

Optimisation du protocole de mélange et de la géométrie d'une chambre d'hybridation de puces à ADN

Optimization of both mixing protocol and geometry of a DNA chip hybridization chamber

AURÉLIEN BEUF, FLORENCE RAYNAL, JEAN-NOËL GENCE, PHILIPPE CARRIERE

Laboratoire de Mécanique des Fluides et d'Acoustique
 CNRS / Université de Lyon ; École Centrale de Lyon / Université Lyon 1 / INSA Lyon
 36, av. Guy de Collongue, 69134, Ecully, France
 Tél : +33 (0)4 72 18 61 89, Fax : +33 (0)4 78 64 71 45, e-mail : aurelien.beuf@ec-lyon.fr

Optimization of both mixing protocol and geometry of a DNA chip hybridization chamber. DNA chip technology requires a rapid and homogeneous dispersion of the DNA molecules over the whole surface of the chip. We present here a numerical study that compares two periodic mixing protocols, based on chaotic advection ; the first protocol uses syringes, the other one pumps. We also compare two different geometries (square and rectangle) of the hybridization chamber in which the chip is placed. To achieve this, the Hele-Shaw flow is modelled by a two-dimensional flow, which allows us to find easily the analytical velocity field in these different shapes. The results are analyzed in terms of Poincaré sections (appearance, filling rate) ; the Lyapunov exponents are also computed. These Poincaré sections are then compared to visualizations in a 10 :1 scaled-up experiment, with good agreement. We show that the protocol that operates with pumps, coupled with the rectangular geometry, is more likely to achieve best chip performance : we get global chaos whatever the period chosen.

I ■ INTRODUCTION

L'ADN de tout être vivant est constitué de deux monobrans d'oligonucléotides appariés. Chaque brin comporte une série de bases - appelées A, T, C ou G - de séquence bien particulière mais inconnue au premier abord car différente d'un individu à l'autre (figure 1a). Les deux brins sont combinés spécifiquement grâce à la complémentarité entre les bases (A s'associant spécifiquement avec T, C avec G). Une séquence particulière « code » l'expression de gènes, comme ceux responsables, entre autres, des maladies dites génétiques ou des virus.

La puce à ADN a pour but de détecter rapidement certaines séquences d'ADN. Elle est constituée d'un support solide (par exemple du verre) sur lequel sont fixées des rangées de sondes biologiques, chacune constituée d'une

suite de 20 à 60 oligonucléotides, de séquence prédéterminée (figure 1b). Avec l'amélioration des techniques de recherche, il est possible d'avoir des centaines de milliers de sondes sur une puce d'un centimètre de côté [1].

La méthode d'analyse consiste dans un premier temps à déposer sur la puce quelques microlitres de monobrans d'ADN en solution, appelés « cibles », préalablement « étiquetés » par des marqueurs fluorescents. Une cible ne peut s'apparier à une sonde de la puce que s'il existe une parfaite complémentarité entre les deux séquences de nucléotides : on parle alors d'hybridation. Il reste ensuite à éliminer les brins non appariés (par lavage chimique), puis à détecter les brins restants par fluorescence induite. Ainsi, ces brins étant spécifiquement appariés aux sondes de la puce, on peut facilement conclure en la présence, ou non, de certaines séquences particulières dans la solution à analyser.

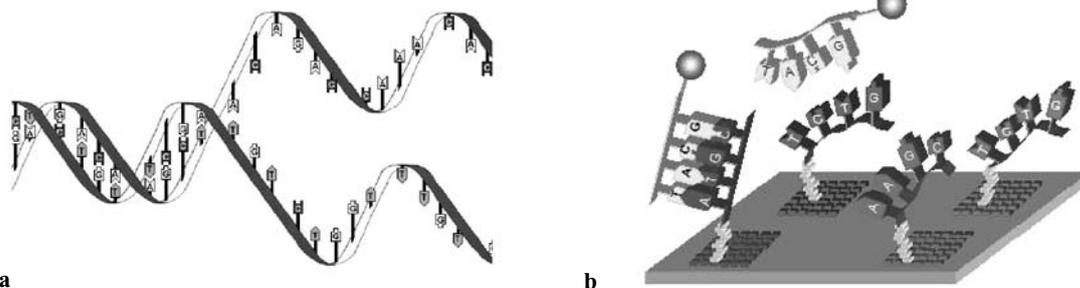


Figure 1 : (a) Une molécule d'ADN est composée de deux brins d'oligonucléotides complémentaires. (b) La puce à ADN est une surface solide sur laquelle sont fixées des sondes ; les cibles marquées de la solution à analyser s'associent spécifiquement avec leurs sondes complémentaires (phénomène d'hybridation).

Chaque sonde de la puce nécessite donc d'être visitée par les cibles de la solution à tester pour que l'hybridation puisse avoir lieu. Ceci peut être rendu effectif par diffusion moléculaire. En tenant compte du coefficient de diffusion moléculaire de l'ADN dans l'eau ($D \approx 10^{-9} - 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) et de la longueur caractéristique de la puce ($l = 1 \text{ cm}$), le temps caractéristique de diffusion est estimé à :

$$\tau_l = l^2/D \approx 30 \text{ à } 300 \text{ heures} \quad (1)$$

ce qui est incompatible avec la volonté d'obtenir des résultats rapides pour une utilisation quasi-systématique de ce type de technologie. Il est donc souhaitable de créer un écoulement pour augmenter la probabilité de rencontre entre cible et sonde complémentaire. Pour cela, la puce est placée dans une chambre d'hybridation dans laquelle un écoulement est créé. Cette cavité a une largeur L pour une hauteur h ($h \ll L$, afin de limiter le volume de la chambre). Compte tenu des faibles dimensions de la chambre, l'écoulement est nécessairement de type rampant, donc laminaire, ce qui nous amène naturellement à explorer les voies ouvertes par l'advection chaotique [2][3][4].

II ■ PROTOCOLES DE MÉLANGE PÉRIODIQUE

La chambre d'hybridation dans laquelle la puce est placée a une hauteur $h = 0.5 \text{ mm}$ et un volume de l'ordre de $110 \mu\text{L}$ (donc une largeur $L = 15 \text{ mm}$ pour la géométrie carrée), avec des trous d'injection aux quatre coins. La puce, de surface 1 cm^2 , est placée comme l'indique la figure 2. Afin de minimiser le plus possible le volume de matériel biologique à analyser, la hauteur h doit être considérée comme une borne supérieure pour les applications futures. L'injection de fluide se fait par des tuyaux de diamètre $d = 0.8 \text{ mm}$ en imposant une différence de pression suffisante grâce à des pompes ou des seringues avec un débit q pris constant et égal à

$20 \mu\text{L}/\text{s}$. En prenant comme viscosité cinématique celle de l'eau ($\nu = 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$), le nombre de Reynolds dans la chambre d'hybridation est de l'ordre de :

$$R_i = \frac{q}{Lv\sqrt{2}} = 0.9 \quad (2)$$

et celui dans les tuyaux est égal à :

$$R_i = \frac{4q}{\pi d \nu} = 30 \quad (3)$$

Ainsi, compte tenu du faible nombre de Reynolds, l'écoulement dans la cavité est de type rampant. Dans de telles conditions, le seul moyen de rendre efficace un tel dispositif consiste à rendre les trajectoires chaotiques : on parle d'advection chaotique. Du fait du très grand rapport d'aspect de la chambre ($L \gg h$), l'écoulement y est presque partout du type Hele-Shaw, sauf près des trous. Il peut être alors considéré comme quasi bidimensionnel. Or, l'unique façon de rendre chaotique un écoulement bidimensionnel, consiste à rajouter une troisième dimension au système - le temps - le plus simplement en le rendant périodique en temps. C'est pourquoi nous comparons ici deux protocoles de mélange périodiques en temps basés sur le principe d'injection/extraction alterné de fluide aux quatre coins de la cavité.

Le premier protocole, (dénommé 'protocole A' par la suite) repose sur l'injection périodique de fluide (période T) grâce à quatre seringues utilisées réversiblement [5][6][7] : pendant une période, quatre phases de durée égale ont lieu (figure 2a). Le deuxième protocole (appelé 'protocole B') repose quant à lui sur deux pompes monodirectionnelles recyclant le fluide extrait. Pour ce dernier, deux phases de durée égale se succèdent pendant T (figure 2b) [8].

À chaque instant, pour les deux protocoles, une source de fluide fonctionne avec le puits situé dans le coin opposé. Grâce à ces deux protocoles, un forçage périodique en temps

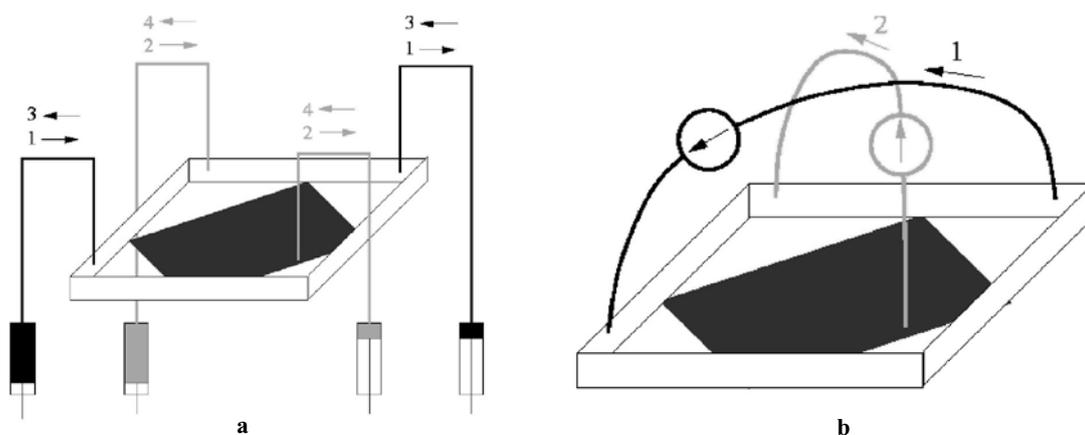


Figure 2 : Présentation des protocoles de mélange périodique. Le carré au centre de la chambre d'écoulement représente la puce à ADN. (a) Le protocole de mélange A, fonctionnant avec des seringues, comporte 4 phases de durée égale pendant une période T . (b) Le protocole de mélange B, fonctionnant avec des pompes, possède pendant T deux phases de durée égale.

est créé dans la chambre d'hybridation, qui permet, en théorie [9], une dispersion horizontale des brins sur la puce par advection chaotique. Cependant, celle-ci étant placée sur la partie inférieure de la chambre d'hybridation, on doit s'assurer également que les molécules puissent visiter toute la hauteur de la couche de fluide (les sondes étant fixées perpendiculairement à la puce, c'est-à-dire en position verticale). Le mélange vertical se fait d'une part par diffusion moléculaire, d'autre part en fixant les tuyaux verticalement sur la chambre d'hybridation.

Indépendamment de notre travail, une autre équipe a proposé [10][11][12] et testé [13] un dispositif basé sur les mêmes principes que le nôtre : les résultats montrent une nette amélioration dans la sélectivité et la sensibilité de la réponse de la puce.

III ■ MODÉLISATION NUMÉRIQUE ET EXPÉRIMENTALE

Pour pouvoir étudier numériquement le mélange résultant des deux protocoles A et B, il est nécessaire de connaître les trajectoires des particules fluides, et donc le champ des vitesses. Comme l'écoulement est de type Hele-Shaw, nous avons choisi de le modéliser par un écoulement bidimensionnel. Il devient alors facile de calculer le champ des vitesses. En effet, dans un tel écoulement, la vitesse moyennée sur la hauteur h vérifie l'équation d'Euler, et peut donc être obtenue par une approche potentielle du problème. Pour obtenir l'écoulement dans une cavité carrée ou rectangulaire, le champ des vitesses est d'abord calculé très simplement dans une cavité circulaire grâce au théorème de Millne-Thomson (théorème des images en mécanique des fluides). On applique ensuite à ce champ une transformation conforme de Schwarz-Christoffel adaptée au type de géométrie recherché. Ainsi, chaque géométrie peut rapidement être obtenue de manière analytique, ce qui rend cette méthode bien plus flexible qu'une expérience ou une simulation numérique 3D : nous montrons sur la figure 3 les lignes de courant obtenues dans les deux géométries.

L'efficacité du mélange est ensuite analysée naturellement avec les outils du chaos : sections de Poincaré et exposants de Lyapunov. Dans notre cas, les sections de Poincaré correspondent à la position cumulée des particules fluides reportée sur une même figure à toutes les périodes (à partir de l'instant $t = 0$ s). Les sections ainsi obtenues sont révélatrices de l'efficacité du mélange car elles montrent les zones chaotiques (celles où le processus de mélange est efficace), coexistant avec les zones dites régulières où le mélange ne se fait que par diffusion (voir figures 4b, 5a et 6). Il s'agit donc de trouver un protocole et/ou des paramètres du système (période, géométrie de la chambre d'hybridation, longueurs de tuyaux, etc.) qui permettent d'obtenir ces zones chaotiques sur la plus grande surface possible de la puce.

On peut alors calculer un « taux de remplissage » de la section de Poincaré : la méthode consiste à tracer mentalement une série de cases identiques et conjointes recouvrant entièrement la surface de la puce. Pour que les statistiques soient correctes, il faut de l'ordre de dix fois plus de points dans la section que de cases. Une case est remplie si elle contient au moins un point de la section de Poincaré. Le taux de remplissage consiste ensuite à compter le nombre de cases occupées (taux exprimé en pourcentage de surface remplie).

Le mélange peut également être analysé par le calcul des exposants de Lyapunov, qui mesurent l'étirement exponentiel de la séparation entre deux trajectoires initialement proches au cours du temps. Si une particule fluide se trouve dans une zone de mélange chaotique, le coefficient de Lyapunov est positif. Si, par contre, elle se situe dans une zone régulière, le coefficient de Lyapunov est nul. Ainsi, la dispersion des particules est d'autant plus rapide que l'exposant de Lyapunov est élevé.

Les sections de Poincaré sont comparées au mélange obtenu par le dispositif expérimental : celui-ci est composé d'une cavité à l'échelle 10 : 1. Les parois sont en verre pour suivre l'évolution d'un colorant, de la Rhodamine B dans notre cas, dans de l'eau bidistillée. Grâce à une nappe laser qui éclaire la cavité par la tranche, on suit l'évolution du colorant par fluorescence induite. Pour les deux protoco-

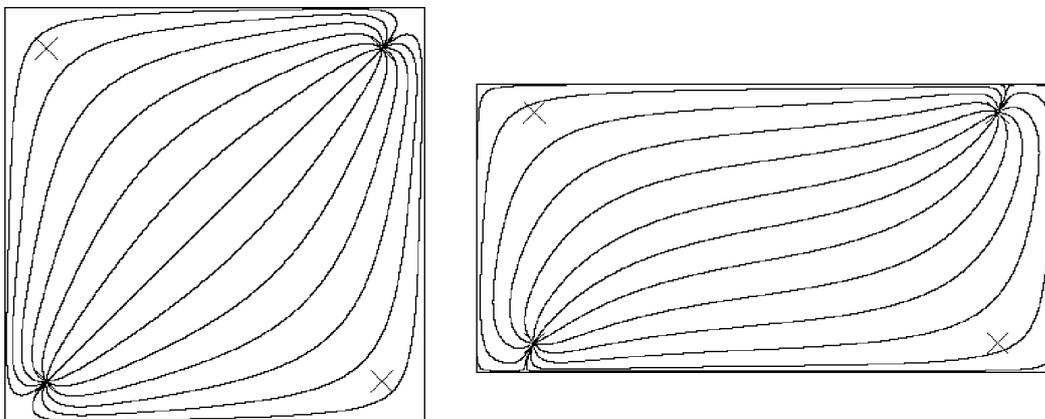


Figure 3 : Lignes de courant d'un écoulement bidimensionnel dans un carré ou un rectangle, créées par une source et un puits de fluide.

les, le fluide est mis en mouvement grâce à deux pompes péristaltiques réversibles, dans une configuration analogue à celle de la figure 2b. Pour modéliser le fonctionnement d'un couple de seringues du protocole A, on utilise une pompe de manière réversible avec des tuyaux suffisamment longs. Pour le protocole B, chaque pompe ne fonctionne que dans un sens. Le colorant est injecté en faible quantité par l'un des trous, et une photographie numérique est prise à la fin de chaque période. La similarité en Reynolds impose que le débit de l'expérience soit égal à 11,24 mL/min. Ainsi, le rapport entre la période réelle T et la période de l'expérience est égal à $9,5 \cdot 10^{-3}$.

Nous avons comparé les deux protocoles dans les cas d'une géométrie carrée et le cas d'une géométrie rectangulaire de même surface (correspondant à des chambres de même volume car la hauteur h est supposée identique dans les deux cas).

IV ■ RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

● IV.1 VALIDITÉ DU MODÈLE

La figure 4 montre deux sections de Poincaré dans la géométrie carrée pour la période $T = 4$ s, l'une avec notre modèle de champ de vitesse analytique bidimensionnel,

l'autre avec un champ de vitesse 3D (éléments finis avec équation de Stokes). Toutes deux sont comparées à la visualisation expérimentale pour les mêmes paramètres. On remarque clairement un très bon accord entre les deux sections de Poincaré : les zones chaotiques (zones « remplies » de points distincts) et les zones régulières (zones « vides » de points ou contenant des « trajectoires elliptiques ») ont des surfaces comparables et des positions identiques. Nous pouvons donc conclure que notre modèle avec champ de vitesse bidimensionnel est tout à fait approprié pour mener à bien une étude complète du problème.

● IV.2 COMPARAISON CARRE / RECTANGLE

Nous montrons figure 4b la section de Poincaré pour $T = 4$ s dans le cas du carré en protocole A. On constate qu'il existe une zone régulière de taille non négligeable en forme d'« étoile », confirmée par l'expérience (figure 4c). Dans les simulations bidimensionnelles, cette région persiste dans le cas du carré pour n'importe quelle période. D'autre part, plusieurs zones régulières périphériques coexistent avec cette « étoile » et, pour des périodes suffisamment grandes ($T > 8$ s), une zone régulière supplémentaire est visible au centre de la cavité, d'autant plus étalée que la période est grande. Ceci explique que le taux de remplissage (fig. 7a) « s'effondre » lorsque T croît. Il existe donc une période

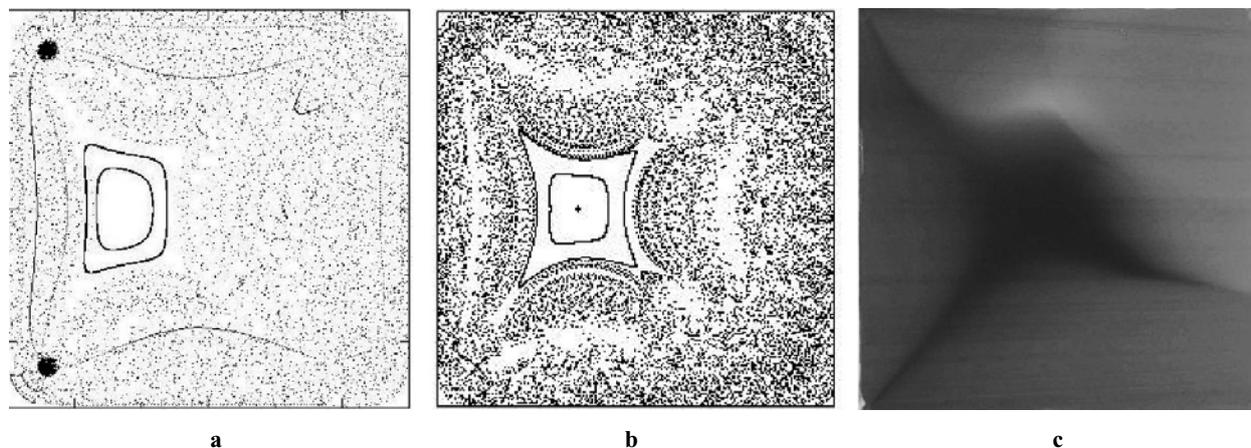


Figure 4 : Section de Poincaré issue du protocole A avec $T = 4$ s : (a) calcul avec champ de vitesse tridimensionnel, (b) cas du modèle de champ 2D et (c) expérience.

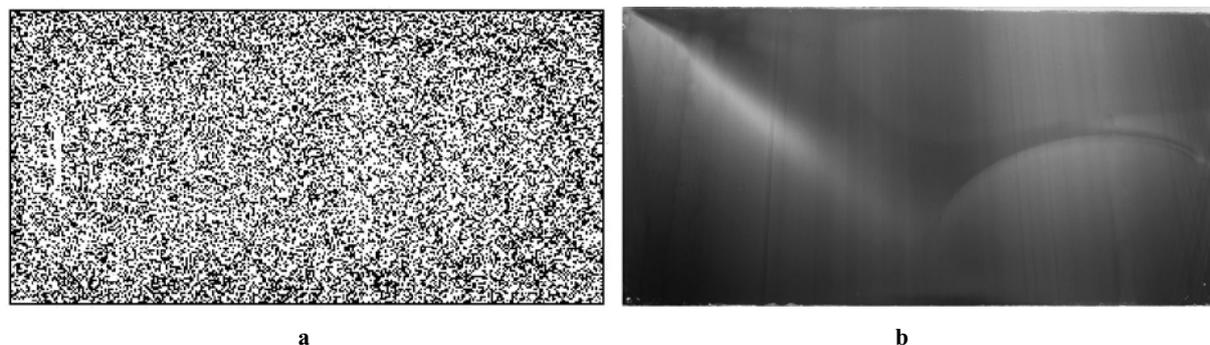


Figure 5 : Section de Poincaré (a) et expérience (b) pour le protocole A avec $T = 4$ s.

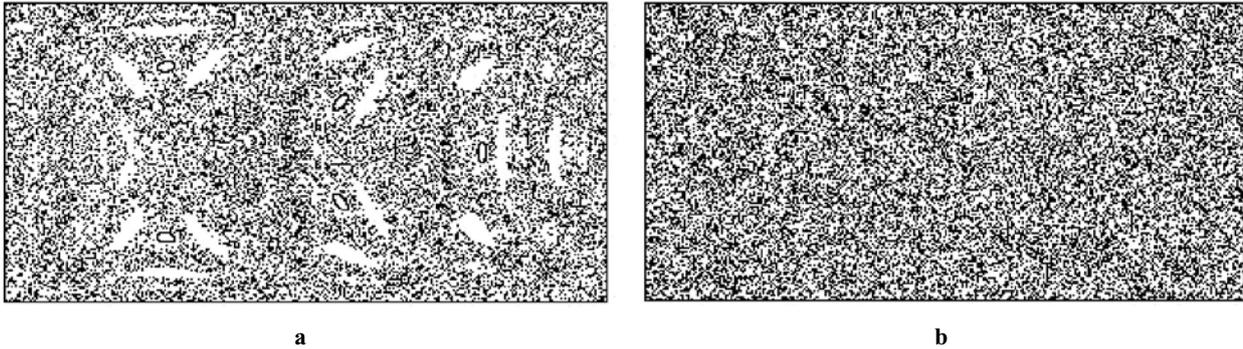


Figure 6 : Comparaison protocoles A / B dans le rectangle : (a) Protocole A, $T = 6$ s (b) Protocole B, $T = 6$ s.

optimale $T = 4$ s, mais non satisfaisante, dans le cas du protocole A dans la géométrie carrée.

Par comparaison avec les mêmes périodes (figure 5a), on constate que la géométrie rectangulaire n'a pas de zone régulière persistante de grande surface. S'il est vrai que l'on trouve des zones régulières pour certaines périodes (voir le cas $T = 6$ s, figure 6a), elles sont vraiment de faibles dimensions et nous ne les avons pas retrouvées dans l'expérience, vraisemblablement gommées par diffusion du colorant. Par contre, il existe toujours une zone régulière au centre de la cavité pour les très grandes périodes, ce que confirme le taux de remplissage (figure 7a). Il existe donc également une période optimale ($T = 4$ s). L'expérience confirme la supériorité du mélange dans le rectangle (figure 5b) par rapport au cas du carré (figure 4c).

● IV.3 COMPARAISON PROTOCOLE A / PROTOCOLE B

Si l'on compare les sections de Poincaré issues des protocoles A et B (fig. 6a et 6b), on constate que pour des périodes identiques, le protocole B est meilleur que le protocole A : tout d'abord les zones chaotiques recouvrent absolument toute la surface de la cavité, alors que dans le cas

du protocole A, il existe le plus souvent encore quelques zones régulières. De plus, le chaos y est global pour une très grande plage de périodes T (taux de remplissage de l'ordre de 100 %, voir figure 7a), alors que l'on avait vu que pour le protocole A, seule une période bien définie ($T = 4$ s) donnait de bons résultats. Ainsi, pour le protocole B, le choix de périodes élevées n'est pas très gênant, mais n'est pas très judicieux car il augmente d'autant la durée de l'expérience.

Concernant les exposants de Lyapunov (figure 7b), on constate que ceux issus du protocole B sont toujours supérieurs à ceux issus du protocole A, donc que le chaos est plus efficace en termes d'étirement dans le protocole B que dans le A. Ceci confirme bien les observations faites précédemment sur les sections de Poincaré.

Enfin, le protocole B est plus intéressant car il minimise la quantité de fluide nécessaire au mélange. En effet, le volume de fluide dans le dispositif est :

$$V_{total} = V_{chambre} + V_{tuyaux} + V_{seringues} \quad (4)$$

Dans les deux cas, $V_{chambre}$ est fixé et V_{tuyaux} peut être rendu aussi petit que possible. Pour le protocole B, $V_{seringues} = 0$. En revanche, pour le protocole A, $V_{seringues} = 2 \times qT/4$ (à la

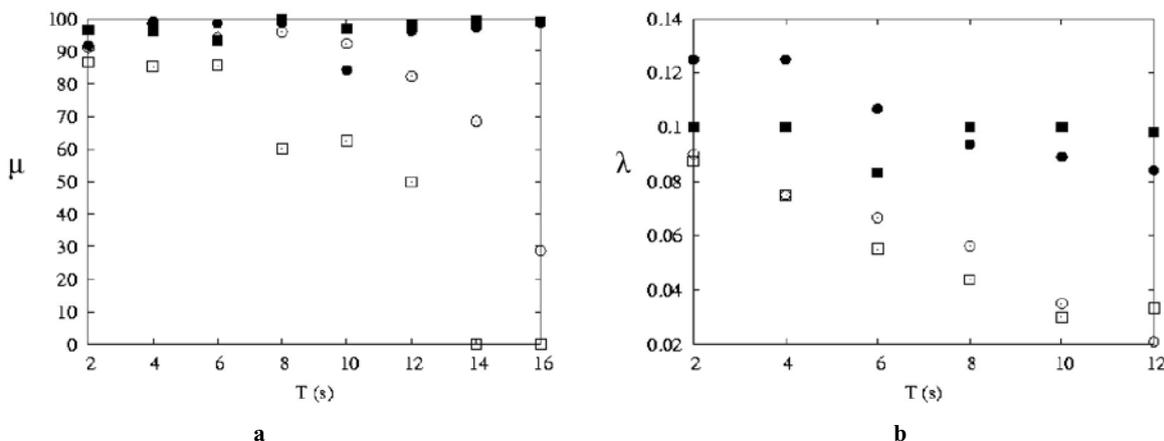


Figure 7 : (a) Taux de remplissage μ en fonction de la période. (b) Exposant de Lyapunov λ en fonction de la période.

Les symboles pleins correspondent au protocole B ; les carrés représentent la géométrie carrée. On a donc : (\square) carré + protocole A, (\blacksquare) carré + protocole B, (\circ) rectangle + protocole A, (\bullet) rectangle + protocole B.

fin d'une phase, deux seringues sont pleines et deux sont vides), ce qui implique un volume additionnel non négligeable, proportionnel à la période : par exemple, le volume total aura doublé pour $T = 10$ s. Cela signifie que la réaction d'hybridation, dont la vitesse est proportionnelle à la concentration en cibles, se fera nettement moins facilement dans un dispositif à seringues que dans notre système à pompes. Ce problème est identique dans le dispositif de McQuain et al. [13], qui utilise deux seringues dans un dispositif à deux phases de durée $T/2$.

En poursuivant cette réflexion sur le volume total, 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

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

égal au volume de fluide déplacé pendant une période sur le volume de la chambre, est gardé constant. Ainsi, pour un volume de chambre fixé, le protocole B conduit toujours à un volume total moins important.

V ■ CONCLUSION

Nous avons comparé dans cet article deux protocoles périodiques susceptibles d'engendrer de l'advection chaotique, afin d'optimiser la phase de mélange dans l'hybridation des puces à ADN. Grâce à une modélisation très simple du champ des vitesses (écoulement de type Hele-Shaw), nous avons pu aisément faire varier la géométrie de la chambre d'hybridation dans laquelle la puce est placée. Les résultats montrent que le mélange est optimal pour notre protocole à pompes dans une géométrie rectangulaire : le chaos est global pour une très large gamme de valeurs de la période, avec de très forts exposants de Lyapunov. De plus, le volume total est bien plus faible dans le système à pompes, ce qui favorise la réaction d'hybridation, dont la cinétique est proportionnelle à la concentration en cibles. Enfin, il est clair qu'un système fonctionnant avec des pompes est plus facilement intégrable sur un laboratoire sur puce.

VI ■ REMERCIEMENTS

Nous remercions Christian Nicot, Patrick Dutheil, Emmanuel Jondeau, Patrick Méjean et Jean-Michel Perrin pour leur aide et leurs remarques constructives.

VII ■ RÉFÉRENCES

- [1] NATURE GENETICS, 1. Supplement (2002) — 32
- [2] AREF H. (1984) — Stirring by chaotic advection. *J. Fluid. Mech.* **143** : 1-21
- [3] WIGGINS S. (1988) — Global Bifurcation and Chaos. Springer Verlag.
- [4] OTTINO J.-M. (1989) — The Kinetics of Mixing : Stretching, Chaos and Transport. Cambridge University Press, New-York.
- [5] RAYNAL F., PLAZA F., BEUF A., CARRIERE P., SOUTEYRAND E., MARTIN J.-R., CLOAREC J.-P., CABRERA M. (2004) — Micromélangeur à advection chaotique pour l'hybridation des puces à ADN, Congrès SHF Microfluidique, Toulouse.
- [6] RAYNAL F., PLAZA F., BEUF A., CARRIERE P., SOUTEYRAND E., MARTIN J.-R., CLOAREC J.-P., CABRERA M. (2006) — Micromélangeur à advection chaotique pour l'hybridation des puces à ADN. *La Houille Blanche.* **2** : 78-82
- [7] RAYNAL F., PLAZA F., BEUF A., CARRIERE P., SOUTEYRAND E., MARTIN J.-R., CLOAREC J.-P., CABRERA M. (2004) — Study of a chaotic mixing system for DNA chip hybridization chambers. *Phys. Fluids.* **16(9)**, L63-L : 66
- [8] RAYNAL F., BEUF A., PLAZA F., SCOTT J., CARRIERE P., CABRERA M., CLOAREC J.-P., SOUTEYRAND E. (2007) — Towards better DNA chip hybridization using chaotic advection. *Phys. Fluids.* **19(1)** : 017112
- [9] JONES J.W., AREF H. (1988) — Chaotic advection in Pulsed source-sink systems. *Phys. Fluids.* **31(3)** : 469-485
- [10] STREMLER M.A., HASELTON F.R., AREF H. (2004) — Designing for chaos : application of chaotic advection at the microscale. *Trans. R. Soc. Lond. A.* **362** : 1019-1036
- [11] STREMLER M.A., COLA B.A. (2006) — A maximum entropy approach to optimal mixing in a pulsed source-sink flow. *Phys. Fluids.* **18(1)**
- [12] COLA B.A., SCHAFFER D.K., STREMLER M.A. (2006) — A pulsed source-sink fluid mixing device. *J. Microelectromech. Sys.* **15(1)** : 256-266
- [13] MCQUAIN M.K., SEALE K., PEEK J., FISHER T.S., LEVY S., STREMLER M.A., HASELTON F.R. (2004) — Chaotic mixer improves microarray hybridization. *Anal. Biochem.* **325** : 215-226