quantification}}$$

### Bruit de quantification

Il correspond à la perte d'information sur le signal lumineux qui a lieu lors de la conversion des charges accumulées par la CCD en niveaux de gris.

Sa contribution exprimée en électrons vaut :  $\sqrt{\frac{q^2}{12}}$  avec  $q = \text{pas de quantification}$  (cf. précédemment)

### Conclusion

Le **niveau de gris** d'un pixel donné correspond au produit :

$$(\text{nombre de photons incidents} * \text{rendement quantique} / \text{pas de quantification}) \\ + \text{offset de lecture} + (\text{courant d'obscurité} * \text{tps expo} / \text{pas de quantification})$$

Il convient tout de même de prendre garde à l'éventuelle présence d'un filtre d'entrée, et au taux de remplissage incomplet du CCD. Penser également, à tenir compte du coefficient de remplissage des pixel du CCD.

Dans le cas d'une caméra présentant un problème de PRNU, il faut appliquer un coefficient dépendant du pixel considéré (obtenu à l'aide d'une plage de lumière uniforme).

L'**incertitude** sur ce niveau de gris correspond à la somme RMS de tous les bruits précédemment décrits.

$$\sqrt{\sigma_{\text{lecture}}^2 + (\sigma_{\text{obscurité}} * \text{tps expo})^2 + \sigma_{\text{photonique}}^2 + \sigma_{\text{quantification}}^2}$$

La **dynamique** est le rapport :  $\frac{\text{capacité de puits maximum}}{\text{bruit}}$

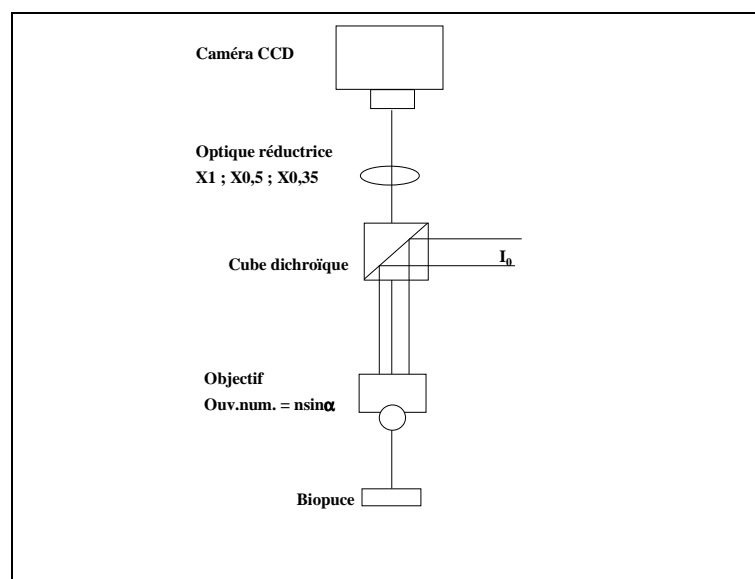
Elle est parfois exprimée en dB (calculer  $20*$  le logarithme décimal du rapport précédent)

Le **rapport signal sur bruit (S/B)** n'est pas une valeur figée : elle dépend du signal considéré. Ainsi, les forts signaux auront un meilleur S/B que les faibles. Il est également parfois donné en dB. Attention ! Le constructeur donne souvent une valeur fixe, généralement égale à la dynamique, mais il se place dans le cas le plus favorable : celui du signal donnant le niveau de gris maximum. C'est par exemple le cas de SPOT qui annonce une dynamique de 60dB (1000) et un S/B de 60dB.

## VI - . Calcul de l'éclairement sur une caméra CCD

Cette partie montre qu'en connaissant la puissance incidente et le facteur d'instrument du microscope choisi, on peut comparer les valeurs de fluorescence d'un système à l'autre (quel que soit le microscope et la caméra utilisée pourvue qu'elle soit linéaire).

### Schéma en épi-illumination



Loi de Beer-Lambert : l'absorption d'une mince couche de concentration  $c$  donne :

$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l c}$   $l$  : épaisseur de la couche ;  $\epsilon$  ; coefficient d'absorption molaire.

Sur une surface plane, on peut transformer la formule ainsi :

$I = I_0 \cdot e^{-\sigma n_d d}$   $n_d$  : densité de fluorophores/cm<sup>3</sup> ;  $d$  : épaisseur de la couche ;  $\sigma$  : section efficace (en cm<sup>2</sup>).

$\sigma$  est relié à  $\epsilon$  par la relation :  $\sigma = 3,82 \cdot 10^{-21} \epsilon$

Il est intéressant de calculer la densité de fluorescence par surface, donc on va partir d'une densité de puissance incidente que l'on notera :  $I_0/s^2$

$s^2$  représente le champ objet illuminé.

La densité de fluorescence émise dans un objectif d'ouverture numérique ON =  $n \sin \alpha$  est alors :

$DI_f = n_f k_f (I_0/s^2) \sigma n_d d (\sin^2 \alpha)$  ( $n=1$ , puisque l'on est dans l'air)

Où  $n_f$  est le rendement de fluorescence et  $k_f$  est un coefficient  $< 1$  qui tient compte d'une anisotropie de fluorescence et éventuellement d'un quenching partiel.

Un pixel caméra de taille  $P_x$  correspond à un pixel objet  $p_x$  tel que  $P_x = G p_x$  ;  $G$  est le grandissement du microscope.

Si l'on considère que la fluorescence est uniforme sur une petite zone, l'éclairement sur un pixel caméra sera l'intégrale de cette formule sur la surface du pixel, soit :

$E_f = n_f k_f (I_0/s^2) \sigma n_d d (\sin^2 \alpha) p_x^2$

Le niveau de quantification pour le type de caméras CCD que nous utilisons est proportionnel au nombre de photons reçus par pixel :  $0 < M_q < 4095$  (puisque nous avons des caméras 12 bits) :

$M_q = C \cdot n_c \cdot N_{ph}$

$C$ 'est le coefficient de conversion,  $n_c$  est le rendement quantique de la caméra à la longueur d'onde d'émission de fluorescence et  $N_{ph}$  est le nombre de photons reçus sur un pixel.

Ce nombre de photons est égal à :

$dP \cdot T_{int} \lambda / (hc)$  ;  $dP$  est la densité de puissance dans le plan objet,  $T_{int}$  est le temps d'intégration sur la caméra.

En remplaçant  $p_x$  par  $P_x/G$ , et en introduisant un facteur de transmission des filtres  $T_f$ , on trouve :

$M_q$  (par pixel) =  $(C \cdot n_c \cdot P_x^2) (n_f \cdot k_f \cdot \sigma n_d d) (T_f \sin^2 \alpha / G^2) (Dp \cdot T_{int} \cdot \lambda / hc)$

Cette formule permet de voir que le signal quantifié sur la caméra dépend de 4 ensembles de facteur :

Le premier facteur dépend de la caméra (coeff. de conversion, rendement quantique, taille du pixel).

Le deuxième facteur dépend du fluorophore (rendement de fluorescence, anisotropie, section efficace, densité de greffage et épaisseur de la couche).

Le troisième facteur dépend du microscope (transmission des filtres, ouverture numérique de l'objectif et grandissement).

Enfin, le dernier facteur tient compte des conditions de mesure (densité de puissance, temps d'intégration et longueur d'onde).

Pour une biopuce formée de plots distincts, un plot de taille  $p$  donne une image de taille  $Gp$ , correspondant à un nombre de pixels  $N$  ; on peut donc écrire :  $Gp = NP_x$ , soit  $N = GP/P_x$

Si on intègre la fluorescence sur tout le plot, on devra (en supposant le plot homogène), multiplier  $M_q$  par  $N^2$  et l'on trouve alors :

Fluorescence intégrée sur le plot —  $(C.n_c.P^2) (n_f k_f \sigma n_d d) (T_f \sin^2 \alpha) (Dp.T_{int} \cdot \lambda/hc)$

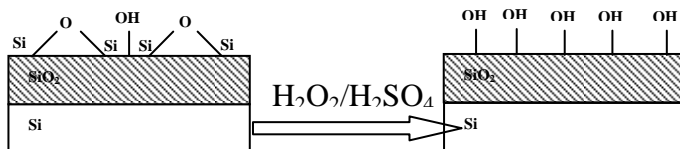
Seul le grandissement a disparu, ce qui est logique.

Les conclusions que l'on peut tirer de cette formule :

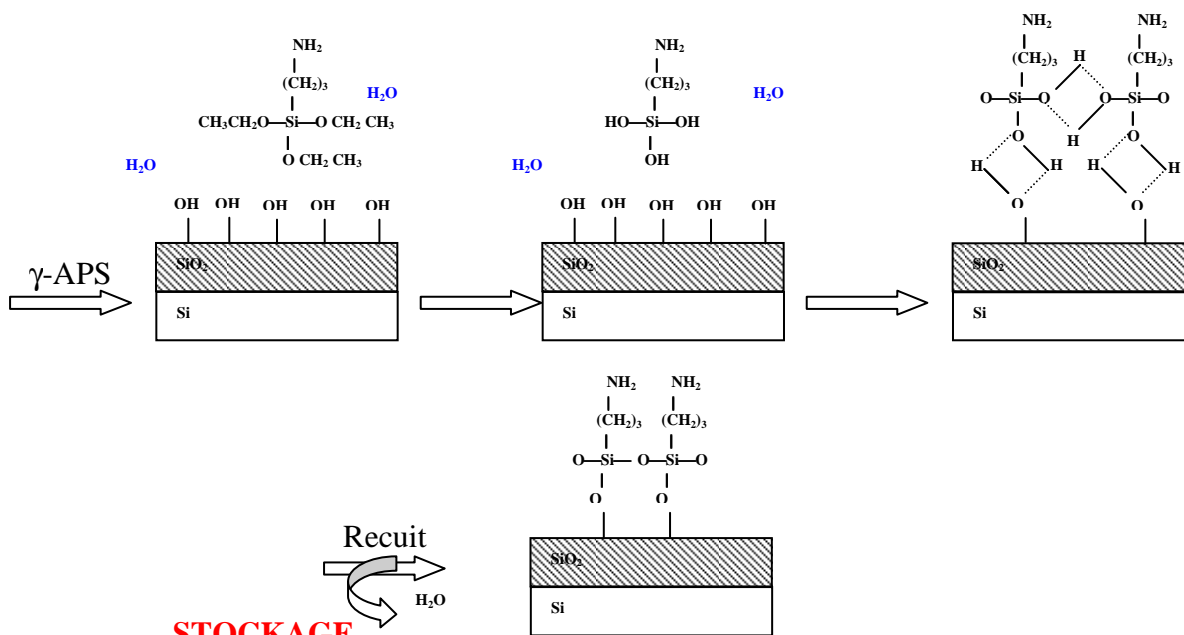
Pour comparer les mesures entre plots et entre deux puces différentes, il est nécessaire de tenir compte de la densité de puissance, qui peut varier du centre du champ au bord du champ et aussi qui peut varier au cours du temps.

# ANNEXE II : DETAILS DES REACTIONS CHIMIQUES EN SURFACE DU SUBSTRAT

## HYDROXYLATION



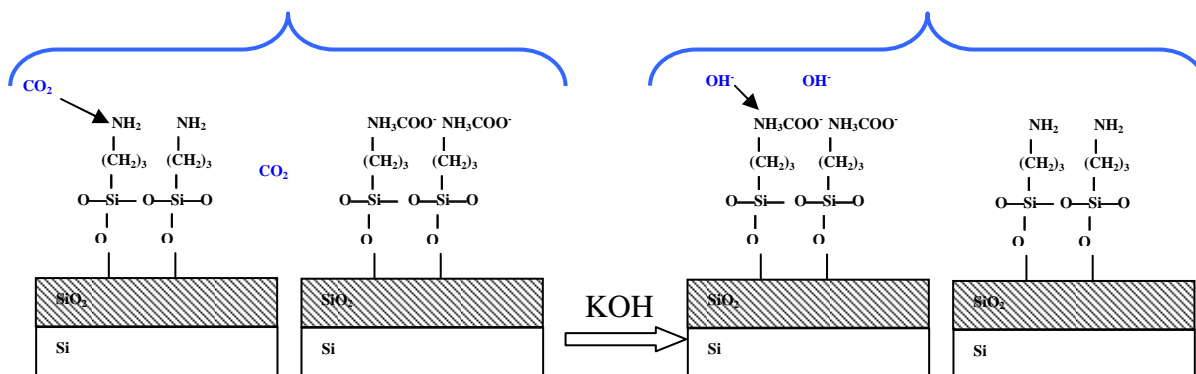
## SILANISATION



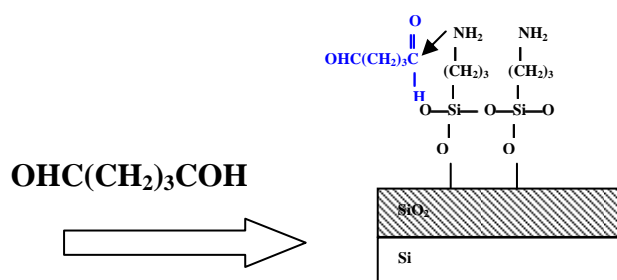
## STOCKAGE

- Rôle du  $\text{CO}_2$  atmosphérique.
- Formation de Silane.

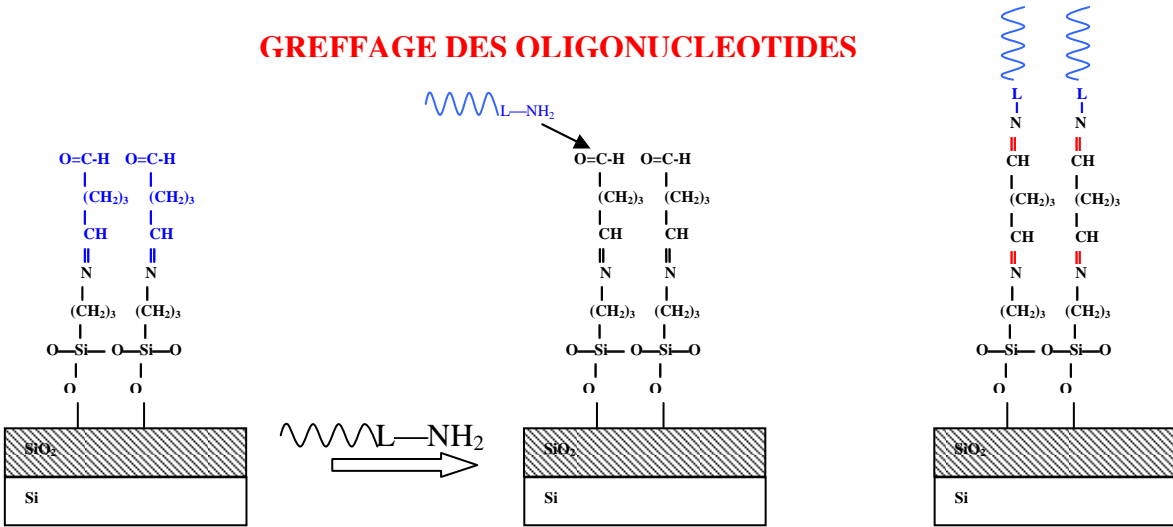
## ACTIVATION



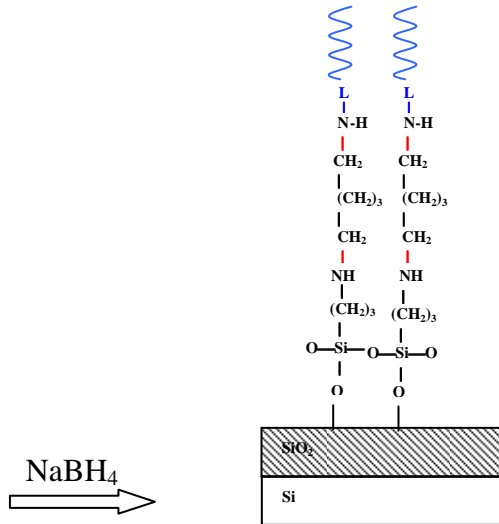
## GLUTARALDEHYDISATION



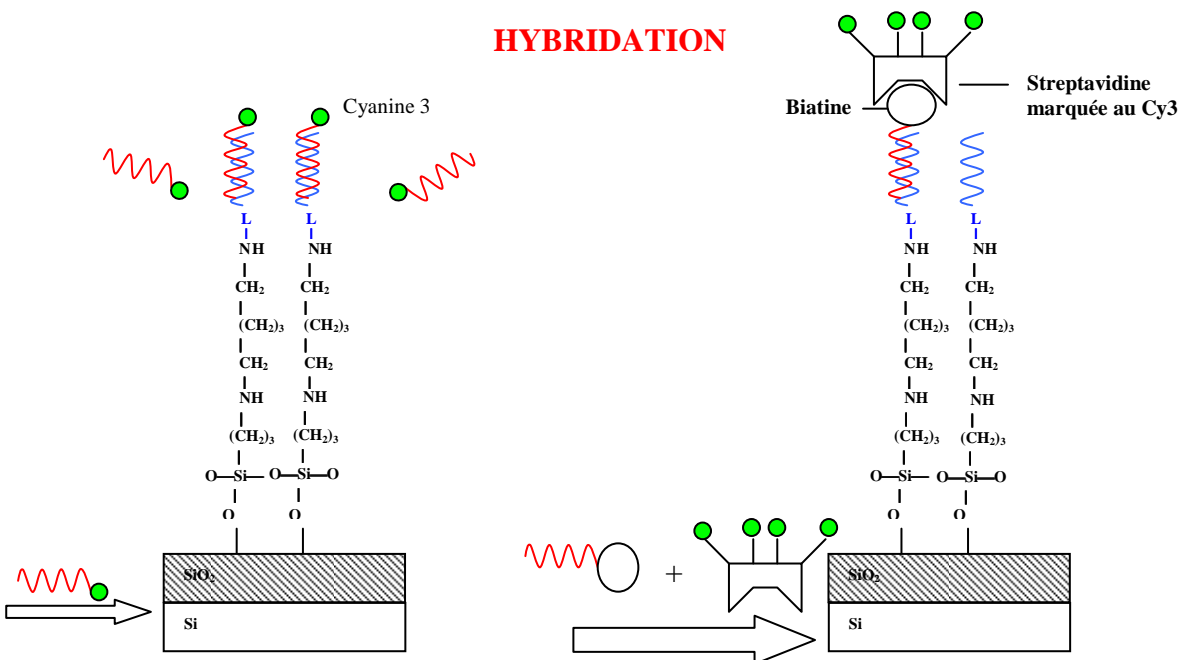
## GREFFAGE DES OLIGONUCLEOTIDES



## TRAITEMENT POST-IMMOBILISATION



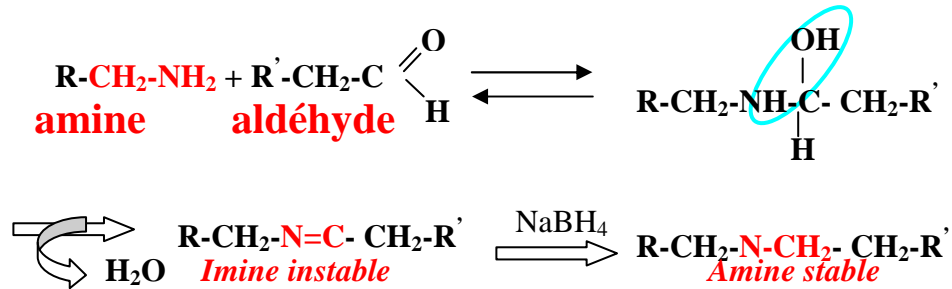
## HYBRIDATION



Le rôle de l'hydroxylation est à la fois de créer des liaisons OH sur la surface qui permettront un bon greffage de la couche fonctionnelle (le silane). - La silanisation permet ensuite de greffer du  $\gamma$ -APS (3 aminopropyl triéthoxysilane) sur la plaque. Le recuit permet ensuite de solidifier le polymère, de le rendre plus stable mécaniquement en supprimant les liaisons hydrogène Si-O-Si.

- Deux phénomènes peuvent se produire pendant la phase de stockage :

- 1) Instabilité de  $\text{NH}_2$  qui réagit avec le  $\text{CO}_2$  atmosphérique pour donner du  $\text{NH}_3^+\text{COO}^-$
- 2) Instabilité des liaisons O-Si-O qui s'hydrolyse pour donner du Silane.



### Hydrures ou silanes.

De formule générale  $\text{Si}_n\text{H}_{2n+2}$ , les silanes sont les équivalents siliciés des hydrocarbures.

Le silane ( $\text{SiH}_4$ ), appelé aussi monosilane et silicométhane, est un gaz d'odeur nauséabonde, très toxique, préparé par réduction du tétrachlorure de silicium par l'hydrure mixte de lithium et d'aluminium ( $\text{LiAlH}_4$ ).

L'hexasilane ( $\text{Si}_6\text{H}_{14}$ ) est un liquide qui se décompose lentement à température ordinaire.

ANNEXE III : CRISTALLOGRAPHIE DU SILICIUM  
ET GRAVURE ANISOTROPE

(David PEYRADE)

1- STRUCTURE DIAMANT DU SILICIUM

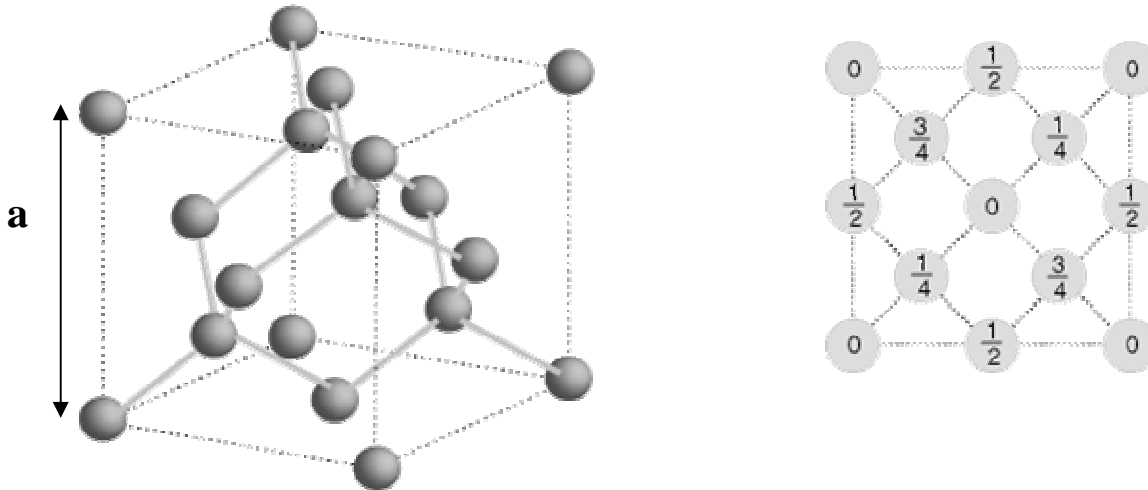


Fig1. Réseau diamant du silicium construit à partir de deux réseaux cfc imbriqués.  
Un atome de silicium forme 4 liaisons covalentes créant un tétraèdre.

Le silicium est un semiconducteur intrinsèque de la colonne IV. Le réseau du silicium est celui du diamant constitué de deux réseaux cubiques faces centrées, imbriqués, décalés l'un de l'autre du quart de la diagonale principale (Fig1.). La maille primitive contient deux atomes de silicium en position  $(0,0,0)$  et  $(1/4,1/4,1/4)$ . Chaque atome a une coordination tétraédrique et établit des liaisons covalentes avec chacun de ses quatre voisins. Le paramètre de la maille cubique est  $a=0.543\text{nm}$ . Les plans denses sont les plans  $\{111\}$ .

2- LES PLAQUETTES DE SILICIUM

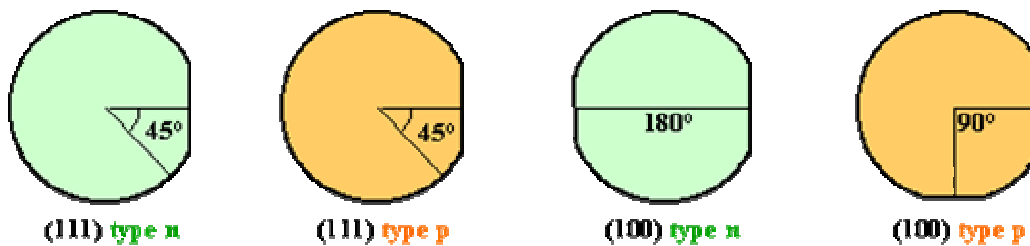


Fig 2. Orientation cristallographique d'une plaquette de silicium

A partir d'une charge de polysilicium purifiée, on réalise un lingot de silicium monocristallin suivant la méthode de « Czochralski ». Un tirage progressif du lingot dans des conditions thermodynamiques très précises (températures du creuset de charge fondue, de l'enceinte, gradient de température, transfert de chaleur, vitesse de tirage d'un germe monocristallin etc ...) permet d'obtenir un lingot monocristallin. Ce lingot est ensuite découpé en plaquettes.

-Les principaux paramètres qui définissent chaque plaquette (Fig2.) sont:

- le diamètre en pouces (**1pouce=2.54 cm**).
- le type de dopage (**p** Bore ou **n** Phosphore).

-la résistivité dépendant du dopage (de  $0.5$  à  $10 \Omega cm$ ).

-l'orientation cristalline indiquée par 1 ou 2 méplats.

Nous disposons de plaquettes présentant les caractéristiques suivantes :

**Plaquettes :** 2pouces (épaisseur de  $275\mu m$ )

**Dopage :** type n

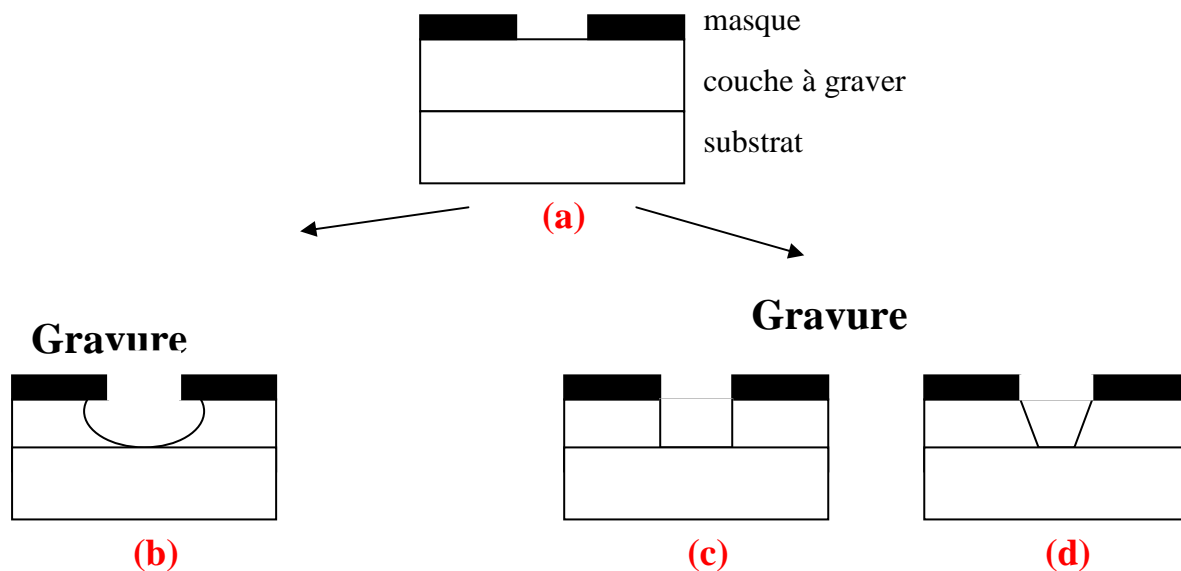
**Résistivité :**  $0.2-0.4 \Omega cm$

**Orientation :**  $\langle 100 \rangle$

### 3- LA GRAVURE DU SILICIUM

Suite à la définition du motif (microcuvettes et caractères alphanumériques) par lithographie optique, développement de la résine, et gravure humide ( $HF/NH_4F$ ) du masque de silice, le motif doit ensuite être transféré dans le silicium.

#### 3-1 Principes généraux de gravure



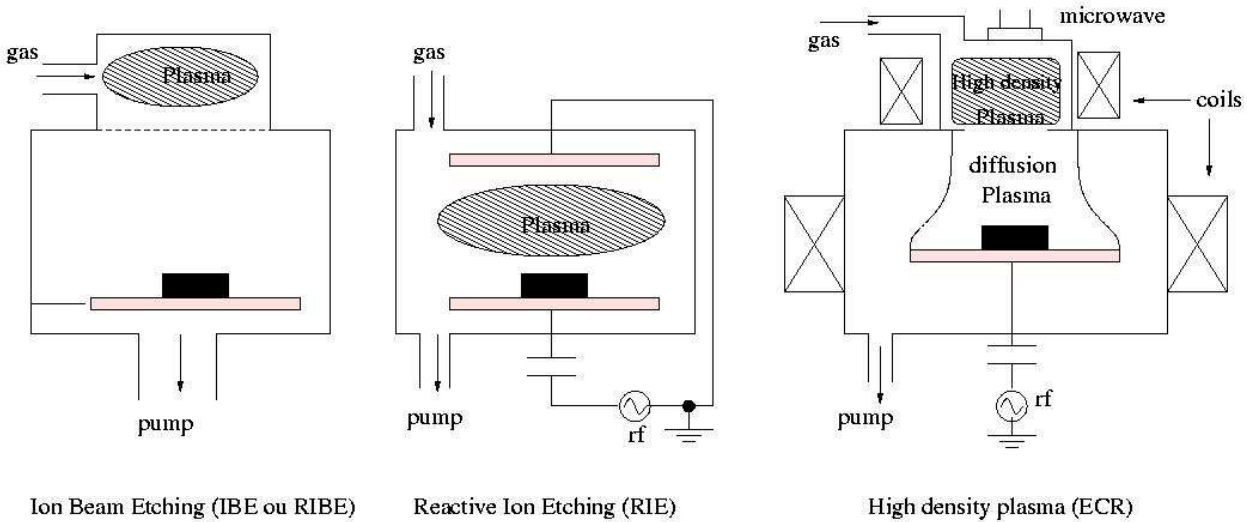
**Fig3. Différents types de profils de gravure idéaux**

La figure 3 présente les différents profils de gravure obtenus idéalement suivant le type de gravure (**sèche ou humide**) que subit le matériau.

**-Gravure humide :** elle consiste à plonger l'échantillon dans une solution pour y subir une attaque chimique dans les zones qui ne sont pas protégées par le masque. Les molécules de la solution vont réagir avec la surface et former un composé qui sera arraché à la surface. Dans ce cas, le profil de gravure généralement obtenu est isotrope (**Fig3(b)**), l'attaque chimique a lieu dans toutes les directions et le motif défini par le masque n'est pas respecté. Si le matériau à graver présente une structure cristalline, la gravure permet alors d'obtenir un profil anisotrope, les vitesses de gravure suivant les directions cristallographiques étant différentes (**Fig3(d)**). Comme nous le verrons par la suite, la gravure du silicium dans une solution de  $KOH$  est anisotrope.

**-Gravure sèche :** Un bâti de gravure sèche (**Fig4**) est composé d'un réacteur dans lequel sont introduits des gaz à basse pression. Une excitation électromagnétique permet d'ioniser les gaz en présence d'un afin de créer un **plasma** dans l'enceinte. Les ions formés sont ensuite accélérés par une différence de potentiel entre deux électrodes. L'échantillon placé sur une des deux électrodes est ainsi soumis à un bombardement ionique. C'est la **partie mécanique** de la gravure. De plus,

certaines espèces (radicaux) réagissent avec les molécules du substrat afin de former des espèces volatiles, c'est la **partie chimique** de la gravure. Un bon contrôle de ces deux phénomènes permet d'obtenir des profils anisotropes (**Fig3(c)**).



**Fig4. Trois grands types de réacteurs de gravure : faisceaux d'ions, RIE et ECR.**

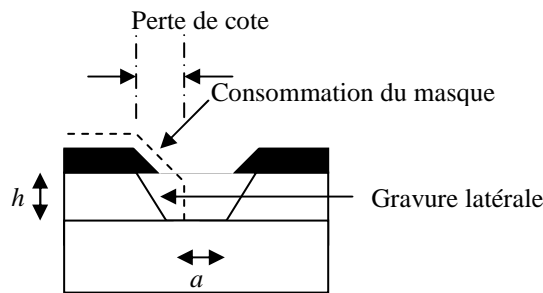
La gravure ionique réactive du silicium se fait généralement dans un plasma fluoré  $\text{SF}_6$  ou chloré  $\text{SiCl}_4$ .

-Les paramètres importants lors de la définition d'un procédé de gravure (**Fig.5**) sont :

-L'anisotropie :  $A=1-(V_{\text{latérale}}/V_{\text{verticale}})$

-La sélectivité :  $S=\text{Vitesse de gravure de la couche} / \text{Vitesse de gravure du masque}$

-Le facteur de forme :  $F=a/h$



**Fig5. Profil de gravure réel**

### 3-2 Gravure humide KOH du silicium

Le tableau ci-dessous présente les principales solutions chimiques utilisées pour graver le silicium.

Solution de gravure	Conditions	Application, vitesse de gravure, remarques
5HNO <sub>3</sub> , 3HF, 3CH <sub>3</sub> COOH	T=25°C	<b>Isotrope</b> Vg ~25µm/min Amincissement
Tetramethyl ammonium hydroxyde (TMAH)	T=90°C	<b>Anisotrope</b> (100)/(111) = 1:40 Vg <100> ~1µm/min
<b>KOH (40%)</b>	<b>T=75°C &lt;100&gt; type n</b>	<b>Anisotrope (100)/(111) = 1:400</b> Vg <100> ~0.7µm/min <b>MEMS, NEMS</b>

Nous utilisons une solution de KOH pour graver les microréacteurs et les caractères alphanumériques. La gravure chimique est fortement anisotrope, le rapport des vitesses d'attaque suivant les plans {100} et les plans {111} étant proche de 400. Elle révèle les plans denses {111}.

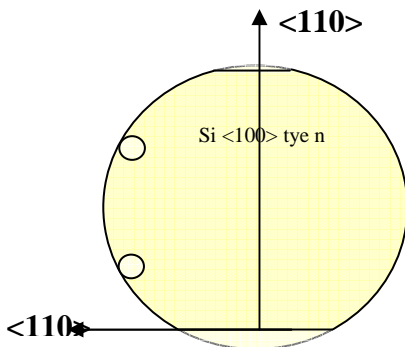


Fig6. Orientations plaquette {100}

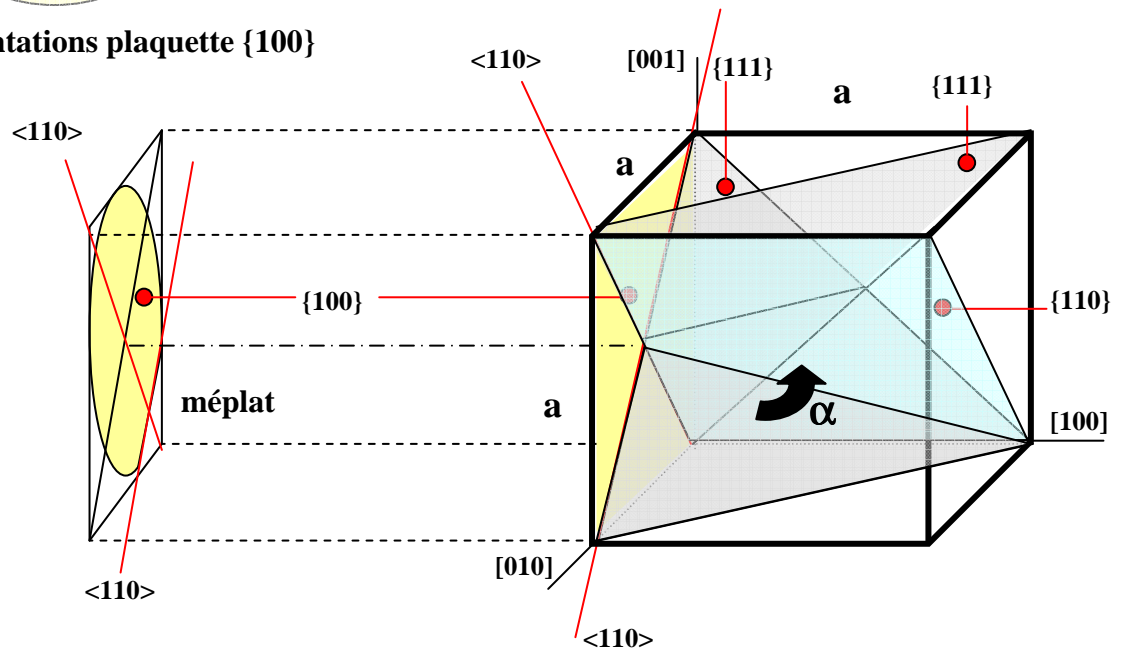
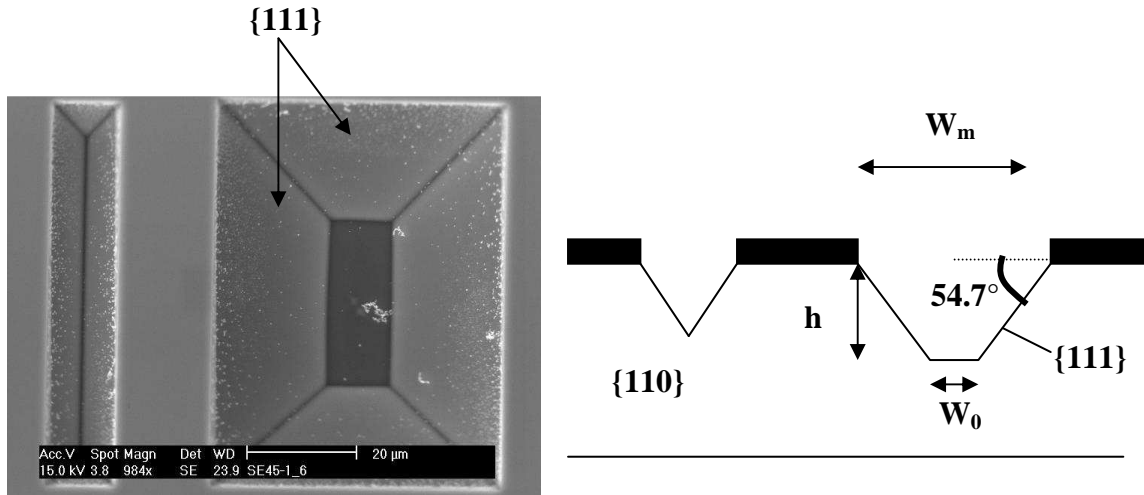


Fig7 . Plaquette {100} de silicium avec référence au cube unité et ses plans principaux

Le profil gravé dans un plan de coupe  $\{110\}$  est une section en V ou en U dont les flans (plans  $\{111\}$ ) présentent une pente de  $\alpha=54.7^\circ$ . La tolérance sur cette pente est déterminée par la précision d'alignement lors de la lithographie optique entre le motif et les directions  $\langle 110 \rangle$  du cristal.

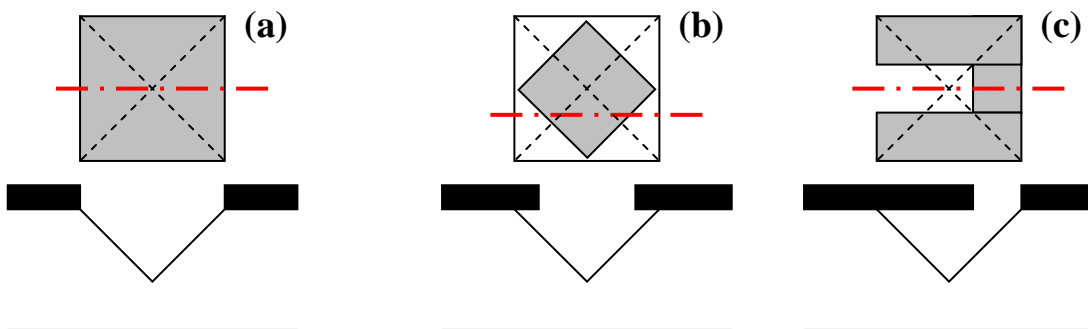


**Fig 8. Révélation des plans  $\{111\}$  du silicium lors de la gravure KOH**

La largeur de silicium gravée au fond des cuvettes  $W_0$  (Fig.8) suivant une direction  $\langle 110 \rangle$  est totalement déterminée par la profondeur gravée  $h$ , la largeur du masque  $W_m$  et le profil de la pente:

$$W_0 = W_m - \sqrt{2}h$$

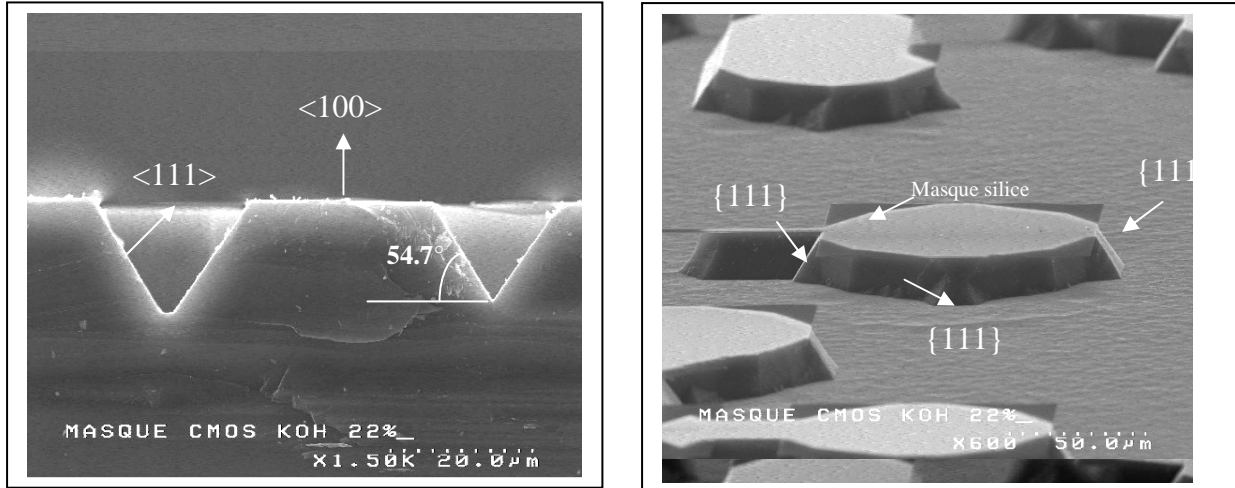
Ainsi, la largeur initiale du masque définit la profondeur à atteindre pour que les plans  $\{111\}$  s'intersectent et forment un profil en V mettant quasiment fin au procédé de gravure. Ce profil en V apparaît lorsque le rapport  $h/W_m \sim 0.7$ .



**Fig9. Trois exemples de gravure anisotrope sur une plaquette de silicium  $\langle 100 \rangle$**

La figure 9 présente trois exemples de gravure anisotrope qui diffèrent par la géométrie du masque de gravure (zone grisée) ou son orientation par rapport aux directions du cristal de silicium.  
-Lorsque les côtés du motifs sont orientés parallèlement aux directions  $\langle 110 \rangle$  (Fig9. (a)), la gravure génère dans le silicium une pyramide renversée à base carrée définie par le motif. Il n'y a pas de sous-gravure.

-Si le même motif subi une rotation de  $45^\circ$  (Fig9(b)), la pyramide gravée dans le silicium est identique à celle obtenue dans le cas précédent générant une sous-gravure du masque.  
-Enfin, un motif présentant des angles connexes (Fig9(c)) permettra de réaliser des structures suspendues tel que des micro-leviers en utilisant l'anisotropie de la gravure.



La figure 10(b) présente un exemple de sous-gravure du masque de silice. Seuls les motifs définis suivant les directions  $\langle 110 \rangle$  ne présentent pas de sous-gravure. Les plans  $\{111\}$  sont clairement définis.

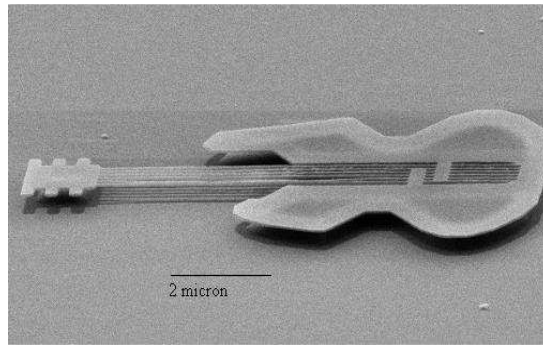
*En résumé, la gravure chimique KOH du silicium est fortement anisotrope [1,2]. Elle permet de révéler les plans denses  $\{111\}$  du réseau diamant du silicium qui se grave 400 fois moins vite que les plans  $\{100\}$ . La définition du motif à lithographier doit tenir compte des différentes orientations cristallographiques de la plaquette et un alignement doit être effectué lors de la lithographie. Dans certaines conditions (désalignement du masque/plaquette, motif présentant des angles connexes), une sous-gravure du masque apparaît qui peut être mise à profit pour réaliser des structures particulières (microleviers, membranes etc.....).*

*Ce type de gravure est abondamment utilisée dans le domaine des « MEMS<sup>1</sup> » [2] et plus récemment des « NEMS<sup>2</sup> » [3] pour réaliser différents types de composants (accéléromètres, capteurs de pression, micro-miroirs etc ..... ).*

**La figure 11 présente un exemple l'état de l'art actuel dans la fabrication de microsystèmes couplant gravure KOH et gravure ionique réactive du silicium.**

<sup>1</sup> MEMS : Micro Electro Mechanical System

<sup>2</sup> NEMS : Nano Electro Mechanical System



**Fig10. Réplique silicium de la guitare « Fender Stratocaster » réalisée par des techniques de nanofabrication. Sa longueur est de l'ordre de  $10\mu\text{m}$  et le diamètre d'une corde est voisin de  $50\text{nm}$ . Image : Dustin W. Carr and Harold G. Craighead, Université de Cornell**

#### **4- REFERENCES**

- [1] K.E. Bean Anisotropic etching of *IEEE Trans. On Electron Devices* vol ED-25 N°10 p 1185-1192 (1978)
- [2] M. Madou *Fundamentals of Microfabrication* CRC Press London ISBN: 0849308267 (2002)
- [3] S.E. Lyshevski *MEMS and NEMS Systems, Devices, and Structures* CRC Press London ISBN: 0849312620 (2001)

## ANNEXE IV : OXYDATION THERMIQUE

### Introduction

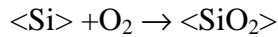
L'oxydation du silicium peut être effectuée de plusieurs manières :

- à haute température (700 à 1250°C) en présence d'un courant gazeux oxydant (oxyde thermique),
- à basse température par dépôt chimique en phase vapeur CVD (oxyde déposé).

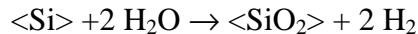
### Principe de l'oxydation thermique:

On forme une couche de silice  $\text{SiO}_2$  à la surface de la plaquette de silicium par oxydation dans un four à haute température (fig.) parcouru par un courant gazeux oxydant. On distingue deux types d'oxydation selon la nature de l'oxydant :

- l'oxydation sèche est réalisée en présence d'un courant gazeux d'oxygène sec, selon :



- l'oxydation humide, beaucoup plus rapide, où le courant d'oxygène est chargé en vapeur d'eau qui réagit aussi avec le Si suivant:



Au cours de l'oxydation, il y a consommation de Si, et par conséquent l'interface Si/SiO<sub>2</sub> se déplace vers l'intérieur de la plaquette, pendant que la surface de l'oxyde se déplace en sens opposé. On admet en première approximation que :

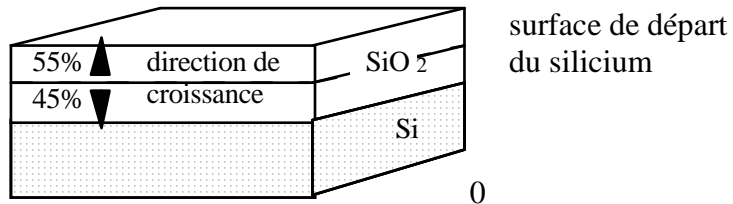
$$e_{\text{Si}} = 0,44 e_{\text{Ox}}$$

$e_{\text{Si}}$  = épaisseur de Si consommée

$e_{\text{Ox}}$  = épaisseur d'oxyde formé

Pour avoir 10 nm de SiO<sub>2</sub>

thermique, on consomme environ 5 nm de Si.



Les températures élevées ainsi que la consommation du silicium font que l'oxydation thermique n'est pratiquée qu'au cours des premières étapes du processus technologique (oxyde épais) sous peine de modifier profondément les structures existantes.

Pour les oxydes minces, de l'ordre de quelques Angströms, l'oxygène sec donne des taux de croissance encore relativement élevés. Pour bien contrôler les faibles épaisseurs, on utilise alors l'effet de dilution de l'oxygène dans un gaz neutre, tel que l'azote ou l'argon.

### Cinétique de croissance :

La cinétique d'oxydation du silicium dépend essentiellement de deux phénomènes :

- la réaction à l'interface Si/SiO<sub>2</sub>:  $\langle \text{Si} \rangle + \text{O}_2 \rightarrow \langle \text{SiO}_2 \rangle$
- la diffusion de l'oxygène à travers la couche d'oxyde déjà formée.

L'épaisseur d'oxyde formé évolue alors avec le temps suivant une loi parabolique (modèle de Deal et Grove):

$$e^2 + A.e = B.t \quad \Rightarrow \quad t = \frac{e^2}{B} + \frac{e}{B/A}$$

où  $e$  est l'épaisseur d'oxyde formé

$t$  la durée de l'oxydation

$B$  une constante qui caractérise la diffusion de O<sub>2</sub> dans SiO<sub>2</sub>

$B/A$  une constante qui caractérise la réaction à l'interface.

Pour les faibles épaisseurs (jusqu'à  $\cong 100$  nm), là où la réaction à l'interface Si/SiO<sub>2</sub> prévaut, la loi de Deal et Grove surestime la durée de l'oxydation. Il est préférable dans ce cas de ne considérer

que le deuxième terme de l'expression de  $t$ :  $t \cong \frac{e}{B/A}$

Les paramètres B et B/A (courbes page suivante) sont liés au dopage, aux conditions de température et de pression des gaz et sont très différents selon que l'oxydation est sèche ou humide. C'est ainsi qu'à 1000°C, il faut 8h pour obtenir une épaisseur de 2000Å en oxygène sec, alors qu'une même épaisseur est obtenue en moins d'une heure en oxydation humide. Les figures (page suivante) permettent de déterminer la constante B et le rapport B/A en fonction de la température et des conditions d'oxydation.

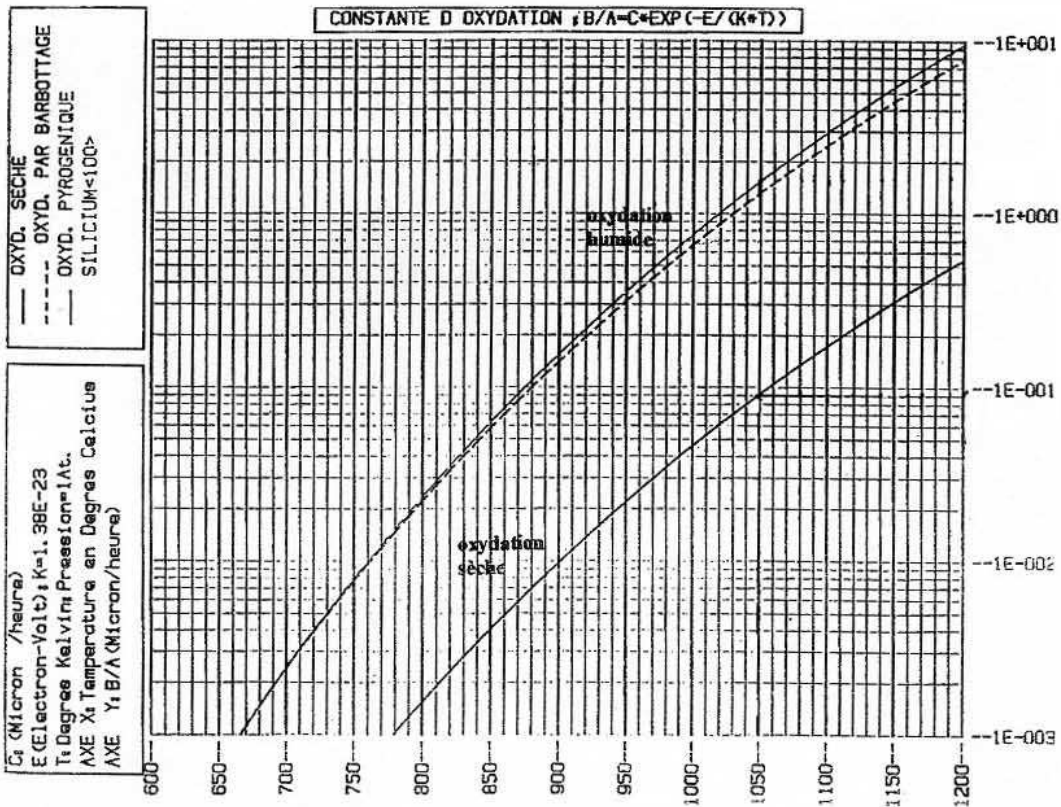
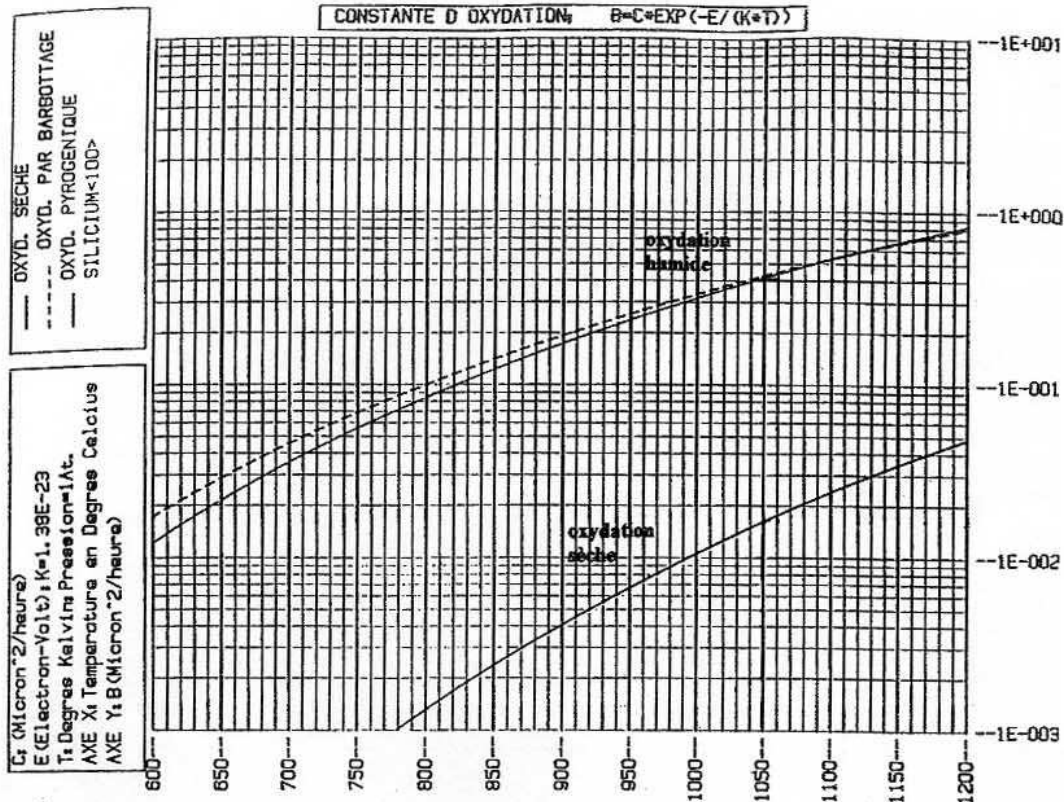
### Qualité de l'interface Si/SiO<sub>2</sub> :

La tension de claquage de SiO<sub>2</sub> est de l'ordre de 12MV/cm (soit, pour une épaisseur de l'oxyde de grille de 60nm, 72V théorique). Toutefois, cette valeur n'est atteinte que si l'interface Si/SiO<sub>2</sub> est parfait ce qui suppose une bonne qualité "mécanique" et électrique du SiO<sub>2</sub> formé qui est en général fortement dépendant de la procédure de nettoyage du substrat avant l'oxydation. De plus, afin de diminuer la densité des charges à la surface, un recuit final est réalisé (10 min à 1050°C sous azote).

### Contrôle de l'épaisseur :

Le contrôle de l'épaisseur d'oxyde peut être réalisé par différentes méthodes, telles que l'Alpha-step ou l'ellipsométrie. Une première indication de l'épaisseur est donnée par la couleur réfléchiée par la plaquette de silicium recouverte de silice, éclairée et observée en lumière blanche sous incidence normale (cf. tableau).

Couleur	Epaisseur (en microns)			
Gris	0,01			
Brun	0,05			
Bleu	0,08			
Violet	0,10	0,28	0,46	
Bleu	0,15	0,30	0,49	0,65
Vert	0,18	0,33	0,52	0,68
Jaune	0,21	0,37	0,56	0,72
Rouge	0,25	0,44	0,62	0,75



Evolutions de B et de B/A en fonction de la température pour différents types d'oxydation (pour Si 100) B.E. Deal and Grove, Journal of Applied Physics, Vol. 36, page 3770 (1965)

**ANNEXE V: L'ELLIPSOMETRIE**

L'ellipsométrie est une méthode non destructive de mesure de l'épaisseur et de l'indice de très fines couches diélectriques.

Considérons une très fine couche de silice sur un substrat de silicium. Une onde lumineuse monochromatique plane, polarisée rectilignement, arrivant sur ce système peut être considérée comme la somme de deux composantes :

- l'onde p, parallèle au plan d'incidence,
- l'onde n, normale au plan d'incidence.

Le déphasage  $\phi_p - \phi_n$  entre les deux composantes est nul.

Aux interfaces air-SiO<sub>2</sub> et SiO<sub>2</sub>-Si, les coefficients de réflexion et de transmission sont différents pour les deux composantes. Il en résulte que la lumière émergente provenant des réflexions multiples sur les deux interfaces possède une polarisation elliptique. Cette polarisation est caractérisée par deux paramètres angulaires  $\Delta$  et  $\Psi$  définis comme suit :

-  $\Psi$  est lié au rapport des amplitudes des ondes n et p par:

$$\Psi = \arctan\left(\frac{A_p}{A_n}\right)$$

-  $\Delta$  est le déphasage entre les deux ondes n et p:

$$\Delta = \phi_p - \phi_n$$

De la mesure de  $\Delta$  et  $\Psi$ , il est possible de déduire l'épaisseur e et l'indice n de la couche diélectrique.

**PRATIQUE :**

Pour des raisons de commodité, on préfère, pour mesurer  $\Delta$  et  $\Psi$ , envoyer sur l'échantillon une lumière polarisée elliptiquement en ajustant l'orientation des axes de l'ellipse et son excentricité (déphasage  $\Delta$ ), de telle façon que la lumière émergente soit polarisée rectilignement. Cette disposition ne change en rien le principe de mesure, mais seulement la disposition des parties constituantes d'un ellipsomètre.

En pratique, un ellipsomètre comporte les éléments suivants :

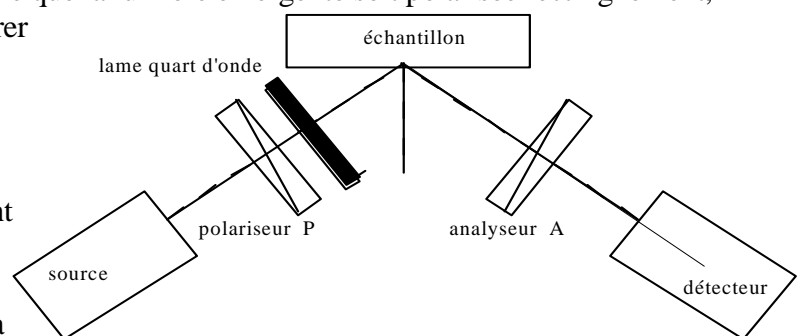
- une source lumineuse monochromatique de longueur d'onde connue,
- un polariseur P permettant de polariser la lumière incidente selon un angle variable,
- une lame quart d'onde induisant un déphasage entre l'onde p et l'onde n de la lumière incidente (ce déphasage est ajusté en ajustant l'orientation de la lame quart d'onde par rapport au polariseur P)
- un porte échantillon,
- un analyseur A permettant d'éteindre la lumière émergente lorsqu'elle est polarisée rectilignement,
- un photomultiplicateur jouant le rôle de détecteur d'extinction.

La technique de mesure consiste à rechercher l'extinction complète de la lumière émergente en agissant sur :

- l'orientation du polariseur P par rapport à la lame quart d'onde. La lumière polarisée elliptiquement qui est envoyée sur l'échantillon doit être telle que la lumière émergente soit polarisée rectilignement,
- l'orientation de l'analyseur A qui doit assurer l'extinction de la lumière émergente.

Ces deux réglages sont convergents.

Il y a en principe 16 couples d'orientation (A,P) qui assurent l'extinction. Cependant, le relevé de deux d'entre eux, judicieusement choisis, permet de déterminer  $\Delta$  et  $\Psi$  sans ambiguïté. Un programme d'acquisition et de traitement des données couplé à l'ellipsomètre permet alors de remonter à l'épaisseur ou/et à l'indice de la couche connaissant l'ordre de grandeur de l'une des deux valeurs.



## ANNEXE VI: PHOTOLITHOGRAPHIE

La photolithographie est l'opération qui consiste à graver selon un certain motif une couche mince d'un matériau donné. Le motif à graver se trouve initialement (en positif ou en négatif) sur un support appelé masque. Il s'agit d'une plaque de verre comportant une couche de chrome ou de gélatine sur laquelle a été gravée le motif que l'on veut reproduire. L'élaboration d'un circuit nécessite en général plusieurs niveaux de masquage, permettant de définir successivement les zones associées à chaque élément de la structure: zone diffusée, régions d'oxyde mince, prises de contact et interconnexions. Le positionnement des masques successifs doit donc se faire avec un alignement rigoureux entre les différents niveaux de masquage.

**ETALEMENT D'UNE RESINE PHOTOSENSIBLE** sur la couche à graver par centrifugation. La plaquette est plaquée par aspiration sous vide sur un support tournant (à environ 4000t/min); quelques gouttes de résine sont déposées au centre ; la force centrifuge étale la résine en un film ayant une épaisseur de l'ordre du micron suivant la fluidité de la résine.

**SECHAGE DE LA RESINE** : 3 min sur une plaque chauffante à 120°C.

**EXPOSITION DE LA RESINE A UN RAYONNEMENT U.V.** (lampe à vapeur de mercure) à travers le masque à reproduire. La résine est exposée à l'ensemble du spectre d'émission du Hg mais elle est sensibilisée par deux longueurs d'onde du spectre du Hg, situées dans l'ultraviolet:

- 405 nm avec une intensité de 10 milliwatts/cm<sup>2</sup>
- 365 nm avec une intensité de 5,3 milliwatts/cm<sup>2</sup>

Le mécanisme de sensibilisation est basé sur l'absorption du rayonnement UV (figure) qui modifie la structure des molécules organiques et permet ainsi l'attaque chimique. Les deux flèches indiquent la longueur d'onde des raies ultraviolettes de la lampe utilisées pour la lithographie

**DEVELOPPEMENT** : la plaquette est placée dans un bain de développement (à base de soude) qui va dissoudre la résine insolée (résine positive) ou non insolée (résine négative). On reproduit de cette façon les motifs du masque mère sur la résine. La concentration du développeur ainsi que le temps de trempage dépend du type de résine utilisée. Les plaquettes sont ensuite rincées et séchées.

**CONTROLE VISUEL** (au microscope) des motifs développés.

**DURCISSEMENT DE LA RESINE** (polymérisation) : 3 min sur une plaque chauffante à 120°C.

**ATTAQUE DE LA COUCHE A GRAVER** dans les régions non protégées par la résine.

**ELIMINATION DES RESIDUS DE RESINE** de manière chimique (dans un bain de remover) ou à l'aide d'un plasma oxygène. La plaquette est alors prête pour une autre étape.