

Mélange chaotique dans un écoulement de Hele-Shaw ; application à l'hybridation des puces à ADN

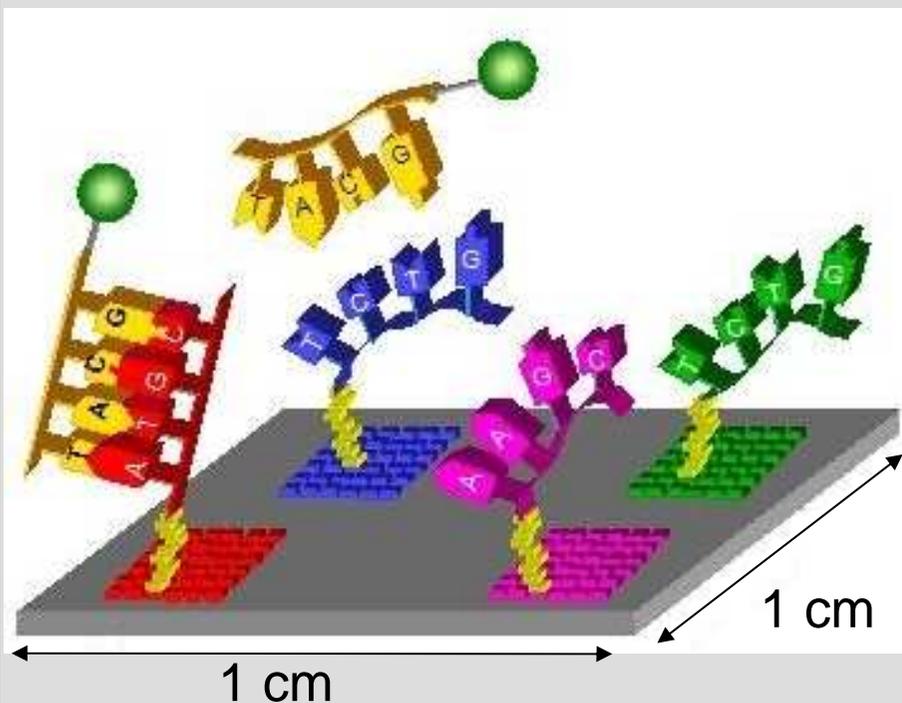
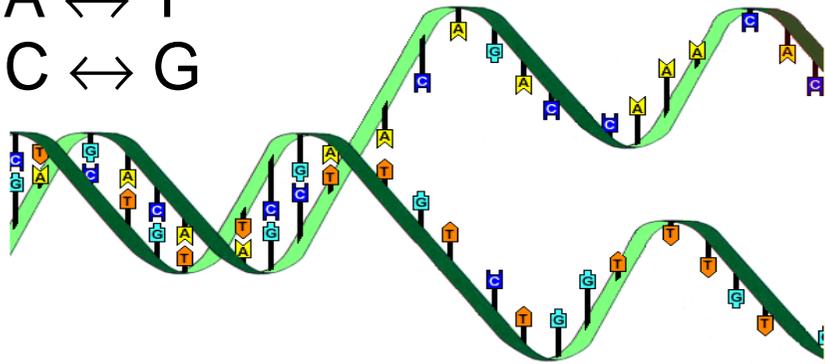
Florence Raynal, Aurélien Beuf, Frédéric Plaza et Philippe Carrière,
[LMFA](#), CNRS-Université de Lyon (École Centrale de Lyon)

Éliane Souteyrand, Vincent Dugas,
auparavant à [Rosatech](#) (Écully, École Centrale de Lyon),

Jean-Pierre Cloarec, Emmanuel Fradier et Michel Cabrera
[INL](#), CNRS-Université de Lyon (École Centrale de Lyon)

Qu'est-ce qu'une puce à A.D.N. ?

A ↔ T
C ↔ G



ADN : deux brins de séquences de nucléotides **complémentaires**.

Puce à ADN :

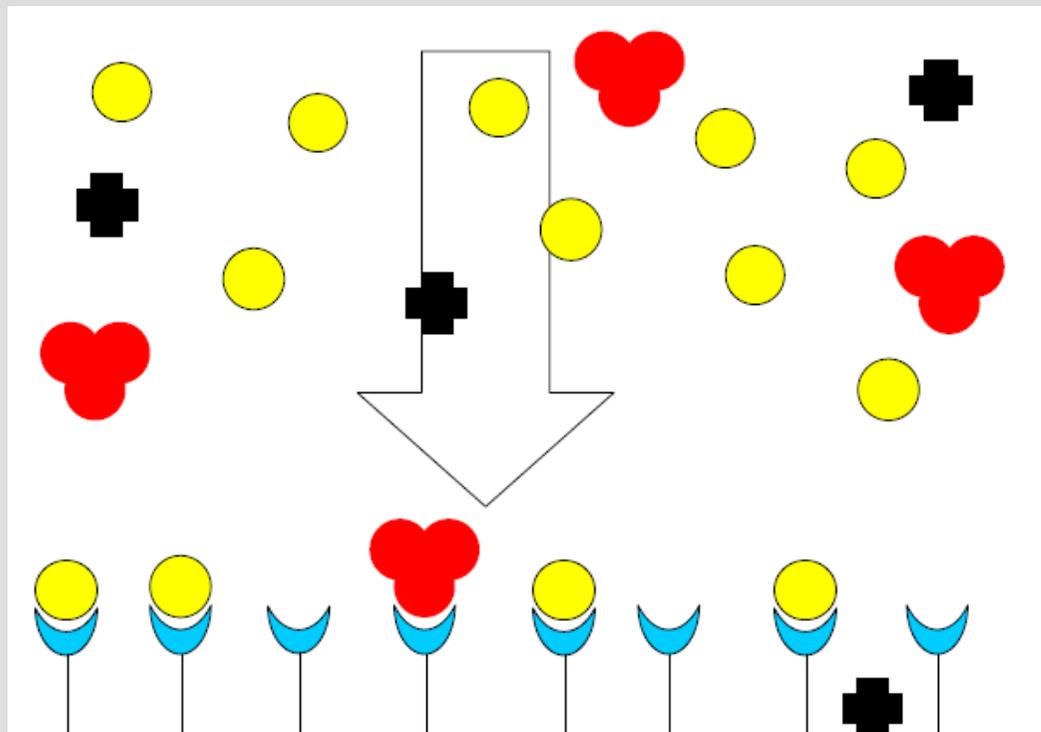
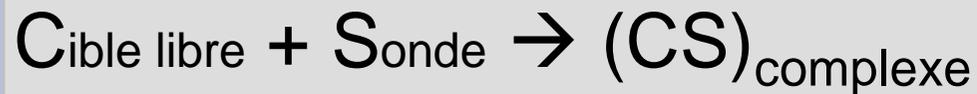
- support sur lequel sont fixés des **sondes** (monobrins d'A.D.N. de séquence connue et choisie).
- La solution à analyser contient des **cibles** (monobrins d'A.D.N. de séquence inconnue, à identifier), qui vont s'associer par **complémentarité** (si existence de brins complémentaires) aux monobrins de la puce (phénomène d'**hybridation**).

Hybridation statique (méthode coverslip)

- On mélange une goutte de solution à analyser dans une solution tampon, puis on l'étend sur la puce, on couvre, on met au bain marie, et on attend...
- Et on attend....
- Et on attend !!! (au moins une nuit !!!)

→ Pourquoi ???

Cas des réactions sur support de type sonde-cible



reconnaissance spécifique reconnaissance non spécifique adsorption non spécifique

- Lorsque la réaction se produit, il y a **appauvrissement en cibles au niveau des sondes**.
- On est limité par le transport par diffusion moléculaire des cibles vers les sondes
- Problème d'adsorption, ou reconnaissance non spécifique

Temps de déplacement des cibles par diffusion (hybridation statique ou méthode coverslip)

- Cibles en excès : il y a toujours une cible au-dessus d'une sonde.
 $D \sim 10^{-5} - 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ avec $h = 50 \text{ }\mu\text{m}$
 $\tau \sim h^2/D \sim 2,5 - 25 \text{ s} !$
 - Très long / cinétique
 - Problèmes de reconnaissance non spécifique
- Cibles en défaut : chaque cible doit visiter toute la puce pour trouver sa sonde complémentaire. $L = 1 \text{ cm}$
 $\tau \sim L^2/D \sim 10^5 \text{ s} - 10^6 \text{ s} \sim 27 - 270 \text{ h} !!$

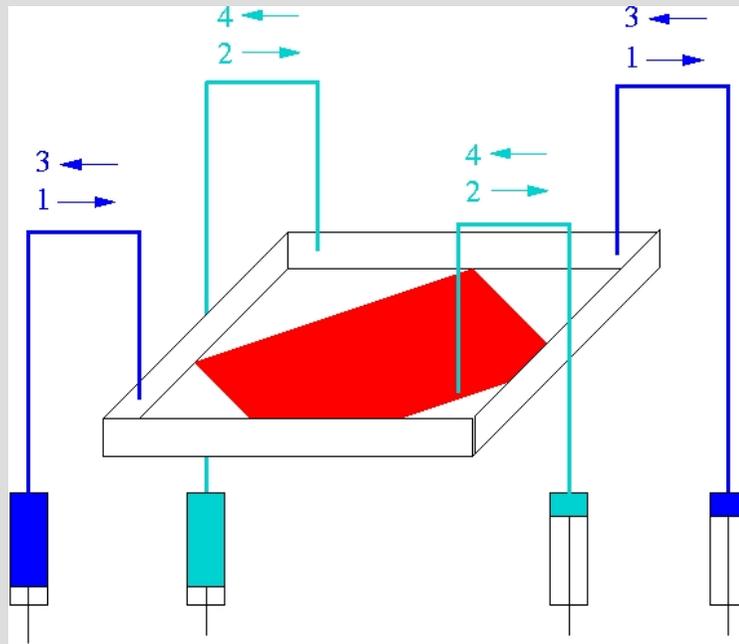
→ **Beaucoup trop long !!!**
La diffusion n'est pas assez efficace...

Nécessité d'un écoulement

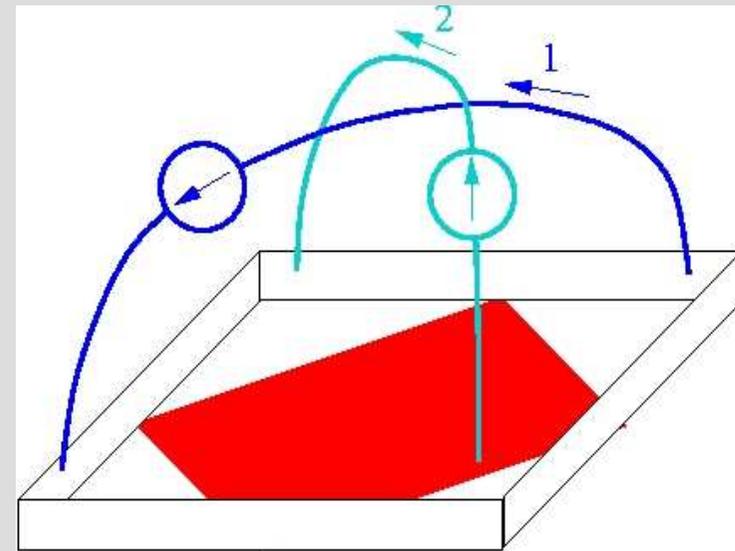
- La puce est placée dans une chambre de faible hauteur (dite cellule de Hele-Shaw).
- On crée un écoulement :
 - laminaire à cause des faibles dimensions de la chambre.
 - ⇒ Pour bien disperser les cibles, nécessité de mélanger par advection chaotique.
 - Ecoulement de Hele-Shaw, donc quasi 2D
 - ⇒ Pour avoir de l'advection chaotique, nécessité d'un écoulement périodique en temps.

Seringues ou pompes ?

Deux protocoles périodiques (période T):



4 phases de durée égale
($T/4$ chacune)



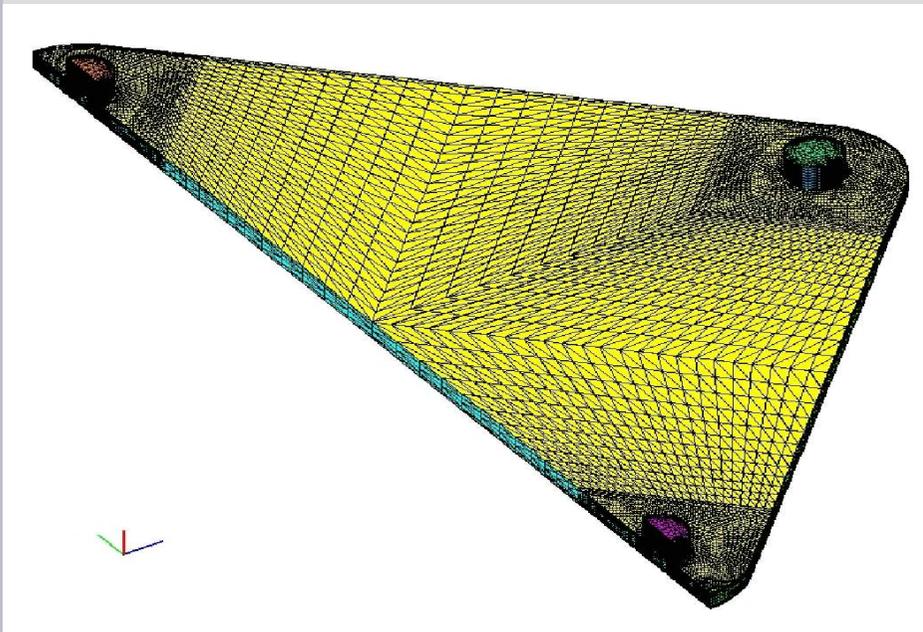
2 phases de durée égale
($T/2$ chacune)

Paramètre :

$$\alpha = \frac{qT}{L^2 h}$$

($\alpha=0.2 T$)

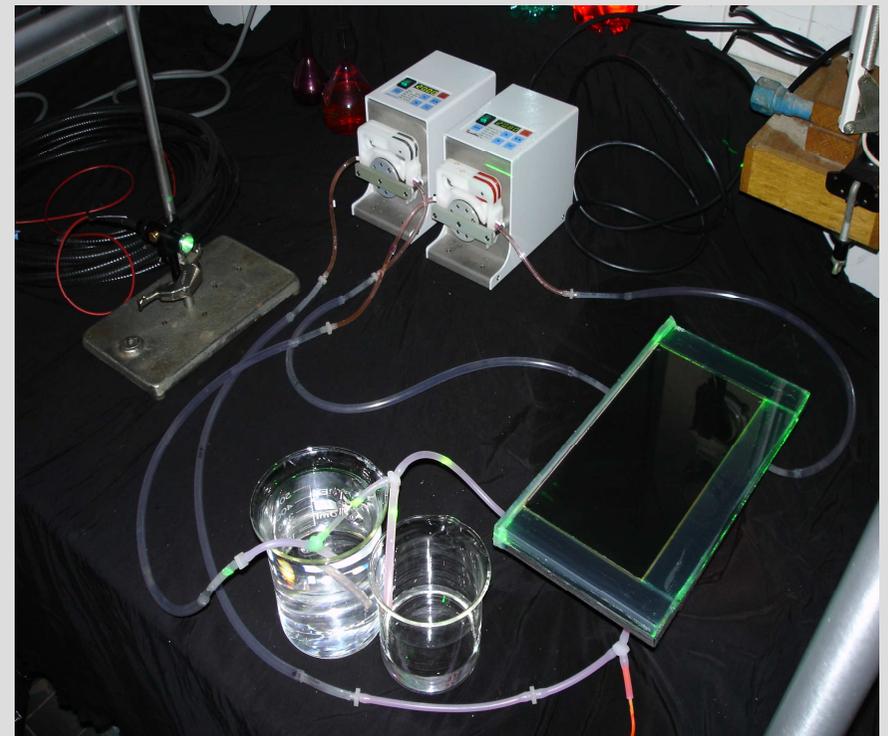
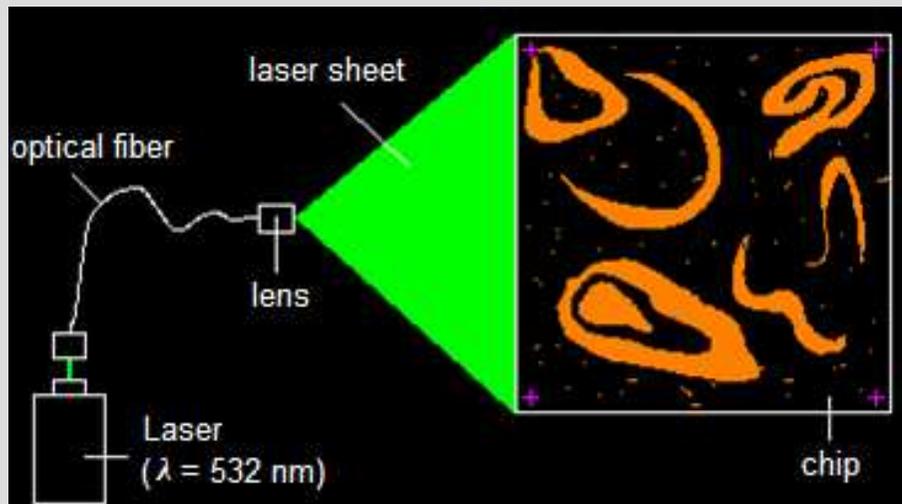
Simulations numériques 3D



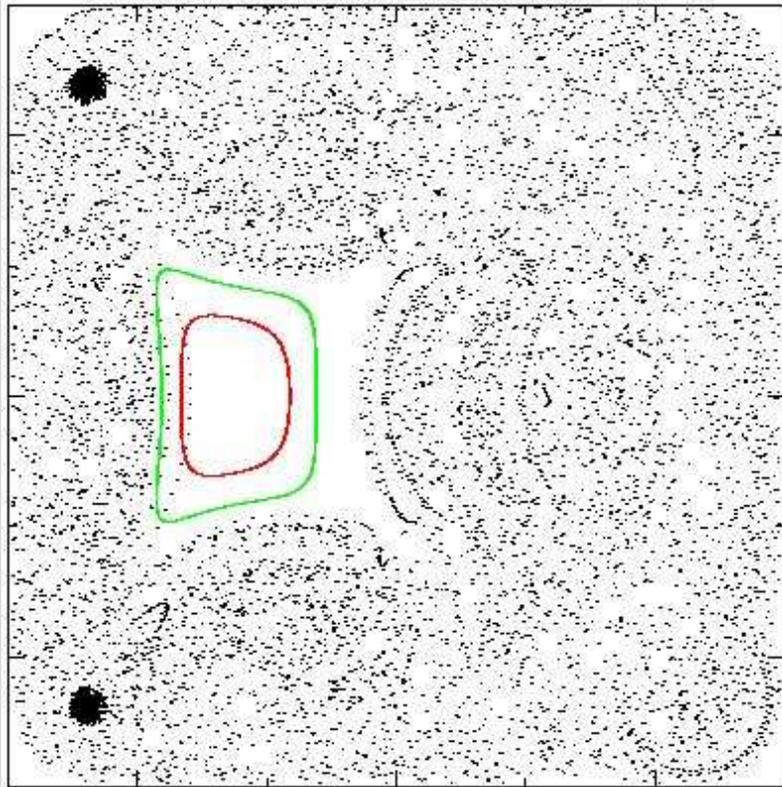
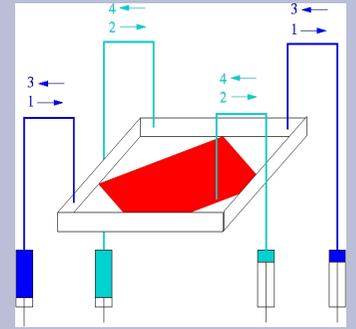
Grille pour la demi-chambre
(Ph. Carrière)

- Champ de vitesse:
 - Stationnaire par phase
 - Équation de Stokes
 - Éléments finis
- Trajectoires
 - Runge-Kutta d'ordre 4
- Sections de Poincaré
- Exposants de Lyapunov

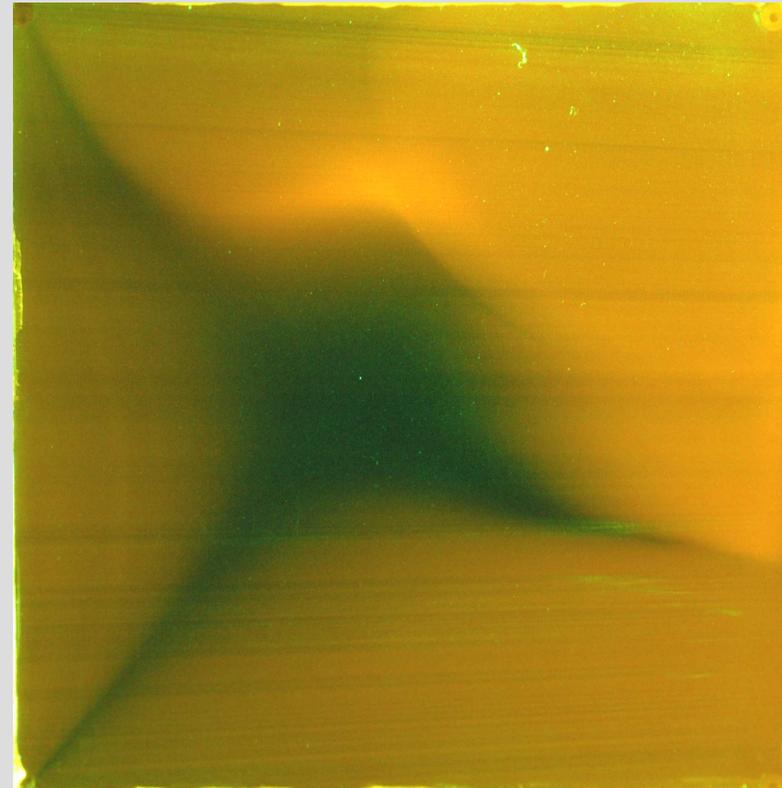
Expérience à l'échelle 10



Comparaison numérique/expérience



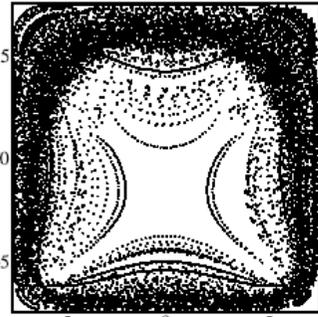
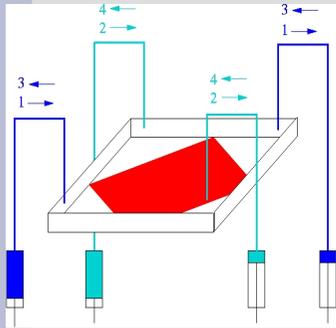
Section de Poincaré



Expérience

$T=4$ s

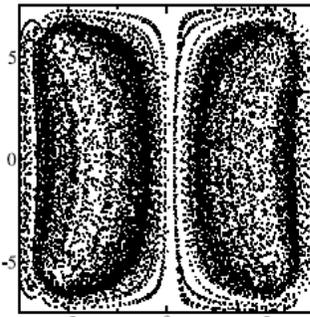
Sections de Poincaré



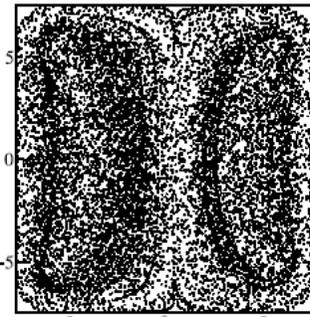
(a)



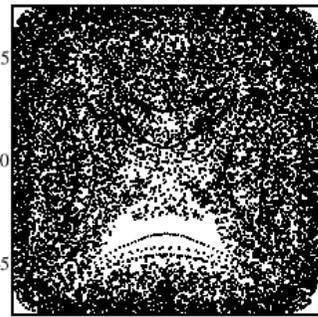
(b)



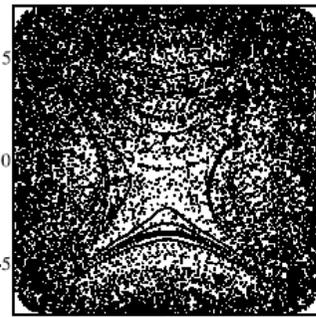
(a)



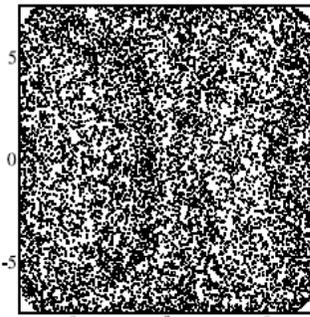
(b)



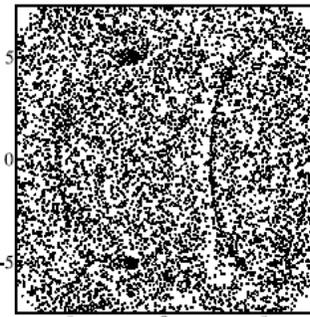
(c)



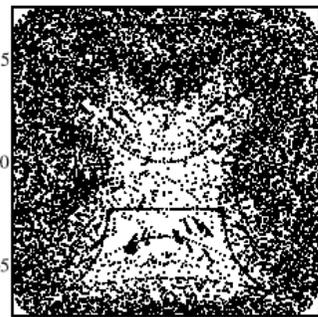
(d)



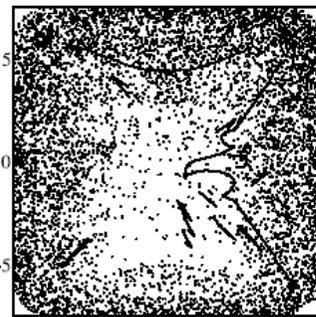
(c)



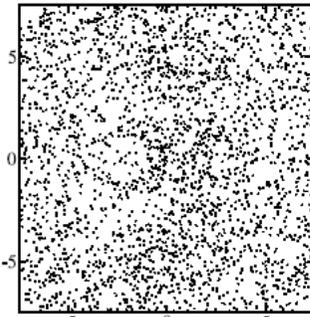
(d)



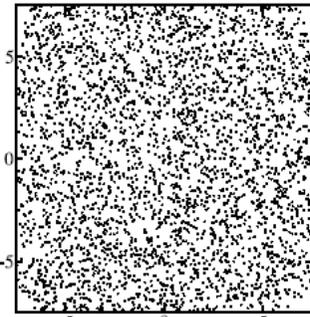
(e)



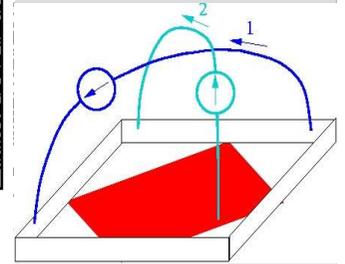
(f)



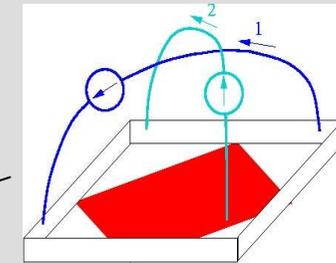
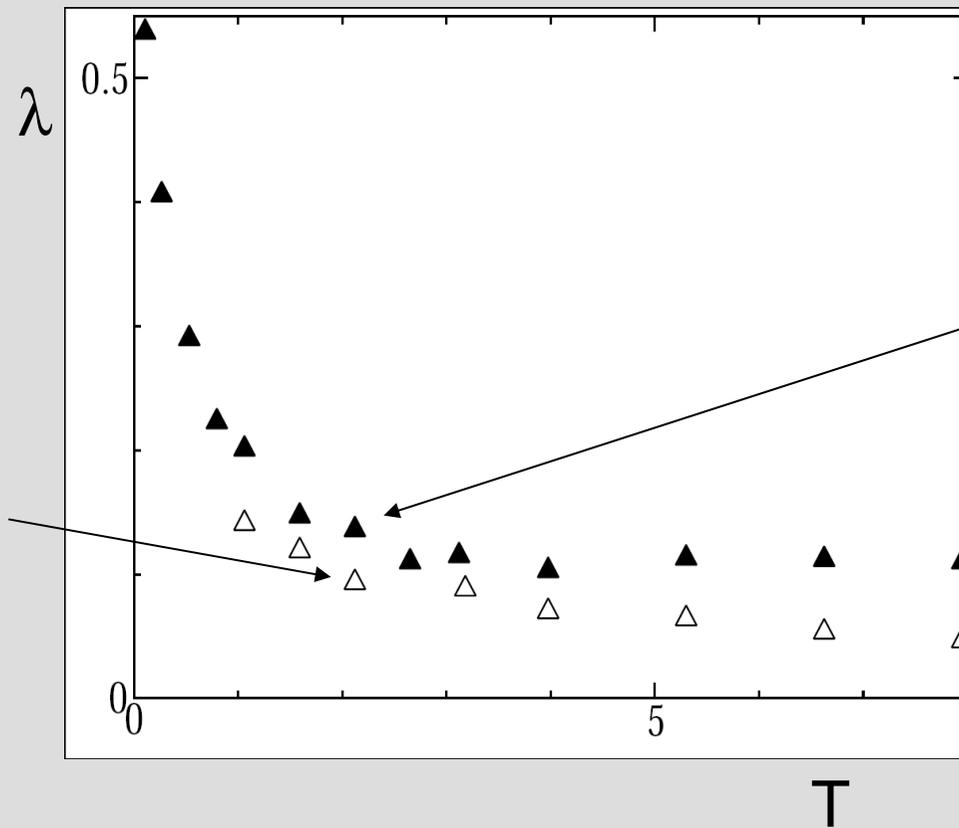
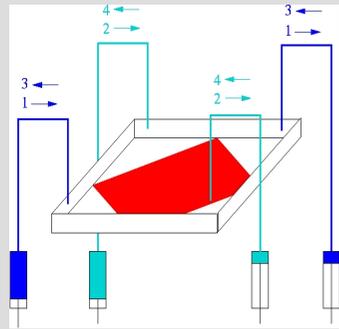
(e)



(f)



Exposants de Lyapunov



Exposants de Lyapunov en fonction de la période T

Seringue ou pompes ?

Conclusion

- Le protocole **à pompes** donne toujours de meilleurs résultats que le protocole à seringues.
 - **Sections de Poincaré** plus homogènes
 - **Exposants de Lyapunov** toujours plus élevés

F. Raynal et al, *Phys. Fluids*, 2004

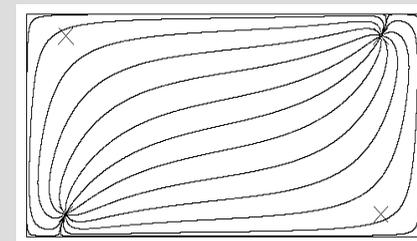
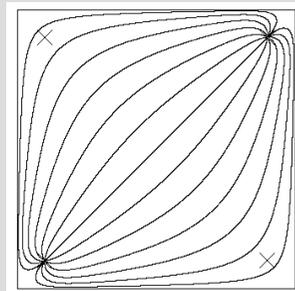
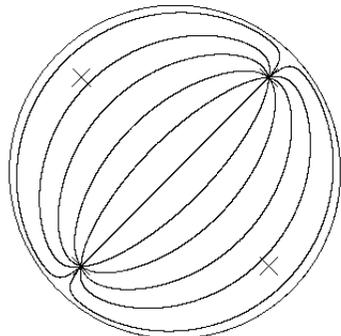
--> sélectionné pour virtual journal of biological physics

F. Raynal et al, *Phys. Fluids*, 2007

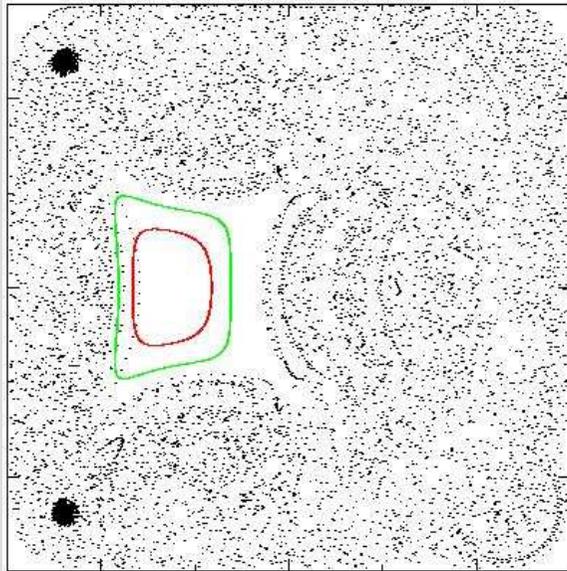
--> sélectionné pour virtual journal of biological physics

Chambre carrée ou rectangulaire ?

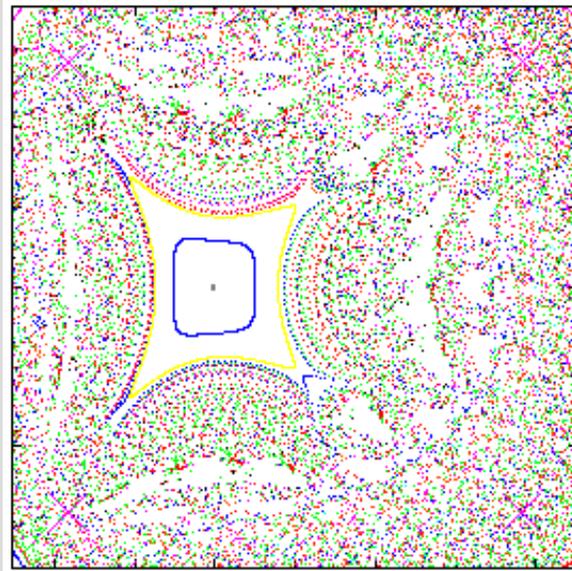
- Refaire un maillage, des simulations et une expérience ?
- Écoulement de type Hele-Shaw :
Champ de vitesse moyenné sur la hauteur vérifie Euler
- [Modèle 2D](#) (thèse Aurélien Beuf)
 - On calcule le champ de vitesse entre une source et un puit dans un cercle (méthode des images)
 - Changement de géométrie aisé par transformation de Schwarz-Christoffel



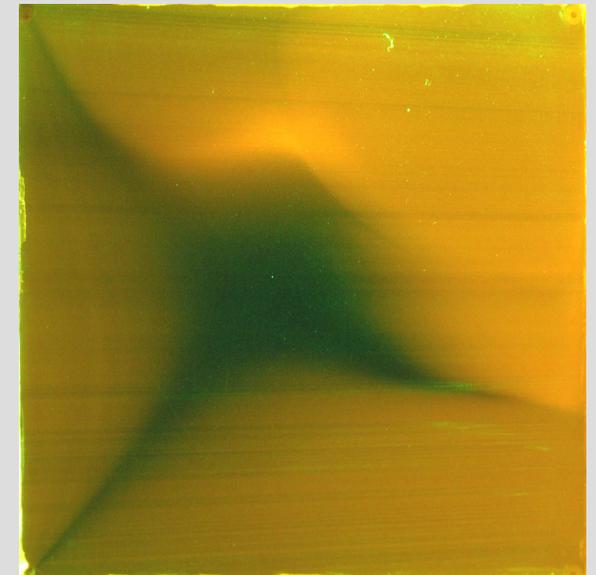
Validation du modèle 2D



Simulation 3D



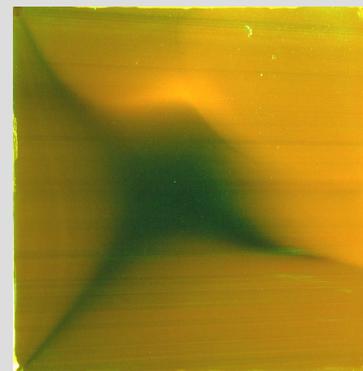
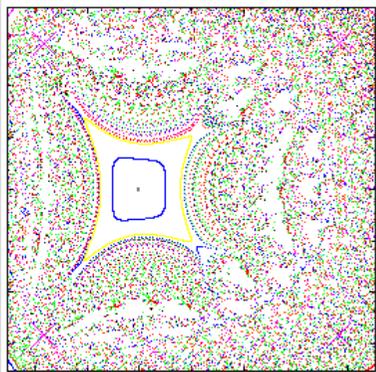
Modèle 2D



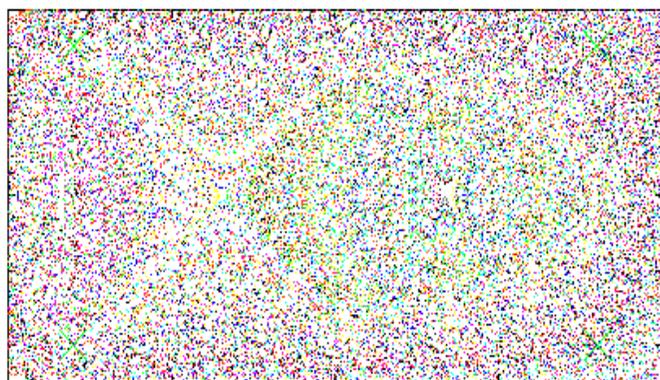
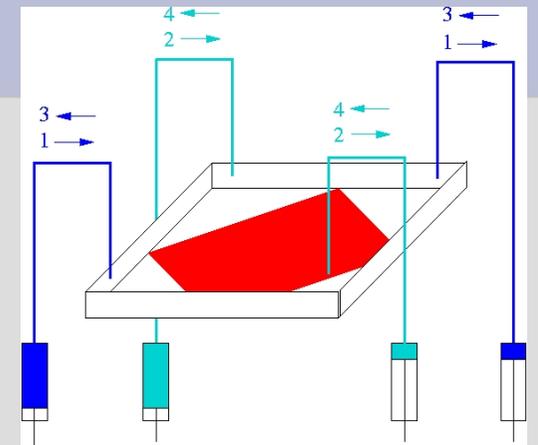
Expérience

⇒ Très bon accord entre le modèle,
la simulation 3D et l'expérience

Protocole à seringues, $T=4s$

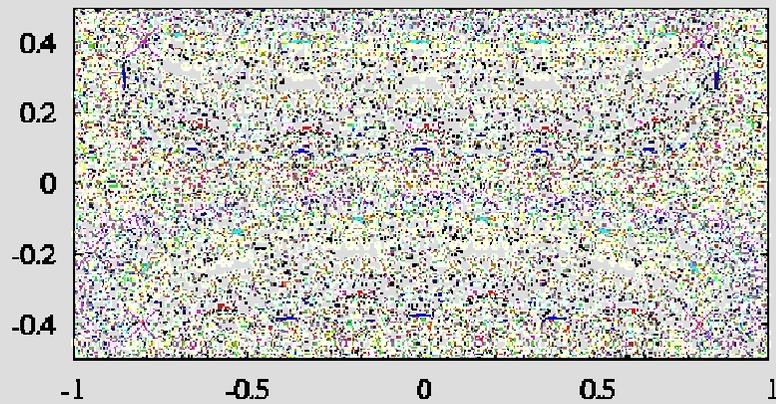
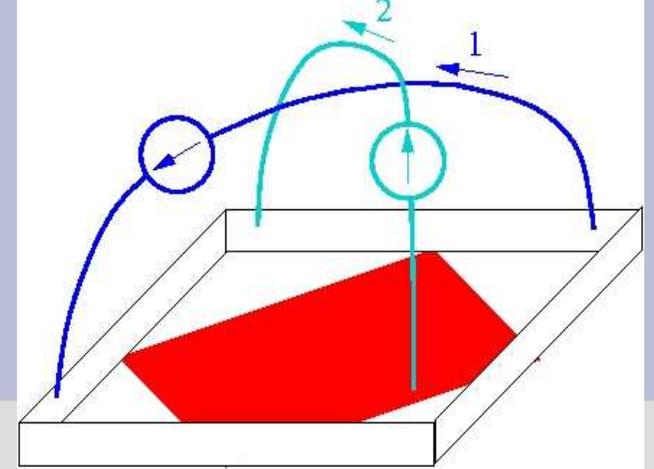


$t = 9 T$

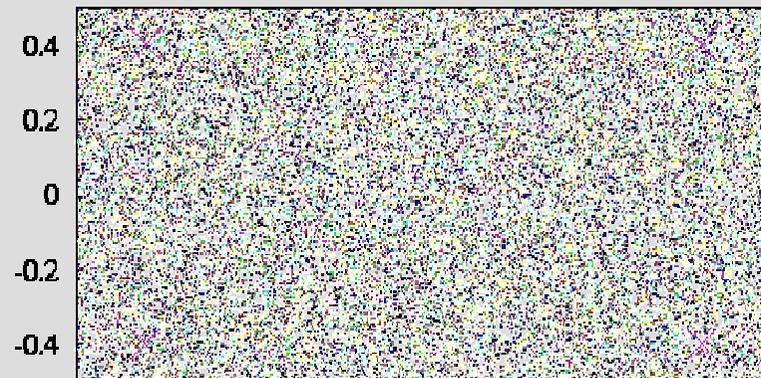


$t = 9 T$

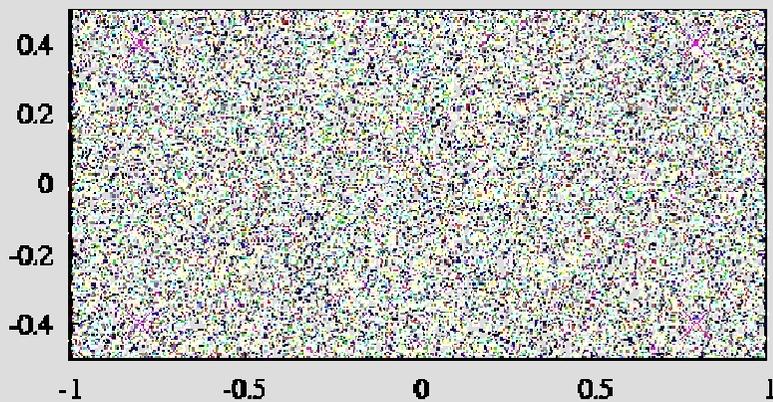
Protocole à pompes



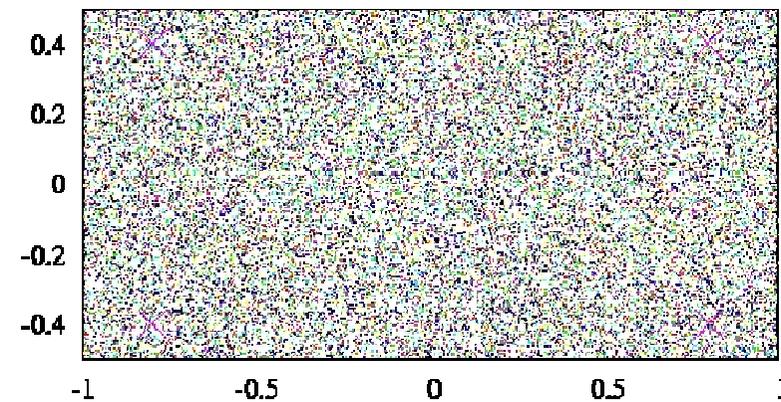
$T = 1s$



$T = 4s$

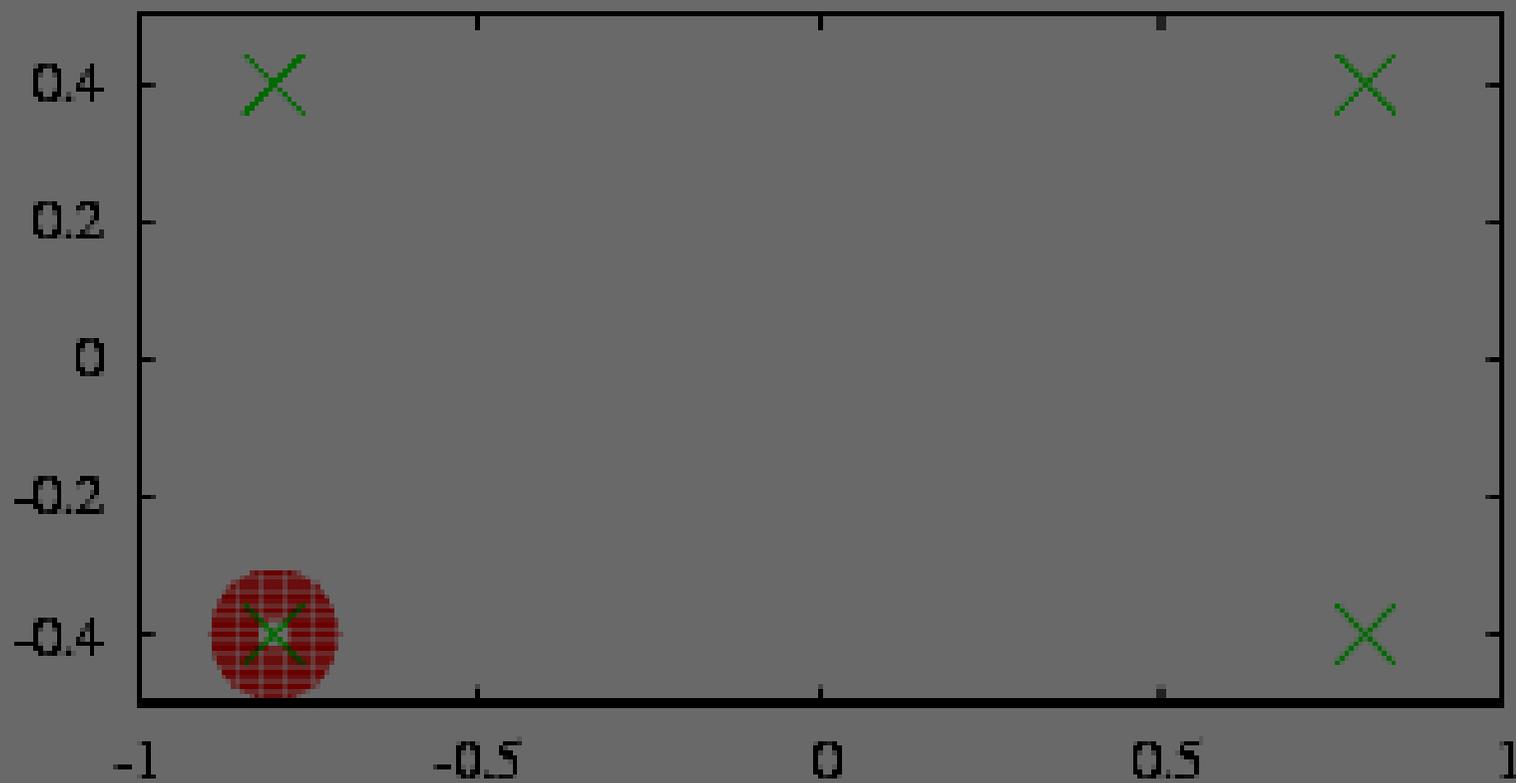
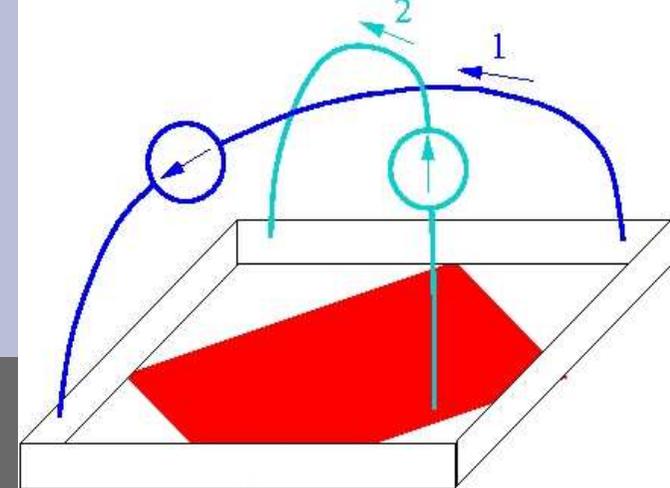


$T = 6s$

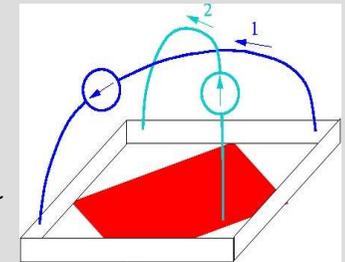
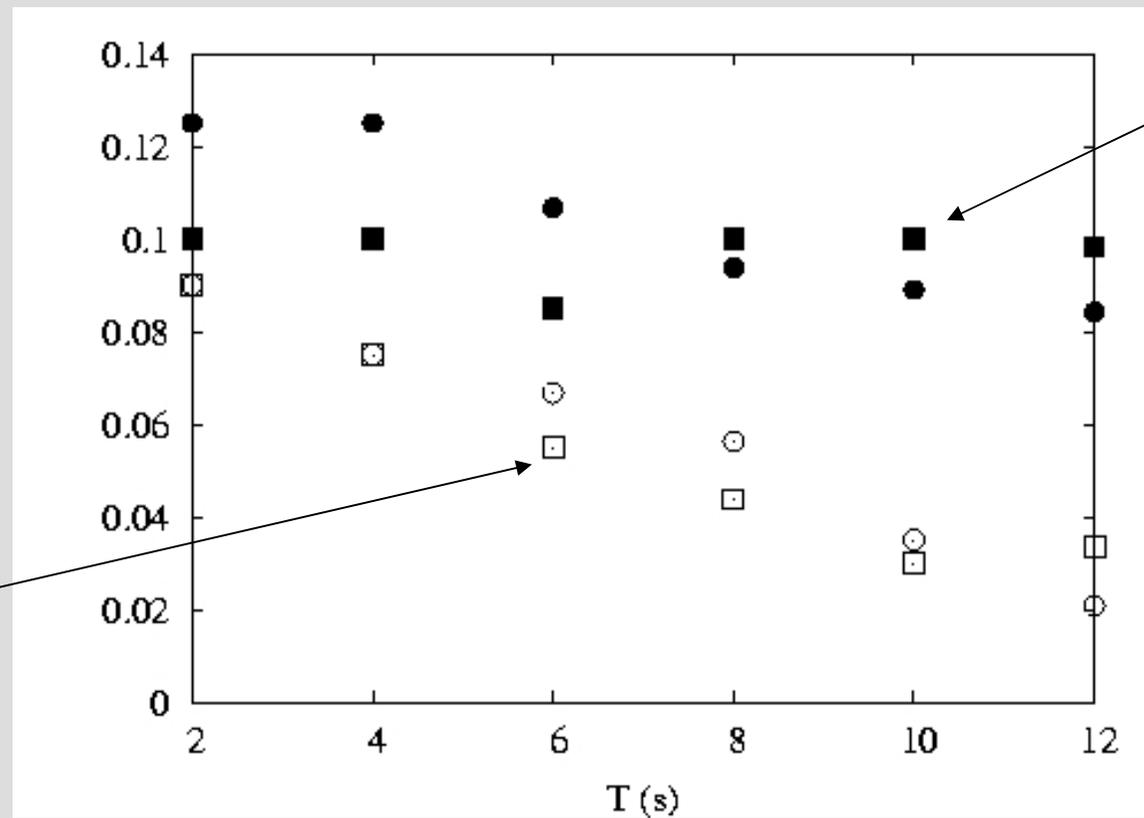
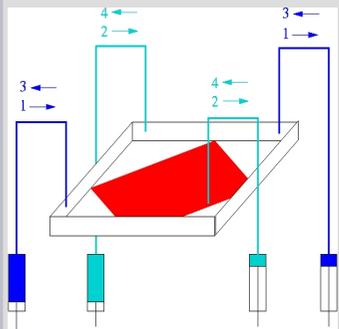


$T = 8s$

$T=4s$



Exposants de Lyapunov



Conclusion des simulations

- Le **protocole à pompe** donne toujours de meilleurs résultats que le protocole à seringues.
- La géométrie **rectangulaire** donne toujours de meilleurs résultats que la géométrie carrée.

Le RosaMix

(société RosaTech)

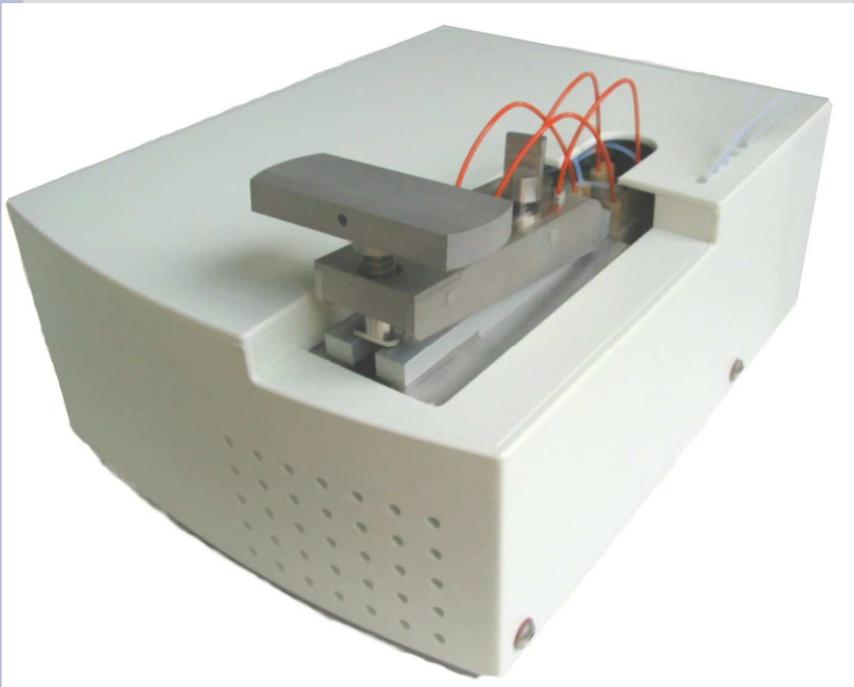
Station d'hybridation pour les puces.

Les + :

- Entièrement automatisée
- Lavages post-hybridation
- Décontamination
- Régulé en température.
- Chambre d'hybridation de 50 μ l

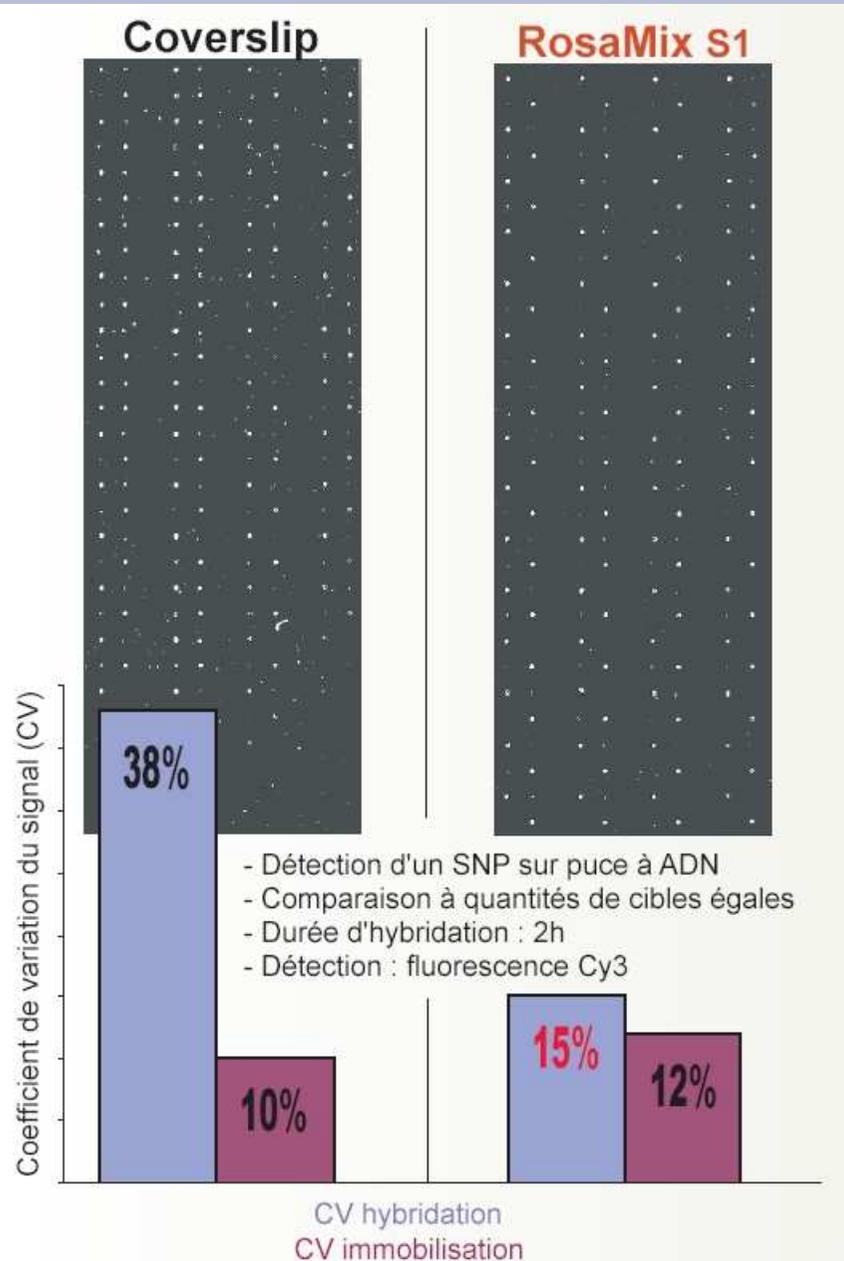
Les - :

- Pas intégré dans un laboratoire sur puce
- Volume total: 500 μ l !!!



Détection d'un SNP

(Single Nucleotid Polymorphism)



Puce à ADN :

- Réseau régulier de sondes 12mer
- 2 types de sondes, HPA1a, HPA1b (protéines des plaquettes sanguines), avec mutation A<->G

Cibles :

- Cibles HPA1a seulement
- 84 mer
- Marquage fluorescent avec CY3

Quantité de cibles : 5pmol

Perspectives

- À court terme :
Diminution du volume total à l'aide de composants plus petits, avec de meilleures performances
- À plus long terme :
Intégration sur laboratoire sur puce

RosaMix s'appelle maintenant TrayMix
(société BioTray, Lyon) !