

Lab-On-a-Chip : réalisation d'une PCR "Polymerase Chain Reaction"

P. Poulichet^a, L. Rousseau^a, J. Pagazani^a, O. Français^a

^a Université Gustave Eiffel - ESIEE Paris - ESYCOM (UMR 9007)

Contact email : olivier.francais@esiee.fr

Cet article décrit la réalisation et la mise en œuvre du thermocycleur d'une puce PCR (Polymerase Chain Reaction) par des étudiants ingénieurs de niveau M1/M2 à ESIEE Paris. Les étudiants réalisent en salle blanche un prototype de puce PCR. Ils mettent en œuvre une électronique de commande pour assurer les cycles de chauffage/refroidissement nécessaire à la duplication des brins d'ADN. Le procédé de micro-fabrication des puces inclut deux étapes de photolithographie avec un dépôt de métal et une passivation. L'électronique est constituée d'une partie détection de la température, d'une partie commande en température et d'une partie asservissement numérique. Ici, un Arduino est utilisé afin de contrôler les phases de température du thermocycleur. Les étudiants réalisent l'électronique sur plaquette d'essais. Un packaging imprimé en 3D, associé à des pointes en ressort, permet d'insérer la puce facilement sur la plaquette d'essais. Les étudiants restent très motivés durant l'ensemble de l'étude du thermocycleur. Ils conçoivent et réalisent une électronique sur un circuit qu'ils ont réalisé en salle blanche. Ils développent leur propre système embarqué. Le contexte de la COVID19 et la détection du virus sont également un très bon vecteur de motivation pour comprendre comment fonctionne une PCR.

I. Contexte de l'enseignement : détection de la COVID19 par PCR

Les deux dernières années scolaires ont été secouées par l'arrivée de la COVID-19 qui a provoqué un confinement total de la population pour limiter la propagation du virus. Dans ce contexte, nous avons développé un enseignement autour des outils mettant en avant la microélectronique et les micro technologies pour la détection de la présence du virus par test PCR (Polymerase Chain Reaction) (1). Une PCR permet d'amplifier en grande quantité un fragment d'ADN lors de cycles thermiques répétés. Chaque cycle d'amplification permet de doubler la quantité de brins d'ADN présents dans l'échantillon et il peut être répété plus de 30 à 50 fois. Un cycle demande trois étapes de mise en température de l'échantillon : a) 94° afin de dénaturer un brin d'ADN en deux demi-brins, b) 55° pour hybrider des amorces sur chacun des brins dénaturés, c) 72° pour reconstruire, par polymérisation, à partir des amorces les brins d'ADN complets.

Il s'agit dans cet enseignement, qui s'adresse à des étudiants ingénieurs de niveau M1 à M2, de réaliser et piloter une microcavité chauffante en température qui est l'élément central dans le fonctionnement d'une PCR et que l'on appelle aussi thermocycleur. Les élèves réalisent eux-mêmes la microcavité chauffante (2) en salle blanche puis développent l'électronique de contrôle pour aboutir à un système autonome pilotable (pour les meilleurs) par un microcontrôleur type Arduino ou PSOC.

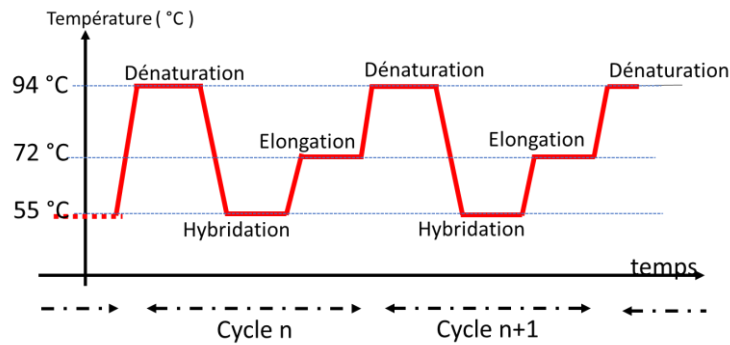


Fig. 1: Principe des cycles en température d'une PCR.

L'unité est structurée autour de travaux pratiques en salle blanche (8h TP), en salle de caractérisation (4h TP) puis en laboratoire d'électronique (14h TP) afin d'aboutir à un système embarqué à même de piloter les phases de contrôle en températures. Deux séances introductives de l'unité (6h Cours) permettent de présenter le contexte de l'unité, les moyens mis en œuvre en environnement salle blanche, les grands principes de fonctionnement de la PCR et de son électronique associée. L'évaluation est faite par une présentation orale associée à un rapport où l'on demande aux étudiants de faire une synthèse de l'ensemble des TPs et d'y montrer une logique de conception.

A noter que la partie en laboratoire d'électronique utilise une approche type projet avec des points d'étapes à valider pour passer à la suite. Sur l'ensemble des séances, ils disposent de temps libre où ils doivent avancer seuls.

II. PCR sur puce

Principe du prototype de PCR : le thermocycleur

La puce miniaturisée, assurant le contrôle en température, s'appuie sur l'utilisation de deux résistances qui permettent pour la première de venir chauffer localement par effet joule et pour la deuxième de servir de sonde de température. Ces deux éléments sont ensuite passivés afin de garantir une isolation électrique (Fig. 2).

Leur réalisation s'effectue en environnement salle blanche à ESIEE Paris (3) par dépôt de couches minces sur un substrat. Deux types substrats sont utilisables : en verre pour tirer bénéfice de la transparence du matériau lors de la visualisation sous microscope, en silicium oxydé pour tirer bénéfice de la faible inertie thermique du substrat.

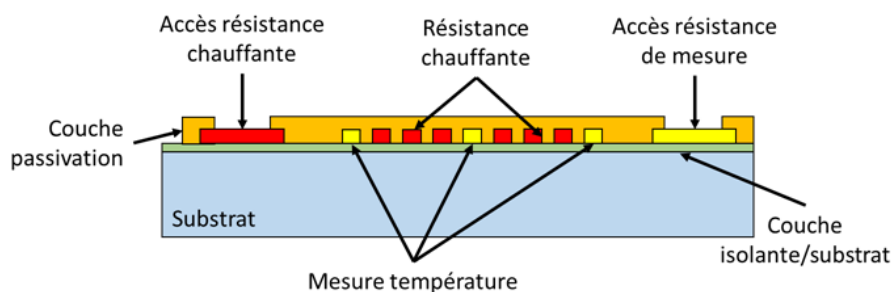


Fig. 2 : Schéma du thermocycleur de la PCR sur puce.

Réalisation en salle blanche

La réalisation en salle blanche est menée par les étudiants qui mettent en œuvre le procédé technologique avec le support d'un enseignant. Le principe de photolithographie fait appel ici à deux niveaux de masques. Le premier niveau permet la définition des résistances (chauffante et de mesure) et leur accès électrique, le deuxième niveau permet la création des ouvertures contacts après passivation (Figure 3) (4).

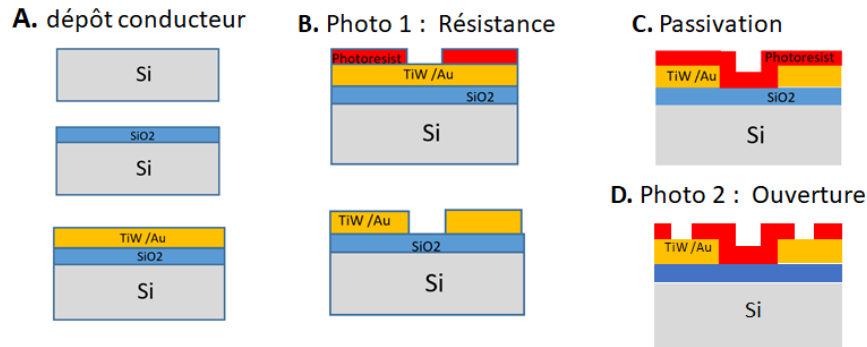


Fig. 3 : Description du procédé de réalisation du thermocycleur à l'aide des microtechnologies.

A partir d'un substrat isolant (Verre ou Si oxydé), on réalise un dépôt en couche mince par sputtering d'une couche conductrice de (TiW/Au) pour une épaisseur de 200 nm (Fig. 3-A). La gravure de la couche conductrice se fait en voie humide après la première étape de photolithographie (Fig. 3-B). Cela permet de former les étudiants aux procédés de dépôts en couche mince, de spin-coating de résine photosensible, d'insolation UV et de développement dans le domaine de la microélectronique. La passivation des électrodes utilise une résine négative dite épaisse (2 μm / SU8_2002) (Fig. 3-C) et permet lors de la deuxième étape de photolithographie de mettre en œuvre l'alignement avec les motifs réalisés lors de l'étape précédente (Fig. 3-D).

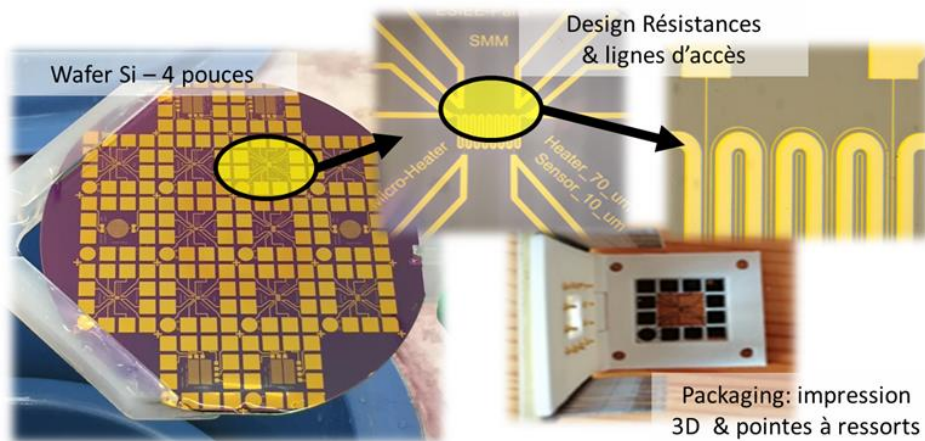


Fig. 4 : Résultat de réalisation en salle blanche par les étudiants et packaging pour l'accès aux électrodes.

Sur chaque substrat, 16 dispositifs sont réalisés (Fig. 4) qui sont ensuite découpés pour pouvoir être utilisés lors des séances en laboratoire d'électronique. Afin de faciliter la manipulation des puces, les plots de contact électrique ont été agrandis et chaque puce fait, après découpe, 2 cm x 2 cm. Un packaging sous pointes permet alors d'avoir accès facilement aux différentes résistances.

Caractérisation en laboratoire

A partir des puces réalisées en salle blanche, une étape de caractérisation a lieu afin de prédéterminer le fonctionnement de la microcavité, à l'image d'un laboratoire sur puce (5). A l'aide d'un vidéo-microscope, les dimensions des différents éléments sont relevées.

L'utilisation d'un vidéo-microscope, d'une plaque chauffante, d'une sonde en température externe, d'un ohmmètre et d'une alim-DC permettent de caractériser :

- la résistance de mesure et sa dépendance avec la température (Fig. 5) (6),
- de caractériser l'élément chauffant afin de relier la variation en température mesurée par la résistance de mesure lors de l'injection d'une puissance électrique dans la résistance chauffante (Fig.6).

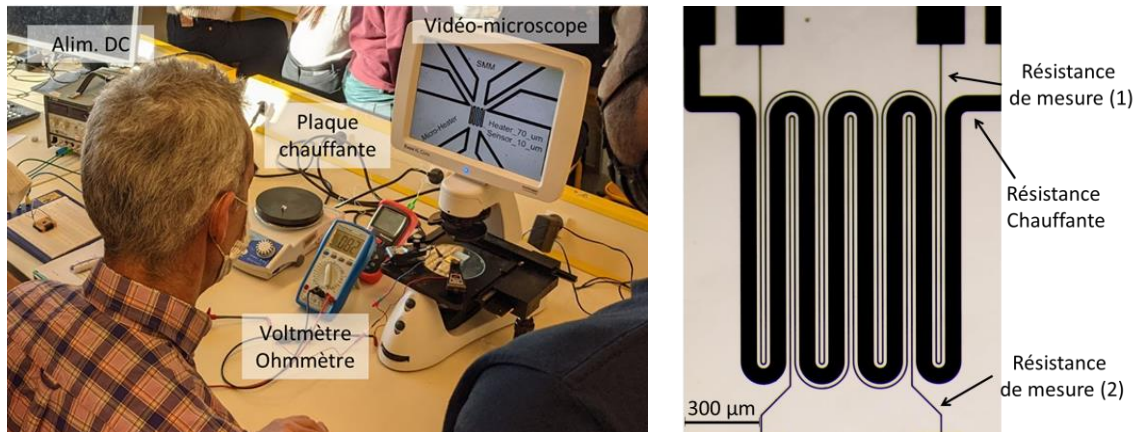


Fig. 5 : Caractérisation du thermocycleur sous vidéo-microscope et observation de la partie « résistance ».

De ces mesures, le coefficient thermique de la sonde de mesure en température peut être estimé et exploité par la suite lors de la mise en œuvre de l'asservissement en température. On effectue la caractérisation dans la gamme de température de 20°C à 140°C, de manière à être compatible avec le thermo-cyclage de la PCR.

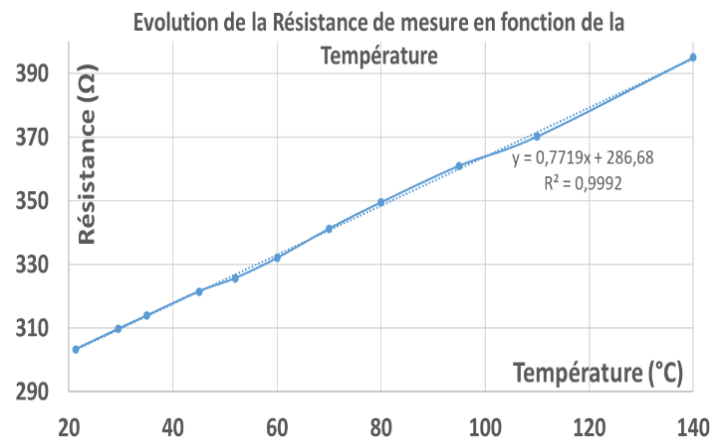


Fig.6. Exemple de mesure de la résistance en fonction de la température obtenue par les étudiants ingénieurs.

A partir du relevé de l'évolution de la résistance en fonction de la température, les élèves appliquent le modèle d'une thermorésistance sous la forme :

$$R_m(T) = R_{m0} * (1 + \alpha_m * T)$$

Avec R_{mo} la valeur de la résistance à 0°C , α_m le coefficient de température et T la température exprimée en $^{\circ}\text{C}$.

Dans l'exemple de la figure 6, les valeurs trouvées sont :

$$R_{mo} = 288,7 \Omega \text{ et } \alpha_m = 2,67 \cdot 10^{-3} (^{\circ}\text{C})^{-1}$$

La valeur du coefficient de température obtenue (cas d'une couche mince en or) peut ainsi être comparée à celui d'une sonde type Pt100 qui vaut $3,85 \cdot 10^{-3} (^{\circ}\text{C})^{-1}$ et qui est du même ordre de grandeur.

En valeur typique pour monter à 140°C , lors des tests sur substrats en verre, les courants associés montent autour de 125 mA pour une puissance d'environ 2 W. Ces valeurs sont aussi utilisées pour caler le pilotage de la PCR par la suite. On montre aussi que l'évolution de la résistance de mesure évolue linéairement avec la puissance électrique injectée dans la résistance chauffante.

III. Electronique de pilotage de la PCR

Mesure de la température

La Fig. 7.-A montre le circuit de polarisation de la puce. La mesure de la température est réalisée avec un courant constant dans la résistance de mesure de la puce. La caractérisation de la puce a permis précédemment de déterminer son coefficient en température. Le courant est délivré par une source de courant dite de Howland (7) et le courant de polarisation de la résistance est d'environ 1 mA afin de ne pas induire d'échauffement.

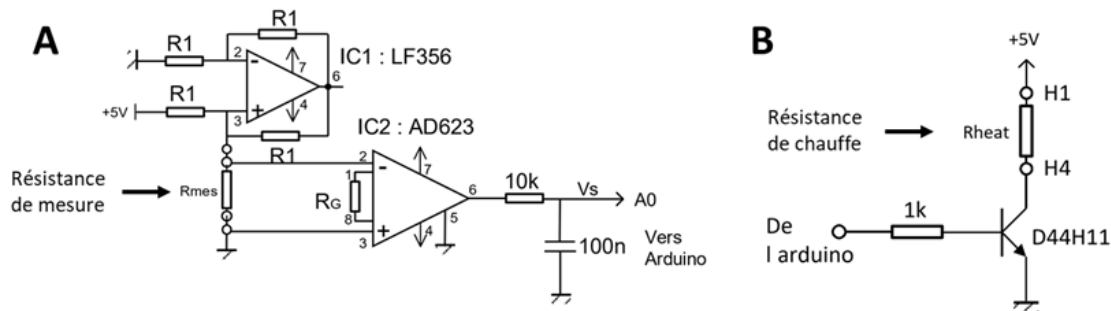


Fig. 7 : A. circuit de polarisation de la résistance de mesure ; B. circuit de commande de la résistance de chauffe.

La tension aux bornes de la résistance de mesure est mesurée avec un amplificateur d'instrumentation. La tension de sortie de l'amplificateur est ensuite connectée à une entrée analogique de l'Arduino pour récupérer l'image de la température. D'une puce à une autre, il y a une forte dispersion de cette tension due à la valeur de résistance qui dépend de sa géométrie et de l'épaisseur de métal lors de la séance de salle blanche. Cette incertitude est à prendre en compte par les étudiants qui doivent déterminer avec l'Arduino la valeur de la tension à température ambiante.

Commande de la résistance de chauffe

La chauffe de la résistance est réalisée en la connectant à la tension d'alimentation. Cette tension peut être délivrée par la carte Arduino ou par une alimentation extérieure. Dans un cas typique, le courant dans la résistance de chauffe est de l'ordre de 0,1 à 0,2 A. Pour délivrer ce courant, un signal PWM et avec un rapport cyclique variable vient piloter un transistor (Fig. 7.-B).

Asservissement pour la mise en œuvre des cycles de température

Le rapport cyclique de la sortie est ajusté en fonction de la température voulue. Au début de la phase de chauffage, il est appliqué le maximum du rapport cyclique. Ensuite deux solutions peuvent être mises en œuvre par les étudiants :

- Commande et tout ou rien : si la température déterminée sur la puce est inférieure à la température voulue par les cycles de la PCR, la commande du rapport cyclique est mise au maximum ; dans le cas contraire, le rapport cyclique est placé à la valeur de zéro ce qui provoque le refroidissement,
- Asservissement du type Proportionnel-Intégral (PI) : la différence entre la température voulue et celle mesurée est calculée et est amplifiée. Cette différence de température multipliée par la période d'échantillonnage correspond au terme I. De ces deux termes est déterminé le rapport cyclique de la commande à appliquer sur la sortie.

Les résultats les plus probants sont obtenus avec des résistances en verre et avec une commande PI. Dans le cas de résistance en silicium, la puissance à apporter au chauffage est plus importante que pour celle en verre. La figure 8 montre un exemple de montage sur platine d'essai et des résultats de variations de température obtenus par les étudiants. L'échelle de temps est de l'ordre de quelques secondes pour chacune des phases.

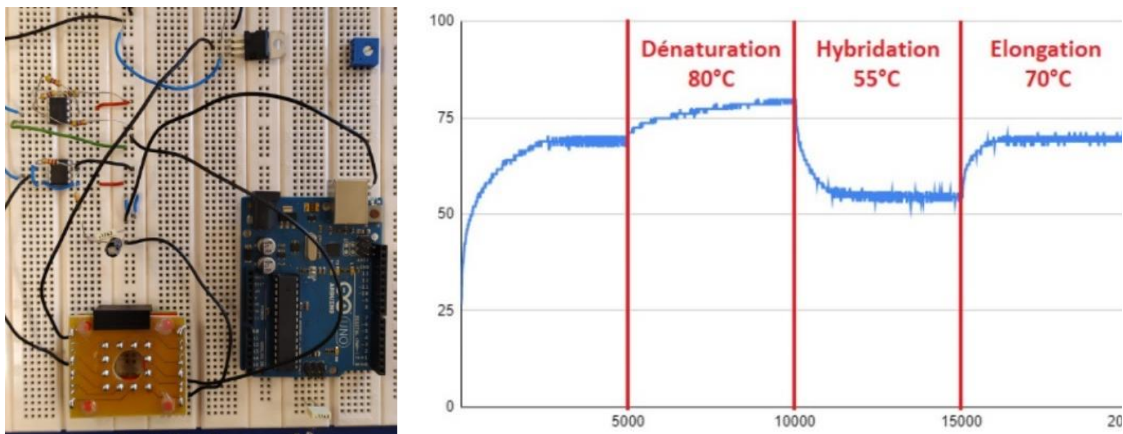


Fig. 8 : circuit de mesure et résultats.

IV. Conclusion

Le cadre de la COVID19 et des tests PCR, qui sert de contexte à cet enseignement, a permis de mettre en avant le rôle de la micro-électronique pour répondre à un enjeu de société. C'est l'ensemble des compétences dans ce domaine qui a été sollicité et est ressenti par les étudiants comme une synthèse de ce domaine.

En mettant en œuvre ce dispositif de thermocycleur à partir d'une puce réalisée par les étudiants, en salle blanche à l'aide des procédés de la micro-électronique, les résultats obtenus par nos étudiants ont dépassé nos attentes mais aussi les leurs. Cela s'est traduit par des présentations orales de synthèse où la plupart des étudiants ont effectué des démonstrations en temps réel de leur réalisation. Certains ont développé des interfaces graphiques permettant de piloter le thermocycleur ou utiliser des plateformes type PSOC comme support de programmation.

Cet enseignement se décline au sein de l'Université Gustave Eiffel - ESIEE Paris, au niveau ingénieur, dans trois filières d'enseignement : Systèmes embarqués par

apprentissage, Biotechnologie et e-Santé, Système Électronique Intelligents. Il a été utilisé cette année comme support promotionnel pour le recrutement des étudiants et lors de visite de l'établissement.

Remerciements

Pour la mise en place de ce projet au sein d'ESIEE-Paris, nous tenons à remercier le GIP-CNFM (8) (Groupement d'Intérêt Public – Coordination Nationale pour la Formation en Microélectronique et en nanotechnologies) via le pôle parisien CEMIP (9) pour leur support financier. Nous remercions aussi le SMM (Service des Moyens de la Microélectronique) de l'ESIEE-Paris pour l'accueil et le support qu'ils ont apportés pour le bon fonctionnement de cet enseignement lors des nombreuses séances en salle blanche.

Références

1. D. Larzul, La PCR : principes et applications. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 4(4), 19–IN6. doi:10.1016/S0923-2532(89)80086-9 (1989).
2. O. Français, M-C. Jullien, L. Rousseau, P. Poulichet, S. Desportes, J.-P. Lefevre, A. Chouai, J. Delaire, A Thermally-Driven Micromixer Based on Fluid Volume Variation. *ASME* 2006, 685–692. doi:10.1115/ESDA2006-95276 (2006).
3. Les Salles-Blanches à ESIEE-Paris : <https://www.esiee.fr/fr/ecole/salles-blanches>
4. P. Bodénès, F. Lopes, D. Pareau, O. Français, B. Le Pioufle, Microdevice for studying the in situ permeabilization and characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* in lipid accumulation phase, *Algal Research*, Volume 16, pages 357-367 (2016).
5. O. Français, T. Bourouina, G. Lissorgues, L. Rousseau, M. Couty, & B. Mercier, Approche des laboratoires sur puce par l'expérimentation : projet MyLOC. *J3eA*, 18, 1006 (2019).
6. Yeong-Maw Chen, Jin-Shown Shie, Thunter Hwang, Parameter extraction of resistive thermal sensors, *Sensors and Actuators A: Physical*, Volume 55, Issue 1, 1996, pages 43-47 (1996).
7. K. F. Morcelles, V.G. Sirtoli, P. Bertemes-Filho & V. Vincence, Howland current source for high impedance load applications. *Review of Scientific Instruments*, 88 (11), 114705 (2017).
8. GIP-CNFM : Groupement d'Intérêt Public - Coordination Nationale pour la Formation en Microélectronique et en nanotechnologies. <http://www.cnfm.fr> (octobre 2021).
9. CEMIP : Centre de Micro-Electronique de Paris Ile de France. Website : http://ingenierie.sorbonne-universite.fr/fr/les-plateformes/le_cemip.html (septembre 2021).