



HAL
open science

Intégration de puce à ADN dans un microsystème fluidique

Jacques Goulpeau

► **To cite this version:**

Jacques Goulpeau. Intégration de puce à ADN dans un microsystème fluidique. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT : . pastel-00002226

HAL Id: pastel-00002226

<https://pastel.hal.science/pastel-00002226>

Submitted on 15 Sep 2010

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.

Thèse de doctorat de l'Université Paris 6

Spécialité : Science des matériaux

**Intégration de puce à ADN
dans un microsystème fluide**

CONCEPTION ET RÉALISATION DE DISPOSITIFS

MICROFLUIDIQUES POUR LA BIOLOGIE.

Présentée par : Jacques GOULPEAU

Soutenue le 3 octobre 2006

Composition du jury :

Françoise BROCHARD-WYART Examineur

Henrik BRUUS Rapporteur

Marie-Claude POTIER Examineur

Patrick TABELING Directeur de thèse

Daniel TROUCHET Directeur de thèse

Jean-Louis VIOVY Rapporteur

Remerciements

Je voudrais en premier lieu remercier chaleureusement Patrick Tabeling et Daniel Trouchet qui m'ont encadré durant ces trois années de thèse et qui m'ont témoigné une confiance que je n'aurais certainement plus l'occasion de retrouver. Ils ont été les initiateurs du projet décrit ici, avec l'intervention décisive de Cécile-Maria Witzke et de Karine Bizet. Merci donc à eux quatre qui m'ont soutenu pendant ce travail et auprès de qui j'ai acquis de nombreuses connaissances.

Un grand merci à Armand Ajdari, toujours disponible malgré ses multiples responsabilités, et qui voit toujours clair dans les explications parfois tortueuses du jeune étudiant. Un grand merci à Marie-Claude Potier sans qui ce travail n'aurait pas eu de dimensions biologiques : ses conseils et sa confiance ont été cruciaux dans les résultats obtenus et je l'en remercie.

Un grand merci à MM Jean-Louis Viovy et Henrik Bruus qui ont accepté d'être rapporteur de mon travail et qui ont pris sur leur précieux temps pour commenter et critiquer ce document. Je remercie chaleureusement Mme Françoise Brochard-Wyart de m'avoir honoré de sa présence dans le jury.

Je voudrais remercier aussi Genescore et en particulier Luc Talini, Diane Leclerc et Fabrice Richard qui ont pris de leur temps et de leur énergie pour rendre mon travail possible.

Cette thèse CIFRE, bicéphale par nature, a été pour moi l'occasion de travailler à Bertin Technologies et de participer à différents projets. Cela m'a permis de connaître Julien Vallayer, Paulo Ferrera, Alain Estève et Thierry Kunc que j'ai eu beaucoup de plaisir à côtoyer. Je voudrais les remercier pour leur soutien et pour les nombreuses connaissances que j'ai pu apprendre à leur contact.

Un grand merci à Laurent Lacroix, Pierre-Yves Lagrée et Virgile Viasnoff qui m'ont aidé de façons ponctuelles mais toujours significatives. Je remercie chaleureusement Pierre Nassoy et Caroline Jullien qui m'ont donné l'occasion de présenter mon travail dans leur laboratoire.

J'ai eu la chance et le plaisir d'encadrer un certain nombre d'étudiants dont le travail fut souvent crucial pour le bon déroulement de ma thèse : un grand merci donc à Yves-Marie Subervie, Julien Chapron et Paul Kauffmann.

Et puis une thèse, c'est surtout un laboratoire, et je remercie Laure et sa spontanéité rafraichissante, Guillaume et le temps partagé au vieux-chêne, Jacques ou la réconciliation

de l'art et de la science, Jean-Baptiste, Vincent, Hervé, Edouard, Pierre et Barbara, Julie, Valessa, Annick, Philippe, Denis, et tous ceux qui m'ont aidé dans ce périple, comme Alice, Matthieu, Irène... Mais une thèse en entreprise, c'est aussi Julien, Ronand, Paulo et Paulo, Brice, Nicolas, Marie-Joe, Valérie et les Sébastiens que je remercie pour de nombreux souvenirs inénarrables, et pour leur passion des combinaisons ringardes de ski.

Je voudrais juste finir en disant que deux personnes, Isabelle et Arash, qui sont liés à mon passage ici, ont beaucoup compté pour moi durant ces trois années.

Table des matières

Prologue	8
1 Technologie microfluidique	12
1.1 Introduction	12
1.2 La lithographie molle : mise en forme du PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) .	13
1.2.1 Fabrication des moules	13
1.2.2 Moulage du PDMS simple et double couche : intégration de mi- croactuateur	16
1.2.3 Exemples de micro-vannes et de micro-pompes	18
1.2.4 L'interface micro-macro	20
1.3 Remplissage des canaux	20
1.4 Écoulement microfluidique	23
1.4.1 Les écoulements à bas nombre de Reynolds : équation de Stokes . .	23
1.4.2 Equivalence électrique et formules pratiques	24
1.5 Conclusion	27
2 Etude expérimentale et modélisation des micro-pompes péristaltique en PDMS	28
2.1 Introduction	28
2.2 Experimental study and modeling of polydimethylsiloxane peristaltic mi- cropumps	29
2.3 Conclusion	39
3 La dispersion de Taylor-Aris dans les micro-canaux	40
3.1 Introduction à la dispersion de Taylors-Aris	40
3.1.1 Le cas simple d'un écoulement de Poiseuille	40
3.1.2 Régimes intermédiaires pour l'écoulement de Poiseuille	42
3.1.3 Cas particulier des canaux arrondis : régimes supplémentaires . . .	43
3.2 Réalisation de gradients de concentration dans des canaux arrondis	45
3.2.1 Introduction aux gradients de concentration	45
3.2.2 Modélisation du régime à temps court : sous régime indépendant de la diffusion	46

3.2.3	Réalisation expérimentale de gradient de concentration par dispersion de Taylor-Aris	47
3.2.4	Conclusion sur le gradient de concentration	51
3.3	Conclusion	52
4	Intégration de puces à ADN dans une plate-forme microfluidique originale	54
4.1	Introduction	55
4.1.1	Principe des puces à ADN	55
4.1.2	Limitations des puces à ADN et apports de la miniaturisation . . .	56
4.1.3	État de l'art des systèmes microfluidiques pour les puces à ADN . .	57
4.2	La plate-forme microfluidique	59
4.2.1	Description générale	59
4.2.2	Automatisation et contrôle microfluidique	61
4.2.3	Régulation et calibration de la température	62
4.2.4	Caractérisation de l'évaporation dans le PDMS	66
4.2.5	Mesures par fluorescence de la réaction d'hybridation	69
4.3	Caractérisation et répétabilité de la réaction d'hybridation sur puce dans la plate-forme microfluidique	72
4.3.1	Comparaison de l'hybridation dans un microsystème aux techniques habituelles.	72
4.3.2	Adsorption spécifique et non spécifique	74
4.3.3	Stabilité du greffage au cours de plusieurs hybridations-désybridations	78
4.3.4	Mesures de courbes de fusion	79
4.4	Intégration dans un système portable	82
4.5	Conclusion	83
5	Analyse expérimentale de la réaction d'hybridation sur puce	86
5.1	Introduction : généralités sur la réaction d'hybridation	87
5.1.1	La réaction en solution	87
5.1.2	La réaction d'hybridation sur une surface	88
5.2	Comparaison de courbes de fusion en volume et sur puce	89
5.2.1	Conditions expérimentales	89
5.2.2	Comparaisons des mesures en volume et en surface	90
5.2.3	Origines physiques des différences de la réaction d'hybridation sur puce	91
5.2.4	Conclusion sur les courbes de fusion sur puce	94
5.3	Influence de la vitesse d'écoulement sur la cinétique d'hybridation	95
5.3.1	Modélisation couplage réaction-diffusion-advection : Modèle ERC .	95
5.3.2	Analyse de la cinétique d'adsorption	101

5.3.3	Comparaison avec l'expérience du modèle ERC dans le cas des puces à ADN	104
5.4	Conclusion	108
6	Application au dosage d'allèles	110
6.1	Introduction	110
6.2	Première méthode basée sur l'équilibre thermodynamique	111
6.2.1	Principe de la méthode	111
6.2.2	Mise en oeuvre expérimentale	113
6.2.3	Conclusion	115
6.3	Deuxième méthode basée sur la cinétique d'hybridation	118
6.3.1	Modélisation de la compétition entre cibles	118
6.3.2	Méthode de dosage basée sur la compétition	119
6.3.3	Mise en oeuvre expérimentale	120
6.4	Expériences sur échantillons biologiques (résultat en annexe I)	121
6.5	Conclusion	123
	Epilogue	124
A	PDMS-based microfluidics for proteomic analysis	126
B	Article sur le gradient de concentration soumis à Lab on a Chip	138
C	Exemple d'utilisation de l'équivalence électrique pour un pousse seringue	164
D	Mélangeur-doseur utilisant la dispersion de Taylor-Aris	168
E	Fabrication du microsystème puce à ADN	174
F	Automate de régulation de température	176
G	Photoblanchiment et réaction d'hybridation : critère de précision	180
H	Description des puces à ADN utilisées	182
I	Résultats des dosages d'allèles sur des échantillons sanguins	186
	Bibliographie	188
	Index	199

Prologue

Pour voir loin, il faut y regarder de près.

Pierre DAC

LA microfluidique est un domaine en pleine expansion aussi bien au niveau académique qu'industriel. La définition courante de la microfluidique comme étant l'étude des écoulements dans des conduites de l'ordre de quelques centaines de microns décrit mal la diversité des sujets abordés par cette jeune discipline. Adapté à l'étude de phénomènes fondamentaux comme par exemple le glissement hydrodynamique aux interfaces [1], elle permet des mesures inédites pour la biologie et la chimie analytique.

Le concept de μ TAS (micro Total Analysis System) ou de laboratoire sur puce [2] nous intéresse ici plus particulièrement. Cette idée qui prône la miniaturisation des systèmes d'analyse ne permet pas seulement de les rendre portables, mais permet aussi d'en améliorer les performances. Ce dernier point est certainement le plus important : la réduction des tailles modifie les phénomènes physiques prépondérants et de nouvelles possibilités sont alors offertes.

Le travail de thèse présenté ici s'inscrit dans un contexte pluridisciplinaire, à la frontière entre la physique, la biologie et l'ingénierie. Cette thèse a été initiée sous la double impulsion de Daniel Trouchet de Bertin Technologies et de Patrick Tabeling, directeur du laboratoire de Microfluidique de l'ESPCI. Ce travail a de plus bénéficié de l'étroite collaboration de Marie-Claude Potier du laboratoire de Neurobiologies et de diversités cellulaires de l'ESPCI.

Bertin technologies a développé un protocole d'identification de bactéries pour des applications militaires et civiles et le but premier de la thèse est d'intégrer dans un microsystème tout ou partie du protocole. Les gains attendus sont l'amélioration des temps d'analyse et l'intégration dans un dispositif portable. Il s'avère qu'à travers ce sujet se cache une grande diversité de phénomènes à appréhender et à maîtriser. En effet, le protocole d'analyse comporte cinq étapes : concentration des bactéries, destruction de la membrane bactérienne (lyse), extraction des acides nucléiques, marquage et rétrotranscription en ADN complémentaire (acide désoxyribonucléique) pour finalement être identifié sur des puces à ADN. L'intégration d'un protocole de complexité équivalente a rarement été réalisé jusqu'ici [3] même si chaque étape prise séparément a reçu de nombreuses études. Afin

d'appréhender cet objectif, nous avons procédé par étape, en nous concentrant d'abord sur le contrôle des liquides contenus dans les microsystèmes, dont les volumes de l'ordre du nanolitre (10^{-9} L) ou inférieur.

Peu de technologies permettent un tel contrôle sans la mise en oeuvre de moyens importants. La technologie mise au point par le laboratoire de S. Quake à Caltech [4] est l'une d'entre elles : elle permet d'intégrer des microvannes et des micropompes dans le PDMS (polydiméthylsiloxane), matériaux de choix pour le prototypage rapide. Cette technique combine des avantages peu courants : elle est à la fois simple et rapide à mettre en oeuvre et peu coûteuse [5]. De plus le PDMS a des propriétés de surface satisfaisantes vis-à-vis des analyses biochimiques du protocole.

J'ai donc participé à la mise en place de cette technologie au laboratoire de thèse. Dans ce cadre, la compréhension du fonctionnement physique des micropompes fabriquées par cette technologie a donné lieu à une publication dans *Journal of Applied Physics*. Après avoir mis en évidence expérimentalement les mécanismes physiques mis en jeu, un modèle théorique, basé sur une équivalence électrique d'une vanne, permet de simuler l'ensemble de la pompe et d'en prévoir les performances. Des micropompes atteignant des débits de l'ordre de $10 \mu\text{L}/\text{min}$, deux ordres de grandeurs supérieurs aux précédents débits rapportés, peuvent alors être conçues. Ce travail permet d'élargir leur utilisation – jusque là associée au contrôle précis de très petits volumes [6] – pour aspirer directement depuis l'intérieur les liquides à introduire dans le microsystème. L'interface micro-macro, souvent problématique, est ici grandement simplifiée. De plus la réalisation d'un système complexe de traitement est notablement facilitée par cet outil de conception. Cette étude a contribué à la réalisation d'une puce d'analyse de protéines comprenant plusieurs étapes, dont la séparation, la sélection et la digestion de protéines, que nous présentons en annexe A. Une méthode de remplissage originale des canaux en PDMS se couple naturellement aux micropompes à haut débit : éliminant les problèmes de bulles et de remplissage, y compris à température élevée, l'échantillon peut directement être déposé sur le dispositif microfluidique qui est alors aspiré à l'intérieur par une micropompe. Basée sur le dégazage du PDMS, cette méthode brevetée met aussi en avant l'utilisation d'un pompage passif, permettant la mise en oeuvre de tests sans partie active.

Le transport des liquides d'une étape à l'autre avec une telle technologie s'accompagne inévitablement d'une dilution de l'analyte transporté. Ce phénomène dû au couplage de la dispersion de vitesse dans les canaux et de la diffusion, est connu sous le nom de la dispersion de Taylor-Aris. Dans les microcanaux de faibles rapports d'aspect, les régimes de dispersion s'enrichissent : sa compréhension précise a permis de mettre en place une nouvelle méthode pour construire des gradients de concentration indépendants de la diffusion des espèces. Une série de réservoirs de quelques nanolitres contenant différentes concentrations sont alors générés en quelques secondes. Ceci représente une nouvelle ap-

proche pour le criblage rapide, qui a fait l'objet d'un article de conférence à μ TAS 2005 [7] et que nous avons soumis au journal "Lab on a chip" (annexe B)

Fort de ces travaux, la dernière étape du protocole constituée d'une puce à ADN est intégrée dans un dispositif microfluidique. Cette étape qui permet d'identifier des milliers de séquences d'ADN d'un même échantillon est intéressante à double titre : d'une part, étant la dernière étape du protocole, sa mise au point permet le test des étapes précédentes sans sortir du format microfluidique. D'autre part, l'intégration de puce à ADN est un enjeu en soi. Outil de base de la biologie depuis une dizaine d'années, la miniaturisation apporte de nombreux avantages au niveau de la rapidité des analyses et de leur précision. La possibilité d'accéder aux phénomènes transitoires des puces à ADN a aussi un grand intérêt : elle permet une meilleure compréhension des phénomènes physiques sous-jacents et ouvre de nouvelles voies de mise en oeuvre des puces à ADN.

La plate-forme que nous avons réalisée se situe dans ce contexte : contrôlant les écoulements et la température avec une grande précision, le signal issu des puces à ADN est mesuré en temps réel par fluorescence. Le dispositif, conçu pour être adaptable à tout type de support, est un outil de choix pour l'étude et la caractérisation des puces à ADN, comme nous le mettrons en évidence par la suite. Afin de démontrer la portabilité de la plate-forme, un prototype portable d'interface est réalisé. Une version simplifiée de la plate-forme a fait l'objet d'un article de conférence à μ TAS 2005 [8].

Après avoir caractérisé le fonctionnement de la plate-forme, les connaissances de la réaction d'hybridation sur puce sont complétées. Ce processus physique qui est à la base des puces à ADN, consiste en l'association de deux brins d'ADN pour former une double hélice. Relativement bien décrite en volume, l'ancrage sur une surface de l'un des deux brins, qui est la situation des puces à ADN, modifie notablement l'affinité et la cinétique de la réaction. Grâce à des mesures comparées de courbes de fusion sur puce et en volume, l'image physique de l'hybridation sur puce est complétée. De plus un modèle de couplage entre la réaction d'hybridation et le transport à la surface est étendu expérimentalement aux puces à ADN grâce à une étude expérimentale effectuée sur 2 ordres de grandeurs de vitesses d'écoulement.

Aussi bien pour la détection de bactéries [9] que pour de nombreuses autres problématiques biologiques [10], comme l'étude de la trisomie 21 ou le diagnostic cancéreux, la spécificité des puces à ADN est une problématique centrale. Elle l'est d'autant plus que cet outil effectue des milliers de tests à la fois. Ainsi, dans le cadre d'une collaboration avec Jérôme Buard et Emmanuelle Haquet de l'Institut de Génétique Humaine (IGH) de Montpellier, initiée par Marie-Claude Potier, pour la première fois une méthode de dosage d'allèle décrite théoriquement par Halperin *et al* [11] est mise en oeuvre. Cette méthode basée sur l'équilibre thermodynamique est adaptée, en accord avec notre analyse précédente sur la réaction d'hybridation. De plus, en mettant à profit la cinétique d'hy-

bridation, une deuxième méthode est décrite et mise en oeuvre expérimentalement. Les résultats sur des systèmes modèles sont très encourageants et à l'heure de l'écriture de ce manuscrit, des expériences sur des échantillons biologiques sont en préparation.

Le manuscrit s'organise en six chapitres : le chapitre 1 se concentre sur la mise en oeuvre pratique de la technologie PDMS. Le brevet de remplissage du PDMS y est décrit à cette occasion. Au chapitre 2, présenté sous forme d'un article publié dans *Journal of Applied Physics*, l'étude expérimentale et théorique sur les micropompes péristaltiques est présentée. Le chapitre 3 décrit la dispersion de Taylor-Aris dans le cas des microcanaux utilisés ici avec la description d'une méthode originale de réalisation de gradients de concentration. Au chapitre 4, la plate-forme microfluidique est décrite et caractérisée : la répétabilité du dispositif et des puces à ADN y est notamment étudiée. Grâce à cette plate-forme originale, une analyse de la réaction d'hybridation sur puces est décrite au chapitre 5. Finalement, le chapitre 6 décrit la mise en oeuvre, pour la première fois, de deux méthodes de dosage d'allèles, basé sur la calibration des puces et sur le traitement de la cinétique d'hybridation.

En annexe, le lecteur trouvera entre autre l'article publié dans "The analyst" sur un système d'analyse de protéines comprenant plusieurs étapes et l'article soumis au journal "Lab on a chip" sur le générateur de gradient de concentration.

Chapitre 1

Technologie microfluidique

Je sais pourquoi tant de gens aiment couper du bois. C'est une activité où l'on voit tout de suite le résultat.

Albert EINSTEIN

1.1 Introduction

La microfluidique s'intéresse aux écoulements fluides, aux petites échelles, typiquement inférieures à $300 \mu m$. Sous cette définition minimaliste se cache pourtant une grande variété de situations. Impliquée dans différents domaines scientifiques et techniques, elle intervient aussi bien dans la chimie analytique, les têtes d'imprimante à jet d'encre, en passant par l'analyse biologique et le refroidissement des microprocesseurs.

Son apparition fut progressive, d'abord ponctuée par des réalisations isolées, comme la mise au point par Little en 1979 d'un micro-système de réfrigération pouvant atteindre 80 K en quelques minutes [12]. Puis grâce un transfert de technologie provenant de la micro-électronique [13], elle connût depuis lors un développement continu. Partie intégrante des MEMS (Micro-Electro-Mechanical Système), elle se différença en partie grâce à l'exposition claire des bases de la miniaturisation pour l'analyse chimique [2] dans les années 1990. Le concept et les avantages des μ TAS (Micro Total Analysis System) se sont alors rapidement popularisés. Touchant la chimie analytique et la biologie, la microfluidique apparut aussi comme un environnement adapté à l'étude de phénomènes fondamentaux, comme par exemple le glissement à l'interface liquide-solide [1] ou la physique des systèmes hors d'équilibre [14].

La technologie de microfabrication fut donc longtemps dominée par les matériaux de la microélectronique : le verre et le silicium. Ces matériaux nécessitant d'importants équipements cantonnaient la microfluidique aux grands laboratoires munis de capitaux importants. L'introduction des méthodes douces de microfabrication ont modifié la situation. Ces techniques de mise en forme des matières plastiques se sont progressivement

propagées. Moins chères que les techniques dites "dures", elles sont plus adaptées à la production de masse dans le cas des thermoplastiques [15]. Un élastomère en particulier, le PDMS (Polyméthylsiloxane) a conquis de nombreux laboratoires et quelques industries grâce à sa facilité de mise en oeuvre et ses bonnes qualités optiques.

1.2 La lithographie molle : mise en forme du PolyDi-MéthylSiloxane (PDMS)

La lithographie molle ou "soft lithography" est la technique de microfabrication couramment utilisée au laboratoire. Le polydiméthylsiloxane ou PDMS constitue l'élastomère de choix [16], largement utilisé dans la communauté des microsystèmes. Transparent et peu fluorescent, il se moule avec une grande précision ($\approx 100 \text{ nm}$). Etape importante de la microfabrication, le collage se réalise facilement de façon réversible ou non-réversible. Ses propriétés élastomériques en font de plus un joint naturel qui facilite les connexions fluidiques avec l'extérieur.

La fabrication d'un microsystème en PDMS se déroule de la manière suivante :

- Le dessin des micro-canaux est imprimé sur une feuille de transparent à l'aide d'une imprimante à haute définition ($>3600 \text{ dpi}$),
- Grâce à ce masque, une résine photosensible, préalablement étalée sur une plaque de silicium ou wafer, est mise en forme pour constituer le moule,
- Le PDMS liquide est étalé sur le moule et durci à 75°C pendant 2 heures.
- Le microsystème en PDMS est alors démoulé et collé sur un substrat, qui peut être par exemple en verre, en PDMS ou en silicium.

En quelques jours, on peut passer de l'idée à la réalisation pratique [5].

1.2.1 Fabrication des moules

La fabrication des moules est réalisée par lithographie classique. Une résine photosensible est d'abord étalée en une fine couche (1 à $100 \mu\text{m}$) sur un wafer de silicium ou de verre qui est ensuite illuminé à travers le masque par une source UV. Les zones illuminées, dans le cas des résines positives ou non illuminées dans le cas des résines négatives, sont détruites lors de l'étape de développement. Les structures en relief à la surface du wafer forment ainsi le moule.

Protocole de fabrication de la résine négative

La résine négative que nous utilisons au laboratoire est la SU8 de la série 2000 de chez MicroChem. Cette série couvre toute une gamme de hauteur allant de quelques microns à plusieurs centaines de microns. Le protocole est décrit de façon détaillée dans les documents constructeurs. Les différentes étapes sont ici rappelées et commentées pour faciliter la mise en oeuvre :

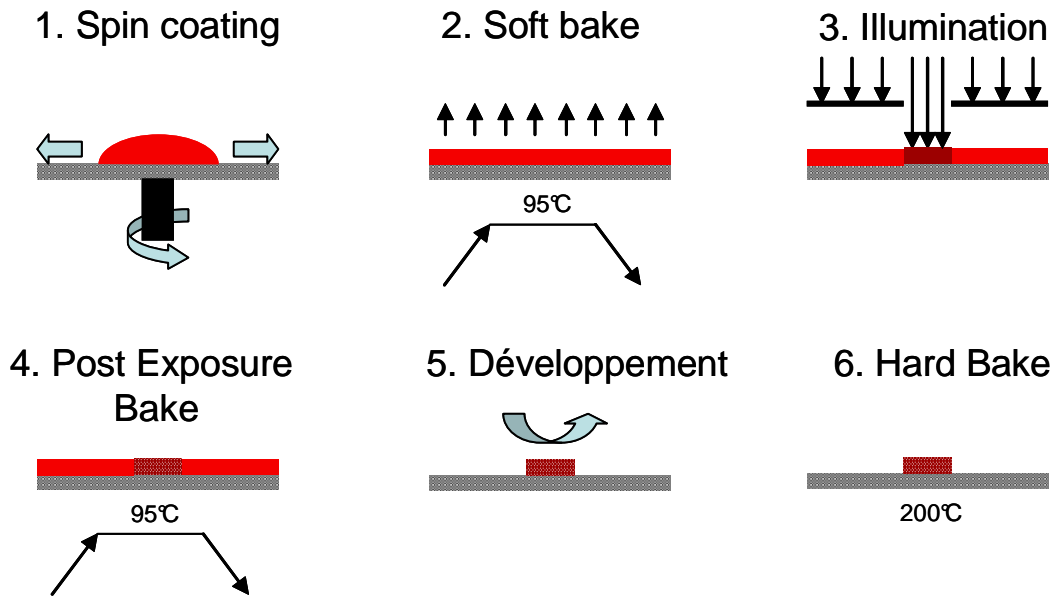


FIG. 1.1 – Protocole de fabrication d’une résine négative sur un substrat en silicium (wafer).

- 1. Préparation du wafer de silicium :** l’adhésion de la résine sur le wafer de silicium est améliorée après une déshydratation du wafer à 200°C pendant une heure. Cette étape est cependant facultative. Un promoteur d’adhésion, Omniccoat, qui se dépose par spin coating (voir plus loin pour la description de ce terme) améliore aussi l’adhésion.
- 2. Enduction de la résine :** la résine est ensuite déposée sur environ 70% de la surface du wafer. L’épaisseur de la résine est alors fixée par la vitesse et le temps de rotation du wafer. Les paramètres de rotation sont contrôlés par un spin coater programmable. Il est à noter que l’épaisseur est aussi fonction de la viscosité de la résine : dépendant fortement de la température, celle-ci doit être réglée pour avoir des protocoles reproductibles.
- 3. Soft Bake :** sans laisser reposer la résine, elle doit être chauffée à 95°C pendant un temps dépendant de son épaisseur. Il est très important de limiter les chocs thermiques pour diminuer les contraintes mécaniques dans la résine : l’utilisation d’une température palier à 65°C ou d’une rampe lente de montée en température est nécessaire.
- 4. Insolation de la résine :** La résine est ensuite insolée par une source UV à travers le masque. Les zones illuminées vont libérer un acide fort qui va réticuler la résine à l’étape suivante. Les filtres de sélection de longueurs d’onde I ou G ne sont à utiliser qu’avec des masques de grande précision. En général, les masques sur transparent contiennent des bulles dues à leur fabrication : avec l’utilisation de filtres, elles sont transférées sur la résine.
- 5. Post Exposure Bake :** comme précédemment, cette étape est un chauffage à 95°C avec une variation lente de la température. La réaction de réticulation dans les zones

où l'acide fort a été libéré est catalysée.

6. **Developpement** : le développeur dissout la résine non réticulée. Cette étape peut être longue si de fines structures ont été dessinées. Le rinçage à l'isopropanol inhibe le développeur et rince le moule. L'apparition de traînées blanches lors du rinçage est le signe d'un développement partiel.
7. **Hard bake** : un chauffage à 200°C pendant 20 min permet de consolider la résine et parfois d'améliorer son adhésion.

Les structures résultantes sont de section rectangulaire.

Protocole de fabrication de la résine positive

La résine positive permet de réaliser des sections de canaux de formes paraboliques [4]. Ceci est particulièrement intéressant pour la réalisation de microactuateurs intégrés comme nous le verrons plus loin [17]. Les résines positives, comme la Shipley 220-7 utilisée ici, sont généralement conçues pour des épaisseurs de moins de 10 μm . Pour réaliser des épaisseurs supérieures, nous avons dû adapter le protocole fourni par le constructeur.

Le protocole utilisé est le suivant :

1. **Préparation du wafer de silicium** : spin coating de HMDS (Hexamethyldisiloxane) à 3000 tr/min pendant 40 s. Cette étape est nécessaire pour avoir une bonne adhésion de la résine.
2. **Enduction de la résine** : la résine est ensuite déposée sur environ 70% de la surface du wafer. La séquence de rotation est la suivante : 10 s à 500 tr/min pour pré-étaler la résine puis 10 s à la vitesse de rotation Ω , typiquement entre 500 et 1500 tr/min. C'est cette dernière vitesse de rotation qui fixe l'épaisseur finale. Il est important de laisser reposer la résine pendant 5 min avant l'étape suivante.
3. **Soft Bake** : la résine est chauffée à 115°C pendant un temps dépendant de son épaisseur. Comme précédemment il est important de limiter les chocs thermiques : l'utilisation d'une température palier à 65°C ou d'une rampe lente de montée en température est nécessaire.
4. **Réhydratation** : la résine doit être réhydratée dans une enceinte à 100% d'humidité pendant 40 min. L'illumination UV déclenche une réaction chimique qui consomme de l'eau : une mauvaise hydratation de la résine diminue le rendement de l'insolation.
5. **Mesure de l'épaisseur de résine** : sur un coin du wafer où l'on a gratté la résine, on mesure son épaisseur à l'aide d'un profilomètre. Ceci est nécessaire pour doser correctement le temps d'insolation.
6. **Insolation de la résine** : La résine est ensuite insolée par une source UV muni du filtre G (436 nm) à travers le masque. Les zones illuminées seront détruites par l'étape de développement. La quantité d'énergie à appliquer est de l'ordre de 110 mJ/cm² pour 1 μm de résine. Pour éviter de surchauffer la résine, il faut l'illuminer

en plusieurs fois avec un temps d'attente de 30 s. La présence de cristaux noirs dans la résine indique une surexposition alors que l'apparition de bulle indique un manque d'hydratation.

7. **Développement** : le développeur dissout la résine exposée au UV. Cette étape peut être longue si la résine n'a été pas assez illuminée. Le rinçage se fait à l'eau désionisée.
8. **Melt bake** : la résine positive est un polymère à l'état vitreux. Un chauffage à 120°C pendant 20 min permet de le faire fluer ce qui lui donne une forme parabolique.

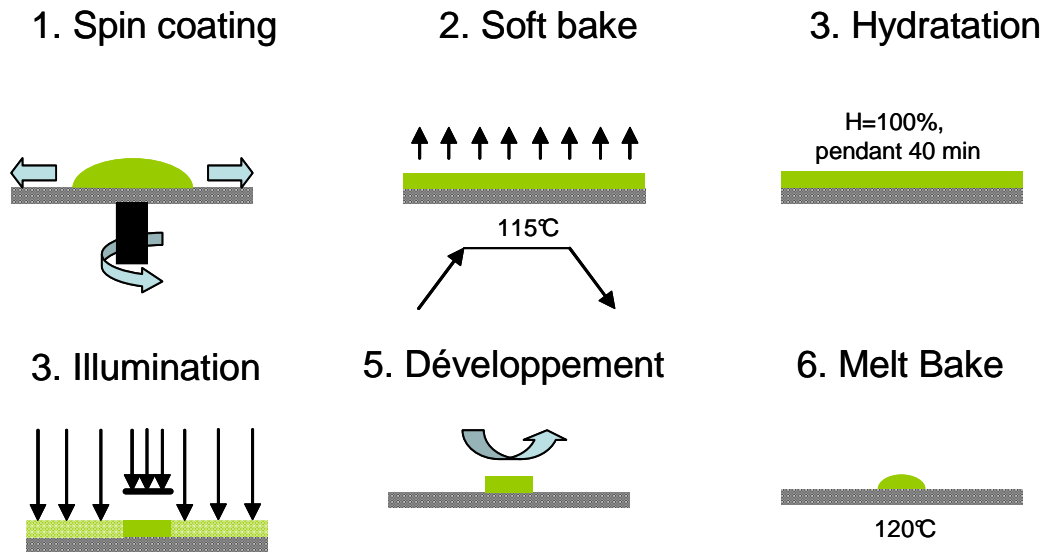


FIG. 1.2 – Protocole de fabrication pour la réalisation de résine positive pour des couches épaisses.

L'épaisseur finale est très dépendante des variations de température. Expérimentalement, la relation suivante donne l'épaisseur h en micron avant le "Melt Bake" en fonction de la vitesse de rotation Ω en tr/min, et de la température T en °C :

$$h_{\mu m} = \frac{5,9 \cdot 10^5 (1 - 0,025 T)}{\Omega_{tr/min}} \quad (1.1)$$

1.2.2 Moulage du PDMS simple et double couche : intégration de microactuateur

Protocole de fabrication simple couche

Le PDMS acheté chez General Electric (RTV 615) ou chez Corning (Sylgard 184) comprend 2 composants : le polymère polydiméthilsiloxane contenant des fonctions chimiques pouvant réticuler, et un agent réticulant. Après mélange de 10 volumes de polymère pour 1 volume de réticulant, le PDMS doit être dégazé puis coulé sur les moules.

Une étape préalable de silanisation des moules améliore le démoulage. Cette étape se fait par dépôt en phase vapeur, en disposant simplement le moule et un peu de HMDS

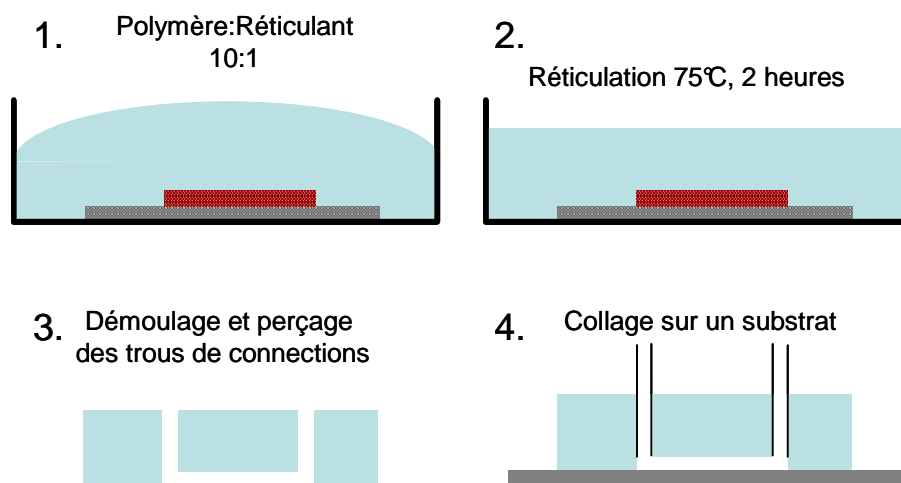


FIG. 1.3 – Méthode de fabrication pour des microsytèmes en PDMS simple couche.

dans une boîte hermétique pendant quelques minutes. Le moule recouvert de PDMS est alors mis au four à 75°C pendant 2 heures. A noter que la dureté finale du PDMS varie avec le temps de réticulation, la proportion de réticulant et le type de PDMS (le Sylgard est plus dur que le RTV).

Protocole de fabrication double couche

La technologie double couche ou MSL (Multilayer Soft Lithography) a été développée dans le groupe de Steven Quake à CalTech [4]. Cette technique permet d'intégrer des microactuateurs à l'intérieur même du PDMS. Son principe est très simple : le PDMS étant un élastomère particulièrement flexible (module d'Young ≈ 1 MPa), il est possible de pincer les canaux microfluidiques en déformant le PDMS, fermant ainsi le canal. Une méthode originale de fermeture est de disposer un canal actuateur séparé du canal microfluidique par une fine membrane de PDMS (typiquement $10 \mu m$) : la mise en pression de ce canal va déformer la membrane et obstruer le canal fluide. En contrôlant la pression dans le canal actuateur, on peut ainsi ouvrir et fermer la microvanne sur demande avec un volume mort quasiment nul.

La pression nécessaire pour fermer ces microvannes peut être très faible [17]. Ces pressions de fermeture varient typiquement de 0,1 à 1 bar pour des tailles de membrane de $100 \mu m$ à $650 \mu m$ de côté.

La mise en oeuvre de cette technologie nécessite la réalisation de 2 moules, un pour les canaux fluidiques et un deuxième pour les canaux d'actuation. La fine membrane est réalisée par spin coating du PDMS sur le moule fluide. Sur le moule actuateur, le moulage réalisé est plus épais et est collé sur la fine couche en utilisant un gradient de concentration de l'agent réticulant et du polymère [4].

La figure 1.5 décrit le protocole de fabrication :

- **Etape 1** : on prépare deux mélanges de PDMS : un mélange avec un rapport de polymère :réticulant de 20 :1, et un autre en quantité plus importante avec le

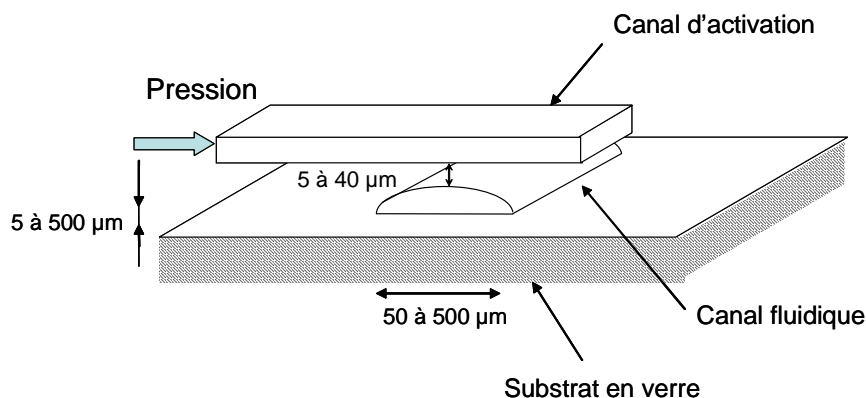


FIG. 1.4 – Disposition des canaux actuateurs et fluidiques pour la réalisation d’une microvannes intégrée.

Ω (tr/min)	2500	2000	1500	1250	1000	750
Epaisseur (μm)	27,8	38,5	50,3	59,5	74,9	101,3

TAB. 1.1 – Epaisseurs de PDMS pour différentes valeurs de vitesse de rotation. Le temps de rotation est de 40 s avec un pré-étalement de 10 s à 500 tr/min.

rapport 5 :1. Après dégazage, la fine couche est réalisée par spin coating. La partie plus épaisse du système (5 mm) est coulée sur le moule actuateur.

- **Etape 2** : les deux moulages sont alors mis au four à 75°C pendant 30 min. L’utilisation du Sylgard nécessite une attention particulière pour cette étape : réticulant plus vite que RTV, il faut sortir les moulages quand la fine couche est encore poisseuse et le mélange 5 :1 déjà solide.
- **Etape 3** : après perçage des trous de connexions pour les canaux d’actuation (voir paragraphe 1.2.4), la surface du moulage 5 :1 est rincé à l’éthanol. L’alignement des canaux d’actuation au dessus des canaux fluidiques peut se faire à l’oeil jusqu’à 50 μm de précision. L’ensemble est remis au four pour une à deux heures.
- **Etape 4** : L’ensemble est alors démoulé délicatement et les trous de connexions fluidiques sont réalisés. Un rinçage à l’éthanol avant le collage évite la présence de bulle d’air.

Le tableau 1.1 donne les épaisseurs de la couche de PDMS pour différentes vitesses de rotation. La viscosité du PDMS étant variable d’un lot à l’autre, ces valeurs sont indicatives.

1.2.3 Exemples de micro-vannes et de micro-pompes

Afin d’illustrer le fonctionnement des microvannes, nous avons réalisé une microvanne avec une membrane carrée de 450 μm de côté et de 30 μm d’épaisseur. Le canal fluide

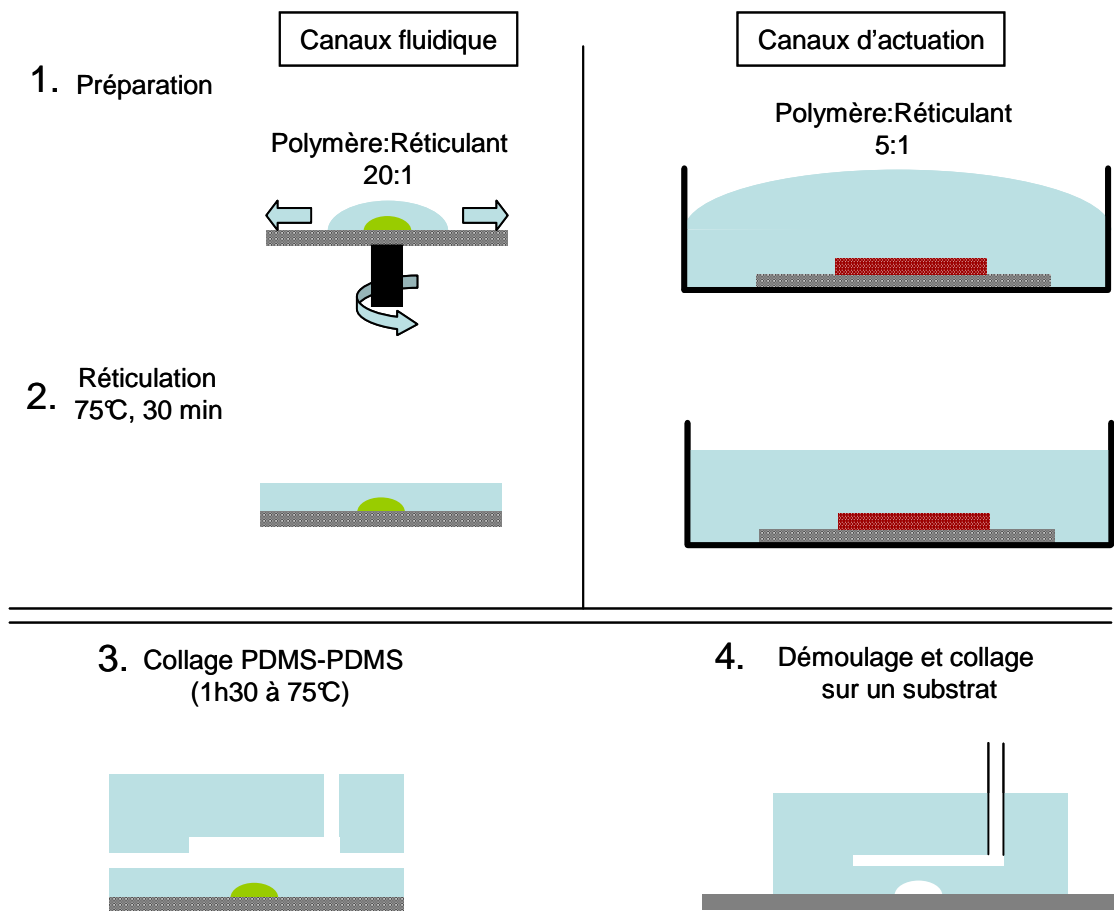


FIG. 1.5 – Etapes de la fabrication pour la réalisation de microsytèmes double couche.

est réalisé par moulage sur un moule arrondi (1.2.1) : sa section finale est parabolique ($450 \mu m$ de large et $30 \mu m$ de hauteur au centre).

La section des vannes de forme parabolique permet une bonne fermeture de la vanne [4] car le canal peut être complètement pincé. Pour des vannes de section rectangulaire, le pincement est mauvais sur les bords du canal et la membrane ne pourra obstruer complètement le canal.

La figure 1.6 montre un microcanal vu de dessus rempli de fluorescéine. On devine le canal actuateur qui le croise à angle droit. Lorsque la pression dans le canal actuateur augmente de 0 à 0,6 bar, le signal de fluorescence diminue, traduisant le pincement du canal fluidique. La série de profil montre la section du canal en fonction de la pression appliquée. On voit qu'en l'absence de pression, le profil du canal est parabolique (utilisation de la résine positive avec un melt bake) et que le profil s'affaisse jusqu'à devenir complètement plat. A 0,6 bar, la vanne est complètement fermée. Dans ce cas la résistance hydraulique augmente de plus de 5 ordres de grandeur.

Le pincement du canal par les membranes permet de réaliser des micro-pompes sur le principe de la pompe péristaltique : en pinçant à plusieurs endroit (au moins deux) le canal sur commande, le volume chassé par chaque vanne peut être converti en un débit dans un sens. La figure 1.7 montre une séquence d'actuation de trois vannes en série en 6 étapes. Dans le canal fluidique partiellement rempli de fluorescéine et d'air, on voit que

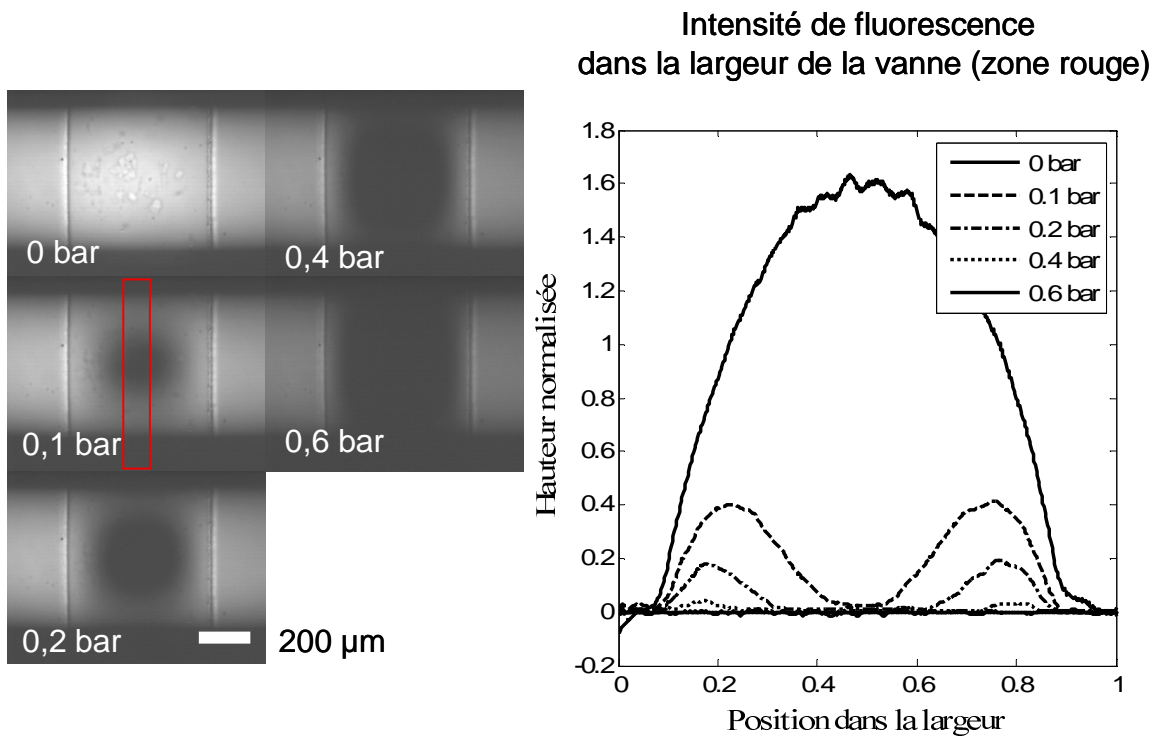


FIG. 1.6 – Images vues de dessus d’un microcanal muni d’une microvanne. En augmentant la pression dans le canal d’actuation, la membrane obstrue le canal, chassant la fluorescéine. Les profils de la section du canal au centre de la vanne sont représentés. On remarque que pour une pression de 0,6 bar ici, la vanne est complètement fermée.

le ménisque liquide-gaz avance sous l’effet du cycle péristaltique. Le comportement des micro-pompes sera étudié en détail au chapitre 2.

1.2.4 L’interface micro-macro

La connectique fluide entre les micro-canaux et l’extérieur est réalisée grâce à de fins tubes d’inco (diamètre extérieur 0,64 mm pour une longueur de 15 mm, disponible chez Phymep). Après perçage grâce à un emporte pièce de diamètre extérieur 0,72 mm, le PDMS est remis au four pendant une à deux heures. Le PDMS rétrécit au cours de sa réticulation, réduisant ainsi le diamètre du trou. Le tube d’inco est alors emmanché en force dans le PDMS et la connexion peut tenir jusqu’à 4 bars. Différents tubes suffisamment souples (PolyEthyène ou Tygon) de diamètres intérieurs 0,51 mm s’emmanchent sans problème dans les tubes d’inco et permettent un raccordement aux connectiques habituelles, comme les dispositifs Upchurch. La photo 1.8 illustre la méthode.

1.3 Remplissage des canaux

Le remplissage avec des solutions aqueuses des micro-canaux en PDMS est souvent problématique. Le PDMS étant naturellement hydrophobe, le remplissage est rarement parfait et des bulles d’air sont souvent piégées dans les canaux. En général, leur présence

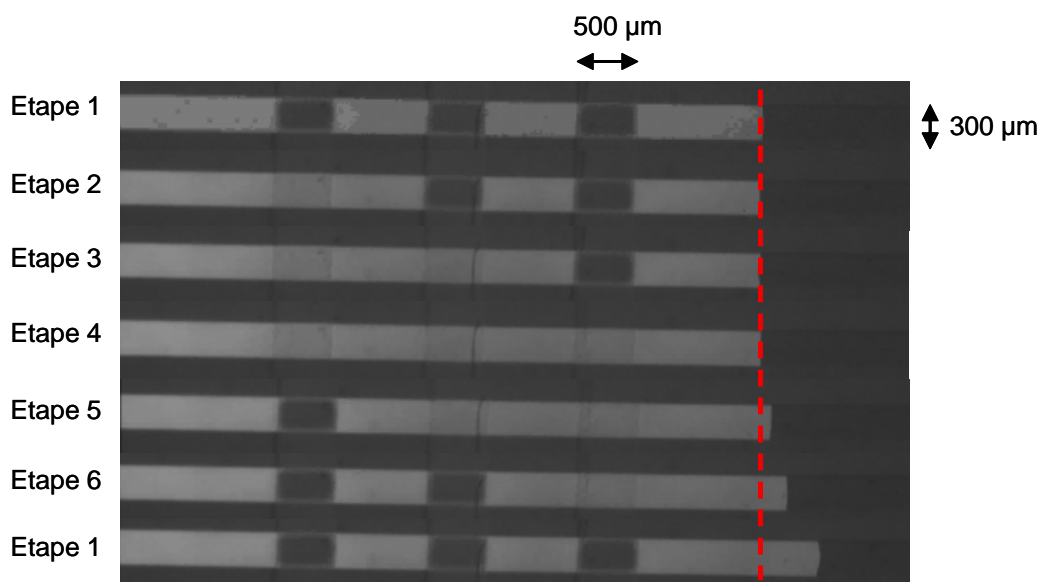


FIG. 1.7 – Vue de dessus de trois micro-vannes disposées à la suite. En les fermant séquentiellement selon un cycle péristaltique, un débit est généré : on voit l'interface de fluorescéine-air avancé.

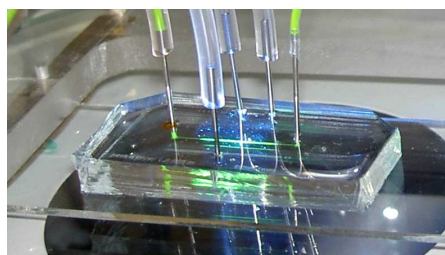


FIG. 1.8 – Photo illustrant la connectique réalisé à l'aide de tubes d'inox. On remarque qu'ils sont emmanchés dans le PDMS et dans le tube extérieur.

est catastrophique. La solution la plus couramment utilisée consiste à traiter le PDMS pour le rendre hydrophile, simplement en le rinçant avec une solution basique (0,1 NaOH), par activation plasma ou par d'autres méthodes de modifications d'état de surface du PDMS.

D'autre part l'utilisation du PDMS au dessus de la température ambiante s'accompagne généralement d'un dégazage du PDMS, ce qui obstrue les canaux de bulles de gaz¹. Ceci nécessite de mettre sous pression les canaux.

Une méthode simple de remplissage a fait l'objet d'un brevet au cours de la thèse [19]. Cette méthode permet à la fois d'éviter la formation de bulles d'air dans le PDMS pendant plus de 6 heures à 60°C, mais aussi de pomper passivement le liquide de l'extérieur vers l'intérieur du système.

Le principe de la méthode est basé sur le dégazage du PDMS : le dispositif est mis sous un vide primaire pendant plus de 2 heures, 5 heures étant un temps couramment utilisé. A la sortie de la cloche à vide, le PDMS appauvrit en air, récupère de l'air par ses

1. La quantité de gaz et en particulier d'air qui est présente dans le PDMS est considérable : à 28°C, il contient 0,22 cm^3 de volume d'air (calculé à 0°C pour 1 atmosphère, conditions STP) pour 1 cm^3 de PDMS à la pression atmosphérique. Cette quantité chute à 0,09 $cm^3(STP)/(cm^3.atm)$ à 35°C [18]

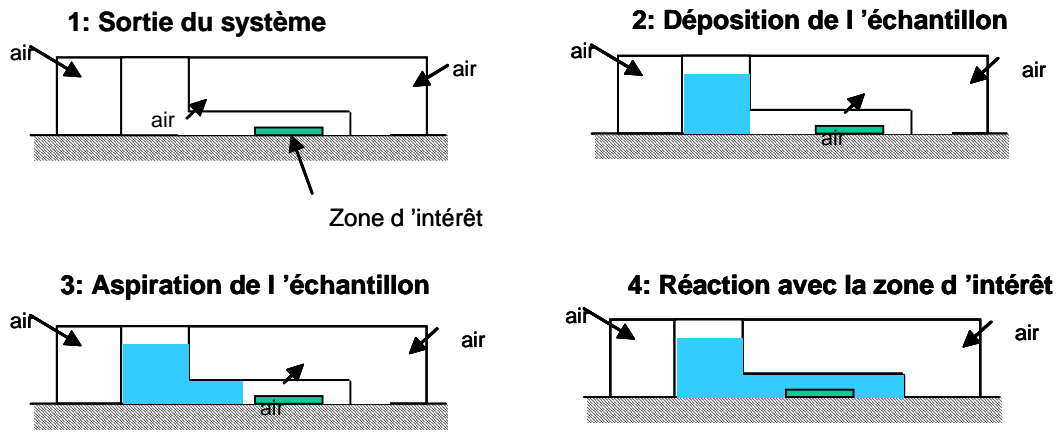


FIG. 1.9 – Effet de pompage passif permettant l'introduction d'un échantillon dans un dispositif microfluidique sans partie active.

surfaces, y compris celle qui forme les micro-canaux. Durant les 15 à 30 premières minutes après la sortie du vide, les le liquide à remplir est disposé aux extrémités des canaux. Les micro-canaux se remplissent passivement, car l'air présent est réadsorbé dans le PDMS.

Une autre application est l'utilisation du pompage passif. Par exemple la réalisation de test hétérogène, ou le mélange avec un autre réactif est possible sans élément actif. La figure illustre ces applications : une chambre connectée à l'extérieur par une seule entrée, contient une surface décorée d'une molécule réactive. Le dispositif emballé sous un étui sous vide, est sorti et l'échantillon est disposé à l'unique entrée : l'échantillon est alors pompé passivement à l'intérieure et le test peut se réaliser. Le même type de principe peut se réaliser avec deux ou plus de liquides.

Durant la thèse, cette méthode de mise en oeuvre a permis d'utiliser le PDMS à température élevée sans mettre sous pression les canaux. Les exigences d'étanchéité étaient donc moins fortes entre le verre et le PDMS, facilitant ainsi le collage.

1.4 Écoulement microfluidique

1.4.1 Les écoulements à bas nombre de Reynolds : équation de Stokes

Les écoulements dans les conduites utilisées en microfluidique sont caractérisés par des vitesses faibles sur des dimensions faibles. Dans ce cadre les effets d'inertie, qui gouvernent notre intuition dans la vie quotidienne, sont négligeables ici : les effets de viscosité sont prépondérants. Plus précisément, on mesure l'effet comparé de l'inertie et de la viscosité par le nombre de Reynolds, Re :

$$Re = \frac{\text{Forces d'inertie}}{\text{Forces de viscosité}} = \frac{\rho UL}{\mu} \quad (1.2)$$

avec U la vitesse du fluide, L une longueur caractéristique, ρ la densité du fluide et μ la viscosité dynamique. Pour un micro-canal de $100 \mu m$ et un écoulement d'eau de $100 \mu m/s$, on a $Re \approx 10^{-2}$.

Dans ce cadre, l'équation de Navier-Stokes pour un fluide newtonien incompressible s'écrit :

$$\rho \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \rho (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} = -\nabla p + \mathbf{f}_v + \mu \Delta \mathbf{v} \quad (1.3)$$

avec f_v les forces appliquées au fluide en volume. Cette expression peut se simplifier dans la gamme des nombres de Reynolds petits. En effet le terme de dérivé convective, source des phénomènes de turbulence, est négligeable devant le terme de frottement visqueux :

$$\frac{\|\rho (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v}\|}{\|\mu \Delta \mathbf{v}\|} \approx \frac{\rho U \frac{U}{L}}{\mu \frac{U}{L^2}} = Re \ll 1 \quad (1.4)$$

En régime stationnaire, l'équation de Stokes régit la plupart des phénomènes fluidiques des micro-systèmes :

$$-\nabla p + \rho f_v + \mu \Delta v = 0 \quad (1.5)$$

Pour des géométries simples, le profil est facilement calculable. Par exemple pour un écoulement entre deux plans très étendus séparés d'une distance h , le profil de vitesse est parabolique et est une fonction simple du gradient de pression $\frac{\partial p}{\partial x}$ le long du canal :

$$v_x(y) = -\frac{y}{h} \left(1 - \frac{y}{h}\right) \frac{h^2}{2\mu} \frac{\partial p}{\partial x} \quad (1.6)$$

avec x la coordonnée le long du gradient de pression, et y la coordonnée perpendiculaire aux plans.

Le débit s'écrit alors :

$$Q = -\frac{h^3 l}{12\mu} \frac{\partial p}{\partial x} \quad (1.7)$$

avec l la largeur considérée. Cette relation est valide pour les canaux de section rectangulaire dans lesquelles $h \ll l$. On remarque tout de suite le déséquilibre entre la petite dimension, h et la grande l sur le débit : une diminution par 2 de la hauteur diminue pratiquement d'un ordre de grandeur le débit, ou bien la pression à appliquer à débit fixé. Il est à noter que l'analogie électrique n'est pas complète : le champ de vitesse ne dérive pas d'un potentiel contrairement au champ électrique.

1.4.2 Equivalence électrique et formules pratiques

Notion de résistances et de capacités hydrauliques

Pour des écoulements monophasiques, l'équivalence électrique des circuits microfluidiques est possible grâce à la linéarité de l'équation de Stokes. Elle permet d'introduire facilement les notions de résistances et de capacités fluidiques, utiles pour le quotidien des expériences et la conception.

Dans le tableau 1.2, les grandeurs fluidiques avec leurs équivalents électriques sont rappelés.

Fluidique	Electrique	Unité microfluidique
Volume (m^3)	Charge (Coulomb)	1 μL
Pression (Pa)	Potentiel (Volt)	1 mBar
Débit (m^3/s)	Courant (Ampère)	1 $\mu L \text{ min}^{-1}$

TAB. 1.2 – Equivalence entre grandeurs fluidiques et électriques. Les unités SI sont entre parenthèse.

La notion de résistance hydraulique est assez intuitive : en considérant la relation 1.7 pour un canal de section $h \times l$ avec $h \ll l$ et de longueur L , une différence de pression P à ces extrémités provoque un débit Q qui vérifie :

$$Q = \frac{1}{R} P \quad (1.8)$$

On retrouve l'équivalent de la loi d'Ohm, avec pour R , l'expression suivante :

$$R = \frac{12\mu L}{h^3 l} \quad (1.9)$$

Comme en électricité, la résistance hydraulique est liée à une dissipation d'énergie.

La notion de capacité hydraulique est quant à elle à rapprocher de l'élasticité du milieu.

Une capacité se définit par l'augmentation de volume à la suite d'une augmentation de pression :

$$C = \frac{\partial V}{\partial P} \quad (1.10)$$

Un dispositif microfluidique est modélisable par une association de résistances et de capacités hydrauliques qui vont décrire le comportement de l'ensemble. Un pousse seringue sera l'équivalent d'un générateur de courant alors qu'une source de pression sera un générateur de tension.

Il est intéressant de noter que comme en électricité, le produit RC , homogène à un temps, est le temps caractéristique du système. Ceci peut être utile pour estimer le temps de réponse d'un pousse seringue C .

Résistances hydrauliques d'un canal de faible rapport d'aspect

Pour des canaux de faible rapport d'aspect, il est possible de modéliser le profil de vitesse simplement. Considérons un canal de largeur w et de hauteur maximum h_0 et ayant une section décrite par la fonction $h_0 H(2x/w)$ avec $x \in [-w/2, w/2]$ la coordonnée dans la largeur et $H \in [0, 1]$. Si on suppose de plus que $H(\pm 1) = 0$ et que $h_0 \ll w$, un développement asymptotique pour $\epsilon = h_0/w \rightarrow 0$ de la vitesse s'écrit :

$$v(x, z) = v_0(x, z) + \epsilon v_1(x, z) + o(\epsilon^2) \quad (1.11)$$

En utilisant l'équation de Stokes 1.5 avec un gradient de pression $\frac{\partial p}{\partial y}$, on obtient pour le terme d'ordre zéro :

$$v_0(x, z) = -z(h_0 H(2x/w) - z) \frac{1}{2\mu} \frac{\partial p}{\partial y} \quad (1.12)$$

La vitesse moyenne U dans la section du canal s'écrit alors simplement :

$$U = - \frac{\int_{-1}^1 H(u)^3 du}{\int_{-1}^1 H(u) du} \frac{h_0^2}{12\mu} \frac{\partial p}{\partial y} \quad (1.13)$$

Pour avoir le débit, il faut multiplier par la section du canal $S = \frac{h_0 w}{2} \int_{-1}^1 H(u) du$. La résistance hydraulique du canal de longueur L vaut alors :

$$R = \frac{24}{I_3} \frac{L\mu}{h_0^3 w} \quad (1.14)$$

avec $I_n = \int_{-1}^1 H(u)^n du$.

Pour une section parabolique $H(X) = 1 - X^2$, on trouve $R = \frac{105}{4} \frac{\mu L}{h_0^3 w}$

Formules pratiques de résistances hydrauliques

Le but de ce paragraphe est de fournir au lecteur des formules pratiques de résistances et de capacités pour des éléments couramment rencontrés. L'expression d'un débit microfluidique en m^3/s est contraire au bon sens et nous avons adapté les unités à la microfluidique pour calculer des ordres de grandeurs très facilement. Le tableau 1.2 décrit les unités qui seront utilisé pour les formules.

Le tableau 1.3 donne les expressions pour les résistances en Ohm liquide (Ωl) défini en annexe C. Par exemple, on veut connaître la pression qu'il faut appliquer pour avoir un débit de $10 \mu L/min$ dans un canal rectangulaire de $300 \mu m$ de large, $20 \mu m$ de haut et de 3 cm de long. La résistance hydraulique vaut $\frac{200 \times 3}{2^3 \times 3} = 25 \Omega l$ et la pression a appliqué vaut $P = RQ = 25 \times 10 \text{ mBar} = 0,25 \text{ Bar}$.

	Tube cylindrique	Canal de section rectangulaire	Canal de section parabolique
Resistance	$\frac{0,68 L_{cm}}{d_{100\mu m}^4}$	$\frac{200 L_{cm}}{h_{10\mu m}^3 l_{100\mu m}}$	$\frac{440 L_{cm}}{h_{10\mu m}^3 l_{100\mu m}}$
Expression	$\frac{128 \mu L}{\pi d^4}$	$\frac{12 \mu L}{h^3 w}$	$\frac{105 \mu L}{4 h^3 w}$

TAB. 1.3 – Valeurs de résistances hydrauliques en Ohm liquide (Ωl) pour de l'eau ($\mu = 1 \text{ mPas}$) pour différents types de canaux en unités microfluidiques. Les quantités en indices indiquent l'unité des longueurs : si $h=30\mu m$, il faut mettre $h=3$ dans la formule. Pour le canal parabolique, h correspond à la hauteur au centre du canal.

L'annexe C donne un exemple de d'utilisation d'équivalence électrique permettant d'estimer le temps de réponse d'un pousse seringue.

Limite de linéarité de la résistance dans les canaux en PDMS

Dans un canal de section parabolique ($227 \mu m$ de largeur sur $24,2 \mu m$ de haut au centre et de $2,8 \text{ cm}$ de long), nous avons mesuré le débit en fonction d'une pression imposée. Après une dépendance linéaire très bien décrite par la formule du tableau 1.3, le débit dévie de la loi linéaire pour des pression supérieures à 600 mBar . Ceci est dû à la déformation du PDMS : la section du canal s'agrandit sous la pression dans le canal, augmentant ainsi le débit (figure 1.3). La prise en compte de la déformation du PDMS conduit à une meilleure caractérisation [20].

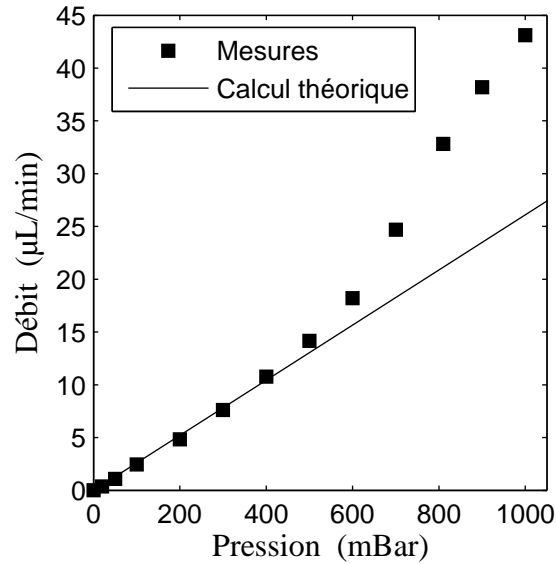


FIG. 1.10 – Mesures de débit pour différentes pressions aux extrémités d’un micro-canal : après un régime linéaire bien décrit par les formules du tableau 1.3, le débit dévie de la loi à cause de la déformation du PDMS.

1.5 Conclusion

Dans cette partie, nous avons décrit les technologies de mise en forme du PDMS utilisées au cours de la thèse. Les protocoles de fabrication des moules et la réalisation des moulages en PDMS sont commentés pour faciliter la fabrication. Ces techniques permettent de microfabriquer des actuateurs intégrés contrôlant les liquides à l’échelle du nanolitre.

Une méthode de remplissage basée sur le dégazage du PDMS a été breveté : éliminant la présence de bulle dans les micro-canaux, y compris au-dessus de la température ambiante, elle permet aussi de pomper passivement les liquides à l’intérieur des canaux.

Finalement après un bref rappel des propriétés des écoulements à faible nombre de Reynolds, une équivalence électrique des circuits hydrauliques est décrite ainsi que des formules pratiques de calculs de résistance.

Chapitre 2

Etude expérimentale et modélisation des micro-pompes péristaltique en PDMS

Il vaut mieux pomper même s'il ne se passe rien que de risquer qu'il se passe quelque chose de pire en ne pompant pas.

Jacques ROUXEL

2.1 Introduction

La réalisation de dispositifs complexes d'analyses nécessite des outils de conception. Les éléments de base, comme les micro-vannes et les micro-pompes ont des performances qui dépendent a priori de nombreux facteurs et il est important de les caractériser. Ce travail a déjà été mené pour les micro-vannes [17], notamment au niveau de la pression de fermeture. En revanche, en ce qui concerne les micro-pompes en PDMS, peu d'études ont été réalisées [21, 22]. De plus, ces micro-pompes ont un certain nombre de limitations : le débit maximum reporté est de l'ordre de $0,14 \mu\text{L}/\text{min}$ [4], ce qui n'est pas suffisant pour résoudre l'interface micro-macro. Passer d'un volume macroscopique, entre $100 \mu\text{L}$ et 10 mL , aux volumes de la microfluidique de l'ordre du nanolitre, demanderait des heures sans l'utilisation d'un pompage extérieur.

Présenté sous la forme d'un article publié dans *Journal of Applied Physics*, ce chapitre décrit une étude expérimentale des différents paramètres géométriques et opérationnels des micro-pompes a été réalisée. Un modèle physique basé sur une équivalence électrique d'une vanne a permis de comprendre et de modéliser les mesures expérimentales et de prévoir les performances des micro-pompes. Grâce à cette étude, le débit maximum atteint est de $7,5 \mu\text{L}/\text{min}$, un peu moins de 2 ordres de grandeur supérieur aux débits précédemment reportés.

2.2 Experimental study and modeling of polydimethylsiloxane peristaltic micropumps

Experimental study and modeling of polydimethylsiloxane peristaltic micropumps

Jacques Goulpeau^{a)}

Microfluidique, MEMS et Nanostructure (MMN), Unite Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS) 7083, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI), 10 rue Vauquelin, 75005 Paris and Bertin Technologies, Saint-Quentin-en-Yvelines, France

Daniel Trouchet

Bertin Technologies, Saint-Quentin-en-Yvelines, France

Armand Ajdari and Patrick Tabeling

Microfluidique, MEMS et Nanostructure (MMN), Unite Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS) 7083, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI), 10 rue Vauquelin, 75005 Paris

(Received 29 December 2004; accepted 16 May 2005)

We present here an experimental study of three-valve peristaltic micropumps fabricated using polydimethylsiloxane multilayer soft lithography, along with a simple model representing their behavior. Variations of the generated flow rate with peristaltic cycle frequencies, design parameters, actuation pressures, and fluid viscosities are analyzed experimentally for a set of ten micropumps. The largest flow rates are obtained for particular “optimal” basic parameters (actuation pressures and cycle frequencies) that depend on design features. A single-valve model, based on nonlinear equivalent electrical circuits, is numerically and analytically solved in relevant cases, leading to qualitative and quantitative agreements with experiments. From this theoretical study, useful predictive rules are deduced for pump design. The maximum flow rate we could achieve is $7.5 \mu\text{L}/\text{min}$, one order-of-magnitude improvement compared to the highest level reported for this particular type of micropump. The design of the actuation system—including both internal and external micropump elements—was found crucial to achieving high flow rates. © 2005 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.1947893]

I. INTRODUCTION

Microfluidics is a field that provides tools and concepts for elaborating complex lab-on-a-chip devices, but the way towards the elaboration of highly sophisticated systems able to drive fluids through mazes of microchannels is still paved with considerable difficulties. In this area, it seems crucial to be able to directly integrate actuators on the chip since it is difficult to conceive of a large number of independent fluid handling operations being performed by a few external devices. From this standpoint, polydimethylsiloxane (PDMS) is an advantageous material, because valves and pumps can be easily integrated thanks to its elastomeric properties.¹ PDMS is not the only material in which actuators have been made. For example, silicon oxide actuators have been reported,² however, their complexity is such that they offer little promise for integration on elaborate lab-on-a-chip devices. In contrast, PDMS actuators have been shown to be suitable for moderate and large scale integrations. This has been demonstrated in devices for nucleic acid analysis,³ and more recently for proteomic applications⁴ in which a protein separation and digestion have been implemented on a chip. In this area, an impressive achievement reported recently is a PDMS crystallizer, operating with minute quantities of proteins ($1.4 \mu\text{L}$), and actuated by thousands of integrated valves.⁵

In PDMS technology, active elements are fabricated using multilayer soft lithography (MSL) technique. Valves are formed at the intersection between a working channel and an actuation channel located in two separate layers. When pressure is increased in the actuation channel, the membrane separating the two channels deflects and closes the working channel, blocking the flow inside. Assembling three valves in series, one can fabricate peristaltic pumps. In comparison with nonintegrated systems, these elements considerably reduce dead volumes and in turn improve flow control. PDMS biocompatibility has been checked for polymerase chain reaction,⁶ cell sorting, and bacteria analysis,^{7,8} thus strengthening the relevance of this particular material for biological applications. PDMS does have a few drawbacks—in particular, its lack of temporal stability of its surface properties—but is altogether very interesting for lab-on-a-chip applications.

PDMS micropumps have a number of limitations at the moment; the maximum flow rates reported so far do not exceed $0.14 \mu\text{L}/\text{min}$,¹ which is not enough to resolve so-called world-to-chip interfacing problems. Biological sample volumes typically range between $100 \mu\text{L}$ and 10 mL , while microchips typically handle dozens of nanoliters. It would therefore take several hours to deal with a sample with their current performance. Consequently external pumps are used to inject volumes of any biomedical interest into microsystems, and it would be highly desirable to have alternative

^{a)}FAX: +33 1 40 79 51 57; electronic mail: jacques.goulpeau@espci.fr

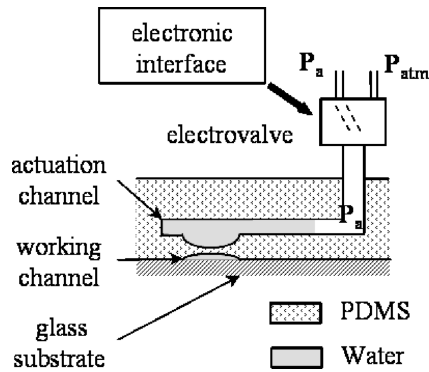


FIG. 1. Sketch of a single valve.

solutions. For example, integrated pumps would present interesting functionalities by coupling integrated injection with cell capture units—e.g., based on dielectrophoresis⁹—or with concentration units—e.g., based on solid-phase extractions.¹⁰

PDMS micropump modeling is currently scarce and there is a great lack of guidelines to improve their performance, i.e., through the choice of rational basic parameters (cycle frequencies and actuation pressures) and the design features. Although PDMS valves have been studied previously,¹¹ laying significant basis for the understanding of their static behavior, a comprehensive rationale for pumps still remains to be achieved. Other peristaltic pumps received detailed experimental interest,^{12,13} but the knowledge gained there is hardly transferable to PDMS pumps, due to substantial geometrical, physical, and operational differences. It is thus worthy and timely to construct a model of PDMS peristaltic pumps, and this is what the present paper is aiming at.

In Sec. II, the experimental setup is described. Then (Sec. III), extensive flow rate measurements are presented as a function of actuation pressures, cycle frequencies, fluid viscosities, and membrane geometries. From this study, optimal basic parameters are identified and their values are shown to be related to design features. In particular, cut-off frequencies reducing the pump performance and optimal actuation pressures are studied. In Sec. IV, we introduce a simple non-linear model for each valve that is used to describe the dynamics of the pump. Models and experiments are then compared (Sec. V), showing close agreement on both qualitative and quantitative levels, and a discussion about the scaling of the pump performance with miniaturization is proposed. This work provides guidelines to maximize the flow rate by improving the pump design for a given fluidic network on which it operates. A micropump 450 μm wide and 44 μm high delivering a flow rate of 7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ —one order of magnitude above the highest flow rates reported in the literature—was fabricated.¹

II. EXPERIMENTAL SETUP

The peristaltic micropump is composed of three valves (Fig. 1) actuated according to the peristaltic cycle displayed in Fig. 2. The valves are in the “push-down” geometry where the working channel is below the actuation channel,¹¹ and the deflected membrane moves down to block the fluid when pressure is applied to the actuation channel (Fig. 1). Com-

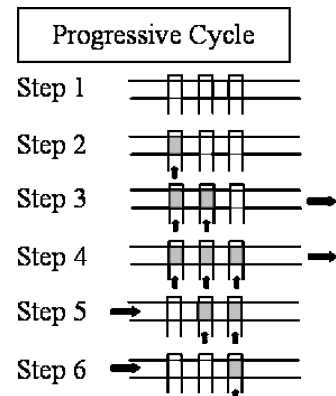


FIG. 2. Peristaltic cycle studied in this work. The gray valves are closed, and the clear ones are opened. The arrows represent an output or input of an elementary volume, being the volume under a valve (V_v).

pared with the “push-up” geometry where the working channel is above the actuation channel and the deflected membrane moves up, the push-down geometry allows developing larger elastic forces.

The valves have been made using MSL technique described in Ref. 1. The mold for working channels was made out of the SJR 5740 positive photoresist from Shipley. The photoresist was spin coated at 1000 rpm for 10 s at 20 °C and patterned by standard photolithography using a printed slide as a mask. After development, the photoresist was heated above its glass transition temperature (120 °C during 20 min) thus allowing the photoresist to reflow, which in turn rounded the working channels cross section. The molds for actuation channels were made out either of SU8-2015 or SU8-2100, using the same mask. Mold A was made out of SU8-2015 spin coated at 1000 rpm for 30 s on a 4-in. silicon wafer. After patterning the photoresist with standard photolithography, the resulting height measured using a profilometer was 33.7 μm with a rectangular shape. As to mold B, SU8-2100 was spin coated at 2000 rpm for 30 s on a 4-in. silicon wafer, its resulting height being around 130 μm .

After exposing the molds for a few minutes to vapor hexamethyldisilazane to avoid sticking during mold release, a 1:5 mix of curing agent and silicone elastomer (Sylgard 184 from Corning) was poured on the actuation mold placed in a reservoir.

A 5-mm thickness was necessary to obtain good fluidic connections. A 1:20 mix of the same components was spin coated onto the working mold at 1250 rpm for 40 s. Varying the composition of curing agent and silicone elastomer allows the bonding between the two layers.¹ The thickness of the working channel layer is controlled by the spin coating speed and the mixture viscosity. This parameter and the working channel height control the membrane thickness. In present conditions the working channel layer is 75 μm thick.

Both layers were placed at 75 °C in an oven and after a 20-min curing, constant attention was required to take out the actuation channel layer (1:5 mix) as soon as the layer started to reticulate. This step was critical since too long a cure would strongly decrease the layer bonding quality. After peeling off the actuation layer, the access holes for the actuation channels were punched using a 20-G right luer stub

TABLE I. Mold dimensions used to fabricate the ten pumps studied in the present paper. All lengths are in microns, h and w meaning height and width, respectively, and the indices w and a meaning working and actuation channel, respectively.

Name	w_w (μm)	h_w (μm)	w_a (μm)	h_a (μm)	V_v (nL)
550 A	540	46.9	539	33.7	9.1
500 A	469	46.0	487	33.7	7.0
450 A	431	44.5	437	33.7	5.6
400 A	398	44.5	400	33.7	4.7
250 A	243	41.4	250	33.7	1.7
550 B	540	46.9	539	130	9.1
500 B	469	46.0	500	137	7.2
450 B	431	44.5	439	143	5.6
400 B	398	44.5	400	136	4.5
250 B	243	41.4	229	136	1.5

adapter. This layer was then aligned with the working channel layer by eye. In order to ensure good alignment between the two layers, the crosses were specially designed on both layers and they were used as references when aligning. The resulting precision was better than $100\ \mu\text{m}$ typically. During this step, the only critical aspect was to keep the system symmetric in order to control the pump position with respect to the ends of the working channel. Indeed by this method, valves were positioned at the working channel midpoint with satisfactory precision—roughly $100\ \mu\text{m}$ which is small compared to the working channel length (20 mm). The bonding between the two layers was achieved by baking at $75\ ^\circ\text{C}$ for 2 h. The bonded layers were then peeled off and fluidic access holes were punched. Then the chip was reversibly sealed onto a precleaned glass cover slide (rinsed with acetone, toluene, and ethanol, drying with nitrogen between each solvent rinsing). The chip fabrication was completed with an ultimate baking at $75\ ^\circ\text{C}$ for 24 h.

As sketched in Fig. 1, high-speed LEE electrovalves (LHDA0533115H) controlled by a LABVIEW program connect the actuation channel either to regulated pressure P_a or to atmospheric pressure P_{atm} to close or open the valves. Note that this scheme that allows pushing the valve on demand is attractive because of its simplicity, but may in some cases be less efficient than a driving pressure also allowing one to pull on the valve, e.g., by a connection to a second pressure source at a value lower than atmospheric pressure. The tubes connecting actuation holes and LEE electrovalves were 12 cm long and filled with air. In order to avoid bubble formation in the working channel due to air diffusion through the PDMS membrane, actuation channels were filled with water. Fast electronic control circuits for the LEE electrovalves along with small actuation volumes allowed working with pressure switch time below 0.5 ms.

To drive the pump, we used the progressive peristaltic cycle sketched in Fig. 2. The flow rate in the working channel was obtained by tracking the displacement of a meniscus located in a 0.51-mm inner diameter polyethylene tube connected to the micropump. The range of flow-rate measurements we addressed extends from 0.02 to $7.5\ \mu\text{L}/\text{min}$, and the relative precision was better than 4%.

Actuation channels were filled with de-ionized (DI) wa-

ter. The working fluid was a mixture of DI water and glycerol. Before conducting the experiments, $0.1M$ NaOH was flushed in working channels to turn the PDMS hydrophilic. Noticeably, this preparation was found to prevent bubble formation and to reduce adhesion between the membrane and the glass substrate. Using a mixture of glycerol and DI water allowed varying the working fluid viscosity by one order of magnitude. The mixture viscosity was determined by measuring the hydraulic resistance of the same microchannel with the different solutions.

In the present work, we made ten distinct micropumps by varying channel widths and actuation channel heights. Their characteristics are displayed in Table I. In all cases, the actuation channel width was such that the valve membrane is a square. Three geometrical dimensions of the pumps were kept fixed; the three valves were 1 mm apart, the actuation channels 8.15 mm long, and the working channels 20 mm long. For all of them, the membrane thickness at the thinnest point was $30\ \mu\text{m}$. In our study, we varied some internal dimensions of the actuation and working circuits, as displayed in Table I (with Fig. 3 providing the corresponding definitions). Table I also indicates the volume enclosed below the valve, given by the formula $V_v = 2/3 h_w w_w w_a$ ($2/3$ coming from a parabolic approximation of the round cross section of the working channel). All dimensions (molds, moldings, and channels) were systematically checked with a profilometer and with a microscope using a $\times 63$ objective.

As shown in Table I, two sets of pumps were studied: in the five micropumps of the first set (set A) the actuation

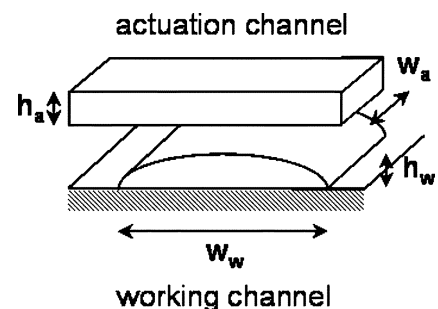


FIG. 3. Dimensions of the working and actuation channels, corresponding to the notations in Table I.

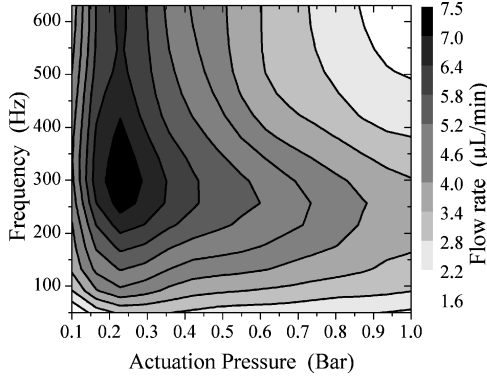


FIG. 4. Contour plot of flow rates ($\mu\text{L}/\text{min}$) vs cycle frequencies (hertz) and actuation pressures (bar) (micropump 450 A).

channels were $33.7 \mu\text{m}$ high, whereas the actuation channels were much larger for the five micropumps of the second set (set B), with heights ranging from 130 to $143 \mu\text{m}$. For all the ten pumps the channels width (working and actuation channels) was almost identical. In both sets A and B this common value varied from 243 to $540 \mu\text{m}$.

III. EXPERIMENTAL RESULTS

The experiments we describe here were made by imposing atmospheric pressure to working channel ends. In these conditions, Fig. 4 represents flow rates for the 450-A micropump versus actuation pressures and cycle frequencies. Throughout this work, the cycle frequency stands for the inverse of the delay between two steps of the peristaltic cycle (Fig. 2). Figure 4 is a two-dimensional (2D) plot representing isoflow rate lines, in a range of frequencies varying from 50 to 630 Hz and in a range of actuation pressures lying between 0.1 and 1 bar. This 2D plot is supplemented by Fig. 5,

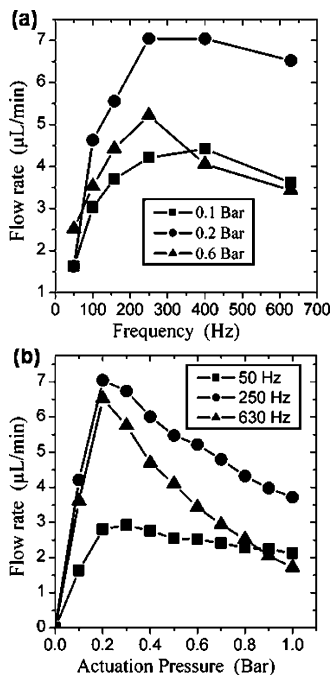


FIG. 5. Flow-rate evolutions vs cycle frequencies and pressure amplitudes. (a) $P_a=0.1, 0.2, 0.6$ bar. (b) $f=50, 250, 630$ Hz.

TABLE II. Experimental results for each micropump. V_v is the volume under a valve, V_0 the volume expelled per cycle, f_c the characteristic frequency, and P_{op} the optimal actuation pressure.

Name	V_v (nL)	V_0 (nL)	f_c (Hz)	P_{op} (bar)
550 A	9.1	9.6	21 ± 1	0.1
500 A	7.0	6.6	82 ± 5	0.2
450 A	5.6	6.3	82 ± 2.5	0.25
400 A	4.7	3.2	159 ± 20	0.3
250 A	1.7	1.4	228 ± 43	0.9
550 B	9.1	10.0	63 ± 2	0.1
500 B	7.2	8.5	63 ± 2	0.15
450 B	5.6	5.3	95 ± 7	0.2
400 B	4.5	3.6	160 ± 7	0.3
250 B	1.5	2.0	367 ± 12	0.7

displaying (a) the flow-rate evolution with cycle frequencies for different actuation pressures and (b) the flow-rate evolution with actuation pressures for different cycle frequencies.

Figures 4 and 5(a) show that the flow rate first increases linearly with the frequency up to 250 Hz, after which it decreases. At low frequencies, as frequency is raised, volumes are expelled or withdrawn along the working channel more frequently, increasing flow rates. At large frequencies, valves cease to follow the excitation and then a flow-rate saturation is observed. The further decrease of the flow rate at larger frequencies, is due to the finite-time response of the actuation circuit. This will be analyzed later on.

Concerning the influence of actuation pressures, we obtain a flow-rate increase in the low-pressure range, followed by a decrease at larger amplitudes [see Figs. 4 and 5(b)]. The first regime can be understood by noting that as the actuation pressure is increased, the membrane is more deflected and consequently the volume displaced at each valve actuation is larger, leading to larger flow rates. This evolution ceases to hold at large actuation pressures where a gradual flow-rate decrease is observed. The 2D plot of Fig. 4 shows the existence of an optimal pressure—called P_{op} —for which the flow rate is maximum. Remarkably, P_{op} is roughly independent of the frequency. Its value turns out to be close to the minimal pressure needed to close a single valve. The optimal pressure thus appears as the actuation pressure maximizing the flow rate. For the particular pump studied in Fig. 4, the “optimal” pressure is around 0.25 bar. Optimal actuation pressures measured for the other pumps are given in Table II. We have studied how P_{op} varies with the valves geometry. Figure 6 shows P_{op} as a function of the inverse of the membrane surface S defined by the formula $S=w_w w_a$. We obtain a linear trend in the form

$$P_{op} = \kappa/S, \quad (1)$$

where κ is a force estimated to be 4.7×10^{-3} N. Given the observation that in all cases this pressure value is comparable with the pressure required to close a single valve, the scaling is consistent with a recent report.¹¹ We did not attempt any further study of the dependence of κ upon elastomer material properties—as suggested in Refs. 11 and 14—a difficult task

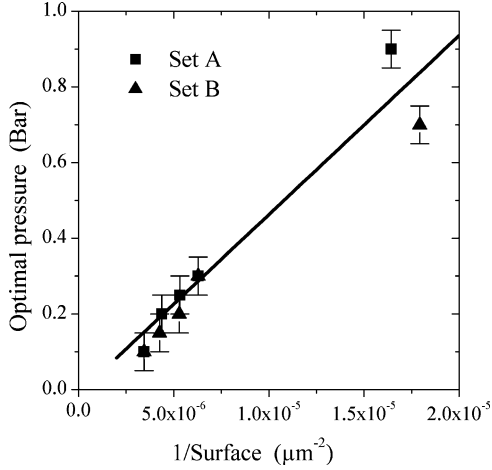


FIG. 6. Optimal pressures vs the inverse of the membrane surface. The full line corresponds to equation $P_{op} = \kappa/S$, κ being a force equal to 4.7×10^{-3} N.

owing to the number of parameters such a study would have to handle.

Let us fix the actuation pressure at its optimal value P_{op} and systematically study flow rate Q versus actuation frequency f , for all the pumps described in Table I. The measurements are shown in Fig. 7. They are represented in rescaled units, using two parameters, V_0 and f_c , obtained by fitting the data to a first-order high-pass filter [$Q(f) = V_0 f / 6 \sqrt{1 + (f/f_c)^2}$]. The corresponding value for volume V_0 and cut-off frequency f_c are listed in Table II, and will be discussed later on. Obviously they directly determine the maximum achievable flow rate and the corresponding operation conditions.

For all pumps, a linear regime is observed at low frequencies, which suggests that a given volume V_0 is expelled at each cycle. Table II shows that this effective expelled volume is close to the volume below each valve. This is quite surprising, since we could have expected $V_0 = 2V_v$ with the peristaltic cycle we used (see Fig. 2). A possible explanation is that when two membranes are in series, the closure of one valve slightly opens its neighbor, which induces a leakage. This explanation is supported by a separate experiment in which the amount of fluid expelled at each step within one cycle was measured in a particular setup.

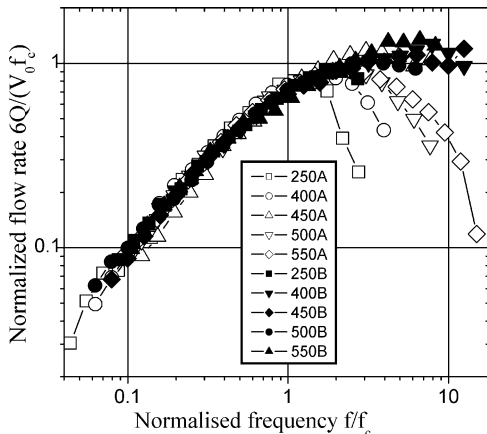


FIG. 7. Flow rates normalized by maximum flow rate $Q_{max} = 1/6 V_0 f_c$ vs cycle frequencies normalized by the characteristic frequency (f_c).

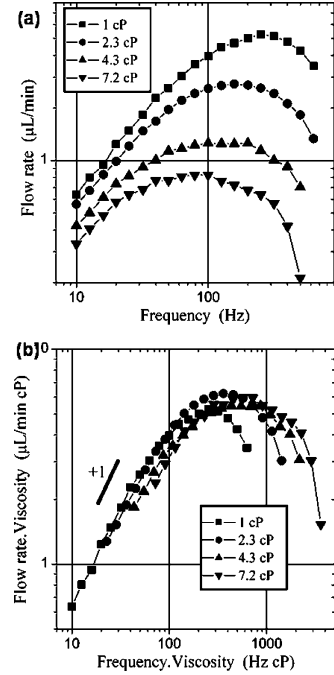


FIG. 8. Flow rates vs cycle frequencies for different working fluid viscosities (micropump 450 A). (a) Raw data. (b) Flow rates vs frequencies rescaled with the working channel viscosity.

At higher frequencies flow rates level off for the pumps of set B, while after a plateau it decreases for the pumps of set A. This behavior indicates the existence of one or two cross-over frequencies, depending on pump dimensions.

We now study f_c with the working fluid viscosity, concentrating on one particular micropump (450 A). Figures 8(a) and 8(b) show flow rates versus actuation frequencies for the pump, varying the working channel viscosity from 1 to 7.3 cP, all other parameters being kept fixed. In Fig. 8(a), a set of curves is obtained, whose shape is similar to those of Fig. 7; a linear increase with frequencies in the low-frequency range, followed by saturation and a decrease at large frequencies. The low-frequency range is controlled by the working fluid viscosity; in Fig. 8(b), the same data one shown, now plotting flow rates multiplied by the viscosity against frequencies multiplied by the viscosity. The previous three regimes are recovered somehow more neatly. The rescaling in Fig. 8(b) indicates that first crossover f_c is inversely proportional to the working fluid viscosity.

This suggests that pump performances are dependent on the hydrodynamic resistance of the external working circuit, i.e., the circuit on which the pump is acting. In our attempt to figure out which physical quantities control f_c , we found that f_c is proportional to the ratio $P_{op}/R_w V_v$, where R_w is the hydrodynamic resistance of the external circuit, as shown in Fig. 9. This relation will be shown to be consistent with the simple model outcome presented in Sec. IV. In practice, resistance R_w was calculated with the following equation:¹⁵

$$R_w = 105 \eta_w L_w / 4 l_w^3 w_w, \quad (2)$$

where L_w stands for the working channel length and η_w stands for the working fluid viscosity.

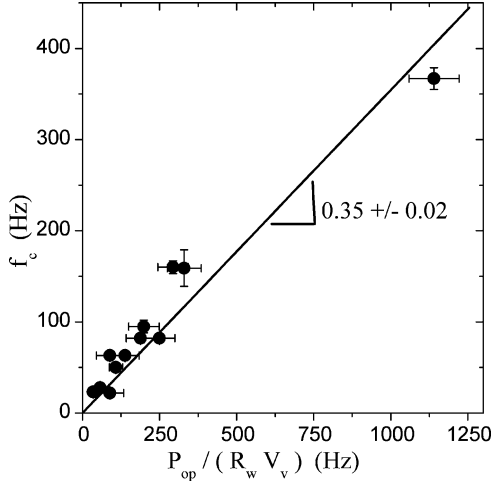


FIG. 9. Characteristic frequencies vs a combination of operational valve parameters.

On physical ground, one may note that V_v/P_{op} represents an estimate for the membrane capacity and $P_{op}/R_w V_v$ represents the inverse of a characteristic time formed with the product of the membrane capacity and the working channel hydrodynamic resistance. Thus from the plot in Fig. 9 it can be deduced that f_c is controlled by the membrane characteristics and the working circuits; this conclusion provides important information for the pump design. We will offer an interpretation for this result later on.

The second cut-off frequency for the pumps of set A at high frequencies appears to be controlled by the *actuation fluid*, not the working one. This was shown by varying the actuation fluid viscosity, all the other parameters being kept constant. Plots similar to Fig. 8 indicate that second cross-over frequency f_c is proportional to the inverse of the actuation fluid viscosity. By increasing actuation channel heights, its hydrodynamic resistance decreases, which leads to a faster actuation and a corresponding substantial increase for f_c , without affecting f_c . This is precisely what the micropumps of set B achieve; these pumps have larger actuation channels, thus showing no flow-rate decrease at higher frequencies (in the experimental range of frequencies explored).

IV. A SIMPLE MODEL FOR PERISTALTIC PUMPS

In the model presented here for three-valve peristaltic pumps, we consider that the role of the peristaltic cycle is essentially to rectify the alternating flow produced by each separate valve which leads us to first analyze an individual valve. To put it simply, each valve is modeled as a piston connected to a spring, under the influence of actuation pressure P_a , as shown in Fig. 10(a).

The application of pressure P_a pushes the piston downwards, squeezing the liquid and progressively closing the hydrodynamic circuit. The mechanical system in Fig. 10(a) is represented as an equivalent electrical circuit in Fig. 10(b). The membrane complex elastic deformation (see Ref. 11) is simply represented by linear capacity C , connected in series with a nonlinear resistor r which can be expressed as

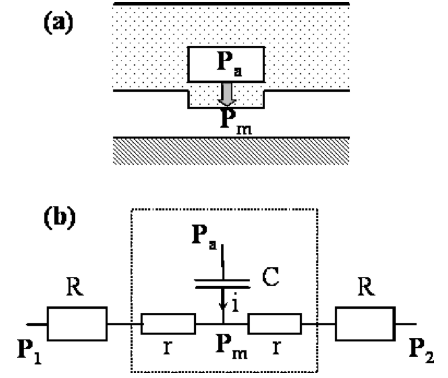


FIG. 10. (a) Simplified mechanical model for a valve. (b) Equivalent electrical circuit. The intrinsic pump modeling is pointed out by the dashed square. R stands for the working channel hydraulic resistance.

$$r = \frac{r_0}{2[1 - (P_a - P_m)/P_c]^3}, \quad (3)$$

where r_0 is the open valve resistance, P_m is the average pressure below the membrane, and P_c is the closure pressure, i.e., the pressure required to close the valve completely (raising resistance r to infinity). The specific nonlinearity in Eq. (3) corresponds to the Reynolds model for a piston approaching a surface where the lubrication approximation is used to describe the growing viscous resistance as the piston approaches the opposite wall. In order to compare with experiments, volume below the valve V_v is directly related to capacity C and closure pressure P_c by

$$CP_c = V_v. \quad (4)$$

The external circuit is simply described by its hydrodynamic resistance R , which amounts to neglecting the channel elastic deformability.

The model can be numerically solved for arbitrary values of inlet and outlet pressures P_1 and P_2 . We focus here on the simple but experimental relevant situation where both are taken equal to zero. The system response to a given actuation $P_a(t)$ is then described by

$$(R + r)C \frac{d\Pi}{dt} + 2\Pi = 2P_a(t), \quad (5)$$

where Π is given by

$$\Pi = P_a - P_m. \quad (6)$$

Equation (5) was numerically solved, for different parameters values, concentrating on the physically relevant situations when r_0 is much smaller than R (in practice $r_0/R \approx 0.01$). In these simulations, we assumed that the actuation has a positive square-wave form, with levels varying between 0 and P_a , consistently with the driving pressure of each valve in the experiments. We also conducted analytical study of Eq. (5), which can be viewed as describing the driven motion of an overdamped particle in a potential. In particular, analytical solutions can be found in the limit of small (but nonzero) values of r_0/R , which become insensitive to the value of this ratio and more importantly insensitive to the particular form of the specific nonlinear law cho-

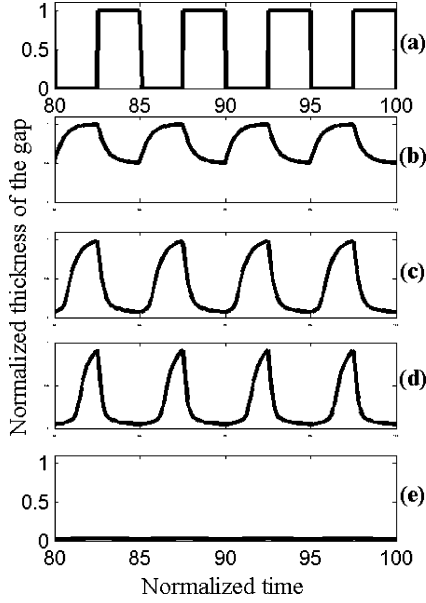


FIG. 11. Evolution of the membrane position in time for four different actuation pressures. Time is normalized by RC . (a) Actuation pressures vs time. (b) $P_a=0.5P_c$. (c) $P_a=1.2P_c$. (d) $P_a=1.5P_c$. (e) $P_a=2P_c$.

sen to describe the resistance [Eq. (3)]. This guarantees the generality of the features described by the numerical results below.

Figure 11 shows the calculated evolution of the quantity $h=1-\Pi/P_c$ in time, which represents the membrane position in dimensionless units; $h=1$ corresponds to a fully open valve, $h=0$ corresponds to the membrane touching the bottom wall of the valve. Figure 11 shows four cases for P_a lower and larger than closure pressure P_c . When P_a is below P_c , the membrane stays close to the upper level $h=1$. In this regime h increases linearly with P_a . By contrast, for values of P_a larger than P_c , the membrane tends to stay close to the lower level $h=0$. The physical origin of such a behavior is that friction increases so much close to the wall that the membrane is unable to detach appreciably during the periods when $P_a=0$. For larger values of P_a the midpoint of the oscillations actually continuously drifts towards the wall, resulting in a continuously decreasing oscillation amplitude.

Let us focus on the average measure of the “rectified” current produced by each branch of this valve as defined by

$$I = \langle |i(t)| \rangle \quad (7)$$

where the brackets mean time averaging. This quantity is easily shown to be proportional to oscillations amplitude $|h_{\max}-h_{\min}|$ multiplied by the driving frequency. As will be discussed later, I is related to the current produced by a pump made with three valves connected in series, considering that the role of the peristaltic cycle is to “rectify” the current produced by each individual valve.

The evolution of dimensionless current $J=IR/P_c$ with actuation pressures and cycle frequencies is displayed on a 2D plot, using dimensionless units (see Fig. 12). Cuts at various levels are shown in Fig. 13. We restricted the present study to a range comprised between 0 and $2P_c$ for actuation

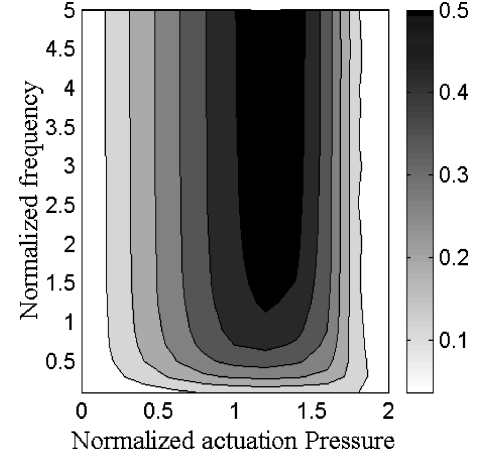


FIG. 12. Isopleth 2D plot of rectified intensities J , for $r_0/R=0.01$. Time is normalized by RC .

pressures and between 0.1 and $4/RC$ for cycle frequencies, a range that will appear to be relevant as regards the experimental domain we investigated.

Taking these dimensionless quantities, these plots only depend on ratio r_0/R . Nonetheless, both the numerical and the analytical study showed that this ratio has little effect on the results (provided it is small, and nonzero); therefore we may consider the plots in Figs. 12 and 13 as “universal.”

Figure 13(a) shows that as frequencies increase, dimensionless rectified current $J=IR/P_c$ produced by a valve tends to saturate. The saturation occurs for a cycle frequency on the order of $2/RC$, for any amplitude P_a in the range of $0-1.5P_c$. This saturation origin is due to the fact that at large frequencies, the membrane no longer follows the excitation, and in turn the rectified intensity levels off. Inspecting the equivalent electrical circuit, the saturation level obtained at large frequencies is $P_a/2P_c$, an estimate which is consistent with numerics. Well above P_c , the membrane almost remains closed, giving rise to a strongly nonlinear behavior. Theoretically analyzing equation (5) shows that whatever the ratio r/R_c , J tends to zero for $P_a/P_c \geq 2$. This analytical result is fully coherent with the numerical findings.

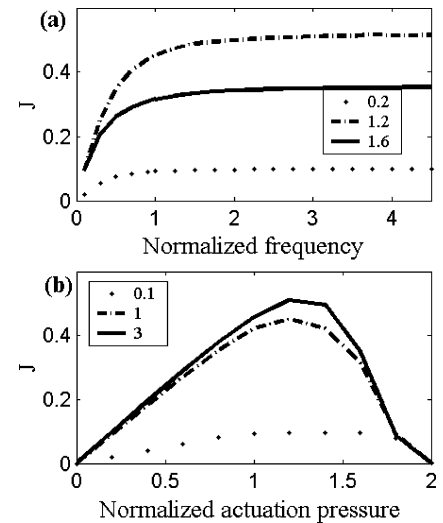


FIG. 13. Dimensionless current J vs cycle frequencies and actuation pressures P_a , for different parameters. (a) $P_a/P_c=0.2, 1.2, 1.6$. (b) $fRC=0.1, 1, 3$.

The evolution of dimensionless current J with actuation amplitude ratio P_a/P_c , for various frequencies, is shown in Fig. 13(b). First J increases with P_a/P_c because the membrane deflection gets larger. Then it reaches a maximum for P_a close to $1.2P_c$, and eventually it collapses for higher pressures. The collapse origin can be understood inspecting Fig. 11; at large actuation pressures the membrane permanently keeps the circuit closed. As was previously discussed, this apparent sticking effect originates in the fact that it takes time to displace the fluid below the membrane so as to re-open the valve. Then the membrane stays almost permanently at the lower level and J is close to vanishing out.

The 2D plot in Fig. 12 summarizes these behaviors. Moreover it neatly reveals the optimal pressure existence, for which the intensity is maximum whatever the cycle frequency between 0.1 and 5 $1/RC$ units. In the present case, the optimal pressure is around $1.2P_c$.

In order to adapt the results obtained on a single valve to peristaltic pumps, one may assume that the role of the peristaltic cycle in Fig. 2 amounts to rectifying the flow rate produced by each valve. Inspecting the complete cycle shows that the net current thus produced is equal to the rectified intensity calculated for a single valve modified by a factor of one-third—as the cycle expels two volumes over six steps. In order to estimate the maximum flow rate the pump can deliver, one must consider the high-frequency limit of the valve model, fixing actuation pressure P_a at its “optimum” value. At large frequencies, membrane capacity C is a short circuit, and the averaged rectified current through one branch can be directly calculated. When applied to peristaltic pumps in Fig. 2, calculation provides the following formula for the maximum flow rate:

$$Q_{\max} \approx 1.2P_c/3R. \quad (8)$$

An expression for the cross-over frequency above which the pumping flow rate levels off can also be determined. Here again, by transposing the results obtained for a single valve, cross-over frequency f_c may be estimated by fitting the calculated data to a first-order high-pass filter (as in the experimental section),

$$f_c \approx \frac{0.54}{RC}. \quad (9)$$

V. DISCUSSION AND DESIGN CONSIDERATIONS

Both the model and the experiment can be compared with each other. We have the following elements obtained in both cases: (i) the 2D diagrams representing flow rates versus actuation pressures and cycle frequencies along with the various cuts are similar both in theory and in experiment; (ii) furthermore the existence of a cross-over frequency above which flow rates level off (pumps from set B) is obtained in both model and experiment. As regards pumps from set A, the flow rate decreases at higher frequencies because of the actuation circuit dynamic limitations—not accounted for in the model—and eventually (iii) the optimal actuation pressure existence, marking the flow-rate maxima locations on the 2D plots, is obtained both in theory and in experiment.

At a quantitative level, optimal pressures are close to closure pressures in both theory and experiment. In order to examine cross-over frequencies f_c , one must note that in the model this quantity can be written as

$$f_c = \frac{0.54}{RC} = 0.45 \frac{P_{\text{op}}}{R_w V_v}, \quad (10)$$

which remarkably fits to the experiments displayed in Fig. 9 (a linear fit gives a coefficient of 0.35), considering the numerous approximations we made to find this result. Similarly, we obtained agreement between the model and the experiment on the flow rates produced by the pump, provided the leakage mentioned in the experimental part is properly taken into account. Thus we have satisfactory agreement concerning the two most important pump characteristics.

Furthermore, the influence of the working fluid viscosity is well described by the model as the hydraulic resistance is proportional to it [Eq. (11)]. We may further derive relations useful for the peristaltic PDMS micropump design. Taking into account Eq. (1) for the relation between the closure pressure and the membrane area, cross-over frequency f_c and maximum flow rate Q_{\max} can be estimated by

$$f_c \propto \kappa h_w^2 / w_w^3 L_w \eta_w, \quad Q_{\max} \propto \kappa h_w^3 / w_w L_w \eta_w. \quad (11)$$

If we further assume that κ is proportional to membrane thicknesses, as suggested in Ref. 11, we have scaling relations that describe how these characteristics are modified if the scale is modified. Multiplying all the geometrical dimensions of the pump by a factor λ provides the following equations:

$$f_c \propto \lambda^{-1}, \quad Q_{\max} \propto \lambda^3, \quad P_{\text{op}} \propto \lambda^{-1}. \quad (12)$$

Equation (12) shows a general scaling trend. We see that increasing the pump size increases the maximum flow rate it can deliver; in the meantime, one operates at smaller frequency. A strategy for increasing the flow rate produced by peristaltic pumps would thus be to increase their sizes, as much as can be done. However, integration difficulties can appear and another issue may be the parallel decrease of the membrane elasticity possibly raising closing difficulties. But all dimensions scaled in Eq. (12) are not necessarily interdependent, and a possible solution for increasing flow rates without changing P_{op} could consist in increasing working channel heights keeping the other dimensions constant. The height effect on maximum flow rate is important (a factor of 2 in height will increase the flow rate by 8) as long as the ratio h/w is low.¹

VI. CONCLUSION

This paper has reported an experimental study of three-valve peristaltic micropumps fabricated using MSL technology in PDMS. Systematic measurements were performed on a set of ten micropumps enabling to understand all relevant parameters that influence pump performance. From this study, the optimal basic parameters suitable for obtaining large flow rates were found closely related to the design feature, in particular, to the hydraulic network resistance where the pumped fluid is flowing. Despite its simplicity, the model

presented here is relevant to observations at both qualitative and quantitative levels and simple design rules have been deduced from it. Moreover, the actuation system was pointed out as an important element to achieve high flow rates and it has been improved using high actuation channels that strongly decrease their hydraulic resistance and so their time response. In the same way, a height increase in working channels to about $44\ \mu\text{m}$ improves the maximum flow rate to $7.5\ \mu\text{L}/\text{min}$ (micropump 450 A), one order of magnitude above the highest level reported for this particular type of micropump.

- ¹M. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherre, and S. Quake, *Science* **288**, 113 (2000).
²D. Maillefer, S. Gamper, B. Frehner, P. Balmer, H. van Lintel, and P. Renaud, *Proceedings of the MEMS 2001, Interlaken, 2001* (unpublished), pp. 414–417.
³J. Liu, C. Hansen, and S. Quake, *Anal. Chem.* **75**, 4718 (2003).
⁴E. Brunet, A. Dodge, S. Chen, J. Goulpeau, V. Labas, N. Royer, J. Vinh, and P. Tabeling, *Proceedings in $\mu\text{TAS}2004$, 2004* (unpublished), p. 545.
⁵C. L. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger, and S. Quake, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. **99**, 16531 (2002).

- ⁶J. Liu, M. Enzelberger, and S. Quake, *Electrophoresis* **23**, 1531 (2002).
⁷A. R. Wheeler *et al.*, *Anal. Chem.* **75**, 3249 (2003).
⁸J. W. Hong, V. Studer, G. Hang, W. F. Anderson, and S. R. Quake, *Nat. Biotechnol.* **22**, 435 (2001).
⁹P. R. C. Gascoyne and J. Vykoukal, *Electrophoresis* **23**, 1973 (2002).
¹⁰M. C. Breadmore *et al.*, *Anal. Chem.* **75**, 1880 (2003).
¹¹V. Studer, G. Hang, A. Pandolfi, M. Ortiz, W. F. Anderson, and S. Quake, *J. Appl. Phys.* **95**, 393 (2004).
¹²W. H. Grover, A. M. Skelley, C. N. Liu, E. T. Lagally, and R. A. Mathies, *Sens. Actuators B* **89**, 315 (2003).
¹³J. M. Berg, R. Anderson, M. Anaya, B. Lahlouh, M. Holtz, and T. Dallas, *Sens. Actuators, A* **104**, 6 (2003).
¹⁴D. T. Eddington, W. C. Crone, and D. J. Beebe, *Proceedings in $\mu\text{TAS}2003$, 2003* (unpublished), p. 1089.
¹⁵We consider a microchannel with a low aspect ratio ($h \ll W$) with a round cross section. Then we can assume that a Poiseuille flow is developed in the height of the channel. The average velocity in a channel slice along the width is $v_a(x) = -h^2(x)/12\eta(\partial P/\partial y)$ (the y axis is parallel to the channel and the x axis is orthogonal to it). Assuming a parabolic approximation for cross sections $\{h(x) = h_0[1 - (2x/w)^2]\}$ we can calculate the total flow rate in the channel produced by the spatial pressure gradient. The resulting hydraulic resistance is $105\eta L/4h_0^3w$. The adequacy with experimental measurements is better than 12%.

2.3 Conclusion

Nous avons présenté à travers cet article une étude approfondie du fonctionnement des micro-pompes réalisées en PDMS double couche. L'influence de la géométrie et des paramètres opérationnels (fréquence et pression d'actuation) ont été étudiés expérimentalement, ainsi que la hauteur des canaux d'actuation. Un modèle, basé sur une équivalence électrique d'une vanne a été résolu numériquement et analytiquement et a montré un bon accord qualitatif et quantitatif avec les mesures de débit.

Des formules prédictives du débit maximum ont donc été établies sur des bases expérimentales et théoriques. Celle-ci est essentiellement fonction de la pression de fermeture des micro-vannes et de la résistance hydraulique du canal. Ces résultats constituent des outils de conception pour l'intégration de ces micro-pompes dans des systèmes complexes.

Chapitre 3

La dispersion de Taylor-Aris dans les micro-canaux

En mathématiques, on ne comprend pas les choses, on s'y habitue.

John von NEUMANN

EN dehors des effets électrocinétiques, les écoulements microfluidiques se caractérisent par une forte dispersion de vitesse dans la section des canaux. Alors que la vitesse est rapide au centre, elle est nulle proche des parois. Cette dispersion étale et dilue les espèces en solution et ceci est particulièrement gênant lors du transport d'un échantillon : dans un dispositif complexe de traitement, le passage d'une étape de traitement à l'autre s'accompagne forcément d'une diminution de concentration, ce qui nuit à la sensibilité de l'ensemble.

La caractérisation de ces phénomènes est indispensable. Couplée à la diffusion massique des espèces, la première partie rappelle les éléments principaux de ce couplage, connu sous le nom de la dispersion de Taylor-Aris. Cet effet, qui représente la plupart du temps une difficulté, peut être mis à profit pour le mélange : un dispositif mélangeur-doseur est décrit dans l'annexe D au niveau théorique et expérimental. De plus, dans certaines conditions que nous expliciterons, la dispersion est indépendante du coefficient de diffusion des espèces : nous montrerons expérimentalement la faisabilité de gradients de concentration utilisant ce principe.

3.1 Introduction à la dispersion de Taylors-Aris

3.1.1 Le cas simple d'un écoulement de Poiseuille

Comme nous l'avons vu dans la première partie (voir 1.4.1), à bas nombre de Reynolds le profil de vitesse est parabolique pour un écoulement entre deux plans parallèles. Dans

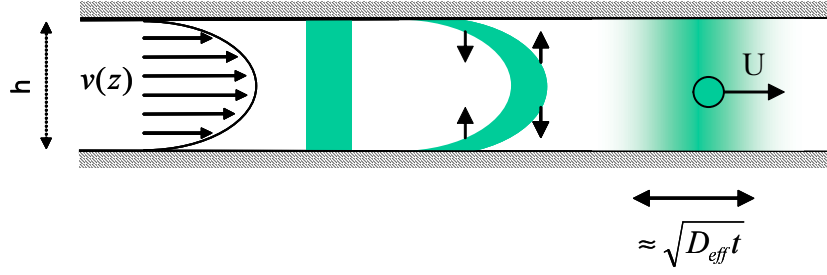


FIG. 3.1 – Illustration de la dispersion de Taylor-Aris dans un écoulement de Poiseuille. Le volume contenant une espèce diffusante (rectangle vert) est d’abord étalé par la dispersion de vitesse. Puis sous l’effet de la diffusion transversale, l’espèce diffusante est homogénéisée dans la section du canal. L’étalement se décrit alors par un coefficient effectif de diffusion dans la direction de l’écoulement.

ce cas particulier, la vitesse au centre est 1,5 fois plus grande que la vitesse moyenne, alors que la vitesse au bord des parois est nulle :

$$v(z) = \frac{3}{2}U \left(1 - \left(\frac{2z}{h} \right)^2 \right) \quad (3.1)$$

avec U la vitesse moyenne, h la hauteur du canal et z l’altitude dans le canal comprise entre $-h/2$ et $h/2$. Cette dispersion de vitesse, couplée à la diffusion perpendiculairement à la direction de l’écoulement, est la base de la dispersion décrite pour la première fois par Taylor en 1953 [23] et complétée par Aris peu après [24].

La figure 3.1 illustre le couplage entre la dispersion de vitesse et la diffusion. Considérons un volume d’échantillon contenant une espèce diffusante transportée dans une telle conduite. Ce volume, symbolisé par le rectangle vert sur la figure, est d’abord étiré par la dispersion de vitesse. A partir d’un certain moment, de l’ordre du temps de diffusion dans la hauteur, la diffusion homogénéise l’espèce dans la section du canal. L’étalement se décrit alors par un coefficient de diffusion effectif dans la direction de l’écoulement. Ce coefficient de diffusion effectif dépend de la vitesse moyenne U , de la hauteur h et du coefficient de diffusion d’origine thermique de l’espèce D_{th} :

$$D_{eff} = D_{th} + \frac{1}{210} \frac{U^2 h^2}{D_{th}} \quad (3.2)$$

Le premier terme de droite correspond à la diffusion d’origine thermique de l’espèce dans la direction de l’écoulement. Ce terme est la plupart du temps négligeable devant le deuxième, qui résulte du couplage entre diffusion transversale et advection. Ainsi le centre de masse se déplace à la vitesse moyenne de l’écoulement U et la distribution de soluté est contrôlée par une équation de diffusion :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{eff} \frac{\partial^2 C}{\partial x'^2} \quad (3.3)$$

avec $x' = x - Ut$ la coordonnée dans le sens de l’écoulement et dont l’origine correspond

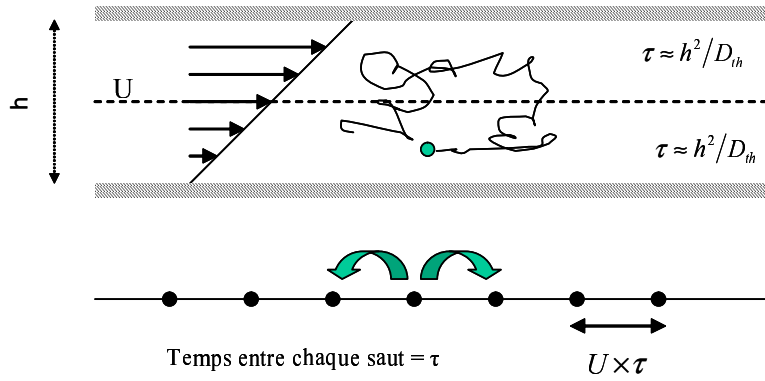


FIG. 3.2 – Explication qualitative du coefficient effectif de diffusion dans la dispersion de Taylor-Aris.

au centre de masse du soluté¹

3.1.2 Régimes intermédiaires pour l'écoulement de Poiseuille

Pour que le couplage entre la diffusion et la dispersion de vitesse soit établi, il faut attendre un temps de l'ordre du temps caractéristique de diffusion dans la hauteur. Après ce temps, l'étalement d'une espèce diffusive est décrite par la dispersion de Taylor-Aris. Avant, c'est uniquement la dispersion de vitesse qui étale l'espèce : on est alors dans un régime balistique.

Le temps d'établissement est généralement court : il représente une faible fraction du temps de diffusion dans la hauteur h^2/D_{th} . Pour l'écoulement de Poiseuille décrit précédemment, le temps d'établissement du régime de Taylor-Aris est $0,043 h^2/D_{th}$ [25, 26].

Ainsi l'étalement moyen Δx par rapport à son centre de masse augmente d'abord linéairement en fonction du temps, à cause de la dispersion de vitesse. Puis la dispersion se fait selon un mode diffusif, fonction de la racine du temps.

1. On peut par un raisonnement physique simple retrouver l'expression 3.2. Considérons un profil de vitesse modélisé par un cisaillement pure (figure 3.2). La conduite s'étend sur une distance h . Dans la moitié supérieure ($z > h/2$), la vitesse est supérieure à la vitesse moyenne U , alors que dans la partie inférieure ($z < h/2$), la vitesse est inférieure. Considérons maintenant une particule diffusante de coefficient de diffusion D_{th} . Le temps de résidence moyen d'une particule dans la partie supérieure ou inférieure est de l'ordre de $\tau = h^2/D_{th}$. Pendant ce temps τ , la particule va se déplacer à cause du fluide d'une distance de l'ordre de $l = U \times \tau$ si elle est dans la partie supérieure et $-l$ si elle est dans la partie inférieure. En moyenne, tous les temps τ , la particule aura une chance sur deux d'être dans la partie supérieure ou inférieure du canal. Cette description est tout à fait comparable à une marche aléatoire où la particule se déplacerait sur un réseau discret à une dimension avec un intervalle entre chaque position l , et un temps entre chaque saut de τ . Le coefficient de diffusion effectif selon cette description est :

$$D_{eff} \propto \frac{l^2}{\tau} = \frac{U^2 h^2}{D_{th}} \quad (3.4)$$

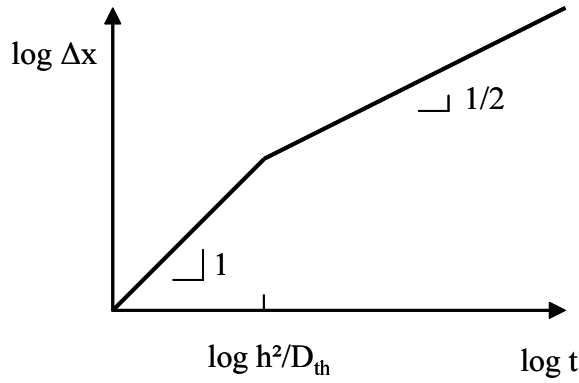


FIG. 3.3 – Régimes de dispersion pour un écoulement plan-plan : à temps court l'espèce s'étire sur une distance typique Δx qui augmente proportionnellement au temps. Quand la diffusion est établie dans la hauteur, le régime de Taylor-Aris décrit l'étirement par un coefficient de diffusion effectif : Δx augmente proportionnellement avec la racine du temps.

3.1.3 Cas particulier des canaux arrondis : régimes supplémentaires

Dans les paragraphes précédents, nous avons présenté la dispersion de Taylor-Aris dans le cas d'un écoulement simple de Poiseuille entre deux plans parallèles infinis. Ceci nous a permis d'en appréhender la phénoménologie générale. La dispersion dans les canaux microfluidiques s'accompagne de quelques subtilités aux conséquences parfois importantes.

Par exemple, le coefficient de diffusion effectif dans un micro-canal de section rectangulaire ne se ramène pas à l'écoulement de Poiseuille entre deux plaques. Même si la hauteur h est très petite devant la largeur w [25], le coefficient de diffusion effectif est environ 8 fois supérieur ($D_{eff} \approx \frac{8}{210} \frac{U^2 h^2}{D_{th}}$).

En particulier pour les canaux de section arrondie, la phénoménologie de la dispersion de Taylor-Aris s'enrichit d'un régime supplémentaire [26]. Prenons le cas d'un canal de section parabolique qui nous intéresse ici, car elle permet la réalisation de micro-vannes hermétiques. A temps très court, de la même façon que dans le cas précédent, la diffusion n'a pas eu le temps d'agir et les espèces sont transportées par advection par le champ de vitesse $v(x, z)$: c'est le régime balistique décrit à la figure 3.4. La dispersion du soluté est alors contrôlée par la dispersion de vitesse dans la section.

Après un temps de l'ordre de h^2/D_{th} et avant un temps de l'ordre de w^2/D_{th} , la diffusion est établie dans la hauteur mais pas encore dans la largeur du canal : un régime de dispersion de Taylor-Aris est donc seulement établi dans la hauteur. Dans ce régime intermédiaire, pour chaque position x , le centre de masse est transporté à la vitesse moyenne $v_m(x)$ dans la hauteur. Il est important de noter que la gamme de temps correspondant à ce régime est assez étendue pour les microcanaux. Pour une situation classique où $h/w = 0,1$, un facteur cent sépare les deux temps bordant ce régime.

Pour des temps supérieurs à w^2/D_{th} , la diffusion est établie dans toute la section du canal : on retrouve une dispersion de Taylor-Aris où le soluté est transporté à la vitesse

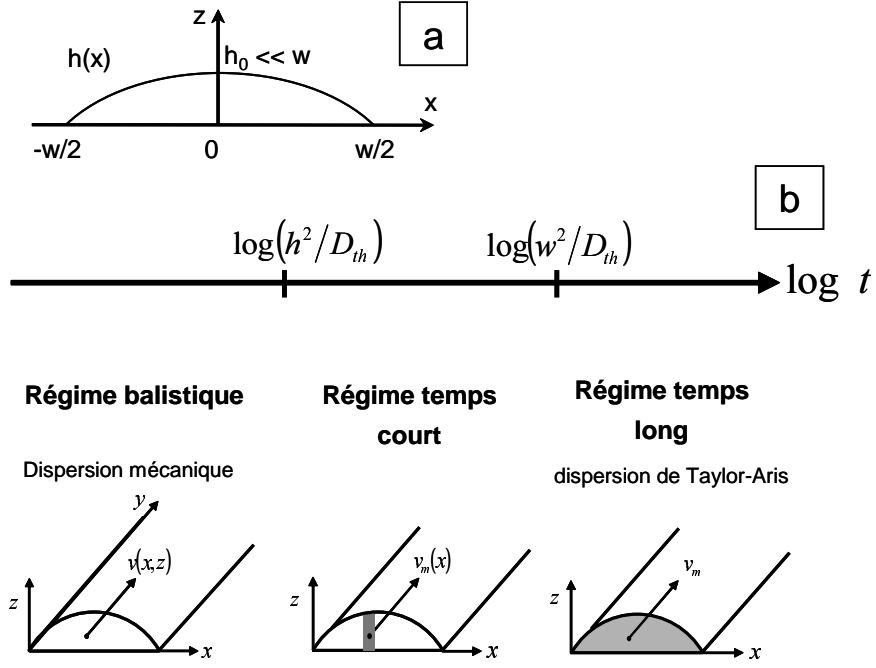


FIG. 3.4 – Différents régimes de dispersion dans un canal arrondi : régime balistique, à temps court et à temps long.

Régime	Limite temporelle
Balistique	$t < 0,043 h_0^2/D_{th}$
à temps court	$0,043 h_0^2/D_{th} < t$ $t < 0,035 w^2/D_{th}$
à temps long	$0,035 w^2/D_{th} < t$

TAB. 3.1 – Limites temporelles des différents régimes de dispersion dans des canaux de section parabolique.

moyenne du fluide. La longueur caractéristique à prendre en compte pour le coefficient effectif est alors la largeur w .

Pour le régime des temps long, le coefficient de dispersion de Taylor-Aris pour une section parabolique s'écrit [26] :

$$D_{eff} = D_{th} + 0,0031 \frac{U^2 h^2}{D_{th}} \quad (3.5)$$

Avec les mêmes techniques que dans l'article de Ajdari *et al* [26], on déduit les limites temporelles des différents régimes de dispersion dans un canal de section parabolique (tableau 3.1). Brièvement, le temps de transition entre chaque régime est déterminé en comparant l'écart type Δx de concentration dans les trois régimes.

3.2 Réalisation de gradients de concentration dans des canaux arrondis

Comme nous venons de le voir, la phénoménologie de dispersion dans des canaux arrondis est plus riche que pour les canaux rectangulaires. L'étude précise du régime "à temps court" nous a permis de mettre en évidence une particularité de ce régime. Sous certaines conditions que nous allons préciser, la dispersion est indépendante de la diffusion de l'espèce en solution.

Ceci ouvre la possibilité de réaliser des gradients de concentration le long d'un canal indépendamment des propriétés de diffusion des espèces. Avec un dispositif pouvant "geler" l'écoulement à un certain moment, par exemple en segmentant le canal en différentes chambres, un gradient de concentration est réalisé. La technologie des actuateurs intégrés dans le PDMS permet une telle réalisation.

3.2.1 Introduction aux gradients de concentration

Pour différentes problématiques, il est important de pouvoir faire varier facilement les conditions expérimentales d'un système et ceci est d'autant plus intéressant dans un environnement microfluidique, où les petits volumes permettent de considérablement diminuer la consommation des réactifs et d'étudier des systèmes de petites tailles, comme les cellules vivantes. Générer des gradients de concentration est donc un enjeu important, qui suppose en microfluidique une manipulation précise des écoulements.

Comme applications importantes, on note entre autre la recherche des conditions optimales de cristallisation de protéines [27, 28], ou l'étude du comportement de cellules vivantes dans des gradients de concentration d'une espèce active [29]. La mise en oeuvre de gradient de concentration ne se limite cependant pas à ces applications phares et l'intérêt de gradient contrôlé se retrouve dans la mise au point de chimie de surface [30] ou de procédés de fabrication [31].

Plusieurs principes permettent de réaliser des gradients avec des niveaux de contrôle variables. Le cône de diffusion d'un co-écoulement [32] entre deux liquides différents est une méthode simple [33, 34] mais qui dépend du coefficient de diffusion de l'espèce. La disposition adéquate de réservoir de soluté [35] permet de résoudre ce problème. Une autre approche consiste à effectuer des dilutions successives [31, 36] dont les détails permettent de réaliser quasiment toutes les formes de gradient [37].

La méthode originale que nous présentons ici est basée sur une description fine du régime à temps court de la dispersion de Taylor-Aris [7] : en plus de ne consommer que très peu de liquide (60 nL), les gradients sont indépendants de la diffusion et ne dépendent que de la géométrie des micro-canaux. Le gradient réalisé par étirement hydrodynamique est ensuite "gelé" grâce à un actuateur qui segmente le canal en une multitude de chambres isolées. Une succession de concentration est alors produite dans chaque chambre.

3.2.2 Modélisation du régime à temps court : sous régime indépendant de la diffusion

Considérons un micro-canal préalablement rempli d'un liquide pur. A $t=0$, un liquide contenant un soluté à la concentration C_0 est introduit dans le canal. Les deux liquides sont supposés miscibles et de même viscosité. Nous prendrons le cas d'un canal de section parabolique. L'interface entre les deux liquides est transportée par advection et après un certain temps que nous préciserons dans la suite, le soluté diffuse selon les régimes de dispersion décrits précédemment. Le régime à temps court nous intéresse plus particulièrement. Dans ce cas, la dispersion de Taylor-Aris est établie dans la hauteur, mais pas dans la largeur (figure 3.4).

Ainsi pour le soluté compris entre x et $x + dx$, le centre de masse est transporté à la vitesse moyenne dans la hauteur $v_m(x)$. Sa dispersion est décrite par un coefficient de diffusion effectif égale à :

$$D_{eff}(X) = D_{th}\left(1 + \frac{1}{210}Pe^2(X)\right) \quad (3.6)$$

avec $X = 2x/w$ la largeur réduite et $Pe(X) = v_m(X)h(X)/D_{th}$ le nombre de Péclet local fonction de la vitesse moyenne $v_m(X)$ et de la hauteur $h(X)$. Nous avons introduit ici le nombre de Péclet qui compare les phénomènes d'advection sur les phénomènes de diffusion. La relation 3.6 est identique à la précédente (3.2). En supposant que la position de l'interface entre les deux liquides à $t=0$ est donnée par $y_0(X)$, on peut en déduire la concentration du soluté dans le canal.

On pose $h(X) = h_0H(X)$ et on en déduit que $v_m(X) = v_0H^2(X)$ avec $v_0 = -\frac{h_0^2}{12\mu} \frac{\partial P}{\partial y}$. Après quelques manipulations, la concentration dans le canal est égale à :

$$C(X, Y, T) = \frac{C_0}{2} \left(1 + erf \left(\frac{\sqrt{T}Y - H^2(X) - y_0/h_0Pe_hT}{2\sqrt{Pe_h^{-2} + \frac{1}{210}H^6(X)}} \right) \right) \quad (3.7)$$

Avec $Pe_h = v_0h_0/D_{th}$, $T = D_{th}t/h_0^2$ le temps réduit, $Y = y/v_0t$ et enfin $erf(a) = 2/\sqrt{\pi} \int_0^a e^{-u^2} du$ la fonction erreur. La longueur v_0t représente géométriquement la longueur du gradient. A partir de cette expression, on peut remonter à la concentration linéique de soluté le long du canal :

$$\rho_l(Y, T) = \frac{1}{\int_{-1}^1 H(X)dX} \int_{-1}^1 H(X)C(X, Y, T)dX \quad (3.8)$$

Il est remarquable d'observer que lorsque T devient grand mais de telle façon que le régime à temps court soit toujours valable, la concentration linéique $\rho_l(Y, T)$ ne dépend plus de T . Elle est uniquement fonction de la forme de la section du canal $H(X)$.

On peut trouver cette limite plus simplement en remarquant que pour $T \rightarrow \infty$, l'étiement hydrodynamique dans la largeur augmente plus vite ($\propto t$) que la dispersion de

Taylor-Aris dans la hauteur ($\propto \sqrt{t}$). En négligeant ce dernier terme, on obtient :

$$\rho_l(Y) = \frac{1}{\int_{-1}^1 H(X)dX} \int_{-V_m^{-1}(Y)}^{V_m^{-1}(Y)} H(X)dX \quad (3.9)$$

avec $X = V_m^{-1}(Y)$ la fonction inverse de $V_m(X) = H^2(X)$. Pour une section parabolique ($H(X) = 1 - X^2$), on a :

$$\rho_l(Y) = 1 - \frac{3}{2}\sqrt{1 - \sqrt{Y}} - \frac{1}{2}\sqrt{1 - \sqrt{Y}}^3 \quad (3.10)$$

On peut exprimer les conditions d'existence de ce régime que nous appelons "régime asymptotique", soit en terme de temps de formation t , soit en terme de coefficient de diffusion D_{th} . Le système doit rester dans le régime à temps court : pour une section parabolique, ceci signifie que $t < 0,035 w^2/D_{th}$. D'autre part, il faut que $T = D_{th}t/h_0^2$ soit suffisamment grand.

Considérons ici le cas peu restrictif des nombres de Péclet Pe_h supérieur à 25. En comparant le profil asymptotique 3.10 avec le profil exact donné par 3.8 et 3.7, on évalue que pour $T = 0,5$, un écart absolu entre les deux courbes est inférieure à 3 % en moyenne et à 15 % au maximum.

Ainsi le régime asymptotique est valable si les conditions suivantes sont vérifiées :

$$0,5 h_0^2/D_{th} < t < 0,035 w^2/D_{th} \quad (3.11)$$

ou en terme de coefficient de diffusion :

$$0,5 h_0^2/t < D_{th} < 0,035 w^2/t \quad (3.12)$$

Pour un rapport d'aspect facilement accessible [4] de $h_0/w = 1/30$, le profil de concentration est indépendant pour une gamme de coefficients de diffusion de 1 à 63.

3.2.3 Réalisation expérimentale de gradient de concentration par dispersion de Taylor-Aris

Pour mettre en oeuvre le principe décrit précédemment, nous avons réalisé des gradients de concentration de fluorescéine dans un microsystème en PDMS. Des mesures quantitatives de fluorescence vont nous permettre de comparer les expériences aux prédictions théoriques. Le régime à temps court et à temps long ainsi que la transition entre les deux régimes sont étudiés expérimentalement.

Dispositif microfluidique de dispersion

Le dispositif expérimental est fabriqué en PDMS double couche pourvu de trois actuateurs. Le schéma des micro-canaux est représenté à la figure 3.5 a. Deux micro-vannes

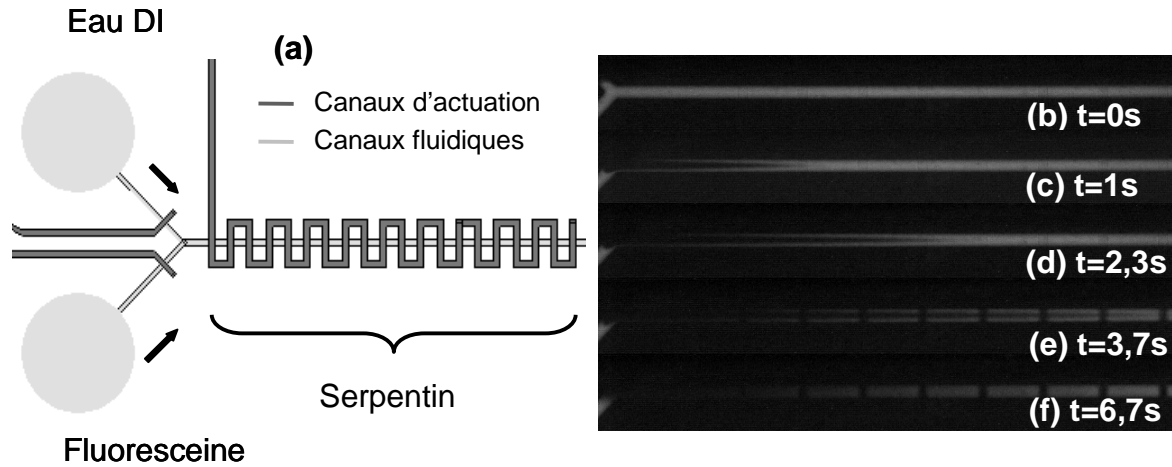


FIG. 3.5 – Dispositif expérimental pour la réalisation de gradient de concentration. (a) schéma des micro-canaux avec deux vannes et le serpentín qui segmente le canal central en différentes chambres.

contrôlent l'arrivée de fluorescéine (solution aqueuse de 1 mM de fluorescéine acide contenant 10 mM de NaOH) ou d'eau désionisée. Le serpentín qui croise plusieurs fois le canal central le segmente en différentes chambres en position fermée. le coefficient de diffusion de la fluorescéine est $3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

Les moules des canaux ont été fabriqués selon les protocoles décrits plus haut (voir 1.2) : les canaux fluidiques sont de section quasiment parabolique de $27 \mu\text{m}$ de haut au centre et de $200 \mu\text{m}$ ou $300 \mu\text{m}$ de largeur. Les canaux d'actuation ont la même largeur que les canaux fluidiques et sont hauts de $130 \mu\text{m}$. Les chambres sont espacées de 1 mm et représentent chacune un volume de 3,6 nL.

Le signal de fluorescence est collecté par une caméra COHU montée sur une binoculaire. Pour normaliser le signal de fluorescence, on effectue deux mesures de calibration : le bruit de fond (B) est mesuré dans le canal rempli d'eau désionisée puis le signal maximum (M) quand le canal est rempli de fluorescéine. Le signal de fluorescence S est normalisée par la relation $(S-B)/(M-B)$.

La série de photo 3.5 b-e illustre la réalisation pratique du gradient. Le micro-canal est préalablement rempli de fluorescéine (a). Grâce à l'actuation des vannes, l'eau désionisée entre alors dans le canal (b,c) par pression hydrostatique. On observe la forte dispersion de vitesses de l'interface dans le canal de section parabolique : le liquide est plus rapide au centre (hauteur la plus élevée) que sur les bords. Après un certain temps, le serpentín est fermé : une proportion différente de fluorescéine et d'eau désionisée est ainsi piégée dans chaque chambre. La concentration s'y uniformise par diffusion (f).

Après fermeture des chambres, la fluorescence normalisée des chambres est tracée sur la figure 3.6. Le système est dans le régime asymptotique puisque $D_{th}t/h_0^2 = 1,5 > 0,5$ et $D_{th}t/w^2 = 0,027 < 0,035$. La prédiction théorique de la relation 3.10 tracée dans les mêmes coordonnées montre un bon accord avec l'expérience.

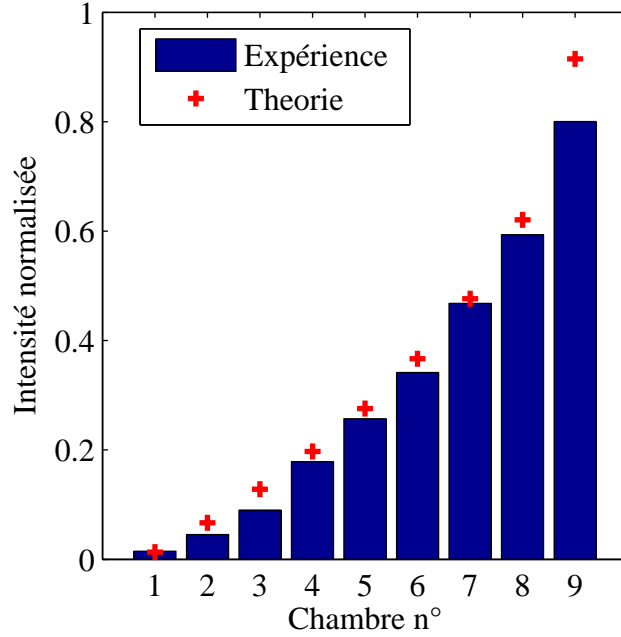


FIG. 3.6 – Intensité de fluorescéine normalisée dans les chambres de l’expérience décrite à la figure 3.5. Ici nous sommes dans le régime asymptotique : $D_{th}t/h_0^2 = 1,5 > 0,5$ et $D_{th}t/w^2 = 0,027 < 0,035$.

Mesures du profil de concentration dans le régime à temps court

En faisant des acquisitions d’images, le profil de concentration est mesuré en fonction du temps dans toute la longueur du micro-canal. Moyenné dans la largeur, cette mesure correspondent à la densité linéique $\rho_l(y, t)$.

Nous nous sommes d’abord concentrés sur le régime à temps court. Les temps compris entre 0,14 et 2,9 s correspondent à des temps adimensionnés compris entre $0,058 h_0^2/D_{th}$ à $1,2 h_0^2/D_{th}$. On vérifie que le régime à temps long n’est pas atteint : la limite $0,035w^2/D_{th} = 4,7 s$ est supérieure à 2,9 s (ici $w=200 \mu m$).

L’interface entre les deux liquides avance dans le centre du canal à la vitesse v_0 : le gradient s’étend donc sur une longueur de v_0t , avec dans notre cas $v_0=2,9$ mm/s. Sur la figure 3.7 la densité linéique de fluorescence est tracé en fonction de y/v_0t pour différents temps de mesure variant de 0,14 à 2,9 s. Quand le temps augmente, les courbes se rapprochent de la courbe théorique du régime asymptotique, conformément aux prédictions théoriques. L’interface entre les deux liquides n’est pas parfaitement plate à $t=0$: du à la dissymétrie du dispositif, la forme de l’interface y_0 n’est pas nulle. Pour la modélisation, cette dissymétrie a été mesurée et insérée dans l’équation 3.7.

La figure 3.7 montre les modélisations du régime à temps court présenté précédent et tracé ici sans paramètre ajustable (3.7). L’accord entre théorie et expérience est remarquable.

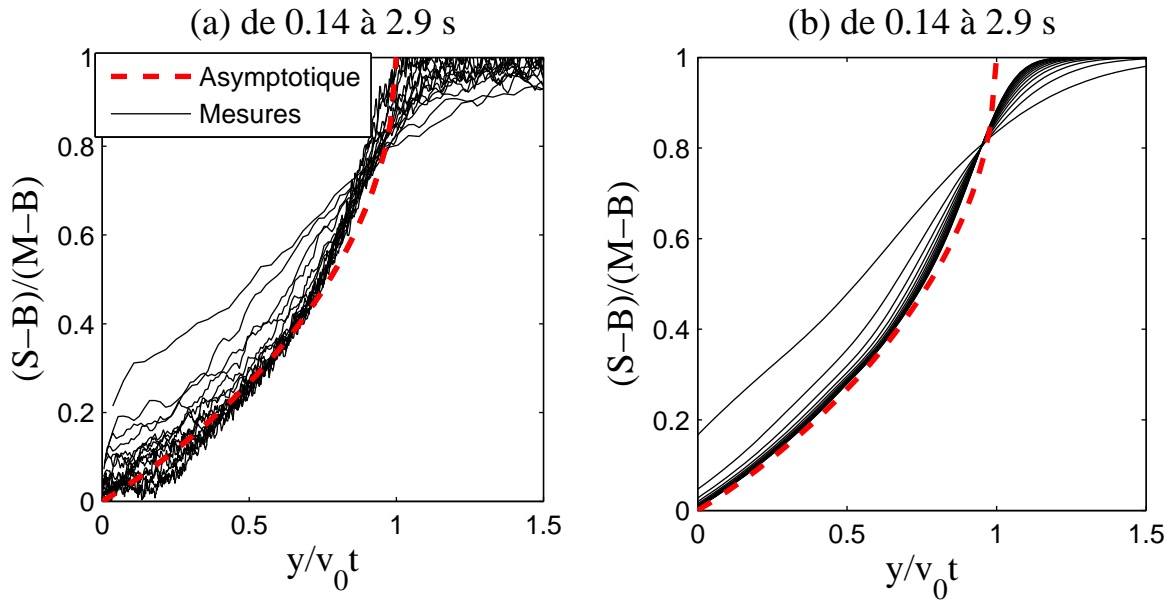


FIG. 3.7 – Mesures et modélisation de la dispersion dans le régime à temps court. (a) : mesures expérimentales, (b) modélisation dans les mêmes conditions par l'équation 3.8.

Mesures du profil de concentration dans le régime à temps long

Nous avons réalisé une série de mesures de profil de concentration pour des temps long compris entre 13 et 120 s correspondant à des temps adimensionnés compris entre $0,043 w^2/D_{th}$ à $0,4 w^2/D_{th}$ (ici $w=300 \mu m$). Nous sommes bien dans le régime à temps long ($t > 0,035 w^2/D_{th}$).

Dans ce cas, le profil de concentration est déduit des niveaux de fluorescence dans les chambres après fermeture du serpentin. Le coefficient de diffusion effectif D_{eff} est calculé après mesure de la vitesse moyenne U et de la largeur du canal. Les profils sont tracés (figure 3.8) en fonction de la quantité adimensionnée :

$$y^* = \frac{y - y_m}{2\sqrt{D_{eff}t}} \quad (3.13)$$

On remarque que l'ensemble des courbes pour différents temps et différentes vitesses (225 et $675 \mu m/s$) se superpose sur la courbe théorique attendue $((1 + erf(y^*))/2)$.

Transition entre régime à temps court et long

Nous avons mesuré le profil de concentration autour de la limite $0,035 w^2/D_{th}$ entre le régime à temps court et le régime à temps long. Le profil est mesuré 1,9 mm après l'intersection des canaux d'alimentation. La vitesse moyenne U du fluide est de $500 \mu m/s$ et la largeur du canal est de $300 \mu m$. La plage de temps est comprise entre 6 et 20 s, correspondant à $0,02 w^2/D_{th}$ et $0,067 w^2/D_{th}$. La figure 3.9 montre le profil normalisé en fonction de y/Ut , la distance sans dimension correspondant au régime à temps long. Les courbes tronquées sont dues à l'arrivée progressive du liquide dans la zone d'observation.

On remarque que les courbes se décalent pour les temps inférieurs à 12 s environ,

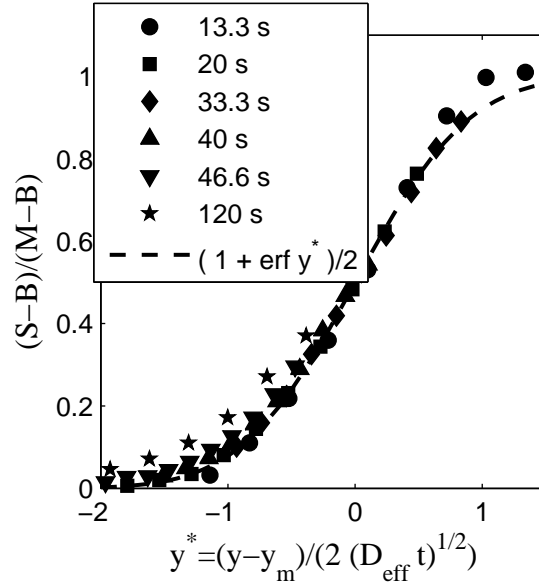


FIG. 3.8 – Profil de concentration à temps long. Ici la dispersion de Taylor-Aris est complètement développée et la dispersion est modélisée par un phénomène diffusif.

alors qu’après les courbes tendent à se superposer dans les coordonnées correspondant au régime à temps long. Ceci est tout à fait cohérent avec les descriptions théoriques : à temps court (ici pour $t < 12$ s) la vitesse caractéristique v_0 est plus grande (d’un facteur 1,46) que la vitesse moyenne U . Ceci explique que les profils se déplacent avant $t = 12$ s, et tendent à se superposer après. La limite entre les deux régimes est clairement mise en évidence ici. Elle correspond à un temps adimensionné de $D_{th}t/w^2 = 0,04$, en bon accord avec la prédiction théorique de 0,035.

3.2.4 Conclusion sur le gradient de concentration

Grâce à trois actuateurs, deux liquides différents sont envoyé séquentiellement dans un micro-canal de section parabolique : un gradient de concentration est généré par étirement hydrodynamique puis par dispersion de Taylor-Aris de l’interface. La fermeture du serpentin isole le micro-canal en différentes chambres de concentrations différentes.

Les prédictions théoriques établi au 3.2.2 ont été vérifié expérimentalement : le régime à temps court a été directement comparé aux modélisations précédente avec un très bon accord. Aux temps longs, la dispersion de Taylor-Aris complètement établie dans la section a été mise en évidence. De plus la transition entre les deux régimes a été observé pour un temps de dispersion en bon accord avec nos prédictions.

Cette méthode qui ne consomme que 60 nL de liquide à chaque formation de gradient est rapide et indépendante du coefficient de diffusion des espèces sur quasiment deux ordres de grandeur. La modification de la longueur du gradient (v_0t) permet de plus de ”zoomer” dans une gamme de concentration déterminée.

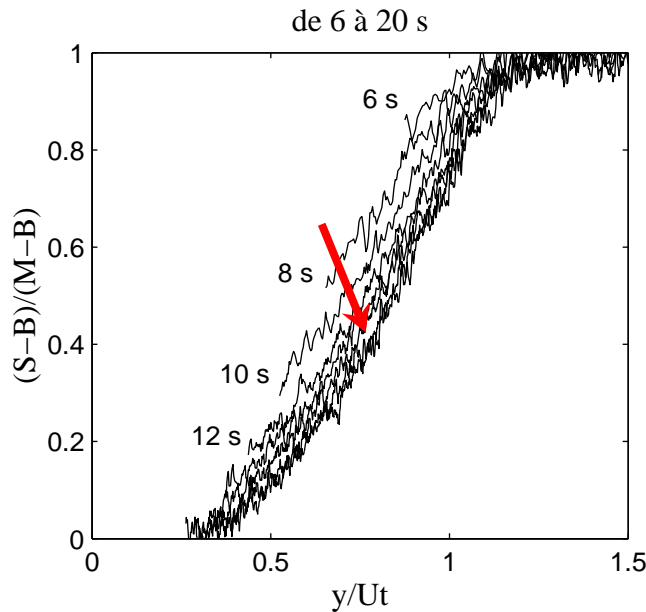


FIG. 3.9 – Mise en évidence de la transition entre le régime à temps court et le régime à temps long : profil de concentration dans les coordonnées correspondant au régime à temps long, les courbes se superposent seulement après environ 12 s.

3.3 Conclusion

Dans cette partie, nous avons rappelé le phénomène de la dispersion de Taylor-Aris en mettant en avant ses particularités pour les micro-canaux de section rectangulaire et arrondie. Les différents régimes de dispersion ont été décrits en précisant leurs domaines de validité.

Le "régime à temps court", présent uniquement dans les canaux de section lentement variable, a reçu un traitement théorique plus approfondi [26]. Grâce à cette analyse précise, une nouvelle méthode de génération de gradients a été mise en évidence théoriquement. Pour une gamme de coefficient de diffusion de quasiment deux ordres de grandeur, le gradient de concentration ainsi généré est indépendant de celui-ci. Cette méthode a été mise en oeuvre expérimentalement dans un dispositif microfluidique en PDMS : la comparaison des mesures avec la théorie conduit à un très bon accord. Ce travail a fait l'objet d'un article de conférence à μ TAS 2005 [7] et a été soumis au journal "Lab on a chip" (annexe B).

Chapitre 4

Intégration de puces à ADN dans une plate-forme microfluidique originale

Un four cuit toujours trop ou pas assez. Un micro-onde fait même les deux à la fois.

Loi de MURPHY

LA réalisation d'une plate-forme microfluidique pour les puces à ADN répondait à plusieurs objectifs dans le cadre de la thèse. D'une part, l'analyse sur puce à ADN est une étape du protocole Bertin et son intégration dans un format microfluidique constitue les prémisses de l'intégration complète du protocole ; étant la dernière étape, sa mise au point permet de tester les étapes précédentes sans sortir du format microfluidique.

D'autre part, l'accessibilité à des mesures sensibles, en temps réel et dans un environnement contrôlé en température et en écoulement est une avancée technologique et nous avons conçu cette plate-forme aussi dans ce cadre. Comme nous le verrons au chapitre 5, cette plate-forme est utilisée pour étendre nos connaissances sur les bases physiques des puces à ADN. Elle permettra au chapitre 6 de développer des méthodes originales de dosages d'allèles basées sur la mesure de cinétique et sur la calibration des puces.

Après une brève introduction sur le fonctionnement des puces à ADN et l'apport de la microfluidique, nous situerons notre travail parmi les contributions déjà réalisées. la plate-forme qui est décrite dans la suite est caractérisée avec précision : le contrôle de la température, les écoulements et la mesure de fluorescence sont présentés. La répétabilité et la spécificité des puces à ADN seront de plus validées dans notre environnement.

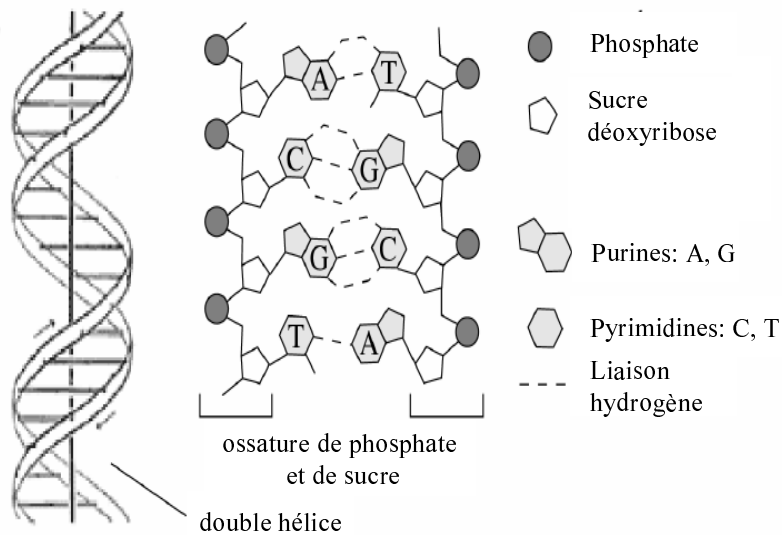


FIG. 4.1 – Structure de l'acide déoxyribonucléique (ADN)

4.1 Introduction

4.1.1 Principe des puces à ADN

Les puces à ADN représentent un des outils de la biologie moderne qui a le plus modifié les habitudes des laboratoires de biologie depuis les dix dernières années [38]. Cet outil qui fait sa première apparition dans le laboratoire de Pat Brown [39] en 1995, permet d'identifier en une seule expérience plusieurs milliers de brins d'ADN différents. Il constitue alors l'outil privilégié pour l'étude de l'expression du génome d'un ensemble de cellules¹.

Son principe repose essentiellement sur la structure de l'ADN (voir figure 4.1) : constitué d'une succession de nucléotides nommés A, T, G et C, ces éléments de base ont la propriété de s'apparier entre eux spécifiquement selon le schéma A-T et G-C. Ainsi deux brins d'ADN complémentaires vont s'apparier de façon spécifique et former une double hélice. Après marquage des ADN de l'échantillon appelé ADN cible, l'appariement ou réaction d'hybridation avec l'ADN sonde peut alors être mesuré, permettant la détection.

Grâce à la possibilité de greffer localement sur une surface de quelques centimètres carrés des milliers d'ADN sondes de séquences différentes (figure 4.2), une analyse sur un très grand nombre est possible avec seulement quelques dizaines de μL d'échantillon. Selon la technique de fabrication par dépôt local [41] ou par synthèse in situ [42], la densité varie typiquement entre 2500 et 250000 ADN par cm^2 .

Les puces à ADN sont couramment utilisées entre autres pour les applications suivantes :

- L'étude de l'expression génétique des cellules,

1. A titre d'exemple, alors qu'il a fallu une vingtaine d'année et l'effort conjugué de plusieurs laboratoires pour identifier une centaine de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'utilisation des puces à ADN a permis l'identification de 800 gènes en quelques mois [40].

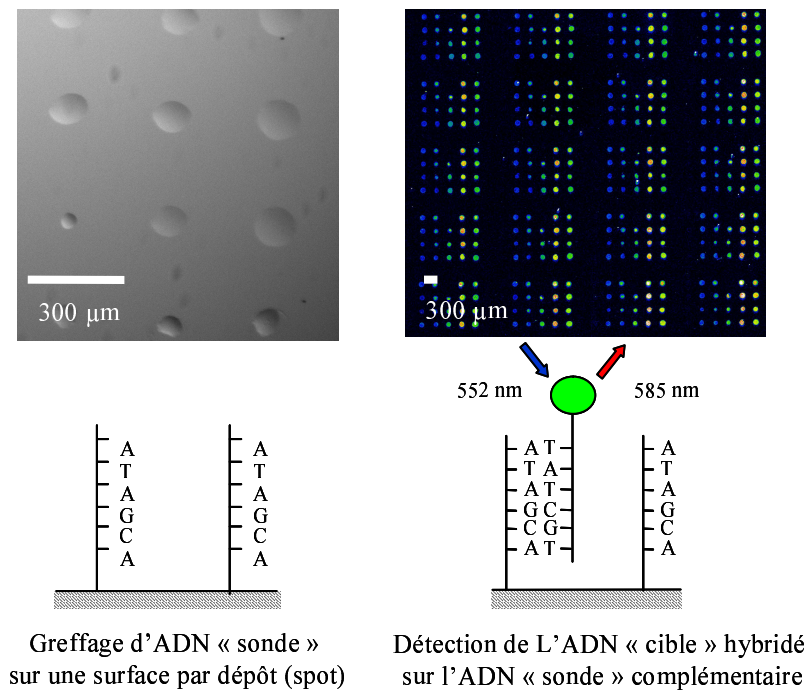


FIG. 4.2 – Puce à ADN : à gauche, image en lumière visible de gouttes ($<1\text{nL}$) déposées sur un substrat de verre et contenant des ADN pouvant se greffer à la surface. A droite, image de scanner en fausses couleurs mesurant par fluorescence le niveau d'hybridation après réaction.

- La caractérisation moléculaire des cancers,
- La détection d'agent pathogène,
- La détection de prédisposition génétique sous la forme de mutation ponctuelle SNP (Single Nucleotide Polymorphism), etc.

4.1.2 Limitations des puces à ADN et apports de la miniaturisation

La miniaturisation apporte de nombreuses améliorations aux puces à ADN [43]. L'avantage le plus direct est la réduction des volumes : passer de $15\ \mu\text{L}$ à $1.2\ \mu\text{L}$ permet de concentrer l'échantillon. En effet les étapes préliminaires de traitement fournissent une quantité finie de matériel qu'il est alors avantageux de diluer dans un volume le plus petit possible [44]. Selon les modèles habituels décrits plus bas (voir 5.1), une plus forte concentration augmente le signal à l'équilibre thermodynamique et diminue le temps de réaction. Un gain même modeste sur ce point a un impact direct sur la sensibilité des puces à ADN, aspect capital pour la détection de gènes très faiblement exprimés.

Indépendamment de la réduction de volume, la miniaturisation diminue le temps d'hybridation. En effet, la vitesse d'hybridation est ralentie par la diffusion des brins d'ADN depuis le volume vers la surface [45], formant ainsi une zone de déplétion au-dessus du spot. Ce phénomène de transport est la plupart du temps l'étape cinétique limitante. La diminution des dimensions favorise les phénomènes de diffusion ($\tau \approx l^2/D$) et ceci

permet d'atteindre plus rapidement l'équilibre thermodynamique. Cet équilibre thermodynamique est le gage d'une détection spécifique et des mesures réalisées avant l'établissement de l'équilibre peuvent conduire à de faux résultats [46]. Ainsi l'intégration de parties actives favorisant le mélange améliore le transport de façon très significative [44]. Cela permet aussi d'uniformiser la concentration d'ADN sur toute la surface de la puce, qui par diffusion ne se fait que très lentement².

Grâce à la réduction des volumes morts, la miniaturisation permet également d'intégrer plusieurs étapes de traitement de l'ADN avant son identification sur puce. Les étapes de sélection de cellules [47], de lyse, de purification [48], d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) [49, 50], ont été réalisées en microsystème et des exemples d'intégration complète ont été reportés [3, 51, 52]. Ces systèmes apportent une plus grande automatisation des étapes tout en gardant une sensibilité proche de celles obtenues manuellement.

4.1.3 État de l'art des systèmes microfluidiques pour les puces à ADN

L'intégration des puces à ADN dans un système microfluidique est un domaine extrêmement dynamique, aussi bien au niveau industriel que scientifique. La figure 4.3 montre l'augmentation importante sur les cinq dernières années du nombre de publications.

Comme nous l'avons précisé précédemment, l'introduction d'un dispositif de mélange permet à la fois de favoriser le transport des ADN et d'uniformiser la concentration au-dessus de toute la surface de la puce. Différentes méthodes de mélange ont été mises en oeuvre comme l'agitation par onde acoustique de surface [53], par cavitation de bulles d'air [54], par advection et mélange chaotique [55, 56] ou par recirculation [57]. Ces techniques permettent d'améliorer le rapport signal sur bruit d'un facteur 2 à 9³.

La réduction des volumes qui permet de concentrer l'échantillon a été mise en évidence dans [58], où seulement 1 μL d'échantillon est nécessaire pour hybrider 5000 spots.

Cependant mis à part le travail de la référence [56], ces précédents travaux permettent difficilement une intégration plus poussée. D'autres groupes qui ont privilégié l'intégration quasi totale de la puce à ADN autour d'une suite d'opérations plus ou moins complexes, l'ont faite souvent au détriment des performances ou ont été contraints d'utiliser des puces non-standards [3, 51, 52].

Les systèmes cités plus haut sont dissociés de l'appareil de mesure des résultats (scanner), ce qui limite l'utilisation des puces à un cycle hybridation-lecture et rend difficile la mesure de la cinétique de la réaction. Des systèmes dédiés à la mesure d'hybridation

2. Il faut environ 700 heures pour uniformiser une solution d'ADN ($D = 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$) sur une distance de 1 cm

3. Malgré ce qui est parfois dit, l'augmentation du signal entre les situations avec ou sans agitation est due à l'accélération de la réaction et à l'uniformisation de la solution, et non à une augmentation du signal à l'équilibre. Ceci s'explique par le fait que pour les concentrations envisagées généralement dans ces expériences ($\approx 1 \text{ pM}$) le système est loin de l'équilibre : le temps théorique de mise à l'équilibre est colossal (≈ 300 heures).

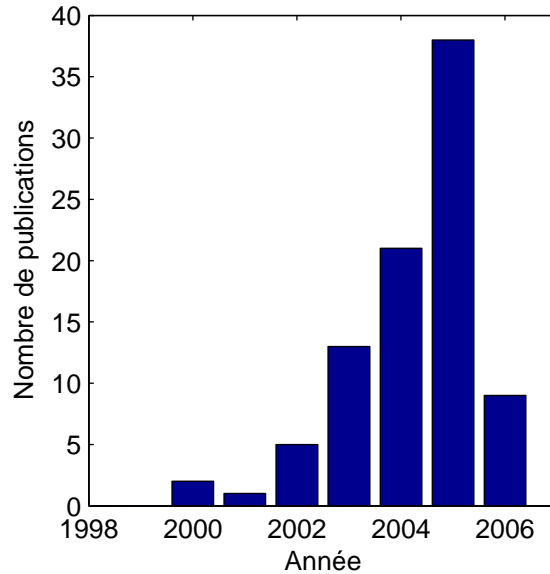


FIG. 4.3 – Nombre de publications par an déterminé sur le moteur de recherche PubMed avec les mots clés "microarray" et "microfluidic". Pour l'année 2006, les résultats sont partiels (avant le 6 juin 2006)

en temps réel ont été utilisés pour la caractérisation physique des puces. Des travaux très précis ont été effectués par SPR (Surface Plasmon Resonance) [59–61], par balance à quartz [62] et par fluorescence [63, 64]. L'un des principaux résultats, mis en évidence par le groupe de Georgiadis [65] et confirmé par Dodge *et al* [64] est l'influence de la densité de sonde sur la réaction d'hybridation sur puce. Cependant ces dispositifs sont difficilement utilisables dans des cas d'intérêts pratiques car soit il n'y a qu'une séquence analysée, soit quelques millilitres d'échantillons sont nécessaires.

Dans le travail présenté ci-après, nous avons réalisé un dispositif contrôlant tous les paramètres importants de la mise en oeuvre des puces à ADN ($T^{\circ}\text{C}$, microécoulement, mesure sensible de l'hybridation en temps réel par mesure de fluorescence) tout en n'utilisant que de faibles quantités d'échantillon ($\approx 10 \mu\text{L}$). Le système utilise les supports standards de puces à ADN, c'est à dire les lames de verre 1 pouce par 3 pouces. Pour nous rapprocher des applications biologiques, le système permet l'observation d'une centaine de spots simultanément, et de 500 moyennant une perte relative de sensibilité. Ce nombre qui reste modeste devant le besoin des biologistes n'est cependant pas dénué d'intérêt pratique pour des applications spécifiques. De plus cette plate-forme à l'utilisation simple, permet de tester et d'expérimenter de nouvelles situations facilement et rapidement. Le test de nouvelles chimies de greffage et la mise au point de nouvelles techniques d'utilisation des puces deviennent alors aisés. D'autre part, la technologie des microvannes et micropompes intégrées déjà présentée dans la partie 1 permettrait dans de prochains développements, l'association des puces à ADN à d'autres étapes.

4.2 La plate-forme microfluidique

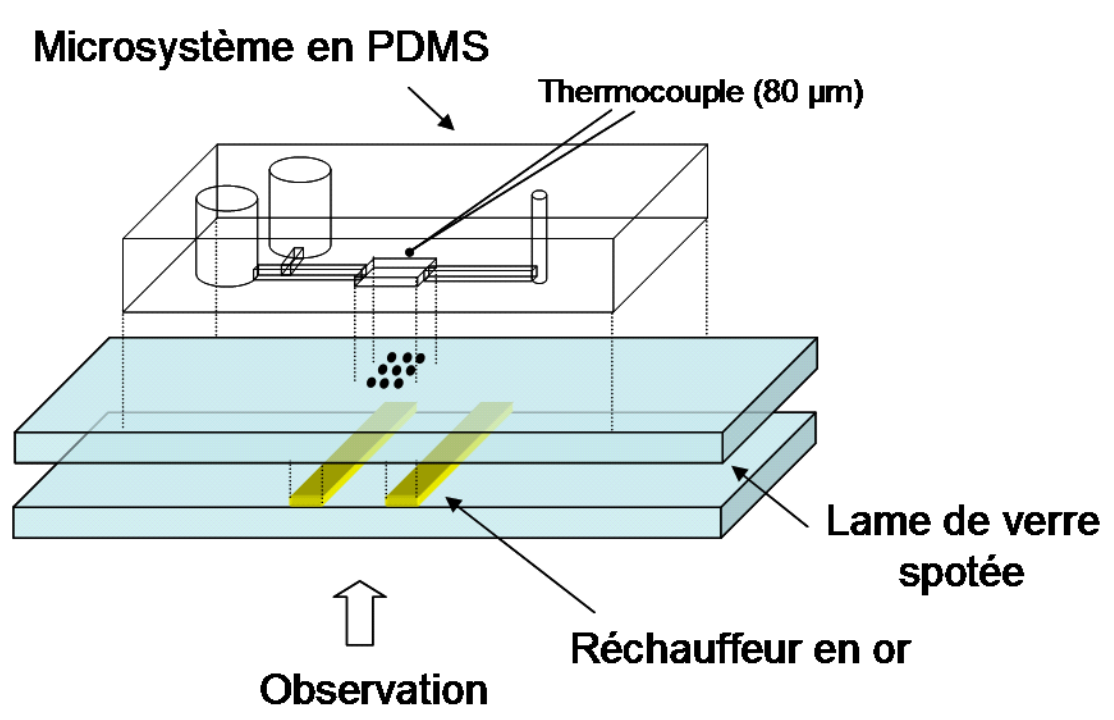


FIG. 4.4 – Schéma du montage. La plate forme est constituée de l'empilage du microsystème en PDMS, la lame de verre spotée et le système de chauffage. L'observation se fait par le bas.

4.2.1 Description générale

Le schéma 4.4 montre l'assemblage des différentes parties : au-dessus de la lame de verre d'un format habituel (1 pouce sur 3 pouces) disposant d'une puce à ADN spotée, on vient coller un microsystème en PDMS. Celui-ci intègre des microactuateurs, trois réservoirs et un thermocouple de $80\ \mu\text{m}$ de diamètre. Par le dessous, on met en contact une deuxième lame de verre recouverte de deux pistes d'or de 1 mm de largeur et d'environ 100 nm d'épaisseur. Ces pistes en or évaporées sur la lame de verre inférieure vont servir à réchauffer le microsystème afin de réguler sa température. L'observation se fait à travers les deux lames de verre avec un objectif $\times 10$ sur un microscope inversé.

Le plan microfluidique du système est schématisé à la figure 4.5. Grâce à une série de microvannes, un des liquides déposés dans les réservoirs ($40\ \mu\text{L}$ de volume max) est sélectionné puis pompé dans le microsystème. Cette configuration permet d'éviter toute complication due à l'interface micro-macro : le liquide est directement déposé dans le réservoir à l'aide d'une micropipette (figure 4.6b). Le réservoir est ensuite complété avec de l'huile minérale inerte [66] pour empêcher l'évaporation. Avec un minimum d'environ $10\ \mu\text{L}$, cette procédure remplace avantageusement l'utilisation de pousse seringues ou de réservoirs pressurisés.

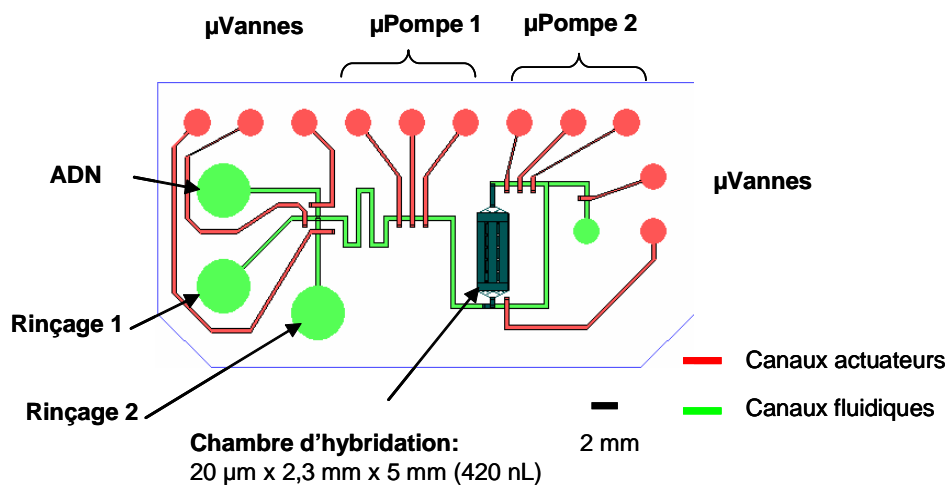


FIG. 4.5 – Plan microfluidique du microsystème : en rouge les canaux d'actuation, en vert les canaux fluidiques. Le système se compose de 3 réservoirs (ADN, rinçage 1, rinçage 2), d'une chambre d'hybridation, de plusieurs μ vannes et de 2 μ pompes. La μ pompe 1 aspire et remplit le système depuis l'un des trois réservoirs. La μ pompe 2 permet de faire recirculer le fluide dans la chambre d'hybridation.

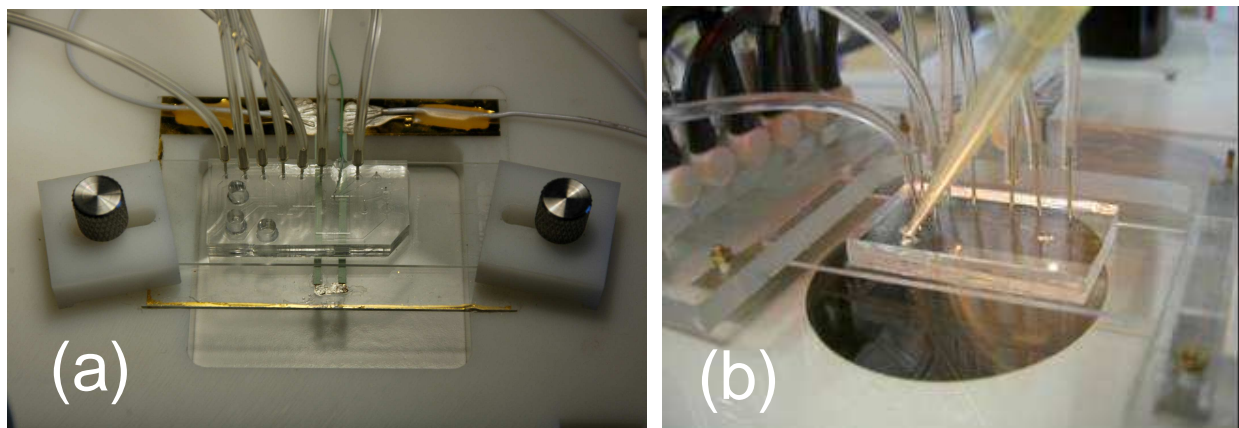


FIG. 4.6 – (a), photo du microsystème. On distingue les deux lames de verre, dont la lame inférieure est décorée de pistes en or pour le réchauffage. Un support spécifique en plastique à été réalisé. (b), photo montrant le remplissage aisé d'un réservoir par pipetage direct sur le système.

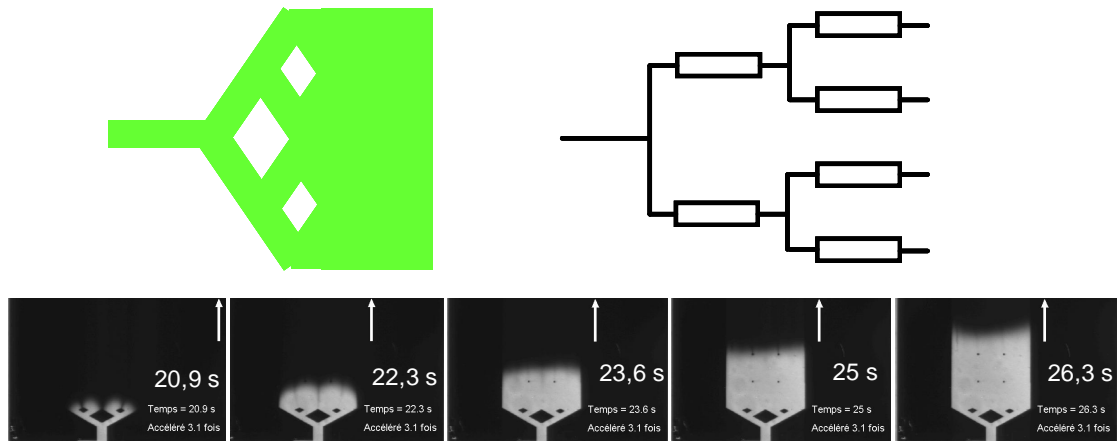


FIG. 4.7 – Uniformisation l’écoulement dans toute la largeur de la chambre d’hybridation : à gauche, schéma des canaux fluidiques. A droite schéma électrique équivalent de la séparation en branche. En bas séquence d’images montrant l’arrivée de fluoresceine dans la chambre d’hybridation.

Tous les canaux sont de sections arrondies ($32 \mu m$ de haut et $300 \mu m$ de large) à l’exception de la chambre d’hybridation qui est de section rectangulaire ($20 \mu m$ de haut et de 300 à $2400 \mu m$ de large). Les canaux arrondis aux niveaux des vannes et pompes sont nécessaires pour un fonctionnement optimal (voir 1). Pour la chambre d’hybridation une section rectangulaire est plus adaptée. En effet ceci permet : (i) d’avoir une vitesse homogène dans toute la largeur et (ii) de limiter la dispersion de Taylors-Aris dans la chambre. La chambre d’hybridation représente un volume de 210 nL et de 420 nL avec la boucle de recirculation. Les canaux actuateurs sont hauts de $130 \mu m$ et large de $300 \mu m$. La couche de PDMS formant les canaux fluidiques est d’environ $100 \mu m$. Conformément aux travaux présentés du chapitre 2, cette conception donne accès à des débits de l’ordre de $1,6 \mu L/min$ maximum.

Le thermocouple est inséré dans un des canaux actuateurs de la μ pompe 2 et du PDMS y est ensuite introduit pour éviter la présence d’air. La soudure chaude du thermocouple est à environ $100 \mu m$ de l’interface verre/PDMS.

L’élargissement de 300 à $2400 \mu m$ à l’entrée de la chambre d’hybridation nécessite quelques considérations. Sans précaution, un écoulement non uniforme se développerait dans la partie large, ce qui est inadmissible dans notre cas car nous voulons une vitesse d’écoulement uniforme sur toute la puce. La figure 4.7 montre que l’utilisation de séparateurs divisant l’écoulement à plusieurs reprises entre le canal et la chambre d’hybridation uniformise l’écoulement sur toute la largeur.

La fabrication est détaillée dans l’annexe E.

4.2.2 Automatisation et contrôle microfluidique

Grâce à une platine spécialement fabriquée à cette effet (figure 4.6), l’empilement du microsystème et des lames de verre (puce à ADN et réchauffeur) est disposé sur un microscope inversé LEICA. Le shutter de 35 mm de chez Uniblitz arrête sur demande

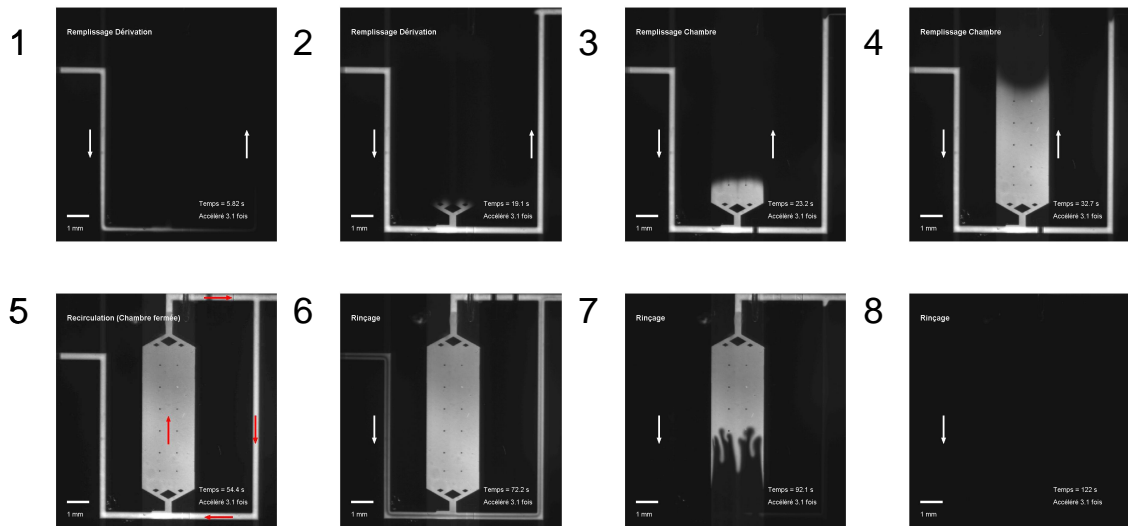


FIG. 4.8 – Exemple d'utilisation de la plate-forme pour la maîtrise des écoulements.

l'illumination par la lampe à mercure. Le signal de fluorescence est mesuré via un cube dichroïque LEICA N3 ou Y5 par une caméra refroidie EMCCD ANDOR.

Un ordinateur contrôle via le programme LabView toutes les fonctions du système grâce à plusieurs cartes d'acquisition. Ce contrôle comprend :

- La mesure de la température (mesure simultanée de 4 thermocouples),
- Le contrôle de la puissance de chauffage des pistes en or,
- Le contrôle de 2 micropompes, dont une à activation rapide, et de 7 microvannes,
- L'ouverture et la fermeture du shutter de l'illumination UV,
- l'acquisition des images de la caméra CCD.

L'électronique de puissance que nécessite un tel dispositif a été fabriquée au laboratoire.

La figure 4.8 montre une série d'images de fluorescence du microsysteme. A l'image 1, de l'eau contenant de la fluorescéine est injectée dans le canal de dérivation. Une fois que le précédent liquide a été complètement évacué (image 2), la fluorescéine est injectée dans la chambre d'hybridation (image 3 et 4). La μ pompe 2 fait recirculer le liquide de la chambre d'hybridation d'un volume total 420 nL (image 5). Le même protocole (image 6 à 8) permet ensuite de rincer les canaux.

La figure 4.9 montre le débit des micro-pompes 1 et 2 en fonction de la fréquence d'actuation. La micro-pompes 2 fonctionnent uniquement avec deux vannes [22].

4.2.3 Régulation et calibration de la température

La réaction d'hybridation étant très dépendante de la température, il est important de bien contrôler ce paramètre sur toute la surface de la chambre d'hybridation et au cours du temps. La conception des réchauffeurs est cruciale pour obtenir une température uniforme sans avoir de zone de surchauffe. Confirmée par des modélisations numériques 3D, la conception des réchauffeurs utilisés pour la plate-forme est présentée dans la partie

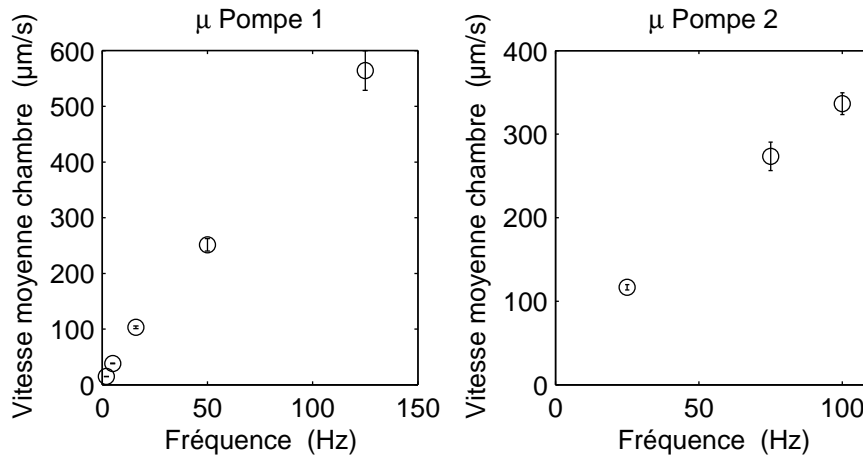


FIG. 4.9 – Mesures des vitesses moyennes dans la chambre sous l’action des micro-pompes 1 et 2.

4.2.3. La méthode de calibration est présentée dans la partie 4.2.3. L’automate permettant la régulation active de la température au cours du temps est décrit dans l’annexe F.

Conception des réchauffeurs

Le chauffage de la lame de verre spotée est réalisé via sa face inférieure qui est en contact avec les réchauffeurs. Les dimensions des pistes électriques en or évaporées sur la lame de verre inférieure sont précisées sur la figure 4.10. La puissance par effet joule dissipée dans ces pistes va chauffer le système. La chambre d’hybridation est placée au centre des deux pistes.

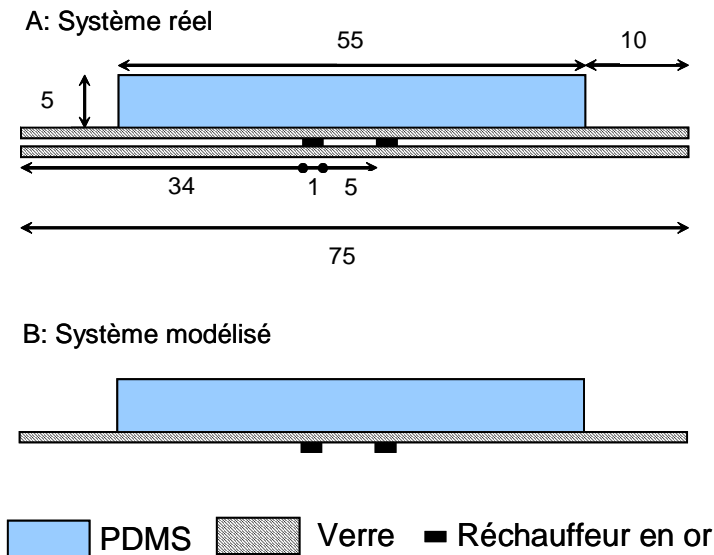


FIG. 4.10 – Plan en coupe verticale des réchauffeurs (pistes en or) et du microsysteme. Les dimensions sont exprimées en mm. A, système réel. B, système modélisé : la plaque de verre inférieure a été supprimée.

Afin d’éviter la détermination de constantes de contact thermique, nous avons simplifié le système à modéliser (figure 4.10 B) et supposé que les surfaces libres échangent de la

	Conductivité λ (W/m/K)	Capacité thermique C_p (J/kg/K)	Densité ρ (kg/m ³)	Diffusivité thermique (m ² /s)
PDMS	0,18	1100	1030	$1,6 \cdot 10^{-7}$
Verre	1,4	835	2225	$7,5 \cdot 10^{-7}$

TAB. 4.1 – Caractéristiques thermiques du PDMS et du verre. Données issues de [68]

chaleur avec l'air selon un coefficient conducto-convectif h égale à $12 \text{ W/m}^2/\text{K}$ [67]. Les caractéristiques des matériaux [68] sont résumées dans le tableau 4.1. La figure 4.11 montre le résultat d'un calcul numérique 3D effectué à l'aide du logiciel Patran-Nastran.

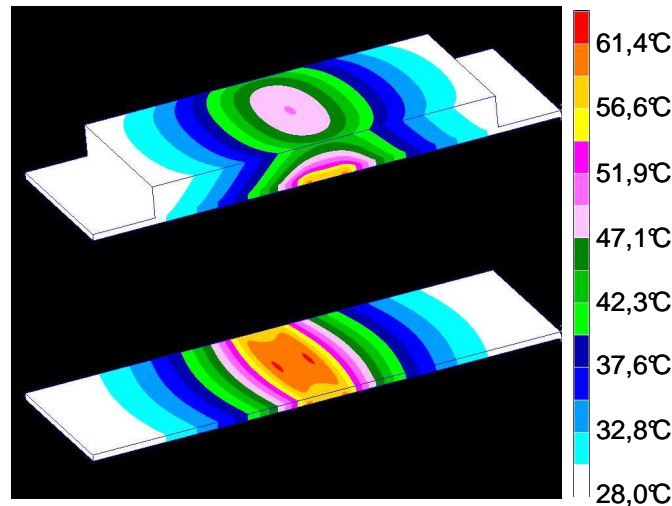


FIG. 4.11 – Modélisation thermique en 3 dimensions effectuée à l'aide du logiciel Patran-Nastran.

On remarque une bonne uniformité de température entre les deux lignes de réchauffeurs malgré des surchauffes limitées à la verticale des réchauffeurs. La température décroît quand on s'éloigne du centre de part et d'autre des réchauffeurs. Cette modélisation nous permet d'estimer l'uniformité de température entre les deux réchauffeurs. Pour une zone de la taille de la chambre d'hybridation ($2,4 \times 5 \text{ mm}$), elle est meilleure que $0,2^\circ\text{C}$.

Calibration de la température

Pour mesurer la température à l'intérieur d'un microsystème, il est nécessaire d'avoir un outil de mesure *in situ* qui ne perturbe pas les échanges thermiques du système. Ceci nous contraint à l'utilisation de capteurs plus petits que les dimensions typiques de notre système, ou à l'utilisation de méthodes locales comme le changement de fluorescence d'un marqueur.

Comme nous l'avons précisé plus haut, un thermocouple de petite taille ($80 \mu\text{m}$) est inséré au plus près de la chambre d'hybridation pour mesurer sa température (figure 4.12). Pour calibrer notre mesure par rapport à la température de la solution présente dans la chambre d'hybridation, nous avons utilisé des MB (Molecular Beacon) [64, 69] comme sonde de température.

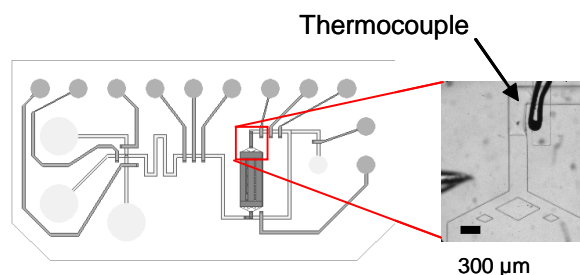


FIG. 4.12 – Image du microsystème en PDMS avec le thermocouple de $80 \mu\text{m}$ visible dans un canal d’actuation de la μ pompe 2.

Les MB sont des oligonucléotides courts qui ont la particularité de se replier sur eux-mêmes à basse température. Si un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence sont greffés aux extrémités, la fluorescence est complètement inhibée à basse température et est normale à haute température. La zone de transition est étroite ce qui permet une calibration précise de la température.

Le MB utilisé est FAM-GCTCTGTATGGTTAATTCGAAATCTTGCAGAGC-Dabcyl à la concentration de 250 nM dans une solution d’eau MilliQ contenant 50 mM Tris-HCl pH=8 et 0,15 X SSC (30 mM NaCl). La température estimée de transition par le logiciel Mfold⁴ est $45,5^\circ\text{C}$ [70–72]. Le même oligonucléotide mais sans l’inhibiteur (Dabcyl) est utilisé pour calibrer la variation du rendement quantique du fluorophore avec la température.

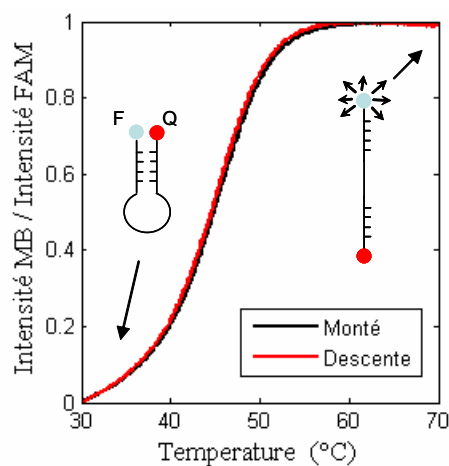


FIG. 4.13 – Signal de fluorescence du MB normalisé par le signal de fluorescence du MB sans quencher en fonction de la température. Cette mesure effectuée dans un LigthCycler constitue la mesure de référence. La vitesse de monté et de descente en température est de $0,1^\circ\text{C}/\text{min}$.

En pratique, on mesure la fluorescence de la solution de MB en faisant varier la température dans un système de référence parfaitement thermalisé (ici il s’agit d’un LigthCycler) et dans le microsystème. Après étalonnage par le système de référence, la température du MB pourra être comparée à la température du thermocouple. Chaque mesure a été faite

4. www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/

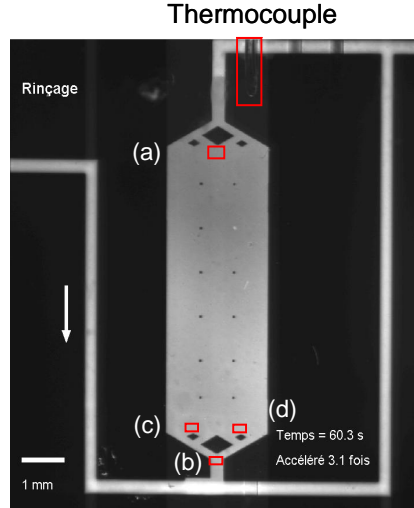


FIG. 4.14 – L'intensité de fluorescence a été mesurée en 4 points repérés a, b, c et d.

en augmentant la température de 30°C à 60°C à 0.1°C/min puis en la diminuant à la même vitesse. Dans ces conditions, aucune hystérésis notable n'a été observée sur les courbes de fusion (figure 4.13), ce qui nous assure que le MB est à l'équilibre thermodynamique.

Les mesures de fluorescence dans le microsysteme ont été effectuées en 4 positions a, b, c et d (figure 4.14) afin d'avoir une idée de l'uniformité de température.

La figure 4.15 montre les courbes de fusion de référence et celles mesurées dans le microsysteme pour les 4 positions. L'accord quantitatif entre les courbes est remarquable. La température mesurée par le thermocouple est bien la température du liquide dans la chambre d'hybridation. La température du thermocouple T_{TC} est reliée à la température du liquide T_{MB} par la relation [67] :

$$T_{MB} = \alpha (T_{TC} - T_{amb}) + T_{amb} \quad (4.1)$$

Avec T_{amb} la température de l'air autour du microsysteme. Pour les positions a, b, c et d, les valeurs de α sont respectivement 0,99 0,995 0,998 et 0,99. Pour une température du thermocouple de 60°C, l'amplitude du défaut d'uniformité est de l'ordre de 0,2°C. Dans la suite on prendra $\alpha = 0,993$ pour une précision de $\pm 0,1^\circ C$. La température de la chambre d'hybridation est donc égale à :

$$T_{ch} = 0,993 (T_{TC} - T_{amb}) + T_{amb} \pm 0,1^\circ C \quad (4.2)$$

4.2.4 Caractérisation de l'évaporation dans le PDMS

Le PDMS est perméable à l'air et à l'eau. Ce fait, qui peut être mis à profit dans certaines applications [14], doit être caractérisé pour notre système. Pour estimer le niveau d'évaporation, nous avons mesuré le niveau de fluorescence d'une solution de 1 mM de fluorescéine dans 100 mM de Tris-HCl pH=8, dans la chambre d'hybridation. L'augmenta-

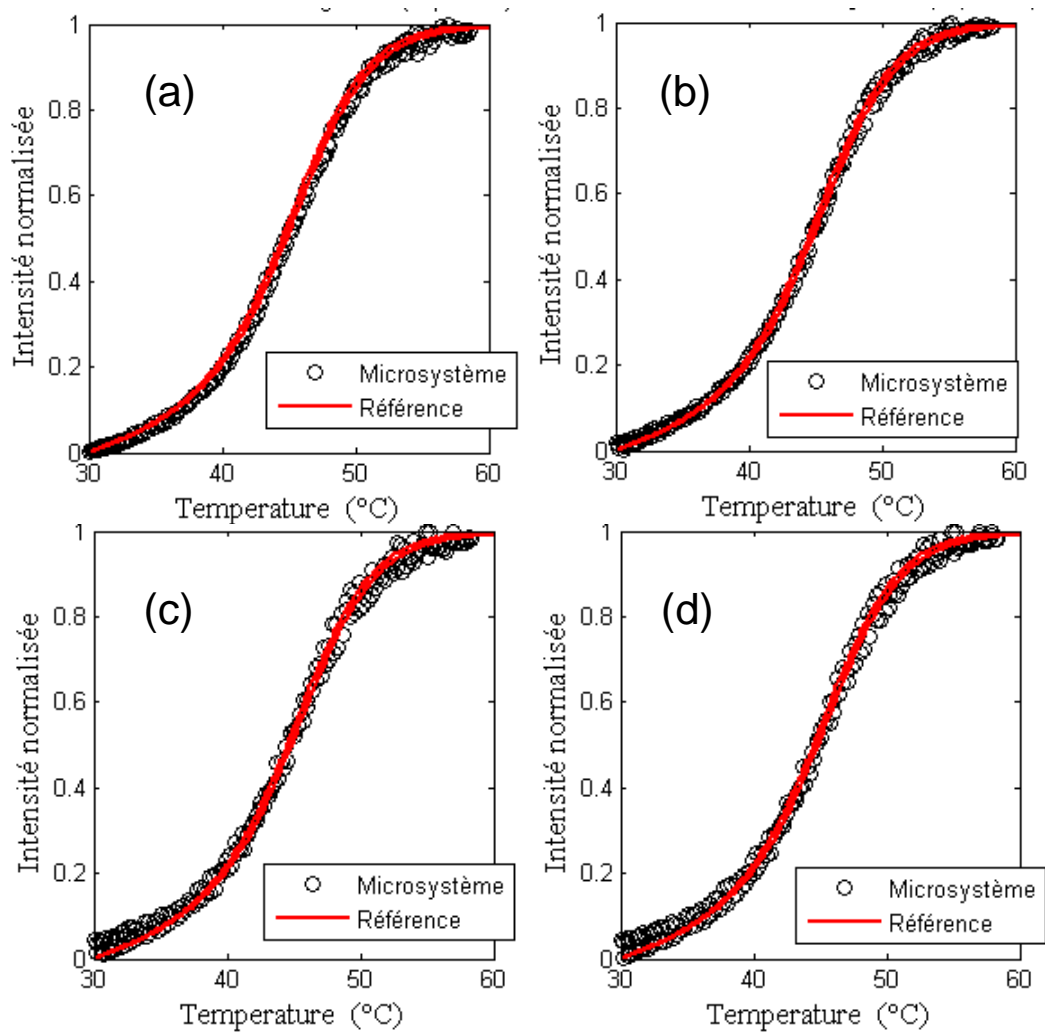


FIG. 4.15 – Courbe du fusion du Molecular Beacon à 4 positions différentes dans le microsysteme. La courbe de fusion de référence a été tracée dans les mêmes coordonnées. On remarque la quasi superposition des courbes.

tion du signal est directement liée à la concentration de la fluorescéine due à l'évaporation du solvant via le PDMS.

Nous avons fait des mesures pour deux situations expérimentales. Dans les deux cas, la solution de fluorescéine est déposée dans un des réservoirs et recouverte de $10 \mu L$ d'huile minérale :

1. Un écoulement de $0,25 \mu L/min$ est maintenu depuis le réservoir vers la sortie.
2. La chambre d'hybridation est connectée au réservoir sans écoulement continu. Une recirculation dans la chambre est maintenue durant l'expérience.

La figure 4.16 montre l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour les deux cas considérés. Dans le premier cas, l'intensité de fluorescence est constante, montrant bien que l'écoulement continu compense complètement l'évaporation à travers le PDMS. Au contraire, dans le deuxième cas, l'intensité augmente, conséquence d'une augmentation de la concentration de fluorescence. Ce taux de concentration est de $0,2 \%/min$, ce qui équivaut à un débit d'évaporation de $1 nL/min$ à $50^\circ C$ (volume de la chambre de $420 nL$). Ce débit d'évaporation est environ divisé par deux pour une diminution de température de $10^\circ C$.

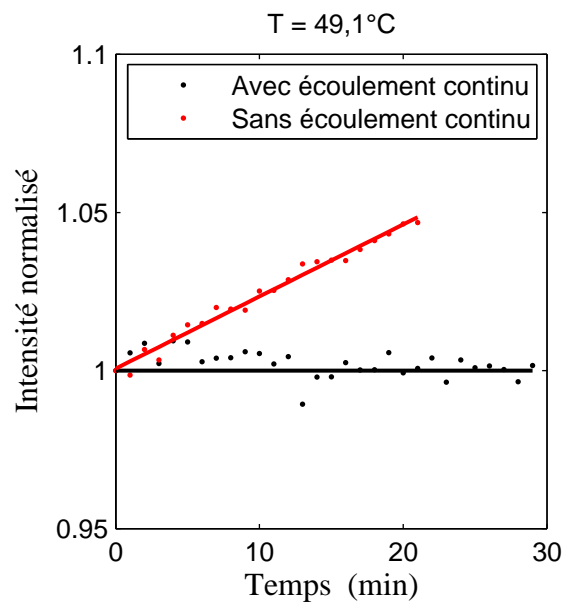


FIG. 4.16 – Fluorescence normalisée en fonction du temps avec un écoulement maintenu dans la chambre ($0,25 \mu L/min$) et sans écoulement.

Pour des expériences de plus de 10 min, cette évaporation n'est pas négligeable et dans ce cas, un apport faible mais continu de solution mère depuis le réservoir doit être maintenu pendant toute l'expérience. Un débit de $100 nL/min$ est suffisant pour fixer la composition de la chambre d'hybridation à celle du réservoir.

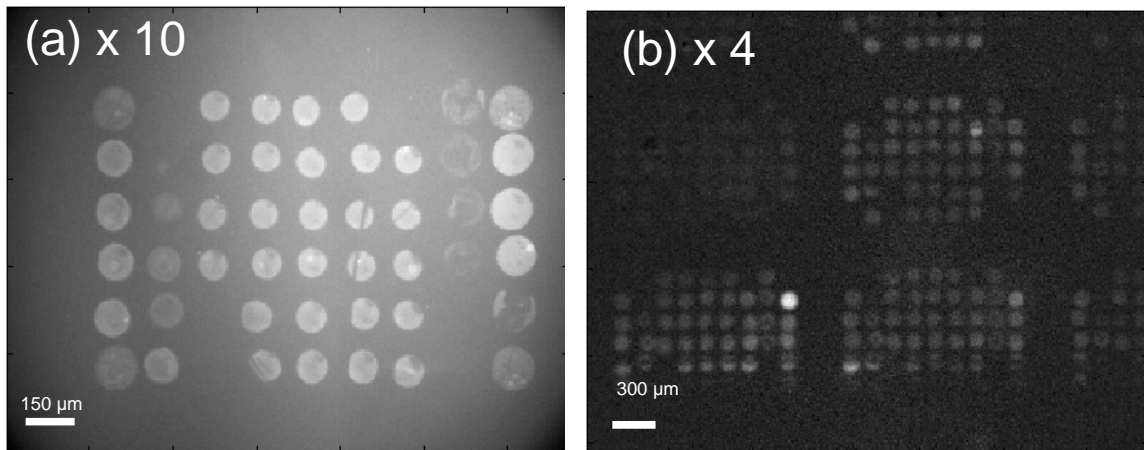


FIG. 4.17 – Image typique de puces à ADN après hybridation pour un objectif $\times 10$ (a) et $\times 4$ (b). Le nombre de spots observables est respectivement de 100 et de 500.

4.2.5 Mesures par fluorescence de la réaction d'hybridation

Traitement d'image

Dans notre système, les mesures du signal d'hybridation se font par la mesure du niveau de fluorescence des ADN cibles marquées par des molécules fluorescentes. Il s'agit de Cyanine 3 et 5 qui sont les fluorophores classiques des puces à ADN. La figure 4.17 montre des images typiques de spots de puces à ADN après hybridation pour des objectifs $\times 10$ et $\times 4$. Le nombre de spots observables est respectivement de 100 et de 500. Dans la suite, seul l'objectif $\times 10$ est utilisé.

La précision de la mesure d'hybridation est directement liée aux propriétés d'émission des cyanines et aux traitements informatiques effectués sur les images. De façon générale, le signal lumineux mesuré par un pixel de la caméra est égal à la somme des contributions du bruit de fond de la caméra F_C , de la densité de sondes hybridées d , de la concentration d'ADN cibles marquées en solution C , et du bruit de fond fluorescent provenant du PDMS F_{PDMS} :

$$I = F_C + \beta I_{UV} (d e(T) + C h e(T) + F_{PDMS}) \quad (4.3)$$

Avec I_{UV} l'intensité incidente de la lampe UV, β un coefficient instrumental, h la hauteur du canal et $e(T)$ le rendement du fluorophore. Ce dernier dépend de la température. Le coefficient β dépend des réglages de la caméra et de l'optique du microscope.

La détection des spots d'ADN sondes se fait par binérisation bayésienne (voir figure 4.18) et la soustraction du fond autour du spot ("zone bruit") au signal du spot ("zone spot") donne :

$$\langle I_{spot} \rangle - \langle I_{bruit} \rangle = \beta I_{UV} \langle d \rangle e(T) \quad (4.4)$$

On a ainsi un signal proportionnel à la densité moyenne de sonde sur la puce, $\langle d \rangle$.

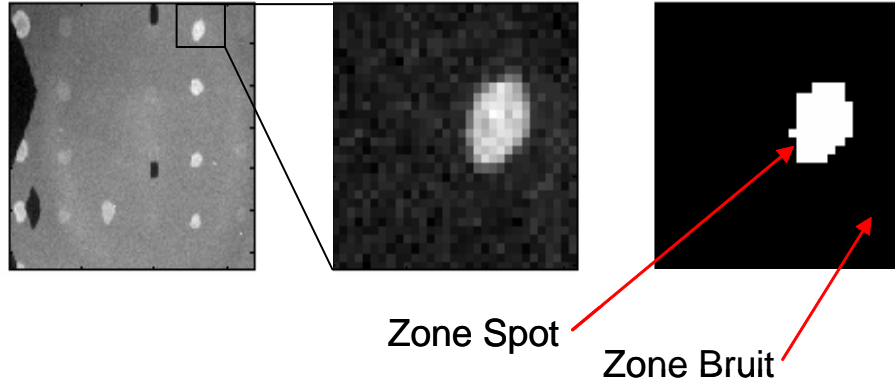


FIG. 4.18 – Détection des spots d'ADN sondes par binérisation bayésienne.

L'intensité de la lampe UV (I_{UV}) est suffisamment stable dans le temps pour la considérer constante sur de longues périodes (plusieurs heures). La variation de rendement avec la température doit être compensée pour les mesures où la température est modifiée.

En mesurant l'intensité de fluorescence du système contenant sans fluorophore ($I_{vide} = F_C + \beta I_{UV} F_{PDMS}$), l'expression suivante est corrigée de la dépendance en température du rendement :

$$\frac{\langle I_{spot} \rangle - \langle I_{bruit} \rangle}{\langle I_{bruit} \rangle - \langle I_{vide} \rangle} = \frac{\langle d \rangle}{C h} \quad (4.5)$$

Cette expression est utilisée à chaque fois que des mesures à différentes températures sont réalisées.

Effet du photoblanchiment

Après absorption d'un photon, le fluorophore peut soit émettre un photon d'énergie inférieure, soit dissiper l'énergie thermiquement, soit détruire la propriété de fluorescence. Ce dernier processus, le photoblanchiment, constitue un artefact dans nos mesures. Son effet sur les mesures est modélisé dans l'annexe G dans le cas d'une réaction d'hybridation. Ce modèle a permis de déterminer le critère suivant qui nous indique si le photoblanchiment est négligeable sur la mesure d'hybridation :

$$\frac{k_a C \tau_b}{\langle S \rangle} > 100 \quad (4.6)$$

avec τ_b le temps caractéristique de photoblanchiment du fluorophore (supposé ici mono exponentiel) et $\langle S \rangle$ la fraction moyenne du temps d'illumination des fluorophores. Pour les temps de photoblanchiment de cyanine 3 dans nos conditions (de 2500 à 3000s), une concentration de 1 nM d'ADN cible et une acquisition d'image de 0,5 s toutes les 20 s, $k_a C \tau_b / \langle S \rangle = 100$. Dans ce cas le photoblanchiment est négligeable.

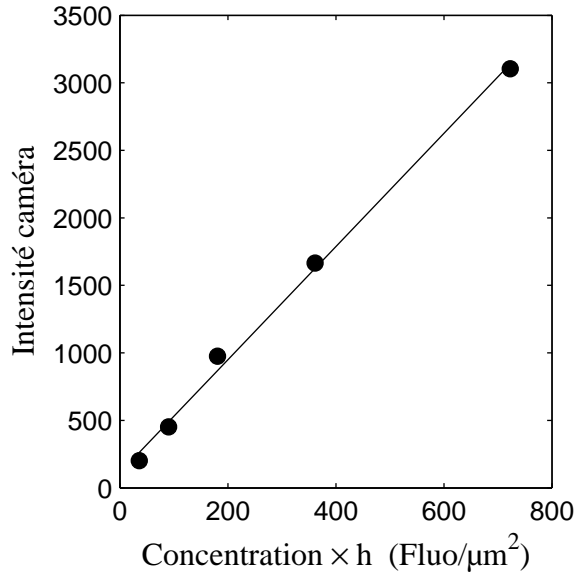


FIG. 4.19 – Niveau de la caméra pour différentes concentrations d’ADN marqué par Cy3 (1 à 30 nM) dans la chambre d’hybridation d’une hauteur de 20 μm .

Calibration du signal caméra

Le niveau de fluorescence donné par la caméra est calibré en fonction du nombre de fluorophores observés. Cette dernière quantité peut être fixée grâce à des solutions de cyanine 3 de concentrations préalablement déterminées à l’aide d’un spectromètre (Nanodrop). Le nombre de fluorophore par unité de surface est alors égal à $C \times h$ avec C la concentration et h la hauteur de la chambre d’hybridation. La calibration est effectuée en cours d’expérience et varie peu d’une expérience à l’autre pour un même réglage de caméra. La figure 4.19 montre un exemple de calibration.

Les densités de saturation des spots varient de 100 à 1000 μm^{-2} ce qui équivaut à un nombre de sondes compris entre $8 \cdot 10^5$ et $8 \cdot 10^6$ par spot. Cette quantité est en bon accord avec les mesures effectuées par Genescore.

Pour des réglages couramment utilisés dans la suite (binning=4, $\tau=0,5$ s, EMCCD=0, objectif $\times 10$) l’écart type des fluctuations du niveau de caméra est de l’ordre de $\sigma = 8$, ce qui correspond à une limite de détection à 3σ de 6 $Cy3/\mu m^2$.

4.3 Caractérisation et répétabilité de la réaction d'hybridation sur puce dans la plate-forme microfluidique

Cette partie présente les premières expériences de puce à ADN réalisées dans un format microfluidique dans le cadre de la thèse. Nous avons tout d'abord comparé des résultats acquis sur un dispositif microfluidique simplifié aux résultats obtenus selon les techniques habituelles. Notre but n'était pas de réaliser une comparaison exhaustive déjà effectuée ailleurs (voir paragraphe 4.1.3) mais de valider notre approche dans nos conditions expérimentales, et notamment l'utilisation du PDMS.

Cette vérification faite, nous avons voulu préciser les conditions optimales permettant de réaliser plusieurs cycles hybridations-déshybridations en utilisant le même dispositif microfluidique et la même puce. Dans le dispositif microfluidique présenté au paragraphe 4.2, l'adsorption non-spécifique ainsi que la stabilité du greffage au cours de plusieurs cycles d'utilisation ont été étudiées.

Comme nous le verrons dans la suite, l'utilisation de surfactant (SDS) et la force ionique du milieu sont sans surprise les paramètres clés qui contrôlent l'adsorption non spécifique de l'ADN sur les surfaces. D'autre part, le mode de deshybridation et le temps d'illumination de la puce par la lampe à mercure sont les éléments qui contrôlent la stabilité du greffage.

Finalement nous avons réalisé des courbes de fusion mettant en évidence la spécificité de l'hybridation dans notre système.

4.3.1 Comparaison de l'hybridation dans un microsystème aux techniques habituelles.

Conditions expérimentales

Nous avons réalisé avec des lames Genescore issues d'un même lot de fabrication une réaction d'hybridation dans un dispositif microfluidique simplifié (figure 4.20) et dans une chambre d'hybridation classique. Le plan de puce "Qualité" a été utilisé pour ces mesures.

Le protocole expérimentale en dispositif microfluidique est le suivant :

- Collage du dispositif microfluidique simplifié sur la lame Genescore (annexe E).
- 10 nM de cibles complémentaires des sondes 1, 2 et 3 marquées Cy5 dans une solution contenant 50% Formamide, 3,4 X SSC, 0,28% SDS est écoulee dans la chambre d'hybridation pendant 30 min. La température est maintenue stable en mettant en contact le dispositif avec une plaque chauffante régulée à 42°C.
- Rinçages de la puce effectués dans le microsystème avec 3 solutions : 0,2% SDS et 1 X SSC, 1 X SSC et enfin 0,1 X SSC dans cet ordre.
- Décollage du microsystème et séchage de la puce. L'intensité de fluorescence est mesurée à l'aide d'un scanner.

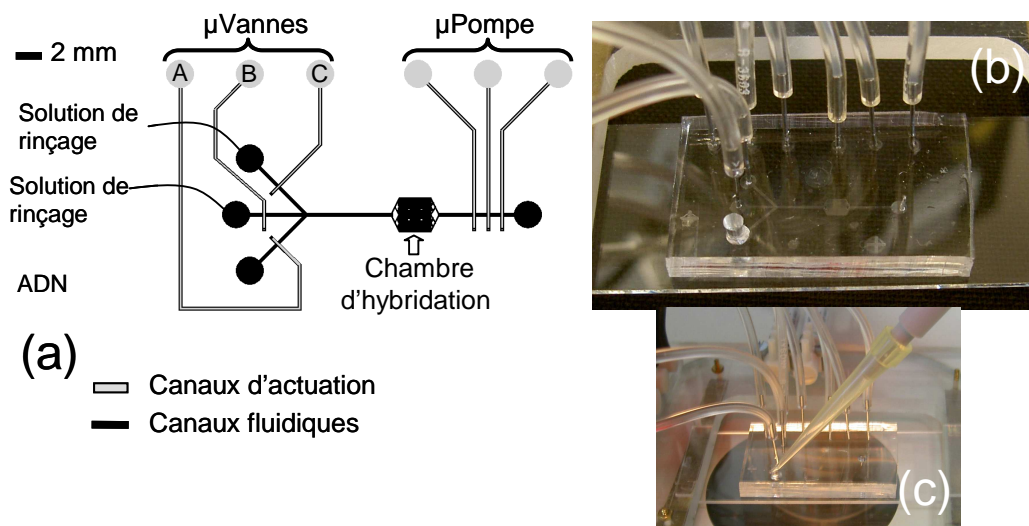


FIG. 4.20 – Dispositif microfluidique simplifié : (a) schéma des canaux d’actuation et fluidiques. La chambre d’hybridation mesure 2,4 mm par 2,4 mm par 20 μ m. (b) Photos du dispositif. (c) Pipettage direct de l’échantillon d’ADN sur le système.

L’expérience témoin avec les techniques habituelles est réalisée avec les mêmes solutions. Les rinçages sont réalisés dans des cuves de 100 mL et l’hybridation est réalisée en déposant 40 μ L de solution d’hybridation sur la puce, que l’on recouvre d’une contre lamelle de verre pour éviter l’évaporation. Le tout est alors mis dans une chambre d’hybridation hermétique plongée dans un bain-marie à 42°C pendant 30 min.

Résultats

La figure 4.21 montre les résultats des scannes des puces. Globalement l’intensité des spots après hybridation sur puce est supérieure ou égale à celle obtenue par l’hybridation habituelle comme l’illustre la figure 4.21. Ceci est tout à fait cohérent avec les travaux déjà cités au paragraphe 4.1.3 où la présence d’un écoulement continu favorise le mélange et l’homogénéité au-dessus de la puce.

Ces mesures préliminaires montrent que l’utilisation du PDMS est possible pour l’étude de la réaction d’hybridation. En effet le collage du PDMS sur les lames Genescore ainsi que le niveau d’étanchéité n’a pas posé de problème.

Le dispositif microfluidique simplifié a servi de prototype à la plate-forme décrite précédemment. Dans la suite nous utiliserons uniquement la plate-forme présenté au paragraphe 4.2.

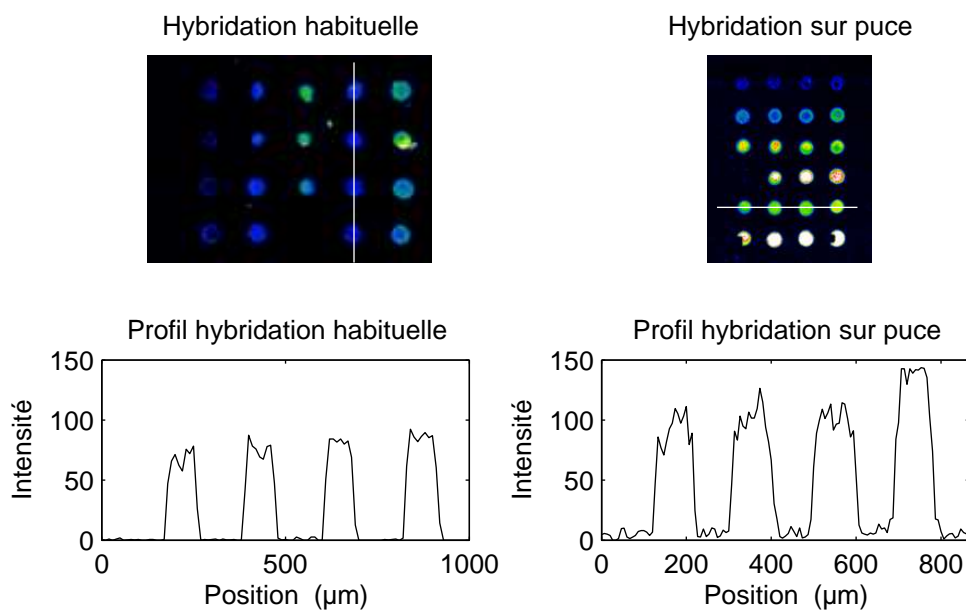


FIG. 4.21 – Résultats des hybridations par la technique habituelle et sur puce. les figures ci dessus montrent les profils d’intensité repérés par une ligne blanche.

4.3.2 Adsorption spécifique et non spécifique

Conditions habituelles d’hybridation

Nous avons mesuré l’adsorption non-spécifique dans des conditions classiques d’hybridation pour des oligonucléotides complémentaires de la sonde 3 d’une longueur de 50 bases. Le tableau 4.2 résume les différents tampons d’hybridation et de rinçage utilisés ici.

Tampon	Composition
B	3, 4 X SSC,
	50% Formamide, 0, 28% SDS, 10 mM de Tris-HCl pH=8
B’	3, 4 X SSC,
	0, 28% SDS
	10 mM de Tris-HCl pH=8
R	1 X SSC, 0, 2% SDS

TAB. 4.2 – Composition des différents tampons utilisés.

Notre but est de suivre l’effet des rinçages par différents tampons sur l’adsorption mesurée par fluorescence. Les trois réservoirs du microsysteme sont respectivement remplis de 20 nM d’oligonucléotides dans le tampon B, du tampon B’ et du tampon R. La température est réglée à 42°C. La solution d’oligo (notée ADN sur les figures) est envoyée dans la chambre d’hybridation selon la procédure décrite plus haut (paragraphe 4.2.2) avec un écoulement continu maintenu pendant toute l’expérience (0,65 $\mu\text{L}/\text{min}$) depuis le réservoir. L’évaporation est donc complètement négligeable ici. Les solutions B’ et R

rincent séquentiellement les puces.

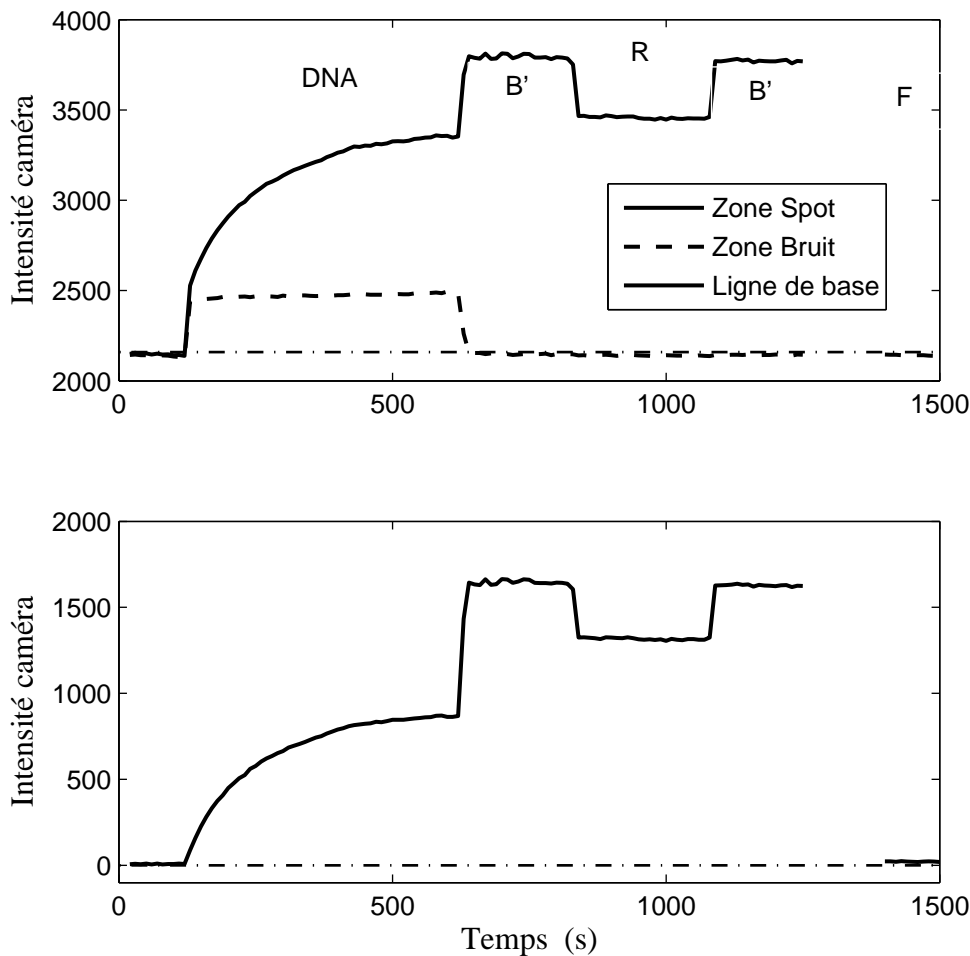


FIG. 4.22 – Signal de fluorescence en fonction du temps d’un spot d’ADN. Les lettres correspondent aux compositions de tampon décrites dans le tableau 4.2. La solution ‘DNA’ correspond au tampon B avec 20 nM d’oligonucléotides de 50 bases. En haut l’intensité de la zone spot et bruit, en bas la différence. ‘F’ est de la formamide pure.

L’acquisition d’image est réalisée pendant 0,5 s toutes les minutes, le shutter coupant l’illumination la plupart du temps. L’effet du photoblanchiment sur la cinétique d’hybridation est négligeable ($k_a C \tau_b / \langle S \rangle = 1500 > 100$). L’intensité de la zone spot et de la zone bruit sont représentées à la figure 4.22.

A l’arrivée de la solution d’oligo, la fluorescence augmente brusquement dans les zones spot et bruit à cause de la fluorescence des oligos marqués en solution. L’intensité de la zone spot continue à augmenter jusqu’à se stabiliser alors que la zone bruit reste fixe. A la fin de l’hybridation, le changement de tampon (B’), ramène l’intensité de la zone bruit à la ligne de base, montrant ainsi que l’adsorption non spécifique sur la lame de verre est négligeable. La puce est alors rincée avec le tampon R puis B’. On remarque que le niveau de fluorescence du spot avant et après le rinçage par le tampon R est équivalent. Ceci met en évidence que le tampon R ne diminue pas la fluorescence de la zone spot, montrant

ainsi que les oligos ne sont pas désorbés.

On remarque la variation de l'intensité de fluorescence lors des changements de tampon. Ces variations qui ont été mesurées à plusieurs reprises sont interprétées comme étant dues à la sensibilité du fluorophore au solvant qui l'entoure.

Finalement une solution pure de formamide (F) qui déstabilise fortement la réaction d'hybridation s'écoule dans le système, ramenant ainsi les niveaux de fluorescence à la ligne de base. Tous les oligos ont bien été déshybridés.

Ces expériences montrent que :

- dans les conditions utilisées ici, l'adsorption sur le verre et sur le PDMS sont négligeables.
- le rinçage par une solution de faible force ionique (R), défavorisant les interactions non-spécifiques mais pas l'hybridation, n'induit pas de desorption. Ceci suggère que l'adsorption sur la puce est spécifique.

Effet du SDS

Nous avons réalisée une série d'expériences à 30°C sans utiliser de formamide pour différentes forces ioniques (1 M, 0,5 M et 0,1 M de NaCl) en l'absence et en présence de SDS à 0,28 %. Une solution tampon contenant 10 nM des mêmes ADN cibles que précédemment est d'abord introduite dans la chambre d'hybridation suivie par une solution tampon sans ADN et une solution de formamide pour déshybridiser les sondes (figure 4.23).

A une force ionique de 1 M sans SDS, l'adsorption sur les surfaces est très importante et les données ne sont pas exploitables. Pour une force ionique de 0,1 M sans SDS, l'adsorption non spécifique est négligeable. La figure 4.23 montre les cinétiques pour 0,5 M NaCl avec ou sans SDS. On remarque qu'en l'absence de SDS (figure 4.23 a), le signal de la zone bruit ne revient pas à la ligne de base (en rouge sur la figure) quand le tampon est introduit dans la chambre. En présence de SDS (figure 4.23b), cette effet est négligeable.

Ceci met en évidence une propriété bien connue du SDS : s'adsorbant aux surfaces et notamment sur le PDMS [73], ce surfactant ionique négativement chargé occupe les sites d'adsorption et augmente la répulsion électrostatique des ADN. L'adsorption non spécifique s'en trouve largement diminuée.

Cependant ces mesures ne peuvent faire la différence entre une adsorption non spécifique sur la surface de verre greffée de PEG et sur le PDMS. Des mesures ont montré une influence du SDS sur le signal d'hybridation à l'équilibre (figure 4.24). Le SDS n'ayant pas d'effet direct sur l'ADN [74], ceci suggère que du SDS s'adsorbe sur la surface des spots, augmentant la répulsion électrostatique.

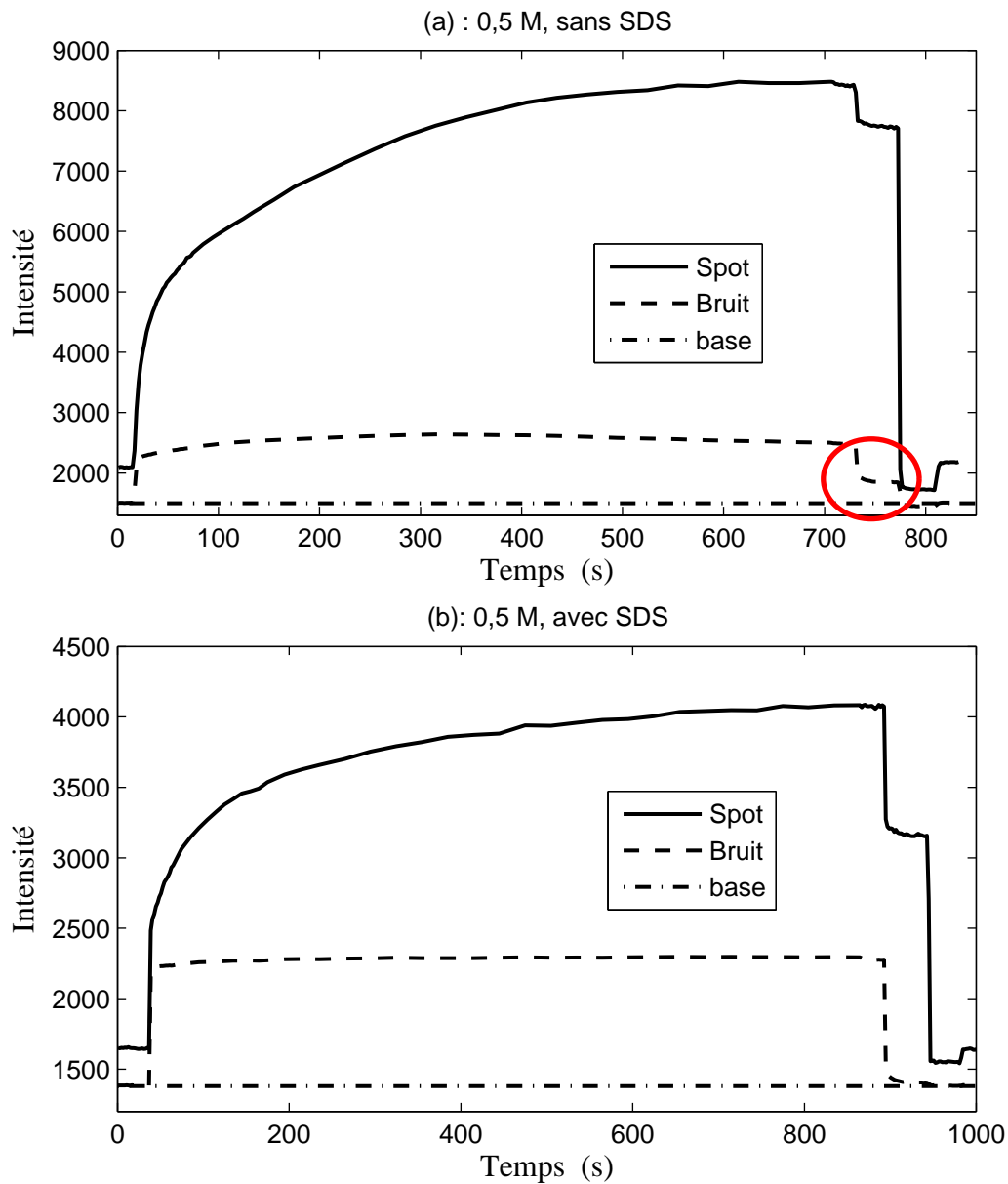


FIG. 4.23 – Effet de la présence de SDS sur l’adsorption spécifique et non spécifique. En trait continue, le signal de la zone spot, en pointillé la zone bruit. Quatre solutions sont successivement introduites dans la chambre : du tampon avec ADN puis du tampon seul, de la formamide pure et finalement du tampon seul. (a) : 0,5 M de NaCl sans SDS. (b) : 0,5 M de NaCl avec 0,28 % de SDS.

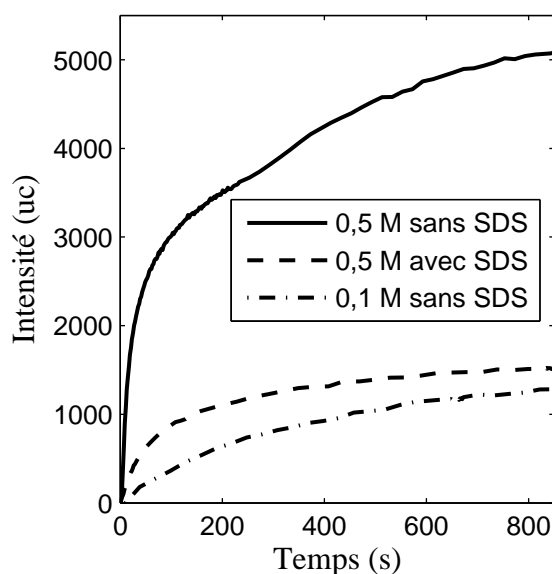


FIG. 4.24 – Intensité corrigée de l’adsorption non spécifique en présence de différents tampons.

4.3.3 Stabilité du greffage au cours de plusieurs hybridations-désybridations

Différents paramètres ont montré une influence sur la longévité des greffages. La stabilité du greffage est apparue principalement sensible aux élévations de température [64] et à l’illumination de la lampe à mercure (550 nm après filtre dichroïque). Ce dernier point a été identifié comme le plus important dans notre cas. Sans diminution importante du temps d’illumination, la densité diminue très rapidement jusqu’à devenir inutilisable après parfois seulement 3 cycles hybridation-désybridation. D’autre part il est préférable de réaliser la désybridation à la formamide pure, qui dénature fortement l’hybridation même à basse température. Une augmentation de température au dessus de la température de fusion est plus agressive.

Dans des conditions proches de l’optimal, l’usure du greffage est montré à la figure 4.25. La même solution est hybridé à 42°C (tampon B du tableau 4.2, 20 nM d’oligo de 50 bases) à plusieurs reprises après une désybridation à la formamide pure à la même température. Le temps d’illumination de la lampe à mercure est de 0,5 s toutes les minutes. La densité de greffage est alors déterminée grâce à l’étalonnage du signal de caméra (paragraphe 4.2.5) et en supposant que les ADN sondes sont saturés. Dans ces conditions, la diminution d’intensité à l’équilibre diminue d’environ 3,3% après chaque expérience. A 35°C, on mesure une diminution moins importante à chaque cycle (1%).

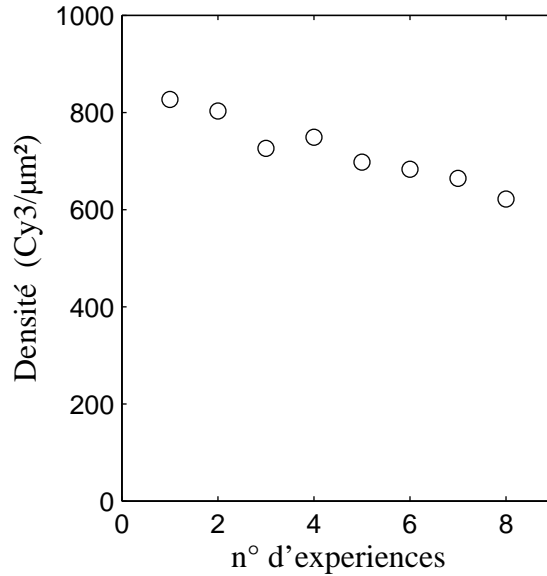


FIG. 4.25 – Diminution de la densité de greffage au cours des cycles hybridation-déshybridation.

4.3.4 Mesures de courbes de fusion

Conditions expérimentales

Nous avons mesuré la quantité d'ADN cible hybridé en fonction de la température pour différentes longueurs d'oligo cible (20, 40 et 50 bases) sur des oligos sondes de 50 bases, complètement complémentaires et comprenant un mésappariement. Les mesures suivantes ont été réalisées simultanément. La solution d'hybridation utilisée contient 50% de formamide, 3,4 X SSC (0,66 M de NaCl) et 0,28% de SDS. Un écoulement faible est maintenu dans la chambre avec une recirculation importante. La température varie de 25°C à 60°C à raison de 1°C/min.

	Séquence (5' → 3')
Sonde 1	NH2- GTGCCTCACGGTGGTTGCCATCACTGTCTTCATGTTTCGAGTATTTTCAGCC-3'
Sonde 1-M	NH2- GTGCCTCACGGTGGTTGCCATCACGGTCTTCATGTTTCGAGTATTTTCAGCC-3'
Cible 1	Cy3- ACATGAAGACAGTGATGGCA-3'
Sonde 2	NH2- TTTTGAGATCTGGCTTCATTTTCGACGCTGACGGAAGTGGTTACCTGGAAG-3'
Sonde 2-M	NH2- TTTTGAGATCTGGCTTCATTTTCGACTCTGACGGAAGTGGTTACCTGGAAG-3'
Cible 2	Cy3- CTTCCAGGTAACCACTTCCGTCAGCGTCGAAATGAAGCCA-3'
Sonde 3	NH2- AACGCCCATCTTAAAATCGACGCCTGTCTCTCCCCATTGCTCTTACCAG-3'
Sonde 3-M	NH2- AACGCCCATCTTAAAATCGACGCCAGTCTCTCCCCATTGCTCTTACCAG-3'
Cible 3	Cy3- CTGGTAAGAGCAATGGGGGAGAGACAGGCGTCGATTTTAAGATGGGCGTT-3'

TAB. 4.3 – Séquence d'ADN utilisée ici. Les séquences qui s'hybrident sont soulignées. Le préfixe -M désigne l'oligo sonde modifié d'une base (en gras).

Nous avons utilisé le plan de puce "SNP" décrit dans l'annexe H. Pour plus de clarté, nous reproduisons dans le tableau 4.3 les ADN sondes avec les ADN cibles utilisés ici. Lors

de l'expérience d'hybridation, les trois cibles sont présentes dans la solution d'hybridation à une concentration de 10 nM chacune. Les cibles 1, 2 et 3 vont s'hybrider parfaitement sur les sondes 1, 2 et 3 respectivement. Les cibles 2 et 3 vont aussi s'hybrider avec un mismatch C-T et C-A sur les sondes 2-M et 3-M respectivement. Suite à un problème de spotting, les sondes 1-M ne se sont pas greffées.

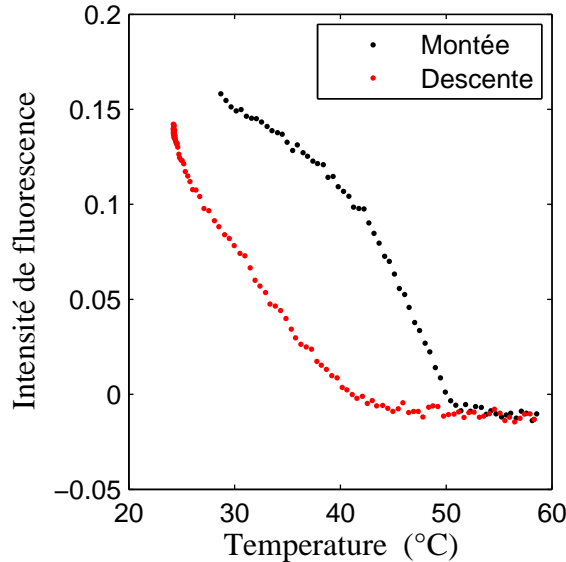


FIG. 4.26 – Intensité de fluorescence en fonction de la température pour la sonde 3. On remarque la différence entre la montée en température et la descente. La température varie à 1°C/min.

Résultats

La figure 4.26 montre la courbe de fusion pour la sonde 3 pour la descente et la montée en température. On remarque que les deux courbes ne se superposent pas, ce qui met en évidence les effets cinétiques. Dans la suite, seules les courbes de fusion pour les températures croissantes sont représentées. Etant une notion thermodynamique, la température de fusion ne peut être clairement définie pour ces mesures : nous ferons donc référence dans ce paragraphe à la température de dissociation à 50%, $T_{d,50}$, comme étant la température à laquelle le signal de fluorescence a diminué de moitié. Cette grandeur a été reliée à la spécificité de l'hybridation [75].

La figure 4.27 montre les intensités de fluorescence normalisées en fonction de la température. Le tableau 4.4 donne les températures de fusion calculées avec le programme *HyTherTM* et corrigées pour l'effet de la formamide par la formule [76] :

$$T_f = T_f^0 - 0,65 \text{ Formamide} \quad (4.7)$$

Où Formamide représente le rapport volumique de formamide exprimé en pourcent. On y trouve aussi les $T_{d,50}$ mesurées dans notre système. La figure 4.27 montre une corrélation linéaire satisfaisante entre $T_{d,50}$ et T_f .

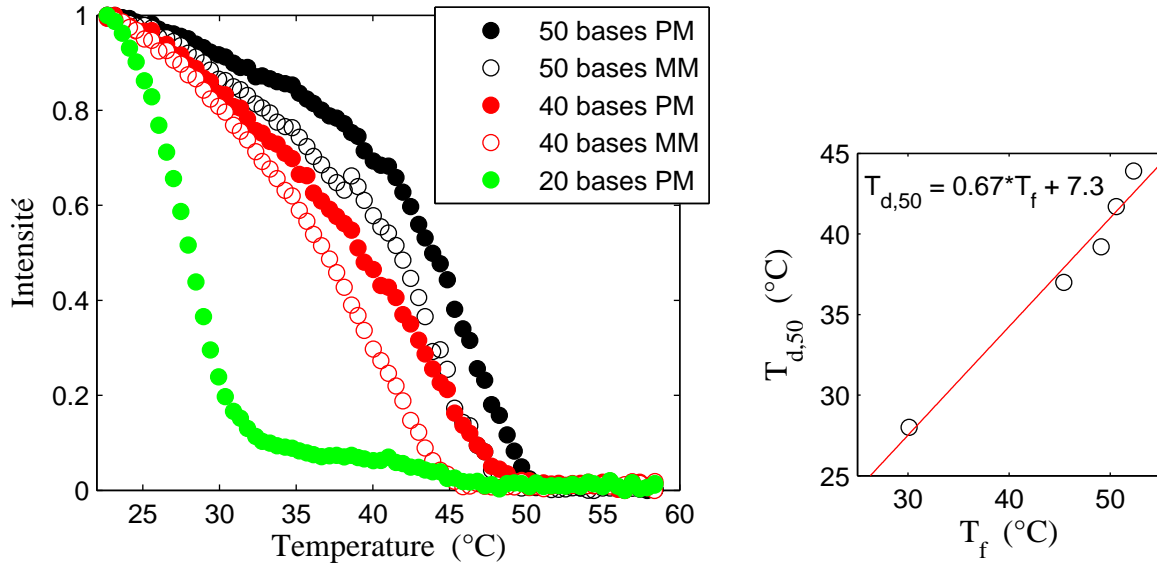


FIG. 4.27 – A gauche : intensité normalisée d’hybridation en fonction de la température, pour des appariements complémentaires de 50, 40 et 20 bases (sondes 3, 2 et 1 respectivement). Pour 50 et 40 bases, l’effet d’un mésappariement C-A et C-T respectivement, est mesuré. A droite : Comparaison des températures mesurées $T_{d,50}$ sur puce et calculées en solution T_f .

		T_f calculée en solution	$T_{d,50}$ mesurée sur puce
Sonde 3	50 bases PM	52,3°C	43,9°C
Sonde 3-M	50 bases MM	50,6°C	41,7°C
Sonde 2	40 bases PM	49,1°C	39,2°C
Sonde 2-M	40 bases MM	45,4°C	37°C
Sonde 1	20 bases PM	30,1°C	28°C

TAB. 4.4 – Températures de fusion calculées à l’aide du logiciel *HyTher*TM.

Cette série de mesures est cohérente avec les données thermodynamiques en solution : la température de dissociation $T_{d,50}$ est d’autant plus grande que la longueur de la zone hybridée est grande. De plus la déstabilisation due à un mésappariement augmente quand on diminue la longueur des brins ($\Delta T = 1,7^\circ\text{C}$, $2,2^\circ\text{C}$ pour 50 et 40 bases respectivement), en accord avec la tendance bien établie (voir par exemple [77]).

4.4 Intégration dans un système portable

Pour valoriser le savoir faire acquis grâce à la réalisation de la plate forme, nous avons fabriqué un système portable d'interface du microsysteme.

Cette interface portable a été réalisé en collaboration avec Yves-Marie Subervie pendant son stage de 3^e année à l'ESPCI et le bureau d'étude de Bertin Technologies, Alain Estève, Jean Descoudras et Richard Plottier.

Ce prototype d'interface se compose :

- d'un système mécanique de positionnement du microsysteme,
- d'un régulateur de pression et d'électrovannes pouvant contrôler 16 micro-vannes intégrées,
- d'un microscope inversé à fluorescence avec un laser rouge commandable,
- d'une interface électronique permettant le contrôle par ordinateur de l'ensemble, la mesure de température ainsi que la commande de puissance pour le réchauffeur,
- d'une interface standard avec une caméra CCD.

Le schéma 4.28 montre l'avant projet de l'interface portable. La photo 4.29 montre l'interface montée avec (a) le système en entier et (b) un gros plan sur le microsysteme avec ses connectiques et le réchauffeur en or. L'ensemble pèse environ 3 kilos, hors caméra, et est facilement transportable.

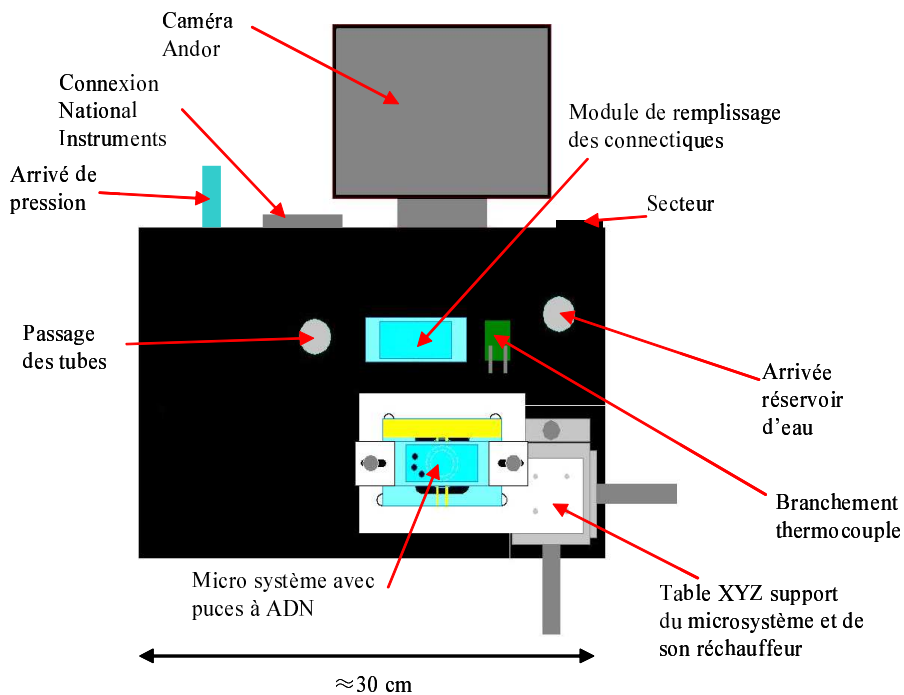


FIG. 4.28 – Plan d'avant projet de l'interface portable microsysteme.

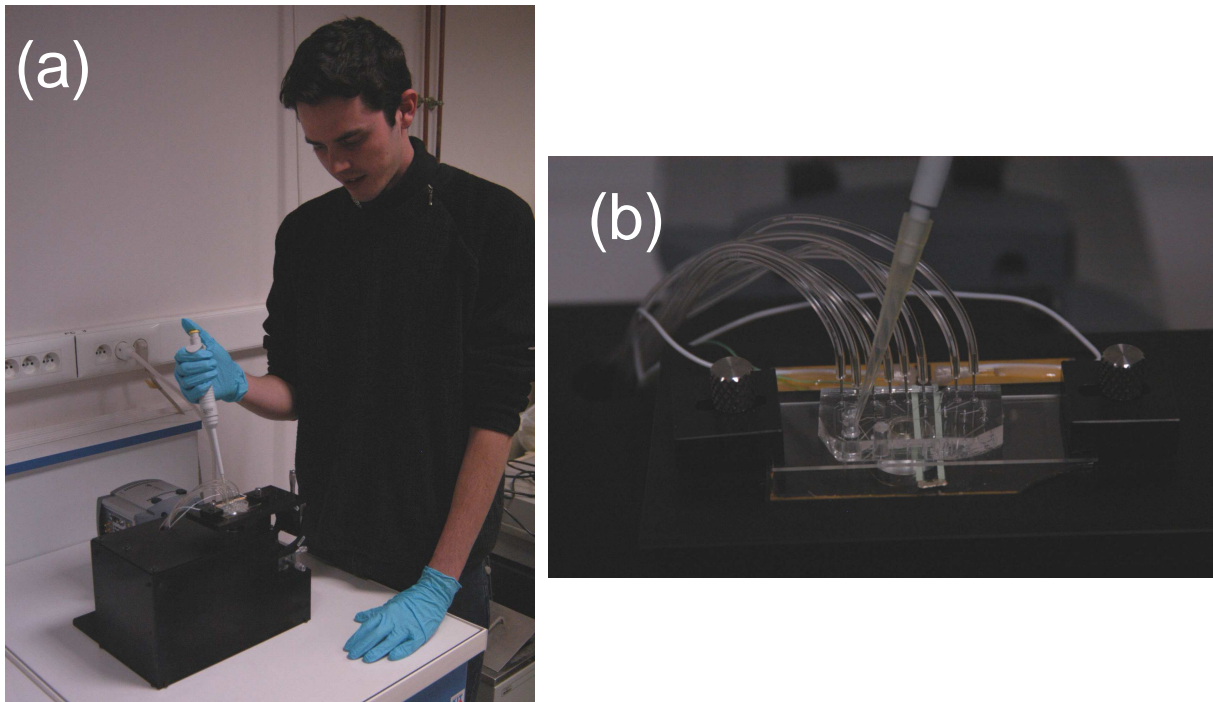


FIG. 4.29 – Photos de l’interface portable montée : (a) photo d’ensemble, et (b) gros plan sur le microsysteme.

4.5 Conclusion

Dans cette partie, après avoir situé notre travail dans le domaine dynamique des puces à ADN, nous avons décrit une plate-forme originale intégrant autour d’une puce à ADN un contrôle précis des écoulements microfluidiques, de la température et une mesure sensible par fluorescence de la réaction d’hybridation. La plate-forme est compatible avec le format standard des puces à ADN (1 pouce par 3 pouces). Chaque élément a été caractérisé :

- la température du système a été calibrée à $\pm 0,1^\circ\text{C}$ à l’aide de brins d’ADN fonctionnalisés (Molecular Beacon).
- les écoulements microfluidiques ont été étalonnés.
- l’évaporation à travers le PDMS a été mesurée et un faible écoulement permet d’en rendre l’effet négligeable.
- les conditions expérimentales où le photoblanchiment est négligeable sont précisées.

L’observation de la fluorescence avec une caméra CCD refroidie permet de mesurer en temps réel une centaine de spots simultanément avec une limite de détection de l’ordre de $6 \text{ Cy}3/\mu\text{m}^2$, ce qui est environ mille fois plus sensible que les techniques de détection basées sur la masse des ADN [62,65]. De plus le dispositif ne consomme que très peu d’échantillon puisque l’on peut déposer aussi peu que $10 \mu\text{L}$ et que la chambre d’hybridation a un volume de 420 nL.

Une première série de mesures d’hybridation a validé le montage. Des résultats d’hybridation obtenus sur notre plate-forme et selon les techniques habituelles ont montré un rendement égale ou supérieur pour l’approche microfluidique.

En vue des études présentées par la suite, nous avons établi les conditions permettant l'utilisation répétée de notre dispositif microfluidique, en terme d'adsorption non-spécifique ainsi que d'usure du greffage. A cette occasion, l'ajout de SDS a montré une double influence : la diminution importante de l'adsorption de surface d'une part, et la diminution du signal de fluorescence à la suite d'une hybridation d'autre part.

La spécificité des puces a été testée par des mesures de courbes de fusion. Des différences de température de dissociation à 50 % pour des brins parfaitement complémentaires et contenant un mésappariement ont été mesurées, conformément aux données en volume.

Finalement un prototype portable d'interface de la plate-forme a été conçu et fabriqué. Ce dispositif condense les fonctionnalités du dispositif expérimental dans un objet portable.

Chapitre 5

Analyse expérimentale de la réaction d'hybridation sur puce

La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi!

Albert EINSTEIN

LA plate-forme que nous venons de décrire est un outil privilégié pour l'étude de la réaction d'hybridation sur puce. Le contrôle de la température, des écoulements couplé à une mesure sensible de la réaction par fluorescence va nous permettre de compléter des observations réalisées avec d'autres dispositifs et d'étendre la pertinence de modèles physiques.

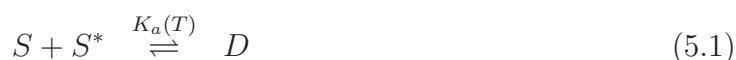
Comme il le sera rappelé dans l'introduction, l'ancrage d'un des oligos à la surface modifie la physique de la réaction d'hybridation par rapport à la situation en volume. D'une part, l'affinité est diminuée : grâce à des mesures de courbes de fusion en volume et sur puce, nous compléterons une image physique des processus expliquant d'autres mesures [65]. D'autre part, la cinétique d'hybridation est couplée au transport des ADN cibles à la surface. Ce couplage, classique des réactions hétérogènes a été observé qualitativement [57] et semi-quantitativement [78] pour les puces à ADN. Dans ce chapitre, un modèle de couplage réaction-diffusion-advection est rappelé et expérimentalement étendu au cas des puces à ADN grâce à une comparaison quantitative avec des mesures effectuées sur la plate-forme.

5.1 Introduction : généralités sur la réaction d'hybridation

Cette partie a pour but de faire le point sur la réaction d'hybridation qui constitue l'élément de base de la puce à ADN. Après quelques notions sur la réaction en volume qui constitue en quelque sorte la situation de référence, nous mettrons l'accent sur les aspects spécifiques qui différentient la réaction d'hybridation sur puce.

5.1.1 La réaction en solution

La réaction d'hybridation est l'association de deux brins d'ADN complémentaires simples brins, S et S^* pour former un brin d'ADN D double brin :



La constante d'affinité $K_a(T) = [D]/[S][S^*]$ dépend fortement de la température, de la force ionique du milieu, de la longueur du brin et de sa composition en nucléotide. On définit une température de fusion T_m qui correspond à la température où les quantités de brins hybridés et non hybridés sont égales. Cette température est généralement comprise entre 5 et 95°C.

La thermodynamique de cette réaction est bien documentée : le modèle du plus proche voisin [70, 79] permet le calcul avec une bonne précision de la variation d'enthalpie ΔH et d'entropie ΔS pour n'importe quelle séquence d'ADN. L'ADN étant un polymère portant une importante charge électrique, une correction pour l'effet d'écrantage par les ions en solution est nécessaire. Différents modèles sont revus dans [80]. L'effet de solvants spécifiques comme la formamide qui est souvent utilisée pour abaisser la température de fusion est discuté dans [76]. Par la suite, les données thermodynamiques sont calculées à l'aide du logiciel *HyTherTM* du laboratoire de Santalucia disponible en ligne¹.

En ce qui concerne la cinétique, l'hybridation se modélise par une réaction bimoléculaire et on peut la décrire par la relation suivante :

$$\frac{\partial[D]}{\partial t} = k_a[S][S^*] - k_d[D] \quad (5.2)$$

k_a est la constante d'association en $M^{-1}s^{-1}$ et k_d est la constante de dissociation en s^{-1} . k_a dépend faiblement de la température et de la longueur du brin [81]. Elle passe par un maximum à environ 20 degrés sous la température de fusion et varie notablement avec la force ionique [82] et plus faiblement avec le taux de formamide [83]. A forte concentration en sel, on retiendra la relation suivante issue de [81] :

$$k_a = 3,5 \cdot 10^5 \sqrt{N} M^{-1} s^{-1} \quad (5.3)$$

1. <http://ozone2.chem.wayne.edu/Hyther/hythermenu.htm>

ou N désigne le nombre de nucléotide. A noter que la cinétique d'hybridation est limitée par l'étape de nucléation de la double hélice. La diffusion n'est pas limitante en volume malgré la faible diffusivité de l'ADN [81]. Le taux de déshybridation $k_d = k_a/K_a$ quant à lui est le miroir cinétique de l'affinité entre les deux brins : selon la longueur, il varie de $0,14s^{-1}$ pour 6 nucléotides (7 s de durée de vie) à $3 \cdot 10^{-32}s^{-1}$ pour 20 nucléotides (50000 ans de durée de vie!)².

5.1.2 La réaction d'hybridation sur une surface

La présence de la surface et le mode d'ancrage de l'ADN modifient les propriétés d'hybridation. Par rapport à la situation en volume, des effets supplémentaires interviennent qui vont tous dans le sens de la déstabilisation de l'hybridation :

- L'entropie à 2 dimensions diffère de la situation en volume et une autre modélisation est nécessaire (isotherme de Langmuir).
 - L'existence d'une charge de surface due à la présence des ADN sondes, entraîne une répulsion électrostatique des ADN cibles.
 - Pour de forte densité de sondes ou de longs ADN, des interactions entre pelotes de polymère peuvent donner naissance à des effets de brosses de polymère, abaissant l'affinité de l'hybridation.
 - L'ancrage à la surface diminue les mouvements de la sonde et donc sa disponibilité.
- Cette énumération met en avant l'importance de la chimie de greffage [84]. La présence d'un espaceur entre l'ADN sonde et la surface et sa rigidité sont des facteurs importants.

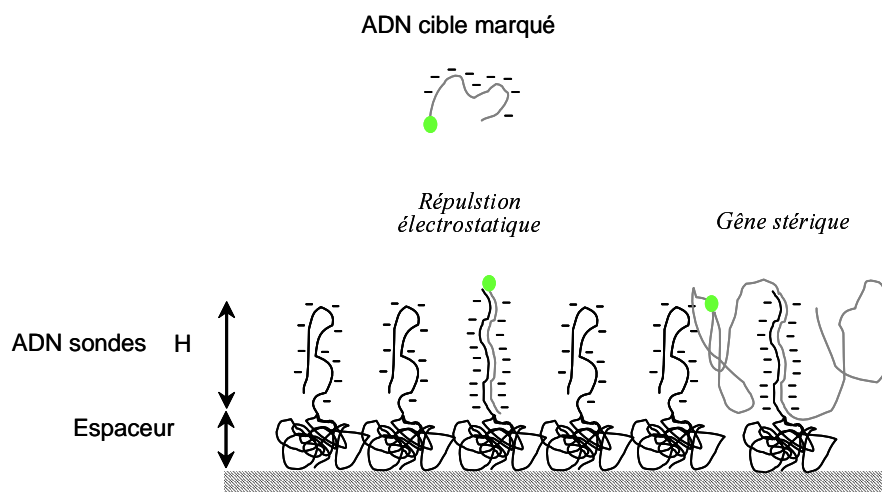


FIG. 5.1 – Vue schématique de l'hybridation sur puce : les ADN sondes forment sur une couche d'épaisseur H sur la surface une densité de charge volumique qui crée un potentiel électrostatique et ainsi une répulsion des ADN cibles. Pour des ADN cibles longs ou bien des densités de sondes importantes, des gênes stériques interviennent. Les contre-ions ne sont pas représentés.

De plus comme nous le verrons plus précisément par la suite (5.3.1), le transport des ADN à la surface modifie la cinétique d'hybridation.

2. Pour cet exemple, les conditions expérimentales considérées sont 1 M d'ions sodium à 42°C.

5.2 Comparaison de courbes de fusion en volume et sur puce

Dans cette partie, nous avons comparé des mesures de courbes de fusion sur puce et en volume pour un appariement parfaitement complémentaire et pour un mésappariement. Les mesures en volume ont été réalisées grâce à l'aide de Laurent Lacroix, chercheur INSERM du Muséum National d'Histoire Naturelle.

5.2.1 Conditions expérimentales

Nous avons réalisé des courbes de fusion sur puce et en volume dans les mêmes conditions expérimentales. Le tampon utilisé se compose de 40 % de Formamide, 10 mM de Tris-HCl pH=8, 3,4 x SSC et de 0,28 % de SDS. La courbe de fusion en solution a été mesurée par absorption UV à 275 nm. L'hybridation sur puce a été suivie par mesure de fluorescence des spots de la puce "SNP" en fonction de la température (annexe H).

Les oligos utilisés sont donnés dans le tableau 5.1. Sur puce, une solution de 100 nM de cible 2-20 est introduite dans la chambre d'hybridation avec une forte recirculation. En plus, un écoulement faible (100 nL/min) est maintenu pendant toute l'expérience depuis le réservoir pour éliminer l'évaporation. La température est modifiée de 20°C à 55°C, puis de 55°C à 20°C avec des vitesses de 0,2°C/min à 1°C/min.

L'intensité de fluorescence des spots 2 et 2-M est traité avec la relation suivante (4.5) :

$$\frac{\langle I_{spot} \rangle - \langle I_{bruit} \rangle}{\langle I_{bruit} \rangle - \langle I_{vide} \rangle} = \frac{\langle d \rangle}{C h} \quad (5.4)$$

qui corrige la dépendance du rendement du fluorophore en fonction de la température.

Nous avons estimé de plus l'intensité maximum du spot de la manière suivante : dans le même tampon à 35°C, nous avons hybridé les oligos complémentaires des sondes 2 et 2-M. Ces oligos de 50 bases de long s'hybrident avec une grande affinité : L'intensité mesurée est considérée comme étant le signal maximum que l'on peut obtenir. Les intensités mesurées lors des fusions sont normalisées par ces valeurs.

	Séquence (5' → 3')
Sonde 2	NH2- TTTTGAGATCTGGCTTCATTTTCGACGCTGACGGAAGTGGTTACCTGGAAG-3'
Sonde 2-M	NH2- TTTTGAGATCTGGCTTCATTTTCGACTCTGACGGAAGTGGTTACCTGGAAG-3'
Cible 2-20	Cy3- TTCCGTCAGCGTCGAAATGA-3'

TAB. 5.1 – Séquences d'oligo utilisées ici pour la mesure de courbes de fusion. La mutation est disposée au centre.

Les mesures de fusion en volume sont effectuées avec deux échantillons : un mélange équimolaire à 1 μM, (i) de la sonde 2 avec la cible 2-20 et (ii) de la sonde 2-M avec la cible 2-20. La température est modifiée de 3°C à 70°C à raison de 0,1°C/min. Les données d'absorption sont traitées selon les méthodes habituelles décrites par exemple dans [85].

Brièvement, l'absorption UV des brins d'ADN, en plus de dépendre de l'hybridation, varie avec la température. Le traitement de l'adsorption UV brute, A , nécessite donc deux lignes de bases, une pour la dépendance en température de l'ADN simple brin (A_s) et une autre pour l'ADN double brin (A_d). La fraction d'ADN hybridé est alors égale à $\theta = \frac{A_d - A}{A_d - A_s}$. Le coefficient d'affinité s'écrit alors $K_a = \frac{\theta}{(1-\theta)^2 C}$.

5.2.2 Comparaisons des mesures en volume et en surface

La figure 5.2 donne les allures des courbes de fusion en volume pour les mesures d'absorption A_{275} brutes (a) et après détermination de la fraction d'ADN hybridée (b). Ces courbes ont deux plateaux bien identifiés à basse température et à haute température, correspondant respectivement aux états complètement hybridé et complètement déshybridé. La transition est nette pour une température de fusion de 44,6°C (37,8°C) pour l'association complémentaire (avec un mésappariement).

A partir de ces données, le coefficient d'affinité est accessible (figure 5.2 c) et son logarithme montre une dépendance linéaire en fonction de l'inverse de la température : la variation d'enthalpie et d'entropie de la transition sont indépendantes de la température. Tous ces éléments sont conformes à la transition hybridé-déshybridé que l'on s'attend à avoir en volume pour des oligos courts [85].

Les allures des courbes obtenues sur puce sont qualitativement différentes (figure 5.3) : à basse température, le plateau n'est pas accessible dans la gamme de température explorée et la transition s'étale sur un large intervalle de température. De plus les températures de fusion sont plus basses qu'en solution, tout en montrant une discrimination aussi forte qu'en volume entre l'appariement parfait et un mésappariement. Ces mesures sont considérées à l'équilibre car les courbes, mesurées à la montée et à la descente en température se superposent.

Les différences que nous venons d'observer ne peuvent être expliquées par la méthodologie utilisée, faisant intervenir la mesure de fluorescence. Bien que le rendement de fluorescence dépende de l'environnement local du fluorophore [86, 87], sa dépendance en température est corrigée par le traitement d'image (4.2.5) et des mesures précises ont déjà été effectuées par cette méthode [88]. De plus nous avons vérifié que le rendement du fluorophore Cy3 n'était pas modifié par l'hybridation, ce qui est le cas pour la fluorescéine [89]. Ainsi les différences s'expliquent essentiellement par l'ancrage à la surface. Une revue des origines physiques possibles est présentée dans la partie suivante.

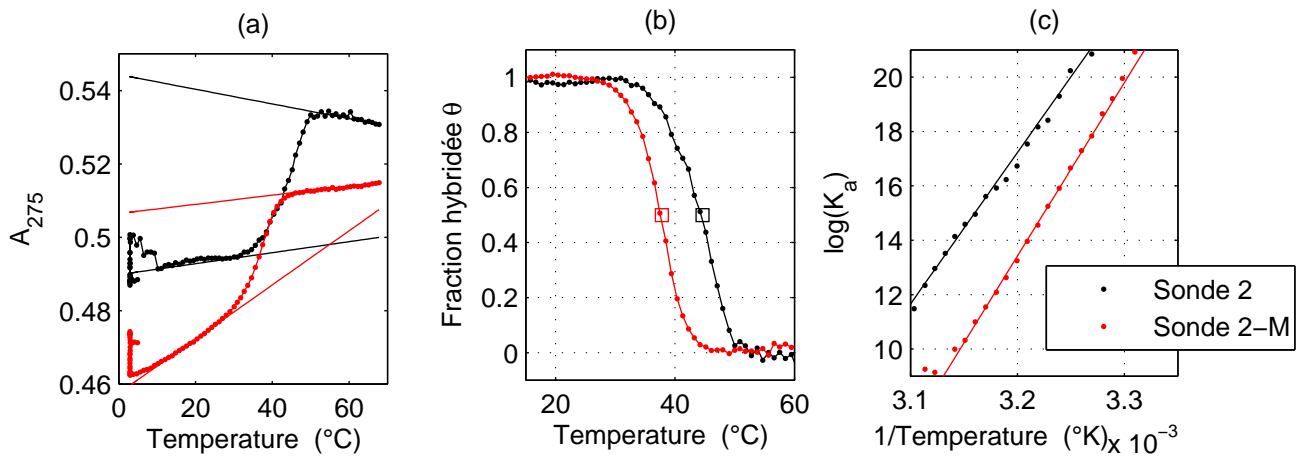


FIG. 5.2 – Courbes de fusion en volume : (a) mesures brutes d’absorption à 275 nm avec les lignes de bases; (b) fraction d’ADN hybridé θ déduite des mesures précédentes; (c) tracé du logarithme népérien de $K_a = \frac{\theta}{(1-\theta)^2 C}$ en fonction de l’inverse de la température ($C=1 \mu\text{M}$).

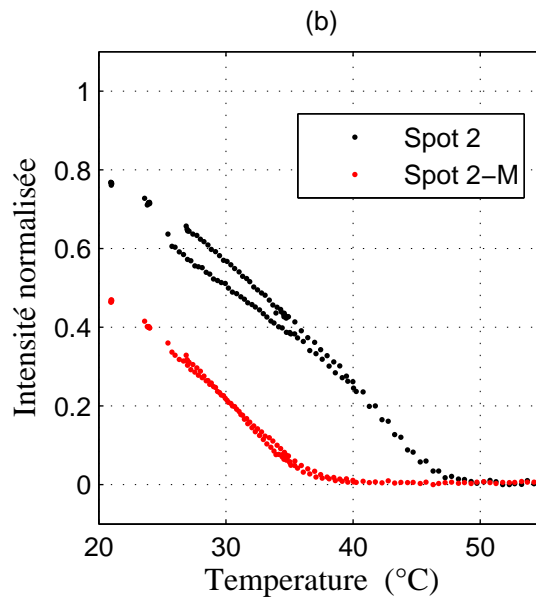


FIG. 5.3 – Courbes de fusion sur puce pour une concentration de 100 nM.

5.2.3 Origines physiques des différences de la réaction d’hybridation sur puce

Comme nous l’avons vu dans l’introduction (5.1), la réaction en surface se différencie de la situation en volume par divers facteurs. Nous allons voir ici les différents effets susceptibles de rendre compte de nos mesures.

L’isotherme de Langmuir : théorie de base

Nous commençons par le point de vue le plus simple d’une adsorption à une surface : l’isotherme de Langmuir. Bien vérifié expérimentalement [59, 62, 90], l’isotherme de Langmuir suppose les hypothèses suivantes : on considère l’adsorption d’espèces neutres sur une surface décorée d’une quantité finie de site d’adsorption pouvant recevoir chacune une

seule espèce [91,92]. Si on considère une concentration d'ADN cible C et un nombre total d'ADN sonde N_s , le nombre de sites N_h hybridés vérifie :

$$\frac{\partial N_h}{\partial t} = k_a C (N_s - N_h) - k_d N_h \quad (5.5)$$

A l'équilibre thermodynamique ($\frac{\partial N_h}{\partial t} = 0$), atteint après un temps de l'ordre de $\approx 1/(k_a C + k_d)$, nous obtenons :

$$\frac{N_h}{N_s} = \frac{K_a C}{1 + K_a C} \quad (5.6)$$

Si on suppose qu'il n'y a pas de répulsion électrostatique, de gêne stérique et que le greffage laisse libre de tout mouvement la sonde, la constante d'affinité $K_a = k_a/k_d$ est égale à celle calculée en solution. Sa variation en température est donc donnée par la relation $K_a = e^{-(\Delta H - T\Delta S)/RT}$.

Prise en compte de la charge de surface : répulsion électrostatique

Le greffage des ADN sondes qui sont fortement chargés négativement (une charge par base) crée un potentiel de surface qui repousse les ADN cibles. Ceci entraîne une baisse d'affinité de l'hybridation, tendance qui va augmenter avec le taux d'hybridation : en effet chaque brin cible augmente la charge de surface lors de l'hybridation.

Cet effet de répulsion électrostatique qui a été modélisé par Vainrub *et al* [93] fournit une explication satisfaisante des mesures effectuées par le groupe de Georgiadis [61,65]. Ces mesures montrent une influence de la densité de sondes sur l'efficacité d'hybridation [65] d'une part, et des déviations à l'isotherme de Langmuir [61] d'autre part. Dans la suite, nous prendrons la description théorique d'Halperin *et al* [91], équivalente à la description de Vainrub *et al* mais plus simple.

La charge de surface est modélisée par une couche d'épaisseur H chargée uniformément par les ADN sondes (figure 5.1). Le potentiel de surface est alors fonction de cette densité en volume sur l'épaisseur H et de l'écrantage par les contre-ions. La loi de Langmuir s'en trouve modifiée : la constante d'affinité dépend alors du taux d'hybridation $B = N_h/N_s$:

$$\frac{B}{C(1-B)} = K_a e^{-\Gamma(1+B)} \quad (5.7)$$

Γ étant l'énergie libre d'origine électrostatique d'un ADN cible hybridé sur une surface chargée. Pour de fortes concentrations de sel, on obtient la formule suivante :

$$\Gamma = 8\pi N^2 \sigma l_B \frac{r_D^2}{H} \quad (5.8)$$

avec N le nombre de base de l'ADN sonde, σ la densité de sondes, $l_B = e/\epsilon kT \approx 0,7nm$ la longueur de Bjerrum, $r_D = (8\pi l_B C_s)^{-1/2}$ la longueur de Debye, C_s la concentration en sel

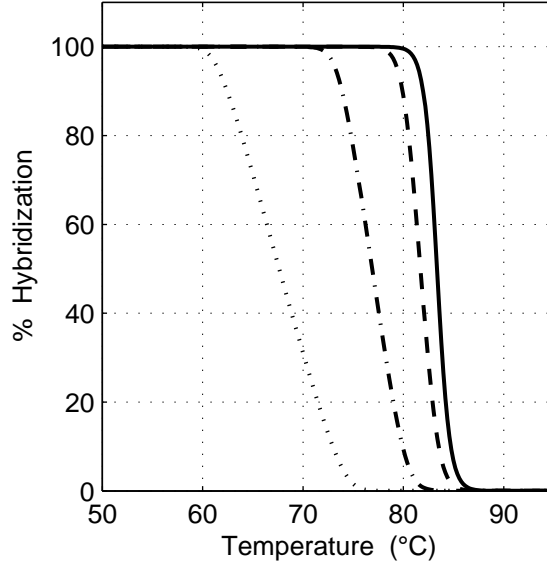


FIG. 5.4 – Courbes de fusion pour des ADN de 50 bases dans 0,66 M de $Na^+ Cl^-$: proportion de sondes hybridées en fonction de la température pour différentes densités de sondes. (—) Isotherme de Langmuir sans interaction électrostatique (Eq. 5.6). Isothermes prenant en compte la répulsion électrostatique (Eq. 5.7) pour différentes densités : (--) $\sigma = 2,5 \cdot 10^{11} cm^{-2}$, (-.) $\sigma = 1 \cdot 10^{12} cm^{-2}$ et (..) $\sigma = 2,5 \cdot 10^{12} cm^{-2}$,

monovalent et $H \approx N \times 0.17 nm$ la hauteur des sondes [91]³. La figure 5.4 montre l'effet d'une densité croissante de sondes sur une courbe de fusion. Par rapport à la description de Langmuir, la T_m est abaissée et la transition est élargie.

L'isotherme décrit par l'équation 5.7 est connue sous le nom d'isotherme de Frumkin [94], classique dans les domaines de l'électrochimie et de l'adsorption de surfactants aux interfaces [95]. Dans la suite, nous désignerons cette description sous le terme de Frumkin.

On remarque un accord qualitatif entre les courbes théoriques de la figure 5.4 et nos mesures sur puce. On peut estimer le Γ dans notre cas expérimental : avec une densité de sondes d'environ $1200 \mu m^{-2}$ ($1800 \mu m^{-2}$) pour le spot 2 (2-M), on obtient $\Gamma = 0,8$ (1, 3), respectivement. Ce modèle, qui reste imprécis dans ses prédictions quantitatives [91] nous montre que la répulsion électrostatique ne peut être négligée dans notre cas. De plus ces observations sont cohérentes avec des mesures réalisées par d'autres laboratoires [96, 97], qui ont mis en évidence les mêmes tendances des courbes de fusion sur puce.

Prise en compte de la gêne stérique : effet brosse

Les effets de brosse de polymère interviennent à la surface pour des brins d'ADN long ou des densités élevées [98] : les ADN sondes et les ADN cibles après hybridation forment une pelote gonflée à la surface du substrat. Si ces pelotes sont suffisamment proches, elles interagissent de façon défavorable, diminuant d'autant l'affinité d'hybridation. Ceci

3. avec e la charge d'un électron, k la constante de Boltzmann, T la température en Kelvin et ϵ la constante diélectrique de l'eau.

se produit quand la distance moyenne entre sonde est de l'ordre du diamètre de Flory de l'ADN⁴, typiquement pour des densités de $10^5 \mu\text{m}^{-2}$ dans le cas d'une sonde de 50 bases. Cet effet n'a pas reçu de confirmation expérimentale dans le cas des puces à ADN.

Si on fait l'hypothèse que la densité est uniforme sur la puce, les densités sont trop faibles pour avoir de tels effets dans notre cas.

Problème géométrique : ancrage à la surface

Généralement les oligos sondes sont accrochés à une surface de façon soit non spécifique [39], soit covalente via une molécule "espaceur" [41, 84, 99].

L'effet de la longueur de l'espaceur et de la densité de sondes est apparu comme critique pour la spécificité et le rapport signal sur bruit de la détection [65, 100]. La charge électrostatique de l'espaceur ainsi que son hydrophobicité ont un effet moindre [101].

Dans notre cas, la chimie de greffage Genescore (voir annexe H) utilise de longs espaceurs hydrophiles et souples formés de PEG (PolyEthylène Glycol) de 3400 g/mol de masse molaire. Ce type de greffage laisse une grande liberté à la molécule d'ADN sonde [102]. Nous ne pouvons conclure ici à propos de l'effet de l'ancrage : une étude en faisant varier la longueur du PEG, ou sa densité sortait du cadre de la thèse.

5.2.4 Conclusion sur les courbes de fusion sur puce

La comparaison de la courbe de fusion sur puce et en volume a mis en évidence des différences importantes : une description simple de type Langmuir doit être enrichie par la prise compte de la charge de surface pour qualitativement expliquer nos mesures sur puce. La répulsion électrostatique diminue la température de fusion et élargit la transition, ce que nous observons ici expérimentalement. Le modèle présenté de Halperin *et al*, qui dans un autre cadre fait référence à l'isotherme de Frumkin, fait de façon plus générale intervenir une interaction de paires ou d'ordre supérieur [95], répulsive dans ce cas.

Ces conclusions obtenues par les comparaisons des courbes de fusion complètent les résultats acquis à température constante par SPR (Surface Plasmon Resonance) : la répulsion électrostatique a été mis en évidence en faisant varier la densité de surface [65, 93] et le potentiel électrostatique de surface [103].

4. Le diamètre de Flory est le diamètre moyen d'un polymère gonflé en situation de bon solvant. Il est fonction de l'indice de polymérisation du polymère, ou nombre de monomères, N à la puissance $3/5$.

5.3 Influence de la vitesse d'écoulement sur la cinétique d'hybridation

Dans cette partie, la cinétique d'hybridation a été étudiée expérimentalement avec en particulier la mise en évidence du couplage entre la réaction de surface et le transport des ADN cibles. Après la description du modèle ERC (Effective Rate Coefficients) qui décrit ce couplage, il sera comparé aux expériences réalisées sur la plate-forme.

5.3.1 Modélisation couplage réaction-diffusion-advection : Modèle ERC

Comme nous l'avons déjà précisé, l'hybridation en volume se différencie de l'hybridation sur puce par la nécessité pour le brin d'ADN cible de se trouver à la surface de la puce pour réagir. Loin de l'équilibre, le flux d'ADN vers la surface crée un gradient de concentration et une zone de déplétion. La concentration à la surface sera plus faible qu'en volume et le taux effectif d'hybridation sera alors ralenti.

Ce problème aux dérivées partielles peut se résoudre numériquement. La situation uniquement dominée par la diffusion a été traitée analytiquement [45] et numériquement [104] pour le cas particulier des puces à ADN. En présence d'un écoulement, le problème a suscité de nombreux travaux théoriques car il correspond à la situation expérimentale du BIAcore, appareil mesurant par SPR l'adsorption dynamique de protéines [105]. Il est apparu que le couplage réaction-diffusion-advection devait être pris en compte [106] pour interpréter précisément les résultats.

Depuis, des développements théoriques ont permis de confirmer un modèle semi empirique [107]. En utilisant une description plus exacte des échanges diffusifs et convectifs, le même modèle a pu être dérivé [108] avec précision. D'autres travaux ont permis d'estimer la validité de ce modèle en le comparant à la solution numérique du problème [109–111].

Ce modèle appelé "approximation des coefficients effectifs" ou ERC (Effective Rate Coefficients) a le mérite d'être une équation différentielle ordinaire et d'être valide dans une large gamme de paramètres [111]. Dans cette partie nous allons reproduire son calcul. Puis à partir de cette équation nous verrons l'effet de l'écoulement sur la cinétique de réaction.

Position du problème

Une puce à ADN de diamètre L est placée dans un microcanal de hauteur h soumis à un écoulement de vitesse moyenne v_m . Comme nous sommes à bas nombre de Reynolds, l'écoulement est laminaire et décrit par l'équation de Stokes. Dans la suite nous nous intéressons au problème bidimensionnel en négligeant les effets dans la direction y (figure 5.5) Ceci est valable pour h petit devant la largeur du canal. On peut alors considérer l'écoulement correctement décrit par un profil de Poiseuille, où la vitesse dans la hauteur

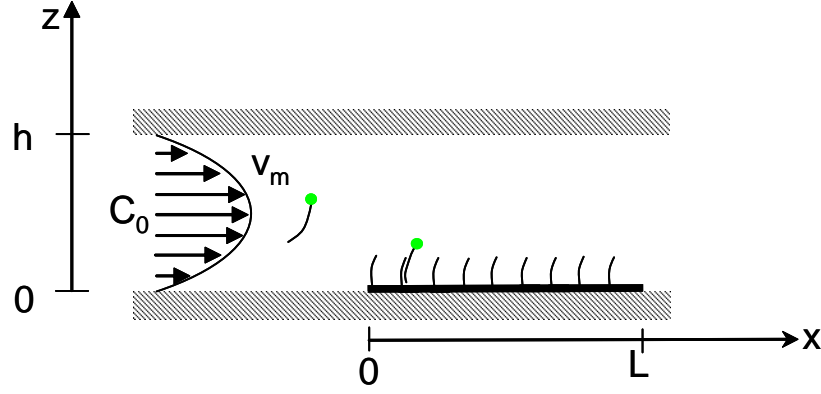


FIG. 5.5 – Position du problème du couplage entre le transport diffusif et advectif et la réaction d’hybridation en surface

du canal suit un profil parabolique avec une vitesse nulle aux parois.

La concentration $C(x, z, t)$ d’ADN cible est régie par l’équation de diffusion-advection :

$$\frac{\partial C}{\partial t} + 6v_m \frac{z}{h} \left(1 - \frac{z}{h}\right) \frac{\partial C}{\partial x} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) \quad (5.9)$$

Les conditions aux limites pour les parois imperméables et aux bords sont :

$$\frac{\partial C(x, h)}{\partial z} = 0 \quad (5.10)$$

$$\frac{\partial C(x, 0)}{\partial z} = 0 \quad \text{si } x \notin [0, L] \quad (5.11)$$

$$C(x, z) = C_0 \quad \text{pour } x < 0 \quad (5.12)$$

$$\frac{\partial C(x, z)}{\partial x} = 0 \quad \text{pour } x > L \quad (5.13)$$

L’adsorption des ADN cibles susceptibles de s’hybrider sur la puce est modélisée par l’isotherme de Langmuir (voir 5.5). Au dessus de la surface de la puce, on a la condition suivante pour $x \in [0, L]$:

$$-D \frac{\partial C(x, 0, t)}{\partial z} = R_T \frac{\partial B(x, t)}{\partial t} \quad (5.14)$$

$$\frac{\partial B(x, t)}{\partial t} = k_a C(x, 0, t)(1 - B(x, t)) - k_d B(x, t) \quad (5.15)$$

avec $B(x, t)$ la densité normalisée de sondes hybridées. On note R_T la densité totale de sondes.

Simplifications

Le problème tel qu’il est posé dans la partie précédente se prête à la modélisation numérique [108]. Cependant nous pouvons simplifier la position du problème par des approximations légitimes, dans le but d’une formulation simple du problème et de la

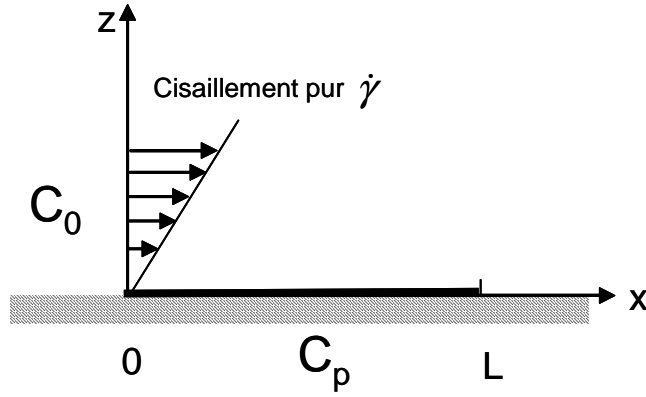


FIG. 5.6 – Simplification du problème du couplage réaction-diffusion-advection.

solution pour la densité de sondes hybridées $B(x, t)$.

Dans nos conditions expérimentales, le temps de réaction étant plus grand que le temps de passage au dessus de la puce, la concentration d'ADN en volume après un court temps de transition, s'établit et varie peu dans le temps. Ainsi la dérivée temporelle de la concentration dans l'équation 5.9 est négligeable par rapport au terme d'advection [112].

Pour résoudre la densité de sonde $B(x, t)$, il suffit de nous intéresser à ce qui se passe proche de surface de la puce, c'est à dire pour z/h petit. Ceci a un sens tant que la couche limite diffusif n'est pas complètement développée dans le canal. Il faut donc que le temps de diffusion dans la hauteur soit plus petit que le temps de convection, et le problème ne s'étendra pas dans tout le canal. Cette situation correspond à des nombres de Graetz $Gr = 1/Pe = LD/h^2v_m$ petits, ou des nombres de Péclet grands. Des calculs numériques [113] ont défini une limite inférieure pour le nombre de Péclet égale à 4,5. Typiquement dans les expériences présentées dans la suite⁵, nous avons $Pe = 50$.

D'autre part, comme nous nous plaçons proche de la paroi, à une distance typique $\delta \ll L$, le flux diffusif est alors plus important dans la direction z que dans la direction x : ce dernier terme peut donc être négligé.

Finalement nous obtenons l'équation simplifiée suivante à la place de 5.9 :

$$6v_m \frac{z}{h} \frac{\partial C}{\partial x} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2}. \quad (5.16)$$

Cette dernière relation peut être rigoureusement obtenue en utilisant des développements en perturbation [112].

5. $h = 20\mu m, L = 100\mu m, D = 10^{-11}m^2/s, v_m = 100\mu m/s$

Problème de Lévêque

On adimensionne de la façon suivante :

$$\tilde{x} = x/L, \quad (5.17)$$

$$Pe = 6v_m h^2/DL, \quad (5.18)$$

$$\tilde{z} = z/hPe^{1/3} \quad (5.19)$$

$$\tilde{t} = k_d t \quad (5.20)$$

Nous avons choisi de redéfinir le nombre de Péclet avec un coefficient 6 afin de faire disparaître ce même coefficient dans l'équation 5.16. En insérant ces nouvelles variables dans l'équation 5.16, nous obtenons le problème de Lévêque :

$$\tilde{z} \frac{\partial C}{\partial \tilde{x}} = \frac{\partial^2 C}{\partial \tilde{z}^2} \quad (5.21)$$

En prenant la variable autosimilaire $\eta = \tilde{z} \tilde{x}^{-1/3}$, nous obtenons le problème auto-similaire $3f'' - \eta^2 f' = 0$ avec $f(0) = 1$ et $f(\infty) = 0$ pour une concentration fixe à la paroi. La couche limite diffusive croît selon $x^{1/3}$ et le flux à la paroi est égale à (variables dimensionnées) :

$$D_{th} \frac{\partial C}{\partial z}(x, 0, t) = 0.54 \frac{D(C(x, 0, t) - C_0)}{h} \left(\frac{LPe}{x} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (5.22)$$

Solution analytique

L'association de 5.15 et de 5.22 permet d'écrire une unique équation pour $B(x, t)$:

$$\frac{\partial B(x, t)}{\partial t} = k_a^e(x) C_0 (1 - B(x, t)) - k_d^e(x) B(x, t) \quad (5.23)$$

avec les coefficients cinétiques effectifs égaux à :

$$k_a^e(x) = \frac{k_a}{1 + \gamma Da (1 - B(x, t)) (L/x)^{1/3}} \quad (5.24)$$

$$k_d^e(x) = \frac{k_d}{1 + \gamma Da (1 - B(x, t)) (L/x)^{1/3}} \quad (5.25)$$

avec $\gamma = 1,85$. Nous avons introduit le nombre de Damkholer $Da = \frac{k_a R T h}{D P e^{\frac{1}{3}}}$ qui est égale au rapport du temps de diffusion sur le temps de réaction. Ces coefficients effectifs dépendent à la fois du taux d'hybridation $B(x, t)$ et de la position x . Dans le cadre de nos expériences, nous nous intéressons à la quantité moyenne $\hat{B}(t)$. En moyennant le flux établi précédemment selon $x \in [0, L]$, on obtient une expression similaire [108] :

$$\frac{\partial \hat{B}(t)}{\partial t} = k_a^e C_0 (1 - \hat{B}(t)) - k_d^e \hat{B}(t) \quad (5.26)$$

avec les coefficients cinétiques effectifs égaux à :

$$k_a^e = \frac{k_a}{1 + \beta Da(1 - \hat{B}(t))} \quad (5.27)$$

$$k_d^e = \frac{k_d}{1 + \beta Da(1 - \hat{B}(t))} \quad (5.28)$$

avec β égale à 1.15. L'équation précédente est une équation différentielle ordinaire qui admet une solution inverse. Le coefficient β n'est pas universel et dépend de la géométrie du système [111]. Ici en utilisant une approche plus simple par le problème de Lévêque, on trouve un coefficient β identique à celui calculé dans [108] à 7.5% près par défaut.

La figure 5.7 montre des courbes d'hybridation et de déshybridation pour différentes valeurs de Damkholer. En haut nous avons tracé les cinétiques dans une échelle de temps correspondant à la réaction de Langmuir (limite $Da \rightarrow 0$), avec τ_h égale à $1/(k_a C_0 + k_d)$. En bas les mêmes données sont tracées dans une nouvelle échelle de temps où le Damkholer a été introduit. Pour l'hybridation, on obtient :

$$\frac{1 + \beta Da}{k_a C_0 + k_d} \quad (5.29)$$

et pour la déshybridation :

$$\frac{1 + K + \beta Da}{k_d(1 + K)} \quad (5.30)$$

La constante d'affinité réduite $K = k_a C_0 / k_d$ influence le comportement de la cinétique. Comme le montre la figure 5.8, plus la constante d'affinité K est grande, plus la forme de la courbe dévie de l'isotherme de Langmuir $1 - e^{-t/\tau}$. Ceci se comprend bien en considérant la relation 5.26 : pour l'hybridation dans le cas d'une faible interaction ($K \ll 1$), \hat{B} reste faible et les coefficients cinétiques sont quasiment constants, donnant ainsi une solution proche d'une exponentielle de temps caractéristique donnée par l'équation 5.29. Au contraire si K est grand, le coefficient cinétique effectif va varier dans le temps sous l'influence de \hat{B} .

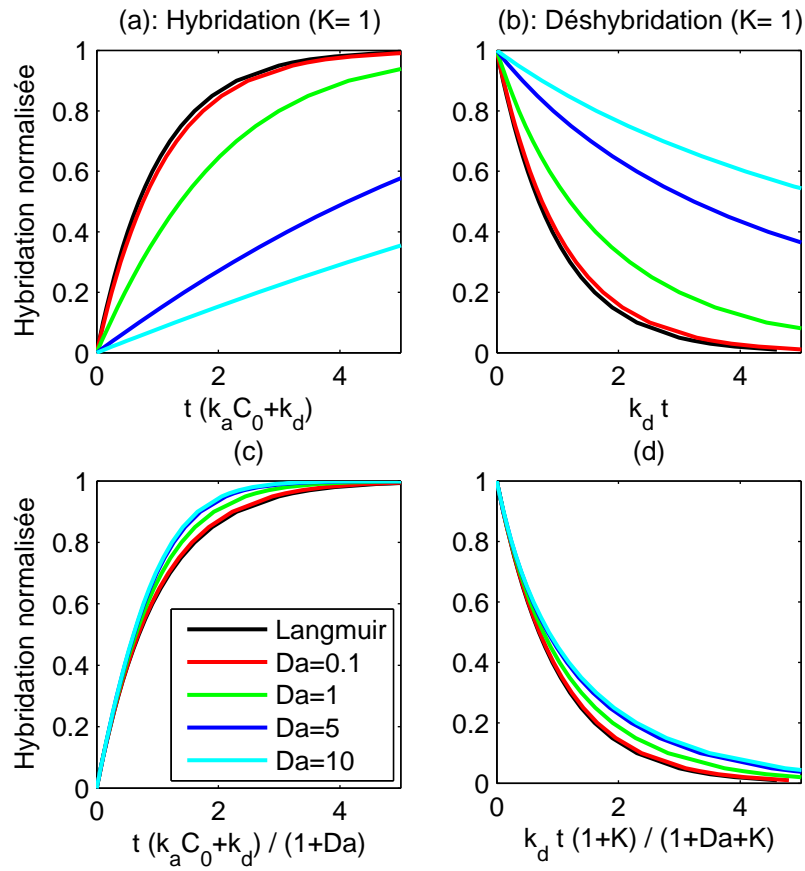


FIG. 5.7 – Effet de l'écoulement sur l'hybridation (a et c) et la déshybridation (b et d) pour différentes valeurs de Damkohler. La constante d'affinité réduite $K = k_a C_0 / k_d$ est prise égale à 1.

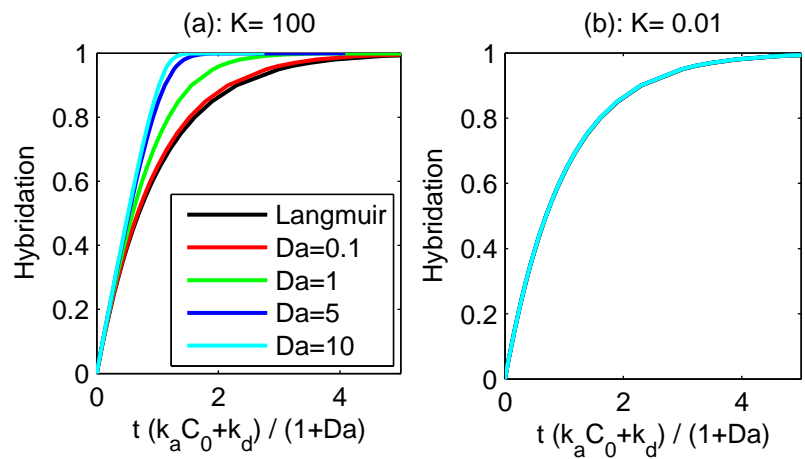


FIG. 5.8 – Manifestation de l'effet de la constante réduite d'affinité $K = k_a C_0 / k_d$ sur la forme de la courbe de cinétique. (a), $K=100$ et (b) $K=0,01$.

5.3.2 Analyse de la cinétique d'adsorption

Avant d'étudier l'effet de l'écoulement, des cinétiques d'hybridation sont comparées à différents modèles d'adsorption de surface dans une situation où le transport est négligeable.

Mesures expérimentales de cinétique d'hybridation

Comme au paragraphe 4.3.3, une solution de 20 nM de cibles de 50 bases complémentaires des sondes 3 a été utilisée. Le tampon se compose de 2,54 X SSC (0,5 M de NaCl), 0,28% SDS. La solution a été introduite à différentes vitesses dans la chambre d'hybridation réglée à 30°C. la figure 5.9 montre les allures des courbes pour différentes vitesses moyennes au dessus des puces. Entre chaque mesure, de la formamide pure déshybride complètement les spots. La série de mesures a été effectuée sur le même spot. On remarque que la vitesse n'a pas d'effet notable sur l'allure de la courbe dans la gamme de vitesses explorée. La cinétique de Langmuir, décrite au paragraphe 5.5, montre un accord partiel avec les mesures.

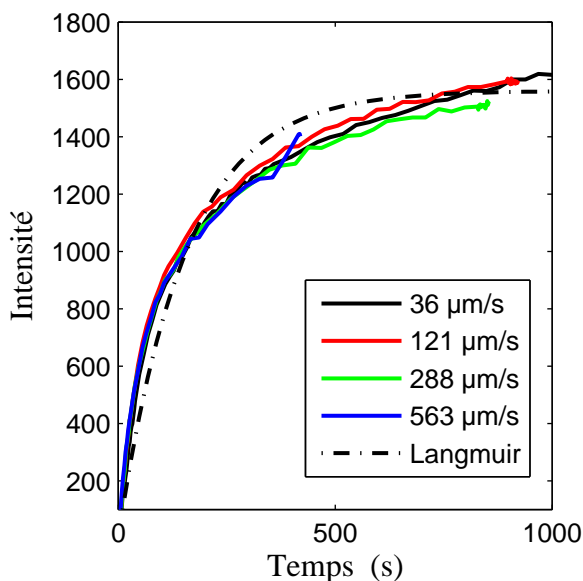


FIG. 5.9 – Hybridation d'ADN de 50 bases de long à plusieurs vitesses moyennes. Le tampon utilisé est 2,54 X SSC (0,5 M de NaCl), 0,28% SDS.

Modèles cinétiques d'adsorption

Les mesures précédentes ne sont pas affectées par le transport et la cinétique de Langmuir n'est que partiellement vérifiée. De façon plus générale, on peut étendre la cinétique de Langmuir par la relation suivante [114] :

$$\frac{\partial B}{\partial t} = k_a C \phi(B) - k_d \psi(B) \quad (5.31)$$

avec k_a , k_d et C qui ont la même signification que dans le cas Langmuir (relation 5.5). Dans ce cadre, $\phi(B)$ représente la probabilité qu'un ADN cible s'hybride pour une fraction de sites occupés B . Si il n'y pas d'interaction, cette probabilité est égale à la fraction de sondes libres $1 - B$, et on retrouve la cinétique de Langmuir. Cependant en présence d'interactions défavorables, $\phi(B) < 1 - B$ et $\phi(B)$ décrit les détails de la cinétique d'adsorption. Celle-ci est a priori une fonction complexe de B . Des cinétiques d'hybridation déviant de l'isotherme de Langmuir ont été rapportées [65,115,116] et des formes de $\phi(B)$ polynomiales ou par exemple du type $\phi(B) = (1 - B)e^{-\gamma B}$ ont été prédites théoriquement [117,118].

Comparaisons des mesures à différents modèles d'adsorption

Comparons les mesures précédentes (figure 5.9) aux différents modèles résumés dans le tableau 5.2. On y trouve le modèle de Langmuir, le modèle ERC présenté plus haut et deux modèles prenant en compte des interactions supplémentaires : le modèle de Langmuir d'ordre deux et le modèle de Frumkin cinétique [94, 118]. La figure 5.10 montre les meilleures approximations. Etant donnée que la température d'hybridation est inférieure de 57°C à la température de fusion des oligos, on suppose que la réaction est totale ($k_d = 0$).

Langmuir	$\frac{\partial B}{\partial t} = k_a C(1 - B) - k_d B$
Frumkin cinétique	$\frac{\partial B}{\partial t} = k_a C(1 - B)e^{-\gamma B} - k_d \psi(B)$
ERC	$\frac{\partial B}{\partial t} = \frac{k_a C(1-B)}{1+1.15Da(1-B)} - \frac{k_d B}{1+1.15Da(1-B)}$
Langmuir 2° ordre	$\frac{\partial B}{\partial t} = k_a C(1 - B)^2 - k_d B$

TAB. 5.2 – Différents modèles de cinétique d'adsorption.

Le tableau 5.3 montre les valeurs des paramètres libres après optimisation des différents modèles, qui sont tracés sur la figure 5.10 avec la courbe expérimentale. Le modèle de Langmuir et ERC ne décrivent pas bien la forme de la courbe. Au contraire, les modèles prenant en compte des interactions plus complexes (Frumkin cinétique et Langmuir d'ordre 2) approche de façon satisfaisante les mesures. Ces observations sur la cinétique sont cohérentes avec nos précédentes mesures de courbes de fusion (5.2).

D'autre part, les valeurs des constantes d'association, de l'ordre de $4 \cdot 10^5 M^{-1}s^{-1}$, sont cohérentes avec les mesures en solution : à -20°C sous la température de fusion, k_a est maximum et on l'estime à $24 \cdot 10^5 M^{-1}s^{-1}$ [81]. La température de mesure plus basse dans notre cas (-57°C sous la température de fusion) et la présence de la surface explique la diminution d'un facteur 5.

Après avoir calibré le signal de la caméra ($0,79I_0 Cy3/\mu m^2$) et estimé le coefficient de

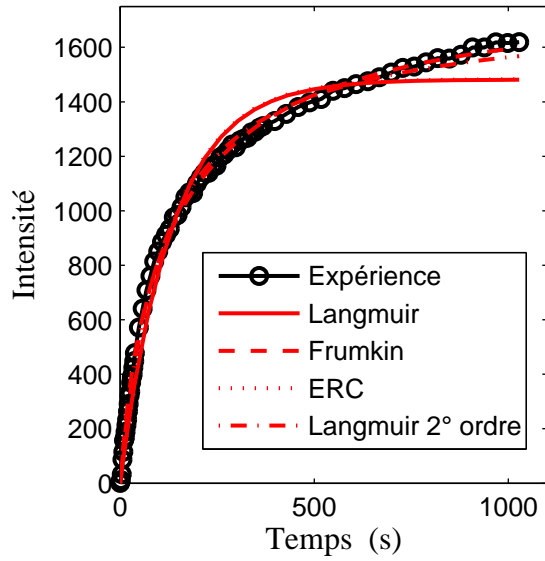


FIG. 5.10 – Meilleures approximations par les différents modèles du tableau 5.2. Les courbes "Langmuir" et "ERC" sont superposées.

	I_0	k_a $M^{-1}s^{-1}$	γ	Da
Langmuir	1482	$3,810^5$	/	/
Frumkin cinétique	1678	$5,810^5$	1,87	/
ERC	1483	$3,810^5$	/	0,001
Langmuir 2° ordre	1736	$4,510^5$	/	/

TAB. 5.3 – Résultats des différents modèles de cinétique d'adsorption.

diffusion de l'ADN à $5 \cdot 10^{-11} m^2/s$ [119,120], on calcule le nombre de Damkholer, décrit plus haut (5.3.1), qui compare le temps de diffusion sur le temps de réaction. On trouve des valeurs comprises entre 0,06 et 0,16. Ces faibles valeurs confirment que le transport est rapide devant la réaction d'hybridation ce qui est en très bon accord avec les expériences (figure 5.9).

Cette analyse montre que la cinétique d'hybridation dans nos conditions expérimentales n'est que partiellement décrite par la cinétique de Langmuir. Des modèles prenant en compte des interactions plus complexes décrivent mieux les allures des courbes. De plus ces modèles fournissent des valeurs de paramètres cohérentes avec les données de la littérature.

5.3.3 Comparaison avec l'expérience du modèle ERC dans le cas des puces à ADN

Mesures expérimentales

Considérons maintenant une autre série de mesures. Avec les mêmes oligos mais dans le tampon B (50 % Formamide, 10 mM Tris-HCl pH=8, 3,4 X SSC (0,66 M de NaCl), 0,28% SDS.), un flux continu de solution d'ADN à 20 nM a été maintenu durant l'expérience à des vitesses moyennes variant de $4,5 \mu\text{m/s}$ à $563 \mu\text{m/s}$. La température est maintenue à 42°C .

Dans un premier temps, les courbes d'hybridation sont approchées au mieux par la fonction :

$$I(1 - e^{-t/\tau}) \quad (5.32)$$

avec I et τ les paramètres ajustables. Après calibration du signal de caméra, la densité de fluorophore est égale à $0,78 \times I$ en μm^{-2} .

La figure 5.11 montre les courbes d'hybridation pour différentes vitesses d'écoulement ainsi que le résultat des meilleures approximations par la fonction 5.32. On remarque l'effet de l'augmentation de la vitesse d'écoulement sur le temps effectif d'hybridation. En augmentant la vitesse de $4,5 \mu\text{m/s}$ à $563 \mu\text{m/s}$, le temps caractéristique τ diminue de 230 s à 100 s (tableau 5.4).

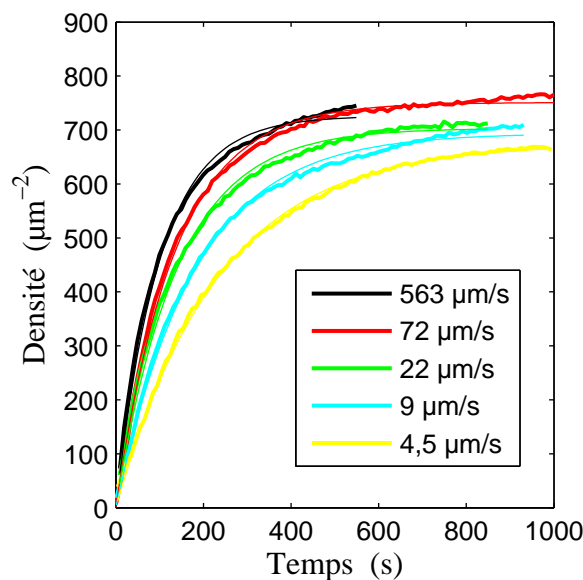


FIG. 5.11 – Effet de la vitesse moyenne de l'écoulement sur la vitesse effective d'hybridation. A gauche signal d'hybridation en fonction du temps pour des vitesses moyennes variant sur 2 ordres de grandeurs.

Vitesse ($\mu m/s$)	τ (s)	Densité (μm^{-2})
4,5	232	720
9	179	744
22	140	697
72	135	688
563	100	668

TAB. 5.4 – Résultats des approximations par la fonction 5.32

Comparaison avec le modèle ERC

Conformément à la conclusion du paragraphe précédent (5.3.2), on remarque sur la figure 5.11 que les approximations des courbes d'adsorption expérimentale par une unique exponentielle n'est pas complètement satisfaisante. Ces observations nous suggèrent d'approcher les mesures avec un modèle hybride ERC-Frumkin de la forme :

$$\frac{\partial B}{\partial t} = \frac{k_a C (1 - B) e^{-\gamma B}}{1 + 1.15 Da (1 - B)} \quad (5.33)$$

en négligeant la dissociation. Le nombre de Damkholer défini plus haut (paragraphe 5.3.1) est égale à :

$$Da = 0,55 k_a R_T D^{-2/3} h^{1/3} L^{1/3} v_m^{-1/3} \quad (5.34)$$

Les quantités $h=20 \mu m$, $R_T = 0,78 \times I \mu m^{-2}$, $L=108 \mu m$ et v_m ont été mesurées préalablement ou pendant l'expérience.

L'ensemble des courbes expérimentales est approché avec un même jeu de paramètres [121]. Ces paramètres sont k_a , γ , l'intensité de fluorescence de la première expérience I_0 , l'usure des spots entre chaque expériences, et le coefficient de diffusion de l'ADN D .

La constante d'association k_a est estimée grâce à l'équation 5.3. Cette valeur est diminuée par un facteur 2,5 à cause de la formamide [83]. Pour 50 bases, on trouve $k_a = 10^6 M^{-1} s^{-1}$. L'usure des spots mesurée précédemment (4.3.3) dans les mêmes conditions est prise égale à 3,3 %.

Ainsi l'ensemble des mesures est approché globalement en faisant varier uniquement I_0 , γ et D . Le résultat est illustré sur la figure 5.12. L'ensemble des courbes est bien approché par un unique jeux de paramètres libres, égaux à $I_0 = 780 \mu m^{-2}$, $D = 3,3 \cdot 10^{-12} m^2/s$ et $\gamma = 1,36$.

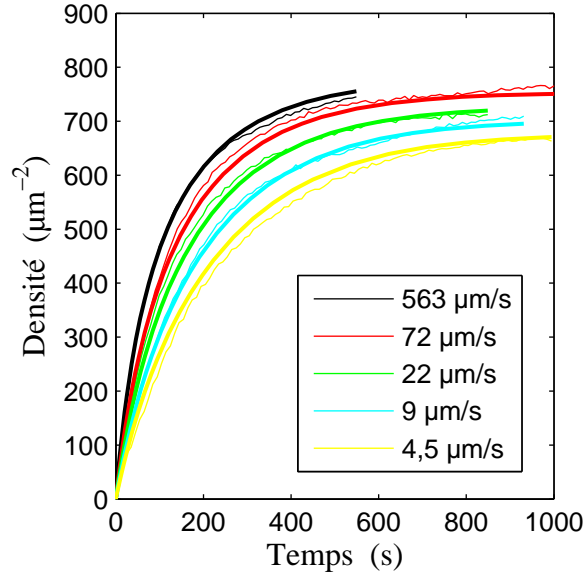


FIG. 5.12 – Approximation de l'ensemble des courbes avec seulement 3 paramètres libres.

Discussion sur les valeurs déduites du modèle

La valeur de γ déduite précédemment (1,36) est cohérente avec l'estimation (1,87) du paragraphe 5.3.2.

En ce qui concerne la valeur du coefficient de diffusion déterminée ici, elle est un peu faible par rapport aux données disponibles dans la littérature. Bien que le coefficient de diffusion de l'ADN n'ait pas été mesuré dans une solution contenant 50% de formamide, on peut estimer une valeur de $2,5 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ à partir des travaux de Nkodo *et al* et de Tinland *et al* [78, 119, 120] en prenant en compte la viscosité de la formamide [83].

Cette différence peut s'expliquer par les approximations réalisées dans le modèle ERC, qui dévie des simulations numériques pour des constantes d'affinité réduite $K_a C$ élevé [111], ce qui est le cas ici. De plus l'action de la formamide sur l'ADN [76] est complexe et est souvent comparée à une diminution effective de force ionique. Sous ces conditions, la valeur de D estimée plus haut doit être diminuée d'un facteur 3.

D'autre part bien que des méthodes mathématiques le permettent [122], nous n'avons pas estimé d'intervalle de confiance sur notre mesure de D .

Pour le coefficient d'association, la valeur déduite de la littérature à $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ permet un bon accord quantitatif avec les mesures. On peut cependant vérifier que le temps d'hybridation extrapolé à $Da \rightarrow 0$, qui représente le temps intrinsèque de la réaction d'hybridation, est compatible avec cette valeur. Pour estimer ce temps $\tau_0 = 1/(k_a C + k_d)$, il suffit d'exploiter la relation suivante :

$$\tau = \frac{1 + 1,15 Da}{k_a C + k_d} \quad (5.35)$$

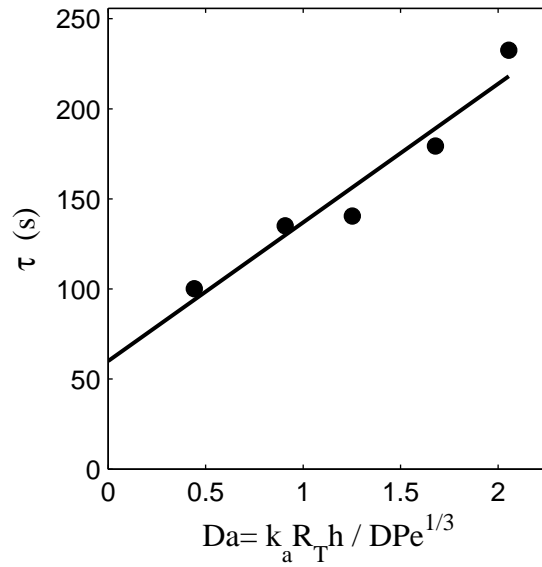


FIG. 5.13 – Temps caractéristiques des mesures en fonction du nombre de Damkholer. On remarque une bonne tendance linéaire en accord avec les prévisions théoriques ($\tau = \frac{1+1,15Da}{k_a C+k_d}$).

qui prédit une relation affine entre le temps caractéristique d'hybridation et le nombre de Damkholer. La figure 5.13 montre les temps caractéristiques τ des cinétiques d'hybridation (tableau 5.4) en fonction du nombre de Damkholer déterminé avec la relation 5.34. La concordance linéaire des points expérimentaux est très satisfaisante étant données les approximations effectuées. La valeur extrapolée est égale à 60 s, ce qui correspond à $k_a = 0,83 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$, valeur en très bonne accord avec la valeur issue de la littérature.

5.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié expérimentalement la réaction d'hybridation sur puce grâce à la plate-forme microfluidique décrite précédemment. Les particularités de la réaction d'hybridation en surface ont été expérimentalement mesurées.

D'une part, grâce à des mesures de fusion effectuées sur puce et en solution, nous avons montré que l'affinité sur puces est plus basse qu'en volume et s'éloigne de la description idéalisée de Langmuir dans nos conditions expérimentales. La prise en compte de la répulsion électrostatique explique qualitativement les différences et complète ainsi les mesures effectuées sur d'autres dispositifs [65].

D'autre part, la cinétique d'adsorption a été expérimentalement analysée. Les phénomènes de transport de l'ADN à la surface ont été mesurés directement en faisant varier sur deux ordres de grandeur la vitesse d'écoulement. Les données expérimentales ont pu quantitativement être comparées au modèle ERC, étendant ainsi sa pertinence aux puces à ADN. Ce modèle a du être adapté pour prendre en compte la cinétique complexe d'adsorption dans nos conditions. Cette plate-forme ouvre de nouvelles perspectives d'études des puces à ADN et de la chimie de greffage.

Chapitre 6

Application au dosage d'allèles

C'est le commencement qui est le pire, puis le milieu, puis la fin. A la fin, c'est la fin qui est le pire.

Samuel BECKETT

DANS ce dernier chapitre, nous avons utilisé la plate-forme microfluidique afin de tester expérimentalement pour la première fois deux méthodes originales de dosage d'allèles. Ces méthodes sont utiles pour la recherche sur la trisomie 21 : une collaboration avec Jérôme Buard et Emmanuelle Haquet de l'IGH (Institut de Génétique Humaine) de Montpellier a été initiée par Marie-Claude Potier sur ce thème.

Basée sur une calibration des puces à ADN pour la première et sur l'observation en temps réel pour la seconde, ces méthodes ont pu être mises en oeuvre grâce au niveau de contrôle atteint par notre plate-forme.

6.1 Introduction

Le dosage d'allèles correspond à la détermination de la quantité relative de séquences d'ADN différentes d'une seule base. Une mesure précise de cette quantité est nécessaire pour l'étude de la non-disjonction des chromosomes 21 qui est à l'origine du syndrome de Down [123]. Pour cette application, il faut pouvoir discriminer des proportions 1, 2/3, 1/3 et 0¹.

D'autres applications biologiques ont besoin de déterminer la fréquence des différentes versions d'un gène, ou allèles, dans une population [125], ou dans un échantillon biologique pour la détermination du génotype (homozygote ou hétérozygote) [10].

1. Pour étudier ces réarrangements chromosomiques, il est nécessaire d'identifier des marqueurs génétiques que l'on va pouvoir détecter par la suite. Les variations génétiques les plus répandues pouvant remplir cette fonction sont les SNP [124] (Single Nucleotides Polymorphism) : en mesurant la quantité relative des versions dites sauvages (la plus courante) et mutées d'un ou plusieurs SNP convenablement choisis, des informations sur les mécanismes biologiques peuvent être déterminées.

La détection d'allèle est aussi impliquée dans le diagnostic cancéreux des échantillons cellulaires [10] : toujours entourées de cellules saines, il faut pouvoir détecter une quantité faible d'allèle muté ($< 15\%$), masquée par une grande quantité d'allèles sains. Une méthode de quantification fiable pourrait diminuer le nombre de faux positifs et augmenter la sensibilité. De plus la mise au point de méthodes impliquant les puces à ADN, permettant des tests à haut débit, est cruciale pour de nombreuses applications.

Différentes stratégies ont été mises en oeuvre utilisant des techniques de biologie moléculaire basées sur l'utilisation de nucléotides modifiés (didéoxyribonucléotides) [10, 125, 126] ou par séquençage direct [127].

L'usage direct des puces à ADN pour la détection d'allèle est relativement rare : la technique DASH (Dynamic Allele Specific Hybridization [128]) permet de déterminer le caractère hétérozygote et homozygote du génotype. L'étude directe de la cinétique d'hybridation sur puce [129, 130] fournit des résultats prometteurs mais non quantitatifs.

Grâce à notre plate-forme microfluidique, nous avons mis en oeuvre pour la première fois une première méthode décrite théoriquement par Halperin *et al* [11] pour le dosage d'allèles. Utilisant un spot spécifique pour chacun des deux allèles, cette méthode nécessite la calibration de la densité des sondes, ce que permet l'environnement microfluidique de notre dispositif.

Une seconde méthode est présentée, basée sur l'étude de la cinétique d'hybridation : grâce à une représentation astucieuse des données, des résultats semi quantitatifs sont obtenus.

6.2 Première méthode basée sur l'équilibre thermodynamique

6.2.1 Principe de la méthode

La méthode présentée ici utilise deux spots pour mesurer un rapport d'allèle, un spot par allèle. Le traitement se fait alors sur la comparaison des niveaux d'hybridation de deux spots [11]. La figure 6.1 illustre la méthode dans le cas où la mutation considérée est une substitution de la base A (allèle sauvage) par la base C (allèle muté).

Les niveaux d'hybridation I_s et I_m des spots sauvages et mutés, sont fonctions des concentrations des allèles sauvages C_s et mutés C_m et des constantes d'affinité. Si on suppose que l'isotherme de Langmuir est vérifié, on obtient :

$$\frac{I_s}{I_s^0} = \frac{K_{s's}C_s + K_{s'm}C_m}{1 + K_{s's}C_s + K_{m's}C_m} \quad (6.1)$$

$$\frac{I_m}{I_m^0} = \frac{K_{m'm}C_m + K_{m's}C_s}{1 + K_{m'm}C_m + K_{s'm}C_s} \quad (6.2)$$

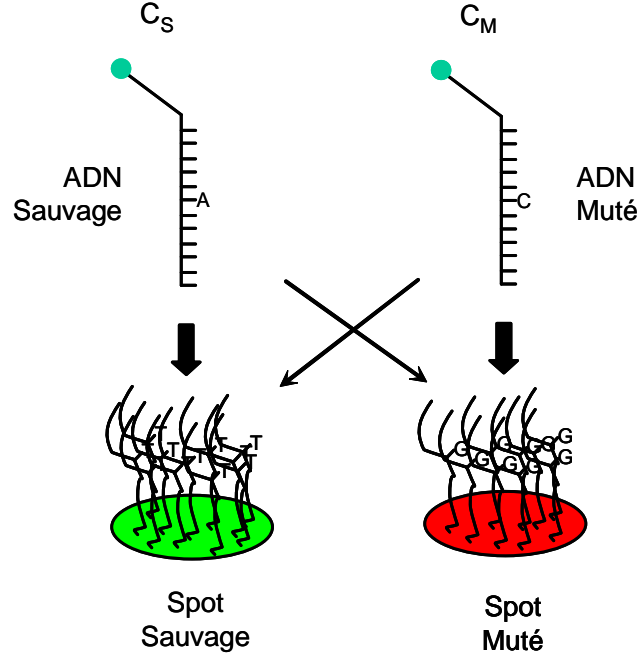


FIG. 6.1 – Illustration de la méthode de dosage d’allèle basée sur l’équilibre thermodynamique.

avec I_i^0 l’intensité maximum du spot $i = s, m$, et K_{ij} la constante d’affinité en M^{-1} de la cible $j = s, m$ sur la sonde $i = s', m'$.

Se basant sur les données en volumes [70], Halperin *et al* supposent de plus que l’hybridation est très discriminante, ce qui implique que $K_{s's}C_s \gg K_{s'm}C_m$ et $K_{m'm}C_m \gg K_{m's}C_s$. La proportion d’allèles mutés est alors fonction des quantités mesurables I_s , I_m , I_s^0 et I_m^0 et d’un paramètre $\alpha = K_{s's}/K_{m'm}$:

$$\frac{C_m}{C_s + C_m} = \frac{\alpha I_m (I_s^0 - I_s)}{I_s (I_m^0 - I_m) + \alpha I_m (I_s^0 - I_s)} \quad (6.3)$$

De façon surprenante, α dépend faiblement de la température, contrairement aux valeurs $K_{s's}$ et $K_{m'm}$ [11].

Nous avons vu précédemment (5.2.4) que la description de Langmuir n’est que partiellement vérifiée, et la prise en compte d’une interaction de pair (d’origine électrostatique), via la description de Frumkin, nous permet une amélioration de l’interprétation de nos mesures sur puce. On rappelle ici l’isotherme de Frumkin, justifié par nos mesures et par la description de la répulsion électrostatique de Vainrub *et al* [93] :

$$\frac{B}{C(1-B)} = Ke^{-\Gamma B} \quad (6.4)$$

Pour cet isotherme et en supposant que le terme de répulsion Γ est le même pour les deux spots, la relation 6.3 n’est que légèrement modifiée. L’unique différence réside dans

l'expression du terme α qui dépend maintenant des taux d'hybridation :

$$\alpha = \frac{K_{s's}}{K_{m'm}} e^{-\Gamma(B_s - B_m)} \quad (6.5)$$

Avec $B_i = I_i/I_i^0$ le taux d'hybridation du spot i .

6.2.2 Mise en oeuvre expérimentale

Conditions expérimentales

Afin de simuler un mélange d'allèles connu, nous avons utilisé des oligos synthétiques de 20 bases de long. Le tableau 6.1 montre les séquences d'ADN : les cibles S et M jouent respectivement le rôle des allèles sauvages et mutés. Nous retrouvons les oligos sondes de la puce "SNP" (annexe H) : les sondes S et M, respectivement complémentaires des cibles S et M, sont différentes d'une base (en gras dans le tableau).

Le tampon utilisé contient 3,4 X SSC, 10 mM Tris-HCl pH=8, 0,28% de SDS et 40% de formamide. La force ionique importante (0,66 M de NaCl) réduit les effets de répulsion électrostatique. La formamide a la double propriété d'abaisser la température de fusion et d'augmenter la discrimination des mésappariements [63, 131, 132]. Les mesures ont été réalisées à 35°C, proche de la température de fusion théorique des cibles en solution (36°C).

Pour valider la méthode, nous avons préparé deux séries de solutions :

- Série A : 7 solutions à différents rapports de concentration $R = C_m/(C_m + C_s)$ (0, 15, 33, 50, 66, 85 et 100%). La concentration totale est constante et est égale à 20 nM.
- Série B : 5 solutions à différents rapports de concentration $R = C_m/(C_m + C_s)$ (0, 1, 2, 5 et 10 %). La concentration totale est égale à 100 nM.

La quantité I^0 est déterminée en hybridant deux cibles de 50 bases complémentaires des sondes S et M, dans le même tampon. Les concentrations de chaque cible sont de 100 nM.

En pratique, les expériences sont réalisées comme suit :

1. Les réservoirs du microsysteme sont nettoyés en déposant plusieurs liquides de rinçage (40 μL de formamide pure suivi de 3 rinçage avec 40 μL d'eau MilliQ) que l'on sèche à chaque fois avec un papier absorbant ;
2. Les 3 réservoirs sont remplis avec la solution test, la formamide pure et la solution d'étalonnage ;
3. La solution d'étalonnage est hybridée dans la chambre pendant 500 s environ ;
4. La formamide est introduite dans la chambre pour déshybrider les cibles d'étalonnage ;
5. La solution test est hybridée pendant 500 s environ.

Ce cycle est répété pour chaque solution, les unes à la suite des autres, dans l'ordre des rapports R croissants.

	Séquence (5' → 3')
Sonde S (2)	NH2- TTTTGAGATCTGGCTTCATTTTCGACGCTGACGGAAGTGGTTACCTGGAAG-3'
Sonde M (2-M)	NH2- TTTTGAGATCTGGCTTCATTTTCGACTCTGACGGAAGTGGTTACCTGGAAG-3'
Cible S	Cy3- TTCCGTCAGCGTCGAAATGA-3'
Cible M	Cy3- TTCCGTCAGAGTCGAAATGA-3'

TAB. 6.1 – Séquences d’oligo utilisées ici comme système modèle pour le dosage d’allèle. La mutation est disposée au centre.

Résultats et discussion

La figure 6.2 montre les mesures brutes pour $R = 15\%$ selon le protocole décrit plus haut. La première augmentation de signal d’hybridation correspond à l’étalonnage des spots, suivi de la déshybridation par la formamide; la solution test est alors hybridée.

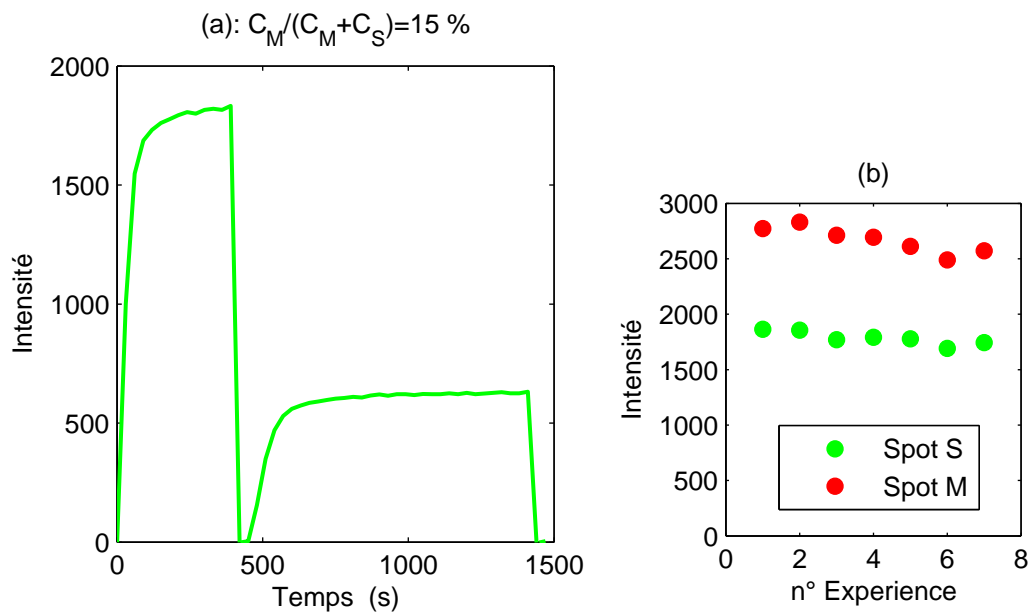


FIG. 6.2 – (a) Procédure de calibration et de mesure pour le dosage d’allèle. Dans un premier temps, la solution d’étalonnage s’hybride sur le spot. La formamide déshybridise les cibles avant le passage de l’échantillon test (ici $R = 15\%$). (b), I^0 pour les deux spots S et M pour les différentes expériences. On remarque la diminution progressive de l’intensité due à l’usure du greffage.

La détermination du niveau à l’équilibre, aussi bien pour l’étape de calibration que celle de test, est extrapolée en approchant les courbes d’hybridation par la fonction $It/(\tau+t)$ qui correspondant à une cinétique de Langmuir de second ordre. En accord avec les observations du paragraphe 5.3.2, les courbes sont très bien approchées par cette fonction ($R=0,99$). En ce qui concerne l’étalonnage, on observe une décroissance des intensités maximum I_m^0 et I_s^0 sur la figure 6.2 due à l’usure des spots. La détermination des intensités conduit à des erreurs de l’ordre de $\pm 5\%$ sur le rapport I/I_0 .

La figure 6.3 montre les données normalisées pour les deux séries de mesures : le rapport d’allèle R varie de 0 à 100 %, de riche en allèles sauvages à riche en allèles mutés. Selon cette séquence, le signal du spot sauvage diminue et celui du spot muté augmente

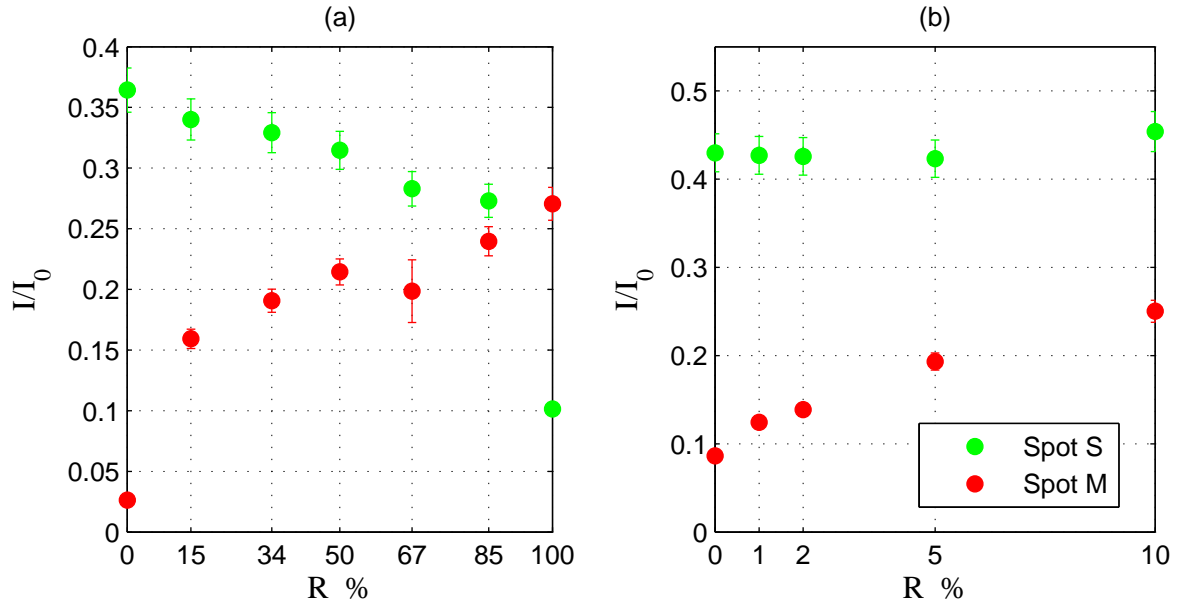


FIG. 6.3 – Intensités normalisées des spots S et M pour différentes valeurs du rapport d’allèles R . (a) Série A, la concentration totale de cible est de 20 nM. (b) Série B, la concentration totale de cible est de 100 nM.

graduellement.

A partir des données pour $R = 0$ et 100% , on peut estimer les valeurs des constantes d’affinité dans le cadre de l’isotherme de Langmuir. En effet dans ces deux cas, il n’y qu’une seule espèce en solution et connaissant I/I_0 , les équations 6.1 et 6.2 permettent de remonter aux coefficients K_{ij} . On obtient $K_{s's} = 2,9 \cdot 10^7 M^{-1}$, $K_{m'm} = 1,9 \cdot 10^7 M^{-1}$, $K_{s'm} = 5,6 \cdot 10^6 M^{-1}$ et $K_{m's} = 1,4 \cdot 10^6 M^{-1}$. La valeur de $\alpha = K_{s's}/K_{m'm}$ est donc estimée à 1,5.

La figure 6.4 montre le traitement des résultats avec l’équation 6.3 pour $\alpha = 1,3$ qui suppose l’isotherme de Langmuir valide. Ce traitement ne donne pas satisfaction et le choix de α n’a pas beaucoup d’incidence sur l’allure de cette courbe.

Le traitement en prenant en compte l’isotherme de Frumkin (équation 6.5) est montré à la figure 6.5. Un choix judicieux du terme Γ et de $\frac{K_{s's}}{K_{m'm}}$ permet de traiter l’ensemble des résultats précédents avec maintenant un bon accord et une précision acceptable (figure 6.5). On a pris ici $\Gamma = 14$ et $\frac{K_{s's}}{K_{m'm}} = 5$. L’ajout du paramètre Γ permet de traiter sur une même base les données obtenues dans la série A et B, qui se différencient notamment par la concentration totale de cible (20 nM et 100 nM).

L’erreur maximum déduite de nos mesures est égale à $\pm 10\%$: ceci est suffisant pour discriminer entre une proportion de $1/3$ et de $2/3$, nécessaire pour l’application à la trisomie 21.

6.2.3 Conclusion

Nous avons mis en oeuvre pour la première fois une méthode décrite théorique de dosage d’allèle à partir de mesures sur puce à ADN. Cette méthode nécessite la calibra-

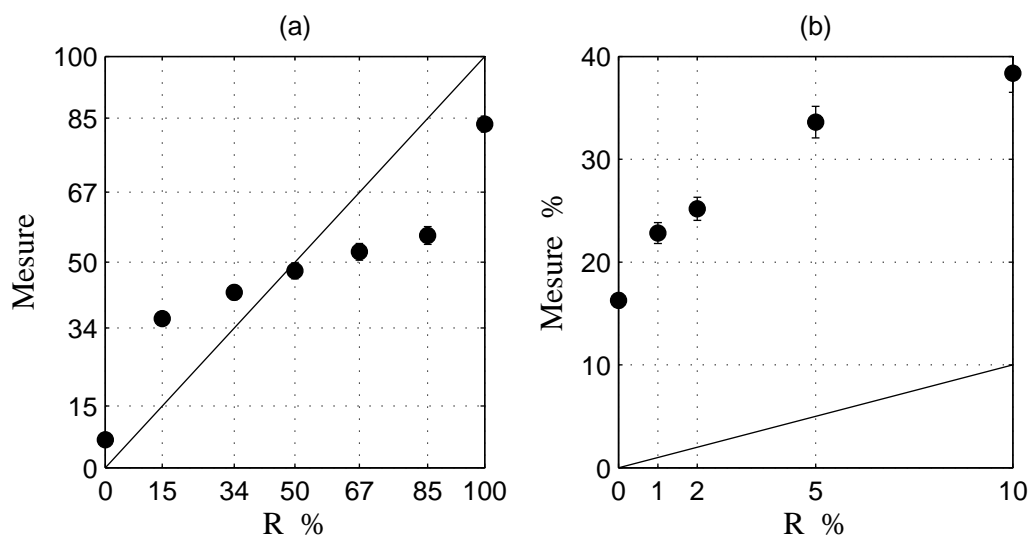


FIG. 6.4 – Traitements des données en supposant l'isotherme de Langmuir. $\alpha = K_{s's}/K_{m'm}$ a été pris égale à 1,5. (a) Résultats pour la série A (concentration totale de cible 20 nM). (b) Résultats pour la série B (concentration totale de cible 100 nM).

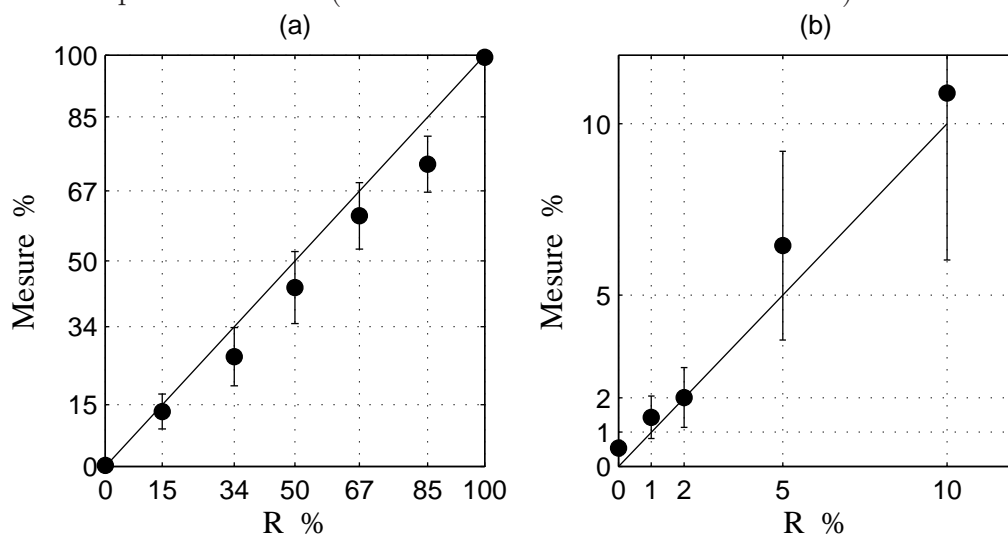


FIG. 6.5 – Traitement des données expérimentales avec l'isotherme de Frumkin. (a) Série A et (b) série B. On remarque un bon accord quantitatif.

tion de la densité maximale de sondes que nous avons effectué grâce à la plate-forme microfluidique.

Nous avons fait varier de 0 à 100 % le rapport d'allèle et grâce à la description de Frumkin de l'équilibre thermodynamique (chapitre 5), le traitement des données expérimentales a permis la détermination du rapport d'allèle avec une erreur maximum de ± 10 %, ce qui est satisfaisant pour l'application à la trisomie 21.

6.3 Deuxième méthode basée sur la cinétique d'hybridation

La présence d'allèles sauvages et mutés dans le même échantillon rend la cinétique d'hybridation complexe : les deux ADN cibles sont susceptibles de s'hybrider même si le brin contenant un mésappariement a une affinité moins forte. La compétition entre les deux brins est en réalité le phénomène dominant de la cinétique d'hybridation [133, 134]. La méthode présentée au paragraphe 6.3.2 est basée sur une représentation mettant en évidence cette compétition.

6.3.1 Modélisation de la compétition entre cibles

Dans un premier temps, nous allons modéliser la cinétique d'hybridation des cibles sauvages et mutées sur le spot sauvage. Même si nous avons vu que la cinétique de Langmuir décrivait partiellement les mesures (5.3.2), elle permet ici de décrire l'essentiel de la physique du système [134]. Prenons le cas du spot sauvage : la proportion de sondes hybridées par une cible sauvage (B_s) et par une cible mutée (B_m) vérifie :

$$\frac{\partial B_s}{\partial t} = k_a^s C_s (1 - B_s - B_m) - k_d^s B_s \quad (6.6)$$

$$\frac{\partial B_m}{\partial t} = k_a^m C_m (1 - B_s - B_m) - k_d^m B_m \quad (6.7)$$

Avec $B = B_m + B_s$, la proportion totale de sondes hybridées. Cette valeur est proportionnelle au niveau de fluorescence mesuré dans nos expériences.

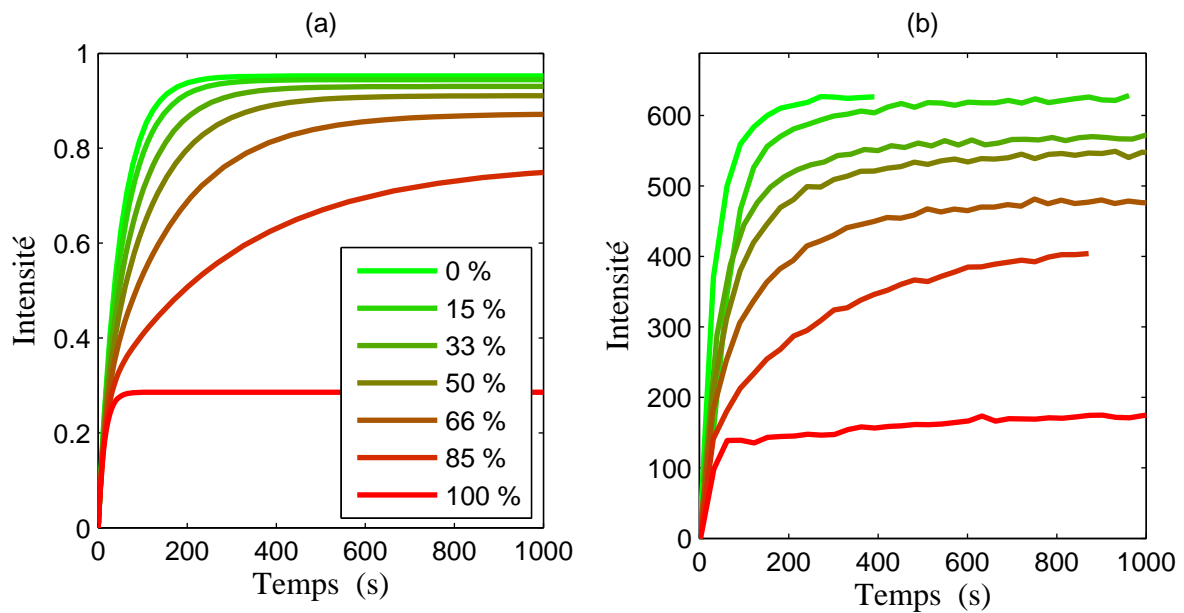


FIG. 6.6 – (a) Modélisation des courbes d'hybridation pour le spot S en présence de cible S et M. (a) Courbes pour différents rapports d'allèles. Les valeurs de coefficients cinétiques sont $k_a^s = k_a^m = 10^6 M^{-1}s^{-1}$, $k_d^s = 10^{-3} s^{-1}$, $k_d^m = 5 \cdot 10^{-2} s^{-1}$ et $C_{total} = 20nM$. (b) Mesures expérimentales issus des mesures du paragraphe 6.2.2.

Les valeurs des coefficients cinétiques jouent un rôle important : le coefficient d'association pour une hybridation parfaite et contenant un mésappariement est quasiment le même [134] alors que les coefficients de dissociation sont différents [135]. Ainsi $k_a^s \approx k_a^m$ et $k_d^s \ll k_d^m$.

A temps court, les deux cibles s'hybrident à une vitesse qui ne dépend que de leur concentrations respectives ($k_a^s C_s$ et $k_a^m C_m$) et une hybridation importante des cibles mutées est alors possible. A temps plus long, un deuxième processus se produit : pour pouvoir atteindre l'équilibre thermodynamique, les brins d'ADN mutés qui se sont hybridés en surnombre doivent se dissocier. Ce processus est d'autant plus lent que la constante de dissociation du mésappariement est faible et que sa concentration est grande.

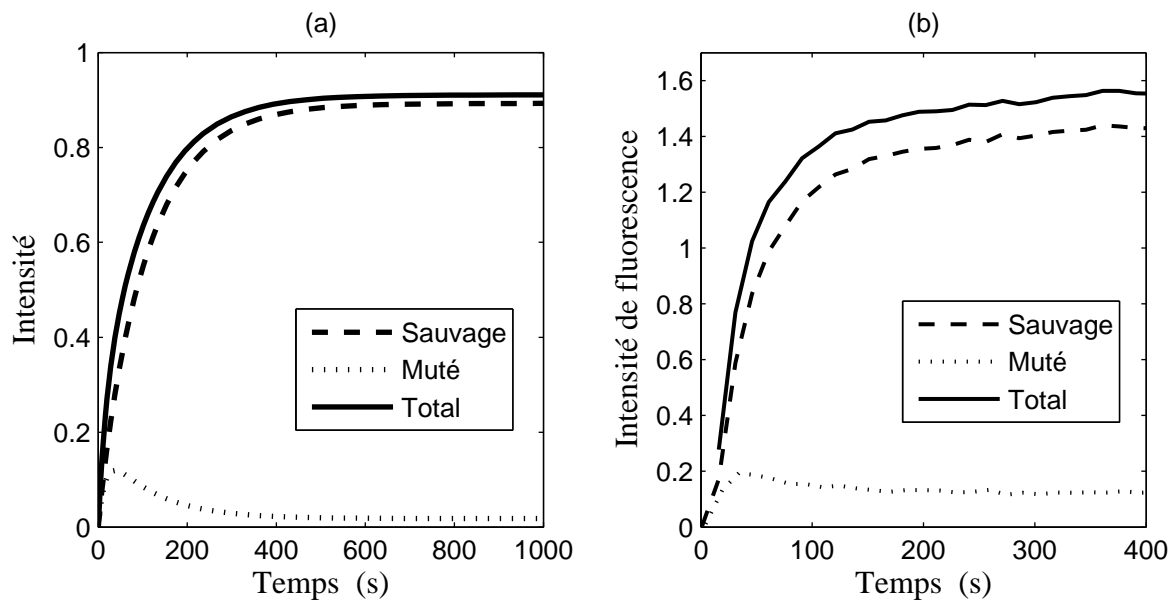


FIG. 6.7 – Mise en évidence de la compétition entre les cibles S et M pour $C_m/(C_m + C_s) = 50\%$. (a) modélisation avec les mêmes coefficients que pour la figure 6.6. (b) Mesures expérimentales.

L'effet de la compétition pour la quantité B est illustré à la figure 6.6 a. Après une cinétique à temps court quasiment identique (la concentration total est constante) pour tout les rapports d'allèles, l'augmentation de cibles mutées ralentit la cinétique dans un deuxième temps. En présence d'allèles mutés uniquement, il n'y a plus de compétition et on retrouve une cinétique simple. La figure 6.7 montre la compétition entre les cibles sauvages et mutées pour le cas $R= 50 \%$. Les mesures expérimentales (figure 6.6 b et 6.7 b) seront décrite dans la suite mais on note déjà un bon accord avec la théorie.

6.3.2 Méthode de dosage basée sur la compétition

En traçant la courbe paramétrée de coordonnées $X(t)=$ intensité du spot muté au temps t et $Y(t)=$ intensité du spot sauvage au temps t , les différences de cinétique dues à la compétition sont mis en évidence (figure 6.8). La pente de la courbe correspond à la vitesse d'hybridation sur le spot sauvage divisée par celle sur le spot muté.

La forme des courbes est caractéristique du processus de compétition. Par exemple pour $R=15\%$, il y a un excès de cibles sauvages. L'intensité du spot sauvage augmente alors rapidement et atteint un niveau élevé. Pour le signal du spot muté, après une cinétique rapide, celle-ci est ralentie par la déshybridation des brins sauvage. La pente de la courbe paramétrée est donc quasiment verticale. Puis comme l'intensité du spot sauvage arrive rapidement à l'équilibre, sa vitesse diminue alors que l'intensité du spot muté continue à augmenter : la pente est maintenant horizontale. Cette enchaînement est caractéristique de la compétition sauvage / muté et les détails de l'allure dépendent du rapport d'allèle R . Cette méthode qui ne nécessite pas de calibration permet une détermination comparative basée sur la réaction de compétition.

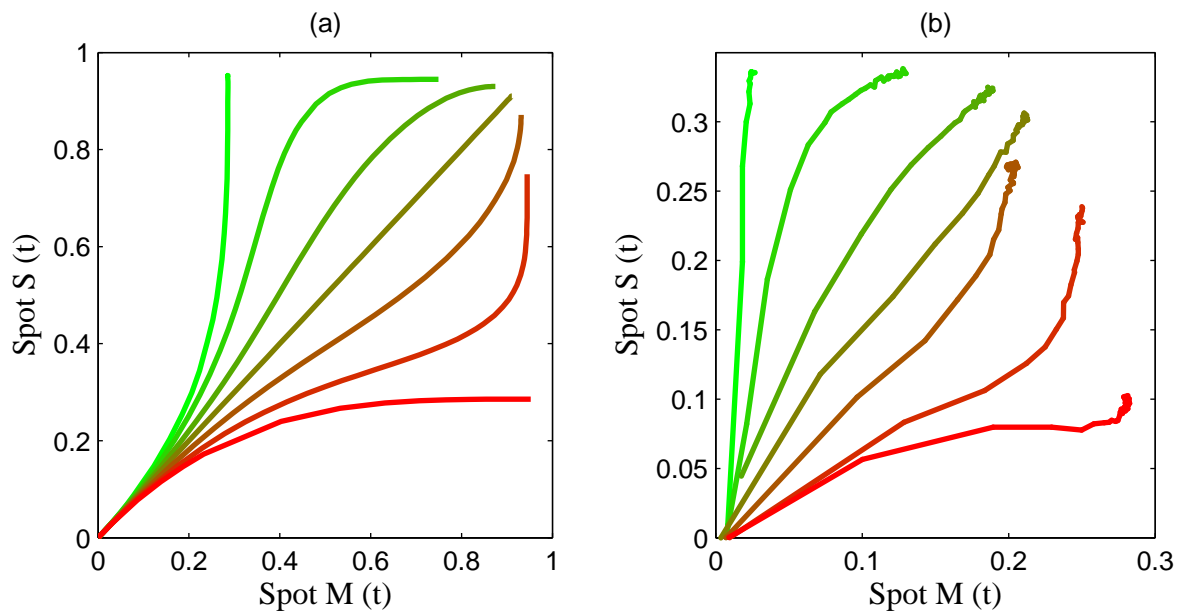


FIG. 6.8 – Discrimination par la cinétique d'un mélange contenant des allèles sauvages et mutés. En traçant la cinétique des spots S et M paramétrée en fonction du temps, on obtient des allures suivantes : (a) Simulation avec le modèle cinétique de Langmuir. Du vert au rouge, nous avons $C_m/(C_m + C_s) = 0, 15, 33, 50, 66, 85$ et 100% . (b) Mesures expérimentales.

6.3.3 Mise en oeuvre expérimentale

Mise en évidence expérimentale de la compétition

Les données expérimentales sont celles de la partie précédente (6.2.2), où nous considérons seulement les cinétiques d'hybridation.

Les cinétiques pour les différents rapports d'allèles ($R=0, 15, 33, 50, 66, 85$ et 100%) sont tracées sur la figure 6.6 b. On constate un très bon accord qualitatif avec la modélisation de Langmuir (figure 6.6 a).

Pour mettre en évidence l'effet de compétition, nous avons réalisé une expérience permettant de mesurer séparément B_s et B_m : des cibles mutées marquées Cy5 ont été mélangées avec des cibles sauvages marquées Cy3 pour une concentration respective de

10 nM. Dans les mêmes conditions que précédemment (6.2.2), l'hybridation est réalisée deux fois de suite avec la première fois un filtre de fluorescence spécifique du fluorophore Cy3 et la seconde, spécifique de Cy5. Après synchronisation des courbes et normalisation des intensités pour compenser les rendements différents de Cy3 et Cy5, nous obtenons les mesures de la figure 6.7 b. L'accord qualitatif avec la modélisation précédente (figure 6.7 a) est très bon. On remarque notamment que le surnombre de cibles mutées, hybridées à temps court, diminue ensuite.

Confrontation de la méthode avec l'expérience

Grâce aux données expérimentales de la partie précédente (6.2.2), l'intensité du spot sauvage en fonction de celle du spot muté est tracée à la figure 6.8 b. L'incidence de la compétition sur l'allure des courbes est tout à fait en accord avec les prédictions théoriques. On remarque une dissymétrie dans les courbes expérimentales que nous ne retrouvons pas dans la simulation. Ceci est certainement dû au fait que, contrairement au cas théorique, la cinétique sur les spots S et M n'est pas identique.

Les 7 courbes correspondant à des rapports d'allèles différents sont discernables : deux rapports d'allèles différents de 15 % sont différenciables par cette méthode.

6.4 Expériences sur échantillons biologiques (résultat en annexe I)

Cette partie présente le protocole d'expériences en cours de mise en place dans le cadre de la collaboration avec Jérôme Buard et Emmanuelle Haquet de l'IGH de Montpellier et Marie-Claude Potier.

Dans son travail de thèse [136], Emmanuelle Haquet a entre autre identifié des SNP particulièrement intéressants pour l'étude de la non-disjonction des chromosomes 21. A partir des ces données, nous avons conçu un protocole pour doser les formes sauvages et mutées de 10 de SNP en une seule expérience, par les deux méthodes décrites précédemment. Le protocole est le suivant :

1. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de séquences spécifiques contenant les SNP recherchés ;
2. Amplification par PCR asymétrique. Cette étape a un double objectif : obtenir des ADN simples brins pour faciliter l'hybridation sur puce et les marquer par un fluorophore Cy3 ;
3. Quantification sur puce : après calibration des puces, le signal à l'équilibre et la cinétique d'hybridation sont mesurés puis traités par les méthodes précédentes.

Pour chaque SNP, 2 spots différents sont nécessaires : le nombre total de spots est donc de 20. Les ADN sondes sont constitués :

- d'une séquence de 20 bases spécifique de chaque allèle,

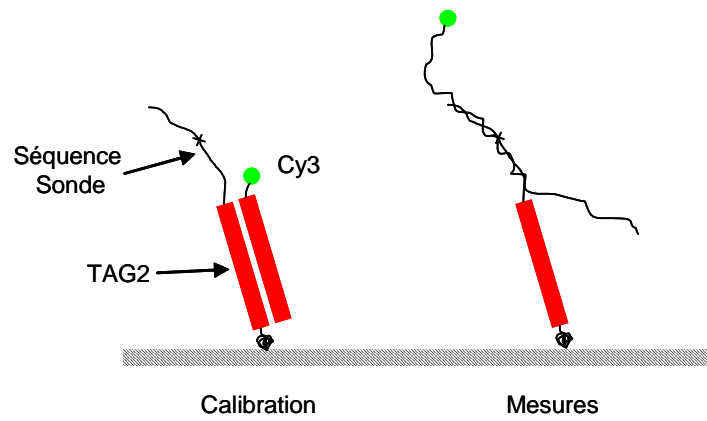


FIG. 6.9 – Calibration de toutes les sondes grâce à la séquence universelle TAG2 suivie de l’hybridation de l’échantillon biologique.

SNP	5' → 3'
rs1892568 C/T	TGTGGGATTGCAGCTCCCCT TGTGGGATTGTAGCTCCCCT
rs1984354 A/G	TGCCAGCGCAGGGAAGGAA TGCCAGCGCGGGAAGGAA
rs2186343 G/T	GCATGAGGAAGTATTGGTAA GCATGAGGAATTATTGGTAA
rs2251085 C/G	ATATGCCACACAAAACATAG ATATGCCACAGAAAACATAG
rs2835691 A/G	CTCAAACACAGCGTAAGGA CTCAAACACGCGTAAGGA
rs2835774 A/T	GTTACGATATAGCTTAAAGA GTTACGATATTGCTTAAAGA
rs2836028 C/T	GAAGGTTACACGGTAAATAT GAAGGTTACATGGTAAATAT
rs722557 A/G	TCCCACGATAAAGACCTCCA TCCCACGATAGAGACCTCCA
rs765321 A/C	CAAAGGTATCAAGGAACCGG CAAAGGTATCCAGGAACCGG
rs960819 A/C	ACAGTAATTCCTATGTACA ACAGTAATTCCTATGTACA
TAG2	TATTATGTTCTCAGCGCGGCTATTATGTTCTCAGCGCGGC

TAB. 6.2 – Séquences des ADN sondes pour les 10 SNP considérés ici.

- d’une séquence TAG2 de 40 bases universelles et identiques pour toutes les sondes. Elle est utilisée pour la calibration de la densité des spots.

Ainsi après la calibration avec un ADN cible de 40 bases complémentaires de la séquence TAG2, l’échantillon biologique est envoyé dans la chambre d’hybridation (figure 6.9).

Le tableau 6.2 donne les séquences des ADN sondes. A l’heure de l’écriture de la thèse, ces expériences étaient en cours de préparation et des résultats présentés dans l’annexe I ont été réalisé grâce au coucours de Marie-Claude Potier et de Paul Kauffmann.

6.5 Conclusion

Grâce à l'utilisation de la plate-forme microfluidique, deux nouvelles méthodes de dosage d'allèle ont été évaluées sur un système modèle. La première méthode est basée sur l'analyse du signal d'hybridation à l'équilibre thermodynamique décrite théoriquement par Halperin *et al* [11]. Cette méthode qui nécessite la calibration des puces à ADN a été mise en oeuvre pour la première fois ici grâce au contrôle microfluidique du dispositif. La méthode a été modifiée : conformément aux mesures du chapitre 5, l'isotherme de Frumkin décrit mieux la réaction d'hybridation sur puce que l'isotherme de Langmuir et fournit un traitement des données précis.

La deuxième méthode est basée sur une représentation originale de la cinétique d'hybridation et en particulier sur la compétition des ADN cibles. Après avoir mis en évidence expérimentalement, à notre connaissance pour la première fois, cette compétition, nous l'avons mis en oeuvre pour le dosage d'allèle. A partir de l'allure des courbes de cinétique dans une certaine représentation, une différence de rapport d'allèles d'au moins 15 % est possible. Ce résultat obtenu sur un système modèle est très encourageant et son application à des échantillons biologiques plus complexes semble tout à fait possible au vue des travaux de la référence [129].

Ces deux méthodes ont permis de déterminer le rapport d'allèle à environ $\pm 10\%$ près, en quelques dizaines de minutes sur un système modèle. Le champ d'observation de notre plate-forme (environ 100 spots visibles) permet de doser 50 allèles en même temps et un système "puce à ADN + plate forme" peut facilement analyser plus de 20 échantillons différents. Ces résultats sont très encourageants aussi bien au niveau de la précision que des débits de test. En collaboration avec l'IGH et Marie-Claude Potier, des expériences sur échantillons biologiques, qui sont succinctement décrites dans le dernier paragraphe, sont en cours de préparation.

Epilogue

Initié dans un contexte industriel grâce à Bertin Technologies, le travail de thèse présenté ici avait pour objectif d'intégrer tout ou partie d'un protocole d'analyse biologique. Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur les fonctions élémentaires nécessaires à la réalisation d'un système complexe : d'une part, la mise en oeuvre sans bulles du PDMS, fonctionnant jusqu'à une température élevée ainsi que le remplissage passif a fait l'objet d'un brevet. D'autre part, la modélisation d'un élément clé, les micro-pompes, a été publié dans *Journal of Applied Physics*.

La dispersion hydrodynamique responsable de la dilution des échantillons lors du transport dans les microcanaux a été étudiée en détail : dans un régime de dispersion particulier que nous avons identifié, le profil de dispersion s'est avéré indépendant de la diffusion, ce que nous avons concrétisé par la mise au point d'un générateur original de gradient de concentration. Ce travail a été soumis au journal "Lab on a chip" (annexe B).

Cet effort sur les éléments de bases de l'intégration a permis la fabrication d'une plate-forme microfluidique originale intégrant des puces à ADN, en deux versions : une version de laboratoire et une version portable. Ce dispositif permet un contrôle précis de la température, des écoulements tout en ne consommant que de faibles volumes d'échantillon grâce à une chambre d'hybridation de 420 nL. Compatibles avec les supports classiques des puces à ADN, une caméra sensible permet la mesure en temps réel et simultanée d'une centaine de spots – jusqu'à 500 moyennant une perte de sensibilité.

Cette plate-forme qui constitue une avancée technologique par rapport à l'état de l'art, nous a permis de compléter et d'étendre les connaissances sur les réactions d'hybridation. Des courbes de fusion effectuées sur puce et en volume ont montré des différences notables bien expliquées par une répulsion électrostatique de surface. De plus en modifiant sur deux ordres de grandeurs la vitesse de l'écoulement, nous avons étendu expérimentalement le modèle ERC, décrivant le couplage réaction-diffusion-advection, aux puces à ADN. A ce titre, le nombre de Damkohler qui compare le temps de diffusion sur le temps de réaction est introduit et constitue un indicateur utilisable en pratique pour estimer l'importance du transport.

Finalement, grâce à l'utilisation de la plate-forme, deux nouvelles méthodes d'utilisation des puces pour le dosage d'allèles ont été expérimentalement testées : respectivement basées sur l'équilibre thermodynamique [11] et sur la cinétique d'hybridation, nous les avons évaluées sur des échantillons modèles. A la suite des résultats très encourageants,

des expériences pour doser simultanément 10 SNP sur des échantillons biologiques sont en cours de préparation. Ces expériences sont réalisées en collaboration avec Jérôme Buard et Emmanuelle Haquet de l'IGH de Montpellier et Marie-Claude Potier pour l'étude de la trisomie 21.

L'outil microfluidique, concrétisé ici par la réalisation de la plate-forme, est un environnement très bien adapté à l'étude des puces à ADN, aussi bien au niveau théorique que pratique. Nos différentes mesures expérimentales, aussi bien à l'équilibre que hors équilibre, ont mis en avant une description des phénomènes d'adsorption particulière, l'isotherme de Frumkin, qui a permis d'expliquer qualitativement les mesures de fusion sur puce et d'améliorer les résultats de la méthode de dosage d'allèles d'Halperin *et al* dans nos conditions expérimentales. De plus la mesure en temps réelle de la cinétique d'hybridation a permis pour la première fois, à notre connaissance, de mettre en évidence directement le phénomène de compétition sur puce. Cette observation a donné lieu à la seconde méthode de dosage d'allèle, basée sur la cinétique.