

Micromélangeur à advection chaotique pour l'hybridation des puces à ADN

Chaotic Advection mixing system for DNA chip hybridization

Florence Raynal, Frédéric Plaza, Aurélien Beuf et Philippe Carrière

Laboratoire de Mécanique des Fluides et d'Acoustique,
UMR CNRS 5509, Ecole Centrale de Lyon – Université Claude Bernard Lyon I – Insa Lyon,
36 avenue de Collongues, 69 134 Ecully.
e-mail : philippe.carriere@ec-lyon.fr

Éliane Souteyrand

Rosatech,
69130 Ecully, France.

Jean-René Martin, Jean-Pierre Cloarec et Michel Cabrera

Laboratoire d'Électronique, Optoélectronique et Microsystèmes,
UMR CNRS 5512, Ecole Centrale de Lyon, 36 avenue de Collongues, 69 134 Ecully.

Numerical and experimental studies of a micromixing system based on chaotic advection for improved DNA chip hybridization are presented. Homogeneous dispersion of particles inside the chamber is of primary importance to achieve the best sensitivity of the chip. The numerical Poincaré sections of the 3D, time periodic, flow are compared with experimental visualizations, with good agreement. We show that a trade off exists between absence of regular islands and small enough total volume of fluid. The results illustrate the potential for optimization of such devices based on numerical simulations.

I ■ INTRODUCTION

Les puces à ADN sont actuellement au cœur de la technologie et de la recherche en génétique. Une puce à ADN est composée de plusieurs rangées de sondes biologiques, par exemple des rangées d'oligonucléotides avec des séquences prédéterminées, fixées sur un support solide (par exemple du verre). Avec l'amélioration des techniques de miniaturisation, il est possible d'avoir des centaines de milliers de sondes sur une puce d'un centimètre carré. Il existe beaucoup de méthodes différentes pour fabriquer et lire une telle puce, mais cela n'est pas le sujet de ce papier (voir *Nature* [2002] pour une bibliographie exhaustive). Lors de l'analyse génétique, la puce est exposée à des demi-brins d'ADN étiquetés (avec des marqueurs fluorescents par exemple). Lorsque des séquences de nucléotides complémentaires se combinent, on dit que la puce est hybridée : les demi-brins d'ADN marqués sont recombines spécifi-

quement avec leur sonde complémentaire sur la puce, et non hybridés avec les sondes non complémentaires. Alors, en utilisant une technique de fluorescence, certains spots sur la puce fluorescent et d'autres non, ce qui conduit à la détermination de la composition chimique (la séquence génétique) de l'échantillon d'ADN.

L'hybridation d'une sonde nécessite que des molécules complémentaires se rencontrent à un certain moment. Cela peut être obtenu par pure diffusion moléculaire de l'ADN dans la solution. Dans ce cas il est possible d'estimer le temps caractéristique de diffusion : pour une puce de largeur $l = 10$ mm, avec un coefficient de diffusion D de l'ADN dans l'eau estimé de l'ordre de 10^{-9} - 10^{-10} m².s⁻¹, le temps caractéristique de diffusion est :

$$\tau_t = \frac{l^2}{D} \approx 30 \text{ à } 300 \text{ h} \quad (1)$$

Un tel temps est, bien sûr, totalement incompatible avec une utilisation systématique de ce type de technologie. Il est donc nécessaire de créer un écoulement pour améliorer la dispersion sur la puce. La puce à ADN est placée dans une « chambre d'hybridation » de largeur L et de hauteur h , et l'on crée un écoulement à l'intérieur de la cavité. Cependant, dans un dispositif de si petite taille, les écoulements sont de type rampants, ce qui nous amène à explorer les voies ouvertes par l'advection chaotique [Aref, 1984][Wiggins, 1988][Ottino, 1989].

Il est bien sûr de la plus haute importance de s'assurer que les échantillons d'ADN ont une probabilité égale de réagir avec chaque sonde. Cependant, dans un écoulement chaotique, en fonction des paramètres de l'écoulement, des zones régulières peuvent coexister avec des régions chaotiques, amenant ainsi une concentration non uniforme à l'intérieur de la chambre. Comme la réaction d'hybridation dépend de la concentration, cela pourrait conduire à une mauvaise réponse de la puce.

Pour résoudre ce problème, nous proposons et étudions l'efficacité d'un protocole de mélange basé sur des injections alternées à l'aide de seringues. Ce protocole combine un forçage périodique en temps [Jones, 1988][Rom-Kedar, 1990] et des effets tridimensionnels locaux [Bajer, 1990][Toussaint, 1995][Toussaint, 2000].

De manière indépendante, McQuain et al.[2004] ont présenté récemment une étude expérimentale d'un système de micromélangeur pour l'hybridation des puces. Le mélangeur chaotique qu'ils proposent est très proche du nôtre, mais contrairement à leur travail, notre étude est plutôt basée sur l'analyse complète de la mécanique des fluides du mélangeur, avec résolution numérique de l'écoulement et détermination des trajectoires des particules fluides. Les résultats, validés sur une expérience à l'échelle 10, permettent de quantifier l'efficacité du mélange en fonction des paramètres de l'écoulement.

II ■ PROTOCOLE DE MÉLANGE CHAOTIQUE

Une vue schématique de la chambre d'hybridation de notre étude est montrée figure 1. Elle est composée d'une cavité carrée de grand rapport d'aspect, de largeur $L = 15$ mm et

de hauteur $h = 0,5$ mm, avec des trous d'injection aux quatre coins. Sur la figure, la puce de côté 10 mm est symbolisée par un carré gris, situé sur la paroi inférieure de la cavité. Le volume de la chambre est approximativement de $110 \mu\text{L}$. Pour minimiser la quantité de matériel biologique nécessaire, la hauteur de la couche de fluide doit être la plus petite possible. La valeur de h donnée plus haut doit donc être vue comme une borne supérieure pour les applications futures. L'écoulement de fluide à l'intérieur de la chambre est produit en imposant une différence de pression suffisante entre deux trous opposés. Dans cette étude, le débit q est pris constant égal à $q = 20 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$. Le nombre de Reynolds caractéristique R_i dans les tuyaux d'injection de diamètre $d = 0,8$ mm est donc :

$$R_i = \frac{4q}{\pi d v} \approx 30 \quad (2)$$

où l'on a supposé que la viscosité cinématique est $\nu = 10^{-6} \text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ comme pour l'eau. A l'intérieur de la chambre d'hybridation, on définit le nombre de Reynolds R_t basé sur la distance entre deux trous opposés :

$$R_t = \frac{q}{\sqrt{2}Lv} \approx 0,9 \quad (3)$$

Le nombre de Reynolds est donc partout dans l'écoulement entre R_t et R_i .

Les principes d'advection chaotique ont été appliqués avec succès dans différentes situations d'écoulements microfluidiques, comme par exemple les micro-canaux [Stroock, 2002][Lee, 2001]. Cependant, la particularité des chambres d'hybridation est que, à cause du grand rapport d'aspect L/h de la couche de fluide, l'écoulement est presque partout du type Hele-Shaw, sauf près des trous d'injection. Puisque la vitesse verticale est très faible, l'écoulement peut-être considéré en première approximation comme bidimensionnel. Pour être efficace dans ce type de géométrie, le protocole de mélange chaotique doit être dépendant du temps : nous proposons ici le plus simple protocole de ce type, basé sur des injections croisées avec deux paires de seringues, comme le montre la figure 1.b. Le forçage périodique en temps permet a priori l'existence de mélange horizontal à travers la cellule. Cependant, puisque la puce est placée sur la paroi inférieure de la chambre, on doit s'assurer également que les

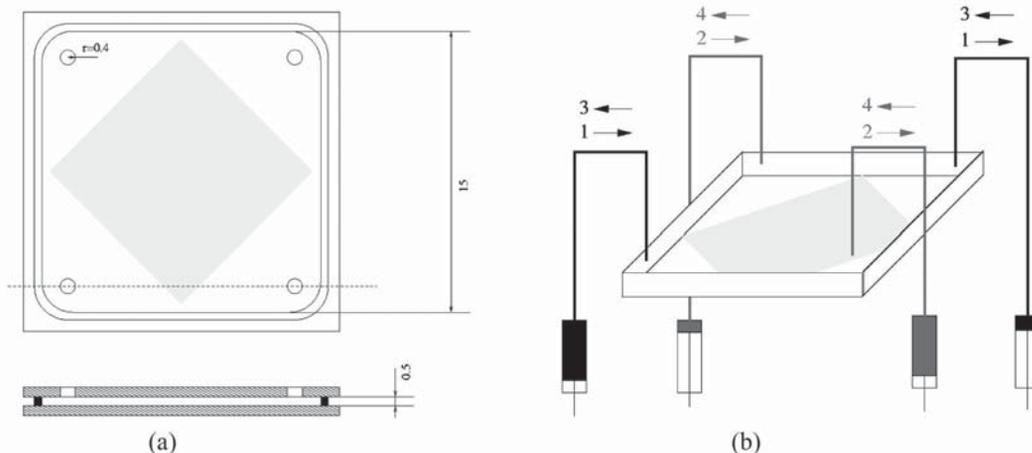


Figure 1 - Chambre d'hybridation ; la puce à ADN est symbolisée par le carré central. (a) : vue schématique de la chambre ; les longueurs sont données en mm. (b) : principe d'injections/extractions alternées. Chaque quart de période du protocole implique deux seringues opposées (les noires pour les phases 1 et 3, les grises pour les phases 2 et 4).

molécules d'ADN visitent toute la hauteur de la couche de fluide. Le temps caractéristique de diffusion verticale,

$$\tau_h = \frac{h^2}{D} \approx 4 \text{ à } 40 \text{ min} \quad (4)$$

est bien plus faible que pour la direction horizontale, ce qui autorise les brins d'ADN à changer de plan vertical dans un temps raisonnable (et, bien sûr, ce temps serait encore moins élevé avec une hauteur de fluide plus faible). Cependant, la diffusion verticale n'est pas assez efficace encore, et l'effet de mélange dans cette direction est accentué en plaçant les tuyaux d'injection verticalement, ce qui crée une forte vitesse verticale au voisinage des deux trous correspondant à la source et au puits à un instant donné : cela permet aux particules de passer d'un plan horizontal de la chambre à l'autre. En conséquence, l'écoulement possède a priori les ingrédients nécessaires à une bonne dispersion, à la fois horizontale et verticale, même sans diffusion moléculaire.

III ■ ÉTUDES NUMÉRIQUES ET EXPÉRIMENTALES

Nous avons effectué des simulations numériques pour déterminer les trajectoires de particules fluides pour ce système d'injection alternée. L'approche numérique a été simplifiée en considérant le champ de vitesse comme stationnaire pendant chaque quart de période correspondant à une phase d'injection/extraction. Le champ de vitesse a été obtenu par résolution des équations de Stokes dans les variables primitives en utilisant une méthode d'éléments finis avec approximation quadratique de la vitesse (l'élément P1-P2 encore appelé élément de Taylor-Hood, avec approximation linéaire de la pression, voir [Girault, 1986]). Le système externe de seringues a été modélisé par de longs tuyaux étroits.

L'écoulement est déterminé numériquement jusqu'à une distance suffisante dans les tuyaux, puis est considéré comme un écoulement de Poiseuille plus loin des trous d'injection. Grâce aux symétries de l'écoulement, le champ de vitesse n'a été calculé que sur une moitié de chambre (voir figure 2), puis reconstruit par symétrie pour permettre le calcul des trajectoires. Le champ de vitesse stationnaire obtenu est ensuite tourné d'un angle de $\pi/2$ à chaque $T/4$. Les trajectoires ont été déterminées en utilisant un schéma de Runge-Kutta d'ordre 4, et les exposants de Lyapunov ont été calculés en utilisant un schéma d'ordre 3 pour intégrer les équations de la matrice jacobienne [Carrière, 2005].

Nous avons réalisé une expérience à l'échelle 10 : 1 avec un dispositif analogue à celui proposé sur la figure 1. L'objectif principal de cette expérience a été de vérifier la pertinence du principe de base et la validité de l'approche numérique. La similarité en Reynolds impose un débit de $11,24 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Cela conduit donc à un rapport entre la période réelle T et la période de l'expérience \underline{T} de $9,5 \times 10^{-3}$. La technique de visualisation utilisée est la fluorescence induite par laser avec de la rhodamine ; pour cela nous avons créé un plan laser horizontal de 2 mm d'épaisseur avec une lentille divergente. Une goutte de solution de rhodamine fortement concentrée est introduite dans l'un des tuyaux d'injection. Puis le protocole d'injection/extraction alternés est mis en route, et l'on prend une photographie (vue de dessus) tous les $T/4$.

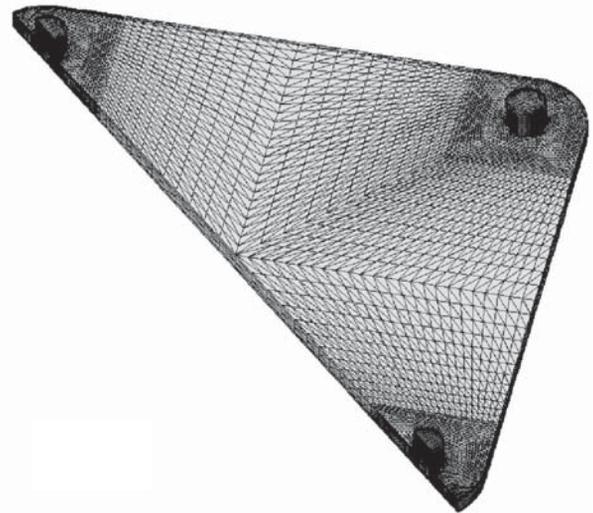


Figure 2 – Grille d'éléments finis.

IV ■ RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Sur la figure 3, on montre des photographies de l'expérience dans le cas $\underline{T} = 420 \text{ s}$ (qui correspond à une période de $T = 4 \text{ s}$ à l'échelle réelle), ainsi que les sections de Poincaré associées ; il existe clairement un très bon accord entre l'expérience et les simulations numériques. Nous rappelons toutefois que comme le champ de vitesse est tridimensionnel et périodique en temps, les sections de Poincaré sont un ensemble de points dans l'espace 3D dont on montre une projection sur la figure. On peut remarquer que, bien qu'il existe une importante région régulière (à la fois sur les visualisations et les simulations numériques), cette région se déplace au cours du temps du fait du protocole d'injection alternée. Pour la valeur de T considérée, une zone donnée de la puce prise au hasard sera visitée par des trajectoires chaotiques (et donc par des molécules biologiques marquées dans l'application réelle), même si elle peut correspondre à une région régulière (sans particules marquées) pendant un certain temps. Cependant, de telles régions régulières conduisent à une concentration d'ADN non uniforme sur la puce, et donc le protocole est peu performant. Pour éviter ce genre de problème, il est nécessaire de s'assurer qu'aucune région régulière n'est présente dans l'écoulement.

Sur la figure 4 on montre des sections de Poincaré horizontales pour quatre périodes, $T = 4 \text{ s}$, $T = 8 \text{ s}$, $T = 10 \text{ s}$ et $T = 16 \text{ s}$. Bien que pour $T = 8 \text{ s}$ on retrouve encore une région régulière, l'écoulement devient complètement chaotique pour $T = 10 \text{ s}$. Dans le cas de ces écoulements globalement chaotiques, l'expérience montre qu'une goutte de rhodamine est très rapidement mélangée en seulement deux ou trois périodes. De même, comme on peut le voir figure 5. b, il existe toujours un exposant de Lyapunov positif, quel que soit la trajectoire étudiée. A l'inverse, les trois exposants de Lyapunov sont nuls pour toute trajectoire d'une région régulière (figure 5.a). Tout cela prouve que le mélange est efficace pour des périodes du champ de vitesse suffisamment élevées.

Cependant, comme nous travaillons à débit fixé, augmenter la période revient à augmenter le volume de fluide dans la seringue : pendant chaque quart de période correspondant à une phase d'injection/extraction, le volume de fluide qui entre dans une seringue est $V = qT/4$. A la fin d'une période,

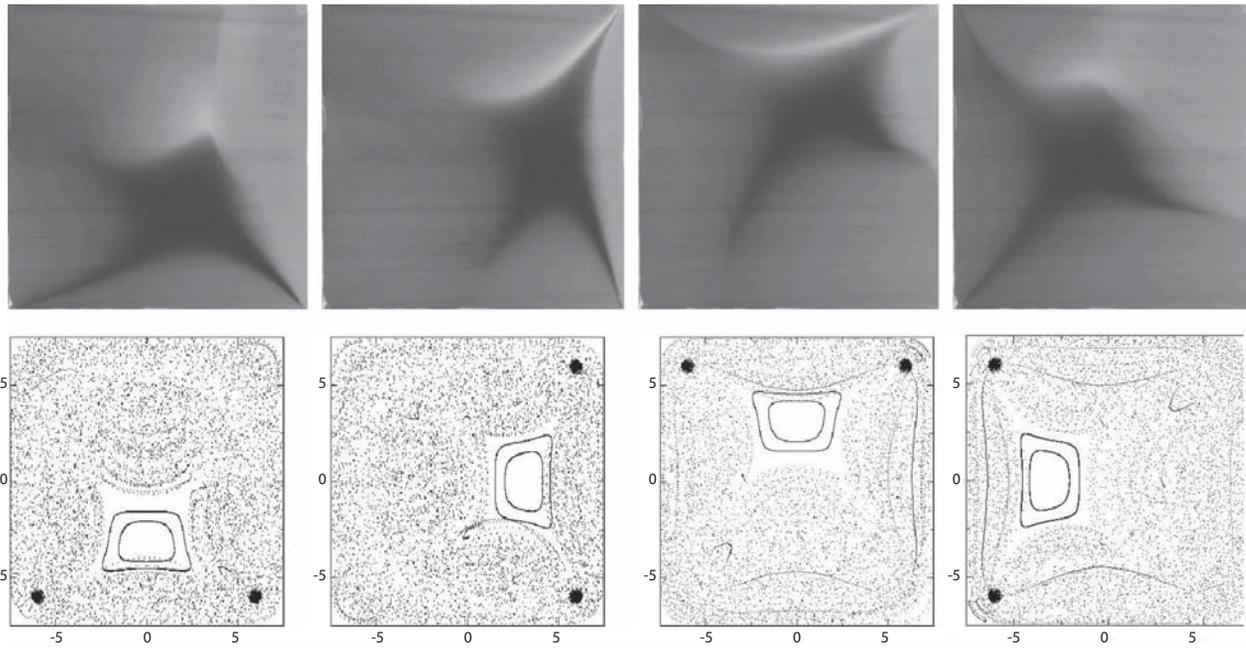


Figure 3 - En haut, visualisations (par rhodamine fluorescente) aux temps : (a) $t = 6T$; (b) $t = 6T + T/4$; (c) $t = 6T + T/2$; (d) $t = 6T + 3T/4$, avec $T = 4$ s ($T = 420$ s). En bas, les sections de Poincaré correspondantes obtenues par simulation numérique.

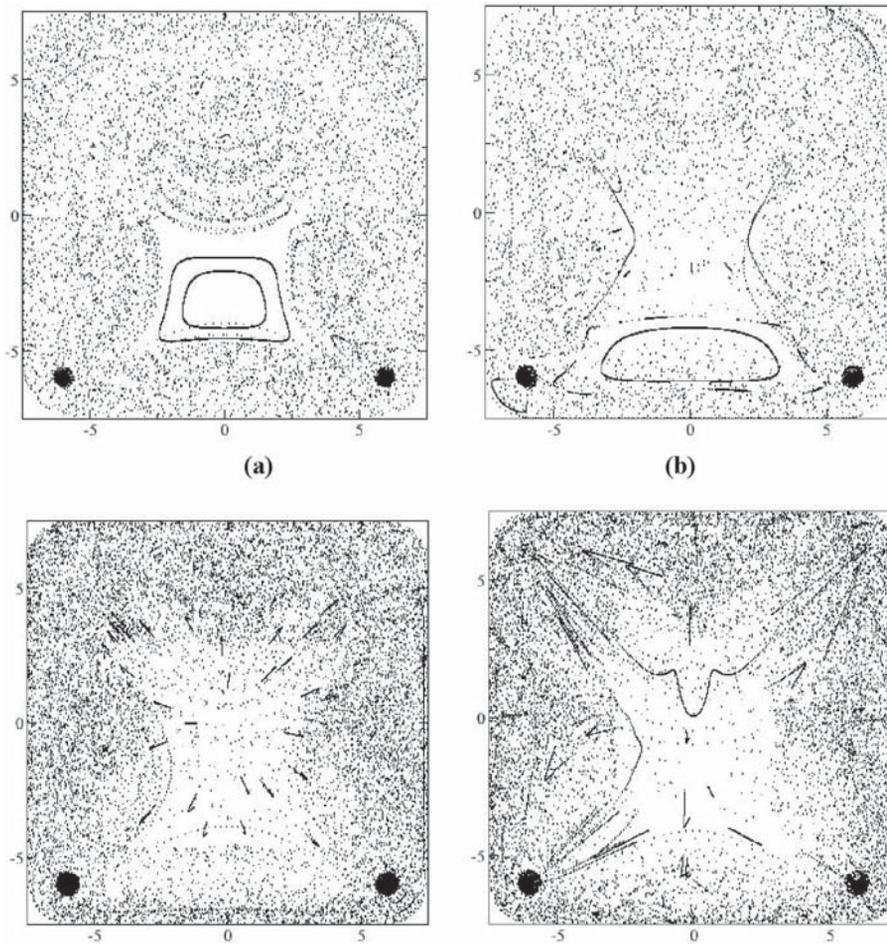


Figure 4 - Projection horizontale de sections de Poincaré pour : (a) $T = 4$ s ; (b) $T = 8$ s ; (c) $T = 10$ s ; (d) $T = 16$ s.

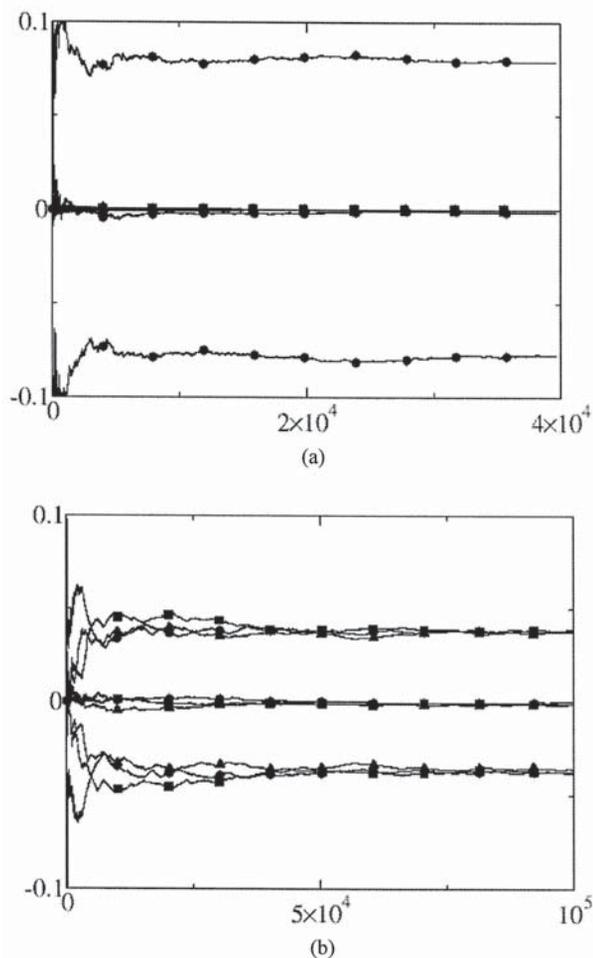


Figure 5 - Exposants de Lyapunov correspondant aux trois trajectoires des sections de Poincaré de la figure 4 pour : (a) $T = 4$ s ; (b) $T = 10$ s.

deux seringues sont pleines, les deux autres sont vides. Pour le premier protocole globalement chaotique trouvé ($T = 10$ s), le volume dans une seringue est $V = 50$ ml ; donc la quantité minimale de fluide nécessaire en tout est environ le double du volume de la chambre, ce qui reste raisonnable. Il faut garder à l'esprit le fait que cette technologie est d'autant plus efficace que le volume de fluide utilisé est faible : il y a donc un compromis entre efficacité du mélange et volume total. En poursuivant cette réflexion on peut se poser la question de ce qui arriverait si l'on diminuait encore la hauteur de la chambre : puisque l'écoulement est principalement de type Hele-Shaw, le problème reste quasiment inchangé si le nombre sans dimension

$$\frac{qT}{L^2 h} \quad (5)$$

proportionnel au volume des seringues sur le volume de la chambre, est gardé constant. De plus, une hauteur h plus faible améliorerait les effets de la diffusion moléculaire, et donc le mélange vertical.

V ■ CONCLUSION

Nous avons proposé un protocole de mélange très simple pour améliorer l'hybridation des puces à ADN, pour lequel

la puce est placée dans une chambre de grand rapport d'aspect, et l'écoulement périodique en temps est produit par quatre phases d'injection/extraction à l'aide de seringues. Nous avons effectué des simulations numériques qui ont été validées par une expérience à l'échelle 10. En faisant varier la période de l'écoulement T , nous avons étudié l'efficacité du mélange, et montré que l'écoulement devient globalement chaotique pour des valeurs de T suffisamment grandes. Cela correspond à des volumes de seringues assez grands, ce qui conduit à un compromis à trouver entre efficacité du mélange et volonté de minimiser le volume. D'autres paramètres, tels que la géométrie de la chambre ou la position des trous d'injection ont certainement leur rôle à jouer. Nous montrons ici l'importance d'une analyse théorique très poussée pour optimiser l'hybridation, compte tenu des contraintes pratiques imposées par cette technologie. Les simulations numériques auront donc sans nul doute leur rôle à jouer dans le futur développement de ces procédés.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Jean-Noël Gence, Julian Scott, Patrick Dutheil, Emmanuel Jondeau, Patrick Méjean, Philippe Blanc-Benon, Jean-Michel Perrin et Michel Lance pour leur aide et leurs remarques constructives. Nous remercions également le support financier du BQR de l'École Centrale de Lyon, du programme Biosécurité du MENRT et de la Délégation Générale de l'Armement, et du programme FITT de la Région Rhône-Alpes.

RÉFÉRENCES

Aref H. 1984. Stirring by chaotic advection. *J. Fluid Mech.*, 143, 1–21.

Bajer K., Moffatt H.K. 1990. On a class of steady Stokes flows with chaotic streamlines. *J. Fluid Mech.*, 212, 337–363.

Carrière Ph., 2006. Lyapunov spectrum determination from the FEM simulation of a chaotic advecting flow. *Int. J. Num. Meth. Fluids*, 50, 555–577.

Girault V., Raviart P.A. 1986. *Finite element methods for Navier–Stokes equations*. Springer-Verlag.

Jones S.W., Aref H. 1988. Chaotic advection in pulsed source-sink systems. *Phys. Fluids*, 31(3), 469–485.

Lee Y.K., Deval J., Tabeling P., Ho C.M. 2001. Chaotic mixing in electrokinetically and pressure driven micro flows. In *Proc. 14th IEEE Workshop on Micro Electro Mechanical Systems*, pages 483–486.

McQuain M.K., Seale, Peek J., Fisher T.S., Levy S., Stremler M.A., Haselton F. 2004. Chaotic mixer improves microarray hybridization. *Analytical Biochemistry*, 325, 215–226.

Ottino J.M. 1989. *The Kinematics of Mixing : Stretching, Chaos and Transport*. Cambridge University Press, New-York.

Rom-Kedar V., Leonard A., Wiggins S. 1990. An analytical study of the transport, mixing and chaos in an unsteady vortical flow. *J. Fluid Mech.*, 214, 347–394.

Stroock A.D., Dertinger S.K.W., Adjari A., Mezic I., Stone H.A., Whitesides G.M. 2002. Chaotic Mixer for Microchannels. *Science*, 295, 647–651.

Toussaint V., Carrière Ph., Raynal F. 1995. A numerical Eulerian approach to mixing by chaotic advection. *Phys. Fluids*, 7, 2587–2600.

Toussaint V., Carrière Ph., Scott J., Gence J.N. 2000. Spectral decay of a passive scalar in chaotic mixing. *Phys. Fluids*, 12(11), 2834–2844.

Wiggins S. 1988. *Global Bifurcations and Chaos*. Springer-Verlag, *Nature genetics*, 2002. 32(1), 1–60. supplement.