



**HAL**  
open science

## Mélange et hybridation dans les biopuces

Ernest Galbrun, Alain Glière, Jean-Luc Achard

► **To cite this version:**

Ernest Galbrun, Alain Glière, Jean-Luc Achard. Mélange et hybridation dans les biopuces. 17e Congrès Français de Mécanique (CFM 2005), Aug 2005, Troyes, France. hal-00199295

**HAL Id: hal-00199295**

**<https://hal.science/hal-00199295>**

Submitted on 12 Mar 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

# Mélange et hybridation dans les biopuces

Ernest GALBRUN, Alain GLIERE

LETI – CEA Recherche Technologique  
17, rue des Martyrs 38059 Grenoble

Jean-Luc ACHARD

Laboratoire des Ecoulements Géophysiques et Industriels – INPG  
BP53 38041 Grenoble

## Résumé :

*Les systèmes microfluidiques pour les biopuces doivent pouvoir traiter des quantités de matière toujours plus petite, en un minimum de temps. Afin d'optimiser la cinétique d'hybridation des oligonucléotides cibles contenus dans les échantillons analysés, il est en particulier nécessaire d'utiliser des techniques de mélange à grande échelle (brassage) in situ. A partir de la modélisation mathématique complète d'un système microfluidique générique, une analyse dimensionnelle a été établie permettant de dégager les temps caractéristiques des différents phénomènes physiques en jeu. Cette approche, complétée par la résolution numérique du modèle mathématique, a permis de mettre en évidence les paramètres critiques sous-tendant la mise en place de tels systèmes.*

## Abstract :

*The purpose of modern microfluidics systems used in DNA biochips is to be able to process very small samples. In order to maximize the hybridization kinetics of DNA targets, the use of in situ macroscale mixing methods may be necessary. A complete mathematical modelling of a typical biochip design has been derived, together with a dimensional analysis, displaying the different characteristic times corresponding to each physical phenomenon. This approach, which has been completed with a numerical resolution of the problem, emphasises on the various critical parameters.*

## Mots clefs:

**Biopuces à ADN ; mélange ; hybridation ; modélisation.**

## 1 Introduction

Les biopuces sont des dispositifs miniaturisés permettant l'analyse en parallèle d'échantillons contenant des molécules issues du vivant, le plus souvent des chaînes peptidiques ou des chaînes d'acides nucléiques. Leur principe est de fonctionnaliser une surface avec des produits réagissant très spécifiquement avec les produits susceptibles d'être présents dans l'échantillon [1]. Les produits que l'on immobilise sur la biopuce sont appelés sondes et les produits à analyser sont les cibles. Sont exclusivement considérées ici les biopuces à ADN, pour lesquels l'objectif est de détecter une chaîne particulière d'acide nucléique en utilisant des brins d'ADN dont la séquence est complémentaire. Les brins cibles forment avec leur complémentaire une double hélice très stable. Cette réaction d'assemblage d'un brin avec son complémentaire est appelée hybridation. La cinétique d'hybridation est aujourd'hui l'étape limitante dans l'analyse hautement parallélisée des échantillons. Cette étude vise à identifier les paramètres cruciaux qui doivent être pris en compte lors de la réalisation d'une biopuce, et en particulier la méthode de mélange utilisée lors de l'étape d'hybridation à l'échelle de toute la biopuce, que nous appellerons brassage.

Considérons une biopuce quelconque, dont les caractéristiques typiques du seul point de vue de la cinétique, vont être recensées. Il sera ainsi possible d'établir un modèle décrivant le transport des oligonucléotides cibles (dits simplement « cibles » par la suite) et leur hybridation ; les différentes équations de ce modèle seront ensuite adimensionnalisées en choisissant judicieusement pour chaque variable les échelles pertinentes ; chaque fois que cela sera possible les nombres adimensionnels résultant de ce processus, seront retranscrits systématiquement en terme de rapports d'échelles de temps. Ainsi tous les phénomènes physiques mis en jeu se verront identifiés et dotés d'une échelle de temps spécifique que l'on évaluera numériquement pour les applications typiques qui nous intéressent. Une simulation numérique montrera l'importance vis à vis de hybridation du rôle joué par le brassage. Cette importance est traduite à

travers la notion de volume utile d'échantillon associée à une zone fonctionnalisée particulière ; ce volume se calcule à partir des seules équations de l'hydrodynamique.

## 2 Présentation du modèle de biopuce

Le modèle qui va être établi plus loin décrit le fonctionnement d'une biopuce classique, qui consiste en une veine liquide carrée d'épaisseur  $e$  très petite par rapport au côté de la biopuce  $L$  ; une des faces de la biopuce est recouverte de zones fonctionnalisées par les brins d'ADN sonde. On attend en général de la réaction d'hybridation qu'elle soit très spécifique, et on admettra donc que chaque zone fonctionnalisée ne permet l'hybridation qu'avec un seul type de cibles présent en solution : la cible dont la séquence est complémentaire de la sonde. Ainsi, en négligeant les réactions d'adsorption non spécifique, sur la surface de la biopuce une seule zone fonctionnalisée sera considérée comme active (voir Figure 1). Cette zone de diamètre  $d$  du même ordre de grandeur que  $e$  (dans un souci de simplicité) est un disque caractérisé par sa position  $(x_s, y_s)$  sur la surface fonctionnalisée, qui sera appelé plot par la suite.

A l'instant initial, on introduit dans tout le volume de la biopuce l'échantillon à analyser contenant les brins complémentaires à une concentration  $c_0$ . Ensuite, l'échantillon est généralement mis en mouvement par un système de brassage. Dans la pratique, le débit recherché peut être soit constant, soit alternatif, avec une orientation changeant éventuellement de sens (balayage en va-et-vient). La Figure 1 montre un exemple où le flux est constant et bouclé. Les avantages respectifs des différents systèmes envisageables de brassage ne seront pas discutés dans cet article. Mentionnons cependant l'utilisation possible de micropompes à membranes [2], de dispositifs d'agitation électrohydrodynamique [3] ou magnétohydrodynamique [4]. On notera  $\Delta P$  l'écart de pression imposé aux bornes de la biopuce et  $P_i$  la pression à l'entrée de celle-ci.

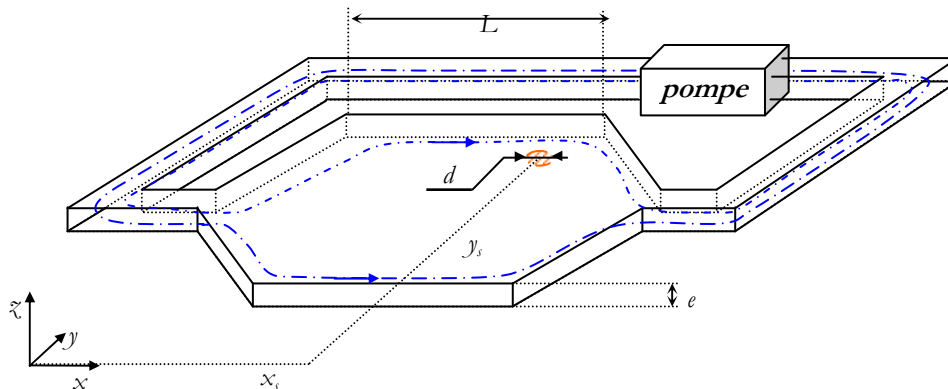


Figure 1 : Configuration géométrique d'une biopuce typique et d'un exemple de système microfluidique d'alimentation en ADN cible.

## 3 Etablissement du modèle mathématique

Le phénomène d'hybridation est subordonné à plusieurs phénomènes physiques qui se manifestent en amont. Le champ de vitesse du liquide porteur en tout point de la biopuce est tout d'abord accessible à l'aide de l'équation de Navier-Stokes. Ce champ de vitesse est ensuite utilisé dans l'équation de convection-diffusion pour calculer la variation spatio-temporelle du champ de concentration des cibles ; le couplage entre ces deux champs est donc faible. En retour, les conditions aux limites de l'équation de convection-diffusion sur le plot découlent des équations régissant la réaction d'hybridation. Il existe donc un couplage fort entre les équations permettant d'obtenir le taux d'hybridation et l'équation de convection-diffusion donnant la concentration de cibles dans le cœur de la biopuce. Présentons l'ensemble des équations du modèle sous forme adimensionnelle, en adoptant comme échelle de temps l'échelle de temps la plus longue du système. Ce temps est, comme nous le vérifierons dans la section 4, le temps caractéristique de la réaction d'hybridation. L'échelle de temps du brassage, notée  $T$ , dépend évidemment du type de balayage utilisé. Dans la pratique, un balayage typique de type alternatif a une période de l'ordre de quelques minutes. Pour fixer les idées on supposera que  $T$  est de l'ordre de 100 secondes. Il sera dans tous les cas supposé

beaucoup plus faible que le temps de réaction, si bien que les équations de Navier-Stokes seront présentées directement en régime permanent :

$$(\delta^2 \frac{\partial^2 u_x^*}{\partial x^{*2}} + \delta^2 \frac{\partial^2 u_x^*}{\partial y^{*2}} + \frac{\partial^2 u_x^*}{\partial z^{*2}}) - \frac{\partial P^*}{\partial x^*} = \delta(R_e u_x^* \frac{\partial u_x^*}{\partial x^*} + R_e u_y^* \frac{\partial u_x^*}{\partial y^*}) + R_e u_z^* \frac{\partial u_x^*}{\partial z^*} \quad (1)$$

$$(\delta^2 \frac{\partial^2 u_y^*}{\partial x^{*2}} + \delta^2 \frac{\partial^2 u_y^*}{\partial y^{*2}} + \frac{\partial^2 u_y^*}{\partial z^{*2}}) - \frac{\partial P^*}{\partial y^*} = \delta(R_e u_x^* \frac{\partial u_y^*}{\partial x^*} + R_e u_y^* \frac{\partial u_y^*}{\partial y^*}) + R_e u_z^* \frac{\partial u_y^*}{\partial z^*} \quad (2)$$

$$\delta(\delta^2 \frac{\partial^2 u_z^*}{\partial x^{*2}} + \delta^2 \frac{\partial^2 u_z^*}{\partial y^{*2}} + \frac{\partial^2 u_z^*}{\partial z^{*2}}) - \frac{\partial P^*}{\partial z^*} = \delta^2(R_e u_x^* \frac{\partial u_z^*}{\partial x^*} + R_e u_y^* \frac{\partial u_z^*}{\partial y^*}) + \delta R_e u_z^* \frac{\partial u_z^*}{\partial z^*} \quad (3)$$

où  $\eta$  est la viscosité du liquide porteur,  $\mathbf{u}$  est la vitesse et  $\rho$  la masse volumique ; les variables adimensionnalisées sont définies par  $x^* = x/L$ ,  $y^* = y/L$ ,  $z^* = z/e$ ,  $P^* = P - P_i/\Delta P$  et  $\mathbf{u}^* = \mathbf{u}/u_0$  avec  $u_0 = e^2 \Delta P / \eta L$ . L'épaisseur adimensionnelle est donnée par  $\delta = e/L$  et le nombre de Reynolds, généralement petit, peut être défini comme  $R_e = t_{vis}/t_{conv}$  avec  $t_{vis} = \rho e^2 / \eta$  et  $t_{conv} = e/u_0$ .

A l'ordre  $O(\delta)$  et  $O(P_e)$ , l'équation (3) montre que la pression est uniforme suivant l'épaisseur en tout point. A cet ordre, les équations (1) et (2) montrent alors que  $u_x^*$  et  $u_y^*$  adoptent un profil parabolique.

Le champ de vitesse déduit de ces équations est introduit dans l'équation adimensionnée de transport des cibles :

$$\kappa_{puce} \frac{\partial c^*}{\partial t^*} + u_x^* \frac{\partial c^*}{\partial x^*} + u_y^* \frac{\partial c^*}{\partial y^*} + u_z^* \frac{\partial c^*}{\partial z^*} = \frac{1}{P_e} \left( \frac{\partial^2 c^*}{\partial x^{*2}} + \frac{\partial^2 c^*}{\partial y^{*2}} + \frac{\partial^2 c^*}{\partial z^{*2}} \right) \quad (4)$$

Dans cette équation,  $c$  est la concentration en volume des cibles,  $c_0$  est la concentration initiale de cibles, et  $D$  est le coefficient de diffusion des cibles. Les variables adimensionnelles utilisées sont  $c^* = c/c_0$ ,  $y^* = y/e$ ,  $x^* = x/e$ ,  $z^* = z/e$  et  $t^* = k_a c_0 t$ . Le nombre de Péclet peut être défini comme  $P_e = t_{diff}/t_{conv}$  avec  $t_{diff} = e^2/D$ . Un nouveau nombre a été introduit, défini par  $\kappa_{puce} = t_{conv}/t_{reac}$ .

Dans les configurations usuelles, le nombre de Péclet est très grand ( $P_e > 10^3$ ), ce qui signifie que les termes diffusifs n'interviennent pas dans le transport des cibles mesuré avec l'échelle spatiale  $e$ . Il est alors nécessaire de considérer séparément les phénomènes convecto-diffusifs à proximité immédiate du plot, où l'adimensionnalisation précédente est inadaptée puisqu'il est clair que la diffusion y joue un rôle essentiel. Pour cela, on introduit une nouvelle coordonnée  $z^\circ$  dilatée, permettant de scruter les faibles valeurs de  $z^*$  :  $z^\circ = P_e^{1/3} z^* = z/z_{cl}$  avec  $z_{cl} = P_e^{-1/3} e$  l'épaisseur de la couche limite de diffusion. L'équation (4) devient alors, dans cette couche limite :

$$\kappa_{cl} \frac{\partial c^*}{\partial t^*} - z^\circ \left( \frac{\partial c^*}{\partial x^*} + \frac{\partial c^*}{\partial y^*} \right) = \frac{\partial^2 c^*}{\partial z^{\circ 2}} \quad (5)$$

Dans cette équation,  $\kappa_{cl} = t_{cd}/t_{reac}$  avec  $t_{cd} = e^2/z_{cl} u_0$  le temps caractéristique des phénomènes convecto-diffusifs dans la couche limite. Ce nombre adimensionnel est d'autant plus petit que la vitesse est grande. Il est ainsi nécessaire d'avoir une vitesse dans la biopuce telle que  $\kappa_{cl}$  soit petit afin qu'il n'y ait pas d'inertie dans le transport des cibles.

Les équations (4) et (5) ont pour conditions aux limite une condition de flux nul sur les parois en dehors du plot. Sur le plot, deux conditions aux limites couplées sont nécessaires ; une traduisant un bilan numérique entre sondes et cibles et une autre exprimant la nature de la réaction entre ces molécules. La réaction est supposée avoir une cinétique du premier ordre :  $c + S \xrightleftharpoons[k_d]{k_a} \Gamma$ .

$$-D_a \frac{\partial \theta}{\partial t^*} = \frac{\partial c^*}{\partial z^*} \quad (6)$$

$$\frac{\partial \theta}{\partial t^*} = c^* (1 - \theta) - \frac{k_d}{k_a c_0} \theta \quad (7)$$

Dans ces équations,  $\Gamma^\infty$  est la concentration surfacique de sonde,  $\Gamma$  est la concentration de sondes hybridées,  $S$  est la concentration de sondes non hybridées (on a donc  $S = \Gamma^\infty - \Gamma$ ), et  $k_a$  et  $k_d$  sont les constantes d'association et de dissociation relatifs à la réaction d'hybridation.  $\theta = \Gamma / \Gamma^\infty$  est la fraction de sondes hybridées. Le nombre de Damköhler est défini par  $D_a = t_{diff,cl} / t_{réac}$  avec  $t_{diff,cl} = \Gamma^\infty z_{cl} / c_0 D$ . L'utilisation du modèle de réaction ci-dessus est justifié selon Axelrod et Wang [5] car la densité de sondes sur le plot que l'on considère ici est suffisamment grande pour que les phénomènes d'adsorption non spécifiques ne jouent pas un rôle significatif. On peut noter cependant que Chan *et col.* [6] ont montré qu'il peut être bénéfique pour accélérer l'hybridation d'échapper à de telles conditions.

#### 4 Recensement des différentes échelles de temps caractéristiques

Toutes les échelles de temps obtenues lors de l'écriture du modèle adimensionnalisé sont comparées au temps le plus pertinent d'évolution du système, qui est le temps de réaction  $t_{réac}$  (voir Figure 2)

Cette simple analyse dimensionnelle permet de saisir la hiérarchie des phénomènes physiques participant à l'hybridation. La réaction d'hybridation est nettement plus lente que tous les autres phénomènes auxquels elle est subordonnée. Cela signifie que, dans les configurations de brassage habituellement utilisées, le phénomène limitant est la réaction, l'apport de réactif par convection et diffusion se faisant quasi-instantanément du point de vue de l'hybridation.

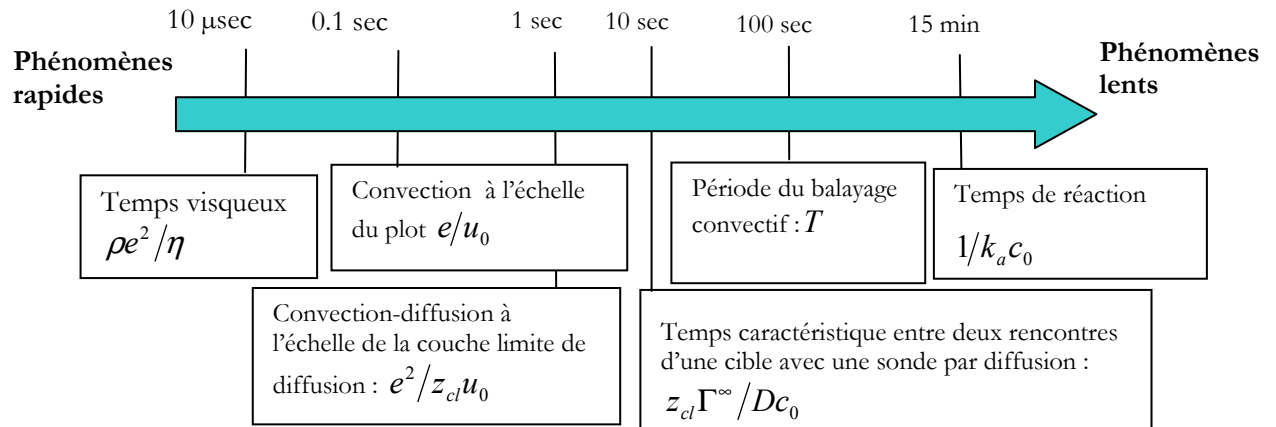


Figure 2 : Les phénomènes physiques en jeu et leurs différentes échelles de temps. Les valeurs numériques utilisées sont :  $c_0 = 10^{-7} \text{ mol m}^{-3}$  ;  $k_a = 10^5 \text{ sec}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ m}^3$  ;  $\Gamma^\infty = 10^{-9} \text{ mol m}^{-2}$  ;  $L = 1 \text{ cm}$  ;  $z_{cl} = 10^{-5} \text{ m}$  ;

$$u_0 = 10^{-4} \text{ msec}^{-1} ; D = 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ sec}^{-1} ; \eta = 10^{-3} \text{ Pa sec} .$$

#### 5 Mise en œuvre d'un système de brassage.

Sans résoudre le modèle défini dans la section 3, on peut faire ressortir les contraintes à respecter lors de la mise en œuvre d'un système de brassage pour réduire le temps d'analyse d'un échantillon. En effet, le transport de cibles doit satisfaire deux objectifs :

- Il faut transporter les cibles le plus rapidement possible à proximité du plot. Cette fonction est assurée par la convection qu'il est facile de rendre plus efficace que la diffusion. En d'autres termes, il faut rendre le nombre de Péclet grand, en augmentant la vitesse de l'écoulement. L'objectif doit être recherché

dans le voisinage du plot d'ordre  $e$  ; on l'atteint du même coup, et de façon plus certaine, à l'échelle  $L$  de toute la puce où le Péclet pertinent doit être divisé par  $\delta = e/L$ . Seule la diffusion permet toutefois aux cibles de se déplacer suivant  $O_z$  pour *in fine* s'hybrider sur le plot. Ce transport terminal s'effectue sur la fine épaisseur d'une couche limite de diffusion au dessus du plot. Il convient ici de veiller à ce que la vitesse de l'écoulement soit suffisamment élevée pour qu'il n'y ait pas d'inertie dans le transport des cibles vis à vis du temps de réaction, que ce soit en traversant la couche limite où jouent à la fois convection et diffusion ( $\kappa_c \ll 1$ ) ou à l'arrivée sur le plot lui-même où seule joue la diffusion ( $D_a \ll 1$ ).

- Il faut transporter le maximum de cibles contenues dans l'échantillon à proximité du plot. Constatons tout d'abord que l'intensité de la réaction, soit le nombre de sondes hybridées par unité de temps, va croître avec le nombre de cibles transportées à proximité du plot jusqu'à concurrence de la saturation des brins sondes. Il est naturel d'attendre par conséquent du système de brassage qu'il maximise ce nombre de cibles. Plus précisément, considérons un nouveau nombre adimensionnel  $\alpha$  appelé nombre d'accessibilité. Il est défini comme le rapport entre le nombre de brins sondes disponibles et le nombre de brins cibles susceptibles de réagir :  $\alpha = N_{sondes} / N_{cibles} = \Gamma^\infty S / c_0 V_{utile}$ . Pour augmenter l'intensité de la réaction il faut réduire le nombre d'accessibilité et donc augmenter le volume utile, qui est le volume d'échantillon conduit à balayer la surface du plot, toutes choses étant égales par ailleurs. A cet égard, d'une part la densité de sonde est maintenue aussi grande que possible pour avoir une réaction rapide et d'autre part, la surface fonctionnalisée et la concentration de cibles dans l'échantillon sont généralement imposées par la technologie de fabrication et par les conditions d'expérimentation.

Une attention toute particulière doit donc être portée sur les relations entre brassage et le volume utile qui dépend *a priori* du type de brassage utilisé et de la position du plot concerné sur la biopuce. Observons tout d'abord que si aucun mouvement n'est mis en place dans la puce, le volume utile est le volume accessible autour du plot par la seule diffusion pendant un temps donné  $\Delta t$ . Dans le cas d'une puce de faible épaisseur (devant la distance caractéristique de diffusion), et dont la taille des plots est petite, ce volume est un cylindre de rayon égal à la distance de diffusion et vaut  $2\pi e D \Delta t$ . Inversement on peut imaginer des dispositifs de brassage complexes et même de mélange à plus petite échelle, permettant d'avoir un écoulement éventuellement chaotique sur l'échelle de temps considérée. Le volume utile résultera de l'intégrale des flux balayant le plot. Un dispositif de mélange à petite échelle est cependant difficile à mettre en œuvre étant donné l'espace restreint dans lequel la biopuce est fabriquée. Dans le cas simple décrit dans la Figure 1 où le débit peut être alternatif, il est facile de monter l'importance de la position du plot.

Une simulation numérique a été menée en utilisant le logiciel Femlab [7], qui résout l'équation de Navier-Stokes en 3D à partir de la géométrie décrite par la Figure 1, en considérant par exemple un système de balayage en va-et-vient. Pour un plot donné, considérons le volume utile correspondant à une impulsion pour un  $x$  croissant. Si l'on assimile le plot à un point, ce volume est simplement l'intégrale de la vitesse au dessus du plot pendant une demi période de balayage, et par conséquent directement proportionnel à la valeur de la vitesse au dessus du plot. Ainsi, certaines zones seront *a priori* mieux desservies que d'autres, comme le montre la Figure 3, qui correspond au calcul de la vitesse en fonction de la position sur la biopuce. On observe que les plots qui se situent sur les bords de la biopuce sont moins bien alimentés en cibles que les plots situés au centre, ce qui est susceptible d'entraîner une hybridation différente selon l'endroit considéré et donc des problèmes pour accéder à une information quantitative.

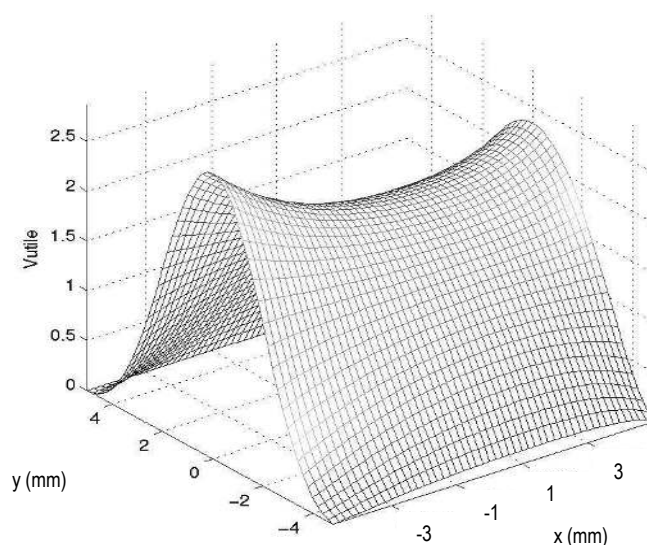


Figure 3 : Les zones centrales de la biopuce sont mieux alimentées, ce qui entraîne un volume utile plus grand pour les plots correspondants.

## 6 Conclusion

Les paramètres cruciaux entrant en jeu dans les différentes étapes de la cinétique d'hybridation des biopuces ont été mis en évidence. Cette approche permet d'avoir une stratégie efficace dans la mise au point des biopuces, notamment en ce qui concerne le dispositif de brassage utilisé pour gérer l'échantillon contenant les cibles. On a montré qu'il était primordial de connaître la valeur d'un ensemble de nombres adimensionnels, afin de s'assurer que l'hybridation se fait dans des conditions optimales. Ainsi il faut que le nombre de Péclet soit grand, afin que le transport par convection soit prépondérant vis à vis de la diffusion en dehors d'une fine couche limite au dessus du plot concerné, que le nombre Damköhler soit petit afin que la réaction ne soit pas limitée par la diffusion et que le nombre d'accessibilité soit également petit. Ce dernier paramètre peut être piloté par l'intermédiaire du volume utile attaché à un plot, qui varie grandement selon la nature du balayage utilisé et selon l'endroit de la biopuce où le plot se situe.

## Références

1. Brown, P. and D. Botstein, *Exploring the new world of the genome with DNA microarrays*. Nature genetics supplement, 1999. **21**(1): p. 33-37.
2. Lenigk, R., et al., *Plastic biochannel hybridization devices: a new concept for microfluidics DNA arrays*. Analytical biochemistry, 2002. **311**: p. 40-49.
3. Darabi, J., et al., *Design, fabrication, and testing of an electrohydrodynamic ion-drag micropump*. Journal of Microelectromechanical Systems, 2002. **11**(6): p. 684-690.
4. Bau, H.H., J. Zhong, and M. Yi, *A minute magneto hydro dynamic (MHD) mixer*. Sensors and Actuators B, 2001. **79**: p. 207-215.
5. Axelrod, D. and M.D. Wang, *Reduction-of-Dimensionality Kinetics at Reaction-Limited Cell Surface Receptors*. Biophysical Journal, 1994. **66**: p. 588-600.
6. Chan, V., et al., *Adsorption and Surface Diffusion of DNA Oligonucleotides at Liquid/Solid Interfaces*. Langmuir, 1997. **13**: p. 320-329.
7. Femlab. 2004, Comsol.