

## Des microtechnologies aux nanotechnologies en biologie clinique.

Pierre-Jean Lamy

UM-1 Biotechnologies et Marqueurs Tumoraux  
Centre Régional de Lutte contre le Cancer Val d'Aurelle - Montpellier

### Résumé

*Les nanotechnologies constituent sans doute la prochaine révolution scientifique et industrielle. La possibilité de manier les atomes un à un offre un vaste champ d'investigation scientifique. La biologie pour l'heure se contente de miniaturiser ses systèmes d'analyse. Les puces à ADN et à protéines se généralisent. Les techniques de Biochimie et d'immuno-analyse peuvent être abordées par les lab-on-a-chip, laboratoires sur puces. Mais cette approche souvent coûteuse a ses limites. La création de matériaux selon la voie ascendante (bottom-up) permet de créer de nouveaux matériaux aux propriétés insoupçonnées dont certaines applications en biologie clinique sont exposées dans cet article.*

**Nanotechnologies / Biologie Moléculaire / Protéomique / Biopuces**

⇒ Un boîtier de quelques cm<sup>3</sup>, une mini-goutte de salive ou de sang et en quelques minutes, le médecin et le patient connaîtront le résultat de l'analyse. Reléguant les tests de grossesses et autres recherches de glucose dans les urines au rang d'ancêtres, c'est une nouvelle biologie miniaturisée et portable qui se propose de détecter les marqueurs génétiques, biochimiques, protéiques, et

cellulaires, couvrant ainsi tout le champ de la biologie clinique. Ces boîtiers, connus sous le nom de Lab-on-a-chip, laboratoire sur puces, existent déjà dans de nombreux laboratoires de recherche et sont utilisés en biologie moléculaire pour l'analyse des gènes et de leur expression. Associant la biologie, la physique des fluides et la microélectronique, ils intègrent des réactions chimiques ou

biologiques au sein de micro-canaux gravés sur un support, la puce. Permettant d'augmenter considérablement le potentiel informatif des échantillons, ils poseront nécessairement la question de l'utilité et du traitement de ces informations. Ainsi la validation de ces tests devra se faire au regard du service rendu, dans le cadre d'essais analogues à ceux qui existent pour les médicaments. Les

Correspondance : Pierre-Jean Lamy

Lab. de Biologie Spécialisée - UM-1 Biotechnologies et Marqueurs Tumoraux. CRLC Val d'Aurelle - 34298 Montpellier cedex 05  
Tel : +33 4 67 61 31 47 - Fax : +33 4 67 632873 - E-mail : pjlamy@valdorel.fnclcc.fr

thérapies ciblées dont l'efficacité est liée à la présence de cibles moléculaires ont besoin d'un typage biologique faisant appel à la détection de nombreux paramètres. C'est un exemple majeur de l'application en clinique de ces nouvelles technologies.

Parallèlement à la réduction de la taille des composants nécessaires aux micro-technologies se développe un monde particulier : le nano-monde, fait d'objets réalisés atome par atome, selon la méthode dite ascendante, comme on construit une maison, brique par brique. Mais ce monde reste encore du domaine de la recherche. Quelles seront ses applications futures en biologie clinique? Les nanocristaux peuvent avoir des applications dès aujourd'hui en immunanalyse. Demain peut-être, les dosages pourront être réalisés à l'aide d'interrupteurs à canal ionique analogues à ceux qui gèrent le transport ionique à travers la membrane plasmique. La sensibilité de tels systèmes sera sans commune mesure avec les moyens actuellement utilisés. Ce sera alors une évolution scientifique aussi importante que celle de l'utilisation des anticorps qui avait permis, avec l'immuno-analyse, d'accéder à la quantification de l'infiniment petit.

### LES BIOPUCES : UN MICRO-LABORATOIRE

#### Définitions

⇒ Les biopuces sont issues de la microélectronique, de la physique des microsystèmes et de la biologie. Elles ont pour but la miniaturisation des analyses biologiques. Elles sont caractérisées par un niveau de sensibilité élevé et par une production de résultats à haut débit. D'une taille de l'ordre du  $\mu\text{m}^2$ , elles sont conçues pour analyser des milliers de séquences d'ADN ou de protéines, pour automatiser et miniaturiser des réactions chimiques ou enzymatiques en série ou pour analyser des événements moléculaires au sein d'une cellule unique.

#### Les puces à ADN-ARN

⇒ Elles portent des sondes génétiques (molécules d'ADN) à leur surface et permettent d'analyser des échantillons biologiques. Sur une seule puce, l'ensemble du génome humain (30 000 gènes) peut être analysé en une étape. Les puces à ADN permettent en effet la mesure en parallèle du niveau d'expression (mesure de l'ARNm, transcrit en ADN complémentaire par reverse transcription) de plusieurs milliers de gènes voire d'un génome entier. Cette avancée technique permet de nombreuses applications comme l'étude des réseaux génétiques au sein d'une cellule ou l'obtention de signatures moléculaires caractéristiques d'un type de cellule, d'une pathologie ou d'un patient, mais aussi le criblage de nouvelles molécules, l'identification de nouveaux médicaments et de nouveaux outils de diagnostic.

Les puces proprement dites sont formées d'un support solide (lame de verre ou membrane) sur lequel des milliers de fragments d'ADN sont déposés (**Figure 1**). Chaque fragment d'ADN est représenté par un point sur la puce. Ils jouent le rôle de sondes pour fixer de façon très spécifique les fragments de gènes complémentaires des échantillons biologiques à tester. Cette technique dite d'hybridation est la première étape. L'ADN fixé, préalablement marqué par des traceurs (fluorescents ou radioactifs) est alors révélé par des techniques optiques sous éclairage fluorescent ou par détection de radioactivité. La quantification des signaux obtenus et l'identification des fragments de gènes reconnus sont ensuite rendues possibles au moyen d'un système d'acquisition d'image puis d'analyse des données faisant appel à des logiciels informatiques dédiés.

Le terme "puce à ADN" recouvre 2 procédés majeurs de fabrications :

- les macro et microarrays : où le dépôt de molécules d'ADN sur leur support est direct. Les macroarrays présentent jusqu'à 25 fragments d'ADN déposés par  $\text{cm}^2$ . Pour les

microarrays la robotisation du dépôt de l'ADN a permis la miniaturisation des systèmes macroarrays. La densité de sondes atteint alors  $1000/\text{cm}^2$ . Les sondes des ADN, doubles brins longs de 200 à 2000 paires de bases, sont capables de fixer 2 cibles différentes. Il est donc possible d'analyser en parallèle 2 échantillons distincts, après marquage de l'ADN complémentaire par 2 fluorophores. Chaque fluorescence émise reflète la quantification de l'expression d'un gène. Deux images dont le niveau de gris représente l'intensité de la fluorescence lue sont générées. Si on remplace les niveaux de gris par des niveaux de couleur verte pour la première image et rouge pour la seconde, on obtient en les superposant une image en fausses couleurs composée de spots allant du vert au rouge en passant par le jaune. Un excès du gène A dans l'échantillon marqué en rouge donnera un signal rouge ; un excès du gène B dans l'échantillon en vert donnera un signal vert ; une expression équivalente du gène C dans les deux échantillons donnera un signal jaune. Après compilation des données et analyse statistique, il est possible d'obtenir des images d'expression relative de gènes entre 2 échantillons ou 2 populations.

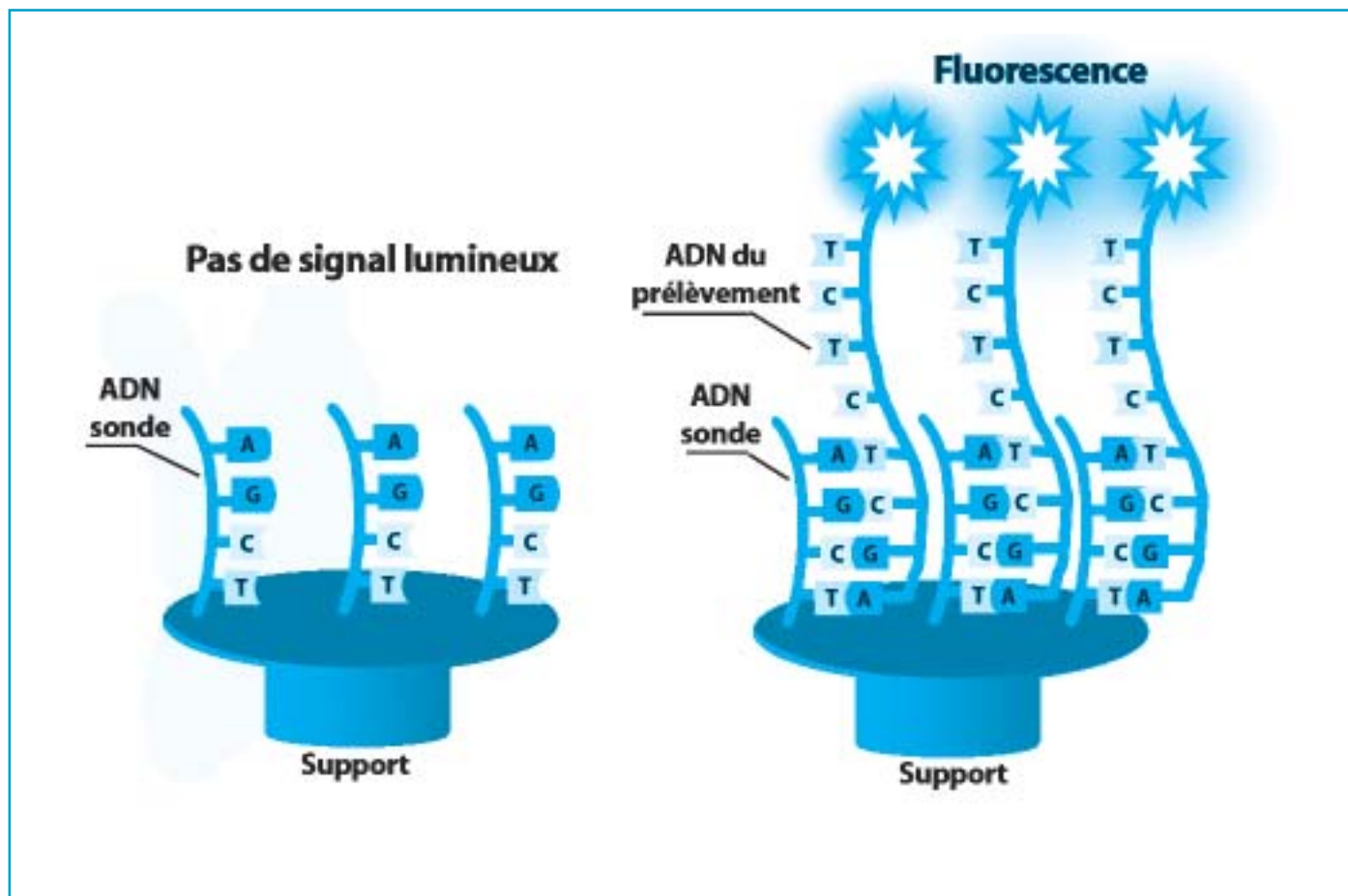
- Les puces à oligonucléotides : où les sondes oligonucléotidiques sont synthétisées in situ sur une surface solide. De très hautes densités d'oligonucléotides (plusieurs centaines de milliers par  $\text{cm}^2$ ) permettent l'analyse de milliers de gènes. Ces sondes sont conçues à partir des banques de données issues du séquençage. Certaines sont génériques, revendiquant une relative exhaustivité des gènes d'une espèce (homme, rat, souris, soja, E coli, drosophila, C elegans...) d'autres sont spécifiques de problématiques posées au sein d'une espèce, comme les puces « cancer » chez l'homme où sont regroupés les gènes susceptibles d'intervenir dans la cancérogénèse humaine.

Une avancée significative, qui verra le jour dans les prochaines années, permettra de détecter l'hybridation entre les acides nucléiques cibles et les acides nucléiques sondes, direc-

tement, c'est-à-dire sans recourir à une étape de marquage par un réactif fluorescent. Ces techniques se basent

en général sur les modifications de propriétés électrochimiques qui peu-

vent intervenir lors de l'hybridation [1].



- Figure 1 -

Principe de la puce à ADN : Chaque support ou microcuvette d'une puce à ADN porte un ADN sonde. L'hybridation d'une molécule d'ADN de l'échantillon préalablement marqué par un traceur va entraîner l'émission d'une fluorescence après lecture à la lumière U.V.

Basics on DNA biochips: DNA probe is immobilized to a solid surface and exposed to a set of DNA targets beforehand labeled by fluorescent dye. Detection of hybridization is made after UV light exposure.

### Les puces à protéines

⇒ L'analyse des milliers de protéines effectrices codées par les gènes est le complément de la génomique. La protéomique apparaît donc comme l'analyse de profils révélateurs de spécificités biologiques. Les puces à protéines sont développées en ce sens. Mais le concept de puce à protéine peut être trompeur car il ne saurait être toujours le parallèle des puces à ADN. Ainsi, il est souvent utilisé pour dénommer un système de chromatographie permettant de simplifier

l'analyse de l'expression des protéines dans un milieu biologique. La technique standard repose sur l'électrophorèse bidimensionnelle, le repérage de spots spécifiques et l'analyse de ceux-ci par chromatographie en phase gazeuse associées à la spectrométrie de masse. Ces puces à protéines utilisent les propriétés physico-chimiques des protéines pour réaliser leur fractionnement. Elles permettent d'éviter l'électrophorèse bidimensionnelle. La spectrométrie de masse de type SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) se distingue des

autres types de spectrométrie de masse, par la possibilité de retenir les protéines d'un échantillon d'une façon sélective sur des surfaces chimiques variées. Ces puces utilisent différentes propriétés utilisées en chromatographie tels que l'hydrophobie, hydrophilie, l'échange d'anions l'échange de cations...et permettent l'analyse de sous-populations protéiques. Cette fixation sélective, combinée à une modulation de la rigueur des lavages, donne ainsi la possibilité de détecter et d'analyser des protéines minoritaires, autrement masquées par les protéines plus abondan-

tes présentes dans l'extrait analysé. Les trois applications majeures qu'offre la technologie SELDI-TOF sont : l'établissement de profils, les études de capture ainsi que l'identification de protéines. L'établissement de profil consiste à comparer le profil protéique d'échantillons susceptibles de présenter des différences (sain /malade, wild type originel/muté, drogue1/drogue 2.....), afin de rechercher la présence ou la disparition de marqueurs protéiques spécifiques. L'utilisation des différentes surfaces avec des lavages différents permet ensuite d'établir une stratégie de purification pour la protéine d'intérêt. L'identification de la protéine semi-purifiée est possible par digestion protéolytique de la protéine isolée après électrophorèse SDS-PAGE, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse des peptides de digestion, et interrogation des banques de données. Les études de capture permettent, via le couplage covalent d'un anticorps, d'un récepteur ou d'ADN/ARN sur la barrette, d'analyser les variations de quantité d'une protéine après différents traitements et/ou dans différents compartiments cellulaires.

D'autres systèmes, plus proches du concept décrit pour les acides nucléiques, consistent en un dépôt de protéines ou d'anticorps sur une membrane et permettent l'élucidation du réseau d'interactions moléculaires dans les complexes de protéines et dans l'ensemble des organismes, le criblage des inhibiteurs pour l'étude des interactions protéine-protéine, protéine-ADN et protéine-ligand, après mise en évidence des interactions par détection de fluorescence des cibles marquées. Mais ces systèmes ne sont pas encore de très haute densité.

### Les "lab on-a-chip"

⇒ Une des technologies promises pour le laboratoire du futur est ce que l'on appelle communément le Lab-on-a-chip ou laboratoire sur puce. Ces laboratoires sont fabriqués par des procédés de photolithographie déve-

loppés dans l'industrie de la microélectronique. Ils sont constitués de circuits de microcanaux de 10 microns de large environ reliant des chambres de réactions dans des matériaux comme le silicium, le verre le quartz ou même le plastique. L'ensemble associe des micro-pompes, des micro-valves, des micro-mélangeurs dont les fonctionnalités permettent la gestion des flux de réactifs chimiques comme les semi-conducteurs gèrent le flux des électrons dans les circuits imprimés [2]. Ces réactifs peuvent être mélangés, dilués avec d'autres réactifs, séparés par électrophorèse capillaire ou électrochromatographie dans une seule puce. Les mouvements des fluides sont basés sur des principes d'électrocinétique: électrophorèse ou électro-osmose. Avec l'électrophorèse, les molécules se déplacent dans un champ électrique d'une électrode à l'autre. L'électro-osmose permet de déplacer un volume de liquide dans un capillaire en appliquant un champ électrique le long de sa paroi. De simples tampons aqueux peuvent être utilisés pour véhiculer les molécules dans les micro-canaux. A ces dimensions, le mélange des réactifs est complexe à réaliser en raison de l'absence de turbulence. Lorsque 2 canaux confluent, les liquides ne se mélangent pas et circulent côte à côte dans le canal résultant. Seule la diffusion thermique peut assurer le mélange mais elle est trop lente. Une solution consiste en l'utilisation d'une géométrie complexe de ces canaux : canaux à rainures sur une seule face entraînant un écoulement hélicoïdal, canaux en réseau 3D, canaux de formes "biscornues" [3].

La difficulté de conception de ces outils est bien sûr réelle mais les bénéfices attendus sont immenses : les puces électrophorétiques n'utilisent pour séparer les protéines ou l'ADN que 1% du temps nécessaire aux électrophorèses classiques, avec bien sûr une économie considérable d'échantillons et de réactifs. En effet, la plupart des réactions chimiques sont limitées par la diffusion des espèces moléculaires dans le volume de réaction. Le calcul indique que la vitesse de réaction est proportionnelle au

carré de la distance moyenne à parcourir par les partenaires de la réaction pour qu'ils se rencontrent. Toutes choses égales par ailleurs, si une réaction chimique (par exemple une réaction entre un anticorps et un antigène) met 24 heures à se réaliser dans un tube à essais de 1 cm de diamètre, cette réaction mettra quelques secondes si le flacon de réaction est réduit à une taille de quelques micromètres. Faire petit signifie faire rapidement. La possibilité d'associer en parallèle différents micro-circuits de fluides permet d'envisager des systèmes d'analyse à très haut débit à des coûts raisonnables en raison des économies de temps et de réactifs. L'ensemble de la biochimie et de l'immuno-analyse peut être en effet abordé par les lab-on-a-chip avec leurs fonctionnalités de mélange, dilution et séparation parfaitement adaptables à de nombreuses techniques d'analyses. Par ailleurs, leur capacité de travailler aux échelles nanométriques ouvre la voie à l'analyse d'échantillons très spécifiques comme l'analyse des composants d'une cellule unique.

### Les analyseurs cellulaires

⇒ Les biologistes ont besoin d'outils pour manipuler les cellules mais une des difficultés réside dans le fait que celles-ci sont équipées de récepteurs très sensibles à leur manipulation modifiant leur état biologique que l'on cherche à étudier. Les cellules sont cependant peu sensibles aux champs électromagnétiques qui peuvent être utilisés pour les manier sans les toucher. Des micro-laboratoires de 0,5 cm<sup>2</sup> de côté et de 200 µm d'épaisseur existent déjà, qui peuvent faire circuler des cellules dans des canaux sous la direction de champs électriques générés par des électrodes. Les cellules isolées dans des cages de potentiel (dites diélectrophorétiques) sont comme en lévitation. Elles peuvent être triées, alignées, purifiées. Un contrôle électronique par un logiciel permet de déterminer les mouvements de chaque cellule individuellement et sans flux de liquide. En manipulant chaque cellule indépen-

damment, il devient possible de sélectionner des populations de cellules rares, comme par exemple, lors de l'analyse de biopsies ou l'isolement de cellules souches à visée thérapeutique. Cet outil universel permet, outre la manipulation de cellules, l'application de composés chimiques ou leur dépôt dans des milieux de culture (étude des effets de drogues, fusion avec des liposomes, transfection avec des gènes...). La SmartChip élaborée par Silicon Biosystem® [4] est constituée d'une matrice de 320 x 320 électrodes, soit plus de 100 000 électrodes sur une surface de 0,4cm<sup>2</sup>. La matrice permet de générer plusieurs milliers de cages indépendantes et le logiciel de pilotage permet de diriger ces cellules vers des compartiments dédiés à l'analyse ou à la manipulation ultérieure des cellules.

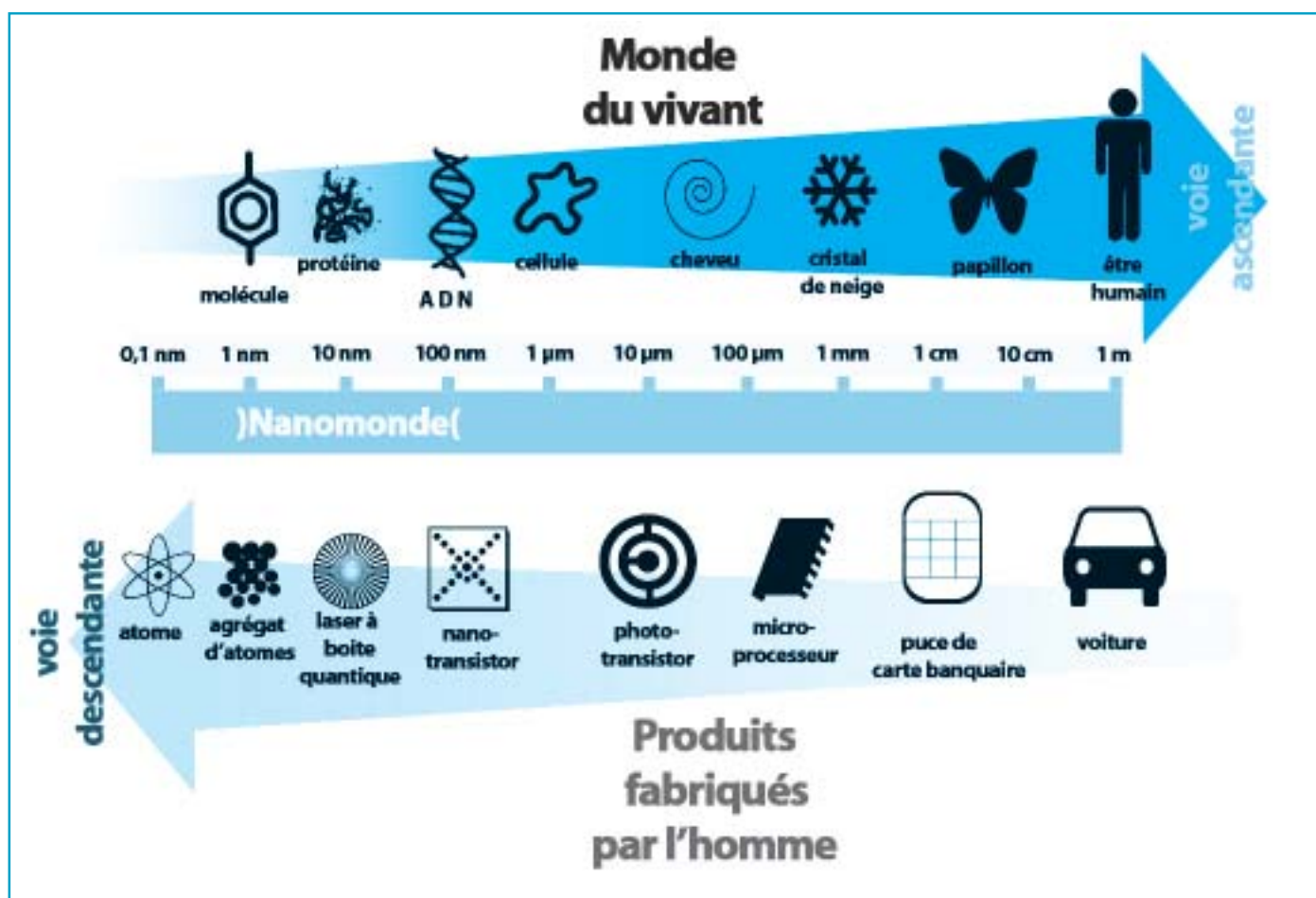
## LES NANOTECHNOLOGIES ET LE LABORATOIRE

### Les nano-objets

⇒ Le préfixe "nano", qui vient d'un mot grec qui signifie très petit, est utilisé devant les unités de mesure pour exprimer le milliardième de l'unité de base. Le nanomètre, 10<sup>-9</sup> mètres, c'est environ 30 000 fois plus fin qu'un cheveu, 100 fois plus petit qu'une molécule d'ADN et la largeur de 4 atomes de silicium. Les nanotechnologies recouvrent l'ensemble des systèmes capables de fabriquer des objets de l'ordre du nanomètre. Le physicien Richard Feynman, prix Nobel de physique en 1965, est considéré comme le fondateur de cette discipline après un discours à Caltech

en 1959 où il déclara avec humour "There is plenty of room at the bottom". Mais c'est son étudiant, Eric Drexler, qui utilisera le terme de nanotechnologie pour la première fois en 1969.

Pour fabriquer des objets de plus en petit, on a traditionnellement adopté ce qu'on appelle la voie descendante ou "top-down" en anglais (**Figure 2**): on découpe un matériau en éléments pour le réduire ; c'est la voie utilisée par l'électronique qui a abouti à des objets de l'ordre des 100 nm. Avec la voie ascendante (ou "bottom-up"), on peut envisager de construire des molécules, atomes par atomes, capable de former des nano-machines que la voie descendante serait incapable de fabriquer et qu'aucune chimie ne saurait synthétiser [5]. Les perspectives qu'offrent les nano-technologies pour le laboratoire sont nombreuses.



- Figure 2 -

Dimensions macroscopiques et microscopiques du monde vivant et des produits industriels  
Macroscopic and microscopic dimensions of living organism and the manufactured goods

### Les "nanocantilevers"

⇒ Les deux outils actuels des nanotechnologies sont le microscope à effet tunnel (en anglais STM, Scanning Tunneling Microscope) et le microscope à force atomique (ou AFM pour atomic force microscope). Le microscope à effet tunnel fut inventé en 1981 par des chercheurs d'IBM, Gerd Binnig et Heinrich Rohrer, qui reçurent le Prix Nobel de physique pour cette invention en 1986. Le STM utilise un phénomène quantique, l'effet tunnel, pour déterminer la morphologie et la densité d'états électroniques de surfaces conductrices ou semi-conductrices avec une résolution spatiale pouvant être égale ou inférieure à la taille des atomes. L'AFM est un dérivé du STM, qui peut servir à visualiser la topologie de la surface d'un échantillon ne conduisant pas l'électricité. Le principe se base sur les interactions (forces de répulsion ionique, forces de van der Waals, forces électrostatiques, forces de friction, forces magnétiques...) entre les atomes de l'échantillon et une pointe, idéalement atomique, montée sur un microlevier (cantilever). La pointe balaie (scanne) la surface à représenter entraînant la déflexion du cantilever. Un ordinateur enregistre ce mouvement et peut ainsi reconstituer une image de la surface. La différence entre l'AFM et le STM réside dans la mesure prise en compte pour la réaction utilisée : le STM utilise le courant tunnel, l'AFM utilise la déviation du levier, c'est à dire indirectement les forces d'interactions entre la pointe et la surface.

Les applications de l'AFM en biologie sont nombreuses comme l'étude des interactions cellulaires en 3D [6]. Une application dérivée de l'AFM par la fonctionnalisation de nanocantilever peut être mise à profit dans la détection des interactions moléculaires. Utilisant le principe de l'AFM, des

nanocantilevers sur lesquels on a fixé des protéines ou de l'ADN vont subir des modifications détectables des forces d'adhésions à leur surface lors de la fixation des ligands, anticorps, récepteurs ou acides nucléiques complémentaires. Il s'en suit la possibilité d'imaginer un outil diagnostique des interactions ligand-récepteur à l'échelle nanométrique. La société Biofinger [7] développe un outil de ce type destiné au laboratoire pour la détection des virus ou des marqueurs tumoraux [8].

### Les nanocristaux

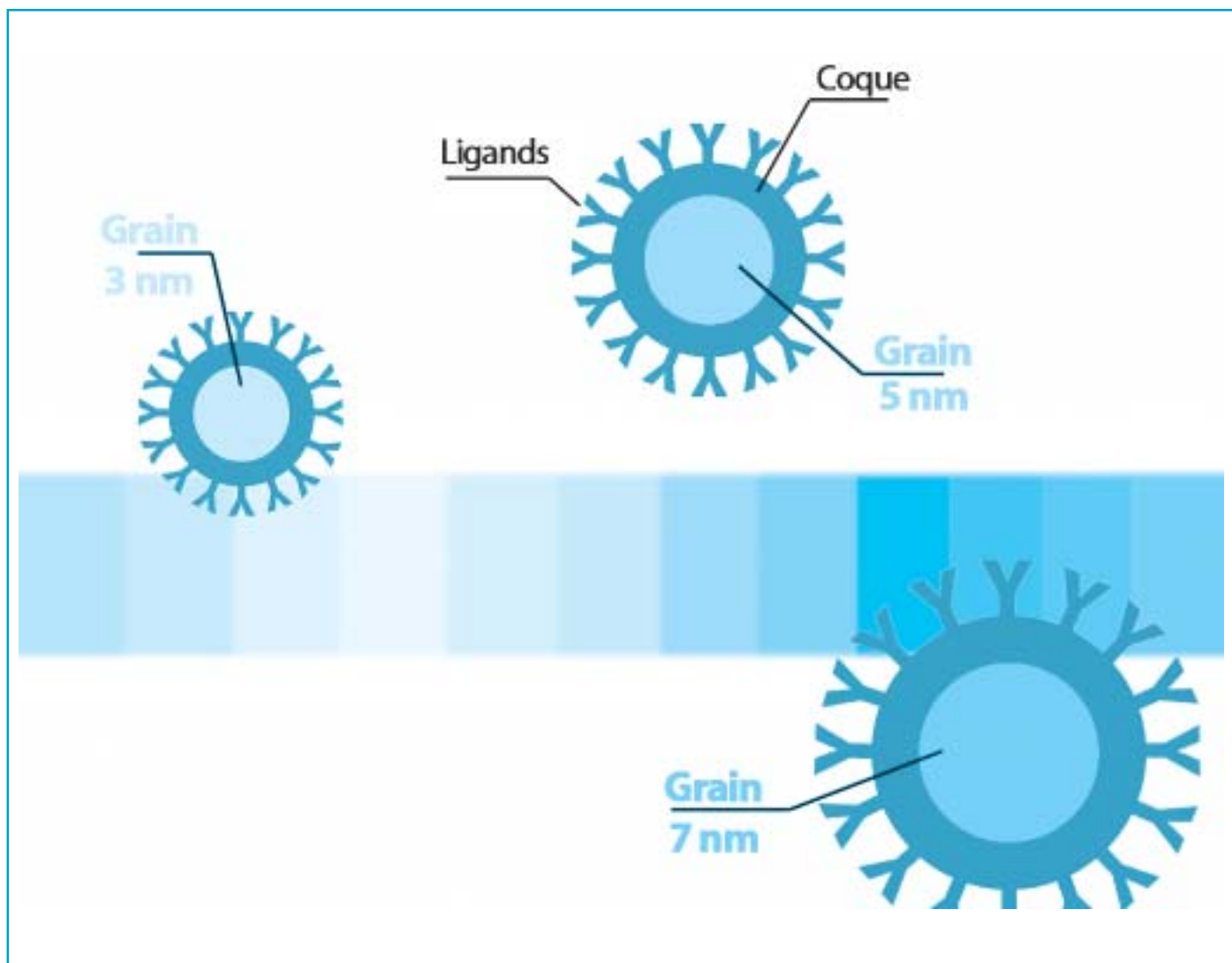
⇒ Une autre application des nanotechnologies pourrait grandement augmenter le nombre de marqueurs fluorescents utilisés en biologie comme traceurs. Le séléniure de cadmium (CdSe) possède des propriétés quantiques particulières quand il est préparé sous forme de grains nanométriques. Eclairés par un rayonnement U.V., ces nanocristaux émettent une lumière dont la couleur change en fonction de leurs dimensions (Figure 3). Du bleu au rouge, la presque totalité des couleurs est ainsi disponible. Parmi de nombreuses applications [9], la fonctionnalisation de telles structures permettra la mise au point de tests d'immunoanalyse multiparamétriques en phase homogène. En biologie moléculaire ces fluorophores plus stables que la fluorescéine ou le Rouge Texas sont utilisés dans des techniques d'hybridation in situ (FISH) d'analyse des chromosomes [10].

### Les capteurs biologiques

⇒ C'est une idée encore au stade du concept : mimer la capacité des cellules à analyser le milieu environnant. Il s'agit de développer un capteur,

analogue à une cellule dotée d'une membrane plasmique, basé sur le principe de l'interrupteur à canal ionique. La genèse et la transmission des signaux électriques présents dans les cellules sont sous la dépendance de protéines transmembranaires spécialisées : les canaux ioniques. Quand la molécule à détecter se fixe sur son récepteur, à la surface du capteur, celui-ci couplé au canal ionique bloque le passage des ions supprimant ainsi le courant électrique. La mesure des fluctuations de courants inférieures au pico-ampère permet de détecter la fixation de la molécule sur son récepteur. Il s'agit de mettre à profit les acquis de la microélectronique pour lever les limites de l'électrophysiologie. Cette détection serait ultrasensible puisque capable en théorie de détecter la présence d'une seule molécule, une potentialité qui pourrait être mise à profit dans l'étude du fonctionnement cellulaire.

Repousser les limites de la miniaturisation, créer des matières nouvelles et, peut-être, mettre au point des nanorobots chargés de produire à grande échelle des biens de consommation, c'est encore une des promesses des nanotechnologies. La mise au point de nanomachines auto-répliquantes peut se révéler difficile alors qu'une autre voie possible serait d'exploiter et de réorienter l'activité de nanomachines qui existent déjà dans la nature, les microorganismes. Les biotechnologies ont permis d'asservir les bactéries pour la production de protéines comme l'insuline, l'érythropoïétine ou l'hormone de croissance. Déjà, les nanotechnologies et biotechnologies sont actuellement en train de fusionner pour former les "nanobiotechnologies artificielles" qui permettront de produire, par création de code génétique, des protéines qui n'existent pas dans la nature.



- Figure 3 -

*Nanocristaux de séléniure de cadmium fonctionnalisés. La fluorescence émise est fonction de la taille des nanocristaux*  
*CdSe quantum dots coated with antibodies. Fluorescence emission is tuned by varying the particle size.*

### Microtechnologies to nanotechnologies in clinical chemistry.

*No doubt that nanotechnologies are the next scientific and industrial revolution. The fact that now, one can handle atoms one by one, offers a very large field for scientific investigations. At the moment, clinical chemistry only miniaturizes its analysis systems. DNA and proteins chips come into general use. Biochemical and immuno-analysis techniques can be approached through the "lab-on-a-chip". But this is quite expensive and has its limits. The "bottom-up" enables to create new materials with unsuspected properties. Some of these properties applications in clinical chemistry are exposed in this review.*

Nanotechnologies / Molecular biology / Proteomic / Biochips

### RÉFÉRENCES

1. Drumond T, Hill M, Barton J. Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotech* 2003;1:1192-9
2. Homsy A, Koster S, Eijkel JC, van den Berg A, Lucklum F, Verpoorte E, de Rooij NFA high current density DC magnetohydrodynamic (MHD) micropump. *Lab Chip* 2005;5:466-71
3. Stroock AD, Dertinger SK, Ajdari A, Mezic I, Stone HA, Whitesides GM. Chaotic mixer for microchannels. *Science*. 2002;295:647-51
4. Manaresi N, Romani A, Medoro G, Altomare L, Leonardi A, Tartagni M and Guerrieri R. A CMOS Chip for Individual Cell Manipulation and Detection. *ISSCC February 2003*, pp192-3, abstract 487
5. *Introduction to Nanotechnology*. Eds Charles P. Poole, Frank J. Owens. Hardcover, June 2003. Wiley Hoboken, New Jersey, USA
6. Lehenkari PP, Charras GT, Nesbitt SA, Horton MA. New technologies in scanning probe microscopy for studying molecular interactions in cells. *Expert Rev Mol Med*. 2000;8:1-19
7. [www.biofinger.org](http://www.biofinger.org)
8. Villanueva G, Montserrat J, Pérez-Murano F, Rius G, Bausells J. Submicron piezoresistive cantilevers in a CMOS-compatible technology for intermolecular force detection. *Microelectronic Engineering* 2004;73-74:480-6
9. Akerman ME, Chan WC, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:12617-21
10. Xiao Y, Barker PE. Semiconductor nanocrystal probes for human metaphase chromosomes. *Nucleic Acids Res* 2004;11;32:e28