



HAL
open science

Optimisation de l'hybridation des puces à ADN grâce au mélange par advection chaotique.

Aurélien Beuf

► **To cite this version:**

Aurélien Beuf. Optimisation de l'hybridation des puces à ADN grâce au mélange par advection chaotique.. Dynamique des Fluides [physics.flu-dyn]. Ecole Centrale de Lyon, 2008. Français. NNT : . tel-00524716

HAL Id: tel-00524716

<https://theses.hal.science/tel-00524716>

Submitted on 8 Oct 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

présentée devant

L'ÉCOLE CENTRALE DE LYON

école doctorale MEGA

pour obtenir

le titre de **DOCTEUR**

Spécialité : Mécanique des Fluides

par

Aurélien Beuf

**Optimisation de l'hybridation des puces à ADN grâce
au mélange par advection chaotique.**

sous la direction de Florence Raynal et Philippe Carrière

Soutenue le 14 novembre 2008 devant la Commission d'Examen

M ^{mes}	C.	Castelain	Thermocinétique Nantes	
	E.	Gouillart	Saint-Gobain Recherche	
	É.	Souteyrand	INL	
	F.	Raynal	LMFA	
MM.	P.	Charette	Université de Sherbrooke	- <i>Rapporteur</i>
	J.-N.	Gence	Université Lyon 1	
	Y.	Le Guer	Université de Pau	- <i>Rapporteur</i>
	Ph.	Carrière	LMFA	

À mon grand-père.

Remerciements

A l'heure où j'écris ces lignes, une grande page vient de se tourner : je viens de terminer ma thèse au Laboratoire de Mécanique des Fluides de l'Ecole Centrale de Lyon. Il est maintenant temps de remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de ce travail, et il y en a beaucoup. . .

Pour commencer, je remercie le directeur du LMFA, qui m'a accueilli dans le laboratoire qu'il dirige.

Je remercie également toute l'équipe technique qui m'a aidé pour la partie expérimentale réalisée au LMFA : Patrick Dutheil pour la réalisation technique de la chambre d'écoulement, Christian Nicot, Jean-Michel Perrin, Emmanuel Jondeau et Patrick Méjan pour le prêt de tout le matériel nécessaire aux expériences et aux mesures, enfin Alexandre Azouzi pour le dessin technique (dans l'urgence!) de la chambre qui a été construite ensuite au Canada.

Je remercie Frédéric Plaza, qui nous a quitté prématurément, et qui est à l'origine de la mise en place de l'étude et de la réalisation expérimentale de la puce à ADN.

Je remercie l'ensemble des membres de mon Jury d'avoir accepté cette tâche difficile : Cathy Castelain, Emmanuelle Guillard, et Eliane Souteyrand. Un grand merci par ailleurs à Paul Charette et Yves Le Guer pour la relecture attentive de mon manuscrit et pour leur travail de rapporteur. Il ne faut pas oublier non plus Jean-Noël Gence, également membre de mon jury, pour ses bons conseils prodigués tout au long de ces trois ans, et pour son intérêt tout particulier à mon travail.

Comme la thèse a été essentiellement numérique, je remercie les membres la commission informatique du labo, Pascale Jeandel, Bernard Barbier et Fabien S. Godefert. Ce dernier, en plus d'être un informaticien redoutable et toujours disponible dès qu'il y a le moindre problème, est également un excellent pâtissier dont j'ai eu plaisir à vérifier les talents lors de nos célèbres cérémonies du "couloir des gâteaux" !

Au Canada, je remercie toute l'équipe de l'Université de Sherbrooke, Vincent Aimez et Paul Charette qui m'ont reçu dans leur laboratoire. Je remercie également Paul Grandbois, qui a accepté d'accueillir notre expérience de SPR dans ses locaux.

Un grand merci à Vincent Chabot, qui m'a constamment aidé dans la réalisation de l'expérience et sans qui aucun travail n'aurait pu être fait. Hors contexte de la thèse, je te remercie également Vincent pour ta générosité et ta très grande sympathie. Amical clin d'oeil également à Allan pour toutes les intéressantes discussions scientifiques que nous avons eues ensemble ainsi que pour tous tes bons plans qui m'ont permis de découvrir cette merveilleuse ville de Sherbrooke et ses environs.

Je n'oublie pas tous mes camarades du LMFA. Parmi toute la bande de "joyeux thésards", citons d'abord mes "colocataires" : Wouter, Yohan, Cécile (merci pour tous tes bons petits plats durant ces 3 ans, ce fut un régal!) ainsi que plus récemment Véronique et Benjamin. Je n'oublie

pas non plus Elena, le rayon de soleil du labo, Juliane, Delphine, Antoine, Jean-Christophe, Remy, Cyril...

Je n'oublierai pas non plus les discussions aéronautiques enrichissantes que j'ai eues avec François B. Merci François pour toutes tes anecdotes et ta passion contagieuse.

Je tiens également à remercier tous mes proches, et en particulier mes parents, qui m'ont soutenu tout au long de ces trois ans : ces années de thèse n'ont en effet, pas été de tout repos, la fin surtout à été très éprouvante et leur aide dans les moments difficiles a été d'un grand réconfort. Mon Grand-père, qui nous a quitté récemment, aurait été fier et heureux d'apprendre que je suis maintenant Docteur en Sciences.

Pour terminer, je tiens à rendre un hommage tout particulier aux deux personnes les plus importantes dans cette thèse : mes Directeurs Philippe et Florence. Merci Philippe pour ton regard éclairé sur mon travail et tes conseils qui ont été très constructifs tout au long de ce parcours. Quant à toi Florence, les mots me manquent pour décrire toute ton implication dans cette thèse... Ta grande disponibilité, tes idées, tes compétences, ta constante bonne humeur et ton dynamisme furent l'essence de ce travail pendant ces trois ans. Ton humour, ta gentillesse, ta motivation ont largement participé à mon investissement dans ce doctorat.

Merci à tous.

Table des matières

1	Introduction et état de l'art	17
1.1	Introduction générale et contexte de la thèse	17
1.2	Les puces à ADN	18
1.2.1	L'A.D.N.	18
1.2.2	Principe des puces à ADN	21
	Fabrication	22
	Marquage des cibles et lecture des puces	23
	Lab-on-a-chip	28
1.2.3	Les grandes applications	29
1.2.4	Séquençage de l'ADN	30
	Méthode de Sanger	31
	Méthode de Maxam et Gilbert	32
	Comparaison avec les puces à ADN	35
1.3	Le mélange en microfluidique	35
1.3.1	Mélange et Microfluidique	35
	Le mélange	35
	La microfluidique	38
1.3.2	Les outils du chaos	41
	Application et sections de Poincaré	41
	Exposant de Lyapunov	42
	Taux de couverture	43
	Entropie de Kolmogorov-Sinai	44
1.3.3	Les exemples de mélangeurs à advection chaotique dans la littérature	44
	Expérience historique de H. Aref	44
	Système puits/source de S.W. Jones & H. Aref	44
	Frontières mobiles	46
	Mélange en cavité ouverte	46
	Mélange 3D	47
1.4	Objectif de la thèse	49
2	Étude du mélange par advection chaotique dans une chambre d'hybridation de puce à ADN	53
2.1	D'un problème physique vers une solution apportée par la mécanique des fluides	53
2.1.1	Historique d'une collaboration	53
2.1.2	Paramètres et grandeurs de la puce réelle	54

2.1.3	Étude 2D ou 3D du mélange ?	55
2.1.4	Vérification expérimentale	56
2.2	Article : Chaotic mixing efficiency in different geometries of Hele-Shaw cells used as DNA hybridization chambers.	58
2.3	Présentation du Rosamix	88
3	Modèle de réaction chimique couplé au mélange dans une chambre d'advection chaotique	91
3.1	Les interactions moléculaires.	94
3.1.1	Brève revue des liaisons intermoléculaires	95
	Les interactions électrostatiques simples (forces coulombiennes)	95
	Les interactions électrostatiques induites	96
	Forces de dispersion de London	96
	Les forces répulsives	97
	Les liaisons intermoléculaires de Van der Waals	97
	La liaison hydrogène	97
	Intensités et portées comparées des interactions	98
3.1.2	Cas de l'ADN	98
3.2	Modélisation de la cinétique dans la chambre d'advection	98
3.2.1	Modélisation numérique d'une interaction moléculaire	98
3.2.2	Domaine d'interaction	102
3.2.3	"Faux 3D"	103
3.2.4	Paramètres de l'étude	104
3.2.5	Conditions initiales	107
3.2.6	Grandeurs issues des simulations	107
3.3	Résultats numériques	108
3.3.1	Comparaison hybridation statique/advection chaotique	108
	Rapidité de l'hybridation	108
	Homogénéité de l'hybridation	109
	Étude de la fiabilité grâce au Rosamix	111
	Discussion	112
3.3.2	Influence de d_h et D	112
	Évolution des grandeurs en fonction de d_h et D	112
	Analyse des données	112
3.3.3	Cinétique de réaction	118
	Advection chaotique	118
3.3.4	Diffusion et vitesse de réaction intrinsèque	123
4	Vers une mesure expérimentale de la constante de vitesse intrinsèque	129
4.1	LA SPR ou Résonance par Plasmon de Surface	129
4.1.1	Nouveaux besoins en méthodes d'analyse : naissance de la SPR	130
4.1.2	Principe physique de la SPR	130
	Réflexion totale d'une onde lumineuse	130
	Plasmon de surface	130
	Excitation des plasmons de surface	131
	Influence de l'indice du diélectrique sur la résonance du plasmon de surface	132

Évolution de la courbe de réflectance en fonction de l'état de surface	134
Protocole d'expérience	136
Exploitation des mesures	137
4.1.3 Sensibilité de la SPR	139
4.2 Suivi par SPR de la cinétique d'hybridation dans une cellule à advection chaotique.	141
4.2.1 Dispositif expérimental SPR mis en place à l'Université de Sherbrooke	142
4.2.2 Cellule d'advection chaotique et protocole de mélange	143
4.2.3 Réaction chimique suivie par le dispositif SPR.	145
4.2.4 Protocole expérimental suivi	147
4.2.5 Premiers résultats expérimentaux	151
Vérification de l'homogénéité du mélange	151
Résultats de cinétique	151
5 Résumé et perspectives	159
A Résultats de cinétique	163
A.1 Résultats d'hybridation dynamique (mélange par advection chaotique)	163
A.2 Résultats d'hybridation statique (mélange par diffusion)	165
B Écoulement de Hele-Shaw	167
B.1 Cavité de Hele-Shaw	167
B.2 Équations	168
C Calcul analytique du champ des vitesses dans une cavité circulaire.	171
C.1 Hypothèses :	171
C.2 Le potentiel complexe	171
C.2.1 Irrotationnalité de l'écoulement et potentiel des vitesses	171
C.2.2 Fonction de courant	172
C.2.3 Lien entre ces deux fonctions	172
C.2.4 Potentiel complexe	173
C.2.5 Conclusion	173
C.3 Vitesse complexe	173
C.4 Exemple	173
C.5 Le problème	174
C.5.1 Rappel : inversion	174
C.5.2 Théorème de Milne-Thomson	174
C.5.3 Solution au problème	175
D Calcul analytique du champ des vitesses dans une cavité rectangulaire	179
D.1 Généralités sur les écoulements potentiels	179
D.1.1 Hypothèses de l'écoulement et potentiel complexe	179
D.1.2 Lien avec les vitesses	180
D.2 Transformation conforme	180
D.2.1 Transformations conformes : généralités	180
Définition	180
Propriétés des transformations conformes :	181
Intérêt des transformations conformes	182

	Retour sur le champ des vitesses	183
	Exemple élémentaire d'application	183
D.2.2	Transformation de Schwarz-Christoffel	184
	Exemple	185
	Remarque :	187
E	Symétries des sections de Poincaré dans une puce carrée	191
E.1	Préliminaires	191
E.2	Protocole de mélange A	192
	E.2.1 Rappel	192
	E.2.2 Symétrie du champ des vitesses	192
	E.2.3 Démonstration	193
E.3	Protocole de mélange B	193
F	Exposant de Lyapunov	195
F.1	Rappels	195
F.2	Calcul pratique de l'exposant de Lyapunov	195
G	Modèle numérique de réinjection 3D	197
G.1	Position du problème	197
	G.1.1 Réinjection parabolique : problème déterministe	197
	G.1.2 Réinjection parabolique : problème probabiliste	197
	G.1.3 Bruit blanc	198
	G.1.4 Passage d'un bruit blanc à une variable aléatoire parabolique	199
	G.1.5 Test	200
H	Modèle numérique de diffusion moléculaire	203
H.1	Equation de diffusion et solution	203
	H.1.1 Forme d'une équation de diffusion	203
	H.1.2 Solution de l'équation de diffusion 1D	204
H.2	Advection-diffusion du point de vue lagrangien	204
	H.2.1 Modélisation de la diffusion moléculaire	204
	H.2.2 Création d'une variable aléatoire Gaussienne	205
	Théorème de limite centrale	205
I	Catalogue des sections de Poincaré	207
I.1	Sections de Poincaré dans le cercle	207
	I.1.1 Protocole A	207
	I.1.2 Protocole B	208
I.2	Sections de Poincaré dans le carré	212
	I.2.1 Protocole A	212
	I.2.2 Protocole B	213
I.3	Sections de Poincaré dans le rectangle 2 :1	217
	I.3.1 Protocole A	217
	I.3.2 Protocole B	218
I.4	Sections de Poincaré dans le rectangle 3 :1	223
	I.4.1 Protocole A	223

I.4.2	Protocole B	224
I.5	Sections de Poincaré dans le rectangle 4 :1	229
I.5.1	Protocole A	229
I.5.2	Protocole B	229
I.6	Sections de Poincaré dans le rectangle 3 :2	230
I.6.1	Protocole A	230
I.6.2	Protocole B	230
J	Propriétés liées aux évolutions exponentielles	231
J.1	Temps moyen d'hybridation	231
J.2	Ecart type	232
J.3	Temps de demi-réaction	233

Table des figures

1.1	Du chromosome à la double hélice d'ADN.	18
1.2	Séquence de 3 nucléotides AGC.	19
1.3	Les 4 bases, briques élémentaires de la molécule d'ADN	20
1.4	Double brin d'ADN (seuls 3 nucléotides sont représentés ici) : les nucléotides sont associés de manière complémentaire car A ne s'associe qu'avec T (par 2 liaisons hydrogène), et C qu'avec G (par 3 liaisons hydrogène).	21
1.5	Principe de la puce à ADN. Les <i>cibles</i> marquées de séquence <i>inconnue</i> vont s'associer par complémentarité aux brins de la puce (appelées <i>sondes</i>) de séquence <i>connue</i> et <i>choisie</i> : cette association s'appelle l' <i>hybridation</i> . La détection des paires de brins permet ensuite de conclure sur la présence et la nature des séquences à analyser.	22
1.6	Principe de synthèse d'une puce par méthode de photolithographie (Affymetrix).	25
1.7	Principe de synthèse d'une puce par méthode de "jet d'encre" (Agilent).	25
1.8	Révélation d'une puce à ADN par fluorescence induite. On distingue bien les plots de sondes. Sur cette image, il y a 1600 plots environs sur une puce de 1.2 cm × 1.2 cm.	26
1.9	Méthode FRET. Les balises moléculaires sont initialement fermées, il y a alors transfert d'énergie du premier marqueur vers l'accepteur (<i>Black Hole Quencher</i> , noté BHQ sur le schéma) : aucun signal n'est détecté. Lorsque la balise est ouverte sous l'action de l'hybridation de la cible sur la sonde, le transfert d'énergie entre les deux marqueurs est stoppé : il y a fluorescence du donneur (voir la thèse de E. Vnuk [1]).	27
1.10	Électrophorèse sur gel d'après la méthode de séquençage de Sanger. Chaque bande résulte du produit de l'une des 4 expériences nécessaires à cette méthode. La lecture de cet électrophorèse indique que la séquence complémentaire GCTTAGGAA a été synthétisée et que, par complémentarité, la séquence inconnue était donc CGAATCCTT.	32
1.11	a) Autoradiogrammes obtenus par Sanger et al. en 1977 b) Résultat donné par un séquenceur automatique en 2004. Chaque couleur correspond à l'une des 4 expériences de base. Seule la première trentaine de séquences est représentée, mais le diagramme complet fait presque 600 bases. Notez l'amorce marquée NN en début de chaîne.	33
1.12	Électrophorèse sur gel d'après la méthode de séquençage de Maxam et Gilbert. Chaque bande résulte du produit de l'une des 4 expériences nécessaires à cette méthode. La lecture de cet électrophorèse indique <i>directement</i> que la séquence CGAATCCTT était la séquence à analyser.	34

1.13	Définition du mélange.	37
1.14	Transformation du boulanger. (a) Première itération d'une transformation du boulanger dans le carré unité : (i) supposons qu'au commencement, une demi-portion du carré soit noire, l'autre blanche. Le carré est comprimé, étiré (ii) puis découpé et rempli (iii). (b) Deuxième itération et (c) quatrième itération. Entre le début de la première itération et la fin de la quatrième, l'interface noir/blanc a été multipliée par 16.	39
1.15	Transformation type "fer à cheval" dans un carré unitaire. Le carré unitaire (a) est étiré (b) puis replié (c). Lors de chaque transformation, l'interface blanc/noir a été multipliée par 2.	40
1.16	Une section de Poincaré regroupe les positions cumulées des particules fluides lagrangiennes espacées d'une durée T ($T =$ période du processus périodique). 2 types de zones coexistent : des zones de bon mélange (chaotiques) et des zones de mauvais mélange (zones mortes ou régulières).	42
1.17	Sensibilité aux conditions initiales : dans un écoulement chaotique, deux particules voisines se séparent exponentiellement vite avec le temps et leur distance varie comme $\delta(t) = \delta_0 e^{\lambda t}$. λ est un taux d'étirement appelé coefficient de Lyapunov. Le fluide s'étire alors dans la direction d'étirement. λ dépend de la localisation des particules.	43
1.18	Dispositif d'advection chaotique d'Aref [2] basé sur l'utilisation alternée de vortex. Le dispositif périodique est réitéré plusieurs fois (n étant un entier, la période est T). Les deux paramètres sans dimension sont $\Pi_1 = \frac{b}{a}$ et $\Pi_2 = \frac{\Gamma T}{2\pi a^2}$, avec Γ l'intensité des vortex.	45
1.19	Dispositif d'advection chaotique de Jones et Aref [3] basé sur l'utilisation alternée d'un puits et d'une source. Les particules absorbées par le puits sont réinjectées par la source (les deux puits/sources ont même débit surfacique Q_s). Le dispositif périodique est réitéré plusieurs fois (période T). Le seul paramètre sans dimension du système est $\Lambda = \lambda/a$ où $\lambda = \sqrt{Q_s T/\pi}$ représente une distance caractéristique. Dans ce dispositif, il n'y a pas de frontières.	45
1.20	Un des nombreux dispositifs à parois mobiles de la littérature. Le mouvement du fluide est assuré par frottement visqueux. Les bandes peuvent être (a) co- ou (b) contra-directionnelles, elles fonctionnent le même laps de temps ($T/2$) mais leur vitesse peut être différente.	46
1.21	État du mélange de deux marqueurs au bout de 20 périodes dans la chambre d'advection chaotique avec parois mobiles. Pour cette expérience, $Re = 1.2$ et les parois sont co-directionnelles. À l'instant $t = 0$, les traceurs n'étaient que deux petites taches orange et verte : on note bien pour $t > 0$ les nombreux étirements et replis réalisés par le mélangeur. On peut remarquer que pour ce jeu de paramètres, les deux traceurs ne se mélangent pas bien. Par contre, on pourrait montrer, en augmentant légèrement le temps de déplacement des rubans pendant chaque période, que le mélange pourrait être bien meilleur. D'après J.M. Ottino [4].	47

1.22	Mélange en cavité ouverte : 2 tiges contra-rotatives mélangent le fluide. (a) protocole "papillon", (b) protocole "brasse". Ce mélangeur type "bateur à oeufs" est alimenté continûment en fluide. Le paramètre gouvernant le mélange est le rapport entre la vitesse d'entrée du fluide et la vitesse de rotation des batteurs. Selon le protocole, le chemin suivi par le fluide pour traverser la zone de mélange est radicalement différent. D'après E. Guillard et al. [5]	48
1.23	Mélangeur passif étudié par Ph. Carrière [6]. Le dispositif contraint, par la géométrie et la configuration des canaux (de type ruban de Möbius), à réaliser une "transformation du boulanger". La répétition de la "cellule" élémentaire permet de réitérer autant de fois cette transformation.	49
2.1	Schéma de la chambre d'hybridation. Le carré orange symbolise la position de la puce à ADN. Les dimensions sont exprimées en mm.	54
2.2	Grille d'éléments finis.	56
2.3	Montage expérimental. Pour les deux protocoles (à pompes ou à seringues), un seul dispositif expérimental a été utilisé, comportant deux pompes péristaltiques réversibles. Dans le cas du protocole à seringues, les pompes fonctionnent réversiblement, et nous avons utilisé de gros tuyaux suffisamment longs pour que la rhodamine ne passe jamais par la pompe. Nous simulons ainsi grâce à une pompe l'action d'un couple de seringues, l'une se vidant, l'autre se remplissant.	57
2.4	Suivi de l'expérience par Fluorescence Induite par Laser.	57
2.5	Photo du Rosamix (photo originale de Rosatech SA)	89
2.6	Principe du Rosamix (schéma original de Rosatech SA).	90
3.1	Les interactions moléculaires dans le cadre des puces à ADN	91
3.2	Ce sont les liaisons hydrogène qui sont responsables de la complémentarité entre les nucléotides. Les liaisons H ont une longueur de 2\AA , c'est à dire 0.2 nm.	100
3.3	Potentiel de Lennard-Jones dans le cadre d'interactions de Van der Waals entre deux atomes ($n = 12$). r représente la distance inter-atomique. La position d'équilibre correspond au minimum de U^{LJ}/E_0 : elle donne la longueur de la liaison.	101
3.4	Potentiel de Morse particulièrement adapté aux liaisons de type hydrogène. La position d'équilibre correspond au minimum de U^{Morse}/D_e : elle donne la longueur de la liaison ($r = R_e$).	101
3.5	Notre modèle de potentiel d'interaction (puits de potentiel).	102
3.6	Répartition des plots sur la puce rectangulaire. Les croix (+) correspondent aux trous d'injection nécessaires au protocole de mélange (et à l'injection des réactifs).	103
3.7	Modèle numérique d'hybridation. Les brins sont transportés par advection (les proportions entre les grandeurs ne sont pas respectées).	103
3.8	Corrélation entre profil du taux de réinjection et volume d'interrogation (pour des raisons de lisibilité de la figure, l'échelle n'est pas respectée pour d_h).	105
3.9	Comparaison du mélange dans les cas "vrai 3D" et "faux 3D". Ces sections de Poincaré sont celles issues du protocole A, $T = 4$ s, dans une chambre carrée. La similitude est très grande.	106
3.10	Conditions initiales (CI) pour l'hybridation statique (répartition aléatoire sur la surface) ou dynamique (tache injectée par un trou). Dans les deux cas, la répartition selon la hauteur h est <i>aléatoire</i>	107

3.11	Résultat de diffusion pure comparée au mélange par advection chaotique. Échelle lin-log. $d_h = 100$ nm et $D = 10^{-10}$ m ² /s.	108
3.12	Évolution typique de la concentration en cibles libres en fonction du temps avec le système d'advection chaotique. Ici, on a $d_h = 100$ nm et $D = 10^{-10}$ m ² /s. Échelle lin-log.	109
3.13	Variance en fonction du temps pour $d_h = 100$ nm et $D = 10^{-10}$ m ² /s. Pour des raisons de lisibilité, la courbe a été tracée en échelle <i>log-log</i>	110
3.14	Confrontation expérimentale hybridation statique/hybridation dynamique grâce au Rosamix. Dans le cas du Rosamix, seuls les plots compatibles avec les cibles sont hybridés.	111
3.15	Évolution du nombre de cibles libres (adimensionné) en fonction de $t \times D/S_{\text{chambre}}$ dans le cas de l'hybridation statique. Au vu de ce résultat, il sera désormais possible d'obtenir la courbe d'hybridation statique pour n'importe quel coefficient de diffusion D à partir d'une seule courbe de référence, par exemple à partir de celle issue de $D = 10^{-10}$ m ² /s. Échelle <i>lin-log</i>	113
3.16	Temps moyen d'hybridation \bar{t} en fonction de d_h dans le cas de l'hybridation statique. Les valeurs sont calculées pour la valeur de $D = 10^{-10}$ m ² /s et extrapolées pour $D = 10^{-11}$ m ² /s et $D = 10^{-12}$ m ² /s. Échelle <i>log-log</i>	114
3.17	Instant moyen d'hybridation \bar{t} adimensionné, en fonction de d_h dans le cas de l'hybridation dynamique. Échelle <i>log-log</i>	115
3.18	Écart type du nombre de cibles hybridées sur chaque plot hybridable (2120 particules). Échelle <i>log-log</i>	115
3.19	On suppose qu'à un instant t donné, il n'y a pas de cibles dans un cylindre dont la base est un plot et la hauteur est supérieure à d_h	116
3.20	Position des cibles à un instant $t' > t$ sous le seul effet de l'advection horizontale.	117
3.21	$\bar{t} \times Pe^{-2/3}$ en fonction de $d_h \times Pe^{1/3}$ pour différentes valeurs du coefficient de diffusion (2120 particules). On remarque que la dépendance en Pe des divers temps est bien une puissance de 2/3 et que d_h^{eff} varie comme $Pe^{-1/3}$. Le calcul de d_h^{eff} montre bien la séparation entre les deux comportements. Échelle <i>log-log</i>	119
3.22	a) Indépendance en $[C]_0$ de τ_∞ . Échelle <i>lin-lin</i> b) Dépendance de τ_∞ en L_p . Les calculs ont été faits pour le cas $d_h = 100$ nm et $D = 10^{-10}$ m ² /s en faisant varier la taille des plots de sondes. On constate bien une dépendance de τ_∞ en $L_p^{-5/3}$ conformément au résultat trouvé par l'équation 3.42. Échelle <i>log-log</i>	122
3.23	Énergie d'activation de la réaction d'hybridation. $S : C$ représente une espèce moléculaire non isolable à mi-chemin entre les réactifs séparés (S et C) et le produit final (SC).	123
4.1	Configuration de Kretschmann à base de prisme pour la SPR. La résonance d'un plasmon de surface s'obtient à l'interface métal/air ou métal/eau lorsque l'angle d'incidence de la lumière est tel que la composante de son vecteur d'onde $K_{\text{év}}$ est égal au vecteur d'onde du plasmon K_{ps} . <i>Note</i> : les proportions ne sont pas respectées, en particulier la couche de métal est représentée épaisse pour bien montrer l'onde de plasmon.	132
4.2	Volume d'interrogation dans un montage SPR. À l'intérieur de ce volume, l'indice vaut <i>en moyenne</i> n_s	133

4.3	Allure de la courbe de réflectance en fonction de θ . Le minimum de R correspond à la condition de résonance.	136
4.4	La fonction $K_{ps}(n_s)$ est une fonction croissante de n_s	136
4.5	Influence de l'indice supérficiel n_s sur la réflectance R . n'_s et n''_s sont deux valeurs de n_s (à titre d'exemple, $n''_s > n'_s$).	137
4.6	Courbe type de cinétique suivie par SPR. Cette courbe a les mêmes variations que l'on regarde la réflectance ou l'angle de résonance θ_r (facteur de proportionnalité entre ces deux grandeurs).	138
4.7	Montage SPR utilisé à l'Université de Sherbrooke.	142
4.8	Dessin technique de la chambre d'advection.	144
4.9	Vues et coupes 3D de la cellule fluïdique construite et utilisée pour le suivi SPR (remarque : le filetage pour les connecteurs n'a pas été représenté).	146
4.10	Photo de la chambre d'advection chaotique fabriquée à l'Université de Sherbrooke.	147
4.11	Schéma du protocole d'advection chaotique utilisé dans ce chapitre (3 phases pendant chaque cycle).	147
4.12	Dispositif expérimental (1/2).	148
4.13	Dispositif expérimental (2/2).	149
4.14	Étape de fonctionnalisation de la surface.	150
4.15	Réaction chimique suivie par SPR.	150
4.16	Comparaison du mélange expérimental dans le cas de a) la diffusion pure (résultat pour $t = 15$ min) et b) le cas du mélange par advection chaotique (résultat à $t = 1$ min, $T = 9$ s). En c), section de Poincaré du mélange (faux 3D). Le colorant utilisé est d'origine alimentaire et son injection est réalisée par le trou inférieur gauche sur la photo.	151
4.17	Premier résultat expérimental : comparaison du signal SPR avant et après réaction pour le cas d'une diffusion pure et dans le cas du mélange par advection chaotique	152
4.18	Évolution de la réflectance au cours du temps pour la diffusion pure. Pendant la réaction, la mesure se fait avec de la solution tampon comme milieu.	153
4.19	Zoom de la figure 4.18 : le déplacement des courbes est dû à l'avancement de la réaction.	154
4.20	Exploitation de la figure 4.19 : a) évolution de la réflectance R en fonction du temps pour un angle de travail donné ($\theta_t = 73^\circ$) b) évolution de l'angle θ en fonction du temps pour une réflectance donnée ($R = 0.5$). On remarque que les courbes sont sensiblement les mêmes.	155
4.21	Évolution de la réflectance au cours du temps pour l'advection chaotique. Toutes les courbes ont été tracées avec la solution tampon comme milieu remplissant le réacteur.	155
4.22	Zoom de la figure 4.21.	156
B.1	Cavité de type Hele-Shaw.	167
C.1	Simulation d'un écoulement autour ou à l'intérieur d'un cylindre ($\beta \geq 1$).	175
C.2	Lignes de courant dans une cavité de rayon $R = 1$ pour $\beta = 0.8$	177
D.1	Passage du plan z au plan Z	181
D.2	Conservation des angles par transformation conforme.	181
D.3	Passage du plan z au plan Z	182

D.4	Exemple de la transformation conforme $Z = z^2$	183
D.5	Principe de la transformation de Schwarz-Christoffel.	184
D.6	Cas particulier du rectangle.	185
D.7	Transformation de Schwarz-Christoffel d'un rectangle en un cercle de rayon 1.	187
D.8	Champ des vitesses dans un écoulement 2D Puits-Source dans un carré.	188
D.9	Lignes de courant créées par un puits et une source dans un carré.	188
D.10	Lignes de courant créées par un puits et une source dans un rectangle.	189
E.1	Symétrie du champ des vitesses pour les protocoles A et B.	191
E.2	Protocole A.	192
E.3	Protocole B.	194
G.1	Fonction densité de probabilité $g(z)$ que l'on souhaite obtenir à partir d'un bruit blanc plat.	198
G.2	Probabilité $P(z)$ de tirer la variable aléatoire entre 0 et z	198
G.3	Densité de probabilité $d(X)$ du bruit blanc plat.	199
G.4	Probabilité $P'(X)$ d'avoir la variable aléatoire entre 0 et X pour un bruit blanc plat.	199
G.5	Fonction de passage.	200
G.6	Histogramme de répartition d'une variable aléatoire de distribution plate après transformation par G.17.	201
H.1	Réponse d'un système diffusif à une impulsion de Dirac $\delta(x)$ ($D = 1 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$). Temps $t = 0.001 \text{ s}$, $t = 0.01 \text{ s}$, $t = 0.1 \text{ s}$ et $t = 1 \text{ s}$	204
I.1	Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.25 \text{ s}$; b) $T = 0.5 \text{ s}$; c) $T = 1 \text{ s}$; d) $T = 2 \text{ s}$; e) $T = 4 \text{ s}$; f) $T = 6 \text{ s}$; g) $T = 8 \text{ s}$; h) $T = 10 \text{ s}$; i) $T = 12 \text{ s}$; j) $T = 14 \text{ s}$; k) $T = 16 \text{ s}$	208
I.2	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$ et : a) $T = 0.25 \text{ s}$; b) $T = 0.5 \text{ s}$; c) $T = 1 \text{ s}$; d) $T = 2 \text{ s}$; e) $T = 4 \text{ s}$; f) $T = 6 \text{ s}$; g) $T = 8 \text{ s}$; h) $T = 10 \text{ s}$; i) $T = 12 \text{ s}$; j) $T = 14 \text{ s}$; k) $T = 16 \text{ s}$	209
I.3	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$ et : a) $T = 0.25 \text{ s}$; b) $T = 0.5 \text{ s}$; c) $T = 1 \text{ s}$; d) $T = 2 \text{ s}$; e) $T = 4 \text{ s}$; f) $T = 6 \text{ s}$; g) $T = 8 \text{ s}$; h) $T = 10 \text{ s}$; i) $T = 12 \text{ s}$; j) $T = 14 \text{ s}$; k) $T = 16 \text{ s}$	211
I.4	Protocole B : Sections de Poincaré pour $T = 4 \text{ s}$ et : a) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$; b) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$; c) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.3$; d) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.4$; e) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.5$	211
I.5	Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.25 \text{ s}$; b) $T = 0.5 \text{ s}$; c) $T = 1 \text{ s}$; d) $T = 2 \text{ s}$; e) $T = 4 \text{ s}$; f) $T = 6 \text{ s}$; g) $T = 8 \text{ s}$; h) $T = 10 \text{ s}$; i) $T = 12 \text{ s}$; j) $T = 14 \text{ s}$; k) $T = 16 \text{ s}$	213
I.6	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$ et : a) $T = 0.25 \text{ s}$; b) $T = 0.5 \text{ s}$; c) $T = 1 \text{ s}$; d) $T = 2 \text{ s}$; e) $T = 4 \text{ s}$; f) $T = 6 \text{ s}$; g) $T = 8 \text{ s}$; h) $T = 10 \text{ s}$; i) $T = 12 \text{ s}$; j) $T = 14 \text{ s}$; k) $T = 16 \text{ s}$	214
I.7	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$ et : a) $T = 0.25 \text{ s}$; b) $T = 0.5 \text{ s}$; c) $T = 1 \text{ s}$; d) $T = 2 \text{ s}$; e) $T = 4 \text{ s}$; f) $T = 6 \text{ s}$; g) $T = 8 \text{ s}$; h) $T = 10 \text{ s}$; i) $T = 12 \text{ s}$; j) $T = 14 \text{ s}$; k) $T = 16 \text{ s}$	215
I.8	Protocole B : Sections de Poincaré pour $T = 4 \text{ s}$ et : a) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$; b) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$; c) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.3$; d) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.4$; e) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.5$	216

I.9	Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.25$ s; b) $T = 0.5$ s; c) $T = 1$ s; d) $T = 2$ s; e) $T = 4$ s; f) $T = 6$ s; g) $T = 8$ s; h) $T = 10$ s; i) $T = 12$ s; j) $T = 14$ s; j) $T = 16$ s.	218
I.10	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.1$ et : a) $T = 0.25$ s; b) $T = 0.5$ s; c) $T = 1$ s; d) $T = 2$ s; e) $T = 4$ s; f) $T = 6$ s; g) $T = 8$ s; h) $T = 10$ s; i) $T = 12$ s; j) $T = 14$ s; k) $T = 16$ s.	220
I.11	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.2$ et : a) $T = 0.25$ s; b) $T = 0.5$ s; c) $T = 1$ s; d) $T = 2$ s; e) $T = 4$ s; f) $T = 6$ s; g) $T = 8$ s; h) $T = 10$ s; i) $T = 12$ s; j) $T = 14$ s; k) $T = 16$ s.	221
I.12	Protocole B : Sections de Poincaré pour $T = 4$ s et : a) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.1$; b) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.2$; c) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.3$; d) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.4$; e) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.5$	222
I.13	Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.25$ s; b) $T = 0.5$ s; c) $T = 1$ s; d) $T = 2$ s; e) $T = 4$ s; f) $T = 6$ s; g) $T = 8$ s; h) $T = 10$ s; i) $T = 12$ s; j) $T = 14$ s; k) $T = 16$ s	224
I.14	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.1$ et : a) $T = 0.25$ s; b) $T = 0.5$ s; c) $T = 1$ s; d) $T = 2$ s; e) $T = 4$ s; f) $T = 6$ s; g) $T = 8$ s; h) $T = 10$ s; i) $T = 12$ s; j) $T = 14$ s; k) $T = 16$ s	225
I.15	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.2$ et : a) $T = 0.25$ s; b) $T = 0.5$ s; c) $T = 1$ s; d) $T = 2$ s; e) $T = 4$ s; f) $T = 6$ s; g) $T = 8$ s; h) $T = 10$ s; i) $T = 12$ s; j) $T = 14$ s; k) $T = 16$ s.	227
I.16	Protocole B : Sections de Poincaré pour $T = 4$ s et : a) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.1$; b) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.2$; c) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.3$; d) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.4$; e) $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.5$	228
I.17	Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 1$ s; b) $T = 4$ s.	229
I.18	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.1$ et : a) $T = 1$ s; b) $T = 4$ s.	229
I.19	Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.5$ s; b) $T = 4$ s.	230
I.20	Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{tuyau}/V_{ch} = 0.1$ et : a) $T = 0.5$ s; b) $T = 4$ s.	230

Liste des tableaux

1.1	Les différentes techniques de fabrication de puces.	24
1.2	Les banques de données de gènes.	30
1.3	Comparaison des différentes techniques de séquençage.	36
3.1	Intensités et portées comparées des interactions intermoléculaires [7][8]. À 298 K, $k_B T \approx 2.478 \text{ kJ.mol}^{-1}$	99
3.2	Grandeurs utilisées dans les simulations numériques. On rappelle que $h = 50 \text{ }\mu\text{m}$	106
3.3	Valeurs rapportées ou mesurées de la constante de vitesse d'hybridation k_a (modèle de Langmuir) chez les différents auteurs dans le cas de diffusion pure.	125
4.1	Caractéristiques principales des ondes de plasmon de surface à l'interface or/eau ou argent/eau.	134
4.2	Sensibilité théorique de la SPR dues aux variations de l'indice de réfraction du diélectrique (RIU = Refractive Index Unit, Unité d'Indice de réfraction). D'après [9]	140
A.1	Résultats d'hybridation dynamique pour $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).	163
A.2	Résultats d'hybridation dynamique pour $D = 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).	164
A.3	Résultats d'hybridation dynamique pour $D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).	164
A.4	Résultats d'hybridation statique pour $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).	165
A.5	Résultats d'hybridation statique pour $D = 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).	165
A.6	Résultats d'hybridation statique pour $D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).	165

Chapitre 1

Introduction et état de l'art

1.1 Introduction générale et contexte de la thèse

Est-il simple de bien mélanger ? Ceux qui prennent du sucre ou du lait dans leur café ou leur thé du matin savent tous intuitivement que pour bien mélanger, il suffit de bien remuer, et les petits tourbillons résultants de cette action mécanique se chargeront de bien homogénéiser l'ensemble. Cette action est efficace car le régime d'écoulement ainsi créé est dit turbulent.

Dans les écoulements très visqueux ou, dans le cas qui nous intéresse, pour des écoulements ayant lieu à plus petite échelle, il est beaucoup plus complexe de mélanger : du fait des faibles dimensions du système, le nombre de Reynolds¹ est alors très petit, si bien que les écoulements sont laminaires. Il n'est donc *a priori* pas possible de mélanger comme dans une tasse. C'est le problème qui se pose lorsqu'on veut mélanger dans les microsystèmes fluidiques. Dans ma thèse, je me suis intéressé au cas des *Puces à ADN*.

Une puce à ADN est un dispositif révolutionnaire qui permet de connaître ou détecter simultanément plusieurs milliers de séquences génétiques d'une molécule d'ADN. Ces séquences recherchées peuvent être responsables de maladies génétiques, mais peuvent être aussi les séquences d'un virus que l'on désire détecter. Une puce à ADN permet également de séquencer l'ADN des individus, permettant ainsi de connaître l'ensemble du génome de tout être vivant.

Ce travail est né d'une collaboration entre deux équipes issues de communautés bien différentes, l'équipe *microhydrodynamique* du LMFA d'une part, spécialisée dans le mélange par "advection chaotique", et l'équipe *Ingénierie du vivant* de l'INL (Institut des Nanotechnologies de Lyon), qui travaille sur les puces à ADN. Hormis un stage à L'université de Sherbrooke au Canada, ma thèse s'est déroulée principalement au LMFA, mais j'ai toujours essayé de faire le lien entre ces deux thématiques. Cela implique tout d'abord un gros travail bibliographique, à la fois sur les puces à ADN (Qu'est-ce qu'une biopuce ? En quoi est-ce mieux que d'autres techniques de séquençage ?) et sur le mélange par advection chaotique, qu'il me semble important de présenter dès l'introduction. Une présentation plus "condensée" pourra être retrouvée dans l'article consacré au mélange du chapitre suivant.

¹Le nombre de Reynolds est défini par $Re = U\ell/\nu$, où U est la vitesse caractéristique de l'écoulement, ℓ est la taille caractéristique du système, et ν la viscosité cinématique du fluide ; l'écoulement est turbulent à grand nombre de Reynolds.

1.2 Les puces à ADN

1.2.1 L'A.D.N.

Les eucaryotes, tels les animaux et les êtres humains, sont des êtres vivants formés de cellules dotées d'un noyau contenant des chromosomes². Chaque chromosome est formé d'un squelette protéique sur lequel est enroulée une seule molécule porteuse de l'information génétique, appelée acide désoxyribonucléique, ou ADN. Le rôle de l'ADN est de commander la synthèse des protéines, molécules indispensables au développement et au fonctionnement des êtres vivants. Cet ADN se présente sous la forme d'une molécule hélicoïdale composée de *deux chaînes polynucléotidiques*. La structure en hélice de cette célèbre molécule fut découverte par Watson et Crick en 1953 [10], ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 1962.

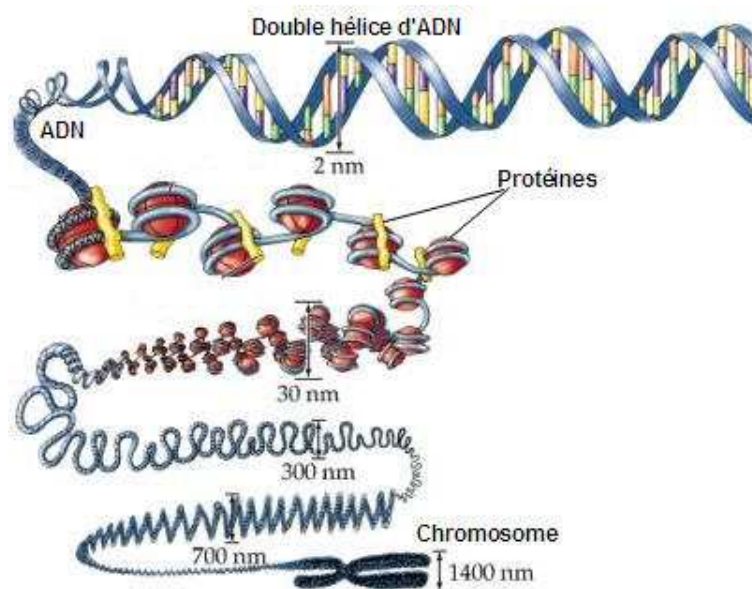


FIG. 1.1 – Du chromosome à la double hélice d'ADN.

Tous les nucléotides de l'ADN comportent (fig. 1.2) :

- un groupe phosphate (noté P sur la figure),
- un ose à cinq atomes de carbone : 2-D-désoxyribose, noté D (pentose),
- une base azotée (figure 1.3) : adénine (symbole A), guanine (symbole G), cytosine (symbole C) ou thymine (symbole T).

Un nucléotide est formé d'un ose lié de manière covalente à une des bases azotées et à une molécule d'acide phosphorique (fig. 1.2). Les nucléotides se regroupent pour former un simple brin d'ADN et l'enchaînement des bases (par exemple AGC sur la figure 1.2) forme la séquence génétique ou *code génétique*. Les gènes sont des portions de ces séquences nucléotidiques et c'est ce code qui est le lien entre l'information génétique et l'expression des caractères de l'organisme

²Par opposition aux procaryotes dont les cellules n'en possèdent pas et qui se multiplient par division asexuée de l'organisme (bactéries, ...).

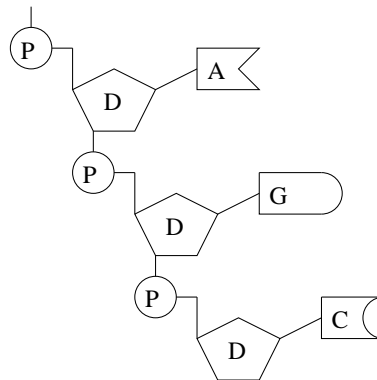


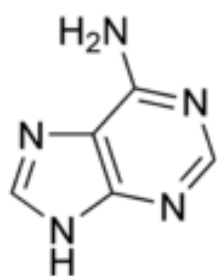
FIG. 1.2 – Séquence de 3 nucléotides AGC.

(le phénotype). Cette séquence est généralement formée de plusieurs centaines de millions de nucléotides, ce qui fait de l'ADN une macromolécule : le génome humain comporte environ 6 milliards de bases réparties sur 46 chromosomes.

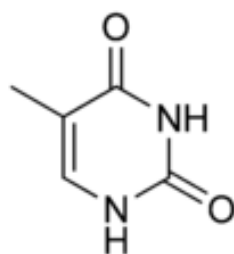
La structure en double hélice de l'ADN est dite bicaténaire, car elle est constituée de deux brins. On parle de *spécificité* entre les brins, car l'adénine ne s'associe exclusivement qu'avec la thymine grâce à deux liaisons hydrogène (et vice et versa) et la cytosine exclusivement avec la guanine à l'aide de trois liaisons hydrogène (et vice et versa). Il résulte de cette spécificité entre les bases que les deux brins de l'ADN sont *complémentaires* (figure 1.4). Puisque chaque brin est initié par un groupe phosphate et se termine par un groupe OH, les brins sont orientés par convention de l'extrémité P vers l'extrémité OH ou encore de 5' vers 3'. Ainsi, les deux brins complémentaires d'une molécule d'ADN sont assemblés de manière antiparallèle, c'est à dire que leurs orientations sont opposées. Cette inversion de la polarité est à la base de la structure en double hélice de l'ADN (figure 1.4).

L'ADN peut être dupliqué par réplication semi-conservative : lors de ce processus, les deux brins se séparent, puis chaque brin solitaire synthétise sa moitié manquante, intégrant selon la règle de complémentarité des bases, des nucléotides libres qui sont dispersés dans le noyau. Ainsi, chaque nouvelle molécule est identique à la molécule d'ADN initiale. C'est ce processus qui est utilisé lors de la division cellulaire : lorsqu'une cellule mère se divise en 2 cellules filles, ces deux cellules ont exactement le même ADN, chacune ayant hérité de l'un des brins d'ADN de la cellule mère. Ainsi, un autre rôle essentiel attribué à l'ADN est la transmission de cette information génétique de génération en génération, c'est pourquoi on dit que l'ADN est le *support de l'hérédité*. Parfois, l'information génétique peut changer suite à des incidents biologiques : on parle alors de *mutations*. Ce sont ces mutations qui sont par exemple responsables des cancers.

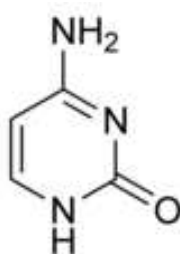
En outre, une molécule d'ADN possède la propriété de se dissocier en deux brins complémentaires : c'est la dénaturation. Ceci est rendu possible grâce aux énergies des liaisons hydrogène entre les bases qui sont relativement faibles ($\sim 10 \text{ kJ.mol}^{-1}$) par rapport aux liaisons covalentes (liaisons fortes, de l'ordre de plusieurs centaines de kJ.mol^{-1}). La dénaturation est expérimentalement observée par augmentation de la température, ou forçage mécanique. Réciproquement, deux brins complémentaires ont la capacité de s'associer pour reformer le duplex de la molécule d'ADN : on parle alors d'*hybridation*.



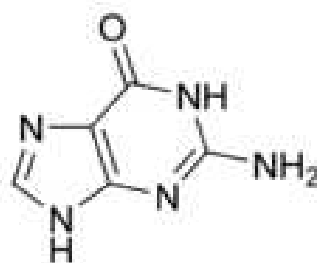
Adénine



Thymine



Cytosine



Guanine

FIG. 1.3 – Les 4 bases, briques élémentaires de la molécule d'ADN

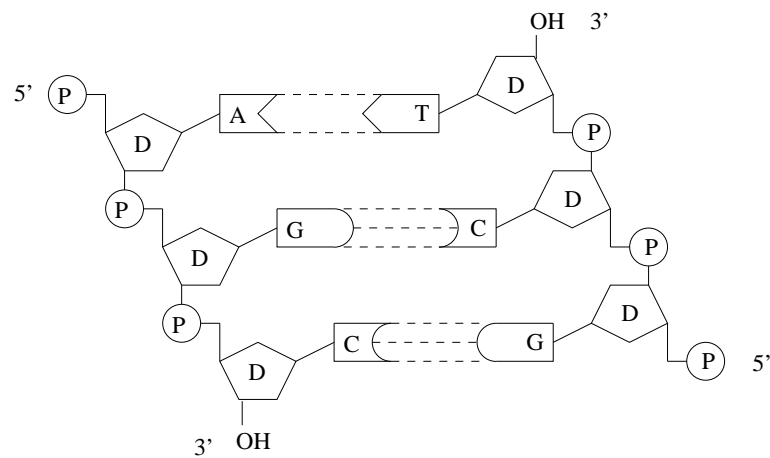


FIG. 1.4 – Double brin d’ADN (seuls 3 nucléotides sont représentés ici) : les nucléotides sont associés de manière complémentaire car A ne s’associe qu’avec T (par 2 liaisons hydrogène), et C qu’avec G (par 3 liaisons hydrogène).

1.2.2 Principe des puces à ADN

Les puces à ADN (appelées aussi *puces à gènes*, *biopuces* et en anglais *biochips*, *DNA-microarrays* ou *microarrays*) marquèrent une véritable révolution dans la recherche génomique lorsque les premières firent leur apparition vers 1995 : cet outil de diagnostic médical permet en effet de détecter plusieurs milliers de gènes ou séquences nucléotidiques différentes en une seule fois.

La puce à ADN (cf. fig 1.5) se présente sous la forme d’une plaque de verre (moins couramment le silicium ou le plastique) de quelques centimètres de côté maximum, sur laquelle sont fixés des *monobrans* d’ADN de séquences *connues* et *choisies* appelées **sondes**. Généralement, on synthétise plusieurs centaines de sondes identiques que l’on regroupe sur un même plot (ou *spot* en anglais) : une puce est alors formée de plusieurs milliers de plots.

Les puces à ADN utilisent le principe de la complémentarité entre les deux brins de l’hélice d’ADN : comme nous l’avons vu plus haut, un brin d’ADN est constitué d’une séquence de nucléotides parmi lesquels A, T, C et G qui ne s’allient qu’avec leur nucléotide complémentaire : A (respectivement C) ne s’allie qu’avec T (respectivement G) et vice versa. Le test consiste donc à mettre en contact avec la puce des monobrans d’ADN à analyser de séquence *inconnue* (appelées **cibles**). Dans la version la plus commune, cette expérience consiste dans un premier temps à étaler la solution d’ADN à analyser sur la biopuce et de laisser agir. Cette solution doit au préalable avoir subi une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction, méthode permettant d’obtenir par multiplication une quantité suffisante de matériel génétique), un traitement chimique (pour séparer la double hélice en monobrans d’ADN) et enfin un marquage des molécules par un agent fluorescent³.

Après la mise en contact de la solution inconnue avec la biopuce, les brins complémentaires vont se lier chimiquement comme dans la molécule d’ADN originelle (association spécifique) :

³On peut également faire un marquage par radioactivité. Le principe de fonctionnement reste identique.

c'est la phase d'*hybridation*. Ensuite, la puce est lavée afin d'éliminer les brins n'ayant pas réagi avec les sondes de la puce. La dernière partie de l'expérience consiste alors à détecter quelles sont les paires (cibles + sondes) sur la puce afin de pouvoir conclure si certaines séquences étaient initialement présentes dans la solution à analyser.

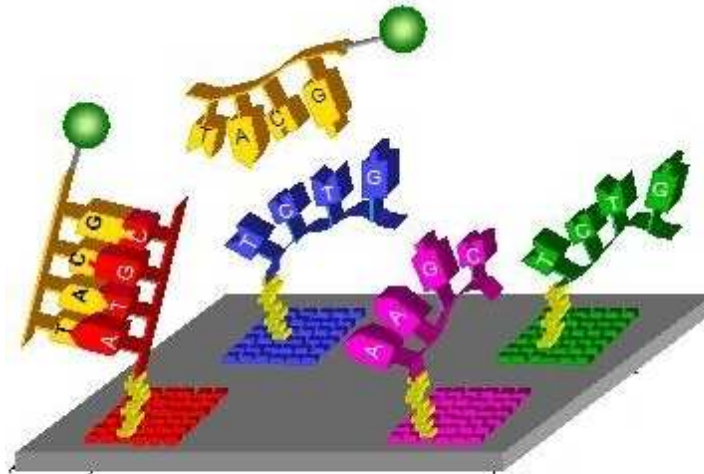


FIG. 1.5 – Principe de la puce à ADN. Les *cibles* marquées de séquence *inconnue* vont s'associer par complémentarité aux brins de la puce (appelées *sondes*) de séquence *connue* et *choisie* : cette association s'appelle l'*hybridation*. La détection des paires de brins permet ensuite de conclure sur la présence et la nature des séquences à analyser.

Fabrication

Le but premier d'une puce à ADN est d'identifier l'existence ou non de séquences bien spécifiques de l'ADN issu d'un organisme, cette spécificité étant déterminée par le choix de la sonde. Généralement, le choix des sondes se fait grâce aux banques de données mondiales de gènes (GenBank, Unigene) issues du travail de séquençage (voir le paragraphe 1.2.3). Mais le choix des séquences intéressantes n'est pas tout et certains critères sont à prendre en compte :

- position de l'enchaînement de nucléotides recherchés : selon que la zone recherchée est au début, au centre ou à la fin de la séquence de la sonde, les risques de mauvais appariement sont plus ou moins importants. La meilleure position est le milieu de la séquence sonde.
- taille de la sonde : plus la sonde est grande, plus le duplex formé est stable entre la sonde et la cible. Cependant, plus la sonde (ou la cible) est grande, plus il y a de risque que celle-ci puisse se replier sur elle-même (on parle de structure secondaire) et donc rendre difficile l'hybridation avec son brin complémentaire. Ainsi, la longueur usuelle des sondes se situe généralement entre 10 et 20 nucléotides.
- recouvrement de séquence : la séquence de la sonde étant courte, il est statistiquement plus

facile de la retrouver dans l'ADN complet de l'organisme étudié. Il faut donc faire attention à ce qu'une sonde ne détecte pas deux polymorphismes (deux caractères différents) simultanément.

- paramètres d'hybridation : température, pH, concentration en sels... Ils dépendent de la sonde (taille, séquence). Ainsi plus la puce aura un nombre important de sondes, plus il sera difficile d'optimiser et d'homogénéiser ses paramètres d'hybridation.

Il existe 3 méthodes de production de puces (tableau 1.1). Toutes trois diffèrent sur la façon de créer les sondes et de les fixer. Ces trois grands procédés sont :

- l'adressage de longs fragments d'ADN biologiques connus,
- la synthèse d'oligonucléotides *ex-situ* puis leur adressage sur la puce,
- la synthèse *in-situ* des sondes.

La première technique est utilisée chez les êtres procaryotes (organismes dont les cellules n'ont pas de noyaux, comme les bactéries). La méthode repose sur une première amplification de l'ADN trouvé directement dans les cellules. Le matériel génétique obtenu est ensuite purifié et/ou filtré, puis fixé sur des membranes ou du verre. Ce dépôt (ou adressage) est réalisé par des robots mais de manière non-covalente dans le cas de membranes, ce qui peut engendrer une perte du matériel génétique. Par contre, un traitement du verre avec des produits à base de silanes permet d'améliorer grandement l'adhérence de l'ADN déposé.

La méthode de synthèse *in-situ* des sondes repose sur deux grandes techniques : la photolithographie et la micro-projection. Adaptée de l'industrie du semi-conducteur, la photolithographie (fig. 1.6) utilise un système de masques (Affymetrix) qui permettent la déprotection de certains sites par radiation lumineuse. Un traitement chimique permet ensuite de fixer sélectivement des nucléotides aux endroits déprotégés. La répétition de ces étapes permet de construire pas à pas des puces de haute densité en sondes. La méthode par micro-projection [11] (Agilent, fig. 1.7), inspirée de la technologie des imprimantes à jet d'encre, utilise quant-à-elle une tête d'impression micro-contrôlée qui projette des nucléotides selon la séquence désirée. Dans les 2 cas, la synthèse est réalisée à grande échelle, car automatisée, ce qui permet de grosses économies en temps et argent.

Généralement, des "espaceurs" sont introduits entre le support solide et les sondes. Leur rôle est de rendre plus accessibles ces sondes, car la proximité du support solide est parfois source de gêne stérique. Grâce à eux, l'interaction cibles/sondes est plus efficace. Il a été montré que de tels espaceurs pouvaient améliorer l'hybridation jusqu'à 150 fois [12] !

Comme déjà décrit plus haut, les sondes identiques sont regroupées en plots, ceux-ci mesurant typiquement quelques 10–100 μm de diamètre. Les surfaces des puces allant de 1 à quelques cm^2 , elles peuvent accueillir plusieurs millions de plots. Actuellement, les puces les plus performantes peuvent accueillir jusqu'à 4×44 kilobases d'ADN soit l'équivalent de 4 génomes humains complets sur une seule puce (!) Cela permet de tester différentes cultures cellulaires sur une même lame, voire réaliser des réplicats (ce qui est vivement recommandé pour l'analyse statistique en aval).

Marquage des cibles et lecture des puces

La technique usuellement utilisée pour repérer les plots hybridés nécessite de marquer préalablement les cibles d'un agent fluorescent (fluorophore) avant leur introduction sur la puce (voir

Méthode	Caractéristiques et/ou applications
<p>I) Dépôt de longs brins d'ADN :</p> <ul style="list-style-type: none"> - les séquences déposées proviennent directement de brins d'ADN biologiques (Stanford University) 	<ul style="list-style-type: none"> • plots de brins multipliés par PCR • reconnaissance de gènes
<p>II) Plots d'oligonucléotides préfabriqués :</p> <ul style="list-style-type: none"> - gel pads (Motorola) - microélectrodes (Nanogen) 	<ul style="list-style-type: none"> • les oligonucléotides sont attachés sur une couche de Polyacrylamide activée • immobilisation contrôlée par champ électrique
<p>III) Synthèse d'oligonucléotides <i>in situ</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - photolithographie (Affymetrix) - "jet d'encre" (Agilent) 	<ul style="list-style-type: none"> • illumination sélective suivie de synthèse des oligonucléotides sur la puce • adapté de l'industrie du semi-conducteur • oligonucléotides synthétisés base par base • adapté de la technologie des imprimantes à jet d'encre

TAB. 1.1 – Les différentes techniques de fabrication de puces.

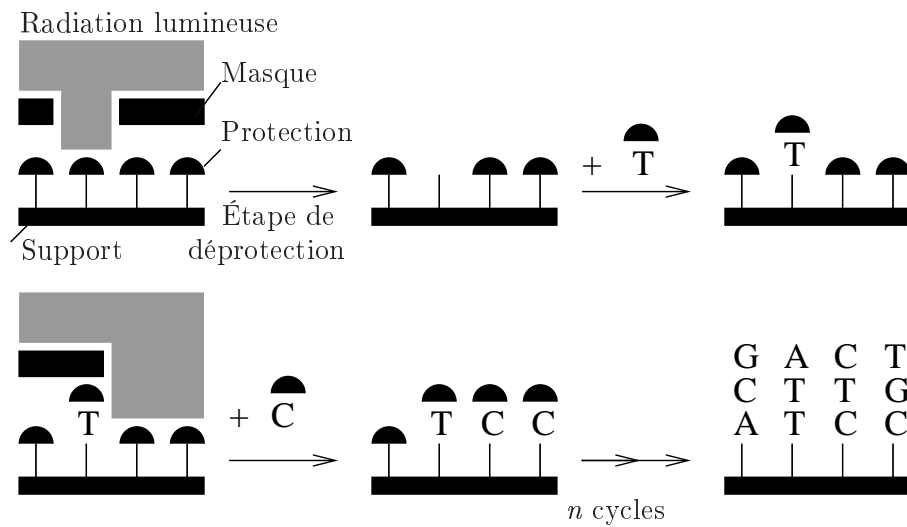


FIG. 1.6 – Principe de synthèse d'une puce par méthode de photolithographie (Affymetrix).

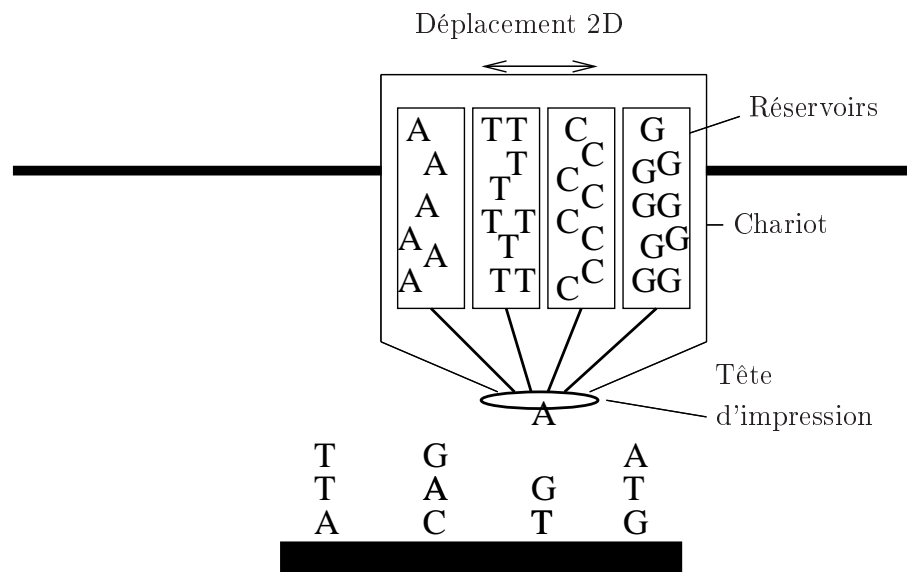


FIG. 1.7 – Principe de synthèse d'une puce par méthode de "jet d'encre" (Agilent).

la figure 1.5). Après injection et hybridation, l'étape de lavage permet de ne conserver que les cibles qui ont réagi : celles-ci peuvent alors être révélées par un rayonnement lumineux. Les fluorophores les plus utilisés sont la fluorescéine (longueurs d'onde d'absorption λ_a et d'émission λ_e respectivement de 495 nm et 519 nm), *Cy3* (Indodicarboyanine 3, $\lambda_a = 548$ nm $\lambda_e = 562$ nm) et le *Cy5* (Indodicarboyanine 5, $\lambda_a = 646$ nm $\lambda_e = 664$ nm). On peut ainsi jouer sur différents types de fluorophores (couleurs) en partageant par exemple une population de cibles en différents groupes, chacun correspondant à une couleur ; on traite alors chaque groupe de manière différente

(irradiations, traitement médicamenteux, etc.), et l'on regarde grâce à la puce si les cibles ont été modifiées par rapport à un groupe témoin.

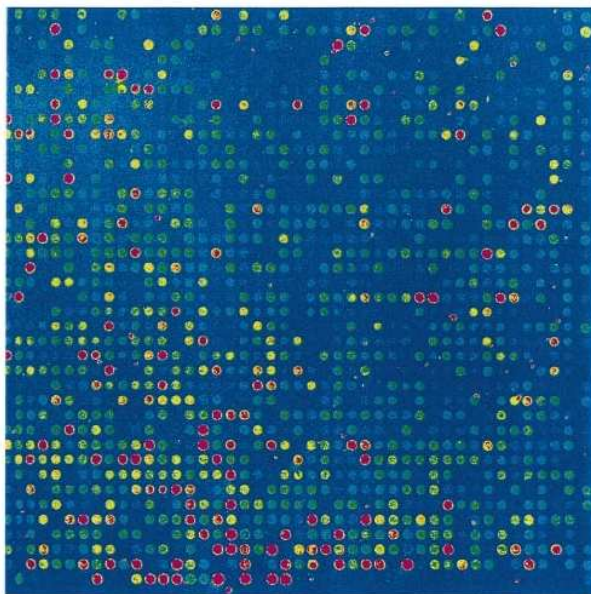


FIG. 1.8 – Révélation d'une puce à ADN par fluorescence induite. On distingue bien les plots de sondes. Sur cette image, il y a 1600 plots environ sur une puce de $1.2 \text{ cm} \times 1.2 \text{ cm}$.

L'avantage de la méthode de marquage des cibles est qu'elle ne nécessite que quelques manipulations simples pour marquer les cibles, son inconvénient est qu'elle oblige un lavage systématique de la puce avant la lecture du résultat de l'hybridation, rendant par exemple impossible un suivi de cinétique par fluorescence en temps réel sur puce. Une autre méthode mise en oeuvre, dite FRET [1] (Fluorescence Resonance Energy Transfer), utilise des sondes particulières appelées "balises moléculaires"⁴. Celles-ci sont en forme d'épingle à cheveux et composée d'un pied et d'une partie correspondant à la sonde. À ses deux extrémités, deux marqueurs spectroscopiquement "complémentaires" sont fixés : le spectre d'émission de l'un correspond au spectre d'absorption de l'autre, qui lui-même ré-émet cette énergie sous forme de chaleur ; comme il n'y a pas de ré-émission lumineuse, ce dernier est appelé "Black Hole Quencher". Lorsque la cible n'est pas hybridée sur la sonde, la balise reste fermée par l'intermédiaire du pied et nous avons un transfert entre les deux marqueurs (voir la figure 1.9). Inversement, lorsque la cible est hybridée sur la partie sonde, la balise s'ouvre et le transfert d'énergie est interrompu. À tout instant, l'illumination de la puce rend donc compte de l'état d'hybridation et autorise ainsi un suivi en temps réel de l'avancée de la réaction. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite en amont un gros travail chimique de préparation de la puce.

Il existe 2 types de système de lecture des puces à ADN [1] :

- Le scanner (système ponctuel) est basé sur l'utilisation d'un laser couplé à un photomultiplicateur connecté à un ordinateur pour récupérer et formater les signaux de fluores-

⁴Il existe différentes méthodes de FRET, nous n'en décrivons qu'une seule ici.

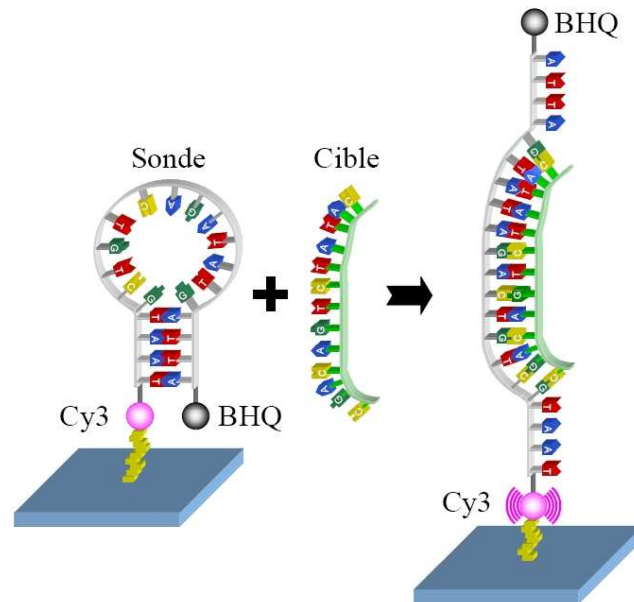


FIG. 1.9 – Méthode FRET. Les balises moléculaires sont initialement fermées, il y a alors transfert d'énergie du premier marqueur vers l'accepteur (*Black Hole Quencher*, noté BHQ sur le schéma) : aucun signal n'est détecté. Lorsque la balise est ouverte sous l'action de l'hybridation de la cible sur la sonde, le transfert d'énergie entre les deux marqueurs est stoppé : il y a fluorescence du donneur (voir la thèse de E. Vnuk [1]).

cence en image. Le système est dit ponctuel, car il ne récupère que la fluorescence d'une zone correspondant à la surface éclairée par le laser. Pour imaginer l'ensemble de la surface, il est nécessaire de déplacer soit le système optique, soit la puce elle-même. La gestion des déplacements est assurée par ordinateur.

- L'imageur (système global) utilise une caméra CCD et, dans la majorité des cas, une source polychromatique. L'utilisation d'une caméra CCD présente l'avantage de disposer d'une surface d'acquisition plus grande que celle du scanner (cette surface étant fonction de la taille du capteur CCD), ce qui permet de réduire sensiblement les temps d'acquisition. De plus, avec un imageur, il n'y a pas besoin d'adapter la source lumineuse au fluorophore adopté. Cependant, l'utilisation d'une caméra ne permet pas d'être aussi sensible que les scanners et pose des problèmes sur l'homogénéité de l'éclairage.

Étant donnée la quantité d'information délivrée par les biopuces par les deux méthodes précédentes, ce sont des logiciels qui interprètent la luminosité de chaque point de la puce. Ils permettent non seulement une rapidité d'analyse, mais aussi une excellente fiabilité dans l'interprétation. Ces logiciels font partie intégrante du processus d'automatisation requis par de tels systèmes d'analyse rapide. Parmi ceux-ci, on pourra citer : ScanAlyse (Stanford), QuantArray

(GSI Lumonics), Imagene (Biodiscovery Ltd), De manière générale, chaque constructeur fournit avec son scanner ou son imageur un logiciel permettant de quantifier et de qualifier une hybridation sur puce. Il existe aussi des solutions gratuites développées par des universitaires [1].

Des systèmes de lecture sans marquage existent. Sans vouloir être exhaustif, on peut citer [13] :

- les systèmes sensibles aux variations de masse : l'utilisation de microbalances à base de cristal de quartz permet de détecter les faibles variations de poids sur une puce. Lorsqu'il y a hybridation sur un plot de sondes, sa masse varie et la pression exercée sur la microbalance modifie la fréquence d'oscillation d'un quartz, ce qui peut être facilement détecté par un dispositif électronique. Cette méthode est utilisée pour le suivi en temps réel de cinétiques [14][15].
- les mesures de topographie (microscopes à force atomique) [16].
- des techniques mesurant une variation de l'indice optique créé par la modification locale de la densité du milieu résultant de l'hybridation. La méthode la plus répandue est la SPR (Résonance de Plasmon de Surface) discutée en détails dans le chapitre 4. La détection par des techniques basées sur l'absorbance d'un rayon lumineux dans l'ultraviolet [17] ou l'infrarouge [18] a également été testé.
- détection électrochimique [19] [20] : l'hybridation d'un plot peut conduire à faire varier localement des grandeurs électrochimiques (la conductance, la capacitance) aisément détectables. Un autre exemple est l'utilisation d'indicateurs redox capables de reconnaître l'existence de duplex (brins appariés), et dont le rôle est alors de modifier l'amplitude d'un signal électrique. Bien évidemment, le choix d'un bon indicateur est alors primordial. Enfin, une voie de recherche actuelle est l'étude des variations d'électronégativité des brins (dues à certaines bases) par comparaison d'un courant électrique ante- et post- hybridation.

Toutes ces méthodes, qui ne nécessitent pas de marquage, ne sont pas très adaptées pour la lecture des puces à ADN qui regroupent plusieurs milliers de plots différents : elles sont plutôt utilisées dans le cadre de *biocapteurs* à ADN [13] (catégorie de MEMS pour Micro Electrical Mechanical Systems) constitués d'une micro-puce à ADN formée d'un nombre très restreint (voire un seul) type de sondes. Cette puce est couplée à un dispositif de détection intégré associé à un transducteur, qui transforme l'évènement biologique détecté en un signal électrique utilisable [21]. Comme la surface à sonder est restreinte, la détection est grandement facilitée, et le résultat du test est directement connu (affichage sur écran). De plus, les coûts de fabrication sont nettement moindres que dans le cas de puces à ADN. Toutefois, l'usage de biocapteurs à ADN ne peut être réservé qu'à une détection très ciblée de gènes.

Lab-on-a-chip

Aujourd'hui, un champ actif de recherche est l'intégration de la puce à ADN au sein d'un laboratoire sur puce (Lab-on-a-chip). Le but premier est d'avoir, regroupé sur un seul dispositif, tout le processus d'analyse depuis l'introduction de l'ADN du patient (salive, goutte de sang) jusqu'à l'interprétation du résultat. Ceci inclut nécessairement une chaîne d'étapes telle l'extraction de l'ADN, son amplification, son hybridation et la détection, le tout sur une plateforme microfluidique. La capacité de réaliser toutes ces étapes biologiques sur un seul dispositif promet de gros avantages en termes de rapidité, coût, consommation en réactifs/agents chimiques, contamination, efficacité et automatisation (plusieurs expériences pouvant être menées en parallèle).

Une telle miniaturisation de cet instrument d'analyse permettrait le transport facile de ce mini laboratoire intégré directement sur le lieu d'utilisation.

La réalisation de ces micro-laboratoires de la taille d'une carte de crédit repose sur les technologies de la microfabrication et l'intégration de micromachines, comme déjà souvent utilisée dans l'industrie des semi-conducteurs. Des appareils sophistiqués ont été fabriqués avec des pompes, vannes, dispositifs de chauffage, filtres... le long d'un réseau microfluidique, les volumes transportés étant de l'ordre du nanolitre.

À titre d'exemple, l'étape d'amplification de l'ADN par PCR a déjà été réalisée sur un laboratoire sur puce au Livermore National Laboratory [22] : le dispositif repose sur un flux continu de matériel à amplifier au travers de 3 cavités contrôlées en température, permettant la dénaturation sélective de l'ADN suivi de sa synthèse semi-conservative. Sur ce type de dispositif, le flux est assuré par électro-osmose, ce qui réduit le nombre de dispositifs mécaniques (pompes et vannes). D'autres dispositifs permettent déjà de séparer de l'ADN. Par exemple, Wooley et al. [23] ont décrit un système de micro-laboratoires reposant sur le principe de l'électrophorèse qui permet de séparer 12 longueurs différentes de séquences d'ADN en parallèle avec une résolution de 10 bp (bp = *base pair*, paire de bases en anglais). Le premier dispositif commercial à intégrer ce système fut le HP2100 Bioanalyser (Hewlett-Packard).

Aujourd'hui, Affymetrix et Agilent (filiale de Hewlett-Packard) sont les deux grandes firmes qui commercialisent des systèmes qui ressemblent le plus à de véritables laboratoires d'analyse d'ADN sur puce.

1.2.3 Les grandes applications

Les puces à ADN servent à la *détection* rapide et en masse de séquences génétiques particulières permettant ainsi de rechercher la présence ou non de séquences responsables de maladies génétiques, d'agents infectieux (virus, bactéries), ... Cependant, ce n'est pas leur seule utilité.

L'une des utilisations les plus significatives des puces à ADN est la *détermination* de l'expression génétique à grande échelle. Par exemple, le génome de *Saccharomyces cerevisiae*, levure chimique utilisée depuis l'aube de l'humanité dans l'élaboration du pain, du vin et de la bière, a été entièrement décrit en 1996 grâce aux puces à ADN. Ce fut le premier eucaryote dont le génome a été séquencé. Son génome de 16 chromosomes est composé de 13 millions de paires de bases et de 6 275 gènes. On estime que cette levure partage 23 % de son génome avec l'Homme. Plus proche de nous, le "Human Genome Project", projet d'envergure internationale, a consisté à décrypter le génome complet de l'être humain : ce projet pharaonique (car il représente le séquençage de presque 3 milliards de bases), initié en 1990 par les USA et aidé des communautés scientifiques de Chine, France, Allemagne, Japon, et Grande-Bretagne, fut complètement achevé en 2003. Cette banque de donnée représente aujourd'hui une avancée remarquable en vue de futurs progrès en médecine et dans bien d'autres domaines de la santé (anatomie, etc.). Relevant du domaine public, tous les résultats de ces séquençages sont regroupés dans la banque mondiale du gène "GenBank".

Les puces à ADN servent également à détecter les changements accidentels dans les séquences génétiques (mutations) : en effet, puisque ces puces sont capables de détecter la présence de séquences spécifiques (gènes, virus), elles sont aussi capables de détecter leur absence ou leur modification. L'une des applications majeures est la détection de cancers : une cellule cancéreuse

Base de donnée	Nb de puces disponibles	Séquences détectables	Date des données
Gene Expression Omnibus - NCBI	8094	205148	Mars 2008
Stanford Microarray database	12742		Avril 2007
UPenn RAD database	100	2500	Septembre 2007
UNC Microarray database	31	2093	Avril 2007
MUSC database	45	555	Avril 2007
ArrayExpress (EBI)	3798		Mars 2008
caArray (NCI)	41	1741	Novembre 2006
UPSC-BASE	100		Novembre 2007
Gemma	612	24513	Mars 2008

TAB. 1.2 – Les banques de données de gènes.

est, à la base, une cellule ayant subi une mutation de son ADN. Comme le propre d'une cellule est de se multiplier, la transmission de cet ADN malin par réplication s'effectue dans toutes les cellules filles : c'est la formation de la tumeur. Ce principe est aussi utilisé dans la recherche pharmacologique pour étudier l'influence de médicaments sur une cellule ou un groupe de cellule, et ainsi conclure sur son efficacité ou sa toxicité.

Aujourd'hui, un certain nombre de gènes sont connus pour leurs fonctions (chez la souris, les levures, cochons, virus, ...). Ces données font l'objet de protocoles de tests sur puces à ADN. Le tableau 1.2 regroupe les tests disponibles à ce jour. Dans le monde, des sociétés comme Affymetrix, Agilent Technologies, CombiMatrix, Eppendorf ou Nanogen (liste non exhaustive) fabriquent et commercialisent la technologie des puces à ADN.

Pour finir, on peut rajouter que les puces à ADN sont également utilisées dans l'agro-alimentaire (contrôle des organismes génétiquement modifiés) ou dans le domaine de l'environnement (traitement des eaux : détection de bactéries).

1.2.4 Séquençage de l'ADN

Comme nous l'avons vu, l'information génétique d'un être vivant est complètement contenue dans son ADN qui en est son support. Cette information est codée sous la forme d'une séquence des quatre bases élémentaires A, T, C et G. On appelle *séquençage* de l'ADN la détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Le premier séquençage fut réalisé bien avant l'arrivée des puces à ADN, simultanément par Gilbert [24] aux USA et par l'équipe de Sanger (Grande-Bretagne) [25] en 1977 selon deux techniques cousines. Ces deux techniques furent utilisées pendant plus de 25 ans, subissant quelques améliorations, puis furent adaptées en vue d'une d'automatisation. Pour cette découverte, Gilbert et Sanger ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 1980. Pour mieux comprendre pourquoi les puces à ADN ont révolutionné la médecine à partir de la deuxième moitié des années 90, il faut bien comprendre comment le séquençage était réalisé jusque là.

Méthode de Sanger

C'est la méthode la plus utilisée pour le séquençage de l'ADN [25]. À partir du monobrin à analyser, on peut réaliser la synthèse du monobrin complémentaire par une technique de synthèse enzymatique sélective. La synthèse est amorcée (grâce à une amorce marquée) et grâce à des enzymes appelées ADN polymérases, elle permet de synthétiser le brin complémentaire, nucléotide par nucléotide, toujours dans le sens 5' vers 3', grâce aux quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) libres en solution (une amplification préalable par PCR est nécessaire).

Or, une synthèse s'arrête si à la place d'un désoxyribonucléotide de type dATP (respectivement dCTP, dGTP et dTTP) se fixe spécifiquement un didésoxynucléotide de type ddATP (respectivement ddCTP, ddGTP et ddTTP) qui agissent comme des "poisons" terminateurs de chaîne : une fois incorporés et associés au brin à analyser, ils empêchent la prolongation de la synthèse du brin complémentaire amorcé.

L'idée (géniale) de Sanger a été de mener en parallèle quatre expériences de synthèse en incluant dans chacune, en plus du brin à séquencer et des quatre "briques" élémentaires (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), un seul des quatre terminateurs en petite quantité. Ces terminateurs vont alors statistiquement pouvoir se fixer sur n'importe quelle base complémentaire du brin original ce qui stoppera à cet endroit la synthèse du brin complémentaire. On obtient alors dans chaque expérience des brins de longueurs différentes, mais se terminant tous par le terminateur associé. Ainsi, l'ensemble de ces quatre expériences regroupe globalement comme produits formés des brins synthétisés de toutes les longueurs possibles (de 1 nucléotide jusqu'au nombre de nucléotides du brin à analyser). Il suffit alors d'analyser le produit de ces quatre expériences par électrophorèse (sachant que plus un brin est long, plus il a de mal à migrer) et d'interpréter les quatre résultats pour reconstituer la séquence complète du brin à analyser.

À titre d'exemple, prenons le cas de la séquence à analyser (donc inconnue au premier abord) : 5' CGAATCCTT 3'. Tout d'abord cette séquence est sélectionnée et multipliée un grand nombre de fois par PCR (Polymerase Chain Reaction). Il faut choisir ensuite astucieusement l'amorce (marquée historiquement par un traceur radioactif, fluorescent aujourd'hui) pour que la synthèse enzymatique débute bien par la séquence CG... Une fois cette amorce (noté M^*) introduite dans le milieu réactionnel, on ajoute les briques nécessaires à la synthèse : dATP (=A), dCTP (=C), dGTP (=G) et dTTP (=T). Pour l'échantillon n° 1, on ajoute en faible quantité le terminateur ddATP (noté A). De cette réaction, il résulte la formation d'un ensemble de brins marqués de longueur variable, complémentaires à la séquence à analyser, se terminant tous par A : M^* -GCTTA, M^* -GCTTAGGA et M^* -GCTTAGGAA. En faisant une 2^e expérience en tout point identique, mais en ajoutant de la ddCTP (noté C) à la place de ddATP, on obtient dans ce cas le brin M^* -GC seulement. Pour la troisième expérience avec ddGTP (G), on obtient l'ensemble des brins : M^* -G, M^* -GCTTAG et M^* -GCTTAGG. Dans la dernière expérience, avec ddTTP (T), il se forme les brins : M^* -GCT et M^* -GCTT. Quelle que soit l'expérience, on a donc globalement toutes les longueurs de brins possibles. Après réalisation de 4 électrophorèses, on obtient (pour cet exemple) le résultat de la figure 1.10. Ces électrophorèses doivent être capables de séparer un fragment d'ADN de n bases de celui de $n + 1$ bases : on utilise couramment des gels comme support de ces électrophorèses. Les marqueurs sont alors révélés et la séquence du brin synthétisé se lit directement sur le résultat de l'électrophorèse. Le brin original (à déterminer) se déduit simplement par complémentarité $A \leftrightarrow T$ et $C \leftrightarrow G$.

Sur la figure 1.11, on montre le résultat d'un séquençage réalisé par Sanger et al. ainsi qu'un

autre plus moderne réalisé par un séquenceur automatique selon la même technique⁵. Initialement, la méthode de Sanger nécessitait de disposer d'un ADN simple brin qui servait de matrice pour la synthèse enzymatique du brin complémentaire. Pour cette raison, le premier organisme biologique dont le génome a été séquencé en 1977 a été le virus bactériophage X174. Ce virus a la propriété d'avoir un génome constitué d'ADN simple brin qui est encapsulé dans la particule virale. Au cours des 25 années suivantes, cette méthode s'est perfectionnée avec l'avancée technologique (introduction de marqueurs fluorescents à la place de marqueurs radioactifs, adaptation de la technique de PCR, utilisation de séquenceurs automatiques de gènes, utilisation de nouvelles formes d'électrophorèses, ...).

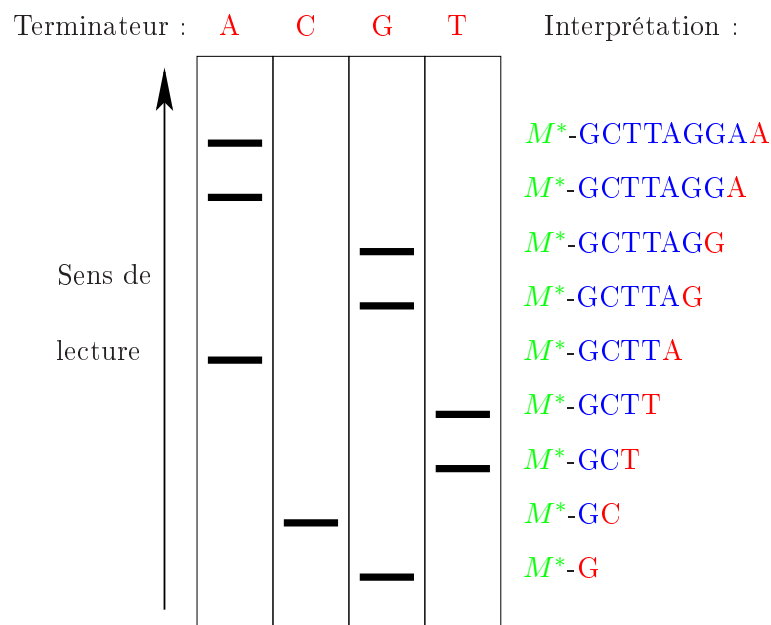


FIG. 1.10 – Électrophorèse sur gel d'après la méthode de séquençage de Sanger. Chaque bande résulte du produit de l'une des 4 expériences nécessaires à cette méthode. La lecture de cet électrophorèse indique que la séquence complémentaire GCTTAGGAA a été synthétisée et que, par complémentarité, la séquence inconnue était donc CGAATCCTT.

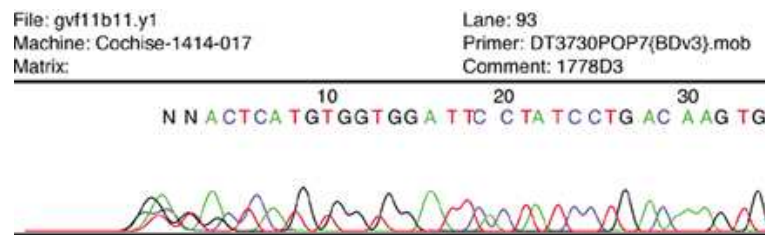
Méthode de Maxam et Gilbert

Cette méthode, bien qu'opposée à celle de Sanger, est philosophiquement très proche [24]. Elle est basée sur la dégradation chimique sélective de l'ADN et utilise les réactivités différentes des quatre bases A, T, G et C pour réaliser des coupures sélectives. La séquence à analyser est d'abord marquée à son extrémité 5' par un marqueur radioactif, le phosphore ^{32}P . Le grand génie de Maxam et Gilbert et d'avoir pu mettre au point 4 réactifs capables, dans des conditions particulières, de couper respectivement des séquences de monobrins en {G}, {A ou G}, {C ou T} et {C}. Ces différentes réactions sont faites dans des conditions très ménagées. On réalise alors

⁵Source : National Human Genome Research Institute
http://www.genome.gov/Images/EdKit/bio1a_large.gif



(a)



(b)

FIG. 1.11 – a) Autoradiogrammes obtenus par Sanger et al. en 1977 b) Résultat donné par un séquenceur automatique en 2004. Chaque couleur correspond à l'une des 4 expériences de base. Seule la première trentaine de séquences est représentée, mais le diagramme complet fait presque 600 bases. Notez l'amorce marquée NN en début de chaîne.

quatre expériences avec chacun des réactifs dégradants, permettant au total tous les clivages possibles. Les conditions expérimentales sont telles qu'un seul nucléotide de la molécule est dégradé. Une analyse par électrophorèse, identique à celle de Sanger, permet de déterminer directement les séquences à analyser.

Par exemple, prenons le cas de notre séquence inconnue CGAATCCTT. La sélection, l'amplification par PCR et le marquage au phosphore donne une grande quantité de ^{32}P -CGAATCCTT que l'on divise en 4 échantillons. Dans le premier, on ajoute à ces brins le réactif capable de couper sélectivement en G : à la fin de la réaction, il y a donc uniquement les brins marqués ^{32}P -CG dans l'échantillon. Dans le second, en ajoutant le réactif capable de dégrader les brins au niveau A ou G, on obtient en fin de réaction l'ensemble de brins : ^{32}P -CG, ^{32}P -CGA et ^{32}P -CGAA. Dans le troisième échantillon, avec le troisième réactif de dégradation sélective (coupure en C ou T), on obtient ^{32}P -CGAAT, ^{32}P -CGAATCCT et ^{32}P -CGAATCCTT, ^{32}P -C, ^{32}P -CGAATC et ^{32}P -CGAATCC. Enfin, avec le dernier réactif (coupure au niveau de C), on obtient dans le quatrième échantillon du ^{32}P -C, ^{32}P -CGAATC et du ^{32}P -CGAATCC. Un exemple d'électrophorèse sur phase gélifiée est montrée figure 1.12. Après révélation des marqueurs, la lecture du résultat de l'électrophorèse donne directement la séquence du fragment inconnu.

L'inconvénient de cette méthode, c'est qu'elle utilise des réactifs chimiques toxiques et reste limitée quant-à la taille des fragments d'ADN qu'elle permet d'utiliser (<250 nucléotides). Moins facile à robotiser, son usage est devenu aujourd'hui confidentiel.

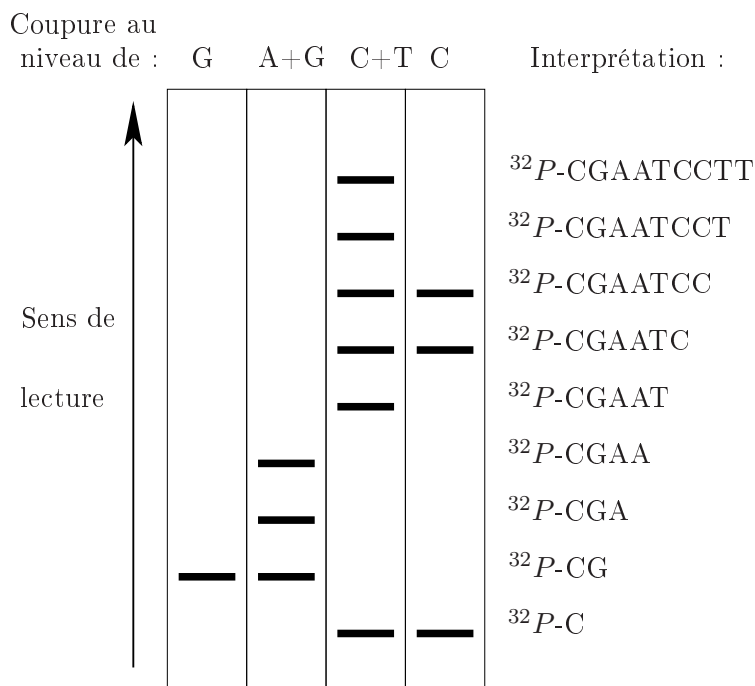


FIG. 1.12 – Électrophorèse sur gel d'après la méthode de séquençage de Maxam et Gilbert. Chaque bande résulte du produit de l'une des 4 expériences nécessaires à cette méthode. La lecture de cet électrophorèse indique *directement* que la séquence CGAATCCTT était la séquence à analyser.

Comparaison avec les puces à ADN

Nous comparons dans le tableau 1.3 la technique de séquençage historique par électrophorèse (encore utilisée aujourd'hui dans certains laboratoires pour déterminer des emprunts génétiques) avec la technique moderne des puces à ADN. Les avantages apportés par les biopuces sont flagrants : grâce aux milliers de détecteurs réalisés en parallèle grâce à celles-ci, le gain de temps réalisé pour un séquençage est exponentiel ! Par ailleurs, les manipulations opératoires dans le cas des puces sont moins nombreuses et moins complexes que celles nécessaires pour l'électrophorèse. Enfin, les puces à ADN sont beaucoup plus aptes à détecter des *mutations point* (des brins qui ne diffèrent entre eux que de seulement une ou quelques bases au maximum) que les autres techniques de séquençage qui sont moins fiables pour ce type de mutation. De même, lorsqu'un gène comporte une séquence composée de la répétition du même nucléotide un grand nombre n de fois, le risque d'erreur sur la détermination de n est grand. Par contre, les puces à ADN nécessitent une technologie de pointe pour la fabrication et l'analyse de résultat, ce qui explique leur arrivée tardive dans le domaine de la recherche génique.

Conclusion : Les puces à ADN couvrent un large domaine technologique puisqu'il faut non seulement réussir à fabriquer des sondes, les fixer, mais aussi réussir à détecter l'hybridation de cibles et faire appel à des algorithmes du traitement du signal pour interpréter les résultats de l'hybridation. Cela suppose de larges connaissances en biologie moléculaire, micro-fabrication avancée, traitement chimique de surface, chimie analytique, logiciels, robotique, automatique Le champ de connaissance pour maîtriser la technologie des puces à ADN est donc très vaste.

1.3 Le mélange en microfluidique

Pour obtenir une réponse de puce à ADN la plus fiable possible, chaque sonde doit pouvoir être testée par chaque cible présente dans la solution à analyser. Un deuxième critère requis par ce type de technologie est la rapidité avec laquelle on doit obtenir la réponse du système : une puce à ADN doit idéalement pouvoir être lue quelques minutes après l'injection de l'ADN à analyser. La technique classiquement utilisée est de laisser diffuser l'ADN libre sur la puce. Cependant, cette façon d'opérer ne marche pas bien dans la pratique, car la seule diffusion ne permet pas d'obtenir **rapidement** un mélange **homogène**. En effet, malgré les faibles dimensions des puces (typiquement $\ell = 1$ cm) et compte-tenu du coefficient de diffusion de l'ADN dans l'eau D , qui est de toutes façons beaucoup plus faible que 10^{-5} cm².s⁻¹ (coefficient de diffusion de l'eau dans l'eau!), le temps caractéristique de diffusion de l'ADN sur la surface de la puce est forcément largement supérieur à $\tau_D = \ell^2/D \approx 30$ h, ce qui est incompatible avec l'objectif de quasi-instantanéité de la réponse. De plus, la condition d'homogénéité n'est pas nécessairement vérifiée. Un processus de mélange doit donc ainsi être mis au point pour améliorer les performances de ces puces.

1.3.1 Mélange et Microfluidique

Le mélange

Définissons tout d'abord ce qu'est le mélange : si A et B sont deux constituants miscibles l'un dans l'autre, on dit que le mélange dans un domaine \mathcal{D} est bien réalisé si, au bout d'un certain temps, la concentration de A dans B est sensiblement la même en tout point de ce domaine (voir la

Méthode de séquençage	Méthode historique de Sanger ou Maxam & Gilbert	Puces à ADN
Préparation de l'analyte :	<ul style="list-style-type: none"> - sélection des séquences à analyser par PCR - amplification des séquences à analyser par PCR - dénaturation des brins - éventuellement : séparation des brins complémentaires - marquage 	<ul style="list-style-type: none"> - amplification par PCR - dénaturation des brins - découpage des séquences - marquage
Protocole expérimental :	<ul style="list-style-type: none"> - traitement chimique pour clivage ou synthèse sélective - électrophorèse - interprétation manuelle ou robotisée 	<ul style="list-style-type: none"> - injection de l'analyte sur la puce - interprétation informatique
Durée de réaction :	<ul style="list-style-type: none"> - en dizaine d'heures - la migration par électrophorèse est le facteur limitant 	<ul style="list-style-type: none"> - en dizaine d'heures aujourd'hui, mais durée pouvant être nettement raccourcie par différents précédés (mélange chaotique) - la diffusion est le facteur limitant
Rendement :	<ul style="list-style-type: none"> - 1000 bases au maximum à la fois 	<ul style="list-style-type: none"> - jusqu'à 4 génomes entiers (10^9 bases) à la fois
Lecture du résultat :	<ul style="list-style-type: none"> - par fluorescence induite ou radiographie 	<ul style="list-style-type: none"> - fluorescence induite - autres méthodes plus complexes
Avantages :	<ul style="list-style-type: none"> - permet de comparer facilement une empreinte génétique à un échantillon de référence (enquêtes judiciaires) - technologie simple 	<ul style="list-style-type: none"> - permet de suivre l'évolution d'une séquence génétique - permet un suivi en temps réel
Inconvénients :	<ul style="list-style-type: none"> - réactifs spécifiques - pas de mesure quantitative (seulement qualitative) 	<ul style="list-style-type: none"> - fabrication de la puce en amont - pas de mesure quantitative (seulement qualitative)

TAB. 1.3 – Comparaison des différentes techniques de séquençage.

figure 1.13). Ainsi, bien mélanger nécessite non seulement un processus d'agitation (ou advection), qui permet de transporter mécaniquement les particules fluides pour les distribuer de manière uniforme, mais également un processus de diffusion qui lisse les gradients de concentration créés par l'agitation. Si l'on note ℓ la longueur caractéristique du système, U la vitesse caractéristique et D le coefficient de diffusion moléculaire, le temps caractéristique de diffusion est $\tau_D = \ell^2/D$, alors que le temps caractéristique d'advection est $\tau_U = \ell/U$. Le rapport de ces deux temps forme le nombre de Péclet :

$$Pe = \frac{U \ell}{D} \quad (1.1)$$

Si $Pe < 1$, les effets diffusifs sont prédominants. Cependant, dans la plupart des écoulements usuels, compte-tenu des faibles valeurs de D , on a $Pe \gg 1$. Il est donc nécessaire de brasser le fluide efficacement pour obtenir un bon mélange.

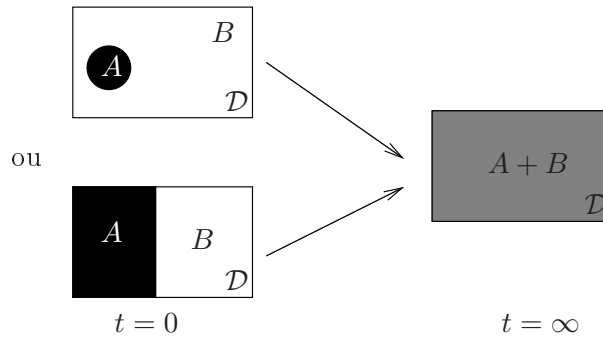


FIG. 1.13 – Définition du mélange.

Plaçons-nous dans le cas des écoulements laminaires et négligeons l'effet de la diffusivité moléculaire dans un premier temps pour ne regarder que le processus d'agitation, comme nous le ferons dans le chapitre suivant : par essence, le mélange est un processus lagrangien, c'est à dire qu'il s'intéresse aux trajectoires des particules fluides, et non au champ des vitesses qui les a créées. Une agitation sera efficace si deux particules fluides finissent par être séparées au bout d'un certain temps : ce problème de sensibilité aux conditions initiales est connu sous le nom de *chaos*. Ainsi, même un champ de vitesse laminaire (plan ou tridimensionnel) bien choisi peut engendrer du chaos, donc une agitation – au moins localement – efficace.

Dans le cas des écoulements plans (cf. chapitre suivant), la condition d'incompressibilité implique l'existence d'une fonction $\psi(x, y, t)$ appelée fonction de courant, telle que :

$$\begin{cases} v_x = \frac{dx}{dt} = \frac{\partial \psi}{\partial y} \\ v_y = \frac{dy}{dt} = -\frac{\partial \psi}{\partial x} \end{cases} \quad (1.2)$$

On reconnaît dans le système précédent un système Hamiltonien, dont le Hamiltonien est ψ et l'espace des phases est le plan de l'écoulement (x, y) . Dans le cas d'un écoulement stationnaire ($\psi = \psi(x, y)$), les trajectoires définies par :

$$\frac{dx}{v_x} = \frac{dy}{v_y} = dt \quad (1.3)$$

vérifient alors :

$$v_x dy - v_y dx = \frac{\partial \psi}{\partial y} dy + \frac{\partial \psi}{\partial x} dx = d\psi = 0 \quad (1.4)$$

soit encore :

$$\psi = \text{constante} \quad (1.5)$$

Les trajectoires sont donc confondues avec les lignes de courant, et sont bien définies dans l'écoulement : deux trajectoires très proches dans l'écoulement restent proches au cours du temps. Pour obtenir une dépendance aux conditions initiales dans un écoulement plan incompressible, il apparaît donc nécessaire que cet écoulement soit *instationnaire*. Le plus simple est alors de choisir un écoulement périodique en temps : en effet, d'une part, d'un point de vue expérimental, il est aisé de créer des signaux périodiques qui actionneront le mécanisme choisi, d'autre part, d'un point de vue théorique, l'utilisation d'un champ de vitesse périodique permet de "simplifier" le problème mathématique par l'introduction d'outils tels que la section et l'application de Poincaré [26] (voir paragraphe suivant). Les trajectoires dites *chaotiques* se séparent alors exponentiellement vite au cours du temps, ce qui permet d'assurer une bonne dispersion des molécules. C'est Aref [2] qui a le premier fait le parallèle entre le chaos dans les systèmes Hamiltoniens et la possibilité de mélanger dans les écoulements laminaires ; il a nommé ce processus : "*advection chaotique*".

En fait, on peut montrer que ces processus périodiques agissent comme l'étirement et le repliement répété du fluide : Wiggins et Ottino [27] insistent beaucoup sur leur importance : "The message is clear. Squeezing, stretching and folding fluid is good for mixing.". Bien que la "transformation du boulanger" (fig. 1.14) soit la méthode la plus efficace, elle se heurte au problème de la discontinuité du champ des vitesses devant "couper" le fluide. Le modèle souvent adopté dans les systèmes fluides, presque tout aussi efficace que le précédent, est celui de la technique du "fer à cheval" (fig. 1.15). Ces deux transformations font partie de la grande catégorie des transformations dites "Link Twist Map" [28].

La conséquence de ces nombreux étirements/repliements sont la formation de stries (ou lamelles) de plus en plus fines avec le temps, jusqu'à atteindre une épaisseur pour laquelle les effets de la diffusion moléculaire deviennent non négligeables.

La microfluidique

On regroupe sous l'appellation *microfluidique* [29, 30] les écoulements qui ont lieu à petite échelle (une des dimensions caractéristiques ℓ' plus petite ou de l'ordre du mm). Compte-tenu des faibles dimensions et des faibles vitesses en microfluidique, il est clair que le nombre de Reynolds, défini par $Re = U\ell'/\nu$ où U est une vitesse et ν est la viscosité cinématique du fluide, sera petit. Or nous savons maintenant qu'il est quand même possible d'obtenir un bon mélange grâce à l'"advection chaotique".

Compte-tenu des faibles vitesses et des faibles dimensions, le nombre de Péclet est beaucoup plus faible que dans les écoulements usuels. Pourtant, les effets diffusifs restent insuffisants pour assurer à eux seuls un mélange efficace, faisant de l'advection chaotique l'outil indispensable de mélange en microfluidique.

La microfluidique connaît actuellement un essor important grâce au développement des microtechnologies telles que les puces à ADN, ou plus généralement les MEMS (Micro Electrical Mechanical Systems) utilisant des écoulements fluides. Les domaines utilisant la microfluidique sont

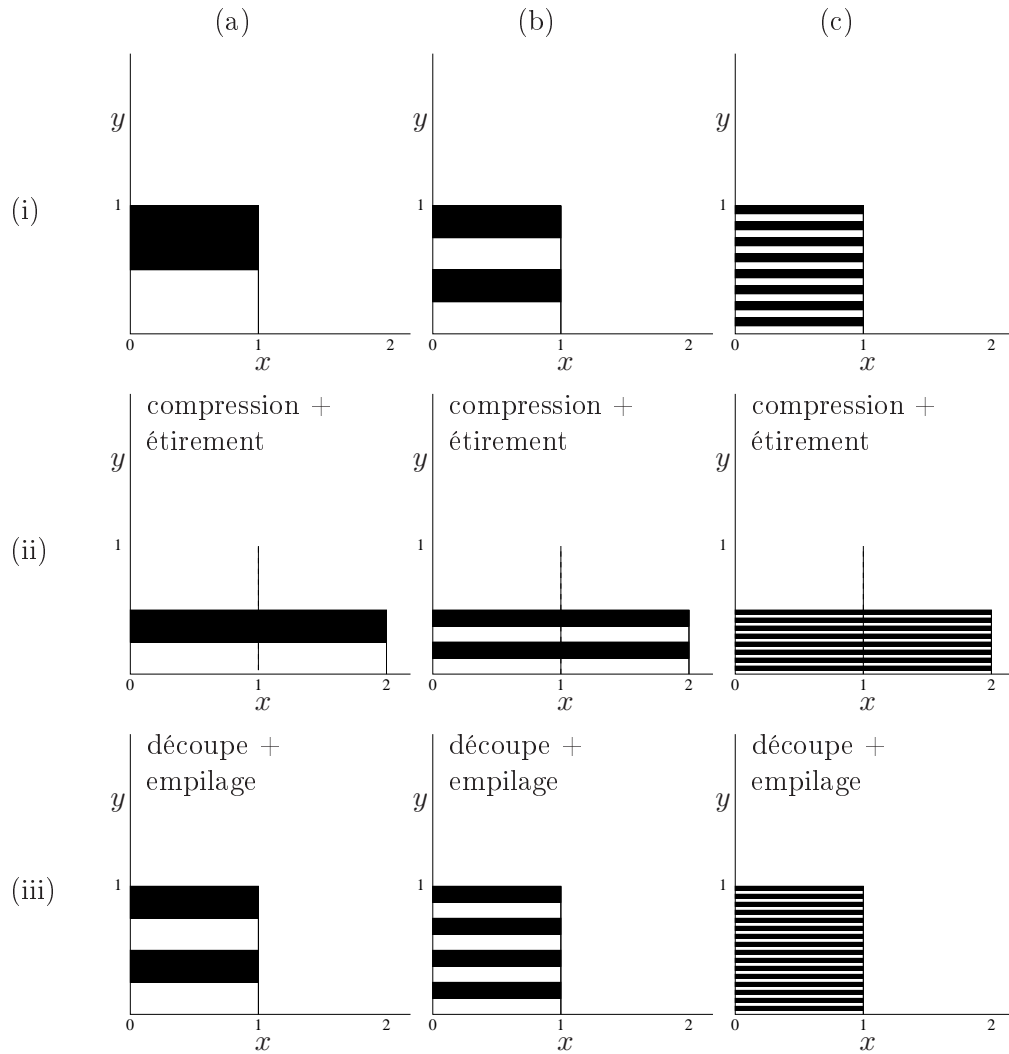


FIG. 1.14 – Transformation du boulanger. (a) Première itération d'une transformation du boulanger dans le carré unité : (i) supposons qu'au commencement, une demi-portion du carré soit noire, l'autre blanche. Le carré est comprimé, étiré (ii) puis découpé et remplié (iii). (b) Deuxième itération et (c) quatrième itération. Entre le début de la première itération et la fin de la quatrième, l'interface noir/blanc a été multipliée par 16.

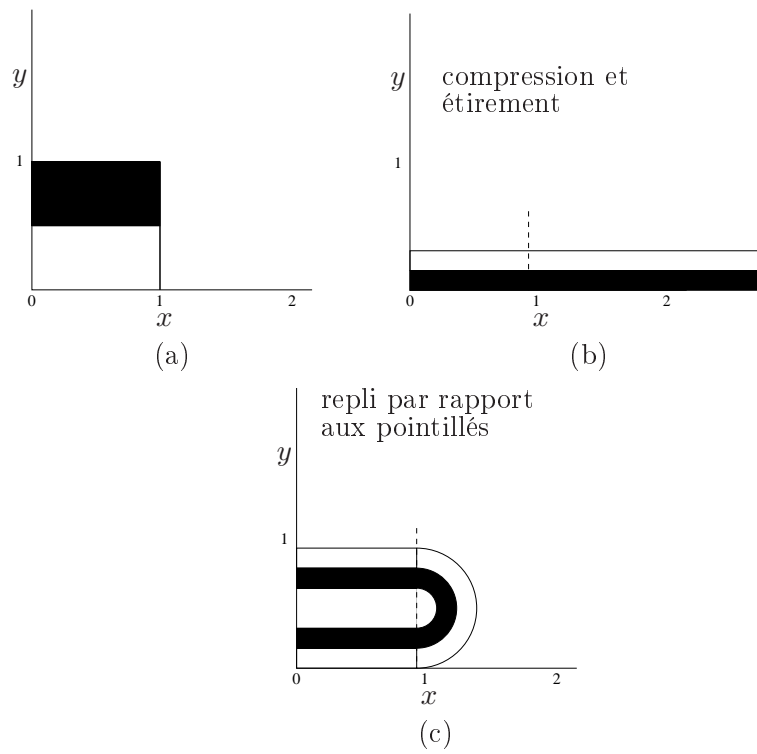


FIG. 1.15 – Transformation type "fer à cheval" dans un carré unitaire. Le carré unitaire (a) est étiré (b) puis replié (c). Lors de chaque transformation, l'interface blanc/noir a été multipliée par 2.

nombreux : chimie analytique, synthèse en chimie organique (micro-réacteurs), micro-biologie ... : une bonne maîtrise des écoulements microfluidiques passe donc par la bonne compréhension de leur comportement à ces petites échelles.

1.3.2 Les outils du chaos

Application et sections de Poincaré

Pour un écoulement **périodique**, l'*Application de Poincaré* est définie par la fonction f qui à la position d'une particule à un instant t , associe la position de cette même particule une période T du système plus tard, à l'instant $t + T$:

$$\begin{array}{ccc} \mathbb{R}^2 & \xrightarrow{f} & \mathbb{R}^2 \\ \vec{x}(t) & \rightarrow & \vec{x}(t + T) \end{array}$$

Dans le cadre des écoulements bidimensionnels, on appelle *section de Poincaré* (fig. 1.16) la représentation de l'ensemble des positions récursivement implémentée par l'application de Poincaré f . Il s'agit donc, pour une (ou plusieurs) position(s) initiale(s) $\vec{x}_0 = \vec{x}(t_0)$, de l'ensemble :

$$\{\vec{x} \in \mathbb{R}^2 \text{ tel que } \forall n, \vec{x} = f^n(\vec{x}_0)\} \quad (1.6)$$

Tous les points (ou positions) qui forment une section de Poincaré sont donc séparés d'une durée multiple de T : dans une section de Poincaré, on a donc une vision "stroboscopique" des trajectoires des particules. Une *trajectoire chaotique* apparaît alors comme un ensemble de points disséminés de manière aléatoire sur la section. Les zones non visitées par les particules sont alors synonymes de mauvais mélange : ces régions sont appelées en chaos Hamiltonien "zones elliptiques", ou "zones mortes" dans le cas du mélange ⁶.

Cette représentation offre plusieurs avantages :

- *réduction de la dimension* : la construction de l'application de Poincaré implique l'élimination d'au moins une des variables du problème, ce qui ramène à l'étude d'un problème à plus faible dimension. Dans le cas des écoulements 2D qui dépendent du temps (périodiques par exemple), c'est la dimension temporelle qui est supprimée.
- *dynamique globale* : une application de Poincaré fournit une image très parlante de la dynamique globale d'un système : on perçoit du premier coup d'œil les zones chaotiques ou zones de mélange et les zones régulières qui correspondent aux zones de non-mélange (fig.1.16).

⁶La section de Poincaré dépend de l'instant initial t_0 choisi. Cependant, si une section de Poincaré possède une zone morte, alors une section de Poincaré basée sur un instant initial différent en possède également une.

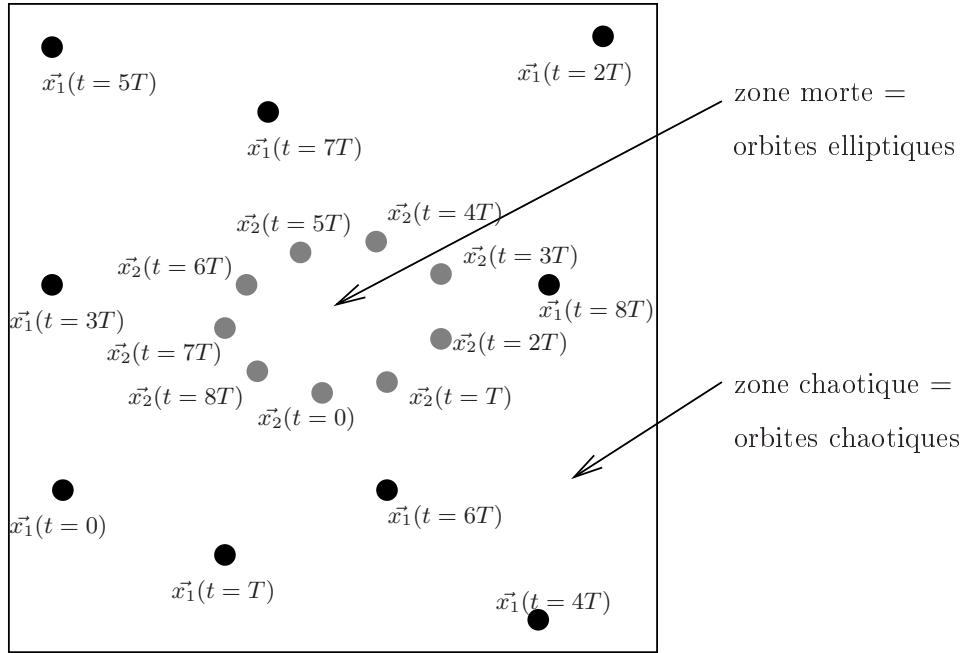


FIG. 1.16 – Une section de Poincaré regroupe les positions cumulées des particules fluides lagrangiennes espacées d'une durée T ($T =$ période du processus périodique). 2 types de zones coexistent : des zones de bon mélange (chaotiques) et des zones de mauvais mélange (zones mortes ou régulières).

Exposant de Lyapunov

Il est possible de caractériser le comportement chaotique d'un système dynamique grâce à l'exposant de Lyapunov, noté λ . Il est défini pour une position initiale \vec{x}_0 fixée par⁷ :

$$\lambda = \lim_{\|\vec{\delta}_0\| \rightarrow 0} \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \ln \left(\frac{\|\delta(\vec{t})\|}{\|\vec{\delta}_0\|} \right), \quad (1.9)$$

où $\vec{\delta}(t) = \vec{x}(\vec{x}_0 + \vec{\delta}_0, t) - \vec{x}(\vec{x}_0, t)$. Cet exposant, qui dépend *a priori* du point initial choisi, caractérise les propriétés d'étirement local d'un système (voir la figure 1.17). Il permet donc de donner une indication sur la sensibilité du système aux conditions initiales, selon la règle suivante :

⁷Dans la pratique, comme on regarde l'écoulement de manière stroboscopique, on calcule l'exposant de Lyapunov de l'application de Poincaré :

$$\lambda_p = \lim_{\|\vec{\delta}_0\| \rightarrow 0} \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \ln \left(\frac{\|f^n(\vec{\delta}_0)\|}{\|\vec{\delta}_0\|} \right). \quad (1.7)$$

On peut réécrire la relation 1.9

$$\lambda = \lim_{\|\vec{\delta}_0\| \rightarrow 0} \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{nT} \ln \left(\frac{\|f^n(\vec{\delta}_0)\|}{\|\vec{\delta}_0\|} \right). \quad (1.8)$$

soit : $\lambda = \lambda_p/T$.

1. si quel que soit la position initiale dans le domaine, l'exposant est positif, alors le système étudié est globalement chaotique,
2. s'il est toujours nul, alors le système n'est pas chaotique,
3. s'il est positif ou nul suivant la position initiale, alors le système étudié est partiellement chaotique (cas où il existe des zones mortes).

Pour appliquer ce principe au système, on met en œuvre le calcul de cet exposant dans le programme de simulation. La méthode de calcul est donnée dans l'annexe F.

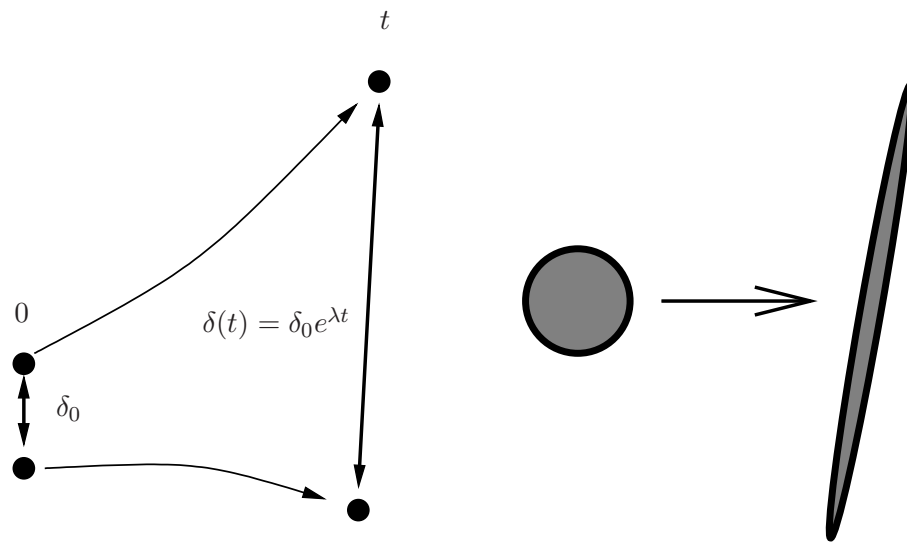


FIG. 1.17 – Sensibilité aux conditions initiales : dans un écoulement chaotique, deux particules voisines se séparent exponentiellement vite avec le temps et leur distance varie comme $\delta(t) = \delta_0 e^{\lambda t}$. λ est un taux d'étirement appelé coefficient de Lyapunov. Le fluide s'étire alors dans la direction d'étirement. λ dépend de la localisation des particules.

Taux de couverture

Le taux de couverture μ permet de quantifier l'étendue des zones chaotiques dans les sections de Poincaré. Notre calcul est basé sur un damier recouvrant toute la chambre d'écoulement, chaque case étant considérée comme pleine si elle contient au moins un point de la section de Poincaré. Lorsqu'on augmente le nombre de cases, la fraction de boîtes remplies tend vers un palier, avant de chuter vers 0. Seule la largeur de ce palier est affectée par le nombre de points dans la section, pas sa valeur qui correspond au taux de remplissage (fraction de cases remplies sur le nombre total de cases). Cette méthode a été testée avec succès sur de nombreuses configurations de sections de Poincaré remplies manuellement (i.e. dont le taux de remplissage est connu à l'avance). D'autres méthodes ont été étudiées, notamment celle de Phelps et Tucker [31]. Cependant, nous avons pu constater que cette dernière se révélait complètement inefficace dans le cas d'une densité variable de points dans les zones chaotiques.

Entropie de Kolmogorov-Sinai

Il est possible qu'un système chaotique puisse mélanger vite (étirer fort), mais seulement dans une zone localisée du domaine. Inversement, un système peut étirer très faiblement le fluide, mais sur un vaste domaine. Dans les 2 cas, le mélange n'est pas satisfaisant. Pour avoir une mesure représentative de l'efficacité globale du mélange, on calcule l'entropie de Kolmogorov-Sinai (*KS-entropy*) h_K , dont on peut montrer qu'elle est, sous certaines conditions, égale au produit du coefficient de Lyapunov λ par le taux de couverture μ [32]. Plus celle-ci est grande, plus le système est supposé mélanger globalement vite, alors qu'une entropie faible indique qu'il existe une déficience dans le mélangeur (en termes d'étirement ou d'étendue des zones chaotiques).

1.3.3 Les exemples de mélangeurs à advection chaotique dans la littérature

Les exemples de mélangeurs à advection chaotiques sont très nombreux dans la littérature, l'imagination des scientifiques étant débordante dans ce domaine (!). Les exemples présentés ci-dessous ont fait l'objet de simulations numériques et/ou études expérimentales. Dans tous les cas, l'écoulement se fait à faible nombre de Reynolds, en utilisant soit des fluides visqueux (encre dans de la glycérine par exemple), soit en réalisant des expériences à petite échelle (micro-mixers) [33][34]. La liste des dispositifs présentés ci-dessous ne serait être exhaustive mais illustre bien les grandes catégories de mélangeurs.

Expérience historique de H. Aref

Le premier système à advection chaotique a été celui étudié numériquement par Aref [2] en 1984. Il s'agit d'un agitateur formé de 2 vortex à l'intérieur d'une cavité circulaire (figure 1.18). Ces derniers sont activés alternativement et de façon périodique avec la même intensité, chacun pendant une durée $T/2$ où T est la période du processus. Le cycle est répété un certain nombre de fois (les deux sources de mouvement sont ici co-rotatives, mais on peut imaginer aussi qu'elles soient contra-rotatives). Pendant chaque demi-période, les écoulements sont considérés comme stationnaires (pas de régime transitoire) : les trajectoires des particules fluides sont donc confondues avec les lignes de courant. Cette alternance des 2 vortex permet de croiser les lignes de courant, créant ainsi le chaos qui a pour but de séparer les particules fluides, donc de mélanger.

Ce système très simple a naturellement servi de socle à l'étude de la théorie du mélange : étude quantitative du mélange par Jones [35] ou, avec un système très voisin, l'étude de l'efficacité de l'étirement par Raynal et Gence [36].

Système puits/source de S.W. Jones & H. Aref

Ce dispositif [3], dont nous allons nous inspirer dans cette thèse [37] [38] [39] [40] [41], utilise le principe d'injection/extraction alternée de fluide par 1 puits et 1 source (voir la figure 1.19). Comme pour le dispositif précédent, à un instant donné, seul le puits ou la source fonctionne : pendant 1 cycle de durée T , le puits et la source ont fonctionné successivement pendant $T/2$ chacun. Lorsque qu'une particule fluide est absorbée par le puits, elle est réinjectée par la source lors de la phase suivante, et ainsi plusieurs modes de réinjection peuvent être testés.

Nous ne sommes pas les seuls à nous être inspirés des dispositifs {puits + sources} : Stremler et al. [42] ont conçu un système d'injections alternées avec 2 puits et 2 sources dans une cavité

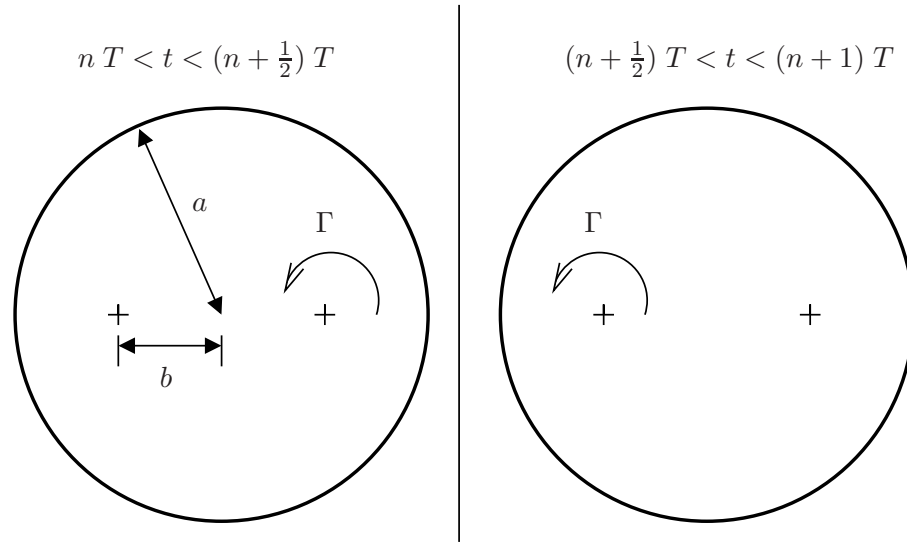


FIG. 1.18 – Dispositif d'advection chaotique d'Aref [2] basé sur l'utilisation alternée de vortex. Le dispositif périodique est réitéré plusieurs fois (n étant un entier, la période est T). Les deux paramètres sans dimension sont $\Pi_1 = \frac{b}{a}$ et $\Pi_2 = \frac{\Gamma T}{2\pi a^2}$, avec Γ l'intensité des vortex.

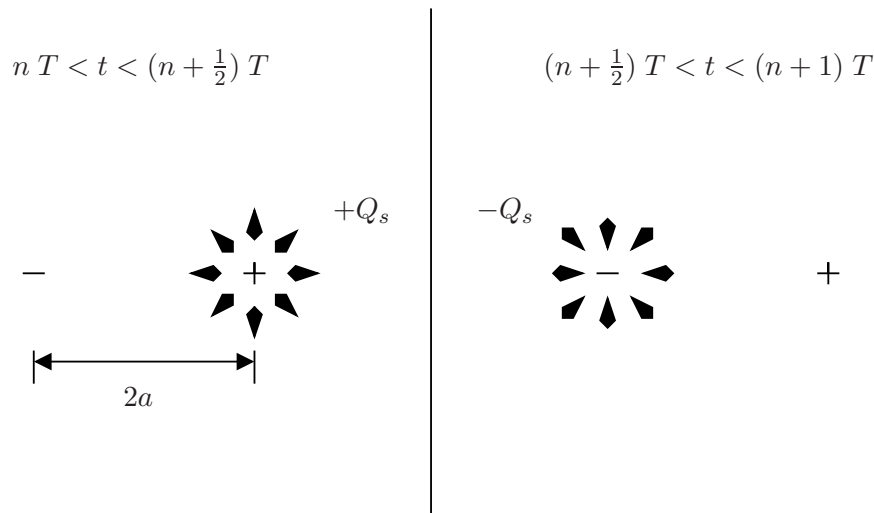


FIG. 1.19 – Dispositif d'advection chaotique de Jones et Aref [3] basé sur l'utilisation alternée d'un puits et d'une source. Les particules absorbées par le puits sont réinjectées par la source (les deux puits/sources ont même débit surfacique Q_s). Le dispositif périodique est réitéré plusieurs fois (période T). Le seul paramètre sans dimension du système est $\Lambda = \lambda/a$ où $\lambda = \sqrt{Q_s T / \pi}$ représente une distance caractéristique. Dans ce dispositif, il n'y a pas de frontières.

rectangulaire. Ce dispositif a été testé expérimentalement par McQuain et al. [43][44]. Hertzsch et al. [45] ont discuté quant-à-eux de l'influence de la position des puits et des sources dans la

chambre d'écoulement.

Frontières mobiles

L'étude de ce dispositif est essentiellement expérimentale. Chien et al. [46] ont mis au point un système de bandes mobiles formant 2 parois d'une cavité rectangulaire (voir la figure 1.20). La mise en mouvement des bandes entraîne le fluide par frottement visqueux et le caractère alterné du fonctionnement (une seule bande fonctionne à chaque instant) permet d'obtenir des trajectoires chaotiques et donc des étirements et replis du fluide (voir le résultat expérimental de la figure 1.21). Plusieurs types de fonctionnement sont étudiés (bandes co- ou contra-directionnelles, intermittence ou non, etc.). Le paramètre sans dimension gouvernant le chaos est le rapport entre le déplacement des parois pendant chaque demi-période sur la largeur W de la cavité.

Des dispositifs analogues basés sur des parties mobiles ont été étudié par exemple par Chaiken et al. [47], H. Aref [48][49], Aref et Jones [50], Kaper et Wiggins [51] ou Saadjan et al. [52] (cylindres excentrés ou ellipses confocales). D'autre auteurs se sont appuyés sur ce modèle pour mieux comprendre le chaos et son optimisation : Leong et Ottino [53], Franjione et al.[54].

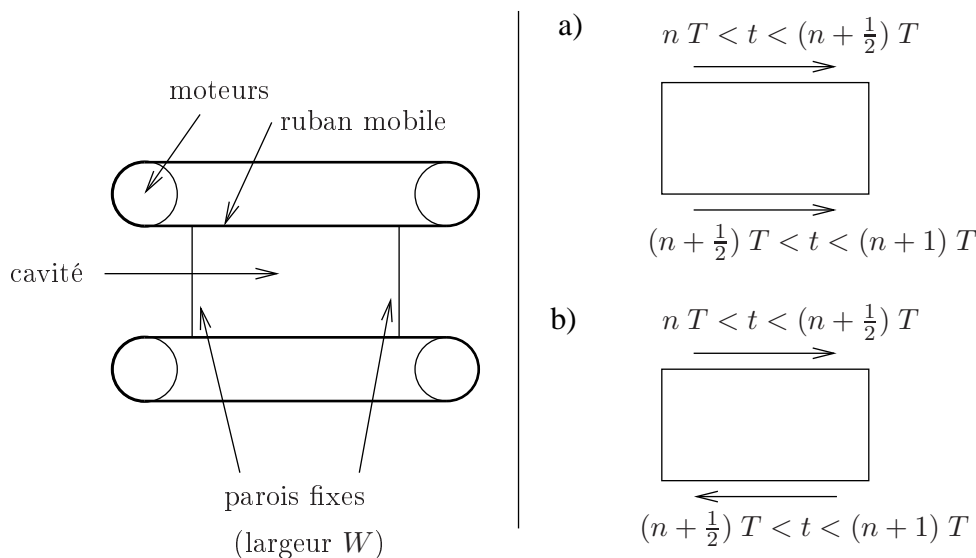


FIG. 1.20 – Un des nombreux dispositifs à parois mobiles de la littérature. Le mouvement du fluide est assuré par frottement visqueux. Les bandes peuvent être (a) co- ou (b) contra-directionnelles, elles fonctionnent le même laps de temps ($T/2$) mais leur vitesse peut être différente.

Mélange en cavité ouverte

Les mélangeurs en cavité ouverte font également partie d'une classe de mélangeurs à advection chaotique. Le travail de E. Guillard [5] est particulièrement intéressant : il s'agit de 2 batteurs (type "batteurs à oeufs") qui étirent le fluide, ce dernier étant contraint à se déplacer selon l'une des directions du plan de mélange (voir la figure 1.22). La zone active du mélangeur est constamment alimentée en fluide, et le produit du mélange est extrait en sortie.



FIG. 1.21 – État du mélange de deux marqueurs au bout de 20 périodes dans la chambre d'advection chaotique avec parois mobiles. Pour cette expérience, $Re = 1.2$ et les parois sont co-directionnelles. À l'instant $t = 0$, les traceurs n'étaient que deux petites taches orange et verte : on note bien pour $t > 0$ les nombreux étirements et replis réalisés par le mélangeur. On peut remarquer que pour ce jeu de paramètres, les deux traceurs ne se mélangent pas bien. Par contre, on pourrait montrer, en augmentant légèrement le temps de déplacement des rubans pendant chaque période, que le mélange pourrait être bien meilleur. D'après J.M. Ottino [4].

Mélange 3D

Les exemples présentés dans ce paragraphe ont tous pour ancêtre le "twisted pipe" de Jones *et al.* [55] qui étudièrent le mélange obtenu grâce à la répétition périodique d'une cellule élémentaire. D'autres dispositifs s'en sont inspirés, comme celui décrit par Amon *et al.* [56], Bringer [57], Castelain *et al.* [58].

Un dispositif de mélangeur 3D stationnaire est bien connu dans la théorie du chaos : il s'agit de l'écoulement ABC ou "ABC flows", pour Arnold Beltrami et Childress. C'est un mélangeur périodique en espace dont le champ des vitesses est donné par :

$$u_x = A \sin(z) + C \cos(y) \quad (1.10)$$

$$u_y = B \sin(x) + A \cos(z) \quad (1.11)$$

$$u_z = C \sin(y) + B \cos(x) \quad (1.12)$$

Les paramètres de ce type de mélangeur sont les constantes A, B et C. Ici, le temps n'est pas une dimension du système, puisque le système est par essence 3D périodique (il faut au moins 3 degrés de liberté pour pouvoir mélanger).

Un autre dispositif original est celui présenté par Ph. Carrière [6]. Ici, il s'agit d'un mélangeur "passif", c'est à dire qu'aucun mécanisme de mélange ne "brasse" le fluide. Le mélange est simplement assuré par la configuration particulière des canaux (fig. 1.23) qui coupent et retournent le fluide, exactement comme dans la transformation du boulanger (fig. 1.14). Ce type de mélangeur fait partie de la catégorie des "Partitioned Pipe Mixers". Ici, comme pour le cas ci-dessus,

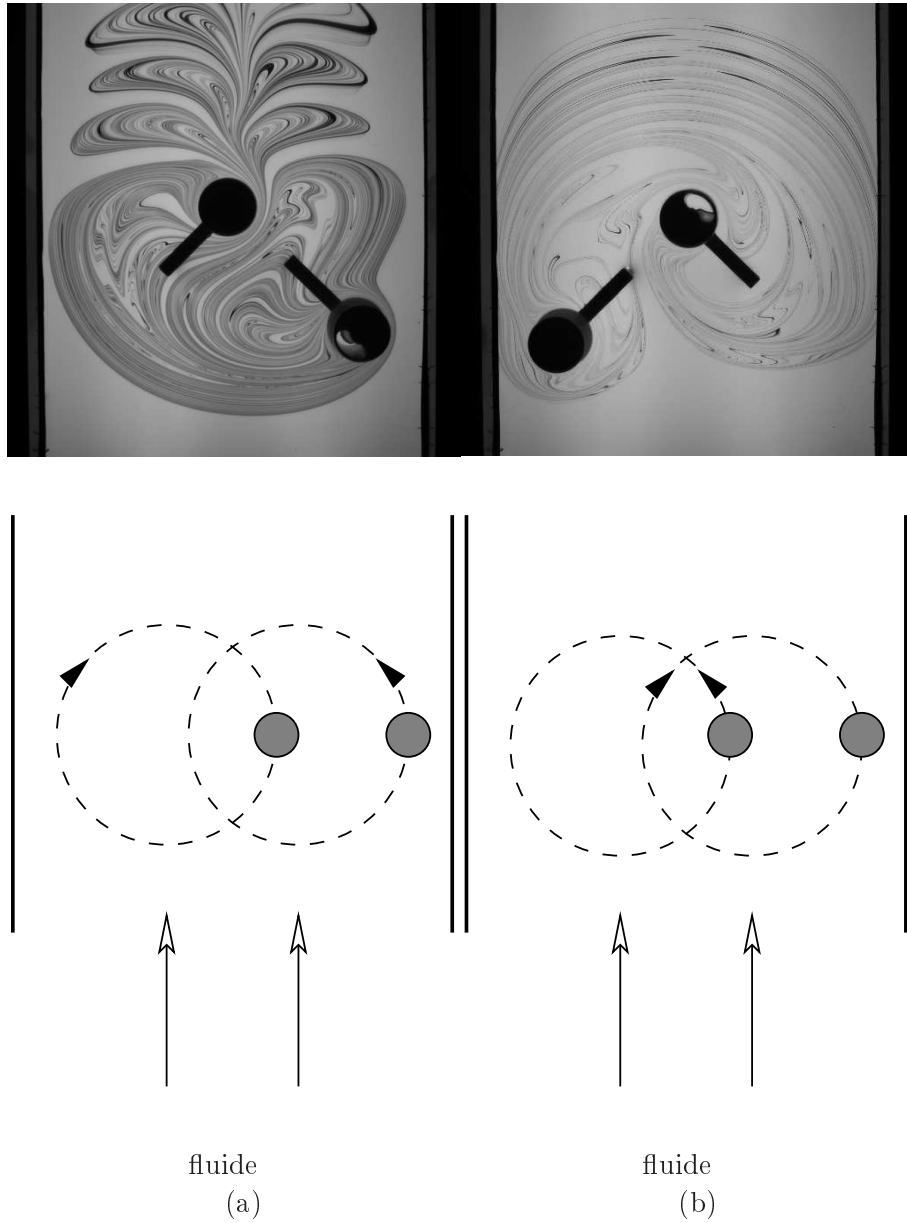


FIG. 1.22 – Mélange en cavité ouverte : 2 tiges contra-rotatives mélangent le fluide. (a) protocole "papillon", (b) protocole "brasse". Ce mélangeur type "bateur à oeufs" est alimenté continûment en fluide. Le paramètre gouvernant le mélange est le rapport entre la vitesse d'entrée du fluide et la vitesse de rotation des batteurs. Selon le protocole, le chemin suivi par le fluide pour traverser la zone de mélange est radicalement différent. D'après E. Guillard et al. [5]

la périodicité est assurée spatialement selon une direction de l'espace.

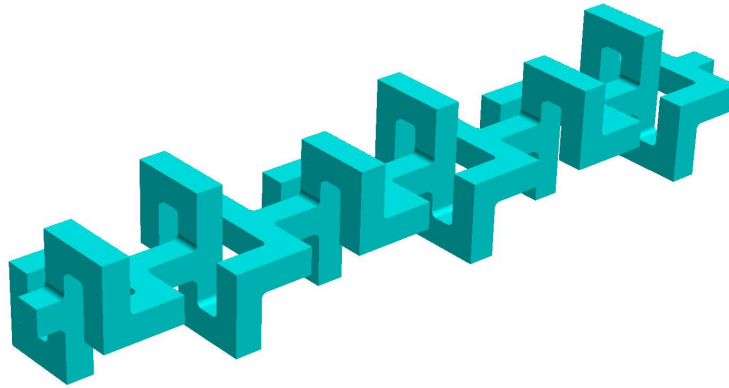


FIG. 1.23 – Mélangeur passif étudié par Ph. Carrière [6]. Le dispositif contraint, par la géométrie et la configuration des canaux (de type ruban de Möbius), à réaliser une "transformation du boulanger". La répétition de la "cellule" élémentaire permet de réitérer autant de fois cette transformation.

1.4 Objectif de la thèse

Dans le prochain chapitre, nous étudierons deux nouveaux protocoles de mélange périodiques que nous avons mis au point, qui sont facilement adaptables à la technologie des puces à ADN, et plus généralement aux micro-systèmes sur puce ("Labs On Chip"). Ces protocoles, que nous étudierons en détails, utiliseront le principe de l'injection alternée de fluide grâce à des pompes ou des seringues. Grâce à une modélisation simplifiée de l'écoulement utilisé (permettant ainsi de calculer analytiquement le champ des vitesses), il sera aussi possible d'étudier l'influence de la géométrie de la chambre d'écoulement sur la qualité du mélange.

Dans le troisième chapitre, nous ajouterons la réaction chimique afin de modéliser l'hybridation des cibles libres avec les sondes de la puce. Tout au long du chapitre, nous comparerons les résultats de l'hybridation pour le transport de cibles par diffusion pure et pour le mélange par advection chaotique (en utilisant le meilleur protocole de mélange du chapitre 2). Pour cette étude, nous étudierons l'influence de plusieurs paramètres, tels que la portée des interactions sondes/cibles libres ou encore l'influence du coefficient de diffusion D . Nous essaierons également d'en tirer une constante de vitesse k dont nous discuterons la légitimité selon le processus de transport utilisé (diffusion ou advection chaotique).

Enfin, dans un dernier chapitre, nous tenterons de vérifier expérimentalement l'efficacité du mélange par advection chaotique sur une réaction chimique. Pour mener à bien cette étude, nous découvrirons un dispositif expérimental de suivi de réaction chimique de surface en temps réel (la SPR ou "Résonance de Plasmon de Surface"). Cette étude a nécessité une chambre d'écoulement à l'échelle 1 : 1 que nous avons entièrement dessinée et construite. Nous présenterons les premiers

résultats expérimentaux en comparant encore une fois l'efficacité d'un mélangeur par rapport à une chambre d'hybridation statique. Tout le travail de ce chapitre a été réalisé au Canada grâce à une collaboration avec l'Université de Sherbrooke.

L'objectif de cette thèse sera donc d'étudier l'apport du mélange par advection chaotique sur une application concrète et moderne qu'est la technologie des puces à ADN. Toute cette thèse sera axée sous l'éclairage de la simplicité de la modélisation utilisée : l'essentiel ici n'est pas de modéliser le plus fidèlement possible et jusque dans les moindres détails la physique qui existe dans la chambre en tenant compte de tous les phénomènes existants (nature du fluide, influence des trous d'injection sur le champ des vitesses, nature exacte des interactions moléculaires, taille des macromolécules, orientation des molécules pour la réaction chimique) mais plutôt de dégager les résultats importants grâce à une approche simplifiée du problème. Afin de ne pas trop dénaturer le problème, chaque hypothèse sera à chaque étape validée grâce à une comparaison du résultat obtenu avec un résultat expérimental ou un autre résultat numérique issu d'un calcul plus complet. Nous verrons alors tout au long de cette thèse qu'il est possible, malgré ces simplifications, d'obtenir des résultats nouveaux et parfois surprenants.

Résumé :

Dans ce chapitre, nous rappelons la structure de la molécule d'ADN : il s'agit d'une macromolécule de forme hélicoïdale, formée de deux brins appariés portant chacun une séquence d'oligonucléotides parmi lesquels 4 bases notées A, T, C et G (pour respectivement Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine). Ces deux brins sont associés de manière spécifique grâce à la grande complémentarité qui existe entre les bases : A ne s'associe qu'avec T et C ne s'associe qu'avec G. La séquence de bases formant la molécule d'ADN constitue le code génétique, support de l'information génétique. Cette séquence est généralement traduite sous la forme de caractères morphologiques (couleurs des yeux, forme du nez, ...) mais elle peut parfois aussi être responsable de maladies (dites génétiques) qu'il est nécessaire de pouvoir diagnostiquer à temps. La recherche de micro-organismes grâce à leur ADN est également un axe de recherche.

Une puce à ADN est constituée d'un support solide sur lequel sont fixées des sondes (monobrins d'ADN de séquence *connue* et *choisie*). La technique consiste à déposer sur cette puce une goutte de solution à analyser contenant également des monobrins d'ADN, préalablement marqués, mais de séquence *inconnue* et *à déterminer* (les cibles). Le déplacement de ces cibles est assuré par diffusion et celles-ci vont s'apparier par complémentarité aux sondes de la puce, si elles existent : c'est l'hybridation. Un lavage permet ensuite d'éliminer les cibles restées libres en volume (faute d'avoir trouvé des sondes complémentaires). Enfin, la détection des paires appariées (généralement par fluorescence induite) permet de conclure en la présence (ou non) de certaines séquences dans la solution à analyser.

Pour que la technologie des puces à ADN donne un résultat le plus fiable possible et le plus rapide, il faut que les cibles puissent visiter en un temps raisonnable toute la surface de la puce dans le but de tester chaque sonde attachée à celle-ci. Malheureusement, en ne comptant que sur la diffusion comme moyen de transport, le temps caractéristique mis par les cibles pour parcourir une puce de $\ell^2 = 1 \text{ cm}^2$ avec un coefficient de diffusion de l'ordre de $D \sim 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ est

$\tau_D = \ell^2/D = 30 - 300$ h, ce qui est incompatible avec l'objectif de résultat rapide de l'analyse. Un dispositif de mélange à base d'écoulements fluides devenait donc nécessaire.

Il existe plusieurs façons de mélanger. De manière générale, un mélange est efficace si des particules fluides initialement très proches arrivent à se séparer exponentiellement vite avec le temps : en mécanique des fluides, ce principe est réalisé grâce à l'*advection chaotique*. Dans le cadre des écoulements laminaires, le processus de mélange consiste surtout à étirer puis replier le fluide (comme dans la transformation du boulanger). De cette manière, des gradients de concentration sont créés et la diffusion peut alors homogénéiser localement les concentrations des espèces.

Dans le cadre des écoulements bidimensionnels comme nous allons l'appliquer dans le chapitre suivant, la façon la plus simple de mélanger consiste à créer un écoulement dépendant du temps (le plus simple : périodique en temps). Une étude du mélange passe alors par le tracé des sections de Poincaré qui permettent de distinguer les zones de bon mélange de celles de mauvais mélange. L'exposant de Lyapunov donnera une indication sur la vitesse d'étirement du fluide et l'entropie de Kolmogorov-Sinai permettra globalement de conclure si un protocole de mélange est efficace, ou pas.

Chapitre 2

Étude du mélange par advection chaotique dans une chambre d'hybridation de puce à ADN

Introduction

Pour que les puces à ADN puissent délivrer la réponse la plus fiable et la plus rapide possible, il faut que les cibles libres en solution puissent rapidement se disperser dans tout le volume de la chambre d'hybridation. Si cette condition est réalisée, ces cibles sont alors toutes en mesure de "tester" en un temps raisonnable chacune des sondes de la puce en vue d'une potentielle hybridation. Dans ce chapitre, nous allons étudier le mélange en terme d'homogénéité, mais également en terme de rapidité grâce à deux protocoles de mélange mis au point à partir d'un processus d'injections alternées. Nous étudierons la dispersion des particules fluides grâce aux outils du chaos (sections de Poincaré, exposants de Lyapunov, entropie topologique, voir le paragraphe 1.3.2). Nous étudierons également l'influence de la géométrie de la chambre d'hybridation sur l'efficacité du mélange. La plus grande partie de ce chapitre prend la forme d'une publication en cours de soumission.

2.1 D'un problème physique vers une solution apportée par la mécanique des fluides

2.1.1 Historique d'une collaboration

La société ROSATECH, ancienne "start-up" de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon spécialisée dans la fabrication des puces à ADN, s'est rapidement aperçue lors de tests que, lors d'une hybridation statique sur puce à ADN (par dépôt d'une goutte de solution à analyser puis en laissant diffuser), le temps nécessaire pour obtenir un résultat suffisamment fiable était trop grand pour une utilisation systématique de ce type de technologie¹. Le LMFA, dont l'équipe

¹Comme expliqué dans le chapitre précédent, avec un coefficient de diffusion forcément plus faible que $D = 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (coefficient de diffusion de l'eau dans l'eau), le temps nécessaire à la tache pour s'étaler sur toute la surface de la puce est largement supérieur à $\tau_D = \ell^2/D \approx 30 \text{ h}$ pour une puce de côté $\ell = 1 \text{ cm}$.

Microhydrodynamique est spécialisée en advection chaotique, s'est donc associée à Rosatech et à l'INL pour tenter d'améliorer les performances des biopuces par un mélange efficace.

2.1.2 Paramètres et grandeurs de la puce réelle

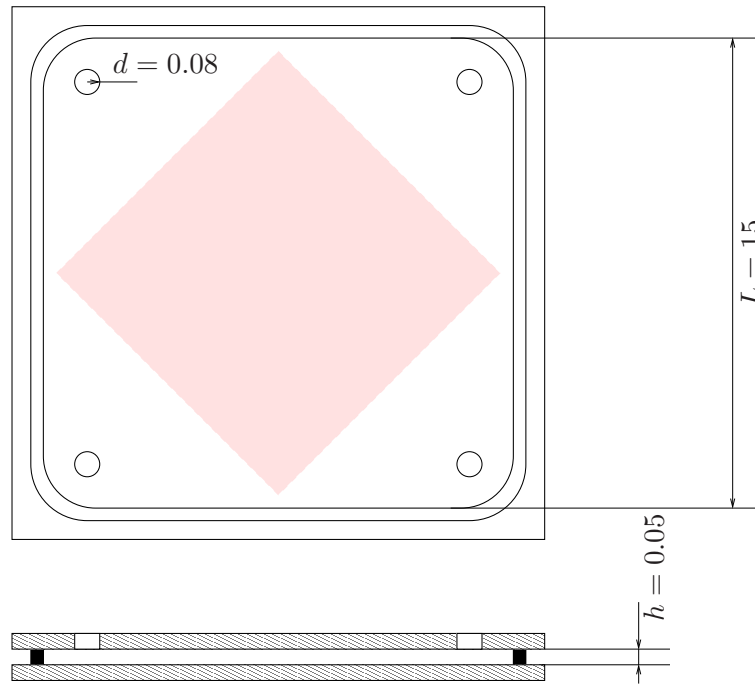


FIG. 2.1 – Schéma de la chambre d'hybridation. Le carré orange symbolise la position de la puce à ADN. Les dimensions sont exprimées en mm.

Pour pouvoir mélanger efficacement et rapidement, nous avons proposé de créer un écoulement : la puce à ADN est placée dans une cellule fermée de type Hele Shaw, de faible hauteur (pour en limiter le volume) avec, aux quatre coins de celle-ci, une entrée ou une sortie de fluide grâce à des conduits de faible section (fig. 2.1).

Les grandeurs du problème sont :

- hauteur : $h = 50 \mu\text{m}$
- dimension de la puce : $\ell = 10 \text{ mm}$
- dimension de la chambre : $L = 15 \text{ mm}$
- diamètre des tuyaux : $d = 80 \mu\text{m}$
- débit : $q = 2 \mu\text{L/s}$
- viscosité cinématique : $\nu = 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

Ceci conduit aux vitesses caractéristiques et nombres de Reynolds suivants :

- vitesse du fluide dans les conduits : $U_i = \frac{4q}{\pi d^2} \approx 4.10^{-1} \text{ m/s}$
- vitesse dans la section transversale : $U_t = \frac{q}{hL\sqrt{2}} \approx 2.10^{-3} \text{ m/s}$

- Reynolds dans les conduits : $Re_i = \frac{U_i d}{\nu} \approx 30$
- Reynolds dans la cuve : $Re_t = \frac{U_t h}{\nu} = 0.09$

Le cadre de l'étude est donc clairement les écoulements fluides à faible nombre de Reynolds (laminaires). De plus, compte-tenu du très faible rapport d'aspect $h/L = 1/300$, l'écoulement est nécessairement de type rampant. Dans ce cadre, nous rappelons que le seul moyen de mélanger consiste à créer de l'*advection chaotique* (voir le paragraphe 1.3.1) grâce à un processus d'*injections alternées périodiques en temps*.

2.1.3 Étude 2D ou 3D du mélange ?

Plusieurs travaux et publications précèdent l'article qui va suivre : notre équipe s'est d'abord intéressée à la simulation numérique du mélange grâce à un écoulement périodique reposant sur l'utilisation de pompes ou seringues [37][38] (ces protocoles, dits 'A' et 'B', seront détaillés dans l'article ci-après) : les trajectoires des particules fluides ont pu être calculées pour ce système d'injection alterné, et le mélange apprécié ou non selon la période T du processus périodique. Dans ces travaux, le champ *tridimensionnel* des vitesses, considéré comme stationnaire pendant chaque phase du protocole périodique, a d'abord été obtenu en résolvant numériquement les équations de Stokes : le champ des vitesses discret (c'est à dire connu sur les noeuds d'un maillage 'épousant' la cavité) a été obtenu grâce à la méthode des éléments finis avec approximation quadratique de la vitesse (le schéma $P_1 - P_2$ encore appelé élément de Taylor-Hood, avec approximation linéaire de la pression, voir [59]). Grâce aux symétries de l'écoulement, ce champ des vitesses n'a été calculé que sur la moitié de la chambre (voir fig. 2.2), puis reconstruit par symétrie pour permettre le calcul des trajectoires. L'inconvénient de cette méthode est que, si l'on change la géométrie de la chambre, le maillage doit être entièrement recalculé, ce qui est long et laborieux.

L'originalité de mon travail repose précisément sur la méthode de calcul du champ des vitesses. Comme la cellule est de type Hele-Shaw, il y a en première approximation découplage entre les variations horizontales et les variations verticales de la vitesse, avec un profil de vitesses parabolique dans la direction verticale (Oz) ; on dit parfois que l'écoulement est quasi-2D. C'est pourquoi nous l'avons modélisé par champ de vitesse strictement *bidimensionnel*. Il devient alors facile de calculer ce champ des vitesses : en effet, dans un tel écoulement, la vitesse moyennée sur la hauteur h vérifie l'équation d'Euler, et peut donc être obtenue par une approche potentielle du problème. Pour obtenir l'écoulement dans une cavité carrée ou rectangulaire, ce champ des vitesses est d'abord calculé très simplement dans une cavité circulaire grâce au théorème de Milne-Thomson (théorème des images en mécanique des fluides, voir l'annexe C). On applique ensuite à ce champ une transformation conforme de Schwarz-Christoffel adaptée au type de géométrie recherché. Ainsi, le champ de vitesse de chaque géométrie peut rapidement être obtenue de manière *analytique*, ce qui rend cette méthode bien plus *flexible* qu'une expérience ou une simulation numérique 3D (voir l'annexe D). Afin de pouvoir comparer raisonnablement les différentes géométries de la chambre d'hybridation, nous travaillerons à *volume de la chambre fixé* : dans ce chapitre, la *surface* de la chambre sera donc la même quelle que soit la géométrie (la hauteur h reste inchangée).

Pour finir, trois autres hypothèses seront considérées dans le calcul des trajectoires :

- lors de chaque phase du processus périodique, le champ des vitesses est stationnaire,
- les brins d'ADN seront considérés, en première approximation, comme des *scalaires pas-*

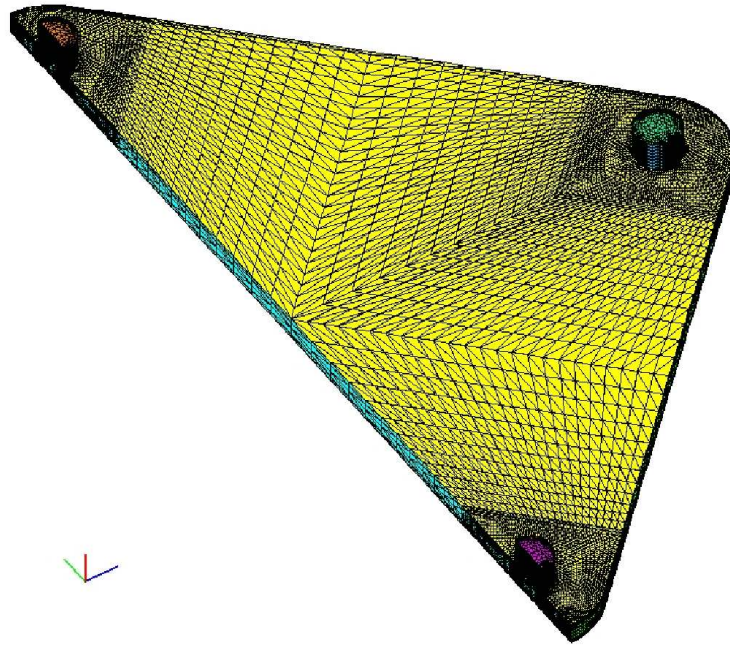


FIG. 2.2 – Grille d'éléments finis.

sifs. Les brins sont donc confondus avec les particules fluides qui les entraînent dans leur mouvement,

- les tuyaux ne mélangent pas : pour l'étude 2D du mélange, une particule fluide qui entre dans un puits ressortira sur la *même* ligne de courant.

2.1.4 Vérification expérimentale

Pour valider ce modèle de champ de vitesse bidimensionnel, nous avons réalisé une brève étude expérimentale du mélange dans les géométries carrée et rectangulaire de la chambre d'écoulement. Le dispositif expérimental est une chambre d'écoulement formée de deux plaques parallèles dont l'une est en verre (transparent pour visualiser par le dessus l'évolution du mélange) et l'autre est en ERTACETAL[®] (opaque, noire). Quatre trous sont percés aux coins de la cavité afin de pouvoir y glisser les tuyaux d'injection et/ou extraction du liquide (cf. fig. 2.3). Tout l'ensemble est collé. Ce dispositif est à l'échelle 10 :1 par rapport à la chambre fictive réelle : pour conserver la similarité en nombre de Reynolds, les débits et les périodes ont été recalculés.

L'évolution d'une tache est suivie en utilisant de la rhodamine B, colorant couramment utilisé dans la technique de Fluorescence Induite par Laser. Son évolution est suivie grâce à un Laser, dont le faisceau est éclaté en un plan de lumière pour éclairer toute la cavité par son coté (cf. fig. 2.4).

Le matériel périphérique consiste en :

- un laser à quartz de longueur d'onde 532 nm (vert), puissance maximale 2 W, Spectra Physics,

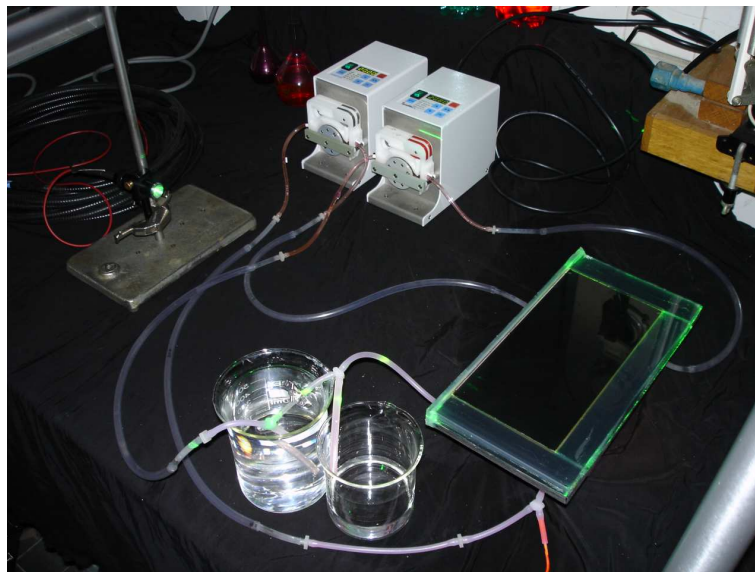


FIG. 2.3 – Montage expérimental. Pour les deux protocoles (à pompes ou à seringues), un seul dispositif expérimental a été utilisé, comportant deux pompes péristaltiques réversibles. Dans le cas du protocole à seringues, les pompes fonctionnent réversiblement, et nous avons utilisé de gros tuyaux suffisamment longs pour que la rhodamine ne passe jamais par la pompe. Nous simulons ainsi grâce à une pompe l'action d'un couple de seringues, l'une se vidant, l'autre se remplissant.

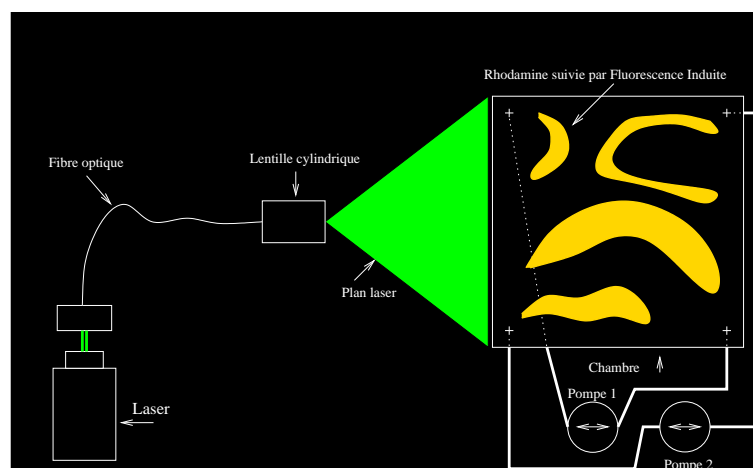


FIG. 2.4 – Suivi de l'expérience par Fluorescence Induite par Laser.

- deux pompes péristaltiques programmables, Ismatec,
- un appareil photo numérique Nikon D50, objectif de focale 50 mm.

2.2 Article : Chaotic mixing efficiency in different geometries of Hele-Shaw cells used as DNA hybridization chambers.

L'article ci-dessous a été publié dans *International Journal of Heat and Mass Transfer*. Il étudie principalement l'influence de la géométrie de la chambre d'hybridation ; la différence entre protocoles (protocole à pompe meilleurs que protocole à seringues) a fait l'objet d'un autre article [38].

Chaotic mixing efficiency in different geometries of Hele-Shaw cells used as DNA hybridization chambers.

Aurélien Beuf*, Jean-Noël Gence, Philippe Carrière, and Florence Raynal

LMFA, CNRS – Université de Lyon, France;

École Centrale de Lyon – Université Lyon 1 – INSA Lyon;

ECL, 36 avenue Guy de Collongue,

69134 Écully cédex, France

DNA chip technology requires a rapid and homogeneous dispersion of all the DNA molecules over the whole surface of the chip. Because of the small dimensions of the chip and the high aspect ratio of the device, the only way to mix efficiently inside the chamber is to generate a periodic flow and thus create chaos. Here we study the influence of the geometry of the hybridization chamber on mixing efficiency: to this aim, we use three different geometries of the chamber (circle, square and rectangle) and we numerically test them by using two protocols of mixing: the first protocol uses syringes, the second uses pumps. In a view of simplicity, this Hele-Shaw flow is modeled as two-dimensional, allowing us to analytically determine the velocity field corresponding to the different shapes. The results are then analyzed in terms of Poincaré sections (appearance, filling rate, homogeneity), and the Lyapunov exponents are calculated. We numerically show that the rectangular geometry leads to a better mixing, but also that the aspect ratio of the rectangle plays unexpectedly no important role on mixing.

* aurelien.beuf@ec-lyon.fr

I. INTRODUCTION

Microfluidic devices are widely used in nowadays' biotechnology, for applications ranging from transport of material in microchannels, sorting of cells, DNA analysis, etc. When chemical reactions come into play (e.g. in many such systems), efficient mixing is required in order to homogenize the solution, so as to favour the meeting of reactants. However, the Reynolds number of flows at the microscale are small, generally of the order of unity or smaller, so that Stokes flows should be commonly expected [1].

It is now well-known that chaotic advection is the best way to mix efficiently in laminar flows [2–5], all the more reason for microfluidic flows. Stroock *et al.* proposed a famous chaotic mixer adapted to microdevices, the so-called staggered herringbone mixer (SHM) [6], dedicated to mixing in microchannels. A typical microchannel has height and width of the order of $50 - 100 \mu m$, and length of a few centimeters, *i.e.* two small dimensions and the third one large compared to the others. In a smooth channel the mixing of material between streams in the flow is purely diffusive, so that the length of channel required for mixing can be prohibitely long. The SHM consists in adding specific bas-relief structures (ridges) on the floor of the channel, leading to chaotic trajectories; the mixing length is therefore greatly reduced. In this article we deal with mixing in a different microfluidic configuration, the Hele-Shaw flows, where the height is small (typically $25 - 50 \mu m$) and the length and width are “large”, of the order of the centimeter. A straightforward application is improvement of DNA-chip technology.

DNA - or Desoxyribo Nucleic Acid - is made of two single stranded chains of oligonucleotides. Each strand is composed of a series of four bases (among them : Adenin (A), Thymin(T), Cytosin(C) or Guanin(G)) specifically combined with the other strand due to high complementarity between the bases (A combines only with T, C with G, see figure 1(a)). A given sequence of bases codes for the gene expression; therefore the knowledge of specific sequences in a given individual's DNA proves the existence of genetic diseases or the presence of viruses.

DNA chip technology is aimed to detect rapidly those DNA sequences [7]. A DNA chip is composed of a solid surface (such as glass) on which arrays of biological probes (single stranded DNA) are fixed [8] (figure 1(b)). Each probe is made of 10 to 60 predetermined oligonucleotides. The working principle of DNA micro-arrays is the so-called *hybridization*

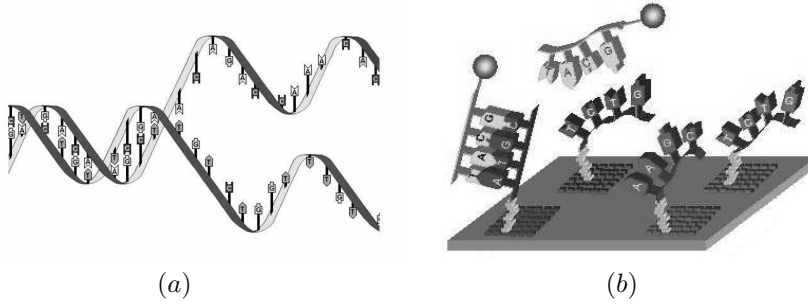


FIG. 1: (a) : DNA is composed of two complementary single stranded chains of oligonucleotides (A combines only with T, C with G). (b) : Schematic view of a DNA chip. The labeled free targets hybridize to their complementary probes on the chip, if present.

phenomenon: when the chip is exposed to single-stranded DNA samples (*targets*), preliminary labeled with a fluorescent marker, targets and probes match each other only if there is a specific complementarity between the two sequences of those nucleotides (figure 1(b)). After a chemical wash (in order to eliminate un-matched targets still in solution), with the detection of the fluorescent signal of the hybridized targets, one can conclude on the presence – or not – of particular sequences in the patient genotype.

During static hybridization (or *cover-slip* method), where no fluid flow is applied, only molecular diffusion allows targets to move, and significant variations in the response of the chip are commonly observed, even after overnight hybridization. Indeed, by considering the diffusion coefficient of DNA in water (typically $D = 10^{-9} - 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) [9], for a square chip of side $\ell = 1 \text{ cm}$, the typical diffusion time τ_ℓ is about

$$\tau_\ell \sim \ell^2/D = 30 - 300 \text{ hours}, \quad (1)$$

which is absolutely incompatible with the wish to get reliable results in a reasonable time. There is thus a need both to improve the reliability of the results, and speed up the process, by making sure that a given target visits the whole surface of the chip in a reasonable time [10], so that hybridization can eventually take place if its complementary target is present. Since molecular diffusion, alone, is too slow, mixing can be achieved thanks to a flow with chaotic advection properties. In order to limit the volume, the cavity in which the chip is placed, called hybridization chamber, must have a height h as small as possible,

which is exactly the configuration of Hele-Shaw cells. However, Hele-Shaw flows can, in a first approximation, be considered as two-dimensional. In those conditions, the only way to achieve chaotic advection is to make the flow non stationary; indeed, time-periodicity is enough.

We previously proposed two time-periodic protocols of mixing, one using two pairs of syringes, the other operating with pumps, and showed that they could exhibit chaotic trajectories in a *square* geometry [11, 12]. Other chaotic protocols in a Hele-Shaw cell in a view of DNA chip hybridization were proposed by two other teams: MC Quain *et al.* [13] proposed a stirring protocol using pulsed pairs of syringe-driven source–sink systems in a *rectangular* chamber and showed experimentally that hybridization was significantly improved; then Stremler *et al.* [14, 15] carried out the 2D mathematical analysis of mixing in their flow while the experimental analysis was done by Cola *et al.* [16]. Another work of importance was done by Hertzsch *et al.* [17] who showed that flows generated by pulsed source-sink pairs could be studied as linked twist maps; therefore they could relate the flow to mathematically precise notions of chaotic mixing, and proposed a new design to generate a well-mixed flow; they compared our protocol A, together with the protocol by Stremler *et al.*, with their new protocol and showed that their protocol, which has mathematical properties in favor of better mixing, was indeed best in a *circular* geometry (see also Sturman *et al.* [18] for more details on the mathematical background).

The idea of this article is not to compare all the protocols of stirring proposed in the literature for Hele-Shaw cells, but to test whether or not the *shape* of the chamber influences the quality of mixing. To this end, we use our two previous protocols [11, 12], which have been shown to exhibit very different mixing abilities. Fluid flow is created thanks to four vertical pipes located near the corners, which inject or extract fluid, and therefore act as sources or sinks. Indeed, those protocols can be considered as variants of the pulsed source–sink chaotic mixer first proposed by Aref and Jones [19].

1. The first protocol (called protocol A in the following) relies on periodic injection of fluid thanks to four reversible syringes : during one period T , four steps of same duration occur (figure 2(a)).
2. The second protocol (protocol B) operates with two mono-directional pumps switched alternately. For this protocol, only two steps of same duration occur during T (figure

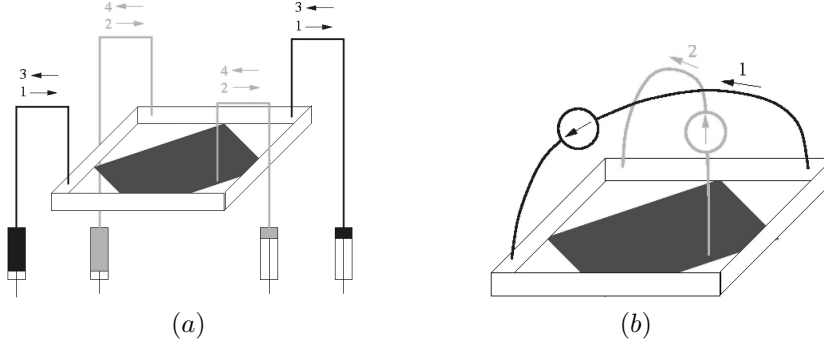


FIG. 2: (a) : Alternating injection scheme for protocol A. Each quarter-period step of the protocol involves two opposite syringes (the black ones in step 1 and 3, the grey ones in steps 2 and 4), the two other ones being inactive. (b) : Same for protocol B. Each half-period step of the protocol involves one of the pumps, the other being inactive. One pump always pushes the fluid in the same direction, or else is inactive. *Note* : the DNA chip is symbolized by the central black square.

2(b)).

In all the following, like in our previous works [11, 12], the flow rate q and the height h are chosen such that $q/h = 40 \text{ mm}^2/\text{s}$, and the hybridization chamber has an horizontal section $S = 2.25 \text{ cm}^2$; its shape is whether a circle, or a square (like in our previous works [11, 12], where the cavity had a side $L = 15 \text{ mm}$), or a rectangle of lateral sides γL and L/γ , where we took different values for $\gamma > 1$, so that the total surface is, in all cases, equal to S .

II. NUMERICAL AND EXPERIMENTAL TOOLS

A. Numerical model

In order to understand and quantify mixing for each protocol in the different geometries, we mainly used numerical simulations. We modeled the velocity field as purely *two-dimensional* in a first approximation, using the depth-averaged horizontal velocity field, which, in a Hele-Shaw flow, satisfies the Euler equation. Indeed, the aim of this work is to test the influence of the shape of the domain, and for this purpose such a 2D model is much more flexible than the calculation of the whole 3D-flow, for which a change of geometry would require a new computational grid, together with heavy calculations. In our case the flow between a source and a sink is calculated *analytically* in a *circular* geometry using the Milne-Thomson theorem [20]. It is then very easy to obtain the flow in the *squared* or *rectangular* geometry using a Schwarz-Christoffel transformation [20]. All the analytical details of the 2D calculations are given in appendix A. The streamlines obtained with our model for a source-sink flow are shown in figure 3 for different geometries of the chamber.

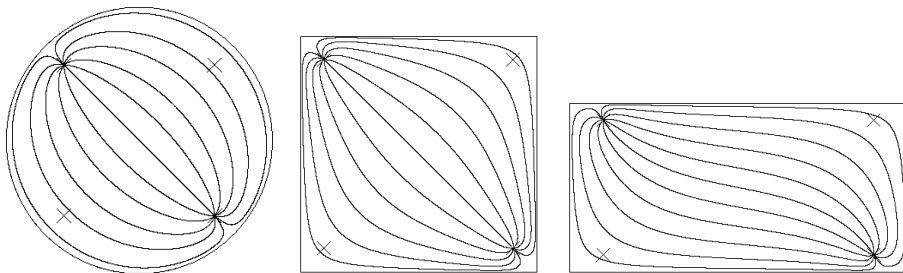


FIG. 3: Streamlines for a source-sink flow in the different geometries of the chamber.

The trajectories are calculated thereafter using a standard fourth order Runge-Kutta integration. In our 2D-model, we imposed that a particle entering in a sink reenters the domain *on the same streamline*. Like in the 3D-simulations, our calculations have been performed without taking into account molecular diffusion. Therefore a fluid particle at a given location at the end of an injection/extraction, which is swallowed inside a pipe during the next phase is swallowed up at exactly the same location when the sink is turned again into a sink. Note that *long time integration of trajectories* is also more easily available with

the 2D-model than with a 3D flow on a computational grid, since the probability that a fluid particle ends on a boundary is very low in the former case: first the flow-field is known analytically, and therefore satisfies exactly the incompressibility constraint, and second the velocity, which is a solution of the Euler equation, is not zero on the boundaries.

B. Tools of chaos

Mixing efficiency is then analyzed with the usual tools of chaos: Poincaré sections and Lyapunov exponents. In a time-periodic flow, the Poincaré section of a given trajectory is obtained by plotting on the same graph all the positions of the initial point taken every period. First of all those sections give visual informations on mixing efficiency by showing chaotic areas (where mixing is very efficient) coexisting with regular islands (where mixing can only occur by pure diffusion). A good mixing is obtained when the Poincaré section of a given single trajectory covers the whole surface, in the most homogeneous way and the smallest period possible.

Mixing can also be analyzed quantitatively using the Lyapunov exponent λ , expressed in seconds⁻¹, which measures the asymptotic exponential stretching between two nearby trajectories (rate of separation): if a fluid particle is initially in a chaotic area, its Lyapunov exponent is positive; else the separation between two nearby particles is at most algebraic and the Lyapunov exponent is equal to zero. Thus, particles dispersion is all the more rapid as the Lyapunov exponent is high.

In the squared and rectangular geometry, it was also possible to calculate the "filling rate" of the Poincaré section, *i.e.* the fraction of surface covered, so as to obtain a quantitative rather than visual information. We could therefore investigate the use of the topological or Kolmogorov entropy h_K through the same estimation as Stremler and Cola [15], which says that, under some conditions, h_K can be calculated as the product of the area covered by a *single* chaotic trajectory with the corresponding Lyapunov exponent [21]. Mixing is supposed to be all the more efficient as the topological entropy is high. Since the total area S is constant in all our calculations, we calculated the topological entropy as the fraction of area covered, multiplied by the Lyapunov exponent, so that it is also expressed in seconds⁻¹.

C. Scaled-up experiment

Experimental investigations were performed with a 10:1 scaled-up model, using laser induced rhodamine B fluorescence technique. The idea was not here to try to obtain quantitative results, but to validate our numerical results. All the details of the experimental set-up are given in our previous papers [11, 12]. In addition to our previous work in the squared geometry, we performed experiments in a rectangular chamber of aspect ratio 2:1 ($\gamma = \sqrt{2}$).

D. Validation of the 2D model

It is important first to validate the 2D model properly. Indeed, the model could be thought of as far from reality: first of all, the Stokes flow can nowhere be considered as *purely* horizontal inside the chamber, all the more as the active couple source/sink is approached (the vertical component of the flow inside the chamber is exponentially small with the distance to the nearest active source or sink); identically, in the active pipes, the flow is not purely vertical, the horizontal component of the velocity decaying exponentially with the height in the pipes. Even though this effect is small, we could wonder however whether our 2D regular regions, which are visible on the Poincaré section after integration of fluid particle trajectories on very long time, would remain stable under such 3D perturbations. Secondly, our 2D model uses the *depth-averaged* horizontal velocity field, whereas the horizontal velocity profile is almost everywhere parabolic. This implies that a fluid particle located at the middle moves faster than what we compute, while another one located for example near the bottom can be much slower. Therefore, we could fear some important discrepancies between our 2D results and our previous 3D calculations [11, 12].

Note also that, since a Poincaré section accumulates the positions of a fluid particle after each period, and since a fluid particle can change depth, the 3D Poincaré section is a 3D set of points, and a regular region is likely to be hidden by points located above and below this region (corresponding to points with different velocities), which is not possible in the 2D case.

We begin our validations with the case tested in our previous papers: figure 4 shows two Poincaré sections for protocol A in the squared geometry with period $T = 4$ s, together

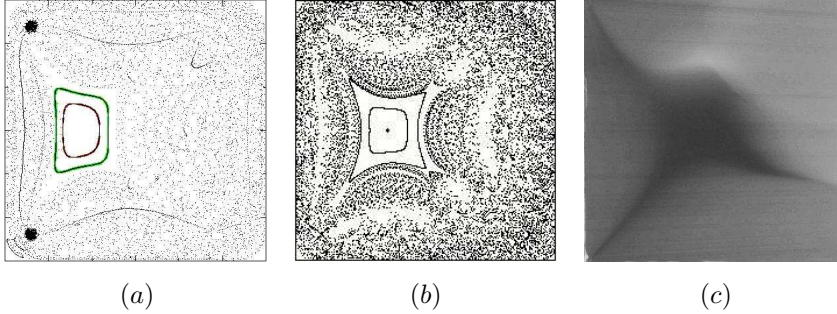


FIG. 4: Comparison between Poincaré sections with 3D velocity flow (a), 2D model velocity flow (b) and scaled-up experiment after six periods (c) for protocol A and the same period $T = 4$ s in the square geometry.

with the corresponding experiment. The first one (figure 4(a)) was obtained thanks to a complete 3D calculation of the Stokes equation (see details in [11]), the second one (figure 4(b)) with our analytical two-dimensional model. We notice a clear matching between the three figures: the chaotic area (area full of points) and large regular island (empty area or area having "elliptical trajectories") have comparable shape, size, and location. The regular islands located around the large one are very thin, and therefore can hardly be detected in the 3D calculations, as explained before.

We check the validity furthermore with rather different topologies of Poincaré sections. On figure 5 are compared 3D and 2D Poincaré sections, together for protocol A with a smaller and a larger period ($T = 1$ s and $T = 10$ s), and for protocol B with a very small period ($T = 0.5$ s) – the comparison for protocol B and large periods is of little interest, since points are almost randomly spread in the whole domain. The 3D Poincaré sections have been calculated for a single trajectory, while the 2D sections have been calculated with points of different initial location.

Concerning protocol B (figures 5(e) and (f)), the matching is very good. For protocol A $T = 1$ s (figures 5 (a) and (b)), the situation is also very similar: the peripheral region of the domain, more dense, corresponds to a chaotic zone, while the region inside is a nearly regular region (keep in mind that in the 2D case, some initial position of points have been chosen on purpose inside the more central region, while in the 3D case a single point was followed).

The large periods for protocol A are less intuitive: as an example, figures 5(c) and (d)

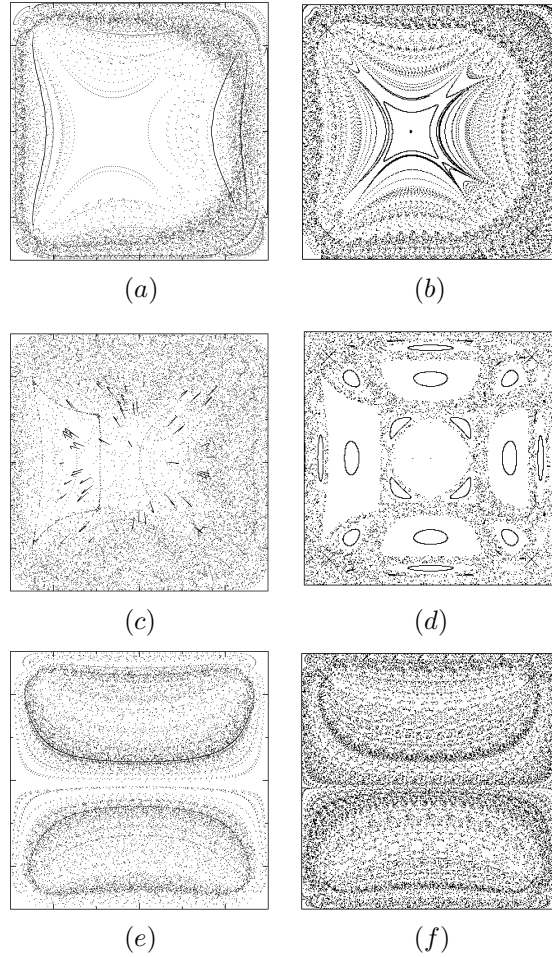


FIG. 5: Comparison between Poincaré sections with 3D velocity flow (left) and 2D model velocity flow (right). Top (a and b): Protocol A, $T = 2$ s; middle (c and d): Protocol A, $T = 10$ s; bottom (e and f): Protocol B, $T = 0.5$ s.

are the 3D and 2D Poincaré sections corresponding to protocol A, $T = 10$ s. Some very large regular regions are present in the 2D case, that are not visible in the 3D case, which corresponds to the first globally chaotic case found [11]. At first sight, the correspondence may appear quite bad. However, a careful analysis shows that the 2D Poincaré section is indeed informative in the present case.

Let us consider the large island which repeats identically at three occurrences in the section (bottom, right and top, denoted by regions A , B and C on figure 15). A point in

one of these islands is in fact a period-7 periodic point, and is swallowed down and up in the different pipes eight times before it comes back to its initial position (see appendix B)! In fact, in a Stokes flow, a fluid particle that is swallowed inside a pipe is not, as in our 2D model, reinjected at *exactly* the same location, since the velocity-field inside the non active pipes is not expected to be exactly zero: a large sequence of eddies forms, each exponentially weaker than its predecessor as height grows [22, 23]. Moreover, as explained before, the computed 3D velocity field does not satisfy exactly the incompressibility constraint. Since the streamlines are very tight inside an active pipe, a change in a fluid particle location during the “inactive” phase, even if very little, will lead the fluid particle to come back *nearly*, but not *exactly* at the same location –we had already checked before that it was indeed the case [12]–.

Now, on the 2D Poincaré sections corresponding to $T = 8$ s and $T = 12$ s —not shown here—, that is, respectively a smaller and a larger period, we checked that this elliptic areas do still exist, but at different locations (respectively closer and further to the center). The location of this zone is not robust with the period. Therefore, in the 3D case, a fluid particle in the period-7 elliptic area, which is swallowed at least once at each period, should leave this area after a few periods. This explains why this zone is not visible in the 3D section.

The trapezoidal-shaped island on the left is, on the other hand, never swallowed in a pipe, but moves in the domain with time (this is indeed the same regular region as the large island seen on the sections for $T = 4$ s on figure 4(b) and at the middle of the section $T = 2$ s on figure 5(b), which grows in size and is slightly displaced to the left with increasing period). Therefore, we should expect a fluid particle trapped inside this region to remain there for many periods before leaving; this is indeed the case, as can be seen on figure 5(c), where a curve corresponding to the trapezoidal area is visible. It is also noticeable that both this region and the central region are less visited than the rest of the domain (less points in the section), in accordance with the corresponding regular regions in the 2D section (figure 5(d)). Therefore, even with large periods of the flow-field for protocol A, we recover special features of the 2D section in the 3D calculations. Note that in a real experiment, because of molecular diffusion, the mixing will be even more rapid than in the 3D calculations. That is why mixing was achieved rapidly for protocol A $T \geq 10$ s, in accordance with the 3D calculations.

A similar comparison was done in the same situation as in figure 4 (protocol A, period

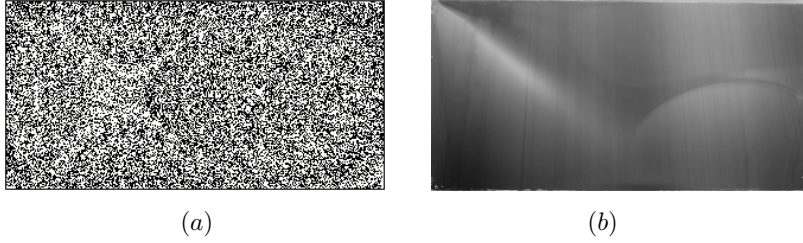


FIG. 6: Comparison between Poincaré sections with the 2D model (a) and scaled-up experiment after six periods of the flow-field (b) for protocol A and the same period $T = 4$ s in the rectangular geometry.

$T = 4$ s), but in the *rectangular* geometry, between our 2D calculations and the experiment. The results are shown in figure 6: the dye has spread everywhere after only six periods of the flow-field, although its concentration is still not completely homogeneous, which is again in favor of good matching between our model and the real flow.

Since we present Lyapunov exponents as a quantitative tool, we could wonder whether the hypothesis of a quasi 2D flow does not alter *quantitatively* this parameter. On figure 7 are presented with symbols the Lyapunov exponents obtained with our model flow versus the period. As a view of comparison, we plotted with lines the results obtained with the full

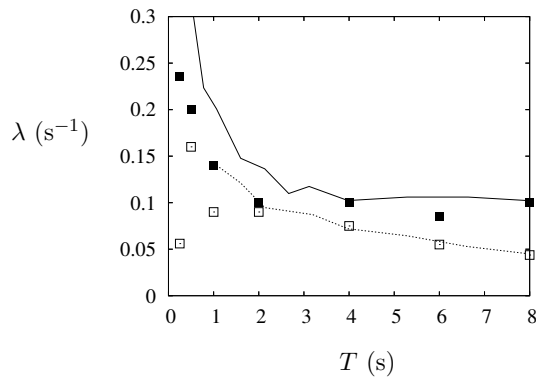


FIG. 7: Comparison of Lyapunov exponents from 2D and 3D calculations in the squared geometry. (□) protocol A, 2D calculations, (■) protocol B, 2D calculations. The lines correspond to the Lyapunov exponents obtained in our previous work with complete 3D calculations [12]: (...), protocol A; (—) protocol B.

3D calculations in a squared chamber [12]; the dotted line corresponds to protocol A and is to be compared with the empty squared symbols (2D flow), while the solid line (protocol B) shall be compared with the full squared symbols: somewhat surprisingly, the comparison shows almost perfect matching, except for very small periods, when the horizontal dispersion by the flow is weak, so that 3D effects cannot be neglected anymore.

We therefore conclude that this 2D-velocity field model is adapted for a complete study of the problem.

III. RESULTS

A. Correspondence between parameters from different authors

It is clear that the efficiency of mixing does not depend on the value of the Reynolds number inside the pipes and inside the chamber, as long as it remains small. Therefore, *for a given geometry and a given protocol*, the important non dimensional parameter is the dimensionless pulse volume α ,

$$\alpha = \frac{qT}{hS}, \quad (2)$$

which represents the volume of fluid displaced during one period compared to the volume of the chamber. Although α is defined for the 3D flow, one can easily switch from volumes to surfaces by dividing by the – constant – height h of the chamber. Therefore, α can be used identically as its 2D equivalent, the dimensionless pulse area, equal to the surface of fluid displaced during one period compared to the surface of the chamber.

In a view of comparison with our previous works, we chose to present our results using the dimensional period of the flow T instead of α . Note that those two parameters are proportional, and are linked by the relation

$$\alpha = 0.18 T \quad (T \text{ in seconds}) \quad (3)$$

with our set of parameters. While Stremler and Cola used α , Hertzsch et al. used a non dimensional period – denoted here T^* – defined as $T^* = qT/2\pi a^2$, where the distance between the source and the sink is equal to $2a$; in their simulations, the radius of the circular chamber is equal to R , chosen as $R = 2a$, which leads to the relation $\alpha = T^*/2$, or, using our dimensional period T ,

$$T^* = 0.36 T \quad (T \text{ in seconds}). \quad (4)$$

B. Poincaré sections and Lyapunov exponents

Poincaré sections are usually the most straightforward tools for characterizing chaos, because of the visual information they provide. In figures 8 and 9 are shown Poincaré sections of protocols A and B respectively, for three periods, namely $T = 1$ s, $T = 4$ s and $T = 10$ s. The circular, squared or rectangular domains have been plotted with the same

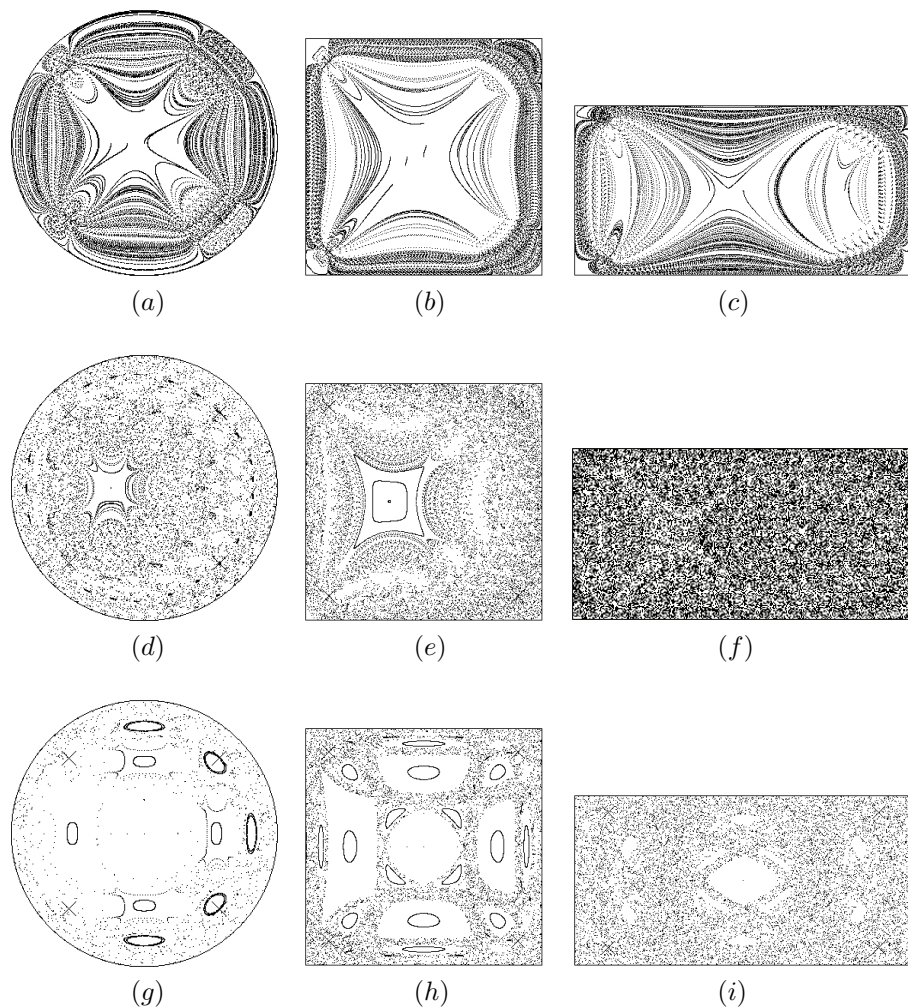


FIG. 8: Poincaré sections : comparison circular/squared/rectangular geometry of the chamber with protocol A (syringes) for $T = 1$ s (above), $T = 4$ s (middle) and $T = 10$ s (below).

area so as to be able to compare them visually – in the case of the circle, although this is not obvious, we indeed have $S = \pi D^2/4 = L^2$, with D the diameter of the circle, which implies $D/L = \sqrt{4/\pi} \simeq 1.13$. As expected [12], we recover with our 2D-model that mixing is much more efficient with protocol B compared to protocol A in the squared geometry; this result can obviously be extended to different geometries of the chamber.

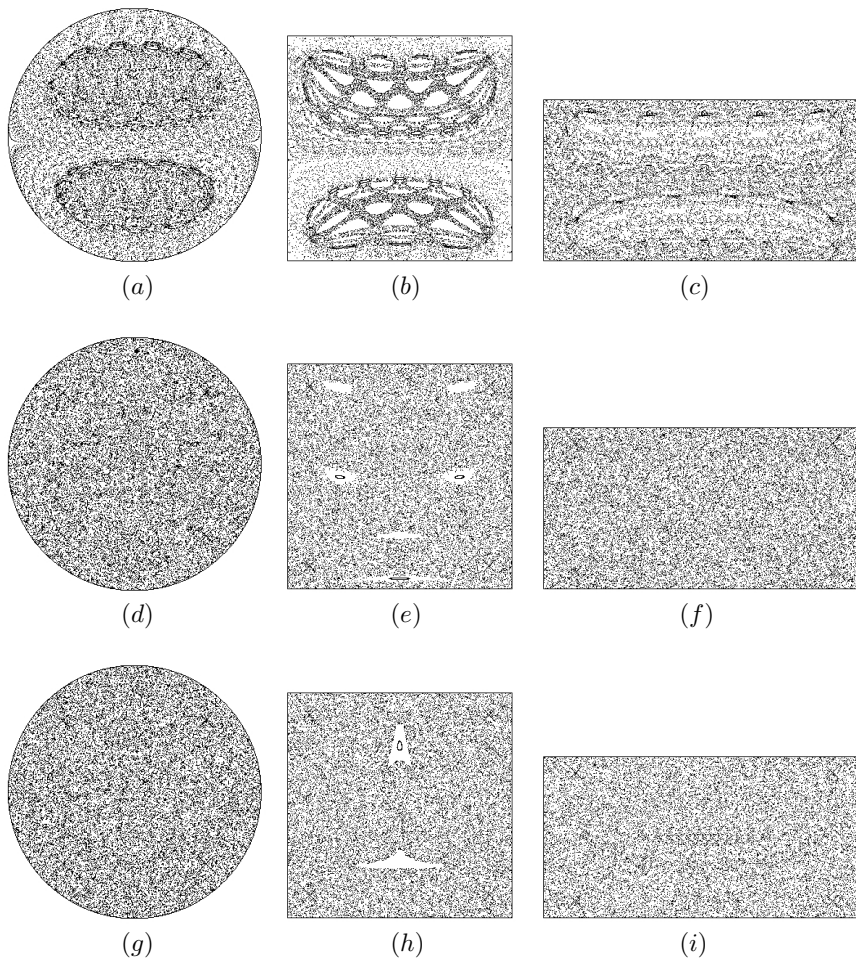


FIG. 9: Poincaré sections : comparison circular/squared/rectangular geometry of the chamber with protocol B (pumps) for $T = 1$ s (above), $T = 4$ s (middle) and $T = 10$ s (below).

A more surprising result is the influence of the geometry of the chamber: the fact is not straightforward concerning protocol B, since mixing is quite good, even if not *perfect* in the squared geometry (some little regular regions still persist, figures 9 (e) and (h), but which are much too small to be seen in a 3D computation or an experiment). However, mixing is as good in the rectangle as in the circle. The results are much more striking

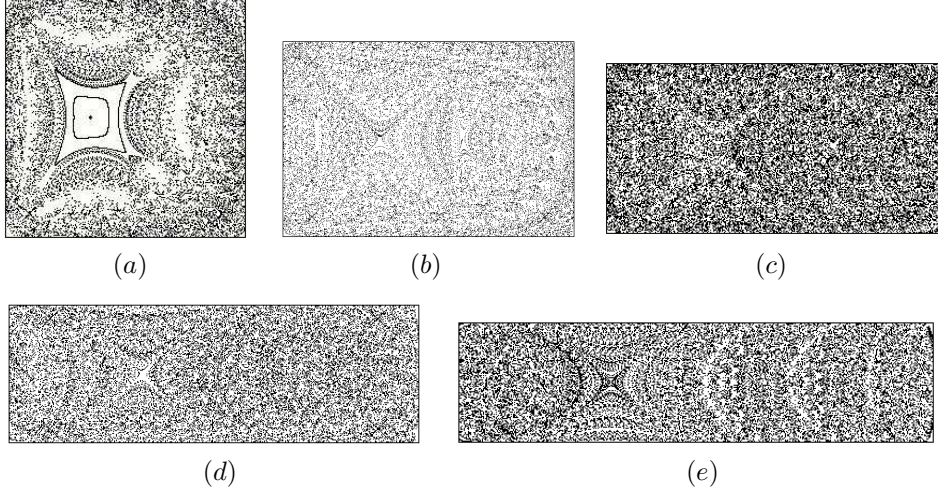


FIG. 10: Comparison of different aspect ratios from squared to rectangular geometry, for protocol A, $T = 4s$: (a), square; (b), rectangle 3:2; (c), rectangle 2:1; (d), rectangle 3:1; (e), rectangle 4:1.

concerning protocol A, since mixing is not very good, neither in the circle nor in the square: the very robust regular region for protocol A, $T = 4s$, seen in the 2D or 3D calculations (figures 8(e) and 4(a)) and in the experiment (figure 4(c)) of the *squared* geometry, also present in the circular geometry (figure 8 (d)), has totally disappeared in the *rectangular* geometry, both in the 2D calculations and in the experiment (figures 8(f) and 6(b)). For the larger period $T = 10s$ (also protocol A), the very large islands seen in the circle and the square (figures 8(g) and (h)) have a much more limited extent in the rectangular geometry. In fact, we performed many 2D calculations, but we could hardly find cases with regular regions (except for large periods of protocol A, where a fluid particle at the center is always swallowed into a sink after a source/sink phase, and always comes back to its initial position when swallowed up) – although we will show two particular cases (one for each protocol) where some small islands are indeed still present.

We wanted to know whether the fact that mixing was best in the rectangular geometry was robust with respect to the aspect ratio of the rectangle, or else if we had just been lucky with the rectangle having a 2:1 aspect ratio: on figure 10 are shown different Poincaré sections, for the same case protocol A, $T = 4s$, from the square geometry to rectangles with aspect ratios ranging from 3:2 to 4:1. In all rectangular Poincaré sections, the regular island is not present (although all of them present the same star-shaped region where the repartition of points is not completely homogeneous), as if the topology of chaos did depend

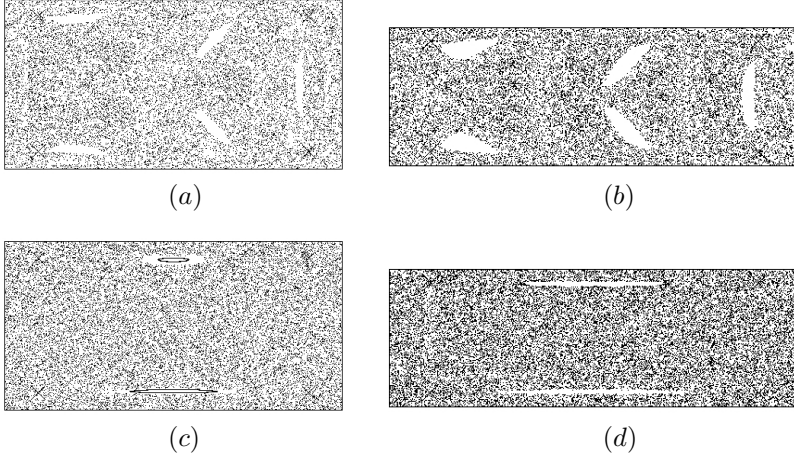


FIG. 11: Poincaré sections : comparison 2:1 / 3:1 rectangular chamber for protocol A with $T = 8$ s ((a) and (b)), protocol B with $T = 14$ s ((c) and (d)). We chose in purpose cases where small regular regions did exist.

much on the geometry (circular, squared or rectangular) but almost not on the aspect ratio of the rectangle. A similar conclusion can be drawn when looking on figure 11, where the small regular islands seen both for protocol A with $T = 8$ s or protocol B with $T = 10$ s are topologically similar in the 2:1 and 3:1 rectangles.

We could calculate the Lyapunov exponent for both protocols and each geometry (circle, square, rectangle 2:1). The results are shown on figure 12, where the black symbols represent protocol B, while the empty symbols are for protocol A: surprisingly, although the Lyapunov exponent depends much on the protocol, it seems not to depend much on the geometry—it might be slightly above in the rectangular case for $T < 8$ s, but is also slightly below for $T > 8$ s, although the Poincaré sections always show a much better chaos—. Moreover, the maximum of the Lyapunov exponent (the smallest period tested $T \simeq 0.25$ s for protocol B, and $T \simeq 0.5$ s for protocol A) is not representative of a good mixing: the stirring is important, but in a restricted chaotic domain. We can conclude that the Lyapunov exponent is quite robust with respect to the protocol (in accordance also with figure 7, where the values of the Lyapunov exponents obtained from either 2D or 3D calculations are very close to each other); however, as it is well known, the value of the Lyapunov exponent does not provide by itself a relevant quantity to decide between different geometries.

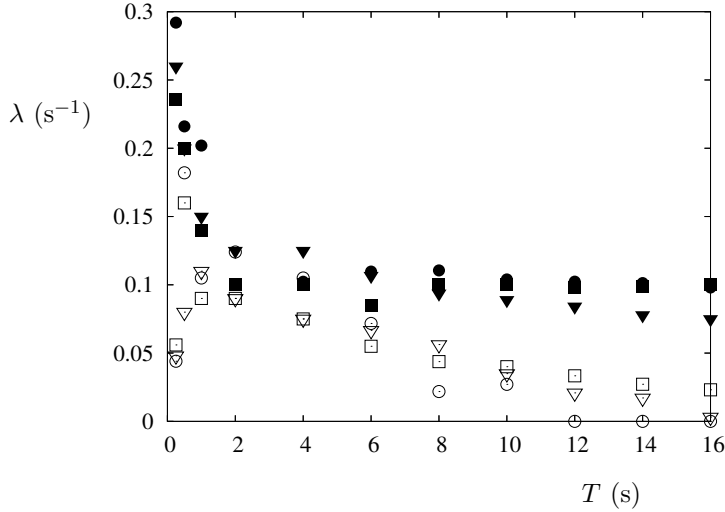


FIG. 12: Lyapunov exponent λ . Full symbols: protocol B; empty symbols: protocol A. Squared symbols: squared geometry; circles: circular geometry; triangles: rectangular geometry. Therefore: (∇) rectangle + protocol A, (\blacktriangledown) rectangle + protocol B, (\square) square + protocol A, (\blacksquare) square + protocol B, (\circ) circle + protocol A, (\bullet) circle + protocol B.

C. Topological entropy

As mentioned at the end of the previous section, there is a need to find a different *quantitative* parameter which could help decide on whether the rectangular geometry indeed leads to more efficient mixing than squared or circular shapes. Recently, Stremler and Cola [15] used the topological entropy [21] as a quantitative tool to measure chaos. This quantity is rather difficult to calculate, but the authors used the property that says that *in the ergodic case* – that is when a fluid particle wanders in the whole domain in a sufficiently erratic way, so that the chaotic regions of the Poincaré section are quite homogeneous –, the topological entropy is equal to the fraction of surface covered *by a single trajectory*, multiplied by the corresponding Lyapunov exponent [21].

Calculating the fraction of covered area is not as straightforward and easy as it may appear at first sight, so we presently let apart the case of the circular geometry, which led to additional difficulties, and focused on the squared or rectangular case. As seen before, the

Lyapunov exponent depends poorly on the geometry of the chamber, so that the topological entropies for different geometries should follow more or less the behavior of the filling rate of the sections. However, for very small periods the value of the filling rate is low, even for protocol B, while for the same protocol the Lyapunov exponent is a decreasing function of the period (figure 12); therefore we could wonder whether the product of the filling rate by the Lyapunov exponent would present a maximum that could be interpreted as an indicator of the optimum of the mixing period. However, if we consider the case of two Poincaré sections, the first one with global chaos, the second half filled, but with a Lyapunov exponent twice as large in the first one: both have the same topological entropy, but in the mixing point of view, the first one is undoubtedly more interesting! Therefore the use of the topological entropy should be restricted to cases with Poincaré sections of rather equivalent filling rate. Note also that the filling of the chaotic area of the Poincaré section is not really homogeneous for small periods, and therefore it is not clear whether the definition of the topological entropy as the product of filling rate by Lyapunov exponent still has a sense in that cases (what is the filling rate of an ensemble of points that have quasi-regular patterns such as the ones visible on figure 8(a-c) for instance?).

On figure 13(a) is shown the filling rate of the Poincaré section as a function of the period, for both protocols in the square and rectangle 2:1, calculated using a single fluid particle followed for at least 10.000 periods. In accordance with the aspect of the Poincaré section, the filling rate is nearly always higher in the rectangular geometry. When multiplied by the Lyapunov exponent, the topological entropy is obtained, as shown in figure 13(b): concerning protocol B, no maximum was found, neither in the square nor in the rectangle; as for the Lyapunov exponent, the quantity is decreasing with time, greater for the rectangle than for the square for $T < 8$ s, and lower thereafter. It is clear though that the smallest periods are not those associated with the best chaos, as seen on figures 9(a), (b) and (c) for protocol B, $T = 1$ s. In the case of protocol A however, a maximum exists for the topological entropy, located at $T \simeq 2$ s for the square (which corresponding Poincaré section can be seen on figure 5(b)), and $T \simeq 4$ s for the rectangle (figure 8(f)). This may indeed correspond to an optimal period for mixing in the rectangle, but inspection of figure 5(b) clearly reveals that this is not true in the case of the square. Also, the comparison between the square and the rectangle shows only a slight difference between both, although the filling rate proves that chaos is much more extended in the rectangle for this protocol. Therefore, the use of the topological

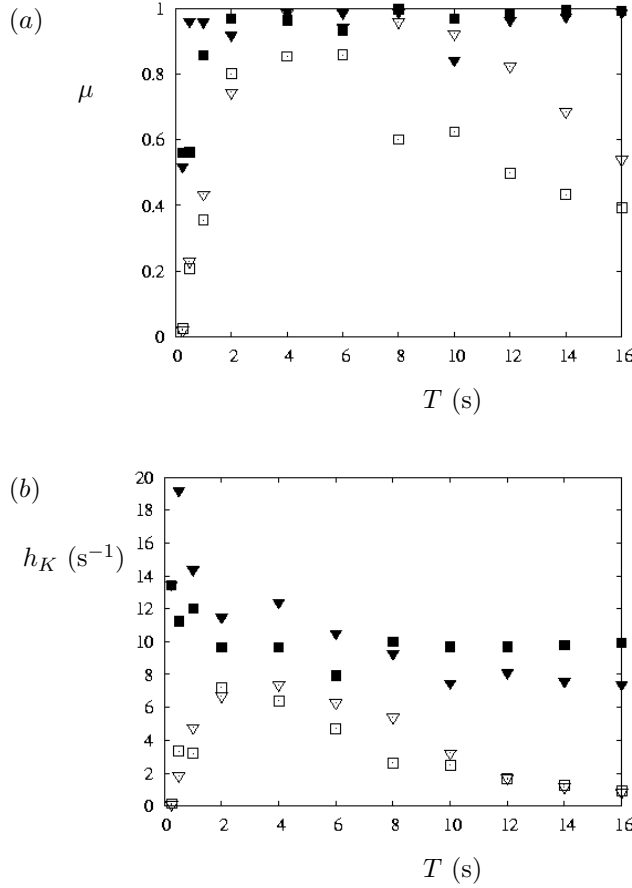


FIG. 13: (a) : Filling rate μ and (b) : Topological entropy $h_K = \mu \times \lambda$ (in seconds $^{-1}$) as a function of the period of the flow T (in seconds). Full symbols: protocol B; empty symbols: protocol A. Squared symbols: squared geometry; triangles: rectangular geometry. Therefore: (∇) rectangle + protocol A, (\blacktriangledown) rectangle + protocol B, (\square) square + protocol A, (\blacksquare) square + protocol B.

entropy, calculated as the product of filling rate of the Poincaré section multiplied by the Lyapunov exponent, even if giving some interesting quantitative information, is not totally convincing...

D. Discussion

The *protocols* have approximately the same symmetries for the different geometries: in the case of protocol A the equations of the trajectories in the 2D or 3D flow are invariant under

the change of variables $t \rightarrow -t$, $x \rightarrow x$, $y \rightarrow -y$, $z \rightarrow z$. This implies that the Poincaré sections $P_{t=0}$, corresponding to the accumulated periodic positions of particles, starting at $t = 0$, are invariant under reflection in the plane $y = 0$. In the square, a translation in time $t \rightarrow t + T/4$ leaves the flow unchanged after rotation of angle $-\pi/4$, and the Poincaré section $P_{t=T/4}$ is obtained from the Poincaré section $P_{t=0}$ by a rotation of angle $-\pi/4$; this is of course not true anymore in the rectangle, but if now we consider the translation in time $t \rightarrow t + T/2$, two consecutive rotations of angle $-\pi/4$ are equivalent to a rotation of angle π , which is also a point symmetry. One can check that this last symmetry is also present in the rectangular geometry. In the case of protocol B, one can check similarly that the invariance of particle trajectories under $t \rightarrow -t$, $x \rightarrow -x$, $y \rightarrow y$, $z \rightarrow z$ implies that the Poincaré sections $P_{t=0}$ are invariant with respect to reflection in the plane $x = 0$. The translation in time $t \rightarrow t + T/2$ leaves the flow unchanged after reflexion in the plane $y = 0$, which implies that the Poincaré section $P_{t=T/2}$ is, in all the geometries studied here, obtained from the Poincaré section $P_{t=0}$ by reflection in y . Therefore, the improvement of results seen in the Poincaré sections in the rectangle does not result from a breaking of symmetry in the combined effect of protocol and new geometry.

Recently, Hertzsch *et al.* showed that flows generated by source-sink pairs could be studied as “Linked Twist Map” (LTM) [17]. They proposed a simplified kinematic model, using unidirectional flows of the type $v_x = f(y)$, $v_y = 0$, crossed periodically with their orthogonal homologous, $v_x = 0$, $v_y = f(x)$. They show and explain that optimal chaos is found when f is monotonic (velocity field of the shear type). The central idea of their article was to construct crossed periodic flows having properties as close as possible to those of the ideal model, i.e., (I) crossing of streamlines as orthogonal as possible, and (II) velocity field as close to monotonous as possible. To this end they proposed to break the symmetry of the twist functions by positioning the source-sink pairs away from an axis of symmetry of the domain (a circle in their case, for which the axis of symmetry is a diameter); this had the effect of reducing the non-monotonicity of the velocity profile. Note that, like in the present study, this symmetry breaking in the velocity profile did not result in a change of symmetry in the Poincaré sections (an axial symmetry remained, as for the other protocols studied in their paper, one of which was our protocol A). We tried to test properties (I) and (II) on our different geometries.

On figure 14 are shown superimposed streamlines for the two source-sink pairs for the

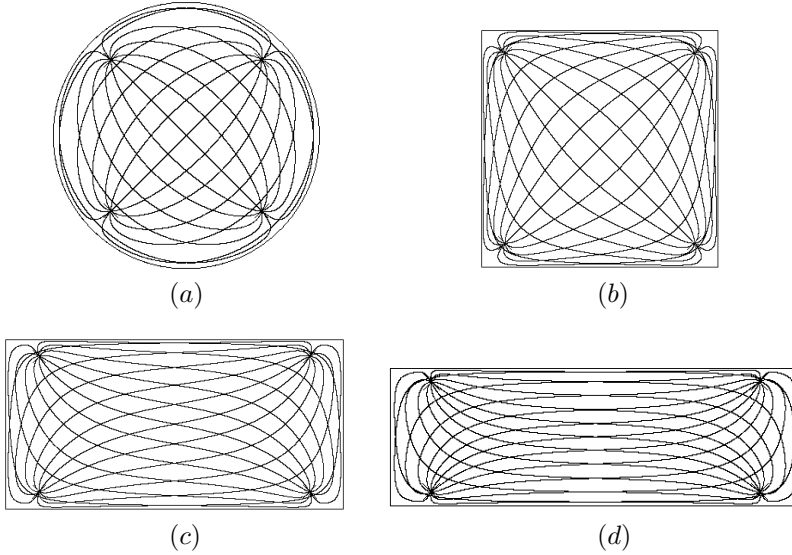


FIG. 14: Superpositions of streamlines created independently by the two source-sink pairs.

different geometries. In all cases the streamlines are close to tangential near the boundaries. In the central region however, the greatest transversality is found in the circular and squared geometry, where streamlines are close to orthogonality. Therefore, we should expect those two geometries to mix better than the rectangles. In the case of the rectangle 3:1 (figure 14(d)), the situation is even worse, since the streamlines in the central region are nearly tangential. In their article, Hertzsch *et al.* had found such a case (which they called protocol 3b), where their kinematic model with streamlines perpendicular everywhere gave results not as good as the corresponding source-sink model. In our case like in theirs, loss of transversality works in favor of mixing, rather than against it.

We therefore tried to find out whether the flow-field in the rectangular geometry was more monotonous than in the square or the circle. It is quite difficult to compare velocity profiles since the flow is not unidirectional, but we can compare the time needed to go from the source to the sink on each streamline instead. To this end, let us come back to figure 3 where streamlines of a source-sink pair are shown for the different geometries: for a given phase with a source-sink pair, let us consider the segment joining the two other corners, that we will chose as our axis of reference. We graduate it from $-c$ to $+c$, where c is the distance from the center to one corner ($c = D/2$ for the circle, and $c = \sqrt{a^2 + b^2}/2$ for the square and

rectangles, a and b being the size of the corresponding sides). Note that in the rectangle, after the Schwarz-Christoffel transformation, the source-sink pair is, as for the square, still aligned with the corresponding corners. Let us denote by $\tau(w)$ the time needed to join a sink starting from the source ($-c \leq w \leq c$). In the circle and the square, the streamlines are symmetric with respect to any line joining a source and a sink; therefore $\tau(w)$ is a symmetric function, and is absolutely not monotonic. In the off diameter source-sink model proposed by Hertzsch et al. in a circle [17], $\tau(w)$ was dissymmetric, and much closer to a monotonic function. In the rectangle however, although the two symmetries with respect to the lines joining a source-sink pairs do not hold, the streamlines are clearly symmetric with respect to the center. This implies that $\tau(w)$ is, as for the circle or the square, a symmetric function, therefore not monotonic either...

We conclude that the only reason for the improvement of mixing in the rectangular geometry is the loss of symmetry of the streamlines themselves. The line joining the source and the sink is no more a streamline of the corresponding flow. Instead, the streamline that goes through the center point wanders from one side of this line to the other, all the more as the rectangle has a large aspect ratio. This last point could explain also why, although superimposed streamlines are even more tangential when the aspect ratio of the rectangle is increased, mixing remains good, and the Poincaré section mostly unchanged.

IV. SUMMARY AND CONCLUSION

In this article we compared different geometries of Hele-Shaw cells, in order to improve chaotic mixing in DNA chips hybridization chambers. To this end we used two different mixing protocols that relied on chaotic advection. We first introduced our 2D model, using the depth-average velocity field, which in a Hele-Shaw flow is solution of the Euler equation. Therefore it could be calculated analytically for a source-sink flow, first in a circle, and in a square or rectangle thereafter with a Schwarz-Christoffel transformation. The model was validated using various Poincaré sections in a square, that qualitatively matched our previous 3D calculations. As a more quantitative tool, 2D and 3D Lyapunov exponents were also compared, with good agreement. We thus could show that mixing in the rectangular geometry was nearly always best (better filling of the Poincaré sections, usually higher Lyapunov exponents, higher topological entropy), whatever the protocol used. The result did not depend much on the aspect ratio of the rectangle.

We tried to find out whether the improvement in mixing in the rectangle could be relied to loss of symmetry in the protocols compared to squared or circular geometry, with no success. Then we searched for properties proposed by Hertzsch et al. in order to approach more ergodic systems, namely increase in transversality of superimposed streamlines, and monotonicity of the velocity profile, but this study revealed that the profile was no more monotonic in the rectangle than in the square or the circle, and that, on the contrary, the streamlines were even less perpendicular. We then concluded that the only reason for this improvement was the loss of symmetry in the streamlines for a source-sink flow in the rectangular geometry: whereas in the square or the circle they present two axes of symmetry, in the rectangle only a point symmetry remains. More specifically, the line joining the source and the sink is no more a streamline in the rectangle.

This improvement in mixing in the rectangular geometry is all the more important in practice as most DNA chips are manufactured on microscope lids, which are of rectangular shape.

APPENDIX A: VELOCITY FIELD

In order to obtain the flow in the squared or rectangular domain, the velocity field is first easily calculated in a circular chamber using the Milne-Thomson theorem. Let $v_x(x, y)$ and $v_y(x, y)$ the components of the velocity-field at point (x, y) . The complex velocity-field $w_c(z)$ is

$$w_c(z) = v_x(x, y) - i v_y(x, y) \quad (\text{A1})$$

where i is the natural base of complex numbers, defined as $i^2 = -1$, and $z = x + i y$. In a circular cavity of radius R , the flow of rate q created by one pair source/sink in opposition at length βR from the center of the cavity is:

$$w_c(z) = \frac{q}{2\pi} \left(\frac{1}{z + \beta R} - \frac{1}{z - \beta R} + \frac{1}{z + R/\beta} - \frac{1}{z - R/\beta} \right) \quad (\text{A2})$$

Then a Schwarz-Christoffel function g , adapted to the transformation of a circle into a square or rectangle, is calculated [20, 24]: let k and λ be solutions of equation:

$$\frac{K(k)}{a} = \frac{K(\sqrt{1-k^2})}{b} = \frac{\lambda}{2}, \quad (\text{A3})$$

where K is a Jacobi function[25] and a and b the lengths of sides of the squared (or rectangular) cavity. Then g is defined as:

$$g(z) = \frac{\text{sn}(\lambda z/2, k) \text{dn}(\lambda z/2, k)}{\text{cn}(\lambda z/2, k)}, \quad (\text{A4})$$

where sn , cn and dn are elliptical functions [25].

Finally, the velocity field $w_r(z)$ inside a square (or rectangular) shape is defined as:

$$w_r(z) = w_c(g(z)) \times \frac{dg}{dz}. \quad (\text{A5})$$

APPENDIX B: STUDY OF THE PERIOD-7 PERIODIC POINT IN FIGURE 5(d)

We describe here briefly how the regular region that wanders in the whole squared domain in figure 5(d) returns to its initial position after 7 periods, while only three identical regions are seen on the Poincaré section. Consider figure 15: protocol A consists in four phases per period; during the first one, denoted by phase 1 (resp. 2, 3 and 4), the active couple is I and its opposite hole, the sink being I (resp. II , III and IV). For this set of parameter,

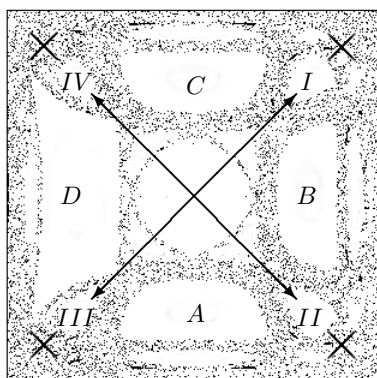


FIG. 15: Sketch of the velocity field for the Poincaré section corresponding to protocol A, $T = 10$ s in the square: during phase 1 (respectively 2, 3 or 4), the sink is I (respectively II , III or IV), the source is at the opposite corner.

a fluid particle located at A (respectively D) is mapped into B (respectively C) during this phase, and a fluid particle located at B or C is swallowed down into pipe I. We remind that a fluid particle is swallowed up at exactly the same location as where it was before being swallowed down. We can therefore follow a fluid particle initially at position A , knowing that each period is composed of the four phases 1, 2, 3 and 4.

1st period: $A \rightarrow B \rightarrow II \rightarrow II \rightarrow B$.

2nd period: $B \rightarrow I \rightarrow I \rightarrow B \rightarrow C$.

3rd period: $C \rightarrow I \rightarrow I \rightarrow C \rightarrow IV$.

4th period: $IV \rightarrow IV \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow IV$.

5th period: $IV \rightarrow IV \rightarrow D \rightarrow III \rightarrow III$.

6th period: $III \rightarrow D \rightarrow A \rightarrow III \rightarrow III$.

7th period: $III \rightarrow A \rightarrow II \rightarrow II \rightarrow A$.

Therefore, there are indeed seven identical regular regions in the Poincaré section, three of which are visible in the section, two inside pipe IV, two others inside pipe III.

-
- [1] H. A. Stone, A.D. Stroock, and A. Ajdari. Engineering Flows in Small Devices: Microfluidics Toward Lab-on-a-Chip. Annu. Rev. Fluid. Mech., 36:381–411, 2004.
 - [2] H. Aref. Stirring by chaotic advection. J. Fluid Mech., 143:1–21, 1984.
 - [3] S. Wiggins. Global Bifurcations and Chaos: analytical methods. Springer-Verlag, New-York, 1988.
 - [4] J.M. Ottino. The Kinematics of Mixing: Stretching, Chaos and Transport. Cambridge University Press, New-York, 1989.
 - [5] Valerie Toussaint, Philippe Carriere, and Florence Raynal. A numerical eulerian approach to mixing by chaotic advection. Physics of Fluids, 7(11):2587–2600, 1995.
 - [6] Abraham D. Stroock, Stephan K. W. Dertinger, Armand Ajdari, Igor Mezic, Howard A. Stone, and George M. Whitesides. Chaotic Mixer for Microchannels. Science, 295(5555):647–651, 2002.
 - [7] Nature Genetics, 32(1):1–60, 2002. supplement.
 - [8] R. T. Pon and S. Yu. Linker phosphoramidite reagents for the attachment of the first nucleoside to underivatized solid-phase supports. Nucl. Acids Res., 32:623–631, 2004.
 - [9] A. E. Nkodo, J. M. Garnier, B. Tinland, H. Ren, C. Desruisseaux, L. C. McCormick, G. Drouin, and G. W. Slater. Diffusion coefficient of DNA molecules during free solution electrophoresis. Electrophoresis, 22(12):2424–2432, 2001.
 - [10] C. J. Schaupp, G. Jiang, T. G. Myers, and M. A. Wilson. Active mixing during hybridization improves the accuracy and reproducibility of microarray results. BioTechniques, 38(1):117–119, 2005.
 - [11] F. Raynal, F. Plaza, A. Beuf, Ph. Carrière, É. Souteyrand, J.-R. Martin, J.-P. Cloarec, and M. Cabrera. Study of a chaotic mixing system for DNA chip hybridization chambers. Physics of Fluids, 16(9):L63–L66, 2004.
 - [12] F. Raynal, A. Beuf, F. Plaza, Julian Scott, P. Carriere, M. Cabrera, J.-P. Cloarec, and E. Souteyrand. Towards better DNA chip hybridization using chaotic advection. Physics of Fluids, 19(1):017112, 2007.
 - [13] M.K. McQuain, K. Seale, J. Peek, T.S. Fisher, S. Levy, M.A. Stremler, and F. Haselton. Chaotic mixer improves microarray hybridization. Analytical Biochemistry, 325:215–226,

2004.

- [14] M. A. Stremler, F. R. Haselton, and H. Aref. Designing for chaos: applications of chaotic advection at the microscale. Phil. Trans. R. Soc. Lond. A, 362:1019–1036, 2004.
- [15] M. A. Stremler and B. A. Cola. A maximum entropy approach to optimal mixing in a pulsed source–sink flow. Physics of Fluids, 18(1):011701, 2006.
- [16] B. A. Cola, D. K. Schaffer, T. S. Fisher, and M. A. Stremler. A pulsed source-sink fluid mixing device. Journal of Microelectromechanical Systems, 15(1):259–266, 2006.
- [17] J.-M. Hertzsch, R. Sturman, and S. Wiggins. DNA microarrays : Design principles for maximising chaotic, ergodic mixing. Small, 2007.
- [18] R. Sturman, J.M. Ottino, and S. Wiggins. The Mathematical Foundations of Mixing. Cambridge University Press, 2006.
- [19] S.W. Jones and H. Aref. Chaotic advection in pulsed source-sink systems. Phys. Fluids, 31(3):469–485, 1988.
- [20] L. M. Milne-Thomson. Theoretical Aerodynamics. Dover Publications, inc., 1958.
- [21] A. J. Lichtenberg and M. A. Lieberman. Regular and Chaotic Dynamics, 2nd ed. Springer, New York, 1992.
- [22] Milton Van Dyke. An Album of Fluid Motion. The Parabolic Press, Stanford, CA, 1982.
- [23] Taneda S. Visualization of separating stokes flows. J. Phys. Soc. Jpn, 46:1935–1942, 1979.
- [24] L. M. Milne-Thomson. Theoretical Hydrodynamics. M Editions, 4th edition edition, 1968.
- [25] M. Abramowitz and I. A. Stegun. Handbook of Mathematical Functions. Dover Publications, 1968.

2.3 Présentation du Rosamix

En accord avec nos résultats numériques et expérimentaux, la société Rosatech a construit un dispositif de mélangeur microfluidique automatique appelé Rosamix, dont une photo se trouve sur la figure 2.5 et dont le principe de fonctionnement est montré sur la figure 2.6.

La chambre est de forme rectangulaire : elle est formée d'un couvercle avec un joint qui s'appuie sur la puce directement fabriquée sur une lame de microscope. Ce dispositif utilise le principe de l'advection chaotique, mais avec un protocole de mélange qui diffère très légèrement du protocole B discuté dans cette partie (pour des raisons techniques) : les deux pompes ont été remplacées par une pompe unique associée à des valves microfluidiques. Ainsi, le mode de réinjection des cibles dans la chambre est très légèrement modifié. En revanche, le champ des vitesses dans la chambre (lignes de courant croisées tous les $T/2$) est totalement identique à celui du protocole B.

Les avantages d'un tel dispositif par rapport à une hybridation statique sont que :

- celui-ci est entièrement automatisé (remplissage, hybridation, lavage),
- une étape de lavages post-hybridation est incluse,
- une étape de décontamination est intégrée,
- le système est régulé en température,
- la chambre d'hybridation fait $50 \mu\text{L}$.

Les inconvénients sont les suivants (en cours d'optimisation) :

- ce système n'est pas intégré sur un laboratoire sur puce,
- le volume total (tuyaux inclus) fait $500 \mu\text{L}$!

À long terme, il serait utile d'intégrer ce "gros" système sur un laboratoire sur puce pour que l'ensemble du processus d'hybridation et celui d'analyse puissent cohabiter sur un même appareil.

Nous verrons dans le chapitre suivant un résultat d'hybridation issu de ce dispositif. Rosamix s'appelle maintenant TrayMix (société BioTray basée à Lyon).

Résumé du chapitre :

Pour que les puces à ADN fournissent le signal le plus fiable et le plus rapide possible, il est nécessaire de créer un écoulement afin que les cibles libres à tester puissent visiter toutes les sondes en temps raisonnable. Dans l'optique de limiter au maximum le volume de solution test à analyser, la puce est placée dans une chambre de faible hauteur (appelée cellule de type Hele-Shaw) ; l'écoulement y est alors laminaire et quasi-bidimensionnel. Dans ces conditions, la meilleure façon de mélanger consiste à créer un écoulement dépendant du temps : nous avons alors imaginé et étudié deux protocoles de mélange *périodiques en temps* .

Le protocole A utilise le principe d'injection alternée de fluide grâce à des seringues : pendant chaque période (période T), quatre phases d'injection (durée $T/4$) se succèdent et le fluide extrait par une seringue est réinjecté par la même seringue deux phases plus tard. Le protocole B (2 phases par période) utilise quant à lui des pompes pouvant réinjecter le fluide extrait dans le coin opposé de la chambre.

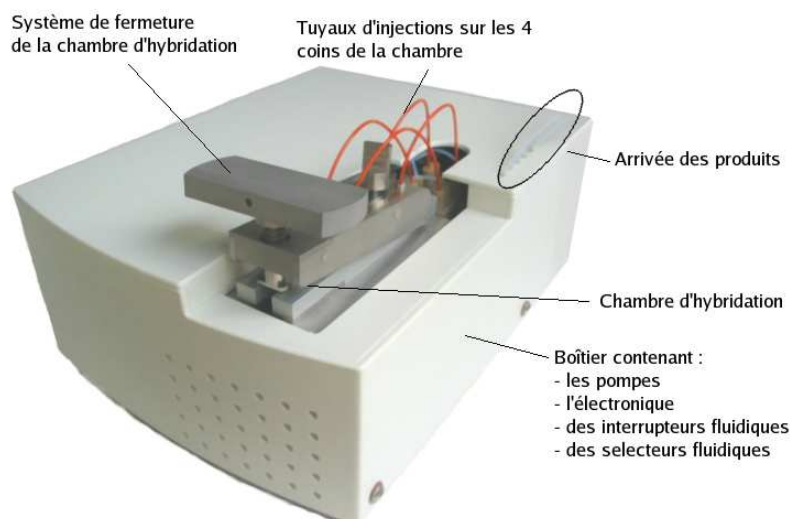


FIG. 2.5 – Photo du Rosamix (photo originale de Rosatech SA)

Pour connaître l'efficacité du mélange, il a d'abord fallu simuler les trajectoires des particules fluides. Ceci a été rendu possible grâce au calcul analytique du champ de vitesse : pour le trouver, il a fallu d'abord calculer (facilement) celui opérant dans une cavité circulaire grâce à l'approche potentielle du problème puis, grâce à une transformation de Schwarz-Christoffel, nous avons pu déduire l'écoulement ayant lieu dans une chambre carrée ou rectangulaire (avec différents rapports d'aspect).

L'étude paramétrique du mélange grâce aux sections de Poincaré, aux exposants de Lyapunov et à l'entropie de Kolmogorov-Sinai a montré que le protocole B associé à la géométrie d'une chambre rectangulaire apportait un excellent mélange tant du point de vue homogénéité sur toute la surface de la puce, que du point de vue rapidité de mélange (effectué en quelques dizaines de secondes seulement). D'autre part, un tel protocole est beaucoup plus robuste puisque la qualité de ce mélange dépend assez peu de la période T choisie. Ces constatations ont pu être vérifiées dans une expérience à l'échelle 10 :1, avec un très bon accord.

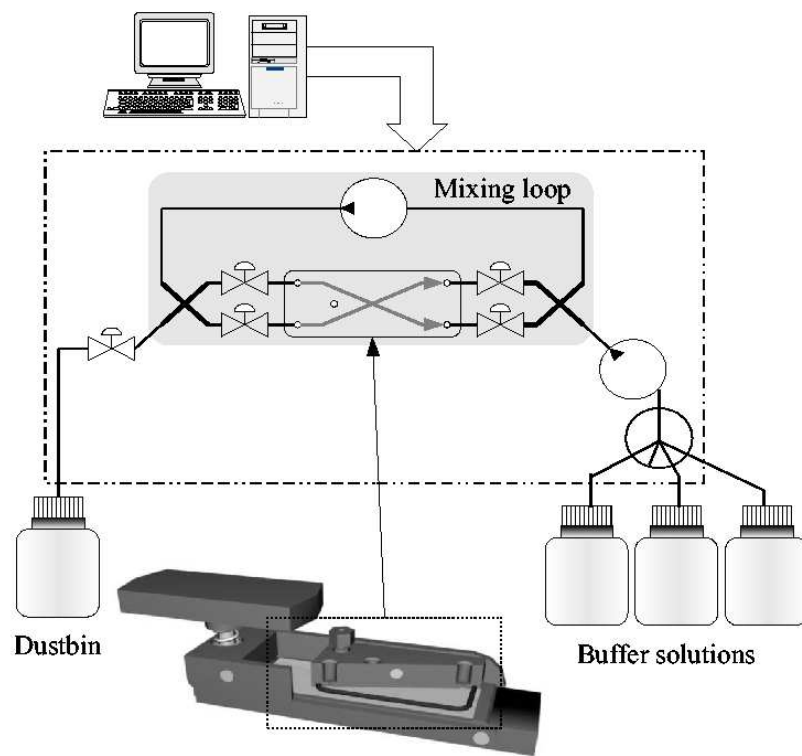


FIG. 2.6 – Principe du Rosamix (schéma original de Rosatech SA).

Chapitre 3

Modèle de réaction chimique couplé au mélange dans une chambre d'advection chaotique

Introduction

Si l'on s'est tellement focalisé sur l'efficacité du mélange dans le chapitre précédent, c'est parce que l'on souhaite trouver le mélangeur idéal, tel que chacune des cibles de monobrin d'ADN libre disposée en son sein puisse visiter et tester, via l'advection chaotique, chaque plot de sondes disponibles sur la surface d'une puce à ADN. Cependant, le transport de ces molécules libres peut s'arrêter s'il y a compatibilité entre la molécule libre et la molécule du substrat. Il y a alors réaction chimique sur le substrat et la cible n'est plus libre (hybridation).

Il est très difficile de modéliser la réaction d'hybridation sur support dans les moindres détails car le nombre d'interactions est très important : sondes/cibles, cibles/cibles, sondes/support, cibles/support etc... L'hybridation sur puce est en fait le résultat de plusieurs mécanismes simultanés difficilement dissociables, certains étant prépondérants par rapport à d'autres (figure 3.1).

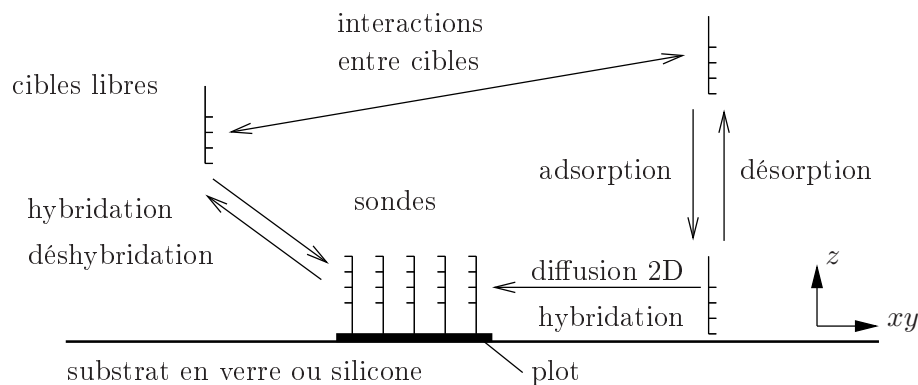


FIG. 3.1 – Les interactions moléculaires dans le cadre des puces à ADN

Plusieurs modèles de réaction d'hybridation sont présents dans la littérature ; ils vont du plus simple au plus compliqué. Les modèles numériques les plus complets, utilisés par Erickson et al. [60] puis Chan et al. [61], tiennent compte de plusieurs de ces phénomènes : réaction d'hybridation directe entre une sonde et une cible présente dans le volume, ou réaction d'adsorption non spécifique d'une cible sur la surface de la puce suivie ou non d'une réaction d'hybridation spécifique entre une sonde et une cible diffusant à la surface de la puce (voir figure 3.1). Erickson montre notamment que l'hybridation directe est beaucoup plus rapide que la réaction d'adsorption non spécifique en surface mais qu'à l'inverse, la réaction {adsorption + hybridation} a une rôle prépondérant par rapport à l'hybridation directe [60]. Au regard de ces résultats, d'autres auteurs, comme Gadgil et al. [62], s'affranchissent du phénomène d'adsorption pour se concentrer sur la diffusion des cibles qui limite grandement la cinétique.

Expérimentalement les auteurs considèrent que, du point de vue macroscopique (c'est à dire à l'échelle de l'expérimentateur), une cible s'hybride avec une sonde (quel que soit le processus microscopique réel) donnant un complexe, qui lui même peut aussi se déshybrider. Cette réaction inverse est toutefois moins facile, puisque l'étape d'hybridation microscopique est irréversible dans les faits, mais ce modèle a le mérite de tenir compte de la désorption des cibles simplement adsorbées sur la surface de la puce. Les auteurs écrivent donc :



où S représente une sonde immobilisée, C une cible libre et SC le complexe hybridé, avec $k_a \gg k_d$. Ce modèle simple est adapté d'un modèle d'adsorption de gaz sur une surface appelé modèle de *Langmuir*. C'est pourquoi l'utilisation de ce terme est parfois maladroite (par exemple dans [63]) où le terme *d'adsorption* (indice "a") désigne le sens \rightarrow et le terme *désorption* (indice "d") désigne le sens \leftarrow .

Dans la littérature, la vitesse de cette réaction est généralement définie par le taux de disparition de l'un des réactifs (cibles libres ou de sondes non hybridées), ou par le taux de création du produit (les paires hybridées ici). Dans l'hypothèse d'une cinétique d'ordre 1 (largement vérifiée dans la littérature), les auteurs écrivent souvent trop rapidement, en se basant sur le cas de réactions se déroulant *en volume* et en supposant que les concentrations soient spatialement homogènes :

$$-\frac{d[C]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[SC]}{dt} = k_a[S][C] - k_d[SC] \tag{3.2}$$

où k_a et k_d sont respectivement les constantes de vitesse de la réaction d'hybridation et de déshybridation, et $[.]$ indique les concentrations molaires volumiques des substances.

Or ces auteurs semblent oublier la véritable spécificité du processus d'hybridation sur les puces à ADN, à savoir que la réaction chimique entre une sonde et une cible libre du volume a lieu en *surface* de la puce. Ainsi, en supposant qu'à l'instant initial la répartition des cibles libres soit homogène dans tout le volume, il va y avoir, à mesure de l'avancement, un appauvrissement des cibles proches de la surface (autour des sondes). De ce fait, un gradient de concentration va apparaître, et un flux diffusif de cibles va se mettre en place entre le volume de la chambre d'hybridation et la puce. C'est ce flux diffusif dont les auteurs, pour la plupart, ne semblent pas avoir tenu compte dans les équations.

Pour bien comprendre les phénomènes qui interviennent dans le réacteur, il est donc nécessaire

de bien dissocier les phénomènes qui ont lieu en surface de ceux du reste de la chambre. Nous allons donc définir deux nouvelles notations pour les concentrations : $[.]^{\text{loc}}$ sera la concentration locale, et $[.]^{\text{moy}}$ sera la concentration moyenne sur tout le volume. Lorsque seule la diffusion transportera les cibles vers la surface (hybridation statique), on aura toujours, pour une espèce donnée, $[.]^{\text{moy}} \neq [.]^{\text{loc}}$ (sauf si la réaction chimique est moins rapide que le temps caractéristique de transport par diffusion). Dans ce cas, l'équation 3.2 est fautive que l'on utilise la notation $[.]^{\text{loc}}$ (puisque'elle ne tient pas compte du *terme de diffusion*) ou que l'on utilise la notation $[.]^{\text{moy}}$ (puisque'elle décrit une variation des constituants dans le volume alors que la réaction a lieu en surface).

Ce constat change dès lors qu'un brassage efficace intervient dans la chambre : dans ce cas, on peut supposer que l'efficacité du mélangeur permette de rendre homogène à chaque instant les concentrations des espèces libres dans le volume. L'équation 3.2 devient alors valable puisque $[.]^{\text{moy}} = [.]^{\text{loc}}$ (la variation des constituants qui a lieu dans le volume reflète bien la variation qui a lieu en surface de la puce). L'équation régissant l'évolution des espèces s'écrit donc bien, sous couvert d'un processus de mélange efficace (tel que l'advection chaotique)¹ :

$$-\frac{d[C]_{\text{adv}}^{\text{moy}}}{dt} = -\frac{d[S]_{\text{adv}}}{dt} = \frac{d[SC]_{\text{adv}}}{dt} = k_a[S]_{\text{adv}}[C]_{\text{adv}}^{\text{moy}} - k_d[SC]_{\text{adv}} \quad (3.3)$$

Dans ce cadre, en supposant que toutes les sondes soient non appariées à l'instant initial de la réaction, la conservation des cibles impose :

$$[C]_{\text{adv } 0}^{\text{moy}} = [C]_{\text{adv}}^{\text{moy}}(t) + [SC]_{\text{adv}}(t) \quad (3.4)$$

où $[.]_0$ est la concentration de l'espèce à l'instant $t = 0$. Il vient donc :

$$-\frac{d[C]_{\text{adv}}^{\text{moy}}}{dt} = k_a[S]_{\text{adv}}[C]_{\text{adv}}^{\text{moy}} - k_d([C]_{\text{adv } 0}^{\text{moy}} - [C]_{\text{adv}}^{\text{moy}}) \quad (3.5)$$

Si les sondes sont très majoritaires devant le nombre de cibles libres, $[S]_{\text{adv}} \approx [S]_{\text{adv } 0}$, donc :

$$-\frac{d[C]_{\text{adv}}^{\text{moy}}}{dt} = (k_a[S]_{\text{adv } 0} + k_d)[C]_{\text{adv}}^{\text{moy}} - k_d[C]_{\text{adv } 0}^{\text{moy}} \quad (3.6)$$

qui a pour solution une exponentielle décroissante :

$$[C]_{\text{adv}}^{\text{moy}} = \left([C]_{\text{adv } 0}^{\text{moy}} - [C]_{\text{adv}}^{\text{moy}} \text{équilibre} \right) e^{-\frac{t}{\tau_k}} + [C]_{\text{adv}}^{\text{moy}} \text{équilibre} \quad (3.7)$$

$$\frac{1}{\tau_k} = k_a[S]_{\text{adv } 0} + k_d \quad (3.8)$$

$$[C]_{\text{adv}}^{\text{moy}} \text{équilibre} = \frac{k_d [C]_{\text{adv } 0}^{\text{moy}}}{k_a[S]_{\text{adv } 0} + k_d} \quad (3.9)$$

¹Dans le cas général, les équations locales vérifient (par exemple sur les cibles mobiles) :

$$-\frac{D[C]^{\text{loc}}}{Dt} = \underbrace{k_a[S]^{\text{loc}}[C]^{\text{loc}} - k_d[SC]^{\text{loc}}}_{\text{réaction chimique}} - \underbrace{D\Delta[C]^{\text{loc}}}_{\text{diffusion}}$$

où $D[.]/Dt$ représente la dérivée particulaire.

Comme expérimentalement $k_a[S]_0 \gg k_d$ (on trouve souvent dans la littérature $k_a \sim 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_d \sim 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ pour $[S]_0 \sim 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), alors $[C]_{\text{adv}}^{\text{moy}} \approx 0$. La disparition des cibles libres, sous l'hypothèse d'un excès initial de sondes par rapport aux cibles et d'une répartition homogène des réactifs à chaque instant grâce à un système de mélange, est donc exponentielle avec un temps de décroissance caractéristique τ_k donné par l'équation 3.8. C'est à partir de τ_k que l'on accède généralement aux valeurs de k_a et k_d .

Dans ce chapitre, nous allons étudier numériquement la rapidité chimique d'hybridation grâce à un modèle simple de capture lors de la phase d'hybridation : nous essaierons de retrouver la décroissance exponentielle dans le cas du mélange par advection chaotique et nous comparerons le gain en temps obtenu par rapport au cas d'hybridation statique (diffusion pure).

Pour bien comprendre le modèle de capture des cibles mobiles par les sondes que nous allons mettre en place, il faut bien comprendre les types d'interactions qui interviennent entre les molécules, et décrire plus spécifiquement celles qui interviennent entre deux brins d'ADN (nature, portée). C'est ce que nous allons détailler dans le paragraphe suivant².

3.1 Les interactions moléculaires.

Souvent en chimie, il peut y avoir une réaction chimique entre deux molécules soit parce que celles-ci entrent en collision (cette collision est alors responsable de la modification de la structure chimique des molécules à condition que les énergies mises en jeu soient compatibles), soit parce qu'il existe des interactions attractives entre elles qui, en dessous d'une certaine distance, permet la formation d'une nouvelle molécule. Dans les deux cas, il y a formation d'une liaison chimique (plus ou moins forte). Il existe plusieurs types de liaisons en chimie [8] :

- Les liaisons covalentes : ce sont des liaisons fortes entre les atomes d'une molécule et qui assurent la cohésion des métaux et des isolants. Dans le cas des molécules, on parle de liaisons *intramoléculaires*. Il est difficile de les rompre chimiquement (énergie de liaison de l'ordre de plusieurs centaines de kilojoules par moles). Leur existence s'explique à partir de la théorie des orbitales atomiques par la mise en commun de paires d'électrons entre les atomes. Ce sont les liaisons qui sont exclusivement responsables de la formations de molécules et des métaux. L'énergie de ces liaisons est de l'ordre de 200 à 800 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.
- Les liaisons intermoléculaires : tous les corps existent à l'état liquide, à l'état solide ou sous forme d'états plus ou moins condensés à plus ou moins basse température. Des forces sont donc nécessaires pour maintenir la cohésion des molécules constituant ces milieux non gazeux. Pour les métaux et les isolants, ce sont des liaisons de type covalentes qui assurent cette cohésion et, compte tenu de la force de ces liaisons, tous ces corps ont des points de fusion et d'ébullition élevés. En ce qui concerne les autres molécules, qui ont chacune leur individualité propre, elles n'ont aucune possibilité d'assurer des liaisons covalentes entre elles. Elles devraient donc se trouver à l'état gazeux, ce qui n'est évidemment pas le cas. Pour expliquer la cohésion de ces molécules dans leurs états condensés, il faut faire intervenir d'autres types de liaisons plus faibles que les liaisons covalentes puisque les températures de changement d'état sont plus basses. On parle de liaisons *intermoléculaires*.

Nous allons dans la suite décrire plus spécifiquement les types de liaison *intermoléculaires*.

²Le lecteur pressé peut se rendre directement au paragraphe traitant des liaisons hydrogènes, page 97.

3.1.1 Brève revue des liaisons intermoléculaires

Les interactions électrostatiques simples (forces coulombiennes)

Interaction entre ions [7][64] L'énergie d'interaction entre deux ions de charge z_1e et z_2e située à une distance r est :

$$U_{int}(r) = \frac{z_1 z_2 e^2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (3.10)$$

où z est la valence ionique, $e = 1.602 \times 10^{-19}$ C est la charge élémentaire, $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12}$ F.m⁻¹ est la permittivité du vide.

C'est une force *intense* et à *longue portée*.

Interaction ion/dipôle [7][64] En prenant en compte la charge des noyaux et les densités électroniques, on peut simplifier les propriétés des molécules en les ramenant à des charges ponctuelles. À longue distance, une molécule apparaîtra sous forme d'une charge ponctuelle, égale à la somme algébrique des charges, et placée au barycentre de celles-ci. Si nous étudions des interactions à plus courte distance, l'assimilation du comportement électrique d'une molécule à une charge moyenne n'est plus suffisante, il faut compléter le modèle par l'introduction du moment dipolaire obtenu en prenant le barycentre des charges positives et celui des charges négatives. La molécule est alors assimilée à deux charges $+q$ et $-q$ situées à une distance d , et qui constituent un dipôle électrique.

Lorsqu'un ion de charge ze est en présence d'une molécule dipolaire, il y a attraction de la charge opposée du dipôle et répulsion de la charge de même signe, ce qui provoque une orientation du dipôle et une attraction de celui-ci par la charge. En phase liquide ou gazeuse, la mobilité des molécules due aux chocs conduit à faire la moyenne de l'énergie d'interaction. On obtient alors :

$$U_{cd}(r) = \frac{-z^2 e^2 \mu^2}{6(4\pi\epsilon_0)^2 k_B T r^4} \quad (3.11)$$

où μ est le moment dipolaire électrique, r la distance entre le centre du dipôle et l'ion, k_B est la constante de Boltzmann et T la température absolue.

Interaction dipôle/dipôle [7][64] Certaines molécules possèdent des dipôles électriques permanents (l'eau, H₂O). Quand ces molécules sont proches l'une de l'autres, les charges positives des dipôles électriques vont attirer les charges négatives, et les charges de même signe vont se repousser. Comme les molécules sont mobiles en phase liquide ou gazeuse, elles vont s'orienter de façon à acquérir l'énergie minimale qui est un état liant.

L'énergie de ce type de liaison à l'équilibre thermique, appelé interaction de Keesom, pour une paire de molécules dans le vide, est donnée par :

$$U_k(r) = -\frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 3k_B T r^6} \quad (3.12)$$

où μ_1 et μ_2 sont les moments dipolaires électrique permanents des deux molécules. On voit que cette énergie ne s'exerce qu'à courte distance, car elle varie en $1/r^6$. Ce type de liaison ne peut s'établir que si les molécules ont des raisons de se rapprocher.

Les interactions électrostatiques induites

Notion de dipôle induit [7][64] Tout atome (où molécule) est un assemblage de noyaux positifs et d'électrons négatifs. Quand la molécule est isolée dans le vide, ces charges sont dans un état d'équilibre électrostatique déterminé par les forces de liaison. Si l'on place ces molécules dans un champ électrique, les charges négatives seront déplacées dans un sens et les charges positives en sens opposé. Une relocalisation des charges va entraîner l'apparition d'un moment dipolaire électrique. Ce dipôle ainsi induit sera proportionnel au champ électrique. On écrit donc :

$$\vec{\mu}_i = \alpha \vec{E} \quad (3.13)$$

où μ_i est le moment dipolaire induit et α est la polarisabilité de la molécule.

Toutes les interactions impliquant des dipôles induits s'ajoutent systématiquement à toute les interactions présentées dans la paragraphe précédent.

Interaction charge/dipôle induit [7][64] Lorsqu'un ion est proche d'une molécule, il va engendrer dans celle-ci un dipôle électrique qui interagira avec la charge. L'énergie d'interaction charge/dipôle induit dans un liquide ou un gaz est donnée par :

$$U_{c\alpha} = -\frac{z^2 e^2 \alpha}{2(4\pi\epsilon_0)^2 r^4} \quad (3.14)$$

Interaction dipôle/dipôle induit [7][64] Si l'on met en présence une molécule portant un moment dipolaire permanent et une molécule non polaire, les charges électriques de ce dipôle permanent vont induire dans l'autre molécule un moment dipolaire qui va interagir avec le dipôle permanent de façon attractive pour créer une cohésion. Il en résulte une énergie d'interaction stabilisante. À l'équilibre thermique, pour un milieu mobile, l'énergie de liaison pour une paire de molécules est donnée par :

$$U_D(r) = -\frac{\alpha \mu^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (3.15)$$

Il s'agit d'une interaction à courte distance, mais qui ne dépend pas de la température.

Forces de dispersion de London [7][64]

Pour des molécules complètement apolaires, le barycentre des charges positives et celui des charges négatives ne sont jamais confondus à un instant donné t (bien qu'ils le soient en *moyenne*) à cause de mouvement continu du cortège électronique. Dans toute molécule, on peut donc supposer qu'il existe un dipôle instantané fluctuant très rapidement. Ce dipôle va induire dans la molécule voisine un dipôle induit instantané qui, par interaction dipôle instantané/dipôle induit, va créer une attraction instantanée fluctuante, dont la moyenne n'est pas nulle et contribue à assurer la cohésion de ces molécules. La calcul quantique montre que cette interaction n'est pas faible comme on le penserait intuitivement, elle constitue la contribution la plus importante des forces attractives.

Pour deux molécules identiques, l'énergie de dispersion de London prend alors la forme :

$$U_L(r) = -\frac{3\alpha_0^2 h\nu}{4(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (3.16)$$

où α_0 est la polarisabilité électronique de la molécule et ν une fréquence de vibration des charges électriques. On remplace souvent la valeur de $h\nu$ par l'énergie de première ionisation de l'atome ou de la molécule.

On retrouve ici le fait qu'il s'agit d'une interaction à courte distance en $1/r^6$ d'origine électrostatique.

Les forces répulsives [64][65]

Les interactions décrites précédemment permettent de concevoir une attraction intermoléculaire, mais, comme pour la liaison ionique, cette attraction va être arrêtée à un certain moment par les forces de répulsion. Les forces répulsives ont la même origine que les interactions covalentes, mais un signe opposé. Elles résultent du recouvrement des orbitales électroniques lorsque les molécules se rapprochent à très courtes distances. Selon le principe d'exclusion de Pauli les électrons ne peuvent pas occuper toute la région de recouvrement, la densité électronique y devient alors plus faible et les noyaux chargés positivement étant moins écrantés se repoussent mutuellement. Ces forces répulsives ont une très courte portée et une croissance extrêmement rapide lorsque les molécules se rapprochent.

Les liaisons intermoléculaires de Van der Waals

Toutes les interactions de nature électrostatiques décrites dans les paragraphes précédents sont attractives, mais à courte distance elles sont contrebalancées par les forces répulsives. Le calcul de l'énergie totale :

$$E_T(r) = U_{\text{attraction}}(r) + U_{\text{répulsion}}(r) \quad (3.17)$$

va conduire à un minimum d'énergie qui maintiendra les molécules à une certaine distance dans un état d'équilibre stable assurant la cohésion de l'ensemble.

La grande différence avec la liaison covalente vient de la très faible valeur de l'énergie au minimum et de la nature des forces attractives. Pour que les liaisons faibles conduisent à une liaison stable à une certaine température, il faut que les énergies soient supérieures à l'énergie d'agitation thermique $k_B T$. À température ordinaire, l'énergie d'agitation thermique vaut 2.48 kJ.mol^{-1} alors que les liaisons de Van Der Waals valent entre $0.10 k_B T$ et $3 k_B T$.

L'ensemble de ces liaisons sont souvent regroupées sous le nom de liaisons de Van der Waals, car elles expliquent, entre autres, l'écart du comportement normal par rapport à la loi des gaz parfaits.

La liaison hydrogène

On s'est aperçu qu'un certain nombre de molécules comme l'eau, les alcools, les acides, présentaient une énergie de cohésion très supérieure à ce que permettaient de prévoir les forces intermoléculaires précédentes. Cette énergie de cohésion vient de la liaison hydrogène. Celle-ci a une grande importance dans tous les systèmes biologiques (protéines). Elle est plus forte que les liaisons de Van der Waals, et se trouve comprise entre 10 et 40 kJ.mol^{-1} . On parle de force d'*association*.

Les chimistes ont remarqué que toutes les substances conduisant à une liaison hydrogène comportaient systématiquement un atome d'hydrogène lié en général à un élément très électronégatif, le fluor, l'oxygène ou l'azote.

Une description correcte simple des forces qui interviennent dans la liaison hydrogène n'est pas aisée. Il est clair que des forces électrostatiques participent largement à la formation de ce type de liaison (on estime que les 2/3 de la force sont d'origine électrostatique), mais les distances observées impliquent aussi un fort recouvrement d'orbitales, donc un certain caractère covalent.

L'existence d'un atome très électronégatif, lié à l'atome d'hydrogène, entraîne une délocalisation des charges, donc un moment dipolaire. Dans le cas de l'hydrogène, cette attraction du seul électron de l'atome a tendance à réduire le cortège électronique du noyau de cet atome, ce qui tend à diminuer la distance d'accès au noyau positif. Cette situation favorise ainsi une plus forte attraction des électrons des doublets des molécules voisines, puisque la distance d'attraction électrostatique est devenue très courte.

Ceci conduit à une forte attraction donnant une distance inter-atomique plus courte que la somme des rayons de Van der Waals, ce qui provoque ainsi un recouvrement partiel entre l'orbitale du doublet et l'orbitale 1s de l'hydrogène. Cette situation confère ainsi un caractère covalent partiel plus ou moins prononcé à ce type de liaison.

À noter que certaines grosses molécules sont aussi capables de réaliser des liaisons hydrogènes *intramoléculaires*, susceptibles par exemple de bloquer des conformations dans les molécules présentant potentiellement certaines flexibilités et empêchant toute participation à des liaisons hydrogènes externes à la molécule.

Intensités et portées comparées des interactions

Comme on peut le remarquer dans le tableau 3.1, excepté les interactions répulsives à très courte distance, toutes les autres interactions sont attractives (pouvant aller jusqu'à de très longue portée pour les interactions électrostatiques). Ce résultat important servira par la suite, notamment lors de la modélisation du phénomène d'hybridation.

3.1.2 Cas de l'ADN

Dans le cas présent de l'ADN, la grande spécificité qui existe entre un brin et son complémentaire est exclusivement liée aux liaisons hydrogène que chaque base peut spécifiquement réaliser avec sa base complémentaire (cf. chapitre 1) : la guanine et l'adénine ne peuvent réaliser que 2 liaisons hydrogène, alors que la cytosine et la thymine peuvent en réaliser 3 (fig. 3.2). Les interactions entre les deux brins sont donc intenses, et d'autant plus intenses que la longueur des brins – donc le nombre de bases azotées sur chaque brin – est grande. La portée des interactions évolue également dans ce sens, car plus la chaîne de nucléotides est grande, plus statistiquement des interactions entre bases peuvent se réaliser souvent (conduisant ou non à une hybridation).

3.2 Modélisation de la cinétique dans la chambre d'advection

3.2.1 Modélisation numérique d'une interaction moléculaire

Une fois connu le potentiel intermoléculaire, la dynamique d'un système classique est entièrement défini [66]. Le plus dur reste à trouver le potentiel qui s'approchera le plus du potentiel exact, ce dernier ne pouvant être totalement connu vu la complexité des phénomènes qui interviennent à l'échelle atomique dans les milieux condensés.

Origine	Intensité	Portée
<i>Répulsive</i>	Très intense	$\frac{1}{r^9}$ à $\frac{1}{r^{16}}$ Très courte
<i>Coulombienne</i> ion/ion	$\approx 300 k_B T$ Très intense	$\frac{1}{r}$ Très longue
ion/dipôle fixe	$\approx 100 k_B T$ Intense	$\frac{1}{r^2}$ Longue
ion/dipôle mobile	$\approx k_B T$ Moyenne	$\frac{1}{r^4}$ Moyenne
<i>Dipolaire</i> 2 dipôles fixes	$\approx k_B T$ Moyenne	$\frac{1}{r^3}$ Longue
2 dipôles mobiles	$< k_B T$ Faible	$\frac{1}{r^6}$ Courte
<i>Polarisation</i> ion/molécule non polaire	$\approx k_B T$ Moyenne	$\frac{1}{r^4}$ Moyenne
dipôle mobile/molécule non polaire	$< k_B T$ Faible	$\frac{1}{r^6}$ Courte
<i>Dispersion</i> 2 molécules non polaires (London)	$\approx k_B T$ Moyenne	$\frac{1}{r^6}$ Courte
<i>Association</i> liaisons H	$\approx 10 k_B T$ Intense	Moyenne

TAB. 3.1 – Intensités et portées comparées des interactions intermoléculaires [7][8]. À 298 K, $k_B T \approx 2.478 \text{ kJ.mol}^{-1}$

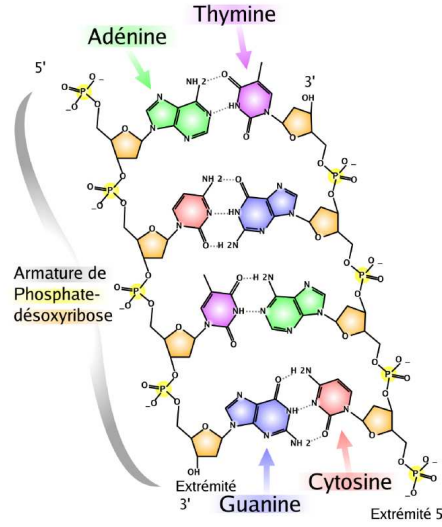


FIG. 3.2 – Ce sont les liaisons hydrogène qui sont responsables de la complémentarité entre les nucléotides. Les liaisons H ont une longueur de 2\AA , c'est à dire 0.2 nm.

Toute méthode de simulation commence donc par la constitution d'un modèle, qui peut être très rudimentaire, quitte à l'améliorer par la suite. Comme dans de nombreux travaux, notre modèle portera surtout sur le choix de la forme du potentiel d'interaction entre deux brins d'ADN.

Curieusement, l'un des premiers résultats les plus significatifs apportés par les méthodes de simulation a été de démontrer le rôle mineur joué par les détails du potentiel intermoléculaire quant à la structure et à la dynamique des molécules pour expliquer le comportement de la plupart des phases condensées.

Pour des systèmes monoatomiques, la classe la plus simple de potentiels – et celle généralement utilisée pour de nombreux systèmes en interaction – est celle du type de *Lennard-Jones n-6* (figure 3.3) :

$$U^{LJ} = 4E_0 \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^n - \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right] \quad (3.18)$$

L'énergie d'interaction ne dépend que des distances inter-atomiques et de trois paramètres : n le plus souvent pris égal à 12, E_0 tel que le minimum de potentiel est $-E_0$ (dans le cas $n = 12$ seulement), et r_0 le diamètre de collision. Cette courbe ne correspond précisément à aucun composé existant, à cause de la loi de puissance adoptée pour le terme répulsif et de l'absence de termes d'ordre supérieur à 6 dans le terme attractif.

Une amélioration est obtenue grâce au *potentiel de Morse*. Ce potentiel s'écrit :

$$U^{\text{Morse}} = D_e \left[\left(1 - \exp(-\beta(r/R_e - 1)) \right)^2 - 1 \right] \quad (3.19)$$

Cette énergie est souvent utilisée pour représenter l'interaction entre les brins d'ADN via les liaisons hydrogène [67], mais il traduit également bien les interactions répulsives des groupements phosphates entre chaque brins. La constante D_e représente l'énergie de dissociation des deux

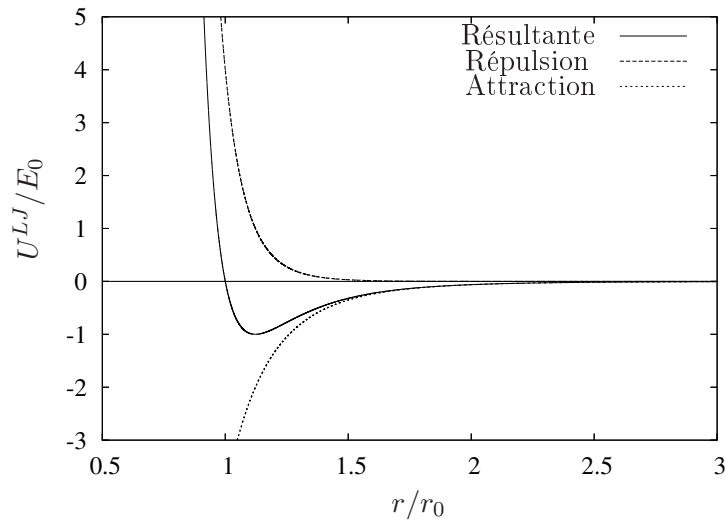


FIG. 3.3 – Potentiel de Lennard-Jones dans le cadre d'interactions de Van der Waals entre deux atomes ($n = 12$). r représente la distance inter-atomique. La position d'équilibre correspond au minimum de U^{LJ}/E_0 : elle donne la longueur de la liaison.

entités, β est un paramètre traduisant la "largeur" du potentiel, enfin R_e est la distance de la liaison à l'équilibre. Une représentation de ce potentiel est donnée figure 3.4.

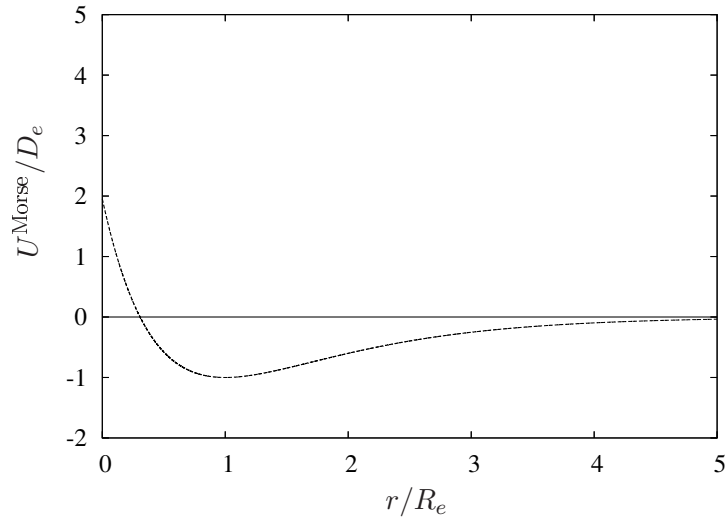


FIG. 3.4 – Potentiel de Morse particulièrement adapté aux liaisons de type hydrogène. La position d'équilibre correspond au minimum de U^{Morse}/D_e : elle donne la longueur de la liaison ($r = R_e$).

Souvent, dans les méthodes numériques comme celle largement répandue de Monte Carlo, on utilise une approche *probabiliste* du problème, car on estime que beaucoup de hasard permet

de rendre compte assez fidèlement de ce qui se passe à l'échelle microscopique. Pour la matière condensée, cette méthode recherche a priori les états de basse énergie parmi tous ceux possibles, en partant du principe qu'ils sont statistiquement les plus probables, donc les plus peuplés, donc les plus représentatifs du système. Dans cette thèse, nous garderons une approche *déterministe* du problème.

3.2.2 Domaine d'interaction

Comme nous venons de le voir dans le paragraphe 3.1, il existe une distance sonde/cible à partir de laquelle les forces inter-atomiques deviennent suffisamment intenses pour que l'influence de l'une sur l'autre tende à les rapprocher (s'il y a compatibilité de réaction). Comme les liaisons hydrogène sont relativement fortes, nous supposons dans notre modèle que lorsqu'une cible pénètre la sphère d'influence de la sonde, il n'est dès lors plus possible qu'elle en ressorte, aboutissant à une hybridation³. Dans ce modèle, nous ne tiendrons pas compte d'une éventuelle déshybridation. Du point de vue énergétique, ceci implique que la profondeur du potentiel d'interaction soit suffisamment grande par rapport à l'énergie d'agitation thermique. À la limite, le puits de potentiel d'interaction sera considéré comme *infinitement* profond (fig. 3.5).

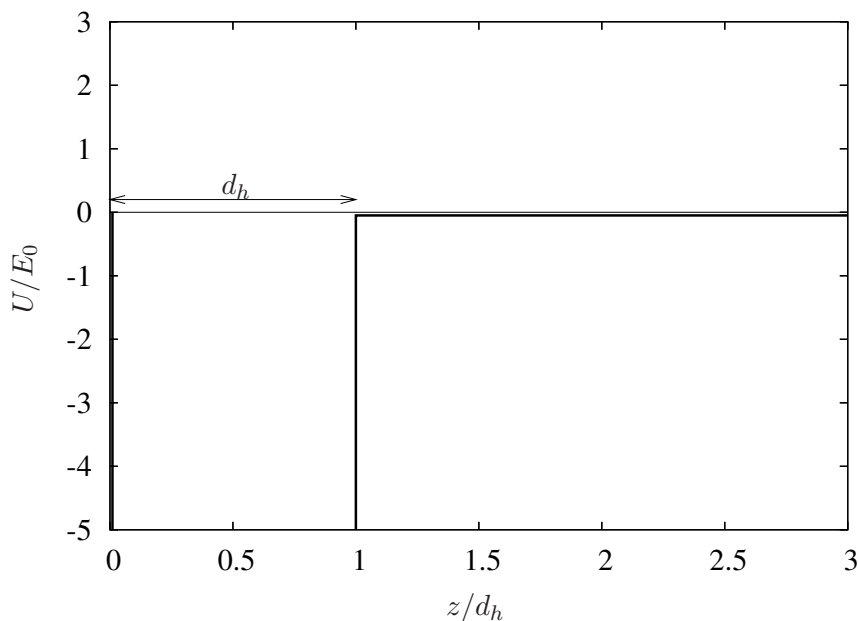


FIG. 3.5 – Notre modèle de potentiel d'interaction (puits de potentiel).

En premier lieu, la puce est modélisée de la manière suivante : elle possède des *plots* contenant chacun un grand nombre de sondes *identiques*. Ces plots sont également identiques entre eux et leur disposition sur une grille n'est pas tout à fait aléatoire (voir la figure 3.6). Nous avons pris sur la puce $N_p = 53$ plots potentiellement hybridables. Ceux-ci sont circulaires de diamètre L_p ,

³Il s'agit en fait d'un modèle de capture du même type que celui utilisé par exemple par Metcalfe & Ottino [68], adapté ici à une réaction surfacique.

et deux plots contigus sont distants de la longueur L_s (nous avons choisi ici $L_s = 2L_p$ avec $L_s \approx 1$ mm).

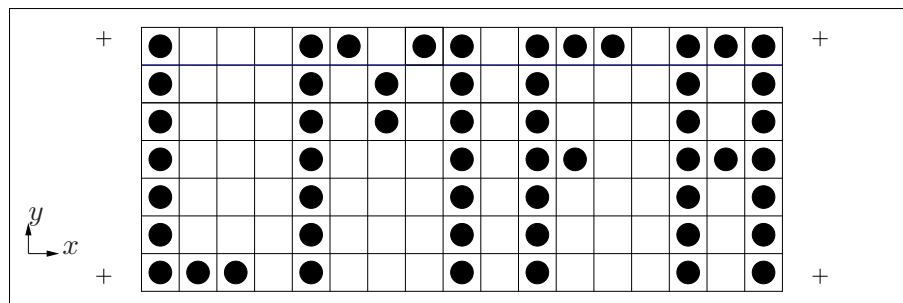


FIG. 3.6 – Répartition des plots sur la puce rectangulaire. Les croix (+) correspondent aux trous d'injection nécessaires au protocole de mélange (et à l'injection des réactifs).

Appelons d_h la distance d'hybridation (fig. 3.5). Le modèle de potentiel d'hybridation que j'ai choisi d'utiliser implique que lorsqu'une cible libre passe dans le cylindre de hauteur d_h et dont la base est formée par un plot hybridable, celle-ci est hybridée sous condition de complémentarité entre les deux entités (figure 3.7). Comme les cibles libres ne sont que d'un seul type et que tous les plots hybridables sont identiques (les sondes leur sont complémentaires à 100 %), alors toute cible peut s'hybrider avec n'importe quel plot hybridable. Dans ce modèle, nous considérerons les cibles comme des objets ponctuels.

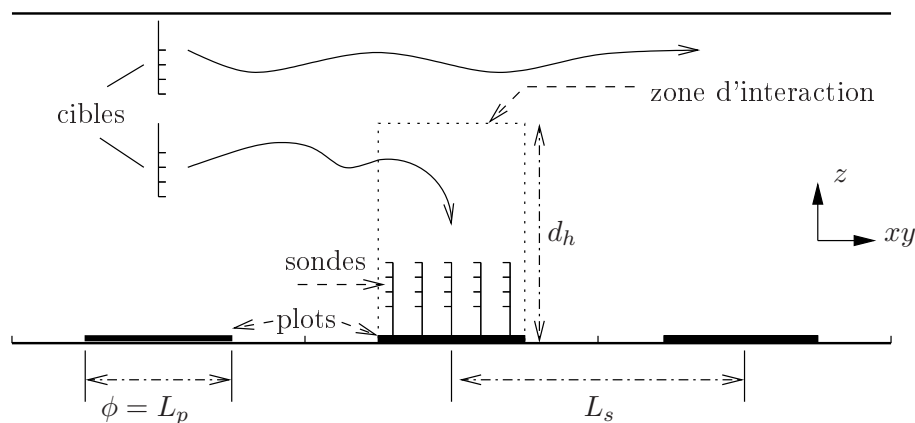


FIG. 3.7 – Modèle numérique d'hybridation. Les brins sont transportés par advection (les proportions entre les grandeurs ne sont pas respectées).

3.2.3 "Faux 3D"

Une cible peut donc s'hybrider si elle passe à l'aplomb d'un spot hybridable et si la hauteur z de la cible est inférieure à d_h . Ce modèle redevient donc explicitement un problème à 3 dimensions, puisqu'en plus de se déplacer au-dessus de la surface de la puce, les cibles ont une altitude z qui peut varier. Cela a plusieurs conséquences concernant l'écoulement :

- pour considérer la dynamique verticale des cibles, on doit nécessairement restituer la dépendance verticale en z du champ des vitesses, que l'on avait moyennée jusqu'à présent (cf. annexe B) : bien que la composante v_z de l'écoulement reste dans ce modèle toujours nulle ($v_z = 0$), le champ des vitesses selon x et y sera maintenant traité avec une dépendance en z ($v_{xy}(x, y, z)$). Pour cela, nous avons choisi un modèle d'écoulement parabolique conformément aux écoulement de type Hele-Shaw. On a donc :

$$v(x, y, z) = 6 \bar{v}(x, y) \times \frac{z}{h} \left(1 - \frac{z}{h}\right) \quad (3.20)$$

avec $\bar{v}(x, y)$ le champ de vitesse 2D utilisé dans le chapitre précédent puisque :

$$\frac{1}{h} \int_0^h \frac{z}{h} \left(1 - \frac{z}{h}\right) dz = \frac{1}{6} \quad (3.21)$$

- les cibles libres doivent pouvoir changer de plan pour avoir une hauteur z compatible avec la condition d'hybridation. Pour cela, nous avons mis en place deux façons de procéder :
 - par réinjection aléatoire selon Oz des cibles lorsque elles sortent des tuyaux. Cette réinjection se fait selon une loi de probabilité sur la composante z en accord avec l'écoulement parabolique en z (voir la figure 3.8 ; dans l'annexe G on explique comment réaliser numériquement une densité parabolique en z). À titre de validation, nous présentons figure 3.9 une section de Poincaré 3D du mélange simple (donc sans diffusion et la cinétique n'intervenant pas encore) et nous la comparons à nouveau au cas de la Simulation Numérique Directe de l'écoulement 3D réalisé par Raynal et al. [37] [38]. Une fois encore, malgré ce modèle très simple d'écoulement 3D, la correspondance entre les 2 sections de Poincaré est très grande, ce qui valide bien cette hypothèse.
 - par diffusion moléculaire, tridimensionnelle, qui est dans ce contexte surtout efficace suivant la direction Oz . Cette diffusion est intégrée numériquement au programme en écrivant l'équation de Langevin :

$$\frac{dx}{dt} = v(x, y, z, t) + \zeta(t) \quad (3.22)$$

où :

- $x(t)$ est la position de la particule à l'instant t .
- $v(x, y, z, t)$ est le champ de vitesse d'advection déterministe.
- $\zeta(t)$ modélise le mouvement Brownien conduisant au phénomène de diffusion. Cette grandeur, homogène à une vitesse, est un processus Gaussien décorréllé tel que $\langle \zeta_i(t) \zeta_j(t') \rangle = 2D \delta_{ij} \delta(t - t')$ ⁴.

Pour plus de détails, le lecteur pourra se reporter à l'annexe H.

Nous regrouperons sous l'appellation de "faux 3D" l'ensemble des hypothèses ci-dessus.

3.2.4 Paramètres de l'étude

Tous les tests de cinétique sont réalisés dans la chambre rectangulaire de rapport 3 : 1 (en accord avec les proportions d'une lame de microscope sur laquelle beaucoup de puces sont fabriquées) avec la période $T = 4$ s, et en utilisant le protocole B : ces paramètres sont maintenant

⁴ $\delta_{ij} = 1$ si $i = j$, $\delta_{ij} = 0$ sinon.
 $\delta(t)$ est la fonction de Dirac.

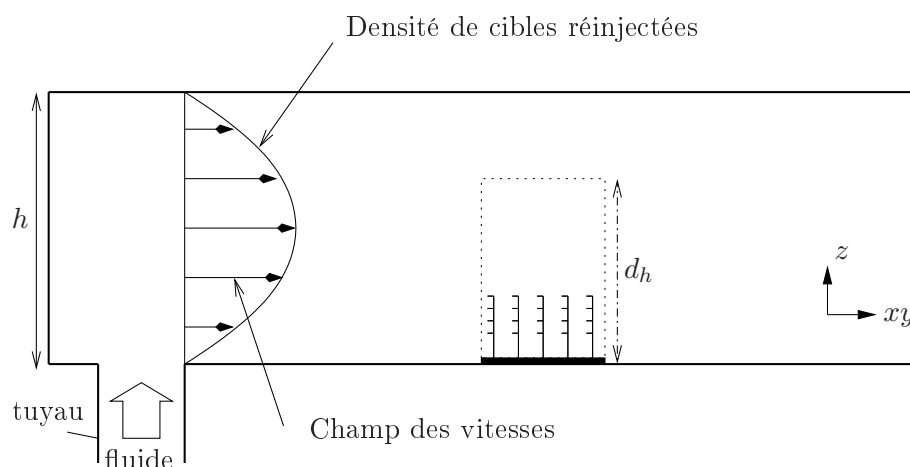


FIG. 3.8 – Corrélation entre profil du taux de réinjection et volume d'interrogation (pour des raisons de lisibilité de la figure, l'échelle n'est pas respectée pour d_h).

reconnus pour donner un excellent mélange compte tenu du volume de notre chambre d'écoulement et du débit utilisé. Ainsi, nous serons certains que le mélange n'est pas un facteur limitant dans le cadre de l'étude cinétique puisque les sections de Poincaré sont parfaitement homogènes sur toute la surface de la puce.

L'étude cinétique revient à faire varier 2 paramètres seulement : la distance d'hybridation d_h et le coefficient de diffusion D de l'ADN dans l'eau. Pour ce qui est des valeurs de D , je me suis servi des résultats expérimentaux indiqués par plusieurs auteurs : par exemple Going et al. [69], Liu et al. [70] et Tinland et al. [71] estiment que le coefficient de diffusion est de l'ordre de $1.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ pour des monobrins d'ADN plutôt courts, alors que Chan et al. [61] reporte que cette valeur peut varier entre $1.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (6-mers) et $0.9 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ pour des brins très longs.

Dans la molécule d'ADN, chaque base est une brique mesurant environ 0.34 nm dans la longueur totale du brin. Sachant que pour une puce à ADN, les sondes utilisées ont une longueur comprise entre 10 (10-mers) et 30 bases (30-mers), une sonde a une longueur d'au maximum 10 nm (il faut tenir compte aussi de la molécule liant le brin au support solide). C'est cet ordre de grandeur que nous avons pris comme borne inférieure de d_h , car des valeurs plus petites n'auraient pas de sens compte tenu du nombre et de la relative longue portée des liaisons hydrogènes pouvant être établies entre les 2 brins.

Concernant la valeur la plus probable de d_h , d'après notre collaborateur Jean-Pierre Cloarec de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon, nous l'avons située autour de 100 nm. Nous l'avons néanmoins faite varier pour étudier son influence sur la capture des cibles.

Les valeurs testées sont regroupées dans les tableaux 3.2.

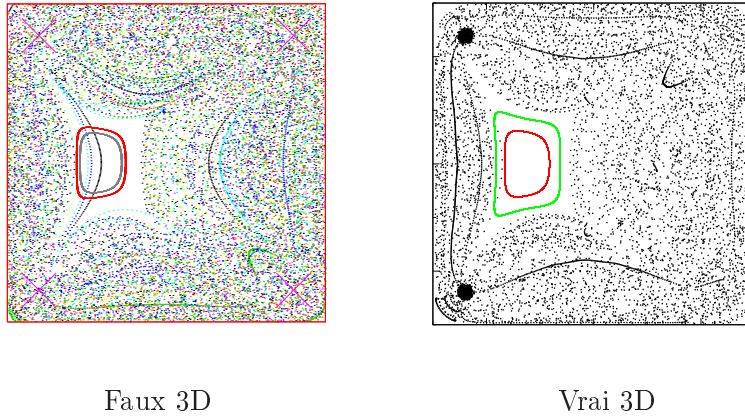


FIG. 3.9 – Comparaison du mélange dans les cas "vrai 3D" et "faux 3D". Ces sections de Poincaré sont celles issues du protocole A, $T = 4$ s, dans une chambre carrée. La similitude est très grande.

D (m ² /s)
10^{-10}
10^{-11}
10^{-12}

d_h (nm)	d_h/h
25	5×10^{-4}
50	1×10^{-3}
100	2×10^{-3}
250	5×10^{-3}
500	1×10^{-2}
1.0×10^3	2×10^{-2}

TAB. 3.2 – Grandeurs utilisées dans les simulations numériques. On rappelle que $h = 50 \mu\text{m}$.

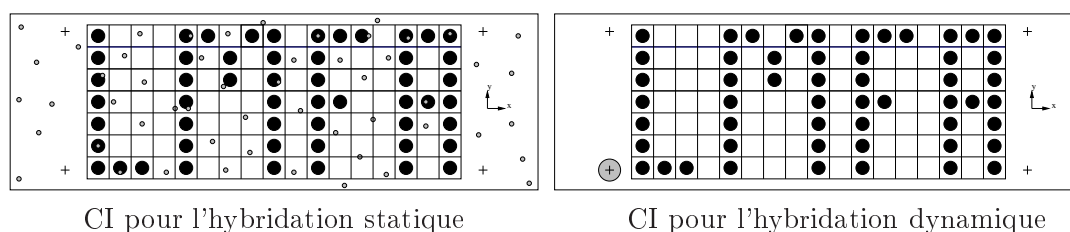


FIG. 3.10 – Conditions initiales (CI) pour l'hybridation statique (répartition aléatoire sur la surface) ou dynamique (tache injectée par un trou). Dans les deux cas, la répartition selon la hauteur h est *aléatoire*.

3.2.5 Conditions initiales

Le programme de simulation injecte à l'instant initial $N_c = 2120$ cibles dans la chambre d'hybridation, ce qui représente en moyenne 40 particules par plot hybridable. Chaque particule correspond (par exemple) à une monobrin d'ADN cible compatible avec les sondes de la puce, et de ce fait est susceptible de s'hybrider sur n'importe quel plot hybridable de la figure 3.6. Dans toutes les simulations nous nous placerons en grand *excès de sondes* par rapport aux cibles, tout comme dans l'utilisation classique de puces, c'est à dire que chaque plot possède un très grand nombre de sondes, bien supérieur au nombre de cibles total. Un seul plot peut donc largement contenir toutes les cibles injectées.

Concernant les positions initiales des particules, nous avons voulu nous rapprocher au maximum des conditions expérimentales. Ainsi, nous avons différencié les 2 cas suivants (voir la figure 3.10) :

- hybridation statique : les expérimentateurs mélangent d'abord l'ensemble {cibles libres + solution tampon} avant de l'introduire dans la chambre d'hybridation. Nous injectons donc à l'instant $t = 0$ les cibles de façon complètement aléatoire dans tout le volume.
- hybridation dynamique : on rentre expérimentalement l'ensemble des cibles par une entrée de la chambre d'hybridation (par un trou d'injection par exemple). Seule la répartition selon la direction Oz est aléatoire.

Le programme calcule alors les trajectoires de ces particules et vérifie à chaque instant s'il y a possibilité d'hybridation ou pas. Pour cela, les cibles sont considérées comme des *scalaires passifs*, dans la mesure où la masse et la taille de ces cibles sont très faibles (quelques dizaines de paires de bases chacune). Le module de diffusion, qui ajoute une fluctuation sur les trajectoires, est intégré au calcul d'après le modèle numérique décrit dans l'annexe H.

3.2.6 Grandeurs issues des simulations

Le programme de simulation note à quels instants et sur quels plots les cibles s'hybrident. À partir de ces données, on peut calculer :

- le temps total de l'expérience (le temps pour que *toutes* les cibles, initialement présentes en *défaut* par rapport aux sondes, puissent s'hybrider) t_{\max}
- la moyenne des temps d'hybridation \bar{t}

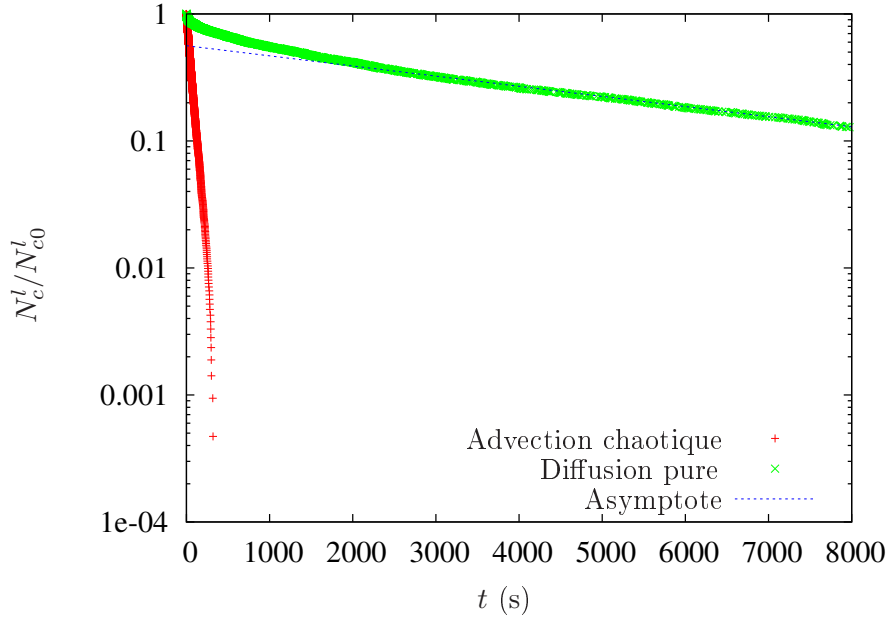


FIG. 3.11 – Résultat de diffusion pure comparée au mélange par advection chaotique. Échelle lin-log. $d_h = 100$ nm et $D = 10^{-10}$ m²/s.

- l'écart type sur les temps d'hybridation σ_t
- le nombre de cibles libres restant en solution à un instant donné, N_c^l (on a donc $N_c^l = N_c$ à $t = 0$ et $N_c^l = 0$ à $t = t_{\max}$)
- le nombre total de plots hybridés N_p^h à la fin de l'expérience
- la quantité de cibles hybridées sur le plot (hybridable) n° i : $N_{c_i}^h$
- l'écart type du nombre de cibles hybridées sur chaque plot (hybridable) $\sigma_{N_c^h}$

3.3 Résultats numériques

3.3.1 Comparaison hybridation statique/advection chaotique

Rapidité de l'hybridation

On montre sur la figure 3.11 les courbes de cinétiques dans les cas d'hybridation statique et dynamique. On voit que le gain, en terme de durée d'expérience, est spectaculaire avec le mélangeur car la décroissance du nombre de cibles libres est très rapide avec le temps. Si l'on fait un zoom sur la courbe d'hybridation dynamique (figure 3.12), on constate que contrairement à la courbe de diffusion pure, celle-ci est vraiment exponentielle (droite en échelle lin-log). Le mélange joue donc un rôle important dans le transport des particules et montre ainsi que le transport par diffusion pure est un facteur *limitant*. Nous calculerons plus loin le gain obtenu en terme de vitesse de réaction (estimation des constantes de vitesses).

En ce qui concerne l'hybridation dynamique, puisque l'évolution en fonction du temps est exponentielle, les propriétés de cette fonction impliquent que l'on puisse écrire (voir l'annexe J) :

$$N_c^l = N_{c0}^l \exp(-t/\bar{t}) \quad (3.23)$$

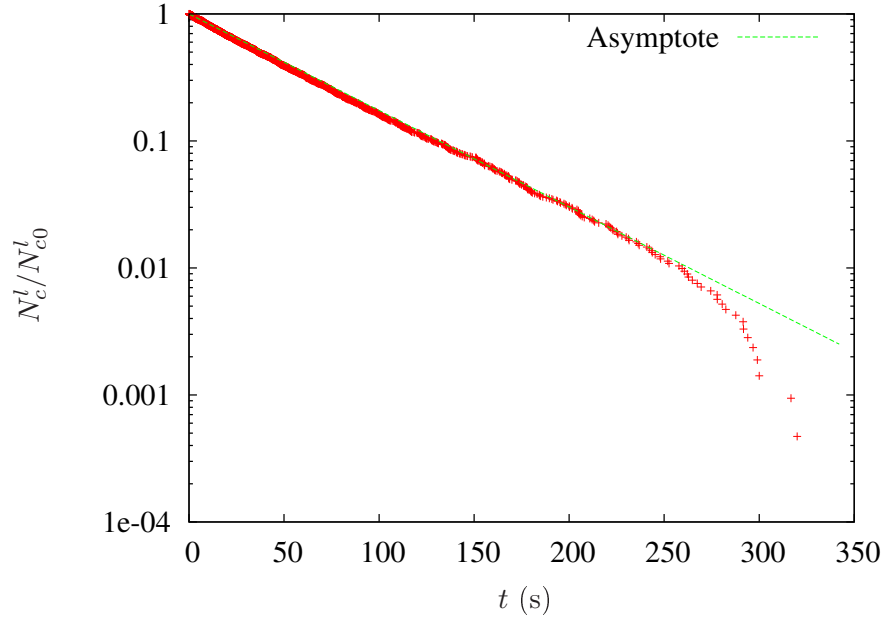


FIG. 3.12 – Évolution typique de la concentration en cibles libres en fonction du temps *avec* le système d'advection chaotique. Ici, on a $d_h = 100$ nm et $D = 10^{-10}$ m²/s. Échelle lin-log.

où \bar{t} est le temps moyen de la réaction d'hybridation. La pente de la droite N_c^l en fonction du temps dans un repère lin-log vaudra alors $-1/\bar{t}$.

À partir des graphiques, nous pouvons mesurer les pentes τ_∞ correspondantes. On obtient $\tau_\infty^{\text{adv}} = 58$ s et $\tau_\infty^{\text{diff}} = 6520$ s. Par rapport à la diffusion pure, le gain apporté par l'advection chaotique (tous les autres paramètres étant identiques par ailleurs) est donc de l'ordre de :

$$\frac{v^{\text{adv}}}{v^{\text{diff}}} = \frac{\tau_\infty^{\text{diff}}}{\tau_\infty^{\text{adv}}} = 112 \quad (3.24)$$

Cela signifie qu'un facteur 112 est gagné dans les temps de réalisation d'une hybridation complète *avec advection* par rapport à l'hybridation ne comptant que sur la *diffusion pure*. À titre d'illustration, une séance d'hybridation qui aurait normalement duré environ 2 h *sans mélangeur*, ne nécessiterait plus que 1 minute avec celui-ci : cette amélioration représente une avancée indéniable dans la course à la productivité recherchée dans le milieu médical (besoin de diagnostic rapide pour pouvoir être réalisé en masse).

Homogénéité de l'hybridation

Nous venons de discuter de la rapidité de la cinétique ; intéressons-nous maintenant à l'homogénéité de l'hybridation. Pour cela, nous comparons ici la variance instantanée en fonction du temps, définie comme :

$$\sigma(t) = \frac{1}{N_c^h(t)} \sqrt{\frac{1}{N_p} \sum_{i=1}^{N_p} \left(N_{c_i}^h(t) - \frac{N_c^h(t)}{N_p} \right)^2} \quad (3.25)$$

où l'on rappelle que N_p est le nombre de plots total ($N_p = 53$), $N_c^h(t)$ et $N_{c_i}^h(t)$ représentent respectivement le nombre total de cibles hybridées sur toute la puce ou sur le plot n° i à l'instant t . La quantité $N_c^h(t)/N_p$ représente la valeur moyenne de cibles hybridées par plot à l'instant t , et on a bien sûr :

$$N_c^h(t) = \sum_{i=1}^{N_p} N_{c_i}^h(t) \quad (3.26)$$

La variance telle qu'on l'a définie ici est renormalisée en fonction du nombre de particules hybridées qui croît au cours du temps (facteur $1/N_c^h(t)$). Dans un cas d'homogénéité parfaite ($\forall i, N_{c_i}^h(t) = N_c^h(t)/N_p$), on obtient $\sigma(t) = 0$. D'autre part, on a bien sûr :

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \sigma(t) = \sigma_{N_c^h} \quad (3.27)$$

Sur la figure 3.13, nous avons tracé les deux courbes (en *log-log* pour pouvoir les comparer) correspondant aux deux cas d'advection chaotique et d'hybridation statique. On remarque qu'au bout d'environ une période du champ de vitesse ($t \approx T = 4$ s), la distribution est déjà plus homogène dans le cas de l'advection chaotique. D'autre part, la variance finale pour l'advection est plus petite que pour le cas de la diffusion, ce qui signifie que l'hybridation est plus homogène avec le mélangeur : ceci est d'autant plus remarquable que l'on rappelle que pour le cas de la diffusion pure, une pré-homogénéisation initiale en volume des cibles a été réalisée à $t = 0^-$ (par opposition à l'advection chaotique, qui elle, démarre d'une injection localisée par un trou de la chambre)! Ces premiers résultats sont donc très encourageants pour la suite de l'étude.

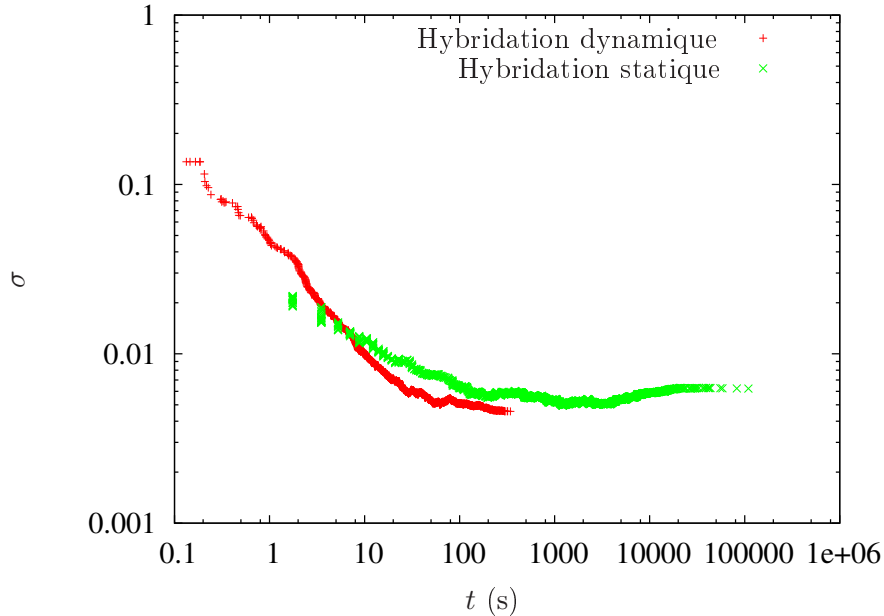


FIG. 3.13 – Variance en fonction du temps pour $d_h = 100$ nm et $D = 10^{-10}$ m²/s. Pour des raisons de lisibilité, la courbe a été tracée en échelle *log-log*.

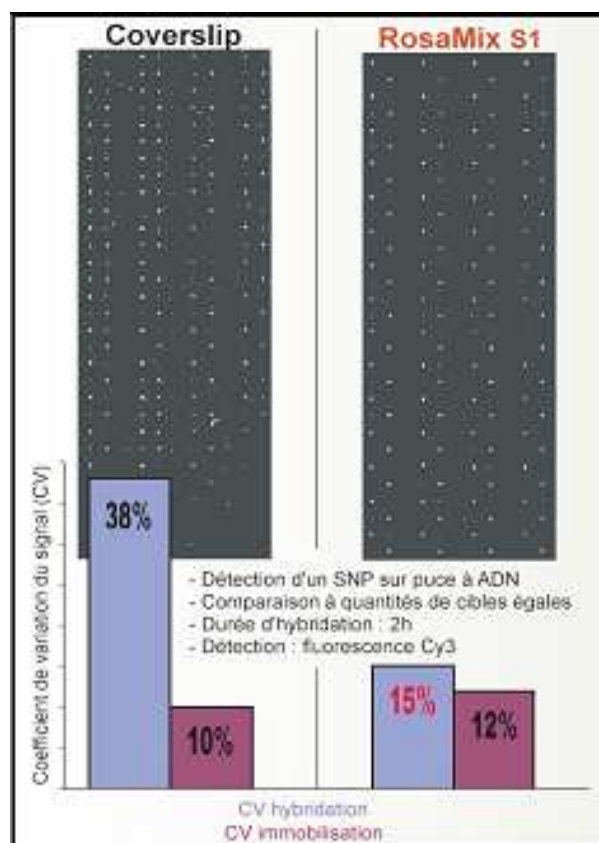
Étude de la fiabilité grâce au Rosamix [39]⁵

FIG. 3.14 – Confrontation expérimentale hybridation statique/hybridation dynamique grâce au Rosamix. Dans le cas du Rosamix, seuls les plots compatibles avec les cibles sont hybridés.

Nous venons de montrer numériquement que le mélangeur permettait une hybridation beaucoup plus rapide et beaucoup plus homogène que la simple hybridation par diffusion. Grâce au Rosamix (voir la présentation du dispositif dans le paragraphe 2.3), une nouvelle qualité va maintenant être mise en lumière : il s'agit de la fiabilité de la réponse de la puce. En effet, la figure 3.14 présente l'aspect d'une puce hybridée sur laquelle ont été fixées alternativement sur un réseau régulier *deux types* de sondes (HP1a et HP1b, 12-mers, protéines des plaquettes sanguines) ne différant que d'une seule base ($A \leftrightarrow T$), ce qui permet de simuler la recherche d'une mutation "point". Ce type de mutation est généralement extrêmement délicat à trouver par séquençage traditionnel car les erreurs ponctuelles sont fréquentes avec le type de technologie habituellement utilisé. L'étude expérimentale a consisté ici à n'injecter qu'un seul type de cibles, complémentaires qu'à un seul type de sonde (HPA1a), et à comparer les résultats d'hybridation de la méthode traditionnelle dite "Coverslip" (hybridation statique) au résultat obtenu avec le Rosamix (hybridation dynamique). Le résultat est sans appel : on montre que grâce à l'advection chaotique, la *fiabilité* des résultats est nettement améliorée par rapport au cas de l'hybridation

⁵Cette étude a été réalisée par la société Rosatech, dans le cadre de la collaboration LMFA/INL/Rosatech.

statique, car cette dernière laisse apparaître des "faux positifs" (des cibles qui s'hybrident avec des sondes qui ne leur sont pas complémentaires à 100%) pouvant conduire à une mauvaise interprétation du type de cibles présent dans la solution à analyser.

Pour compléter l'analyse de cette expérience, on peut remarquer sur la figure 3.14 de la méthode Coverslip que certains plots n'ont pas été hybridés (par exemple dans le coin inférieur droit) alors qu'ils l'ont été grâce au Rosamix. Enfin, le coefficient de variation (CV), qui représente la différence de signal entre des plots hybridés issus de l'expérience et des plots témoins (hybridés "manuellement"), montre qu'il y a beaucoup plus d'uniformité du signal (CV faible) avec le Rosamix que sans celui-ci.

Pour résumer, on peut donc dire que le Rosamix – et plus généralement le mélange par advection chaotique – permet non seulement d'augmenter la rapidité et l'homogénéité de l'hybridation, mais permet aussi d'améliorer nettement la *fiabilité* du résultat de l'interprétation des puces, ce qui est crucial en médecine.

Discussion

Malgré ce net progrès en termes de temps de réaction, le gain apporté dans le temps d'hybridation est loin d'être celui gagné pour le simple mélange par advection chaotique comparé au mélange par diffusion pure (gain estimé à 10^3 sur la seule dispersion des particules, voir chapitre précédent). Ceci signifie que le processus de dispersion verticale – la diffusion – est un facteur limitant dans la réaction d'hybridation : le renouvellement vertical des cibles n'est pas assez rapide⁶. Pour comprendre pourquoi, nous allons tenter de relier les pentes observées aux paramètres du problème.

3.3.2 Influence de d_h et D

Évolution des grandeurs en fonction de d_h et D

Nous nous sommes posés la question de savoir si la connaissance précise de la valeur de d_h était cruciale ou pas. Nous l'avons donc faite varier numériquement de 25 nm jusqu'à la hauteur totale de la chambre (!). Nous avons par ailleurs testé les différentes valeurs du coefficient de diffusion. Dans chaque cas, nous avons calculé t_{\max} , \bar{t} , σ_t , τ_∞ (temps donné par l'asymptote sur les graphiques d'évolution du nombre de cibles libres en fonction du temps, en échelle lin-log, comme sur la figure 3.12), $\tau_{1/2}$ (temps de demi-réaction, c'est à dire temps pour lequel la moitié des cibles ont réagi), N_p^h et $\sigma_{N_c^h}$. Tous les résultats sont donnés sous forme de tableau dans l'annexe A pour la diffusion pure et pour l'advection chaotique.

Analyse des données

Cas de l'hybridation statique Pour comprendre comment le nombre de cibles décroît dans le cas de l'hybridation statique, nous avons calculé les courbes de cinétiques dans le cas de la diffusion pure pour des coefficients de diffusion variant entre $D = 10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ à $D =$

⁶C'est à cette même conclusion qu'aboutissent Gadgil et al. [62], Chan et al. [61] ou Erickson et al. [60] d'après leurs simulations numériques et Henry et al. [63] d'après leurs mesures expérimentales. Et, même si Erickson et al. [60] ou Lehr et al. [72] ont testé l'hybridation avec un flux *continu* de fluide, ils n'accélèrent pas pour autant le transport vertical des cibles.

$10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Nous avons tracé, sur le graphique 3.15, l'évolution du nombre de cibles libres (adimensionné) en fonction du temps adimensionné par les paramètres du problème, soit $t \times D/S_{\text{chambre}}$ (S_{chambre} est la surface de la chambre = L^2).

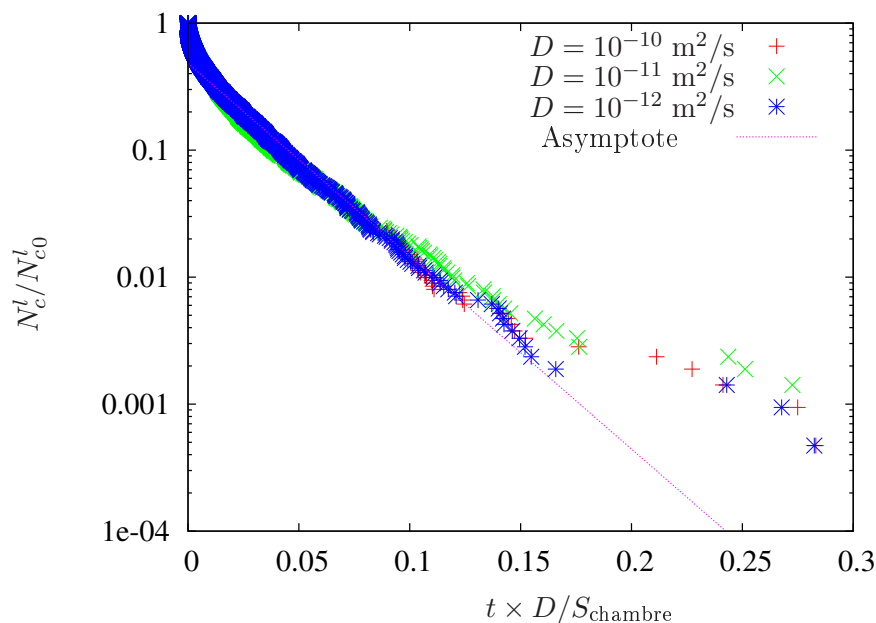


FIG. 3.15 – Évolution du nombre de cibles libres (adimensionné) en fonction de $t \times D/S_{\text{chambre}}$ dans le cas de l'hybridation statique. Au vu de ce résultat, il sera désormais possible d'obtenir la courbe d'hybridation statique pour n'importe quel coefficient de diffusion D à partir d'une seule courbe de référence, par exemple à partir de celle issue de $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Échelle *lin-log*.

D'après la figure 3.15, on remarque deux résultats importants. Le premier résultat remarquable est que l'évolution du nombre de cibles libres en fonction de $t \times D/S_{\text{chambre}}$ dans le cas de l'hybridation statique ne dépend pas du coefficient de diffusion D : les courbes suivent en effet une loi universelle indépendante du coefficient de diffusion. Ce premier résultat va donc nous permettre d'extrapoler rapidement la courbe relative à n'importe quel coefficient D (tout autre paramètre étant identique par ailleurs) à partir d'une seule autre, par exemple celle correspondant à $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (la plus rapide à obtenir). Le second résultat important est que l'évolution de la courbe n'est pas tout à fait exponentielle, sauf asymptotiquement (vérifié sur plusieurs décades). L'équation différentielle 3.3 n'est donc pas vraiment vérifiée dans le cas de l'hybridation statique où la diffusion joue un rôle très important dans le transport des particules.

Si l'on calcule la pente de l'asymptote de la figure 3.15, on trouve que celle-ci est de l'ordre de 1. Or, nous avons construit ce graphique en adimensionnant le temps par S_{chambre} , c'est à dire que, par construction, nous avons privilégié l'étude de l'influence de la diffusion horizontale par rapport à la diffusion verticale. La valeur de l'ordre de 1 de la pente de l'asymptote signifie donc que c'est la répartition horizontale des plots qui limite la diffusion pour l'hybridation statique. Ceci est confirmé par le fait que la distance L_s entre les plots de sondes est très grande devant la hauteur d_h ($h/L_s = 0.1$, soit, pour les temps caractéristiques, $h^2/D = 10^{-2} \times L_s^2/D$). On

s'attend donc logiquement à ce que le paramètre d_h ait une influence négligeable ici. Sur la figure 3.16, nous avons tracé le temps moyen d'hybridation \bar{t} en fonction de d_h : comme nous pouvons le constater, c'est bien le cas ! Ainsi, les résultats en diffusion pure ne dépendent pas de d_h !

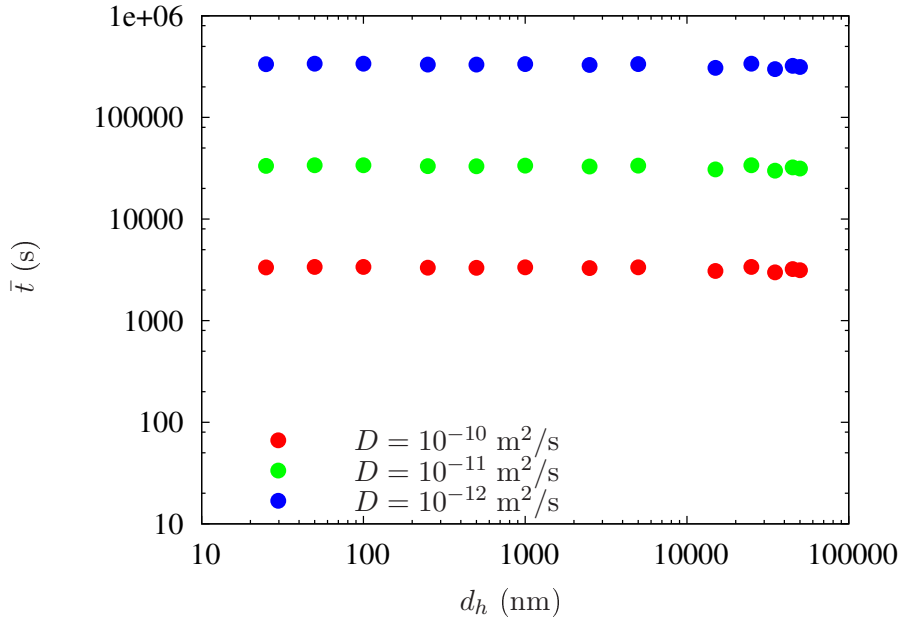


FIG. 3.16 – Temps moyen d'hybridation \bar{t} en fonction de d_h dans le cas de l'hybridation statique. Les valeurs sont calculées pour la valeur de $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ et extrapolées pour $D = 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ et $D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Échelle *log-log*.

Cas de l'advection chaotique Nous avons tracé l'évolution de la valeur moyenne du temps de réaction \bar{t} en fonction de d_h pour différents D sur la figure 3.17. En ce qui concerne t_{\max} et σ_t , leur évolution est strictement identique à celle de \bar{t} (c'est pourquoi nous n'avons pas représenté ces grandeurs ici). De la même manière, nous avons également tracé la variation de σ_{N_c} (fig. 3.18).

L'évolution des grandeurs suivant la distance d'hybridation d_h marque deux comportements : lorsque $d_h \lesssim 1 \mu\text{m}$, les grandeurs sont globalement indépendantes de d_h : ce premier résultat indique que même dans le cas de l'advection chaotique, la *valeur exacte de d_h n'est pas cruciale*. C'est d'autant plus agréable que d_h était le paramètre que nous maîtrisions le moins (nous l'avons estimé à $d_h = 100 \text{ nm}$)⁷ !

En revanche, on voit que le coefficient de diffusion joue un rôle important. En mélange, comme nous l'avons vu, les effets de diffusion sont mesurés grâce au nombre de Péclet $Pe = UL/D$, où

⁷Pour $d_h \gtrsim 1 \mu\text{m}$, les valeurs décroissent (t_{\max} , \bar{t} ou σ_t) en variant comme une puissance de d_h car la représentation de ces grandeurs est linéaire dans un graphique en échelle *log-log*. Concernant σ_{N_c} (figure 3.18), celle-ci évolue en étant d'abord constante pour les petites valeurs de d_h , puis croissent. Cependant, les valeurs $d_h \gtrsim 1 \mu\text{m}$ nous intéressent peu, car n'ayant pas de véritable sens physique.

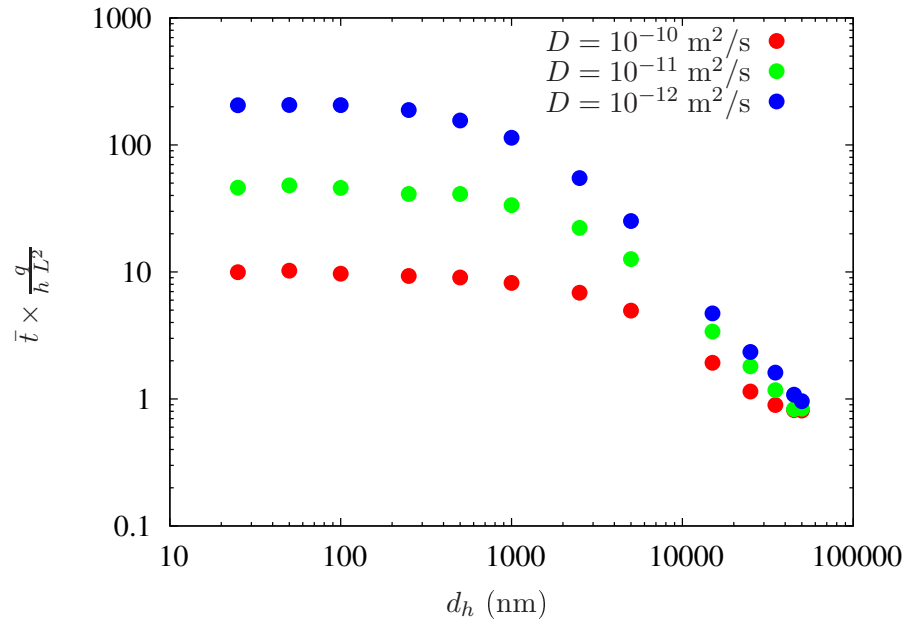


FIG. 3.17 – Instant moyen d'hybridation \bar{t} adimensionné, en fonction de d_h dans le cas de l'hybridation dynamique. Échelle *log-log*.

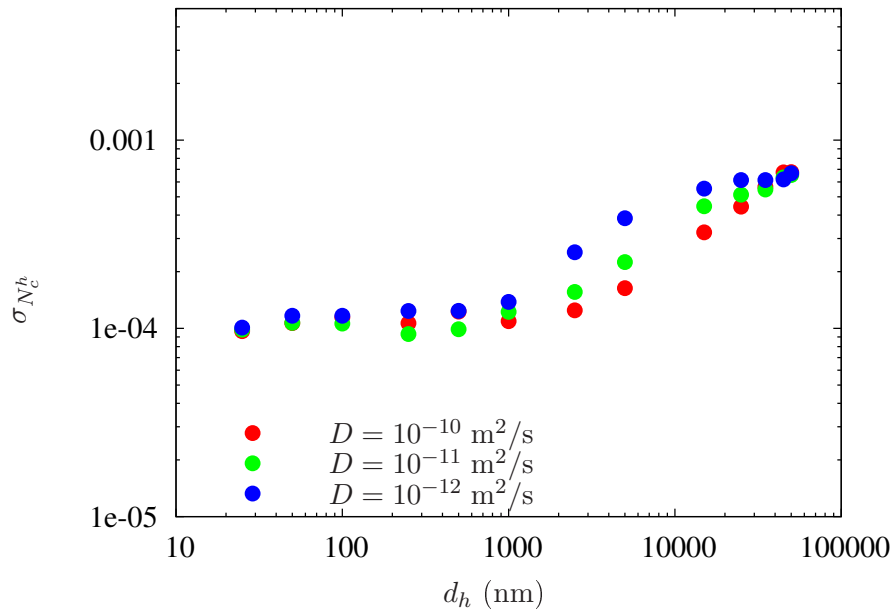


FIG. 3.18 – Écart type du nombre de cibles hybridées sur chaque plot hybridable (2120 particules). Échelle *log-log*.

U et L sont respectivement une vitesse et une longueur caractéristique (ici la longueur de la chambre). Il est défini dans notre cas par :

$$Pe = \frac{q}{h \times D} \quad (3.28)$$

et varie entre 4×10^5 (pour $D = 10^{-10}$ m²/s) et 4×10^7 (pour $D = 10^{-12}$ m²/s). Nous sommes donc bien dans une configuration où les effets de l'advection sont prédominants sur les effets de diffusion. Puisque le rôle de d_h est négligeable, on s'attend à ce que [73] :

$$\bar{t} \approx \frac{L}{U} \times f(Pe) \quad (3.29)$$

$$\approx \frac{L^2 \times h}{q} \times f(Pe) \quad (3.30)$$

Essayons maintenant d'estimer la fonction f . Nous avons choisi un modèle de capture pour les cibles, c'est-à-dire qu'elles s'hybrident à mesure qu'elles entrent dans le volume d'hybridation. Il nous faut donc comprendre comment le fluide se renouvelle au dessus d'un plot, dans le volume d'hybridation. Pour cela, supposons qu'à un instant donné il n'y ait plus de cibles au dessus d'un plot (fig.3.19).

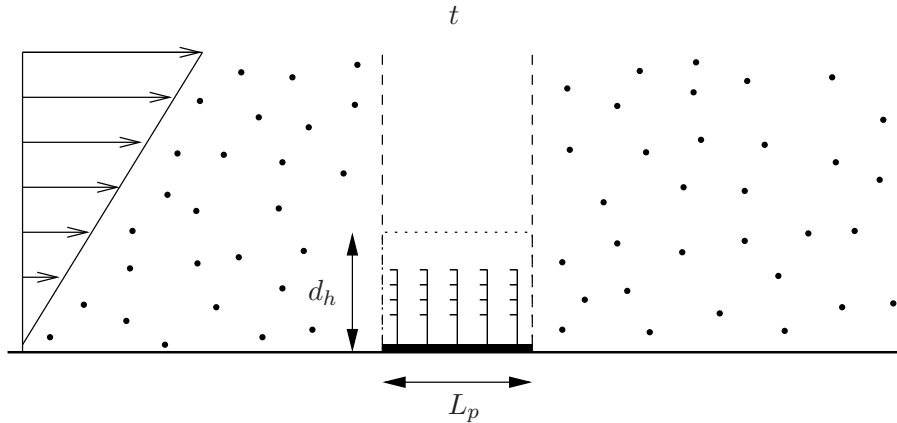


FIG. 3.19 – On suppose qu'à un instant t donné, il n'y a pas de cibles dans un cylindre dont la base est un plot et la hauteur est supérieure à d_h .

Deux mécanismes entrent en compétition : l'un est l'advection horizontale des cibles par le champ de vitesse (figure 3.20), l'autre est la diffusion verticale des cibles au-dessus de ce volume d'hybridation. Or, pour de très faibles valeurs de d_h telles que celles que nous avons choisies car physiquement plausibles ($d_h = 100$ nm), l'échange de fluide par diffusion (de temps caractéristique d_h^2/D) est bien plus efficace que l'apport par le champ de vitesses (de temps caractéristique $L_p/v(d_h)$), puisque localement près de la surface, le champ de vitesse est de type cisaillement). Or, à une hauteur $z > d_h$, le temps caractéristique de renouvellement des cibles par l'advection est $L_p/v(z) < L_p/v(d_h)$. Ainsi, des cibles sont amenées au dessus du volume d'hybridation (figure 3.20), et celles-ci pourront ensuite être ramenées à l'intérieur de celui-ci par échange vertical de fluide grâce à la diffusion moléculaire. Tout se passe donc comme si, au lieu de d_h , il nous fallait considérer un volume bien plus gros, de hauteur d_h^{eff} , pour lequel les

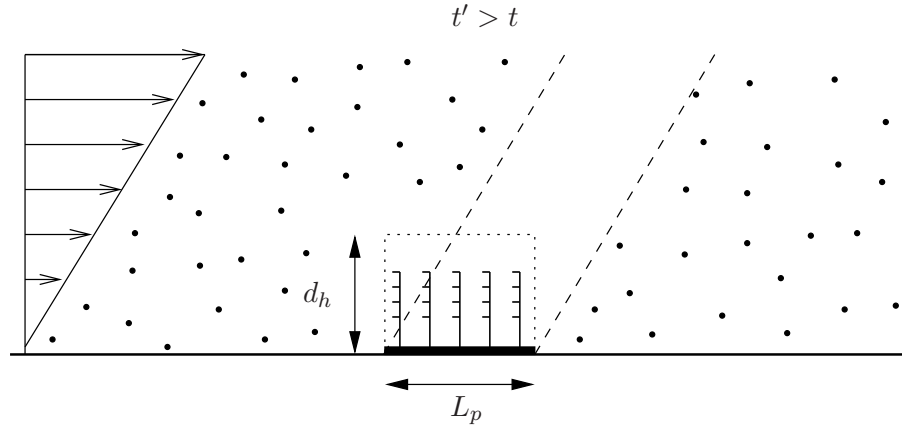


FIG. 3.20 – Position des cibles à un instant $t' > t$ sous le seul effet de l'advection horizontale.

apports par advection sont de même ordre que les apports par diffusion. En écrivant l'égalité des temps caractéristiques correspondants, on obtient :

$$\tau_{\text{adv}} = \tau_{\text{diff}} \quad (3.31)$$

$$\frac{L_p}{v(d_h^{\text{eff}})} \approx \frac{d_h^{\text{eff}2}}{D} \quad (3.32)$$

Compte-tenu du profil de vitesse parabolique $v(z) = 6 z/h(1 - z/h) \bar{v}(x, y)$, où $\bar{v}(x, y)$ est la vitesse moyennée sur la hauteur, on a :

$$v(d_h) \sim 6 \times \frac{d_h^{\text{eff}}}{h} \times \frac{q}{h \times L} \quad (3.33)$$

soit :

$$d_h^{\text{eff}3} \approx \frac{D \times L_p \times h^2 \times L}{6 \times q} \quad (3.34)$$

$$= \frac{L_p \times h \times L}{6 \times Pe} \quad (3.35)$$

soit finalement :

$$\boxed{d_h^{\text{eff}} \propto Pe^{-\frac{1}{3}}} \quad (3.36)$$

Le temps caractéristique de renouvellement du fluide dans ce volume de hauteur d_h^{eff} au dessus d'un plot est alors :

$$\tau^{\text{eff}} = d_h^{\text{eff}2} / D. \quad (3.37)$$

Nous devons considérer maintenant le taux de renouvellement du fluide au-dessus de tous les plots (sur la hauteur d_h^{eff}) pour obtenir la vitesse de réaction. Comme nous savons que la décroissance du nombre de cibles libres en fonction du temps est exponentielle (temps de décroissance τ_∞), nous pouvons écrire :

$$-\frac{1}{N_c^l} \frac{dN_c^l}{dt} = \frac{1}{\tau^{\text{eff}}} \frac{V_{\text{utile}}}{V_{\text{total}}} = \frac{1}{\tau_\infty} \quad (3.38)$$

où τ_∞ est le temps caractéristique de décroissance des cibles, N_c^l est (on le rappelle) le nombre de cibles libres, $V_{\text{utile}} \sim N_p \times L_p^2 \times d_h^{\text{eff}}$ est le volume efficace correspondant à *tous* les plots de la puce (on rappelle que N_p est le nombre de plots hybridables), V_{total} est le volume total du dispositif, égal à la somme du volume de la chambre et du volume dans les deux tuyaux. Dans notre cas le volume d'un tuyau est égal à 10% du volume de la chambre ; on a donc $V_{\text{total}} = 1.2 \times V_{\text{chambre}}$. On obtient alors :

$$\tau_\infty = \times \frac{d_h^{\text{eff}2}}{D} \times \frac{1.2 \times L^2 \times h}{N_p \times L_p^2 \times d_h^{\text{eff}}} \quad (3.39)$$

soit :

$$\tau_\infty = \frac{1}{6^{1/3}} \times \frac{1.2 \times L^2 \times h}{q} \times \frac{q}{D \times h} \times \frac{L_p^{1/3} \times h^{1/3} \times L^{1/3}}{Pe^{1/3}} \times \frac{h}{N_p \times L_p^2} \quad (3.40)$$

et enfin :

$$\tau_\infty = \frac{1}{6^{1/3}} \times \frac{1.2 \times L^2 \times h}{q} \times Pe^{2/3} \times \frac{1}{N_p} \frac{h^{4/3} \times L^{1/3}}{L_p^{5/3}} \quad (3.41)$$

$$\boxed{\tau_\infty \propto \frac{Pe^{2/3}}{L_p^{5/3}}} \quad (3.42)$$

Dans notre cas, nous avons $\tau_\infty = \bar{t}$ (voir l'annexe J). Nous avons donc tracé $\bar{t} \times Pe^{-2/3}$ en fonction de $d_h \times Pe^{1/3}$ (d'après l'équation 3.36) : les résultats sont montrés sur la figure 3.21. Par ce graphique, on note bien une très forte loi d'universalité qui démontre bien les résultats précédents, à savoir que \bar{t} varie comme $Pe^{2/3}$ et d_h^{eff} comme $Pe^{-1/3}$. Le calcul numérique correspondant à l'équation 3.34 nous donne $d_h^{\text{eff}} \times Pe^{-1/3} = 407 \mu\text{m} = 4.07 \times 10^5 \text{ nm}$; nous avons reporté la valeur correspondante sur la figure 3.21 : notre calcul nous donne le bon ordre de grandeur. Concernant la valeur de τ_∞ , le calcul numérique correspondant à l'équation 3.41 nous donne $\tau_\infty \times Pe^{-2/3} = 8.88 \times 10^{-3} \text{ s}$, que l'on compare avec un excellent accord en ordre de grandeur avec le plateau autour de 10^{-2} s de la figure 3.21 !

On remarque enfin que, contrairement à l'advection chaotique dans les systèmes bidimensionnels [73] ou tridimensionnels [74], la dépendance du temps de mélange avec le Péclet ne se fait pas en $\log(Pe)$ comme on pourrait s'y attendre, mais au travers d'une fonction puissance, comme dans le cas des écoulements laminaires non chaotiques usuels. En effet, le mélange ne se fait pas de manière chaotique dans la direction verticale, car le mélange dans cette direction ne se fait que par le gradient du champ de vitesse comme nous venons de le montrer. Cela explique pourquoi le gain réalisé sur les temps de cinétique (facteur de l'ordre de 100 par rapport à la diffusion pure) est beaucoup plus faible que celui que l'on aurait pu espérer avec notre modèle de mélange purement bidimensionnel !

3.3.3 Cinétique de réaction

Advection chaotique

Dans le cas du mélange par advection chaotique, la décroissance exponentielle indique que la cinétique est bien un processus de pseudo ordre 1 (car nous sommes dans le cas particulier de l'excès de l'un des deux réactifs), chose qui n'est rigoureusement démontrée que dans le cas d'un mélange efficace dans la chambre (voir la discussion introductive de ce chapitre). Étonnamment,

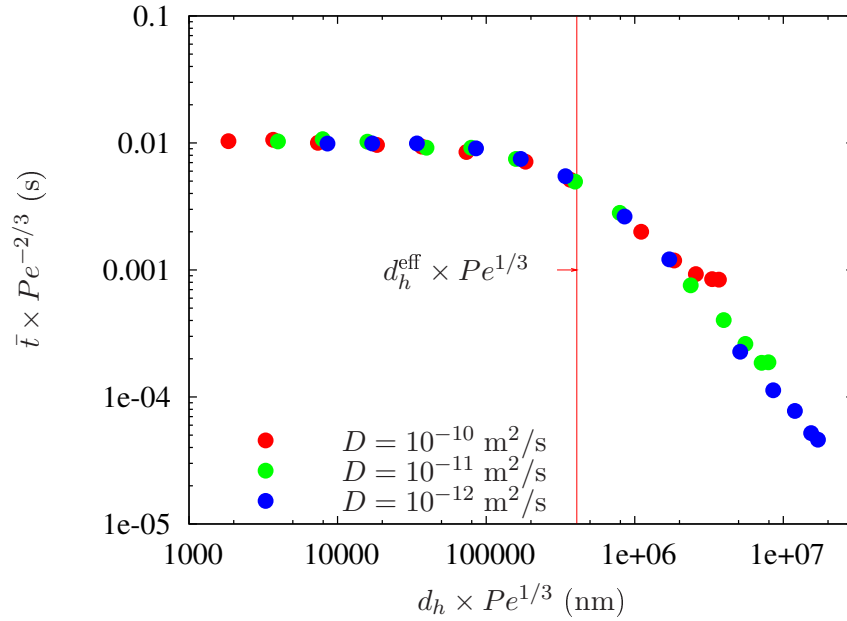


FIG. 3.21 – $\bar{t} \times Pe^{-2/3}$ en fonction de $d_h \times Pe^{1/3}$ pour différentes valeurs du coefficient de diffusion (2120 particules). On remarque que la dépendance en Pe des divers temps est bien une puissance de $2/3$ et que d_h^{eff} varie comme $Pe^{-1/3}$. Le calcul de d_h^{eff} montre bien la séparation entre les deux comportements. Échelle *log-log*.

c'est aussi ce type d'évolution que de nombreux auteurs trouvent, malgré l'absence de mélange dans leur expérience (par exemple dans [75] [76] [72] ...) alors que nous avons montré, simulations à l'appui, que c'était censé ne pas être le cas !

À partir de ces résultats, nous allons tenter de déterminer l'ordre de grandeur de la constante de vitesse k_a définie par l'équation 3.2 et calculable d'après les égalités 3.7 et 3.8. On rappelle que dans notre modèle d'hybridation, nous n'avons pas tenu compte d'une éventuelle dissociation des brins appariés. On a donc déjà :

$$k_d = 0 \quad (3.43)$$

Il reste donc :

$$k_a \times [S]_0 = \frac{1}{\tau_\infty} \quad (3.44)$$

Il s'agit maintenant d'estimer $[S]_0$, sachant que nous savons seulement par hypothèse que chaque plot contient un très grand nombre de sondes. Si L_p représente le diamètre d'un plot, la surface de ce plot vaut :

$$\pi(L_p/2)^2 \quad (3.45)$$

La surface totale des plots sur la puce vaut donc :

$$N_p \times \pi(L_p/2)^2 \quad (3.46)$$

Le problème qui se pose maintenant est de donner un ordre de grandeur de la densité de sondes sur les plots. La densité joue en effet un rôle important : il a été montré qu'une densité

trop importante jouait sur l'accessibilité des sondes (effets stériques), faisant décroître k_a [61] [63]. Il faut donc que les sondes soient suffisamment espacées sur les plots. D'un autre côté, notre modèle d'hybridation suppose que la cible soit hybridée dès lors qu'elle passe à une hauteur d_h au dessus du plot (volume d'hybridation). Cela signifie que dès lors qu'elle est dans le volume d'hybridation, elle se trouve dans la sphère d'influence d'une sonde (donc au plus à une distance d_h d'une sonde). Nous allons donc, en ordre de grandeur, supposer qu'il y a une sonde pour une surface de d_h^2 . Ainsi, la densité de sondes sur les plots est :

$$1/d_h^2 \approx 10^{10} \text{ sondes.cm}^{-2} \quad (3.47)$$

Dans la pratique, les puces à ADN peuvent accueillir jusqu'à 10^{12} molécules par cm^2 , mais la plupart du temps cette densité est beaucoup moindre. La valeur trouvée en 3.47 est donc tout à fait acceptable.

Le nombre total de sondes N_s sur la puce est donc :

$$N_s = \frac{N_p \times \pi(L_p/2)^2}{d_h^2} \quad (3.48)$$

La concentration volumique initiale, exprimée en mol/L, vaut donc :

$$[S]_0 = \frac{N_s}{\mathcal{N}_a \times L^2 \times h} \quad (3.49)$$

où \mathcal{N}_a est le nombre d'Avogadro. En prenant $\mathcal{N}_a = 6.02 \times 10^{23}$, $d_h = 100 \text{ nm}$, $L = 1.5 \text{ cm}$, $h = 50 \text{ }\mu\text{m}$, $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, $N_p = 53$ plots et $L_p \simeq 0.54 \text{ mm}$, les calculs donnent :

$$N_s \approx 10^9 \quad (3.50)$$

et :

$$[S]_0 = 2 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1} \quad (3.51)$$

On peut alors calculer les constantes de vitesse de la réaction, données par :

$$k_a = \frac{1}{\tau_\infty \times [S]_0} \quad (3.52)$$

Dans le cas de l'hybridation statique (diffusion pure), on a $\tau_\infty^{\text{diff}} = 6520 \text{ s}$, soit :

$$k_a^{\text{diff}} = 8.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1} \approx 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1} \quad (3.53)$$

où M est le symbole des unités de concentrations volumiques usuellement utilisé en chimie : mol.L^{-1} . Ce résultat est remarquable car, avec un modèle très simple, nous trouvons le même ordre de grandeur que celui trouvé expérimentalement par de nombreux auteurs! Ceci prouve bien que c'est certainement la diffusion qui limite la réaction chimique.

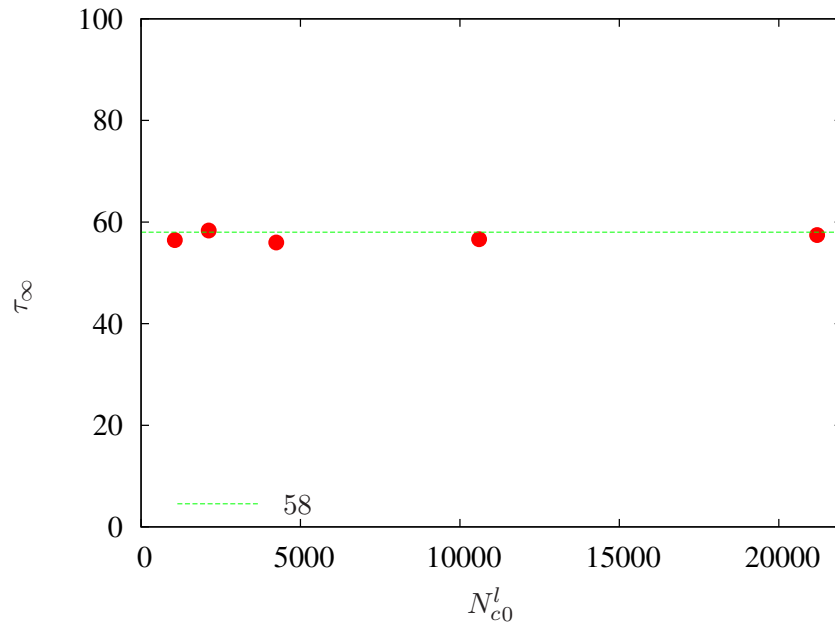
Dans le cas de l'hybridation avec advection chaotique, pour $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, on a $\tau_\infty^{\text{adv}} = 58 \text{ s}$. On obtient une vitesse plus importante, soit⁸ :

$$k_a^{\text{adv}} = 9.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1} \approx 10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1} \quad (3.54)$$

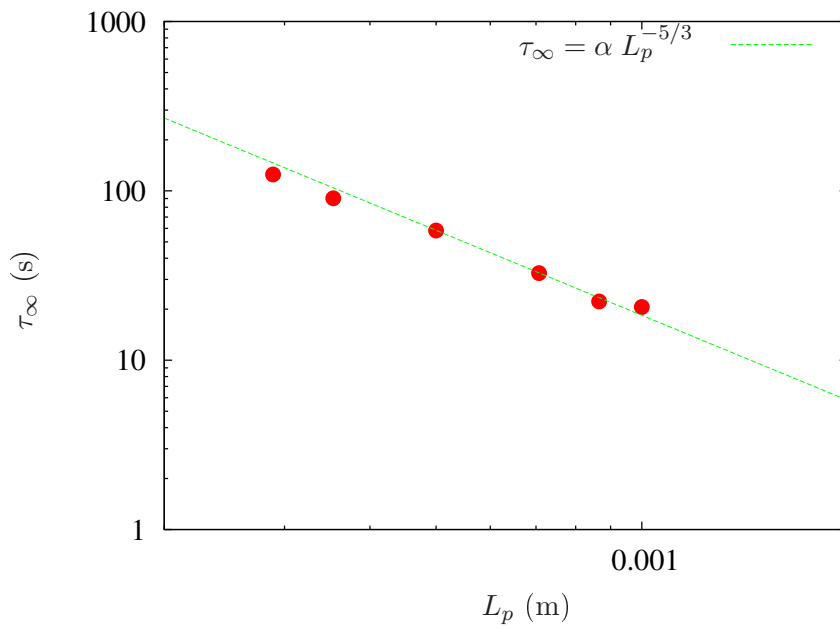
⁸On retrouve bien le rapport $k_a^{\text{adv}}/k_a^{\text{diff}} = \tau_\infty^{\text{diff}}/\tau_\infty^{\text{adv}} = 112$

Nous avons également vérifié que la grandeur $1/\tau_\infty$ ne dépendait effectivement pas de $[C]_0$, comme le suggère l'équation 3.44, en faisant varier le nombre de cibles (figure 3.22a). D'autre part, nous avons fait varier la taille des plots (d'une surface trois fois plus petite jusqu'à quatre fois plus grande que celle étudiée jusqu'ici⁹ (revoir la figure 3.6). En effet, pour que la constante de réaction k_a soit strictement indépendante de $[S]_0$, il faudrait que τ_∞ soit inversement proportionnel à $[S]_0$ (d'après l'équation 3.52), donc proportionnel à L_p^{-2} . Or, notre étude théorique (équation 3.42) nous prédit plutôt un comportement en $L_p^{-5/3}$ effectivement vérifié figure 3.22b). Ainsi, la constante de réaction k_a dépend très légèrement de la taille des plots. Cependant, cette déviation ($L_p^{-5/3}$ au lieu de L_p^{-2}) est suffisamment faible pour être difficile à montrer expérimentalement.

⁹Dans le cas où la surface des plots est quatre fois plus grande, deux plots adjacents se touchent.



(a)



(b)

FIG. 3.22 – a) Indépendance en $[C]_0$ de τ_∞ . Échelle *lin-lin* b) Dépendance de τ_∞ en L_p . Les calculs ont été faits pour le cas $d_h = 100$ nm et $D = 10^{-10}$ m²/s en faisant varier la taille des plots de sondes. On constate bien une dépendance de τ_∞ en $L_p^{-5/3}$ conformément au résultat trouvé par l'équation 3.42. Échelle *log-log*.

Parmi tous les auteurs qui ont essayé de déterminer la valeur de k_a , aucun n'avait incorporé le mélange par *advection chaotique* dans son dispositif expérimental ou dans ses simulations. Nous avons quand même voulu comparer notre résultat de diffusion pure à ceux d'autres auteurs en résumant dans le tableau 3.3 les différentes valeurs trouvées d'après ces lectures.

Enfin, il faut savoir que, outre l'influence de la densité de sondes sur la puce, les valeurs de k_a dépendent également de nombreux autres facteurs comme :

- la longueur des monobrins utilisés [61][76]
- la correspondance brins/cibles : une discordance de 1 base pour un 20-mer peut diminuer entre 10 à 100 fois la valeur de k_a [77] [60]
- les propriétés chimiques de la solution tampon (salinité, pH, etc.) [63].

3.3.4 Diffusion et vitesse de réaction intrinsèque

Une question nous vient alors à l'esprit : est-il logique que la constante de vitesse d'une réaction, qui ne dépend en principe que de la réaction chimique étudiée, dépende aussi du mode de transport des réactifs utilisé dans l'expérience (advection ou diffusion pure) ? La loi d'Arrhénius 3.55, qui permet de décrire de façon empirique la variation de la constante de vitesse d'une réaction chimique, ne dépend que des énergies d'activation des molécules et de la température, mais ne tient absolument pas compte par exemple d'un processus d'agitation, de transport ou autre :

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{R.T^2} \quad (\text{formule empirique}) \quad (3.55)$$

où k est la constante de vitesse d'une réaction, R est la constante des gaz parfaits, T est la température et E_a l'énergie d'activation d'Arrhénius.

Cette énergie ne dépend en principe que des molécules mises en jeu et on a coutume de représenter E_a par la figure 3.23 :

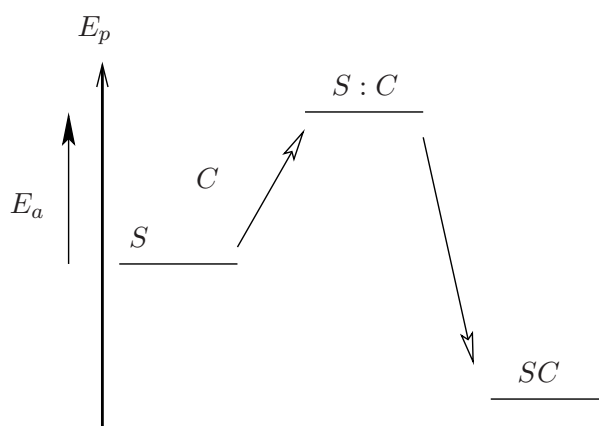


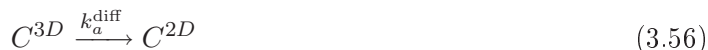
FIG. 3.23 – Énergie d'activation de la réaction d'hybridation. $S : C$ représente une espèce moléculaire non isolable à mi-chemin entre les réactifs séparés (S et C) et le produit final (SC).

Auteurs	k_a ($M^{-1}.s^{-1}$)	Sources
Zhang et al.[78] (2005)	$10^4 < . < 5.0 \times 10^6$	<ul style="list-style-type: none"> - Valeurs de k_a issues de la littérature avec $[S]_0 \sim 10^{-6}$ M, $[C]_0 \sim 10^{-3}$ M – 10^3 M - Simulations numériques : simule les cas $[S]_0 \gg [C]_0$, $[S]_0 \ll [C]_0$ et $[S]_0 \approx [C]_0$ pour plusieurs rapport k_a/k_d
Gadgil et al.[62] (2004)	1.0×10^6	<ul style="list-style-type: none"> - Simulations numériques avec valeur de k_a prise dans la littérature - $[S]_0 = 78 \mu\text{M}$ $[C]_0 = 3.8$ nM, 90 pM et 4.5 pM - 2 types de cibles (+ ou - complémentaires avec les sondes) de longueur 500 bp
Erickson et al. [60] (2003)	1.6×10^6	<ul style="list-style-type: none"> - Simulations numériques - Valeur de k_a calculée d'après la formule de Wetmur et Davidson (empirique) : $k_a = 3.5 \times 10^5 \frac{\sqrt{L^*}}{N^*}$, L^* étant le nombre de nucléotides et N^* la complexité de la séquence de la cible, généralement prise comme étant égale au nombre total d'enchaînement différents de nucléotides dans la séquence d'ADN. - C :20-mer et S :20-mer - $[C]_0 = 0.1 \mu\text{M}$ et $[S]_0 = 10^{-9} - 10^{-7} \text{ cm}^{-2}$ - Courant de fluide continu tel que $v_{max} = 0.5 \text{ mm.s}^{-1}$ et $Re = 0.1$
Chan et al. [61] (1995)	4×10^6 , 5.7×10^5 , $k_a^i \approx \times 10^9$	<ul style="list-style-type: none"> - Valeurs de k_a issues de la littérature - C : 6 à 40k-mer ; S : 6 à 40k-mer

Auteurs	k_a ($M^{-1}.s^{-1}$)	Sources
Kambhampati et al. [75] (2001)	8.9×10^3	<ul style="list-style-type: none"> - Valeur expérimentale de k_a - S :15-mer et C :15-mer - $[S]_0 = 1$ sonde/40 nm² $[C]_0 = 5 \times 10^{-7}$ M - 1 discordance (= 1 mer non complémentaire entre cibles et sondes)
Zeng et al. [77] (2003)	$\approx 10^6$	<ul style="list-style-type: none"> - Résultats expérimentaux - C :20-mer et S :20-mer - $[C]_0 \sim 10^{-7}$ M – 5×10^{-8} M, haute et basse densité de sondes (respectivement 10 nm et 5 nm entre chaque sonde) - Les auteurs différencient les phénomènes d'adsorption sur la surface et l'hybridation.
Lehr et al. [72] (2003)	$10^5 < . < 10^6$	<ul style="list-style-type: none"> - Résultats expérimentaux - C :30-mer ; S :30-mer - Courant de fluide continu : 1 μL/s - $[C]_0 = 10$ nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM
Henry et al. [63] (1999)	5×10^4 et $k_{a0} = 5 \times 10^5$	<ul style="list-style-type: none"> - Résultats expérimentaux - C :22-mer ; S :22-mer - $[C]_0 \sim 10^{-8} - 10^{-9}$ M, $[S]_0 \sim 10^{-9}$; M

TAB. 3.3 – Valeurs rapportées ou mesurées de la constante de vitesse d'hybridation k_a (modèle de Langmuir) chez les différents auteurs dans le cas de diffusion pure.

Le problème vient de l'équation 3.55 qui n'est valable qu'à l'équilibre thermodynamique. Or ici, la concentration en cibles n'est pas constante ! Ainsi, pour beaucoup d'auteurs, leur mesure macroscopique de k_a est limitée par la réaction de diffusion. Les deux étapes de la réaction sont alors :



et :



où C^{3D} et C^{2D} représentent respectivement les cibles en volume et celles en surface (proches des sondes), et k_a^i représente la **constante de vitesse intrinsèque**.

Or, on montre dans ce cas que la constante de réaction k_a s'exprime par :

$$k_a = \frac{1}{[S]_0} \left(\frac{k_a^{\text{diff}^2}}{k_a^i [S]_0 + k_a^{\text{diff}}} + k_a^{\text{diff}} \right) \quad (3.58)$$

où k_a est la constante de vitesse macroscopique (mesurée par l'expérimentateur) et k_a^{diff} est la "constante de vitesse" de l'équation de diffusion 3.56. La diffusion étant le processus limitant (lorsqu'il n'y a pas advection chaotique), on a $k_a^{\text{diff}} \ll k_a^i [S]_0$, donc $k_a \approx k_a^{\text{diff}} / [S]_0$, qui n'a plus aucun lien avec la réaction étudiée : l'expérimentateur ne mesure plus que le temps caractéristique que met une cible à arriver dans un voisinage $O(d_h)$ d'une sonde, et non pas le temps que mettent les espèces, initialement très proches, à s'hybrider !

Par contre, si l'on dispose d'un phénomène de transport efficace, de sorte que la réaction chimique devienne l'étape limitante, on peut accéder directement à la mesure de k_a^i . Chan et al. [61], conscients du problème, estiment que $k_a^i \sim 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

La constante *intrinsèque* de vitesse de la réaction serait donc celle que l'expérimentateur mesurerait s'il n'y avait aucun autre processus limitant pour la réaction l'hybridation : pour pouvoir mesurer k_a^i , certains auteurs [79] suggèrent de travailler avec un grand excès d'espèces mobiles, car alors le flux du volume vers la surface devient important : c'est dans ce cas particulier que la majorité des auteurs se sont placés spontanément (mais ceci pour des raisons de facilités de calculs uniquement, sans être vraiment conscients du problème). Le flux diffusif des cibles en volume vers la surface s'exprime en effet par :

$$j_D = \frac{D}{x_d} \times ([C]_{3D} - [C]_{2D}) \quad (3.59)$$

où D est le coefficient de diffusion, x_d est l'épaisseur de la couche limite diffusive, $[C]_{3D}$ et $[C]_{2D}$ représentent respectivement la concentration en volume et celle proche de la surface. Dans le cas d'une cinétique d'hybridation rapide, $[C]_{2D} \approx 0$: le gradient de concentration est élevé. Puisque $[C]_{3D}$ est grande, le flux l'est aussi, et c'est ainsi que certains expérimentateurs pensent pouvoir accélérer la diffusion verticale¹⁰.

Notre modèle est un simple modèle de capture (le brin s'hybride instantanément à la cible dès qu'il entre dans le volume d'hybridation). Dans la pratique, on s'attend à ce que la réaction ne soit

¹⁰Cependant, pour mesurer la vitesse de réaction, ils doivent diviser par la concentration en cibles ... et retrouvent la même valeur que ceux qui se placent en plus faible concentration ! Cela prouve bien qu'ils sont quand même limités par la diffusion.

pas instantanée, mais possède un temps de réaction $\tau_{\text{réac}}$ supérieur au temps de renouvellement du fluide dans le volume d'hybridation. Le processus limitant dans le système est donc la réaction chimique proprement dite¹¹. Dans le cas du Rosamix par exemple, une première tentative de mesure de cinétique, faite en recommençant plusieurs fois l'expérience d'hybridation avec des puces identiques et en arrêtant l'expérience à différents temps, donne un rapport de vitesse de l'ordre de 20 entre l'hybridation statique et l'hybridation dynamique [80]. Or, nos calculs montrent que l'on amène les cibles environ 100 fois plus vite avec le Rosamix. Il est possible que la différence observée soit due au temps de réaction $\tau_{\text{réac}}$. Ainsi, l'advection chaotique devrait nous permettre de mesurer les vitesses intrinsèques de réaction, en nous plaçant dans le cas $\tau^{\text{diff}} > \tau_{\text{réac}} > \tau^{\text{adv}}$ (la vitesse de réaction n'est pas limitée par le transport des cibles vers les sondes, mais par la réaction elle-même). C'est ce que nous allons faire dans le chapitre suivant.

Résumé

Dans ce chapitre, nous avons introduit un modèle de réaction chimique dans la chambre d'hybridation de puces à ADN, basé simplement sur la capture de cibles libres lorsque celles-ci s'approchent suffisamment près des plots de sondes fixes (distance inférieure à d_h). Ce modèle simule ainsi les interactions intermoléculaires essentiellement de type liaisons hydrogène entre des brins complémentaires, qui sont des interactions relativement fortes et de longue portée.

Tout au long de ce chapitre, nous avons comparé l'efficacité de l'hybridation pour les deux types de transport des cibles : la diffusion pure (méthode historique) et le mélange par advection chaotique (nouveau). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'hybridation associée au mélange par advection chaotique permettait un gain énorme en terme de temps de réaction (≈ 100 fois plus rapide), mais aussi en terme d'homogénéité de l'hybridation, gage d'une excellente fiabilité du signal délivré (et donc en fiabilité d'interprétation des résultats).

Nous avons pu mettre également en évidence le caractère peu crucial de la valeur exacte de d_h (numériquement) dans le cas du mélange : en effet, les résultats sur les temps d'hybridation dépendent peu de ce paramètre pour les valeurs de d_h les plus probables (compte tenu des interactions en jeu). En ce qui concerne l'influence du coefficient de diffusion D sur l'hybridation associé au mélange, nous avons pu montrer une dépendance des temps de réaction selon une loi en $Pe^{2/3}$.

¹¹ Dans le cas d'une cinétique lente, nous sommes dans le cas où la cinétique de réaction a un temps caractéristique $\tau_{\text{réac}}$ supérieur au temps de renouvellement du fluide τ^{eff} , le processus limitant dans le système est donc la réaction chimique proprement dite. La vitesse de réaction s'écrit alors :

$$-\frac{1}{N_c^l} \frac{dN_c^l}{dt} = \frac{1}{\tau_{\text{réac}}} \frac{V_{\text{utile}}}{V_{\text{chambre}}} \quad (3.60)$$

soit :

$$-\frac{1}{N_c^l} \frac{dN_c^l}{dt} = \frac{1}{\tau_{\text{réac}}} \frac{N_p \times L_p^2 \times d_h^{\text{eff}}}{L^2 \times h} = \frac{1}{\tau} \quad (3.61)$$

d'où :

$$\tau \propto \frac{1}{d_h^{\text{eff}}} \propto Pe^{1/3} \quad (3.62)$$

Pour essayer de retrouver des résultats expérimentaux issus de la littérature, nous avons essayé d'estimer la constante de vitesse k_a de la réaction d'hybridation dans le cas de la diffusion pure. Nous avons trouvé numériquement le même ordre de grandeur que celui trouvé par de nombreux auteurs ($k_a \sim 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Dans le cas de l'hybridation sous mélange chaotique, cette constante est bien plus élevée ($k_a \sim 10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Nous avons enfin expliqué comment, grâce à l'advection chaotique, nous espérons pouvoir mesurer la constante de vitesse intrinsèque de la réaction (notée k_a^i), et non la vitesse d'apport de cibles vers les sondes. C'est le but du chapitre suivant.

Chapitre 4

Vers une mesure expérimentale de la constante de vitesse intrinsèque

Introduction

Nous avons testé dans le chapitre 2 un prototype de mélangeur par advection chaotique dont nous avons simulé numériquement l'efficacité en fonction, par exemple, de la période du processus périodique ou de la forme de la chambre d'écoulement. Dans un second temps (chapitre 3), nous avons introduit un modèle simple d'hybridation moléculaire, et nous avons évalué l'influence de plusieurs paramètres (hybridation statique ou dynamique, coefficient de diffusion, distance d'interaction). Dans ces simulations, la cinétique était modélisée par un modèle de capture : dès que la cible entrait dans un (petit) voisinage de la sonde, elle s'hybridait. Cependant, on imagine que dans la pratique, ce n'est pas réalisé aussi facilement : il existe une vitesse intrinsèque à laquelle la cible s'hybride sur la sonde. Ainsi, notre modèle numérique n'est valable que tant que les cibles sont renouvelées dans le volume d'hybridation avec un temps caractéristique plus long que le temps intrinsèque d'hybridation. Notre idée est donc d'utiliser l'advection chaotique pour amener de plus en plus vite les cibles vers les sondes (en augmentant le débit), jusqu'à l'obtention d'une vitesse de réaction intrinsèque d'hybridation, qui ne dépende plus du débit. Pour cela, nous devons utiliser un dispositif de mesure de l'avancement de la réaction chimique en temps réel : nous avons utilisé la technique de *Résonance de Plasmon de Surface* (SPR) qui présente le grand avantage, en plus d'être une méthode de suivi non intrusive, de permettre de réaliser des mesures instantanées pour des suivis en temps réel. J'attire l'attention du lecteur sur le fait que ce chapitre est essentiellement prospectif ; comme son titre l'indique, il n'a pas été possible, faute de temps, de reprendre la série de mesures de cinétique chimique en advection chaotique. Ce dernier point est d'ailleurs une des principales perspectives de ce travail.

4.1 LA SPR ou Résonance par Plasmon de Surface

Le principe physique de la SPR repose sur de fortes connaissances d'électromagnétisme associées à d'autres de physique des milieux condensés. Afin de conserver un constant souci de simplicité, je décrirai le principe de la SPR sans trop entrer dans le cœur du phénomène. Pour plus de détails, le lecteur pourra se reporter à l'article d'Andreas Otto [81].

4.1.1 Nouveaux besoins en méthodes d'analyse : naissance de la SPR

Depuis une vingtaine d'années, un besoin croissant en méthodes d'analyses et de détection des interactions moléculaires s'est fait ressentir. Les domaines nécessitant ce type de technologie sont nombreux : biologie moléculaire (biocapteurs), analyse de la pollution de l'air et de l'eau, diagnostics médicaux, agriculture, sécurité... Un besoin important concerne également la recherche génomique, pour tester et mesurer par exemple les interactions moléculaires sur les puces à ADN. Pour être efficace, il fallait trouver un système de détection moderne, rapide, sensible et robuste tout en restant économique. Dans ce but, de nombreux biocapteurs ont été développés ([82][83][84]). Ils ont été spécialement conçus pour détecter et/ou quantifier les interactions biologiques à la surface d'un substrat solide.

En ce qui concerne les puces à ADN, l'observation de l'hybridation de monobrins d'ADN sur un substrat solide reposait (et repose encore très souvent) sur un processus de transduction optique utilisant le principe de la fluorescence induite d'un marqueur par une onde lumineuse [85][86][87]. L'avantage de cette méthode est l'important rapport signal sur bruit de la mesure (dû au fort contraste lumineux entre les spots fluorescents et le bruit de fond) mais les inconvénients sont l'utilisation de réactifs onéreux ainsi que les longues et fastidieuses procédures d'étiquetage moléculaires. De plus, la plupart de ces outils ne permettent qu'une mesure en fin de réaction (par opposition à une mesure en temps réel). C'est ce point que va essayer de corriger la méthode de résonance par Plasmon de Surface (SPR).

4.1.2 Principe physique de la SPR

Réflexion totale d'une onde lumineuse

Lorsqu'une onde lumineuse se propage dans un milieu optique dense (le verre par exemple, $n_1 = 1.5$) et rencontre un milieu d'indice optique plus faible (par exemple l'air ou l'eau, d'indices respectifs $n_2 \approx 1$ et $n_2 = 1.33$), il peut y avoir réflexion totale du rayon incident dans le milieu le plus dense si l'angle d'incidence est supérieur à l'angle de réfraction $\arcsin(n_2/n_1)$: le rayon reste alors dans le milieu le plus dense¹.

Une conséquence importante de la réflexion totale est la création d'une onde évanescente qui pénètre dans le milieu moins dense. On l'appelle ainsi car l'intensité de cette onde décroît exponentiellement avec la distance à l'interface (pas de propagation dans cette direction) sur une profondeur de l'ordre de la longueur d'onde² [88]. De plus, cette onde évanescente a la propriété de se propager le long de l'interface entre les deux milieux.

Plasmon de surface

Un plasmon de surface est une densité de charge longitudinale qui se propage le long de l'interface entre deux milieux, dont l'un est un métal et l'autre un diélectrique (liquide ou gaz, [89]). Un plasmon peut être induit par l'effet du couplage entre un champ électromagnétique (onde lumineuse) et l'oscillation du *plasma* d'électrons libres du métal sous l'effet de cette onde.

¹En revanche, il ne peut y avoir réflexion totale si l'onde lumineuse va de l'air vers le verre, de l'eau vers le verre, ou de l'air vers l'eau. Il y a alors *réfraction* de l'onde lumineuse car celle-ci traverse les deux milieux en subissant une déviation à l'interface.

²Sous des conditions normales, la création d'une onde évanescente n'affecte pas la conservation de l'énergie, car une onde évanescente ne transmet aucune énergie (son "vecteur de Poynting" est nul).

D'après les équations de Maxwell, cette onde de plasma est associée à une onde évanescente, localisée des deux côtés de l'interface, et dont les propriétés sont fortement liées à la nature de diélectrique (fig. 4.1).

Le choix du métal est important, puisque celui-ci doit avoir des électrons décrits par le modèle de l'électron libre [90]. Les deux métaux principalement utilisés sont l'or et l'argent. Nous discuterons plus loin des différences entre ces métaux.

Excitation des plasmons de surface

Deux principaux dispositifs expérimentaux ont été développés par Otto [81] et Kretschmann [91][92] pour exciter les plasmons de surface. Cependant, c'est la configuration "à réflexion totale" (Attenuated Total Reflectance, ATR) de Kretschmann qui est la plus utilisée en SPR.

Pour créer un plasmon de surface, le dispositif de Kretschmann (figure 4.1) utilise le principe de la réflexion totale interne d'une onde entre deux milieux : le verre et généralement un liquide ou un gaz. Sur le verre, du côté de ce qui formera l'interface, on dépose une très fine couche de métal (par évaporation) de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur. Ainsi, si les caractéristiques de l'onde évanescente résultant de la réflexion d'une onde (vecteur d'onde de propagation le long de l'interface) sont identiques à celle du plasmon de surface, l'onde évanescente pourra exciter de façon non négligeable l'onde de plasmon et entrer en résonance avec elle : on parle alors de résonance de surface. Cela se traduit par une perte d'énergie de l'onde incidente dans le film métallique, engendrant une réduction de l'intensité de l'onde réfléchie. Ce dernier phénomène peut être facilement détecté grâce à un capteur photométrique (type capteur CCD, ...).

Revenons plus dans les détails : pour ce type de montage, on utilise une onde plane monochromatique rectiligne polarisée dans le plan d'incidence et l'interface entre les 2 milieux optiques est constituée d'une fine couche de métal d'épaisseur inférieure à la longueur d'onde de l'onde lumineuse. Le vecteur d'onde de l'onde évanescente $K_{év}$ est donné par :

$$K_{év} = \frac{\omega_o}{c} n_1 \sin(\theta), \quad (4.1)$$

où :

- ω_o est la fréquence de l'onde incidente (monochromatique),
- n_1 est l'indice optique du milieu dense (le verre),
- θ est l'angle d'incidence du rayon lumineux,
- c la célérité de la lumière dans le vide.

Le vecteur d'onde du plasmon de surface K_{ps} peut être, quant-à-lui, approximé par :

$$K_{ps} = \frac{\omega_o}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m n_s^2}{\epsilon_m + n_s^2}}, \quad (4.2)$$

où :

- ϵ_m est la constante diélectrique du film métallique,
- n_s est l'indice optique superficiel local du diélectrique (air ou eau) *au niveau de l'interface*³ (figure 4.2).

³ $n_s = n_2 + \epsilon$ avec $|\epsilon| \ll 1$

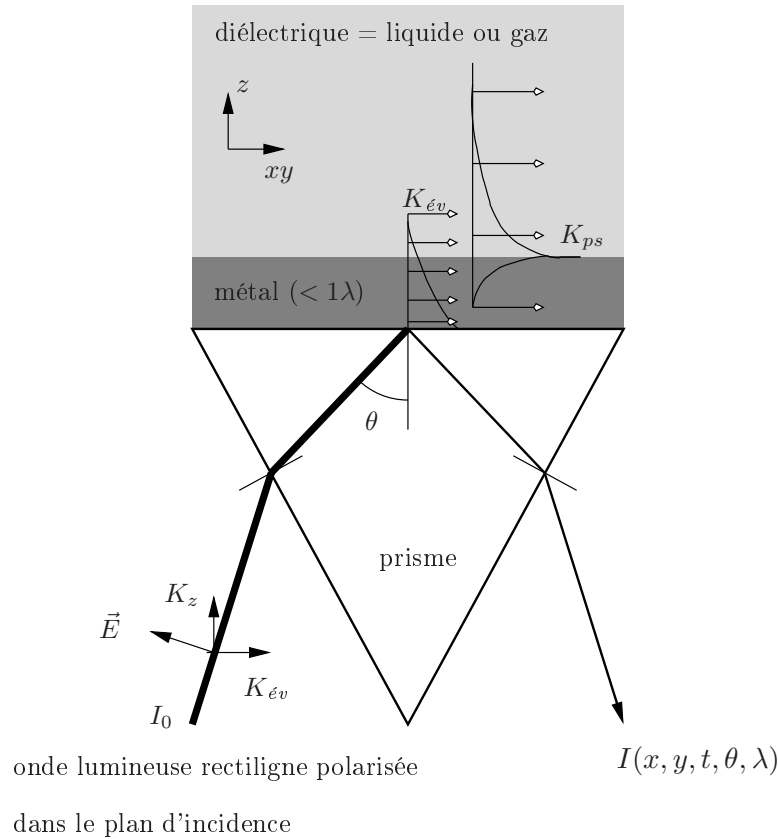


FIG. 4.1 – Configuration de Kretschmann à base de prisme pour la SPR. La résonance d'un plasmon de surface s'obtient à l'interface métal/air ou métal/eau lorsque l'angle d'incidence de la lumière est tel que la composante de son vecteur d'onde $K_{\epsilon v}$ est égal au vecteur d'onde du plasmon K_{ps} . *Note* : les proportions ne sont pas respectées, en particulier la couche de métal est représentée épaisse pour bien montrer l'onde de plasmon.

L'onde évanescente issue du rayon lumineux incident est ainsi capable d'interagir avec les électrons libres (plasmons) du métal. Ceux-ci vont alors osciller dans la couche métallique lorsque l'angle θ sera tel que la condition de résonance :

$$\boxed{K_{\epsilon v} = K_{ps}} \quad (4.3)$$

sera vérifiée. Expérimentalement, on note à la résonance un minimum d'intensité de rayon réfléchi. On dit alors que le plasmon est excité par *résonance de surface*.

Influence de l'indice du diélectrique sur la résonance du plasmon de surface

L'équation 4.2 montre que K_{ps} dépend de l'indice de réfraction n_s du diélectrique (air ou eau) au-dessus du film métallique. Le volume d'interrogation, *d'indice n_s en moyenne* (fig. 4.2), a des dimensions qui dépendent de la distance de pénétration de l'onde plasmon dans le diélectrique, de la longueur de propagation de l'onde et de la taille du faisceau lumineux.

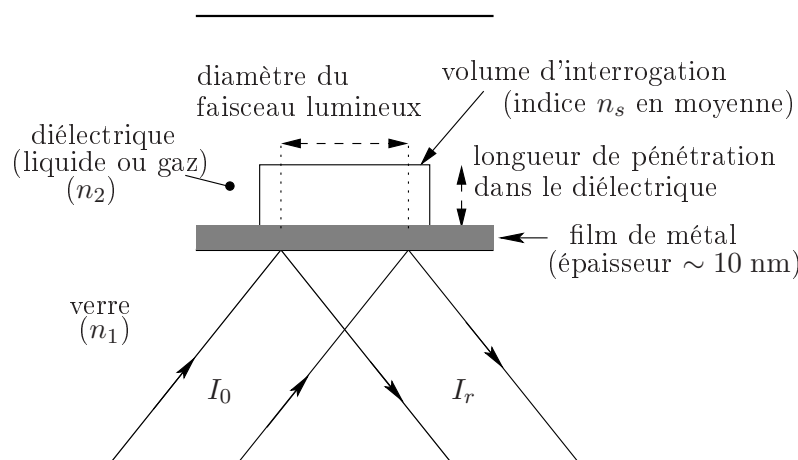


FIG. 4.2 – Volume d'interrogation dans un montage SPR. À l'intérieur de ce volume, l'indice vaut *en moyenne* n_s .

Les propriétés de l'onde de plasmon de surface sont données dans le tableau 4.1. Le choix du métal utilisé dans l'expérience dépend des caractéristiques du volume sondé : par exemple, si l'on veut avoir une mesure localisée sur certains plots, il vaut mieux utiliser le métal dont la longueur de propagation de l'onde SPR est de la taille du plot (par exemple résolution spatiale grande avec l'or). Par contre, si l'on ne désire qu'une moyenne de l'état de surface, il vaut mieux utiliser le métal argent dont la longueur de propagation de l'onde est élevée. Pour sonder en profondeur, les deux métaux se valent, car seule la longueur d'onde du faisceau lumineux compte : plus la longueur d'onde est élevée, plus le diélectrique est sondé en profondeur. Le choix de la longueur d'onde doit également être choisi astucieusement vis-à-vis du comportement spectroscopique de certaines molécules (absorption, diffraction, ...)

Avec la SPR, une profondeur pouvant aller jusqu'à 450 nm peut être sondée à l'intérieur du diélectrique. Or, il existe un lien fort entre la densité du milieu et son indice optique : d'après la loi de Gladstone 4.4, l'indice optique est une fonction croissante de la densité :

$$\frac{n_s^2 - 1}{\rho} = \text{constante} \quad (4.4)$$

Ainsi, si dans le volume d'interrogation la densité du milieu augmente – par accumulation de molécules (adsorption) et/ou par croissance de molécules sur la surface – la densité superficielle du milieu va augmenter, ce qui va engendrer une modification de l'indice optique superficiel du milieu. Par exemple, si l'indice optique juste au-dessus du film métallique est modifié par l'adsorption de molécules (hybridation de monobrins d'ADN par exemple), un ajustement de l'angle d'incidence va devoir être opéré pour que la condition de résonance 4.3 puisse à nouveau être vérifiée. Ainsi, cet ajustement peut permettre, en théorie, de quantifier l'évolution de n_s et donc de décrire l'état de surface au-dessus du métal. En ce sens, la SPR est fondamentalement une technique qui informe de l'état de surface d'un diélectrique.

D'autre part, d'après la loi de Cauchy, l'indice optique d'un milieu homogène dépend égale-

Métal utilisée pour la SPR	Argent	
Longueur d'onde	$\lambda = 630$ nm	$\lambda = 850$ nm
longueur de propagation (μm)	19	57
Profondeur de pénétration dans le métal (nm)	24	23
Profondeur de pénétration dans le diélectrique (nm)	219	443

Métal utilisée pour la SPR	Or	
Longueur d'onde	$\lambda = 630$ nm	$\lambda = 850$ nm
longueur de propagation (μm)	3	24
Profondeur de pénétration dans le métal (nm)	29	25
Profondeur de pénétration dans le diélectrique (nm)	162	400

TAB. 4.1 – Caractéristiques principales des ondes de plasmon de surface à l'interface or/eau ou argent/eau.

ment de la longueur d'onde λ de l'onde lumineuse selon :

$$n_s = A + \frac{B}{\lambda^2}, \quad (4.5)$$

où A et B sont des constantes qui dépendent du milieu. C'est pourquoi la condition de résonance dépend aussi de la longueur d'onde λ du faisceau incident. Ainsi est-il envisageable de faire varier λ pour détecter la condition de résonance (cela nécessite un matériel performant et onéreux) mais, dans la plupart des dispositifs, l'onde incidente est monochromatique et c'est une variation de l'angle θ qui est opérée.

Évolution de la courbe de réflectance en fonction de l'état de surface

Le protocole utilisé dans la technique de Résonance de Plasmon de Surface est toujours le même : la surface métallique est d'abord traitée de façon à fixer certaines molécules (formant le substrat initial) capables de réagir avec les molécules libres qui seront injectées (en volume) dans le diélectrique. Les interactions moléculaires auront donc nécessairement lieu en surface du métal et pourront ainsi être suivies par SPR.

La SPR permet ainsi l'étude de nombreux types d'interactions :

- En Physique :
 - développement de nouveaux traitements de surfaces (étude de l'adsorption et/ou désorption de molécules [93] [94], ...),
 - étude de certaines propriétés liées aux métaux (constantes diélectriques [95], ...),
 - autres réactions physiques (hydratation de molécules en surface [96], érosion de films de polymères biodégradables [97], porosité de certains polymères).
- En chimie :
 - réactions de synthèse en chimie organique (croissance de molécules, [98]),

- étude des propriétés de certains catalyseurs solides,
- détection et mesure de concentrations de gaz [99].
- En biologie (biocapteurs [100]) :
 - interactions protéines/protéines (enzymes, anticorps/antigènes [101][102], autres protéines [103]),
 - interactions virus/anticorps [104],
 - réactions récepteurs/ligands dans les couches lipidiques [105],
 - réactions hormones/récepteurs [106],
 - *génotypage sur puce à ADN* [107],
 - ...

La grandeur mesurée dans un dispositif SPR est la réflectance R , c'est à dire le rapport de l'intensité réfléchiée I_r sur l'intensité du faisceau incident I_o :

$$\boxed{R = \frac{I_r}{I_o}} \quad (4.6)$$

La réflectance est une mesure locale : elle reflète un état de surface **moyen** sur toute la zone illuminée par le faisceau incident (voir figure 4.2). Cette mesure est instantanée, elle peut donc être réalisée en temps réel.

La réflectance est donc une fonction de plusieurs variables :

- des coordonnées (x, y) de la surface sondée sur l'interface
- de l'angle θ du faisceau incident
- de la longueur d'onde λ
- du temps t

On peut donc écrire $R(x, y, t, \lambda, \theta)$ ou $I_r(x, y, t, \lambda, \theta)$ puisque nous allons travailler à intensité du faisceau incident constant. De plus, nous allons utiliser une source (laser) monochromatique et l'impact du faisceau sera localisé au centre de la cellule. Ainsi, il ne reste que le temps t et l'angle θ comme variables indépendantes du système et l'on écrira alors $R(t, \theta)$.

La forme typique de la courbe de la réflectance en fonction de θ , pour un état de surface donné, est du type de celle de la figure 4.3.

Comme on peut le voir sur la figure 4.3, la réflectance en fonction de θ possède un minimum (ici proche de 0.3) qui correspond à la condition de résonance de l'onde plasmon avec l'onde optique. Nous appellerons "angle de résonance" θ_r l'angle qui correspond à la condition de résonance (correspondant au minimum de R).

La fonction $K_{ps}(n_s)$ est une fonction croissante de n_s , comme le montre la figure 4.4. Ainsi, en supposant que l'expérimentateur se soit placé à la condition de résonance $\theta = \theta_r$ et que l'indice superficiel n_s augmente légèrement (par exemple par adsorption et/ou de la croissance de molécules en surface), la fonction $K_{ps}(n_s)$ va augmenter aussi. La condition de résonance 4.3 n'est alors plus vérifiée et il faut réajuster l'angle en l'augmentant pour retrouver à nouveau la relation 4.3. On a donc θ_r qui augmente (respectivement diminue) lorsque n_s augmente (respectivement diminue). Globalement, la forme de la courbe ne varie donc que très peu, seule une translation horizontale est observée lorsque θ_r varie (figure 4.5).

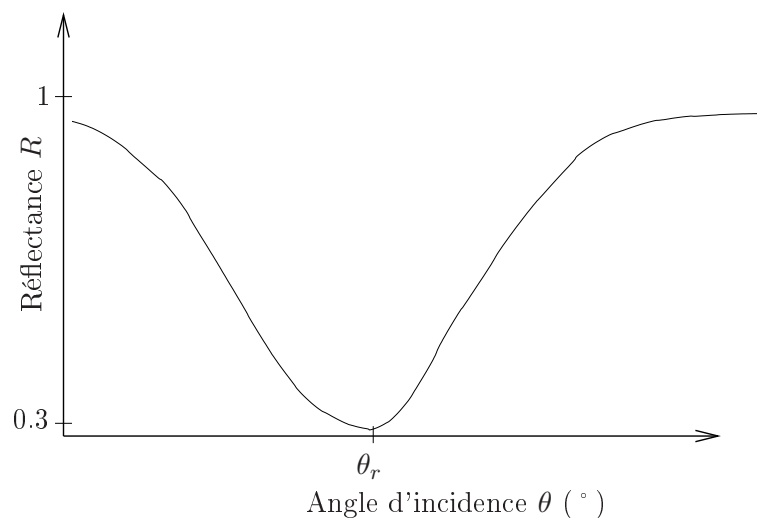


FIG. 4.3 – Allure de la courbe de réflectance en fonction de θ . Le minimum de R correspond à la condition de résonance.

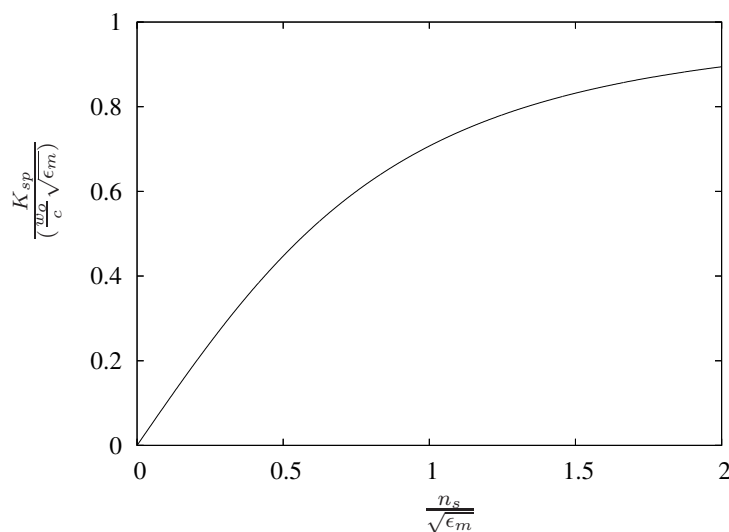


FIG. 4.4 – La fonction $K_{ps}(n_s)$ est une fonction croissante de n_s .

Protocole d'expérience

Comme nous l'avons vu, l'angle de résonance θ_r est fortement lié à l'indice de surface n_s . Ainsi, il serait possible par exemple de suivre en temps réel $\theta_r(t)$ dans le cadre d'une cinétique. Toutefois, cette façon de procéder n'est pas très pratique puisque pour déterminer θ_r , il faut scanner l'angle θ sur tout un intervalle pour en trouver le minimum de R . Ce n'est donc généralement pas le protocole utilisé dans le cadre du suivi d'une cinétique.

La procédure la plus utilisée est la suivante (voir fig. 4.5) : on effectue d'abord un balayage de

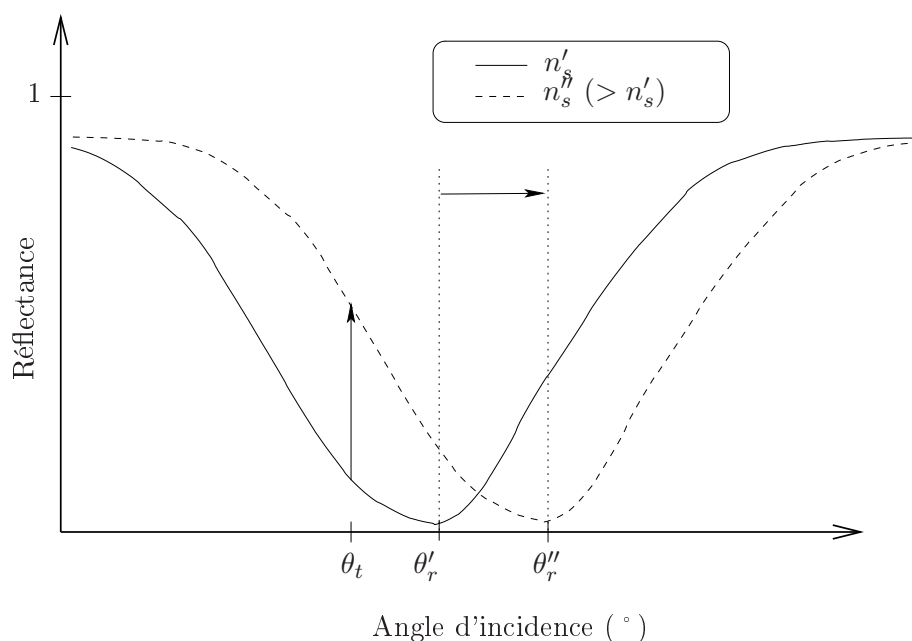


FIG. 4.5 – Influence de l'indice supéerficiel n_s sur la réflectance R . n'_s et n''_s sont deux valeurs de n_s (à titre d'exemple, $n''_s > n'_s$).

la réflectance en fonction de l'angle d'incidence θ . On détermine alors l'angle $\theta_r(t = 0)$. Ensuite, on règle le faisceau de façon à choisir un *angle de travail* θ_t qui se trouve sur la portion quasi linéaire de courbe $R(\theta)$, qui est également la portion de courbe la plus sensible pour la réflectance. On fixe ensuite cet angle **pour toute l'expérience**.

La cinétique est ensuite lancée : lorsque l'indice superficiel n_s change au cours du temps, la courbe de la réflectance en fonction de θ se translate horizontalement (car θ_r est modifié). Sachant que l'on travaille à angle fixé ($\theta = \theta_t$), c'est la réflectance, donc l'intensité du faisceau réfléchi (à un coefficient près), que nous allons mesurer en fonction du temps.

Comme notre angle de travail θ_t se trouve sur une portion de courbe quasi linéaire, la variation de $R(t)$ donne bien une image de la variation de $\theta_r(t)$ sans avoir besoin de rechercher à chaque instant (par un balayage mécanique) l'angle de résonance θ_r . Ceci est d'autant plus intéressant que l'intensité réfléchi est très sensible aux variations de θ_r , donc de n_s .

Exploitation des mesures

La courbe typique que l'on obtient lors d'une réaction chimique de capture (comme dans le cas de l'ADN lorsque les cibles s'hybrident aux sondes fixes) est celle de la figure 4.6. La grandeur mesurée est la réflectance (l'angle de résonance étant relié à la réflectance par une relation de proportionnalité liée à la pente de la courbe). Cette courbe se divise en plusieurs parties :

1. $t < 0$: avant l'injection des réactifs, la réflectance R est constante,
2. $t = 0$: injection des réactifs. La réflectance augmente brusquement, du fait d'un dépôt des produits sur la surface ou de la suspension de ceux-ci dans le volume d'interrogation. La

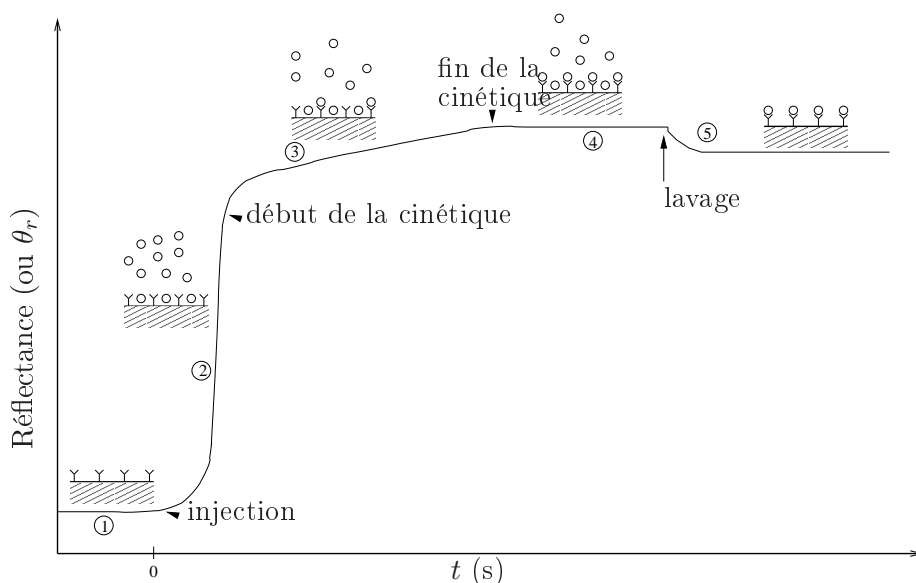


FIG. 4.6 – Courbe type de cinétique suivie par SPR. Cette courbe a les mêmes variations que l'on regarde la réflectance ou l'angle de résonance θ_r (facteur de proportionnalité entre ces deux grandeurs).

réaction chimique étudiée n'a donc pas commencé,

3. cinétique : la réaction chimique se déroule et R varie,
4. fin de la réaction : la réflectance reste constante,
5. lavage pour élimination des molécules n'ayant pas réagi : diminution de la réflectance finale.

Comme on le voit très clairement sur cet exemple, il est nécessaire de bien sélectionner la bonne portion de courbe pour pouvoir interpréter la cinétique de la réaction. Par exemple, la portion de courbe n° 2 n'est pas liée à la chimie ; elle est simplement due à l'apport de matière dans le milieu, ce qui modifie assez brusquement l'indice du milieu (augmentation de l'indice de surface, donc de l'angle de résonance ou de la réflectance). Par contre, la portion de courbe n° 3 est bien celle liée à la cinétique de réaction : elle est terminée lorsque plus aucune variation des grandeurs physiques n'est observée (portion 4).

Sur les portions 1 et 5, on peut noter que l'ajout de matière ou son extraction par lavage modifie l'indice de surface, donc la réflectance R , à cause des molécules qui viennent par gravitation se déposer à l'interface metal/diélectrique. Il est donc souhaitable de travailler sous advection de fluide, car le flux devrait alors empêcher le dépôt de matière sur l'interface. Les portions "gênantes" sont alors très diminuées, ce qui représente une amélioration. Toutefois, il faut tenir compte de cette advection dans la cinétique de la réaction car un tel réacteur n'est pas équivalent à un réacteur "statique". Dans notre cas, nous allons introduire *l'advection chaotique* pour améliorer l'efficacité du mélange. Nous serons donc dans le cas où les portions gênantes de la courbe vont devenir négligeables.

4.1.3 Sensibilité de la SPR

Pour la SPR, la *sensibilité* est définie par la dérivée du paramètre SPR mesuré (par exemple l'angle de résonance) par rapport au paramètre déterminé (indice du milieu). La *résolution* d'un capteur est la plus petite variation expérimentalement observable de la grandeur à mesurer grâce à celui-ci. Elle est limitée par le niveau du bruit de fond que l'instrument est capable de détecter.

Comme la réflectance est une grandeur physique qui dépend, outre de l'état de surface du diélectrique, de l'angle θ et de la longueur d'onde λ , on peut alors étudier les modifications de la courbe de réflectance :

- soit par étude des variations de l'angle de résonance [108] (à λ fixé),
- soit par étude de la réflectance à angle θ_t et longueur d'onde λ fixés [99] (méthode discutée dans le paragraphe "Protocole d'expérience"⁴ et utilisée pour le suivi de cinétique en temps réel),
- soit par recherche de la longueur d'onde de résonance [109] (longueur d'onde pour laquelle à θ fixé, il y a résonance, méthode rarement utilisée dans la configuration de Kretschmann).

Parmi les recherches sur la SPR [9][110][111], on trouve les données du tableau 4.2 pour la sensibilité et la résolution des différentes techniques SPR selon la méthode de mesure utilisée. Pour toutes ces méthodes, la sensibilité peut donc être exprimée en deg.RIU^{-1} (RIU = Refractive Index Unit, Unité d'Indice de réfraction).

Dans ce tableau, il est question d'un autre type de montage de SPR, basé sur le couplage de l'onde optique par un réseau. Dans ce montage, le faisceau lumineux traverse d'abord le diélectrique pour ensuite être diffracté par le réseau. La diffraction permet de travailler sur plusieurs modes du rayon réfléchi, et donc plusieurs longueurs d'ondes (un exemple d'utilisation est décrit par Cullen et al. [112]).

Enfin, un troisième montage à base de guide d'onde est parfois utilisé (non discuté dans les tableaux ci-dessous) : l'onde lumineuse est apportée par une fibre optique par réflexions successives le long du diélectrique. L'avantage de cette troisième façon de procéder est la grande surface d'illumination de l'échantillon, mais dans la pratique l'analyse est beaucoup plus complexe à mettre en oeuvre (première description du dispositif par Jorgenson et al. [113]).

On peut remarquer également dans ce tableau que dans le cas de l'interrogation de l'angle de résonance, la sensibilité augmente lorsque λ diminue, alors que c'est le contraire pour les autres types d'interrogation. La sensibilité est par ailleurs toujours supérieure dans le montage avec prisme que dans celui utilisant un réseau.

Ce qui est très intéressant dans l'application de la SPR aux biocapteurs, c'est que l'onde évanescente est extrêmement sensible aux variations de l'indice superficiel n_s du diélectrique. D'autre part, il est remarquable que la mesure puisse se faire sur une échelle spatiale très petite dans la limite de propagation de l'onde. Cette sensibilité élevée est intéressante dans le cas des biocapteurs, puisque la moindre biomolécule qui interagit au voisinage de la couche de métal induit un changement de la densité du volume d'interrogation, ce qui conduit inéluctablement à une modification de n_s . À titre d'exemple, le dépôt d'une couche de 1 nm de molécules sur la surface engendre une modification de 4% de la réflectance (dans le cas $\lambda = 660$ nm et $n_2 = 1.41$ comme dans le cas de l'ADN dans l'eau).

Comme la SPR ne permet pas en général de déterminer la distribution spatiale de l'indice

⁴ voir page 136

Méthode de détection	Interrogation de l'angle			
Système optique utilisé pour l'excitation des ondes de plasmon de surface	Sensibilité (deg.RIU ⁻¹)		Résolution (RIU)	
	$\lambda = 630 \text{ nm}$	$\lambda = 850 \text{ nm}$	$\lambda = 630 \text{ nm}$	$\lambda = 850 \text{ nm}$
Capteur SPR à base de prisme	191	97	5×10^{-7}	1×10^{-6}
Capteur SPR à base de réseau	43	39	2×10^{-6}	2×10^{-6}

Méthode de détection	Interrogation de la longueur d'onde			
Système optique utilisé pour l'excitation des ondes de plasmon de surface	Sensibilité (deg.RIU ⁻¹)		Résolution (RIU)	
	$\lambda = 630 \text{ nm}$	$\lambda = 850 \text{ nm}$	$\lambda = 630 \text{ nm}$	$\lambda = 850 \text{ nm}$
Capteur SPR à base de prisme	970	13800	2×10^{-5}	1×10^{-6}
Capteur SPR à base de réseau	309	630	6×10^{-5}	3×10^{-5}

Méthode de détection	Interrogation de l'intensité			
Système optique utilisé pour l'excitation des ondes de plasmon de surface	Sensibilité (deg.RIU ⁻¹)		Résolution (RIU)	
	$\lambda = 630 \text{ nm}$	$\lambda = 850 \text{ nm}$	$\lambda = 630 \text{ nm}$	$\lambda = 850 \text{ nm}$
Capteur SPR à base de prisme	3900	15 000	5×10^{-5}	1×10^{-5}
Capteur SPR à base de réseau	1100	4400	2×10^{-4}	5×10^{-5}

TAB. 4.2 – Sensibilité théorique de la SPR dues aux variations de l'indice de réfraction du diélectrique (RIU = Refractive Index Unit, Unité d'Indice de réfraction). D'après [9]

superficiel n_s (puisque la mesure est une moyenne sur le volume d'interrogation), cette technique est généralement associée à d'autres instruments qui peuvent apporter un complément d'information, telle la microscopie à force atomique. Cependant, cette dernière méthode ne permet qu'une mesure à des instants ponctuels (généralement lorsque la réaction chimique est terminée) et non pas en temps réel, comme la SPR le permet.

4.2 Suivi par SPR de la cinétique d'hybridation dans une cellule à advection chaotique.

Lorsque M. Vincent Aimez et M. Paul Charette⁵, tous deux Professeurs au Département de génie électrique et de génie informatique à l'Université de Sherbrooke, sont venus à l'École Centrale dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de Nanotechnologie de Lyon (INL), ils ont parlé de leurs difficultés de suivre en temps réel par SPR une cinétique de synthèse de la Bradykinine [98].

Leur problème avait pour origine la précipitation du catalyseur de la réaction au contact de l'oxygène de l'air et l'accumulation au fond du réacteur du précipité obtenu par cette réaction parasite, ce qui faussait complètement les mesures par SPR. Par ailleurs, les réactifs venaient s'accumuler dans les tuyaux lorsqu'ils utilisaient un système d'advection (continue) utilisant des pompes, ce qui diminuait d'autant la quantité utile de réactifs pour la réaction chimique. Enfin, comme la synthèse de la Bradykinine est une suite de réactions longues réalisées sur l'espace d'une journée (du fait d'une cinétique chimique lente), il aurait été souhaitable d'accélérer celle-ci avec, par exemple, un système améliorant l'efficacité de l'interaction entre les molécules (en surface ici).

Nous leur avons donc proposé de tester un dispositif de mélangeur à advection chaotique dans le but d'améliorer leur technique de détection et, pour nous, de tester l'efficacité en conditions réelles d'un tel mélangeur. C'est ainsi qu'a débuté cette collaboration qui m'a permis d'effectuer un stage au Canada. Mon stage s'est déroulé d'octobre à décembre 2007 dans la ville de Sherbrooke, dans la province du Québec. M. Vincent Aimez et M. Paul Charette m'ont encadré durant ce stage, et j'ai travaillé avec Vincent Chabot, alors en Master. La conception et réalisation de la chambre à advection chaotique s'est faite à l'Université de Sherbrooke (<http://www.usherbrooke.ca>) et les mesures se sont déroulées au Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke (CHUS), dans le laboratoire de M. Grandbois, sur un montage SPR déjà existant.

Dans le paragraphe qui va suivre, nous allons expliquer comment nous avons réalisé une cinétique dont nous avons suivi l'évolution par SPR. Nous avons ainsi pu tester l'efficacité d'un mélangeur à advection chaotique par comparaison à une chambre de réaction statique.

⁵Département de génie électrique et de génie informatique,
Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université,
Sherbrooke Québec Canada J1K 2R1
Vincent.Aimez@USherbrooke.ca
Paul.Charette@USherbrooke.ca

4.2.1 Dispositif expérimental SPR mis en place à l'Université de Sherbrooke

Le dispositif expérimental SPR a été entièrement monté par Vincent Chabot [98][114][115][116]. Une schéma simple de l'expérience est montré figure 4.7.

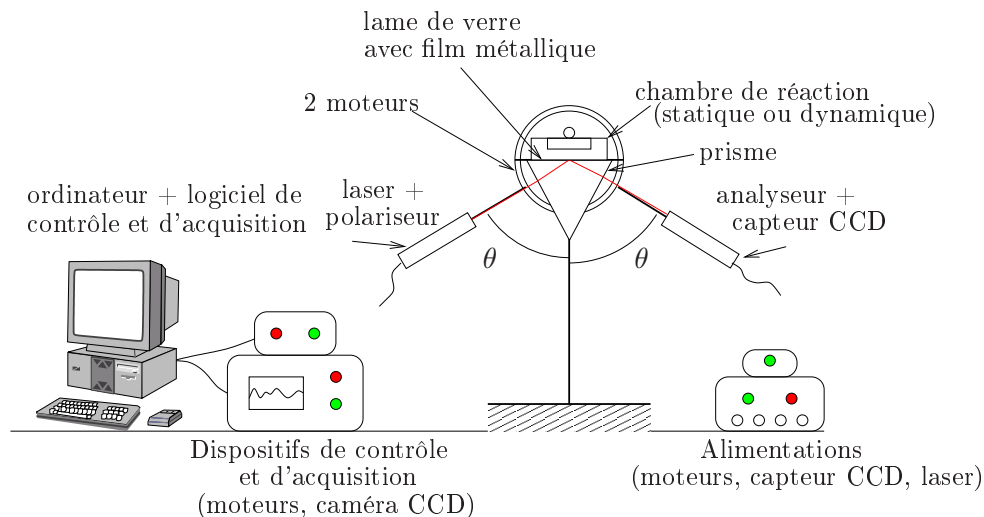


FIG. 4.7 – Montage SPR utilisé à l'Université de Sherbrooke.

Ce dispositif est celui de la configuration de Kretschmann présentée plus haut (voir la figure 4.1). Deux moteurs co-axiaux dirigent deux bras sur lesquels sont fixés sur l'un l'ensemble {laser + polariseur} et sur l'autre un ensemble {analyseur + capteur CCD}. Ces moteurs, dotés d'une grande précision angulaire, sont alimentés par une source de puissance externe et sont contrôlés par l'ordinateur via le logiciel LabVIEW. Le capteur CCD est lui aussi alimenté par une source externe, et le signal de sortie est envoyé sur le *même* ordinateur. Le prisme équilatéral est en verre, et la couche métallique d'une épaisseur de 45 nm est faite d'or.

Le réacteur chimique utilisé avant mon arrivée était simplement en polystyrène et possédait un petit couvercle d'où l'on pouvait injecter les réactifs. Le fond de la cavité était ouvert pour que les réactifs rentrent en contact avec l'interface en métal. Le logiciel, développé entièrement par Vincent Chabot⁶ [117], permet de :

- scanner l'angle θ afin d'en rechercher θ_r ;
- sélectionner un angle de travail θ_t ;
- suivre en temps réel la réflectance en fonction du temps ;
- suivre en temps réel la réflectance en fonction de la température.

Les références des instruments du montage sont :

- moteurs de précision angulaire nanométriques, Thorlabs Inc., USA, réf : NR360S ;
- laser à diode 4 mW, spectre centré sur 635 nm, Thorlabs Inc., USA, réf : LMD 635 ;
- photodétecteur, fenêtre optique 400 – 1100 nm, temps de montée : 45 ns, Thorlabs Inc., USA, réf : DET100A ;
- filtre monochromatique pour caméra CCD, 635 nm ;

⁶vincent.chabot@USherbrooke.ca

- polariseurs ;
- prisme équilatéral en verre, 50 mm, Melles Griot, USA, réf : BK7 glass ;
- logiciel LabVIEW + carte de contrôle et d'acquisition ;
- gel pour interface prisme/verre, Cargille Laboratories, New Jersey, USA.

4.2.2 Cellule d'advection chaotique et protocole de mélange

Pour vérifier les performances du mélangeur par advection chaotique, il a fallu construire une chambre d'écoulement adaptée à l'injection/extraction de fluide. Plusieurs conditions devaient être respectées : d'une part, la cellule devait être petite puisque la mesure SPR est une mesure locale (quelques mm²). D'autre part, nous souhaitions que le dispositif de mélange soit adapté à des réactions beaucoup plus générales que celles utilisant l'ADN (par exemple des puces à protéines, puces à sucres, puces à ADN, ...). Dans cette optique, nous aurions pu utiliser le même type de cellule rectangulaire avec 4 puits ou sources étudiée dans le chapitre 2, en utilisant le protocole de mélange B que nous avons imaginé et étudié dans le chapitre précédent. Nous aurions alors obtenu d'excellents résultats de mélange en accord avec les simulations numériques entreprises dans cette thèse. Cependant, si nous avions procédé ainsi, nous nous serions retrouvé face au même problème que celui de l'équipe de Vincent Aimez, à savoir le passage des réactifs dans les tuyaux et éventuellement leur contamination : en effet, dans le cas du protocole B, les pompes ne fonctionnent que dans un seul sens, ce qui aurait induit nécessairement le passage de réactifs par les tuyaux.

La solution au problème serait d'utiliser le protocole A puisque dans ce cas, les particules fluides feraient non seulement un va-et-vient dans les tuyaux, mais grâce aussi à un système de *réservoirs*, elles ne passeraient pas du tout par les tuyaux. Or nous avons montré dans le chapitre 2 que ce protocole n'est pas très performant : il laisse apparaître des zones mortes quelle que soit la période utilisée, et les sections de Poincaré sont peu homogènes.

Pour remédier à ce problème, Hertzsch et al [45] ont suggéré de n'utiliser que 3 puits/sources dans le mélangeur, modifiant de ce fait toutes les lignes de courant par rapport à un dispositif à 4 puits/sources. La disposition de ces trous augmente la transversabilité des lignes de courant des différentes phases ce qui devrait améliorer le mélange, surtout au centre de la chambre. C'est en s'inspirant de cette publication que nous avons décidé de créer une nouvelle configuration de mélangeur. Celui-ci est donc basé sur 3 puits/sources de fluide disposés sur un triangle équilatéral. La géométrie de la chambre (toujours de faible hauteur) est circulaire. Les injections/extractions de fluide se font par trois injecteurs proches de la périphérie de la chambre (figure 4.11). Trois réservoirs de fluide sont connectés aux injecteurs : ils empêchent que les réactifs ne puissent accéder aux tuyaux et les contaminer. Le protocole utilisé s'inspire de notre protocole A (avec le même principe de l'injection/extraction par seringues).

Le design et les dimensions de la cellule fluide sont représentés sur la figure 4.8. Des vues 3D et en coupes de cette même cellule sont représentées sur la figure 4.9. La chambre fabriquée à l'échelle 1 : 1 est montrée figure 4.10. Elle a été réalisée en PEEK. Nous utilisons toujours 2 pompes péristaltiques (Instech Laboratories Inc., réf : P625/66) et les tuyaux font 0.15 mm de diamètre. Ces derniers sont reliés à des connecteurs de marque Upchurch. Un connecteur en T permet la connexion de 2 tuyaux à la 3^{ème} sortie de la chambre. Le schéma du dispositif d'advection est celui de la figure 4.11. L'ensemble du dispositif expérimental est présenté figures 4.12 et 4.13.

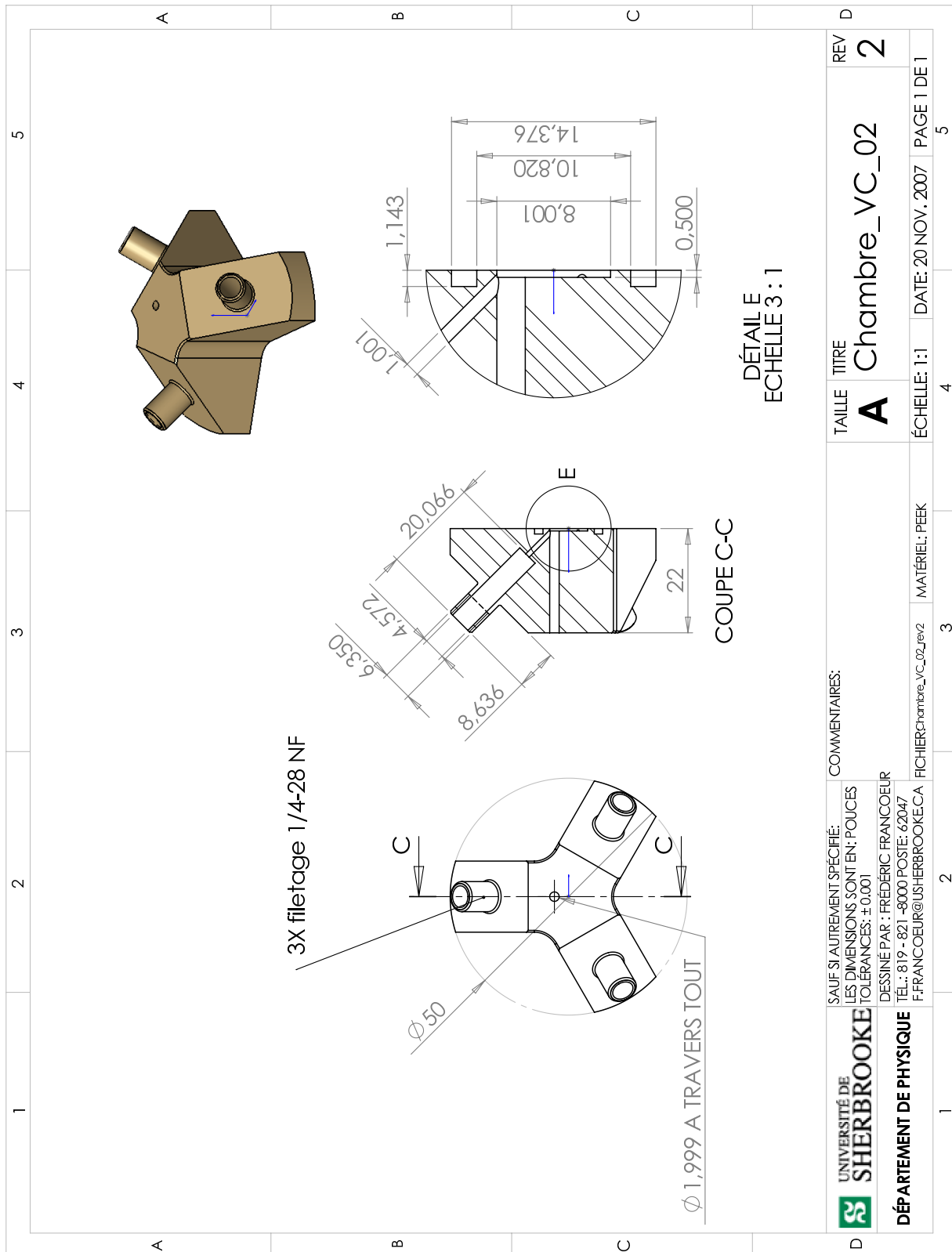


FIG. 4.8 – Dessin technique de la chambre d'advection.

La chambre a les caractéristiques suivantes :

- diamètre de la chambre : 8 mm
- hauteur de la chambre : 500 μm
- volume de la chambre : 25 μL
- volume de fluide dans un réservoir : à fixer.
- diamètre des injecteurs : 1 mm

Le protocole de mélange est périodique (période T), et *chacun* des cycles de mélange contient ici 3 phases (figure 4.11) :

- pour $0 < t < T/3$, la pompe I fonctionne dans le sens 1. Le trou i est une source et le trou ii est un puits de fluide (iii est inactif)
- pour $T/3 < t < 2T/3$, la pompe II fonctionne dans le sens 2. Le trou ii est une source et le trou iii est un puits de fluide (i est inactif)
- pour $2T/3 < t < T$, les pompes I et II fonctionnent dans le sens 3. Le trou iii est une source et le trou i est un puits de fluide (ii est inactif)

L'ensemble {pompe + tuyaux} permet de couvrir une gamme de débits q comprise entre 0.5 mL/min et 10 mL/min. Par analogie avec les cas connus de bon mélange (d'après nos simulations), nous allons nous placer dans le cas où le volume déplacé pendant chaque cycle correspond environ au volume de la chambre (donc le volume déplacé lors de chaque phase correspond au tiers du volume de la chambre ; pour éviter qu'une bulle d'air ne puisse rentrer dans la chambre on remplit le réservoir avec un volume de fluide supérieur). Les temps de fonctionnement de la pompe pendant chaque phase sont donc compris entre 0.05 s et 1 s. Nous allons donc choisir le débit minimal ($q = 0.5$ mL/min) pour avoir le temps de fonctionnement le plus long ($T/3 = 3$ s) car la mécanique des pompes est peu disposée à supporter des phases de fonctionnement trop courtes.

4.2.3 Réaction chimique suivie par le dispositif SPR.

La réaction chimique que nous avons utilisée pour étudier l'efficacité du mélangeur n'est pas à proprement parler une réaction d'hybridation de monobrins d'ADN sur une puce. En effet, nous devons utiliser une réaction simple et rapide à mettre en place en vue de réaliser et répéter plusieurs tests à moindre coût. D'autre part, la fabrication de puces à ADN aurait été non seulement onéreuse mais surtout, elle aurait pris beaucoup de temps pour le laboratoire qui n'est pas spécialisé dans ce domaine. La réaction sur laquelle s'est portée notre attention est donc une réaction simple à mettre en place, suffisamment lente pour que l'on puisse suivre sa cinétique mais suffisamment rapide pour en réaliser plusieurs dans une journée, et qui donne un signal facilement mesurable par SPR.

Dans un premier temps, comme toujours en SPR, il s'agit de fonctionnaliser la plaque de verre métallisée (la métallisation a consisté à déposer une épaisseur de 45 nm d'or) pour que la réaction chimique suivie puisse se dérouler en surface : un aminosilane est fixé d'après la réaction de la figure 4.14 sur la surface métallique. La plaque est ensuite déposée sur le prisme du dispositif SPR. La chambre est placée sur l'ensemble de telle façon que la plaque métallisée (et ainsi fonctionnalisée) forme la paroi inférieure de la chambre d'advection. La chambre est ensuite remplie de solution tampon correspondant aux conditions de pH nécessaires à la réaction.

La réaction suivie par SPR est celle de NHS – PEG – BOC, macromolécule de polymère, agissant sur l'amine de l'aminosilane. La macromolécule libre va donc réagir en surface, ce qui

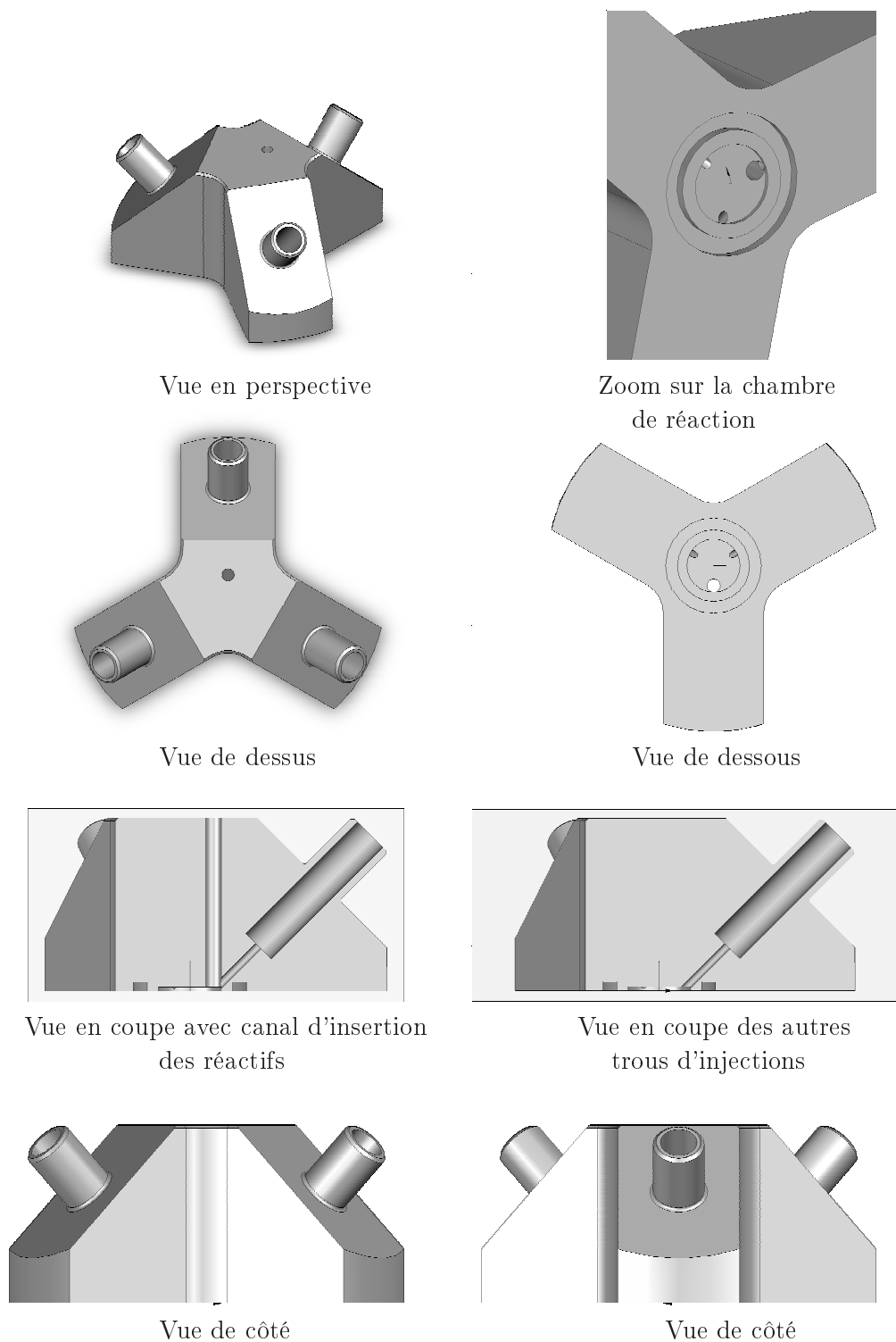
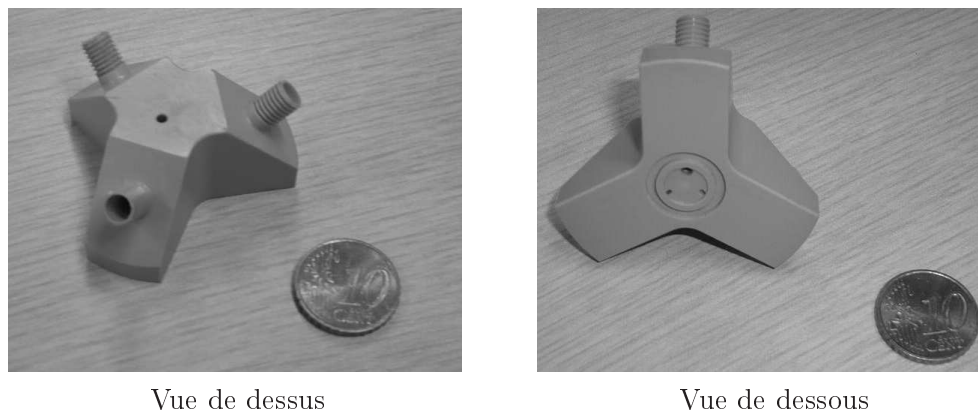


FIG. 4.9 – Vues et coupes 3D de la cellule fluïdique construite et utilisée pour le suivi SPR (remarque : le filetage pour les connecteurs n'a pas été représenté).



Vue de dessus

Vue de dessous

FIG. 4.10 – Photo de la chambre d'advection chaotique fabriquée à l'Université de Sherbrooke.

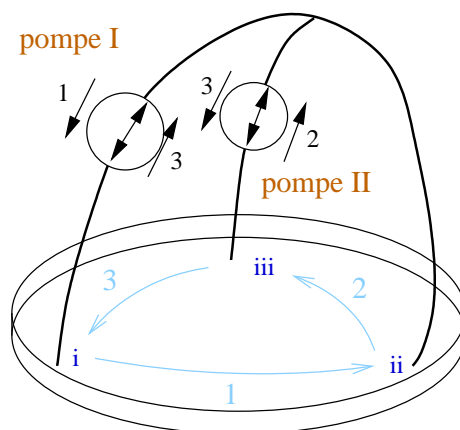
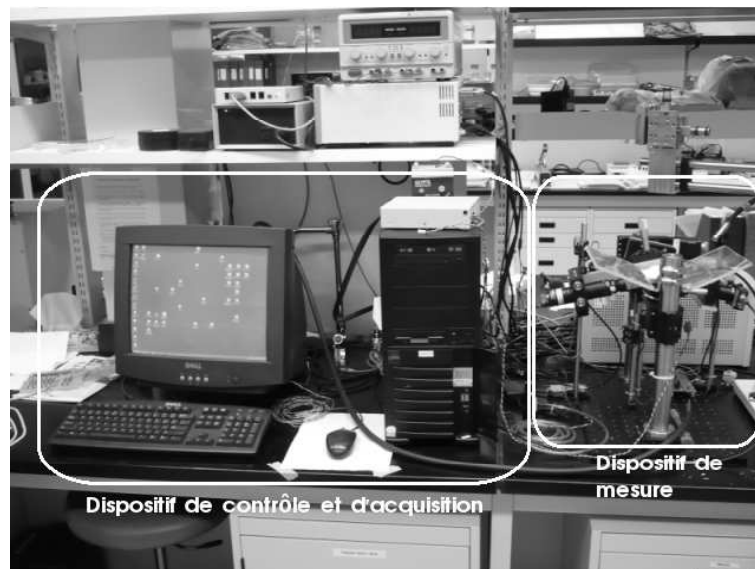


FIG. 4.11 – Schéma du protocole d'advection chaotique utilisé dans ce chapitre (3 phases pendant chaque cycle).

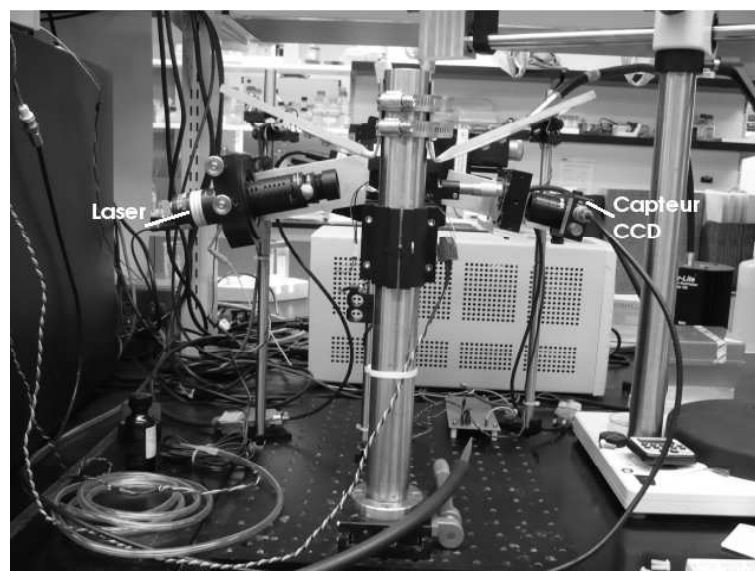
va modifier la réflectance de façon significative. La terminologie employée est la suivante : le NHS est le N-hydroxysuccinimide, le PEG est du polyéthylène glycol et le BOC est du tert-Butylcarbamate.

4.2.4 Protocole expérimental suivi

Comme il a déjà été expliqué dans le paragraphe 4.1.2, la procédure normale de suivi en temps réel de la cinétique de réaction aurait été de suivre l'évolution de la réflectance en fonction du temps t , à *angle* θ_t fixé. Cependant, nous n'avons pas pu procéder ainsi pour la raison suivante : avec le système d'advection chaotique, l'ordinateur associé à l'expérience devait accueillir 2 programmes : celui du pilotage des pompes (pour le mélange) et celui gouvernant le dispositif SPR (pilotage des moteurs et acquisition des mesures). Or l'interface matérielle ne peut être pilotée par deux programmes à la fois : nous ne pouvions donc pas faire fonctionner les pompes et recueillir *en même temps* le signal de la réflectance. Nous les avons donc fait fonctionner *suc-*

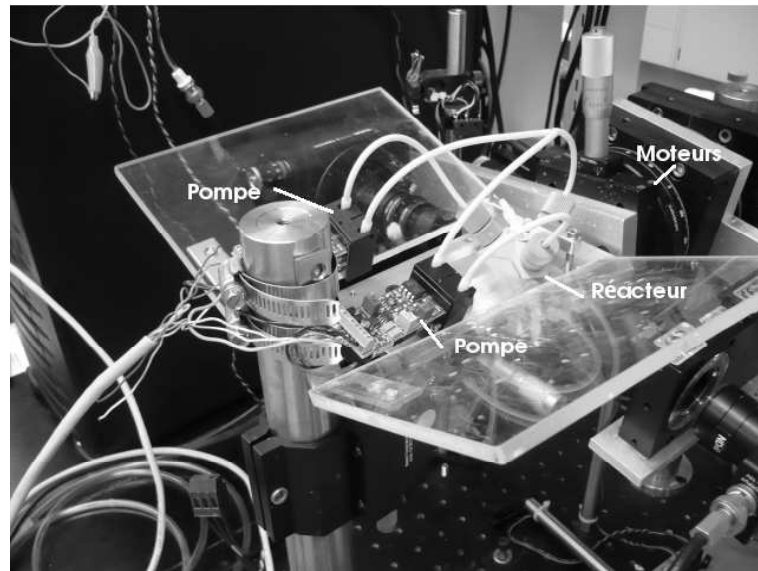


Dispositif global

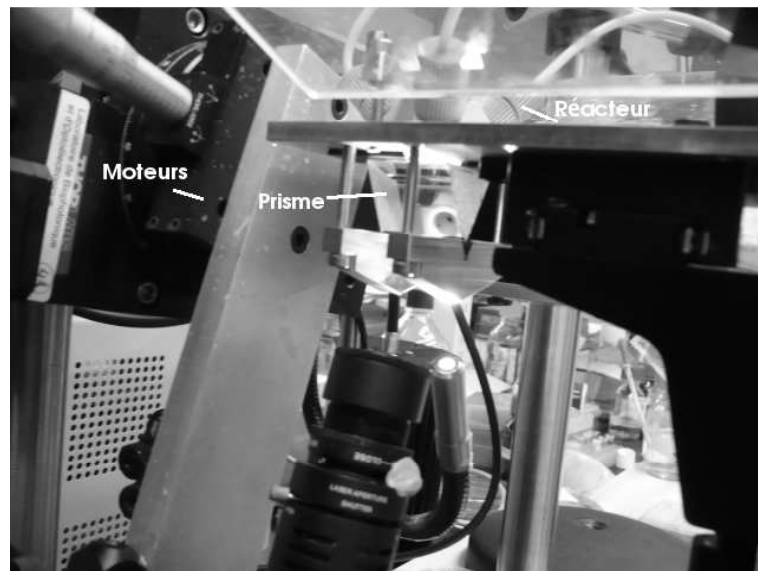


Dispositif de mesure

FIG. 4.12 – Dispositif expérimental (1/2).



Dispositif d'advection chaotique



Dispositif optique

FIG. 4.13 – Dispositif expérimental (2/2).

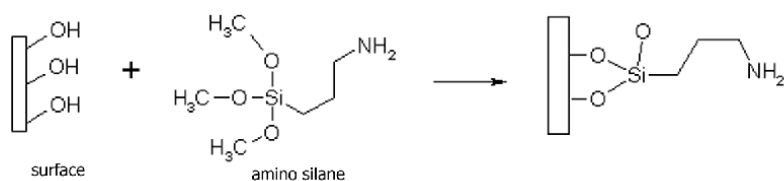


FIG. 4.14 – Étape de fonctionnalisation de la surface.

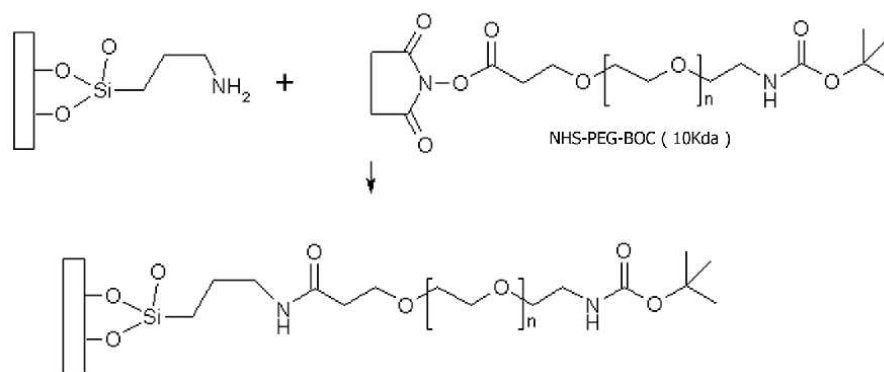


FIG. 4.15 – Réaction chimique suivie par SPR.

cessivement : ainsi, toutes les 10 min exactement, nous avons stoppé le dispositif de mélange pour réaliser un scan angulaire de la réflectance, puis nous avons redémarré le mélange, et ainsi de suite pendant 1 heure (le schéma expérimental est donc : scan angulaire → mélange → scan angulaire → mélange → ...). Ainsi, les étapes expérimentales d'une expérience complète sont les suivantes :

1. $t < 0$: remplissage de la cavité de solution tampon ou d'eau,
2. $t < 0$: 1^{ère} mesure (scan angulaire),
3. à $t = 0$: insertion du PEG + déclenchement du protocole de mélange (pompes),
4. mesure (scan angulaire) toutes les 10 min (arrêt des pompes pendant la mesure),
5. à $t = 60$ min : rinçage de la chambre à la solution tampon neuve,
6. re-remplissage de solution tampon neuve ou d'eau,
7. dernière mesure (scan angulaire).

La réaction chimique se déroule pendant les étapes 3 à 5. D'après ce protocole expérimental, le suivi de cinétique n'est donc pas tout à fait en temps réel, mais nous avons quand même accès à l'information sur le système toutes les 10 min. Il est clair qu'un travail de fusion des deux logiciels de pilotage des pompes et de mesure aurait permis un véritable suivi instantané de la réaction, mais le fait que je connaissais très peu le programme de commande du dispositif SPR, associé au peu de temps qui me restait jusqu'à la fin du stage, m'a incité à renoncer à cette tâche.

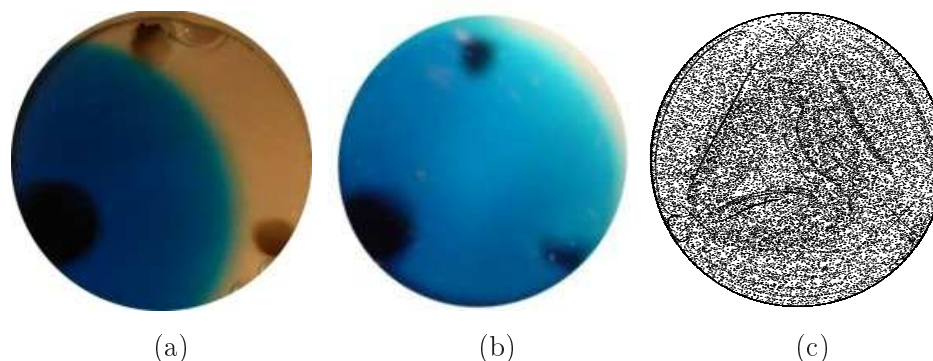


FIG. 4.16 – Comparaison du mélange expérimental dans le cas de a) la diffusion pure (résultat pour $t = 15$ min) et b) le cas du mélange par advection chaotique (résultat à $t = 1$ min, $T = 9$ s). En c), section de Poincaré du mélange (faux 3D). Le colorant utilisé est d'origine alimentaire et son injection est réalisée par le trou inférieur gauche sur la photo.

4.2.5 Premiers résultats expérimentaux

Vérification de l'homogénéité du mélange

Comme le protocole de mélange utilisé dans cette partie est légèrement différent des deux protocoles (A et B) présentés et étudiés dans le chapitre 2 (3 phases par période contre 4 ou 2 dans le chapitre 2), j'ai voulu vérifier l'efficacité du mélange seul à l'aide de colorant alimentaire, et j'ai comparé le résultat aux sections de Poincaré équivalentes. Les résultats sont regroupés sur la figure 4.16.

En comparant ces trois figures, on confirme bien que la vitesse de mélange est bien plus rapide dans le cas de l'advection chaotique par rapport au cas de diffusion pure. Par ailleurs, on note que le mélange est assez homogène sur toute la surface de la chambre, en accord avec la section de Poincaré correspondante.

Résultats de cinétique

Comparaison Mélange/Diffusion pure La figure 4.17 montre les courbes de réflectance en fonction de θ à $t < 0$ et $t > 60$ min (après rincage) pour la diffusion pure et les mêmes pour l'advection chaotique. Les deux surfaces fabriquées pour chacune de ces deux expériences étant légèrement différentes (épaisseur du dépôt de métal légèrement différente, traitement chimique de surface légèrement différent), il est normal qu'une paire de courbe ait une réflectance maximale différente de celle de l'autre paire. D'autre part, même si les deux expériences se sont déroulées dans le même milieu (la solution tampon), ce n'est pas le cas pour les deux paires de mesures avant réaction et après lavage (l'eau pour la diffusion pure et solution tampon pour l'advection chaotique). Ces milieux ayant un indice optique différent, les paires de courbes sont assez décalées l'une de l'autre horizontalement (sens \leftrightarrow). Cependant, comme on compare l'avancement à $t = 60$ min *relativement* à la courbe obtenue à $t = 0$, ces différences ne comptent pas.

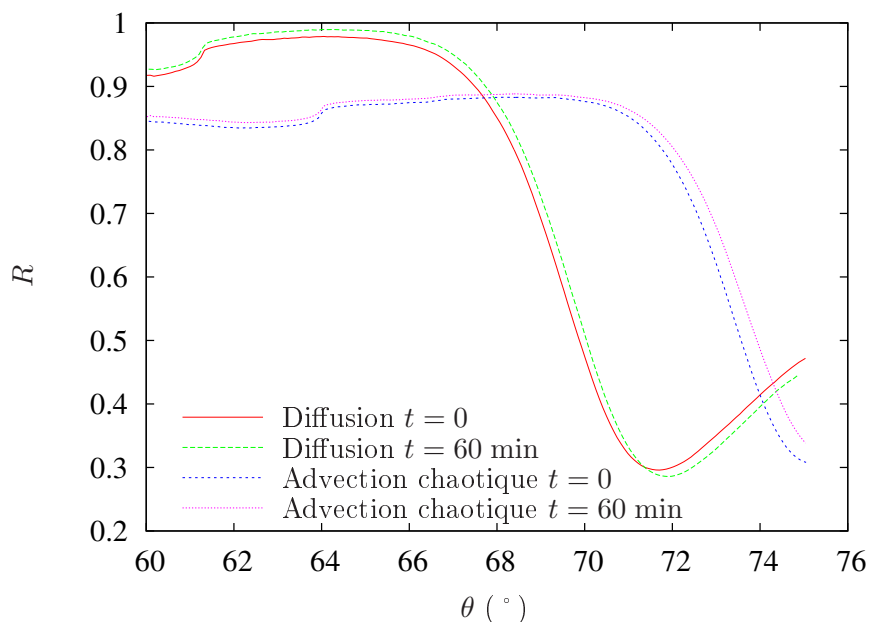


FIG. 4.17 – Premier résultat expérimental : comparaison du signal SPR avant et après réaction pour le cas d’une diffusion pure et dans le cas du mélange par advection chaotique

On constate sur la figure 4.17 que l’écart $t = 0/t = 60$ min est bien plus large dans le cas du mélange par advection chaotique que dans le cas de la diffusion pure. Cela signifie que la surface fonctionnalisée a beaucoup mieux réagi avec le mélange par advection chaotique que sans. Ce résultat est bien conforme avec les résultats donnés par les simulations numériques de cette thèse, à savoir que nous savons maintenant expérimentalement qu’un mélange efficace permet de réels gains en temps de réaction par rapport à la diffusion pure.

Pour estimer la gain obtenu, il aurait fallu par exemple mesurer les variations de l’angle de résonance correspondant au minimum des courbes entre $t = 0$ et $t = 60$ min pour les deux cas. Or cette mesure d’angle n’est pas possible en pratique dans le cas du mélange par advection chaotique, car cet angle de résonance se trouve en dehors de la gamme d’angles balayée par le dispositif. Pour estimer le gain, je me suis donc fixé une réflectance et j’ai mesuré la variation de l’angle entre les courbes. Cette estimation indique qu’un facteur de l’ordre de 2 en quantité de produit formé a été gagné grâce à l’advection (ce rapport varie entre 1.8 et 2.15 selon la portion des courbes que l’on exploite). Ce facteur 2 est évidemment décevant, et on peut avancer une explication à ce résultat : nous avons réalisé les deux expériences sur un intervalle de 1 heure chacune. Or on peut se demander si la réaction avec advection chaotique n’était pas trop rapide et a donc atteint son avancement maximal en très peu de temps, alors que celle avec diffusion pure, bien que plus lente, a rattrapé son retard pendant toute la durée restante. Cette hypothèse, peu évidente au début, n’a pas pu être vérifiée par la suite.

Avancement de la réaction en diffusion pure Si l’on représente les différentes courbes de la réflectance (en fonction de θ) à chacun des temps successifs de mesure, on obtient la figure

4.18. Un zoom sur la portion linéaire des courbes est montré sur la figure 4.19. On constate que les courbes se décalent vers la droite au fur et à mesure du temps : ce déplacement est représentatif de l'*avancement* de la réaction (augmentation de la couverture de la surface de la cellule SPR et/ou de l'épaisseur de produit formé). Comme on l'a déjà plusieurs fois expliqué, un moyen d'estimer l'avancement de cette réaction est de se fixer un angle de travail θ_t ($= 73^\circ$) et regarder l'évolution de la réflectance en fonction du temps (figure 4.20a). Un autre moyen est de regarder l'évolution de l'angle de résonance θ_r en fonction du temps. Or ici, la gamme d'angles balayés par le dispositif SPR ne permet pas de déterminer précisément cet angle de résonance : à la place, nous allons suivre l'évolution en fonction du temps de l'angle correspondant à une valeur de la réflectance fixée ($R = 0.5$, figure 4.20b).

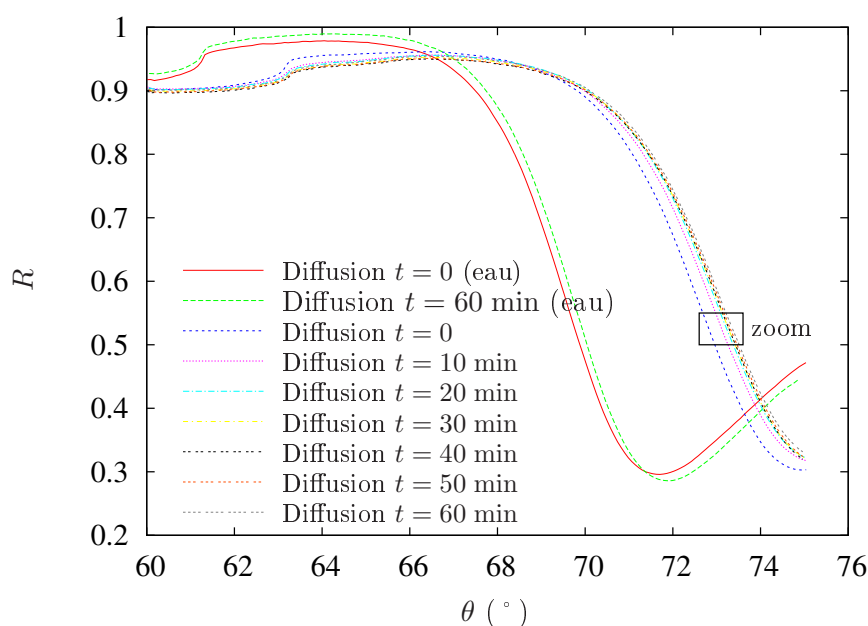


FIG. 4.18 – Évolution de la réflectance au cours du temps pour la diffusion pure. Pendant la réaction, la mesure se fait avec de la solution tampon comme milieu.

J'ai tenté d'ajuster les courbes de la figure 4.20 par une exponentielle. Certes le modèle convient plutôt bien (surtout pour la figure 4.20b). Une estimation grossière du temps caractéristique d'évolution (d'après l'extrapolation de la courbe) donne :

$$\frac{1}{\tau_{\text{PEG}}^{\text{diff}}} = (18 \text{ min})^{-1} \approx 9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} = 3.2 \text{ h}^{-1} \quad (4.7)$$

Compte-tenu de la valeur de $\tau_{\text{PEG}}^{\text{diff}}$ obtenue, on devrait avoir atteint un plateau à $t = 60$ min, ce qui n'est pas totalement clair sur les résultats expérimentaux. Il aurait sans doute fallu continuer l'expérience sur une plus grande durée.

D'autre part, à partir de la valeur de $\tau_{\text{PEG}}^{\text{diff}}$, il est théoriquement possible de remonter à une constante de vitesse grâce à la relation déjà vue de nombreuses fois dans cette thèse (nous avons

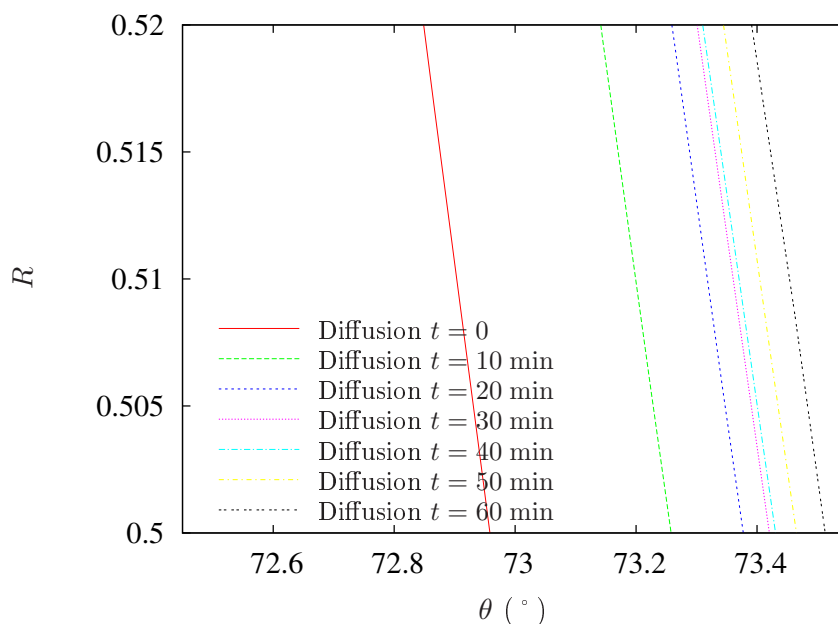


FIG. 4.19 – Zoom de la figure 4.18 : le déplacement des courbes est dû à l’avancement de la réaction.

gardé les mêmes notations que dans les chapitres précédents) :

$$\frac{1}{\tau_{\text{PEG}}^{\text{diff}}} = k_{\text{PEG}}^{\text{diff}}[S]_0 \quad (4.8)$$

Cependant, il n’est absolument pas facile dans notre cas de déterminer $[S]_0$ car la fixation des molécules en surface s’est faite lors d’un traitement global de surface, et non pas ponctuellement comme pourrait l’être la fixation de sondes sur la puce. Il y a donc une grande incertitude sur la valeur de $[S]_0$.

D’autre part, comme nous l’avons discuté dans le chapitre précédent, cette réaction est limitée cinétiquement par le phénomène de diffusion, et ce n’est donc pas la constante de temps intrinsèque de réaction qui est mesurée. De là naît l’intérêt d’utiliser l’advection chaotique pour réduire l’effet limitant du transport, et ainsi calculer la constante intrinsèque de vitesse. C’est ce que nous proposons de faire maintenant.

Avancement de la réaction grâce à l’advection chaotique

La figure 4.21 montre l’évolution au cours du temps de la réflectance dans le cadre du mélange par advection chaotique. En faisant un zoom sur les courbes 4.22, on note clairement des positions erratiques des courbes qui représentent chacune un temps de mesure : par exemple la courbe de la réflectance pour $t = 20$ min se retrouve entre les courbes pour $t = 0$ min et $t = 10$ min, ce qui n’est pas logique. Ces courbes sont donc inexploitables pour des mesures de cinétique.

Une hypothèse peut expliquer ce résultat : lorsque nous avons fait fonctionner le mélangeur pour étudier l’efficacité du mélange seul grâce au colorant (voir ci-dessus), nous avons pu souvent

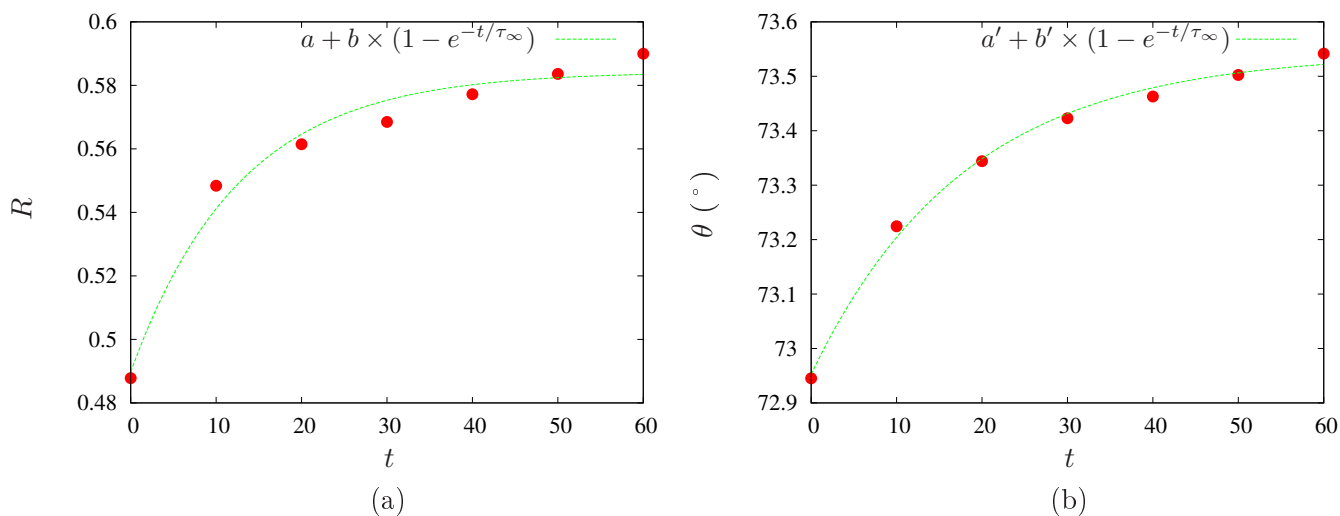


FIG. 4.20 – Exploitation de la figure 4.19 : a) évolution de la réflectance R en fonction du temps pour un angle de travail donné ($\theta_t = 73^\circ$) b) évolution de l'angle θ en fonction du temps pour une réflectance donnée ($R = 0.5$). On remarque que les courbes sont sensiblement les mêmes.

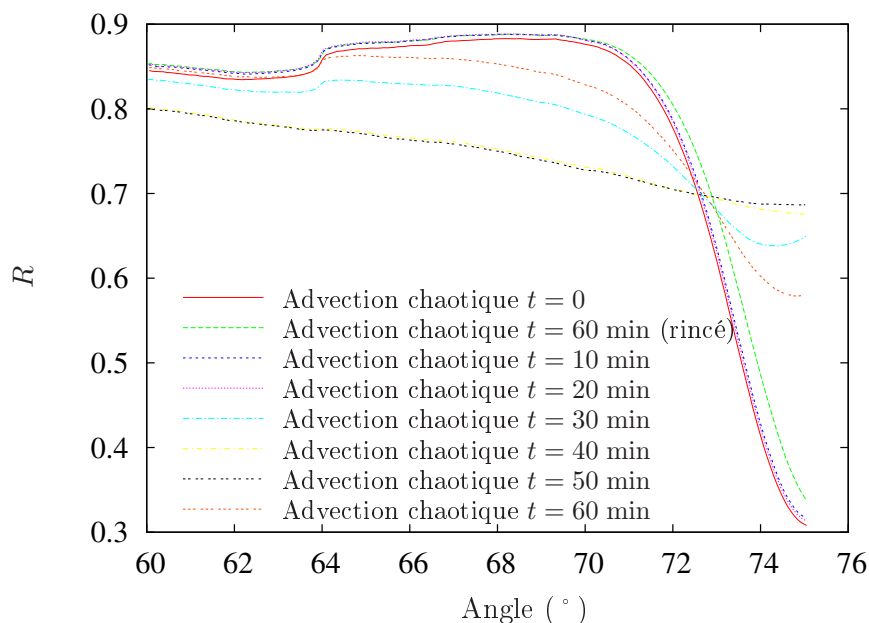


FIG. 4.21 – Évolution de la réflectance au cours du temps pour l'advection chaotique. Toutes les courbes ont été tracées avec la solution tampon comme milieu remplissant le réacteur.

constater l'existence de bulles d'air à l'intérieur de la chambre de réaction. Cette hypothèse est confortée par les grandes disparités d'échelles de réflectance entre certaines courbes : le lecteur pourra par exemple comparer la courbe représentant la réflectance pour $t = 40$ min avec celle de

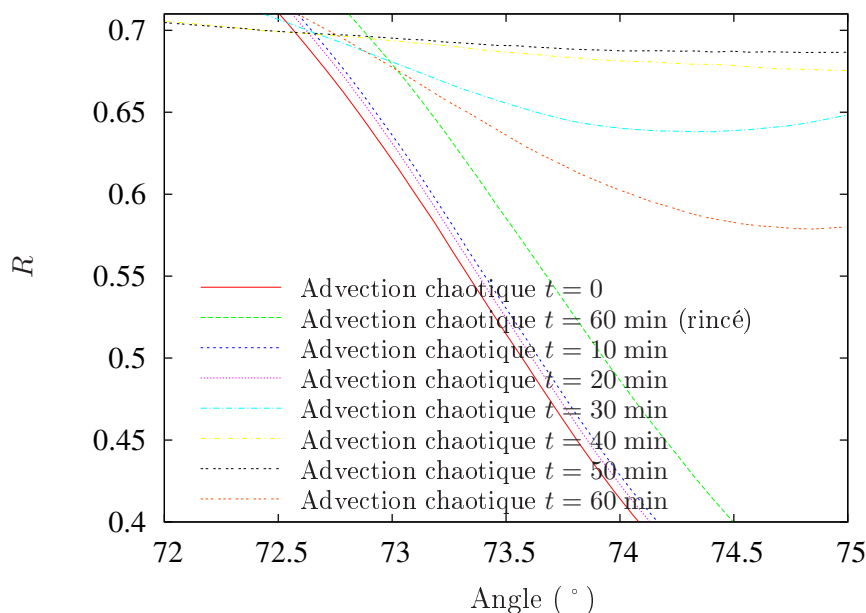


FIG. 4.22 – Zoom de la figure 4.21.

la réflectance pour $t = 20$ min. Cette grande différence peut s'expliquer par un milieu différent dans le volume d'interrogation au moment de la mesure (air et solution tampon par exemple).

Ces bulles résultaient soit d'un remplissage initial imparfait de la cavité (grâce à une pipette par le trou de remplissage), soit par l'apport de bulles d'air par les pompes lors de leur fonctionnement pendant le mélange, soit peut-être à cause de la porosité du joint entre la cavité et la lame. Il faut savoir que l'opérateur ne peut pas contrôler la présence ou non de bulles à l'intérieur de la chambre, puisqu'une fois la cavité fermée par la surface métallisée, il n'y a plus moyen de voir ce qui se passe à l'intérieur (alors que cela l'était lors du test de mélange seul, puisque une simple lame de verre transparente fermait la cavité, ce qui a permis de faire quelques photos et vidéos). Il est d'ailleurs fort probable que les bulles aient empêché la réaction d'avoir lieu dans les conditions optimales. Concernant les pompes, on peut suspecter un fonctionnement dissymétrique avec des volumes d'injection différents des volumes d'extraction.

Le problème lié à ces bulles a vraiment été pénalisant : je n'ai pas trouvé le moyen de les empêcher d'apparaître, sinon de recommencer l'expérience (tout vider, tout nettoyer, tout re-préparer). Une solution envisagée (mais non réalisée compte tenu de la durée de stage restante), aurait été de modifier la chambre de mélange en créant un couvercle sur le dessus pour éventuellement éliminer ces bulles (grâce à une seringue par exemple). Parce que le temps m'était compté (une semaine séparait la fin de la fabrication du mélangeur et mon retour pour la France), et parce que je n'étais pas le seul à disposer du montage SPR, je n'ai pas pu réaliser d'autres expériences de mesure SPR. L'étude expérimentale s'achève donc sur ce seul résultat, certes encourageant (avec une seule expérience on a pu montrer une amélioration par advection chaotique), mais pas totalement finalisée (pas de cinétique en temps réel).

Résumé

Dans ce chapitre, nous avons fait connaissance avec un outil optique non intrusif de suivi de cinétique chimique de surface : la résonance de Plasmon de Surface. Ce dispositif réussit la détection de très faibles variations d'indice optique au niveau d'une interface métal/diélectrique, ce qui permet de suivre en direct l'évolution d'une réaction chimique de surface, telle que l'hybridation sur puces à ADN. De ce fait, c'est un outil beaucoup plus commode et simple à utiliser que la méthode traditionnelle utilisant la fluorescence induite qui nécessite en amont une grosse préparation des réactifs (fluorescence induite ou FRET).

Nous avons associé à ce montage notre dispositif de mélange par advection chaotique. Pour cela, il a fallu construire une cavité circulaire de très petite dimension (1 cm de diamètre pour 0.5 mm de hauteur) percée de trois trous par lequel le fluide est injecté ou extrait de manière périodique grâce à deux pompes péristaltiques. Le protocole de mélange a été légèrement modifié par rapport aux deux protocoles étudiés dans le chapitre 2 pour pouvoir être adapté aux contraintes demandées par l'équipe de Vincent Aimez et Paul Charette qui ne voulait pas que les produits puissent passer dans les tuyaux (raisons de contamination).

Pour tester le mélangeur, nous avons d'abord vérifié l'efficacité du mélange seul (grâce à un colorant) *avec* et *sans* advection chaotique : comme prévu, le mélange s'est montré nettement plus efficace grâce à l'écoulement que par rapport à la diffusion pure. Nous avons ensuite mis à profit notre mélangeur sur une réaction chimique de surface (mais pas une hybridation pour des raisons purement techniques). Nous avons pu calculer une "constante de vitesse" en diffusion pure (donc une mesure de la diffusion, puisqu'on sait depuis le chapitre précédent que c'est celle-ci qui limite la réaction complète).

Pour la mesure de cinétique dans le cadre de l'advection chaotique, nous nous sommes heurtés au problème (non résolu) de la présence de bulles malgré ou à cause de l'intégration de réservoirs de fluide en amont des trous d'injection. Les résultats mesurés se sont montrés complètement chaotiques (pour une fois, c'est regrettable !) et sans grande cohérence. Nous n'avons donc pas pu les exploiter pour en tirer une estimation de la valeur de la constante de vitesse intrinsèque.

Chapitre 5

Résumé et perspectives

Après avoir rappelé la structure de la molécule d'ADN ainsi que sa fonction, nous avons décrit le principe de la puce à ADN. Nous avons alors bien compris que pour que les puces à ADN délivrent le signal le plus fiable et le plus rapide possible, il fallait développer un système de mélange afin que les cibles libres d'ADN à analyser puissent tester toutes les sondes de la puce en un temps raisonnable.

Nous avons alors vu que si l'on ne devait compter que sur la diffusion pour disperser ces cibles au dessus de la puce, le mélange aurait pris plus d'une dizaine d'heures, alors que l'idéal serait qu'un patient qui donne un peu de son ADN puisse avoir un diagnostic en quelques minutes. Il faut donc accélérer la probabilité de rencontre cibles/sondes en créant un écoulement, c'est pourquoi nous avons eu l'idée de placer la puce dans une chambre d'écoulement. Comme les dimensions de la puce à ADN sont très petites (de l'ordre du centimètre pour les dimensions latérales et du dixième de millimètre pour la hauteur de la chambre), l'écoulement dans ce type de cavité est quasi-bidimensionnel et la seule façon de mélanger est alors de rendre l'écoulement dépendant du temps (le plus simple : périodique en temps).

Nous avons donc imaginé deux protocoles de mélange périodiques en temps basés sur l'injection et l'extraction alternée de fluide. Le premier protocole (dit "A") utilise des seringues alors que le protocole "B" utilise des pompes et recycle le fluide extrait. L'étude du mélange s'est faite numériquement en calculant les trajectoires des particules fluides grâce à un champ de vitesse analytique et en considérant les cibles d'ADN comme des scalaires passifs (nous avons utilisé les propriétés de l'écoulement pour nous ramener à une approche potentielle du problème). Nous avons pu aussi facilement faire varier la géométrie de la chambre en testant les configurations carrées, rectangulaires (avec différents rapports d'aspect), mais aussi circulaires (voir le catalogue des sections de Poincaré en annexe I). Nous avons ainsi pu montrer que le protocole B, associé à une géométrie de chambre rectangulaire, donnait d'excellents résultats quelle que soit la période utilisée et le rapport d'aspect de cette géométrie.

Nous avons alors modélisé la chimie du problème en introduisant un modèle simple de capture des cibles libres par les sondes de la puce tout en redonnant à l'écoulement son caractère tridimensionnel : ajout de la dépendance en z pour le champ de vitesse, et modélisation de la diffusion moléculaire. Nous avons tout au long de ce chapitre comparé les résultats de diffusion pure (hybridation statique) à ceux du mélange par advection chaotique (hybridation dynamique). Nous avons d'abord pu montrer que l'hybridation dynamique était bien entendu plus rapide que

l'hybridation statique (environ 100 fois plus), plus homogène mais aussi donnait des résultats plus fiables (point crucial pour un bio-capteur). Nous avons par ailleurs montré que dans le cas de l'hybridation dynamique, la valeur de la portée des interactions cibles/sondes avait peu d'influence sur les temps du mélange (temps moyen de réaction, temps de l'expérience, écart-type sur les temps d'hybridation) mais qu'en revanche, ceux-ci variaient comme $D^{-2/3}$. Nous avons alors calculé un ordre de grandeur des constantes de vitesses de la réaction d'hybridation : nous avons montré que dans le cas de la diffusion pure, nos simulations donnaient typiquement le même ordre de grandeur que la plupart des auteurs de la littérature. Pour le mélange par advection chaotique, nous avons trouvé une constante de vitesse bien plus grande, ce qui suggère que la diffusion limite le processus d'hybridation et que la vitesse mesurée n'est pas la vitesse intrinsèque de la réaction chimique proprement dite.

Dans un dernier chapitre, nous expliquons comment, à partir d'un problème expérimental de réaction chimique rencontré au Laboratoire du Département de génie Électrique et de génie Informatique à l'Université de Sherbrooke, nous avons débuté une collaboration pour mesurer la vitesse intrinsèque de réaction à l'aide d'un prototype de mélangeur. Nous avons pu montrer que le mélange était nettement plus rapide et homogène avec celui-ci par rapport au cas de diffusion pure. Nous voulions également suivre la cinétique en temps réel grâce à la technique de Résonance de Plasmon de Surface. Nous avons pu montrer globalement que la réaction avec mélange par advection chaotique était effectivement plus rapide que par diffusion, mais nous nous sommes heurtés au problème (non résolu à ce jour) de bulles d'air dans la cavité qui perturbaient les mesures.

Suite à la collaboration INL/LMFA, le principe du mélange par advection chaotique appliqué aux puces à ADN a été adapté dans un mélangeur, le Rosamix, basé aussi sur le principe d'injections alternées de fluide. Ce système, commercialisé aujourd'hui par la société Biotray sous le nouveau nom de TrayMix, a permis de vérifier en partie nos résultats, à savoir que l'advection chaotique permettait de réduire de manière très significative le temps nécessaire à l'hybridation, tout en augmentant la sélectivité. Même si le Rosamix a fait sauter un premier verrou technologique, il présente toutefois encore un volume trop important (500 μL). En effet, la vitesse de réaction étant proportionnelle à la concentration en cibles, l'hybridation se fera d'autant plus rapidement que le volume total est faible. D'autre part, le système actuel possède des tuyaux en polymère souple par lesquels le fluide circule chargé de cibles. Cela ne pose pas de problème en soi pour une puce à ADN, mais devient rapidement problématique par exemple pour une puce à protéines, celles-ci ayant la fâcheuse tendance à aller se coller sur les tuyaux, faisant disparaître les cibles avant qu'elles ne soient hybridées sur les sondes.

La suite de ce travail, objet d'un projet labellisé Carnot et dans la continuité de mon travail au Canada, consistera à construire un système plus sophistiqué que le Rosamix, permettant de donner des résultats cliniques en un minimum de temps. L'appareil devra être adapté à tout type de puce (ADN, protéines, sucres) mais avec un système de mélange par advection chaotique ne faisant pas intervenir d'éléments extérieurs par lesquels circule le fluide. Cela donnera également à plus long terme la possibilité d'avoir recours à des dispositifs jetables.

Une fois ce dispositif réalisé, la seule façon d'améliorer le temps total d'hybridation sera d'optimiser la vitesse à laquelle les cibles et les sondes se rencontrent, donc augmenter le débit. Cela ne pose pas de problème technologique majeur car les pertes de charge dans une chambre possédant deux dimensions grandes devant la hauteur ("cellule de Hele-Shaw") sont faibles comparées

à celles dans un canal, où le frottement latéral n'est pas négligeable. Mais jusqu'à quel point cela est-il efficace, voire souhaitable ? En effet, si une cible passe trop vite devant sa sonde complémentaire, aura-t-elle le temps de s'hybrider ? Si ce n'était pas le cas, augmenter trop le débit risquerait de nuire à l'efficacité de l'hybridation. D'autre part, un monobrin d'ADN n'est certainement pas un simple scalaire passif diffusif : jusqu'à quel point va-t-il « suivre » l'écoulement ? Le système sera donc parfaitement optimisé en vitesse lorsque, si l'on considère le voisinage d'une sonde pour lequel les interactions sondes/cibles sont non négligeables, le temps passé par la cible dans ce voisinage correspond au temps caractéristique de la réaction chimique. Cela nous permettra de mesurer effectivement la cinétique d'une réaction de type sonde sur support/cible en solution. Ce travail sera couplé à une étude paramétrique complète (influence de la salinité, du pH, ...).

Annexe A

Résultats de cinétique

A.1 Résultats d'hybridation dynamique (mélange par advection chaotique)

$D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$							
d_h (nm)	t_{max} (s)	\bar{t} (s)	σ_t (s)	τ_∞ (s)	$\tau_{1/2}$ (s)	N_p^h	$\sigma_{N_c^h} (\times 10^{-3})$
25	453	56	56	55	39	53	3.87
50	466	57	60	57	39	53	4.27
100	342	54	54	58	36	53	4.57
250	474	52	55	55	35	53	4.26
500	300	51	49	49	36	53	4.91
1.0×10^3	376	46	46	45	33	53	4.37
2.5×10^3	343	39	40	41	26	53	4.99
5.0×10^3	243	28	30	33	18	53	6.54
15×10^3	99	11	12	15	7	53	12.94
25×10^3	91	6	8	8	3	53	17.72
35×10^3	61	5	7	10	2	51	22.58
45×10^3	66	5	7	9	2	47	26.96
50×10^3	77	4	7	9	2	49	27.06

TAB. A.1 – Résultats d'hybridation dynamique pour $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).

$D = 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$							
d_h (nm)	t_{max} (s)	\bar{t} (s)	σ_t (s)	τ_∞ (s)	$\tau_{1/2}$ (s)	N_p^h	$\sigma_{N_c^h} (\times 10^{-3})$
25	1872	259	268	256	174	53	3.94
50	2755	270	271	233	186	53	4.28
100	1635	258	258	268	175	53	4.24
250	1768	231	231	222	158	53	3.73
500	2439	231	244	239	152	53	3.96
1.0×10^3	1695	189	189	184	126	53	4.89
2.5×10^3	954	125	125	133	86	53	6.25
5.0×10^3	689	71	73	72	49	53	9.00
15×10^3	147	19	21	20	13	53	17.83
25×10^3	85	10	12	13	6	53	20.52
35×10^3	69	7	8	9	3	52	21.86
45×10^3	57	5	6	8	2	52	25.38
50×10^3	74	5	7	8	2	49	26.09

TAB. A.2 – Résultats d'hybridation dynamique pour $D = 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).

$D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$							
d_h (nm)	t_{max} (s)	\bar{t} (s)	σ_t (s)	τ_∞ (s)	$\tau_{1/2}$ (s)	N_p^h	$\sigma_{N_c^h} (\times 10^{-3})$
25	8806	1156	1150	1254	798	53	4.03
50	8570	1160	1204	1290	775	53	4.67
100	7618	1158	1126	1150	806	53	4.67
250	7853	1060	1062	1040	730	53	4.95
500	7001	876	876	808	611	53	4.96
1.0×10^3	6204	641	635	599	465	53	5.53
2.5×10^3	2474	308	325	320	205	53	10.14
5.0×10^3	957	142	142	141	101	53	15.38
15×10^3	240	27	29	29	17	52	22.09
25×10^3	150	13	16	18	8	52	24.56
35×10^3	90	9	12	14	4	53	24.54
45×10^3	70	6	9	10	2	51	24.72
50×10^3	71	5	8	9	2	50	26.69

TAB. A.3 – Résultats d'hybridation dynamique pour $D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).

A.2 Résultats d'hybridation statique (mélange par diffusion)

$D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$							
d_h (nm)	t_{max} (s)	\bar{t} (s)	σ_t (s)	τ_∞ (s)	$\tau_{1/2}$ (s)	N_p^h	$\sigma_{N_c^h} (\times 10^{-3})$
25	138464	3336	6105	5754	1138	53	6.84
50	64222	3379	5764	6234	1176	53	6.12
100	90204	3381	6021	6520	1095	53	6.62
250	100468	3316	6158	5493	1155	53	6.55
500	84801	3309	5688	6120	1162	53	6.26
1.0×10^3	91294	3350	5814	6056	1041	53	6.41
2.5×10^3	82873	3287	6133	5932	1065	53	6.41
5.0×10^3	111417	3350	6211	5856	1120	53	7.06
15×10^3	73000	3079	1310	5892	1002	53	6.77
25×10^3	110921	3380	6883	5956	971	53	6.70
35×10^3	90120	2988	5377	5820	840	53	6.48
45×10^3	115581	3221	5998	6336	982	53	6.26
50×10^3	140030	3137	6036	6244	938	53	6.62

TAB. A.4 – Résultats d'hybridation statique pour $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).

$D = 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$							
d_h (nm)	t_{max} (s)	\bar{t} (s)	σ_t (s)	τ_∞ (s)	$\tau_{1/2}$ (s)	N_p^h	$\sigma_{N_c^h} (\times 10^{-3})$
50	1324560	33465	66436	59480	11277	53	6.70
100	1069090	32770	59172	58616	11184	53	6.48

TAB. A.5 – Résultats d'hybridation statique pour $D = 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).

$D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$							
d_h (nm)	t_{max} (s)	\bar{t} (s)	σ_t (s)	τ_∞ (s)	$\tau_{1/2}$ (s)	N_p^h	$\sigma_{N_c^h} (\times 10^{-3})$
50	16785176	339764	651840	700216	109620	53	6.48
100	7376400	343260	610720	576164	103648	53	6.62

TAB. A.6 – Résultats d'hybridation statique pour $D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ($T = 4 \text{ s}$).

Annexe B

Écoulement de Hele-Shaw

Pourquoi, si l'on considère un fluide newtonien (de viscosité μ) en écoulement dans une cavité de type Hele Shaw, peut-on considérer en première approximation que cet écoulement est de type "fluide parfait" ?

B.1 Cavité de Hele-Shaw

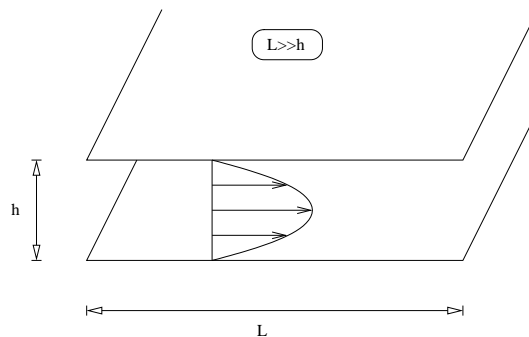


FIG. B.1 – Cavité de type Hele-Shaw.

Une cavité de type Hele-Shaw est délimitée par deux plans (horizontaux) distants d'une distance h très petite devant son extension latérale, et à l'intérieur de laquelle circule un fluide newtonien (cas particulier de l'écoulement de Poiseuille).

Le nombre de Reynolds, défini par :

$$Re = \frac{\text{Vitesse Caractéristique} \times \text{Longueur caractéristique}}{\text{Viscosité cinématique}} \quad (\text{B.1})$$

est par conséquent très petit si l'on considère h comme la longueur caractéristique de l'écoulement.

B.2 Équations

Compte tenu du faible nombre de Reynolds, on considère que l'écoulement obéit à l'équation de Stokes :

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}(x, y, z, t) = -\vec{\nabla} P(x, y, z, t) + \mu \Delta \vec{v}(x, y, z, t) \quad (\text{B.2})$$

avec l'équation d'incompressibilité :

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{v} = \frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} = 0. \quad (\text{B.3})$$

Après projection, simplification des termes $1/L^2 \ll 1/h^2$ et en régime stationnaire, il vient :

$$0 = -\frac{\partial P}{\partial x} + \mu \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \quad (\text{B.4})$$

$$0 = -\frac{\partial P}{\partial y} + \mu \frac{\partial^2 v_y}{\partial z^2} \quad (\text{B.5})$$

$$0 = -\frac{\partial P}{\partial z} \quad (\text{B.6})$$

soit $P(x, y, z) = P(x, y)$. On en déduit :

$$v_x(x, y, z) = \frac{1}{2\mu} \frac{\partial P}{\partial x} z^2 + A'(x, y)z + B'(x, y) \quad (\text{B.7})$$

$$v_y(x, y, z) = \frac{1}{2\mu} \frac{\partial P}{\partial y} z^2 + A''(x, y)z + B''(x, y) \quad (\text{B.8})$$

d'où :

$$\vec{v}(x, y, z) = \frac{1}{2\mu} \vec{\nabla} P z^2 + \vec{A}(x, y)z + \vec{B}(x, y) \quad (\text{B.9})$$

Les conditions limites imposent :

$$v(x, y, z = 0 \text{ et } z = h) = 0 \quad (\text{B.10})$$

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial z}(x, y, 0) = 0 \quad (\text{B.11})$$

car la composante normale de la vitesse est nulle à la paroi, soit :

$$\vec{A}(x, y) = -\frac{1}{2\mu} \vec{\nabla} P h \quad (\text{B.12})$$

$$\vec{B}(x, y) = \vec{0} \quad (\text{B.13})$$

d'où :

$$\vec{v}(x, y, z) = \frac{1}{2\mu} \vec{\nabla} P z(z - h) \quad (\text{B.14})$$

Finalement, en moyennant sur z :

$$\vec{v}(x, y) = \frac{1}{2\mu} \int_0^{+h} \vec{v}(x, y, z) \, dz \quad (\text{B.15})$$

$$= -\frac{h^2}{3\mu} \vec{\nabla} P \quad (\text{B.16})$$

$$= \vec{\nabla} \left(-\frac{h^2}{3\mu} P \right) \quad (\text{B.17})$$

$$= \vec{\nabla} \phi \quad (\text{B.18})$$

La vitesse dérive donc d'un potentiel : on peut donc se reporter à un cas d'écoulement de type fluide parfait pour la vitesse moyennée sur z .

Annexe C

Calcul analytique du champ des vitesses dans une cavité circulaire.

Cette annexe sert de préambule à l'annexe suivante qui calculera le champ des vitesses dans des cavités rectangulaires.

C.1 Hypothèses :

Pour tous les calculs, nous nous placerons dans un repère cartésien (O, x, y) . Nous utiliserons également la représentation de nombres complexes dans le plan complexe. Nous supposons par la suite que notre écoulement est bidimensionnel (cavité de type Hele Shaw). Nous supposons également que l'écoulement est irrotationnel ($\vec{\nabla} \wedge \vec{v} = \vec{0}$) et le fluide comme incompressible ($\vec{\nabla} \cdot \vec{v} = 0$).

C.2 Le potentiel complexe

C.2.1 Irrotationnalité de l'écoulement et potentiel des vitesses

L'irrotationnalité de l'écoulement s'exprime par la relation :

$$\vec{\nabla} \wedge \vec{v} = 0 \tag{C.1}$$

ce qui conduit à :

$$\vec{v} = \vec{\nabla} \phi \tag{C.2}$$

d'où :

$$v_x = \frac{\partial \phi}{\partial x}(x, y, t) \tag{C.3}$$

$$v_y = \frac{\partial \phi}{\partial y}(x, y, t) \tag{C.4}$$

où ϕ est le potentiel des vitesses. Comme l'écoulement est incompressible ($\vec{\nabla} \cdot \vec{v} = 0$), il résulte par C.2 et par la condition d'incompressibilité que :

$$\Delta \phi = 0 \tag{C.5}$$

La condition limite de glissement au bord de la cavité circulaire s'écrit :

$$\vec{V} \cdot \vec{n} = 0 \quad (\text{C.6})$$

ce qui est équivalent à :

$$\frac{\partial \phi}{\partial n} = 0 \quad (\text{C.7})$$

où \vec{n} est le vecteur normal à la surface de la cavité.

C.2.2 Fonction de courant

L'incompressibilité de l'écoulement s'écrit :

$$\frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} = 0 \quad (\text{C.8})$$

d'où :

$$\frac{\partial v_x}{\partial x} = -\frac{\partial v_y}{\partial y} \quad (\text{C.9})$$

L'égalité précédente est suffisante pour assurer l'existence de $\psi(x, y, t)$ tel que :

$$-v_y dx + v_x dy = d\psi \quad (\text{C.10})$$

soit :

$$v_x = \frac{\partial \psi}{\partial y} \quad (\text{C.11})$$

et :

$$v_y = -\frac{\partial \psi}{\partial x} \quad (\text{C.12})$$

La condition d'irrotationnalité $\vec{\nabla} \wedge \vec{v} = \vec{0}$ conduit à :

$$\Delta \psi = 0 \quad (\text{C.13})$$

Les courbes $\psi(x, y, t) = \text{cte}$, sont les lignes de courant, c'est pourquoi cette fonction est appelée fonction de courant. La condition limite est donc $\psi = \text{cte}$ sur le bord de la cavité, ou encore :

$$\frac{\partial \psi}{\partial s} = 0 \quad (\text{C.14})$$

où s est l'abscisse curviligne sur la ligne de courant.

C.2.3 Lien entre ces deux fonctions

Nous avons donc :

$$\frac{\partial \phi}{\partial x} = \frac{\partial \psi}{\partial y} \quad (\text{C.15})$$

$$\frac{\partial \phi}{\partial y} = -\frac{\partial \psi}{\partial x} \quad (\text{C.16})$$

ce qui implique :

$$\vec{\nabla} \phi \cdot \vec{\nabla} \psi = 0 \quad (\text{C.17})$$

Les lignes de courant sont donc perpendiculaires aux lignes iso- ϕ , ce qui est cohérent avec la condition limite sur la surface de la cavité.

C.2.4 Potentiel complexe

Considérons la fonction :

$$z = x + iy \mapsto \phi(x, y, t) + i\psi(x, y, t) \quad (\text{C.18})$$

où :

$$i^2 = -1 \quad (\text{C.19})$$

Si ϕ et ψ sont \mathcal{C}^1 et si les équations de la section précédente sont vérifiées, alors $\phi + i\psi$ est une fonction holomorphe dans \mathcal{D} (notre domaine), c'est-à-dire que $f(z) = \phi + i\psi$ est définie pour tout point M de \mathcal{D} et :

$$\left(\frac{df}{dz}\right)_{z_0} = \lim_{z \rightarrow z_0} \frac{f(z) - f(z_0)}{z - z_0} \quad (\text{C.20})$$

existe ! On appelle cette fonction f : potentiel complexe.

C.2.5 Conclusion

Les problèmes en ϕ et ψ sont donc équivalents à un seul problème : chercher $f(z)$ holomorphe dans \mathcal{D} , $f = \phi + i\psi$ telle que $\psi = \text{cte}$ sur le bord de la cavité.

C.3 Vitesse complexe

Nous utiliserons dans ce paragraphe le plan complexe. On peut alors écrire :

$$\left(\frac{df}{dz}\right)_{z_0} \quad (\text{C.21})$$

$$= \lim_{z \rightarrow z_0} \frac{f(z) - f(z_0)}{z - z_0} \quad (\text{C.22})$$

$$= \lim_{\substack{x \rightarrow x_0 \\ y = y_0}} \frac{\phi(x, y_0, t) + i\psi(x, y_0, t) - \phi(x_0, y_0, t) - i\psi(x_0, y_0, t)}{x - x_0} \quad (\text{C.23})$$

$$= \frac{\partial \phi}{\partial x} + i \frac{\partial \psi}{\partial x} \quad (\text{C.24})$$

$$= v_x - iv_y \quad (\text{C.25})$$

Posons alors :

$$w(x, y, t) = \frac{df}{dz} = v_x(x, y, t) - iv_y(x, y, t) \quad (\text{C.26})$$

w est la vitesse complexe.

C.4 Exemple

Puisque $w(z) = v_x - iv_y = \|w\| e^{-i\theta}$ si $w = \|w\| e^{i\theta}$ ($w \in \mathbb{C}$), nous allons calculer analytiquement $f(z)$ pour une source en O . Par conservation du débit surfacique Q_s , nous pouvons écrire :

$$Q_s = 2\pi r v_r \quad (\text{C.27})$$

d'où :

$$v_r = \frac{Q_s}{2\pi r} \quad (Q_s \geq 0). \quad (\text{C.28})$$

On en déduit :

$$w(z) = \frac{Q_s}{2\pi r} e^{-i\theta} = \frac{Q_s}{2\pi r e^{i\theta}} = \frac{Q_s}{2\pi z} \quad (\text{C.29})$$

soit encore :

$$f(z) = \frac{Q_s}{2\pi} \log(z) \quad (\text{C.30})$$

et enfin, si la source se trouve en z_o :

$$f(z) = \frac{Q_s}{2\pi} \log(z - z_o) \quad (\text{C.31})$$

C.5 Le problème

C.5.1 Rappel : inversion

On appelle inversion de pôle O et de paramètre $R \geq 0$ la transformation :

$$\begin{aligned} M &\longmapsto M' \\ OM \cdot OM' &= R^2 \\ (O, M, M') &\text{ sur la même droite} \end{aligned} \quad (\text{C.32})$$

Soit $z = re^{i\theta} = OM e^{i\theta}$

$$z' = OM' e^{i\theta} = \frac{R^2}{OM} e^{i\theta} = \frac{R^2}{OM e^{-i\theta}} = \frac{R^2}{\bar{z}} \quad (\text{C.33})$$

d'où finalement, cette transformation correspond à l'opération :

$$\begin{aligned} M &\longmapsto M' \\ z &\longmapsto \frac{R^2}{\bar{z}} \end{aligned} \quad (\text{C.34})$$

C.5.2 Théorème de Milne-Thomson

Théorème 1. *Si $f(z)$ est le potentiel complexe d'un écoulement ayant toutes ses singularités à l'extérieur d'un cercle de rayon R , le potentiel $g(z)$ de l'écoulement se faisant autour du cercle avec les mêmes singularités extérieures est :*

$$g(z) = f(z) + \bar{f}\left(\frac{R^2}{\bar{z}}\right) \quad (\text{C.35})$$

Exemple :

Soit une source de débit surfacique Q_s au point $A(-\beta R, 0)$, alors on a déjà vu que pour cette source : $f(z) = \frac{Q_s}{2\pi} \log(z + \beta R)$

Autour du cercle, par application du théorème de Milne-Thomson, il vient alors :

$$g(z) = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\log(z + \beta R) + \overline{\log\left(\frac{R^2}{\bar{z}} + \beta R\right)} \right) \quad (\text{C.36})$$

Or :

$$\overline{\log(z)} = \log(\bar{z}) \quad (\text{C.37})$$

d'où :

$$g(z) = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\log(z + \beta R) + \log\left(\frac{R^2}{z} + \beta R\right) \right) \quad (\text{C.38})$$

Il est intéressant de remarquer que :

$$\begin{aligned} \log\left(\frac{R^2}{z} + \beta R\right) &= \log\left(\frac{R}{z}(R + \beta z)\right) \\ &= \log\left(\frac{\beta R}{z}\left(z + \frac{R}{\beta}\right)\right) \end{aligned} \quad (\text{C.39})$$

$$= \log\left(z + \frac{R}{\beta}\right) - \log z + K \quad (\text{C.40})$$

d'où :

$$g(z) = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\log(z + \beta R) + \log\left(z + \frac{R}{\beta}\right) - \log z + K \right) \quad (\text{C.41})$$

c'est-à-dire qu'une source positionnée au point $(-\beta R, 0)$ (avec $\beta \geq 1$ ou $\beta \leq 1$) provoque autour du cercle de rayon R , le même écoulement dans l'espace infini que celui créé par un puits en $(0, 0)$, coexistant avec une source en $(-\frac{R}{\beta}, 0)$, ainsi qu'une troisième source en $(-\beta R, 0)$ (cf. le théorème des charges images en électrostatique).

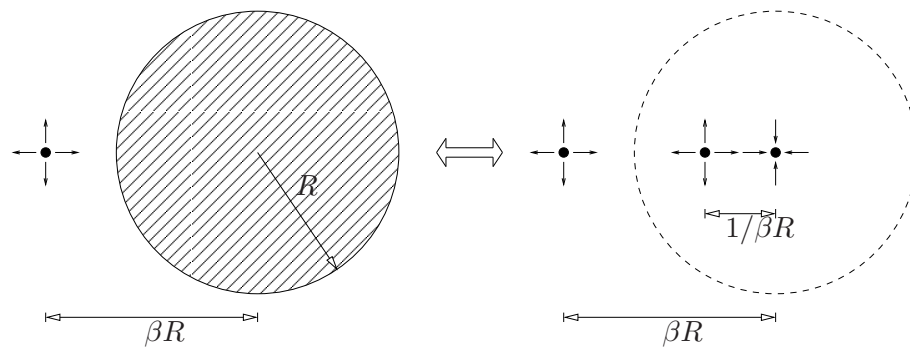


FIG. C.1 – Simulation d'un écoulement autour ou à l'intérieur d'un cylindre ($\beta \geq 1$).

C.5.3 Solution au problème

Considérons une source et un puits respectivement placés aux points $(-\beta R, 0)$ et $(\beta R, 0)$ du plan complexe. Alors $h(z) = g(z)[\text{puits}] + g(z)[\text{source}]$ (équations linéaires).

$$g(z)_{\text{source}} = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\log(z + \beta R) + \log\left(z + \frac{R}{\beta}\right) - \log z + K \right) \quad (\text{C.42})$$

$$g(z)_{\text{puits}} = \frac{-Q_s}{2\pi} \left(\log(z - \beta R) + \log\left(z - \frac{R}{\beta}\right) - \log z + K \right) \quad (\text{C.43})$$

d'où

$$h(z) = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\log(z + \beta R) + \log\left(z + \frac{R}{\beta}\right) - \log z + K \right. \\ \left. - \log(z - \beta R) - \log\left(z - \frac{R}{\beta}\right) + \log z - K \right) \quad (\text{C.44})$$

Nous rappelons que :

$$w(z) = \frac{dh}{dz}(z) = v_x(x, y, t) - iv_y(x, y, t) \quad (\text{C.45})$$

d'où

$$w(z) = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\frac{1}{z + \beta R} - \frac{1}{z - \beta R} + \frac{1}{z + \frac{R}{\beta}} - \frac{1}{z - \frac{R}{\beta}} \right) \quad (\text{C.46})$$

En introduisant $z = x + iy$ il vient :

$$w(z) = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\frac{x + \beta R - iy}{(x + \beta R)^2 + y^2} - \frac{x - \beta R - iy}{(x - \beta R)^2 + y^2} + \frac{x + \frac{R}{\beta} - iy}{(x + \frac{R}{\beta})^2 + y^2} - \frac{x - \frac{R}{\beta} - iy}{(x - \frac{R}{\beta})^2 + y^2} \right) \quad (\text{C.47})$$

soit au final :

$$v_x(x, y) = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\frac{x + \beta R}{(x + \beta R)^2 + y^2} - \frac{x - \beta R}{(x - \beta R)^2 + y^2} + \frac{x + \frac{R}{\beta}}{(x + \frac{R}{\beta})^2 + y^2} - \frac{x - \frac{R}{\beta}}{(x - \frac{R}{\beta})^2 + y^2} \right) \quad (\text{C.48})$$

$$v_y(x, y) = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\frac{y}{(x + \beta R)^2 + y^2} - \frac{y}{(x - \beta R)^2 + y^2} + \frac{y}{(x + \frac{R}{\beta})^2 + y^2} - \frac{y}{(x - \frac{R}{\beta})^2 + y^2} \right) \quad (\text{C.49})$$

Les expressions des vitesses ci-dessus sont celles des vitesses à l'intérieur ou à l'extérieur de la cavité (selon le choix $\beta \geq 1$ ou $\beta \leq 1$). Nous avons donc résolu notre problème en trouvant de manière explicite leur valeur en un point (x, y) de la cavité.

Les lignes de courant sont présentées sur la figure C.2 :

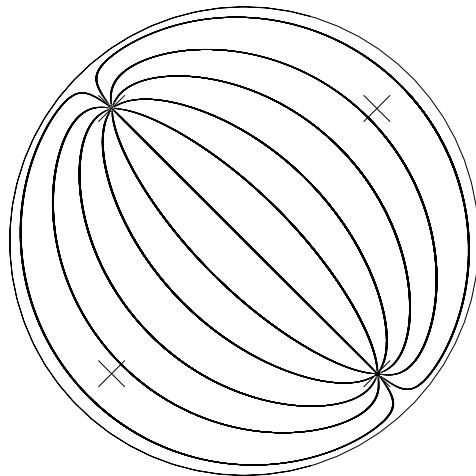


FIG. C.2 – Lignes de courant dans une cavité de rayon $R = 1$ pour $\beta = 0.8$.

Annexe D

Calcul analytique du champ des vitesses dans une cavité rectangulaire

Le but de ce chapitre est d'obtenir analytiquement le champ des vitesses dans une cavité carrée ou rectangulaire. Cette idée est motivée par le fait que les Puces à A.D.N. développées dans le commerce sont généralement de forme rectangulaire (lames de microscope). Ce calcul du champ des vitesses n'est pas évident à priori. Il va donc falloir mettre en oeuvre une méthode générale à base de transformations conformes : il s'agit de calculer le champ des vitesses autour ou à l'intérieur d'un profil complexe à partir d'un champ des vitesses facilement calculable (autour ou à l'intérieur d'un profil simple), puis d'appliquer une **transformation** dite **conforme** pour transformer ce profil simple en le profil complexe. Grâce à une telle transformation, le champ de vitesses 'simple' sera lui aussi transformé et donnera alors le champ des vitesses dans le profil complexe. Cette méthode très puissante est à la base du calcul du champ des vitesses autour des ailes d'avions (ou profils de Joukowski) permettant le calcul des forces de portance et de trainée qui s'y exercent. Nous allons rappeler dans ce chapitre la théorie des transformations conformes, pour trouver ensuite grâce à cette à cette méthode le champ des vitesses qui nous intéresse. Le lecteur pourra se reporter à [118] pour un cours complet et illustré d'exemples. Pour tous les calculs, nous nous reporterons au repère cartésien (O, x, y) et nous utiliserons la représentation complexe dans \mathbb{C} .

D.1 Généralités sur les écoulements potentiels

D.1.1 Hypothèses de l'écoulement et potentiel complexe

On considère un écoulement de type fluide parfait (sans viscosité) bidimensionnel et incompressible ($\vec{\nabla} \cdot \vec{v} = 0$). On ajoute à ces hypothèses que l'écoulement est irrotationnel ($\vec{\nabla} \wedge \vec{v} = \vec{0}$) : le champ de vitesses dérive alors d'un potentiel f , obéissant à l'équation de Laplace $\Delta f = 0$. Il existe alors deux fonctions ϕ et ψ qui sont respectivement la partie réelle et la partie imaginaire de f (on fait ici l'hypothèse supplémentaire que f est holomorphe dans \mathbb{C}). On peut décomposer la fonction potentielle de l'écoulement f par :

$$f(x, y) = \phi(x, y) + i\psi(x, y) \tag{D.1}$$

D.1.2 Lien avec les vitesses

Les fonctions ϕ et ψ sont telles que si v_x et v_y désignent les composantes suivant Ox et Oy de la vitesse \vec{v} , on a alors les conditions dites de Cauchy suivantes :

$$v_x = \frac{\partial\psi}{\partial y} = \frac{\partial\phi}{\partial x} \quad (\text{D.2})$$

$$v_y = -\frac{\partial\psi}{\partial x} = \frac{\partial\phi}{\partial y} \quad (\text{D.3})$$

Les lignes où ϕ est constant correspondent à des lignes équipotentielles, alors que les lignes où ψ est constant correspondent à des lignes de courant. Ces deux familles de courbes sont orthogonales entre elles. La connaissance de la fonction potentielle permet, grâce aux conditions de Cauchy, de déterminer complètement le champ des vitesses \vec{v} . On utilise dans ce cas la vitesse complexe w définie par :

$$w(x, y) = \frac{df}{dz} \quad (\text{D.4})$$

avec $z = x + iy$.

D.2 Transformation conforme

D.2.1 Transformations conformes : généralités

Définition

Considérons deux plans (x, y) et (X, Y) et une transformation ponctuelle bijective :

$$\begin{cases} X = X(x, y) \\ Y = Y(x, y) \end{cases} \quad (\text{D.5})$$

qui à tout point $m(x, y)$ lui associe le point $M(X, Y)$ et inversement. Lorsque, dans le plan (x, y) , le point m décrit une courbe (c) , le point M dans le plan (X, Y) décrit une courbe (C) qui est l'image de (c) dans la transformation (fig. D.1). Parmi toutes ces transformations ponctuelles bijectives, certaines vérifient, au moins dans certains domaines \mathcal{D} du plan complexe, les relations de Cauchy :

$$\begin{cases} \frac{\partial X}{\partial x} = \frac{\partial Y}{\partial y} \\ \frac{\partial X}{\partial y} = -\frac{\partial Y}{\partial x} \end{cases} \quad (\text{D.6})$$

La transformation est alors dite "*transformation conforme*" dans \mathcal{D} et on peut refaire, pour les fonctions X et Y , un raisonnement identique à celui déjà fait pour ϕ et ψ , ce qui conduit au résultat suivant :

Propriété 1. *Les transformations conformes peuvent toutes s'écrire sous la forme : $Z = g(z)$ et $z = G(Z) = g^{-1}(Z)$ où $Z = X + iY$ et $z = x + iy$*

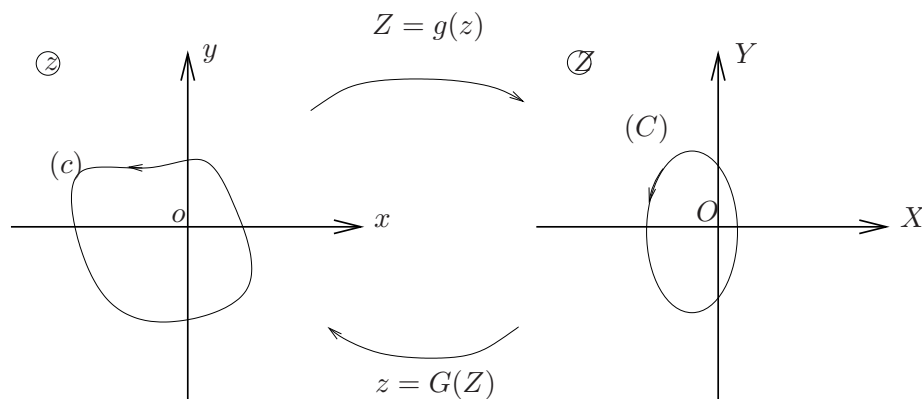


FIG. D.1 – Passage du plan z au plan Z .

Propriétés des transformations conformes :

- Holomorphic : il résulte de la définition même que $g(z)$ doit être dérivable dans \mathcal{D} et uniforme : elle est donc *holomorphe dans \mathcal{D}* , mais si on prolonge la définition de $g(z)$ à tout le plan complexe, cette fonction doit nécessairement présenter des singularités en dehors de \mathcal{D} ou sur les frontières de \mathcal{D} .
- Conservation des angles et points singuliers : la fonction $g(z)$ étant holomorphe dans \mathcal{D} , la transformation conforme *conserve les angles*. Plus précisément, si deux courbes γ et γ' passent par un point $z_0 \in \mathcal{D}$ et se coupent sous l'angle α , leurs transformées Γ et Γ' passent par le point transformé Z_0 et se coupent en général dans le plan Z sous le même angle α (fig. D.2). En effet, un développement au voisinage de z_0 s'écrit, sous réserve que $g(z)$ soit

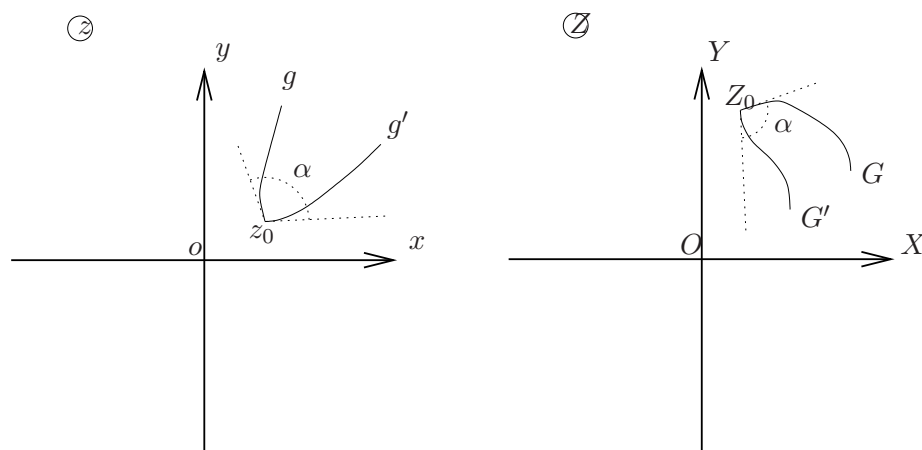


FIG. D.2 – Conservation des angles par transformation conforme.

holomorphe en z_0 et que $g'(z)$ soit non nul :

$$dZ = g'(z_0)dz \tag{D.7}$$

Ceci montre que l'on passe du voisinage de z_0 au voisinage Z_0 par une similitude définie

par le nombre complexe $g'(z_0)$ différent de 0. En étendant le domaine de définition de $g(z)$ à tout le plan complexe, on obtient la propriété suivante :

Propriété 2. Une transformation $g(z)$ conserve les angles en tout point du plan complexe où $g(z)$ n'est ni nul ni infini.

Les points où $g'(z)$ est nul ou non défini sont dits points singuliers de la transformation conforme.

Intérêt des transformations conformes

Soit $f(z)$ le potentiel complexe d'un écoulement dans le domaine (d) du plan xOy et soit $Z = g(z)$ ou $z = G(Z)$ une transformation conforme telle que $g(z)$ soit holomorphe dans (d) .

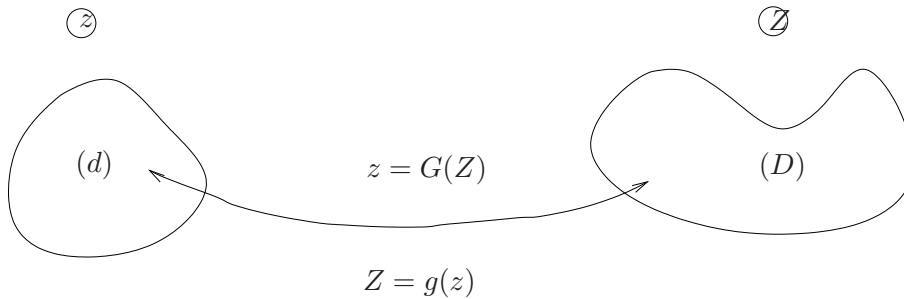


FIG. D.3 – Passage du plan z au plan Z .

Si le domaine (d) est simplement connexe, il en est de même du domaine transformé (D) et la fonction $F(Z) = f(G(Z))$ est holomorphe dans (D) pourvu que $f(z)$ le soit. Elle représente, par suite, le potentiel complexe d'un nouvel écoulement dans (D) et, en deux points homologues, on a :

$$f(z) = F(Z) \quad (\text{D.8})$$

Plus généralement, si (d) est multiplément connexe, ou si f présente des singularités dans (d) , on a le long d'une courbe fermée quelconque (c) du plan z :

$$\int_c w(z) dz = \Gamma + i\Delta \quad (\text{D.9})$$

On en déduit, puisque la transformation est holomorphe dans (d) :

$$\Gamma + i\Delta = \int_c w(z) dz = \int_c \frac{df}{dz} dz = \int_c \frac{dF}{dZ} \frac{dZ}{dz} dz = \int_C \frac{dF}{dZ} dZ = \int_C W(Z) dZ \quad (\text{D.10})$$

d'où la propriété suivante :

Propriété 3. La circulation et le débit se conservent dans une transformation conforme, pour des courbes homologues.

Entre autre, si $f(z)$ présente en un point z_0 une singularité (source ou tourbillon), alors l'écoulement transformé présente au point Z_0 homologue de z_0 la **même singularité** (source ou tourbillon) avec **le même débit ou la même circulation**.

Remarquons enfin que, puisqu'en deux points homologues on a $f(z) = F(Z)$, alors les valeurs des potentiels et des fonctions de courant sur deux points homologues sont également égales. Par suite, les lignes équipotentielle et les lignes de courant des deux écoulements sont homologues dans la transformation : en particulier, **la ligne de courant (c) que constituait l'obstacle devient aussi la ligne de courant (C) limitant l'obstacle transformé**.

C'est là l'intérêt fondamental des transformations conformes, le principe étant de chercher l'opération qui transforme le contour de l'obstacle en un contour plus simple pour lequel on sait calculer le potentiel complexe de l'écoulement. Toute la difficulté réside alors dans la recherche de la transformation conforme en question ...

Retour sur le champ des vitesses

Comme f , fonction potentielle complexe dans le domaine (d) du plan z , et F , fonction potentielle complexe dans le domaine (D) du plan Z , sont liées par la relation :

$$f(z) = F(Z) \quad (\text{D.11})$$

On a alors la relation suivante entre les vitesses :

$$w(z) = \frac{df}{dz} = \frac{dF}{dZ} \cdot \frac{dZ}{dz} = W(Z = g(z)) \cdot \frac{dg}{dz}(z) \quad (\text{D.12})$$

Ainsi, on obtient le champ des vitesses dans le plan z à partir du champ des vitesses dans le plan Z multiplié par la dérivée de la transformation conforme du plan Z au plan z .

Exemple élémentaire d'application

Prenons l'exemple d'un écoulement $f(z)$ qui se déduit de l'écoulement uniforme $F(Z)$ au moyen de la transformation conforme $Z = g(z) = z^2$, Cette transformation conserve les angles sauf en l'origine où la dérivée $2z$ de la transformation s'annule : si on pose $z = re^{i\theta}$ et $Z = Re^{i\Theta}$, on voit qu'autour de l'origine les angles sont divisés par 2.

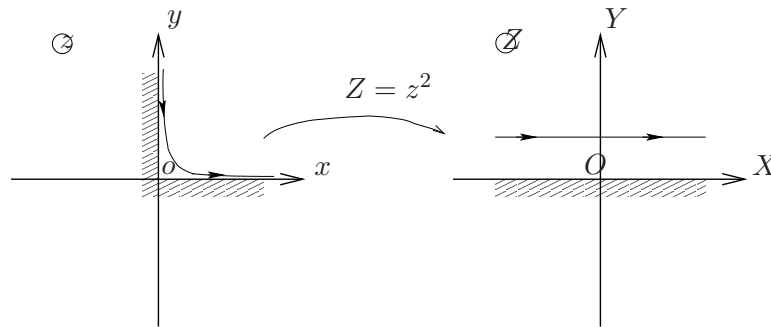


FIG. D.4 – Exemple de la transformation conforme $Z = z^2$.

Il suffit donc de chercher le champ des vitesses au dessus d'un plan (chose facile en utilisant le théorème des images) pour obtenir ensuite le champ des vitesses le long de deux plans se coupant en angle droit (via la transformation conforme ci-dessus).

D.2.2 Transformation de Schwarz-Christoffel

Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser au problème général des domaines fermés avec frontières rectilignes. Il s'agit de trouver une transformation conforme $Z = g(z)$ qui projette l'intérieur d'un polygone fermé à n cotés (du plan z) en le demi-plan supérieur $\Im(Z) \geq 0$ et où tous les points homologues de des sommets du polygone se retrouvent sur l'axe OX (du plan Z). Pour plus de détails, le lecteur pourra se reporter à [119].

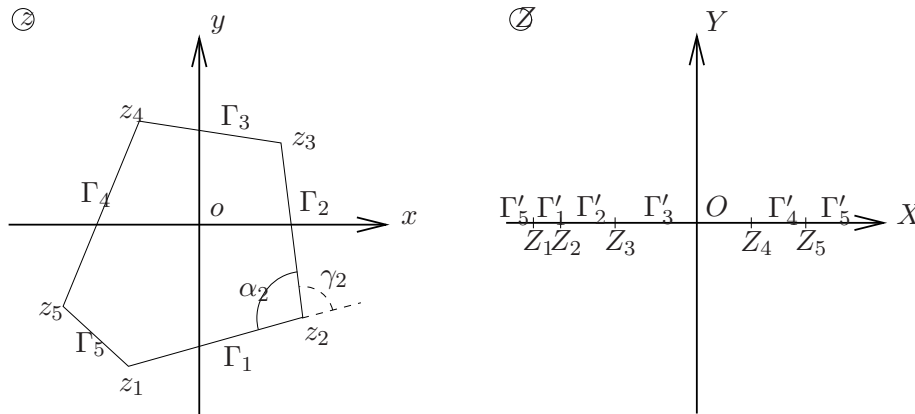


FIG. D.5 – Principe de la transformation de Schwarz-Christoffel.

Dans toute la suite, nous noterons X_j la partie réelle de Z_j . On notera z_1, z_2, \dots, z_n les n affixes des extrémités du polygone et Z_1, Z_2, \dots, Z_n leurs images respectives sur l'axe OX (X_1, X_2, \dots, X_n sont donc des réels!). On pourra prendre par exemple $X_1 < X_2 < \dots < X_n$ (fig. D.5). D'après le théorème de Riemann, seuls trois points parmi les Z_j peuvent être choisis arbitrairement. Les n cotés du polygone sont notés $\Gamma_1, \dots, \Gamma_n$ et leur projection dans le plan Z est notée $\Gamma'_1, \dots, \Gamma'_n$. On remarquera que si $X_1 \neq -\infty$ et si $X_n \neq +\infty$, alors Γ'_n est constitué de deux demi-droites $X < X_1$ et $X > X_n$. Notons également α_j ($j = 1 \dots n$) l'angle intérieur au polygone au sommet d'affixe z_j ($j = 1 \dots n$) et γ_j l'angle complémentaire de α_j . Enfin, nous orienterons le contour du polygone dans le sens trigonométrique de sorte que lorsqu'on décrit le contour dans ce sens, on décrit l'axe OX dans le sens des X croissants. On a donc :

$$\sum_{j=1}^n \alpha_j = (n-2)\pi \quad (\text{D.13})$$

Un première approche du théorème de Schwarz-Christoffel consiste à remarquer que la fonction $z = G(Z)$ avec $G'(z) = z^{-k}$ (k réel) transforme l'axe OX en un couple de segments dans le plan \mathbb{C} avec un angle $k\pi$ à leur intersection (cf. exemple plus haut). Cela suggère, dans le cas où X_1 et X_n sont à distance finie, que la fonction de transformation appropriée au problème s'écrive

sous la forme [120] :

$$G'(Z) = a \prod_{j=1}^n (Z - X_j)^{\alpha_j/\pi-1} \tag{D.14}$$

où a est une constante complexe et où $0 < \arg(Z - X_j) < \pi$, pour tout j . Cette équation différentielle est la relation de *Schwarz-Christoffel*. L'intégration de la relation (D.14) mène à :

$$z = G(Z) = a \int_{Z_0}^Z \prod_{j=1}^n (\mathcal{V} - X_j)^{\alpha_j/\pi-1} d\mathcal{V} + b \tag{D.15}$$

où ' b ' et Z_0 sont des constantes. La formule ci-dessus est l'expression de la transformation conforme qui transforme l'axe OX du plan Z en le polygone recherché dans le plan z . ' b ' contrôle la position du polygone et ' a ' contrôle sa dimension.

En général, pour des polygones fermés, il n'existe pas de forme standard pour les fonctions $g(z)$ et $G(Z) = g^{-1}(Z)$. Nous allons le montrer dans l'exemple ci-dessous.

Exemple

Essayons de trouver la transformation qui projette l'intérieur d'un rectangle dans le demi-plan $\Im(Z) \geq 0$ (fig. D.6). Pour simplifier, plaçons le rectangle de façon à ce que ses sommets aient pour affixe $z = \pm 1; \pm 1 + ic$ (c est une constante réelle positive). Dans la formule (D.15), on a $n = 4$ et nous ne pouvons donc choisir arbitrairement que trois points parmi X_1, \dots, X_4 . De plus, vue la symétrie du problème nous prendrons :

$$\begin{aligned} z_1 = -1 + ic &\rightarrow X_1 = -\frac{1}{k} \\ z_2 = -1 &\rightarrow X_2 = -1 \\ z_3 = +1 &\rightarrow X_3 = +1 \\ z_4 = 1 + ic &\rightarrow X_4 = +\frac{1}{k} \end{aligned}$$

où k est une constante à déterminer ($k < 1$).

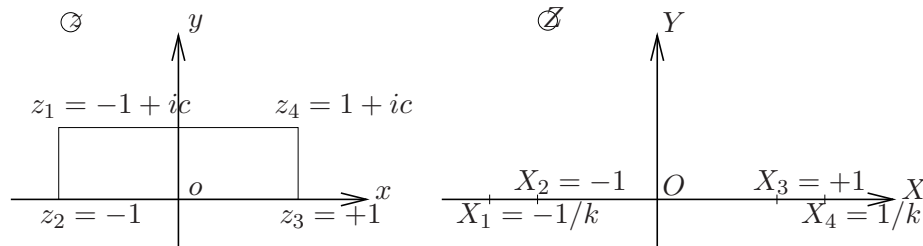


FIG. D.6 – Cas particulier du rectangle.

Vu la position du rectangle dans le plan z , nous prendrons $b = 0$ et $Z_0 = 0$. Comme $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = \frac{\pi}{2}$, l'équation (D.15) devient :

$$z = G(Z) = a \int_0^Z \frac{d\mathcal{V}}{\sqrt{(\mathcal{V}^2 - 1)(\mathcal{V}^2 - 1/k^2)}} \tag{D.16}$$

Posons : $d = k.a$. Il vient alors :

$$z = G(Z) = d \int_0^Z \frac{d\mathcal{V}}{\sqrt{(1-\mathcal{V}^2)(1-k^2\mathcal{V}^2)}} \equiv d \times E(k, Z) \quad (\text{D.17})$$

Les constantes d et k sont évaluées en écrivant que certains points de l'axe OX correspondent à des sommets du rectangle. Ainsi, $G(Z_3 = 1) = z_3 = 1$ conduit à l'équation :

$$d \times K(k) = 1 \quad (\text{D.18})$$

où $K(k)$ est l'intégrale elliptique de première espèce définie par :

$$K(k) = \int_0^{\frac{\pi}{2}} \frac{d\theta}{\sqrt{1-k^2\sin^2\theta}} \quad (\text{D.19})$$

De même, $G(Z_4 = 1/k) = z_4 = 1 + ic$ conduit à :

$$1 + ic = G(1) + d \int_1^{1/k} \frac{d\mathcal{V}}{\sqrt{(1-\mathcal{V}^2)(1-k^2\mathcal{V}^2)}} \quad (\text{D.20})$$

d'où :

$$d \times K_1(k) = c \quad (\text{D.21})$$

où :

$$K_1(k) = \int_1^{1/k} \frac{d\mathcal{V}}{\sqrt{(1-\mathcal{V}^2)(1-k^2\mathcal{V}^2)}} \quad (\text{D.22})$$

Ainsi, nous avons deux équations (D.18 et D.21) pour deux inconnues (d et k) : le problème est entièrement résolu. La fonction $G(Z)$ est donc parfaitement unique. Or c'est la fonction $g = G^{-1}$ qui nous intéresse : en effet, une fois l'écoulement calculé dans le plan $\Im(Z) \geq 0$, il faut connaître $g(z)$ (et $g'(z)$) d'après la formule (D.12). Pour cela, nous sommes obligés d'introduire de nouvelles fonctions, dites de Jacobi. Posons u défini par :

$$u = \int_0^\phi \frac{d\theta}{\sqrt{1-k^2\sin^2\theta}} \quad (\text{D.23})$$

et définissons les fonction elliptiques de Jacobi "sn", "cn" et "dn" par :

$$\text{sn}(u|k) = \sin(\phi(u|k)) \quad (\text{D.24})$$

$$\text{cn}(u|k) = \cos(\phi(u|k)) \quad (\text{D.25})$$

$$\text{dn}(u|k) = \sqrt{1-k^2\sin^2(\phi(u|k))} \quad (\text{D.26})$$

La fonction inverse de G est donc, d'après (D.17) :

$$Z = g(z) = \text{sn}(z/d) \quad (\text{D.27})$$

Pour plus de détails sur les fonctions elliptiques de Jacobi, le lecteur pourra se référer à [121].

Remarque :

On peut montrer ([122, 120]) que la forme différentielle de la formule de Schwarz-Christoffel sert aussi pour transformer l'intérieur d'un polygone en l'intérieur d'un cercle de rayon 1. Par contre, les sommets du polygone sont projetés sur le cercle (on n'a donc plus nécessairement $\Im(Z_j) = Y_j = 0$). La forme différentielle s'écrit alors :

$$G'(Z) = a \prod_{j=1}^n (Z - \mathbf{Z}_j)^{\alpha_j/\pi-1} \quad (\text{D.28})$$

et donc :

$$z = G(Z) = A \int_{Z_0}^Z \prod_{j=1}^n (\mathcal{V} - \mathbf{Z}_j)^{\alpha_j/\pi-1} d\mathcal{V} + B \quad (\text{D.29})$$

($\alpha_1, \dots, \alpha_n$ correspondent également aux angles intérieurs du polygone et A et B sont des inconnues à déterminer).

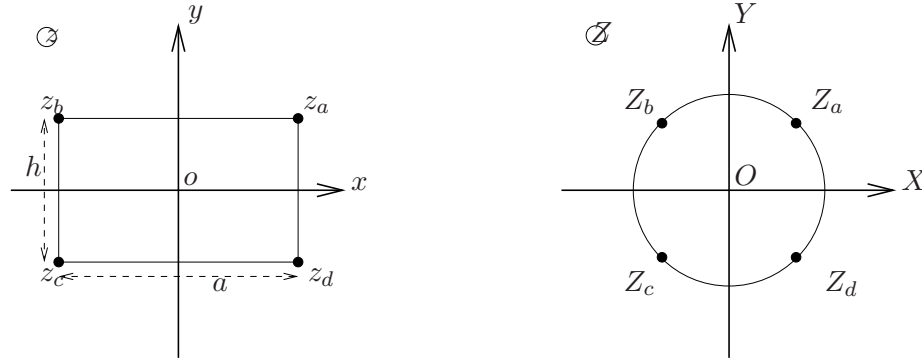


FIG. D.7 – Transformation de Schwarz-Christoffel d'un rectangle en un cercle de rayon 1.

On démontre alors [122] les relations suivantes :

$$\frac{K(k)}{a} = \frac{K(\sqrt{1-k^2})}{h} = \frac{\lambda}{2} \quad (\text{D.30})$$

et :

$$Z = g(z) = \frac{\text{sn}(\frac{\lambda}{2}z)\text{dn}(\frac{\lambda}{2}z)}{\text{cn}(\frac{\lambda}{2}z)} \quad (\text{D.31})$$

C'est à partir de cette formule que l'on va pouvoir calculer le champ des vitesses dans une cavité carrée car le calcul des vitesses dans une cavité circulaire a déjà été trouvé (voir l'annexe C pour le détail de la méthode).

On rappellera simplement que le champ des vitesses complexes dans un cercle de rayon R , centré sur l'origine du repère xOy , et ayant une paire de source/puits d'intensité Q_s respectivement placés sur l'axe Ox aux abscisses $z = -\beta R$ et $z = \beta R$ ($\beta \in [0..1]$) est :

$$W(Z) = \frac{Q_s}{2\pi} \left(\frac{1}{Z + \beta R} - \frac{1}{Z - \beta R} + \frac{1}{Z + \frac{R}{\beta}} - \frac{1}{Z - \frac{R}{\beta}} \right) \quad (\text{D.32})$$

Pour un puits et une source sur une même diagonale d'un carré, on obtient alors, grâce à la relation D.12, le champ des vitesses et lignes de courant suivants :

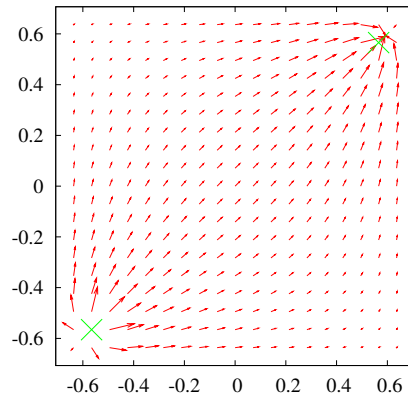


FIG. D.8 – Champ des vitesses dans un écoulement 2D Puits-Source dans un carré.

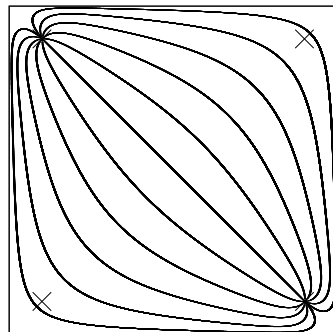


FIG. D.9 – Lignes de courant créées par un puits et une source dans un carré.

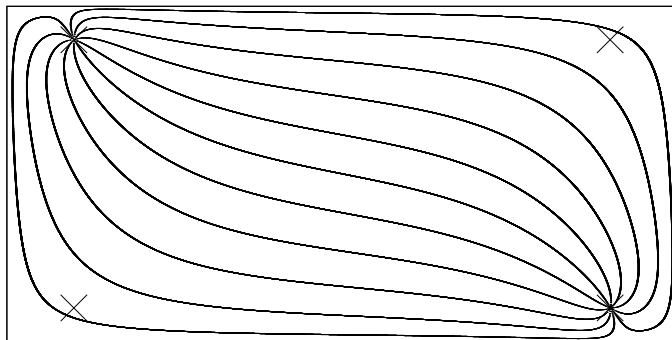


FIG. D.10 – Lignes de courant créées par un puits et une source dans un rectangle.

Annexe E

Symétries des sections de Poincaré dans une puce carrée

On peut remarquer que les sections de Poincaré issues du protocole de mélange A sont symétriques par rapport à l'axe Ox du carré. De même, les sections de Poincaré issues du protocole de mélange B présentent également une symétrie, cette fois selon l'axe Oy du carré. Nous allons essayer de l'expliquer.

E.1 Préliminaires

D'après l'expression du champ des vitesses calculé dans l'annexe D, il résulte que celui-ci est toujours symétrique par rapport à l'une des diagonales du carré (ce qui est normal car les sources sont placées sur l'une ou l'autre de ces diagonales). La figure E.1, représentant les configurations possibles des lignes de courant pouvant intervenir dans l'une des phases des protocoles A ou B, nous le confirme bien.

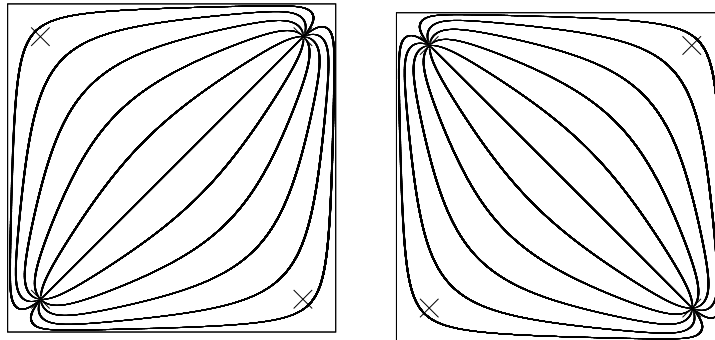


FIG. E.1 – Symétrie du champ des vitesses pour les protocoles A et B.

E.2 Protocole de mélange A

E.2.1 Rappel

Le protocole de mélange A correspond à la configuration suivante : entre $t = nT$ et $t = (n + 1)T$ (T est la période du processus de mélange), l'écoulement adopte 4 configurations successives (cf. fig. E.2) :

- entre $t = 0$ et $t = \frac{T}{4}$ (configuration A1), 1 est une source, 3 est un puits, 2 et 4 ne fonctionnent pas,
- entre $t = \frac{T}{4}$ et $t = \frac{T}{2}$ (configuration A2), 2 est une source, 4 est un puits, 1 et 3 ne fonctionnent pas,
- entre $t = \frac{T}{2}$ et $t = \frac{3T}{4}$ (configuration A3), 1 est un puits, 3 est une source, 2 et 4 ne fonctionnent pas,
- entre $t = \frac{3T}{4}$ et $t = T$ (configuration A4), 2 est un puits, 4 est une source, 1 et 3 ne fonctionnent pas.

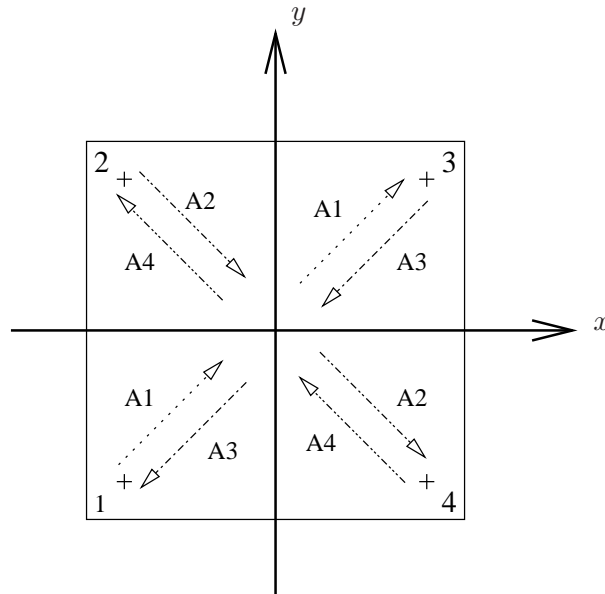


FIG. E.2 – Protocole A.

E.2.2 Symétrie du champ des vitesses

Les sections de Poincaré du protocole A correspondant à l'instant initial $t_0 = 0$ sont symétriques par rapport à l'axe Ox . Il faut donc prouver que les équations des trajectoires sont invariantes par la transformation :

$$\begin{aligned}
 x &\mapsto x \\
 y &\mapsto -y \\
 t &\mapsto -t
 \end{aligned}
 \tag{E.1}$$

Considérons tout d'abord la configuration A1 : lorsqu'on change t en $-t$, comme A1 s'intéresse au champ de vitesse entre $t = 0$ et $t = T/4$, on doit considérer le champ de vitesse entre $t = -T/4$ et $t = 0$, soit la configuration A4 puisque le champ de vitesse est périodique de période T . Puisque $\vec{v}(A3) = -\vec{v}(A1)$, il est clair que par changement de variable :

$$\begin{aligned}x &\mapsto x \\y &\mapsto -y ,\end{aligned}$$

on change $v_x(A4)$ en $v_x(A3) = -v_x(A1)$ et $v_y(A4)$ en $v_y(A1)$.

Procédons maintenant de même pour la configuration A2 : en changeant t en $-t$, on passe à la configuration A3. Or, puisque $\vec{v}(A4) = -\vec{v}(A2)$, il est immédiat de constater que par symétrie par rapport à la médiatrice horizontale du carré, on change $v_x(A3)$ en $v_x(A4) = -v_x(A2)$ et $v_y(A3)$ en $v_y(A2)$. Ainsi, par la transformation E.1, le champ de vitesse vérifie :

$$v_x(x, -y, -t) = -v_x(x, y, t) \quad (\text{E.2})$$

$$v_y(x, -y, -t) = v_y(x, y, t) . \quad (\text{E.3})$$

E.2.3 Démonstration

Les équations des trajectoires sont données par :

$$\frac{dx}{dt} = v_x(x, y, t) \quad (\text{E.4})$$

$$\frac{dy}{dt} = v_y(x, y, t) . \quad (\text{E.5})$$

Par la transformation E.1, on change dx/dt en $-dx/dt$, et dy/dt reste dy/dt . Grâce aux égalités E.2 et E.3, on peut donc conclure que les équations des trajectoires sont invariantes par la transformation E.1. Ainsi, si l'on considère la position des particules toutes les périodes, à partir de l'instant initial $t_0 = 0$, la position d'une particule à l'instant nT peut être déduite de sa position à l'instant $-nT$ par symétrie par rapport à l'axe Ox du carré.

Cela explique pourquoi, globalement, la section de Poincaré correspondant à l'instant initial $t_0 = 0$ présente cette même symétrie (l'allure globale de la section de Poincaré $t_0 = 0$ est la même que celle de la section $t_0 = N/2 * T$, où N est le nombre total de périodes pour une trajectoire de la section).

E.3 Protocole de mélange B

Cette fois, le processus est plus simple (E.3) :

- entre $t = 0$ et $t = \frac{T}{2}$ (configuration B1, analogue à A1), 1 est une source, 3 est un puits, 2 et 4 ne fonctionnent pas,
- entre $t = \frac{T}{2}$ et $t = T$, (soit entre $t = -\frac{T}{2}$ et $t = 0$, c'est-à-dire la phase correspondant à la configuration B2, analogue à A2), 2 est une source, 4 est un puits, 1 et 3 ne fonctionnent pas.

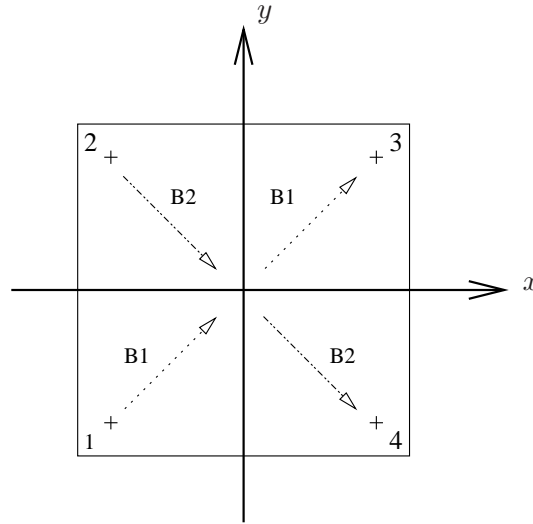


FIG. E.3 – Protocole B.

Considérons tout d'abord la configuration B1 : lorsque l'on change t en $-t$, comme B1 s'intéresse au champ de vitesse entre $t = 0$ et $t = T/2$, on doit considérer le champ de vitesse entre $t = -T/2$ et $t = 0$, soit la configuration B2 puisque le champ de vitesse est périodique de période T . Il est clair que par changement de variable :

$$\begin{aligned} x &\mapsto -x \\ y &\mapsto y, \end{aligned}$$

on change $v_x(\text{B2})$ en $v_x(\text{B1})$ et $v_y(\text{B2})$ en $-v_y(\text{B1})$

$$v_x(-x, y, -t) = v_x(x, y, t) \quad (\text{E.6})$$

$$v_y(-x, y, -t) = -v_y(x, y, t). \quad (\text{E.7})$$

Si l'on considère maintenant les équations des trajectoires

$$\frac{dx}{dt} = v_x(x, y, t) \quad (\text{E.8})$$

$$\frac{dy}{dt} = v_y(x, y, t), \quad (\text{E.9})$$

on remarque qu'elles sont invariantes par la transformation :

$$\begin{aligned} x &\mapsto -x \\ y &\mapsto y \\ t &\mapsto -t. \end{aligned} \quad (\text{E.10})$$

On peut donc en déduire que les sections de Poincaré pour l'instant initial $t_0 = 0$ sont symétriques par rapport à la médiatrice verticale du carré.

Annexe F

Exposant de Lyapunov

F.1 Rappels

Nous avons vu dans le cas de la transformation du boulanger que, dans un régime chaotique, deux particules initialement très proches se séparaient exponentiellement vite au cours du temps. Ainsi, si l'on considère la variable δ comme la distance infinitésimale entre les deux particules au cours du temps, alors cette distance croît exponentiellement aux temps courts. Plus généralement, on définit l'exposant de Lyapunov pour une position initiale $\rightarrow x_0$ fixée par :

$$\lambda = \lim_{\|\vec{\delta}_0\| \rightarrow 0} \lim_{n \rightarrow \infty} \ln \left(\frac{\|f^n(\vec{\delta})\|}{\|\vec{\delta}\|} \right), \quad (\text{F.1})$$

où f est l'application de Poincaré, et $\vec{\delta}(t) = \vec{x}(\vec{x}_0 + \vec{\delta}_0, t) - \vec{x}(\vec{x}_0, t)$ ¹. λ dépend a priori du point initial choisi, mais on peut montrer qu'il ne dépend pas de la direction du vecteur initial $\vec{\delta}_0$. Cependant, cet exposant est très intéressant, car s'il converge vers un réel positif, alors on peut dire que le système est bien chaotique.

F.2 Calcul pratique de l'exposant de Lyapunov

Soient deux particules M_1 et M_2 initialement très proches (séparées d'une distance δ). On pose $\vec{\delta} = \overrightarrow{M_1 M_2}$. On calcule, au bout d'une période (grâce à l'application de Poincaré), la distance entre ces deux particules. On a :

$$\|\vec{\delta}(t = T)\| = \|\overrightarrow{M_1 M_2}(t = T)\| = \|f(\vec{\delta})\| \quad (\text{F.2})$$

où T est la période de l'application de Poincaré et n un entier naturel.

Pour rester dans la limite $\|\vec{\delta}\| \rightarrow 0$, la position de la seconde particule est, à chaque itération de l'application de Poincaré f , ramenée à une distance telle que $\|\overrightarrow{M_1 M_2}\| = \delta$.

¹On utilise ici la notation lagrangienne : $\vec{x}(\vec{x}_0, t)$ désigne la position à l'instant t de la particule qui se trouvait en \vec{x}_0 à $t = 0$

Puis on réalise la sommation des logarithmes des rapports $\frac{\|f^n(\vec{\delta})\|}{\|f^{n-1}(\vec{\delta})\|}$:

$$\Sigma = \ln \left(\frac{\|f^n(\vec{\delta})\|}{\|\vec{\delta}\|} \right) \quad (\text{F.3})$$

$$= \ln \left(\frac{\|f^n(\vec{\delta})\|}{\|f^{n-1}(\vec{\delta})\|} \times \frac{\|f^{n-1}(\vec{\delta})\|}{\|f^{n-2}(\vec{\delta})\|} \times \dots \times \frac{\|f(\vec{\delta})\|}{\|\vec{\delta}\|} \right) \quad (\text{F.4})$$

$$= \ln \left(\frac{\|f^n(\vec{\delta})\|}{\|f^{n-1}(\vec{\delta})\|} \right) + \ln \left(\frac{\|f^{n-1}(\vec{\delta})\|}{\|f^{n-2}(\vec{\delta})\|} \right) + \dots + \ln \left(\frac{\|f(\vec{\delta})\|}{\|\vec{\delta}\|} \right) \quad (\text{F.5})$$

On obtient finalement le coefficient λ au stade n par l'opération :

$$\lambda(n) = \frac{1}{n} \times \Sigma \quad (\text{F.6})$$

Annexe G

Modèle numérique de réinjection 3D

Le but de cette annexe est de trouver une méthode de réinjection aléatoire dans la direction Oz qui soit cohérente avec l'écoulement de type Hele-Shaw de la cavité et en particulier compatible avec une réinjection plus probable au centre que sur les bords, en accord avec le profil des vitesses parabolique.

G.1 Position du problème

G.1.1 Réinjection parabolique : problème déterministe

Nous savons bien que, dans le cas des écoulements plans comme pour les écoulements de Hele-Shaw, le champ de vitesses est bidimensionnel ($v_z = 0$) et v_x et v_y ont chacun une dépendance en z de type *parabolique*. Dans le cadre de cette hypothèse forte, si l'on souhaite que l'écoulement soit également parabolique juste au niveau des trous de réinjection (modèle), le champ de vitesse au dessus de ceux-ci doit être du type :

$$v_i(z) = \alpha \times z \times (h - z) \quad i = x \quad \text{ou} \quad y \quad (\text{G.1})$$

avec α une constante dépendant du débit et des paramètres du système.

G.1.2 Réinjection parabolique : problème probabiliste

Nous voudrions donc que la réinjection au niveau des trous soit aléatoire de sorte que les particules présentes dans les tuyaux puissent changer facilement de plan z au moment de la réinjection. Ainsi, dans le cadre probabiliste, c'est la *densité de probabilité* du tirage aléatoire qui doit être parabolique. Notons $g(z)$ cette densité de probabilité. La fonction $g(z) dz$ représente alors la probabilité que le tirage d'une variable aléatoire soit comprise entre z et $z + dz$. Nous voulons donc :

$$g(z) = \beta \times z \times (h - z) \quad (\text{G.2})$$

Si l'on pose :

$$dP(z) = g(z) dz \quad (\text{G.3})$$

alors :

$$P(z) = P(0) + \int_0^z dP(z) = P(0) + \int_0^z g(z) dz \quad (\text{G.4})$$

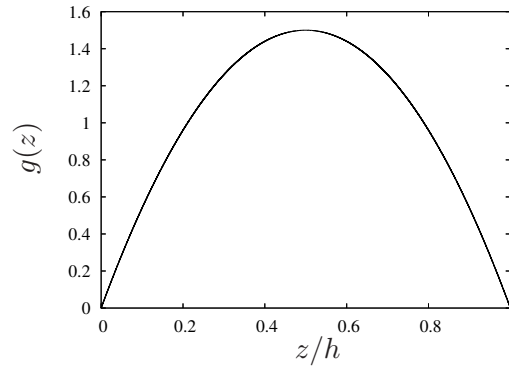


FIG. G.1 – Fonction densité de probabilité $g(z)$ que l'on souhaite obtenir à partir d'un bruit blanc plat.

$P(z)$ représente la probabilité que la variable aléatoire tirée soit comprise entre 0 et z . On a donc $P(0) = 0$. Pour connaître la constante β , on normalise la probabilité $P(z)$ en écrivant :

$$P(h) = 1 = \int_0^h g(z) dz = \int_0^h \beta \times z \times (h - z) dz \quad (\text{G.5})$$

d'où $\beta = 6/h^3$, et donc :

$$P(z) = 6 \times \left(\frac{1}{2} \times \frac{z^2}{h^2} - \frac{1}{3} \times \frac{z^3}{h^3} \right) = 3 \frac{z^2}{h^2} - 2 \frac{z^3}{h^3} \quad (\text{G.6})$$

Une représentation de la fonction $P(z)$ est donnée par la figure G.2.

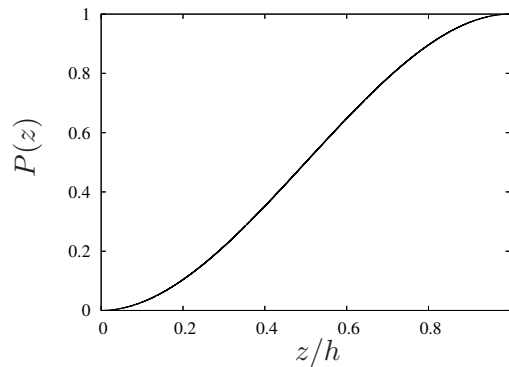


FIG. G.2 – Probabilité $P(z)$ de tirer la variable aléatoire entre 0 et z .

G.1.3 Bruit blanc

Le générateur de nombres aléatoires, fourni par dans la majorité des logiciels de programmation, est un bruit blanc plat d'amplitude $[0 : 1]$. La variable aléatoire est donc uniformément

répartie sur $[0 : 1]$. Sa densité de probabilité $j(X)$ est donc constante et vaut 1 sur tout l'ensemble $[0 : 1]$:

$$j(X) = 1 \quad X \in [0 : 1] \quad (\text{G.7})$$

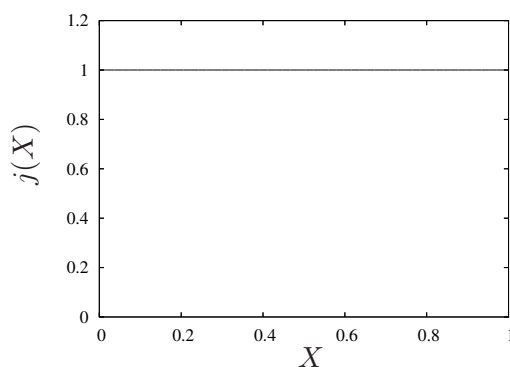


FIG. G.3 – Densité de probabilité $d(X)$ du bruit blanc plat.

La probabilité $dP'(X)$ de trouver la variable aléatoire X entre X et $X + dX$ vaut $j(X) dX$ et on a :

$$P'(X) = P'(0) + \int_0^X j(X) dX = X \quad (\text{G.8})$$

où $P'(X)$ est la probabilité de trouver la variable aléatoire issue du bruit blanc plat entre 0 et X .

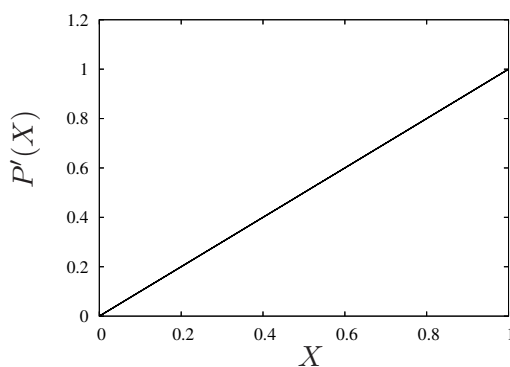


FIG. G.4 – Probabilité $P'(X)$ d'avoir la variable aléatoire entre 0 et X pour un bruit blanc plat.

G.1.4 Passage d'un bruit blanc à une variable aléatoire parabolique

Il reste maintenant à trouver le changement de variable qui transforme la variable aléatoire X de densité de probabilité j en variable aléatoire z de densité de probabilité g . Soit f cette fonction. Par définition, f est bijective et on a donc :

$$X = f(z) \quad \text{ou} \quad z = f^{-1}(X) \quad (\text{G.9})$$

Or, la probabilité de trouver la variable aléatoire X entre $X + dX$ est la même, par transformation f , que de trouver la variable aléatoire z entre $z + dz$. On a donc :

$$dP(z) = dP'(X) \quad (\text{G.10})$$

$$g(z)dz = j(X)dX \quad (\text{G.11})$$

$$g(z)dz = j(f(z))dX \quad (\text{G.12})$$

$$g(z)dz = j(f(z))\frac{dX}{dz}dz \quad (\text{G.13})$$

donc :

$$g(z) = j(f(z))f'(z) \quad (\text{G.14})$$

or $j(X) = 1$ pour tout X donc :

$$g(z) = f'(z) \quad (\text{G.15})$$

$$f(z) = \int_0^z g(z)dz = P(z) - P(0) = P(z) \quad (\text{G.16})$$

donc la fonction de passage recherchée est f^{-1} tel que :

$$\boxed{f^{-1}(X) = z = P^{-1}(X)} \quad (\text{G.17})$$

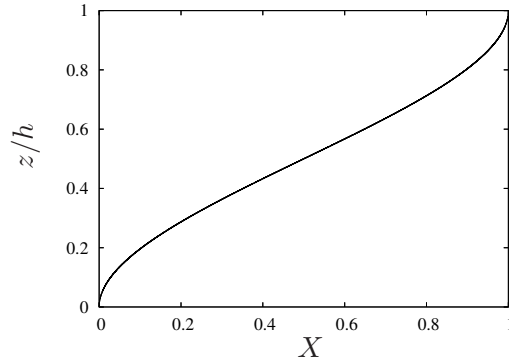


FIG. G.5 – Fonction de passage.

G.1.5 Test

On vérifie (figure G.6) que les 10^6 variables aléatoires, issues d'un bruit blanc plat et après application de la fonction de passage G.17, se répartissent bien selon la loi parabolique recherchée G.1.2.

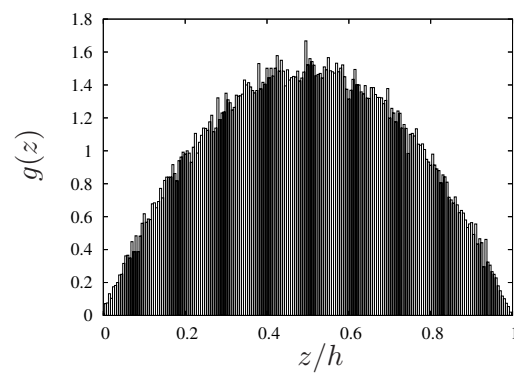


FIG. G.6 – Histogramme de répartition d'une variable aléatoire de distribution plate après transformation par G.17.

Annexe H

Modèle numérique de diffusion moléculaire

Introduction Nous montrons ici un modèle de diffusion moléculaire souvent utilisé en simulation numérique. Nous en avons besoin dans cette thèse car, sans elle et du fait que l'écoulement soit de type Hele-Shaw (donc quasi bidimensionnel dans le plan xOy), les particules ne peuvent pas changer de plan selon z (sauf lors du processus de réinjection par les trous, voir annexe G). Or, expérimentalement, les particules peuvent changer de plan au sein de la chambre, ce qui est rendu possible uniquement par le processus de diffusion. Ainsi, comme il est important que ces cibles puissent bouger selon z afin d'obtenir la possibilité de s'hybrider avec les sondes de la puce, il devenait nécessaire d'introduire la diffusion moléculaire dans notre modèle numérique "faux 3D".

H.1 Equation de diffusion et solution

H.1.1 Forme d'une équation de diffusion

De manière générale, on appelle équation de diffusion d'une grandeur vectorielle $\mathbf{u}(\mathbf{r},t)$ les équations de la forme :

$$\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} - D\Delta \mathbf{u} = f \quad (D > 0) \quad (\text{H.1})$$

où f est un terme source. Une équation de diffusion est donc une équation aux dérivées partielles de type *parabolique*.

L'équation H.1 se ramène simplement, pour une grandeur scalaire u et dans dans le cas d'un problème 1D sans source, à :

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \quad (D > 0) \quad (\text{H.2})$$

Les équations de diffusions se rencontrent très souvent dans presque tous les domaines de la Physique. On citera, sans vouloir être exhaustif, les cas :

- $u = T$ (température)
- $u = c$ (concentration moléculaire)
- $\mathbf{u} = \mathbf{E}$ (champ électrique)

- $\mathbf{u} = \mathbf{B}$ (champ magnétique)
- $u = V$ (potentiel électrostatique)
- $u = \rho$ (densité de charges)
- $\mathbf{u} = \mathbf{v}$ (vitesse en Mécanique des Fluides)
- ...

H.1.2 Solution de l'équation de diffusion 1D

Dans le cas d'une équation de diffusion 1D, de condition initiale $u(x, 0) = \phi(x)$ où ϕ est continue et bornée, la solution générale est :

$$u(x, t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \phi(y) \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp^{-\frac{(x-y)^2}{4Dt}} dy \quad (\text{H.3})$$

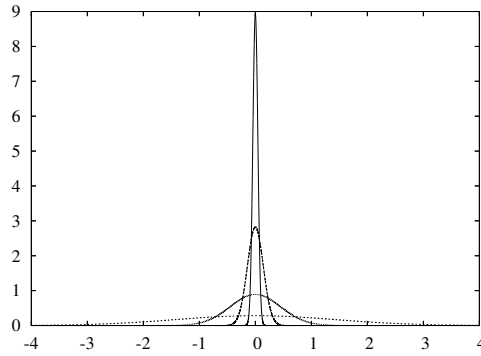


FIG. H.1 – Réponse d'un système diffusif à une impulsion de Dirac $\delta(x)$ ($D = 1 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$). Temps $t = 0.001 \text{ s}$, $t = 0.01 \text{ s}$, $t = 0.1 \text{ s}$ et $t = 1 \text{ s}$.

H.2 Advection-diffusion du point de vue lagrangien

H.2.1 Modélisation de la diffusion moléculaire

Pour une substance qui diffuse (comme l'ADN dans l'eau), la cinétique de chacune de ses 'particules' peut être donnée par l'équation généralisée de Langevin [123] :

$$\frac{d\mathbf{x}}{dt} = \mathbf{V}(\mathbf{x}, t) + \zeta(t) \quad (\text{H.4})$$

où :

- $\mathbf{x}(t)$ est la position de la particule à l'instant t .
- $\mathbf{V}(\mathbf{x}, t)$ est le champ de vitesse d'advection déterministe.
- $\zeta(t)$ est le mouvement Brownien qui donne la diffusion.

$\zeta(t)$ représente la vitesse d'une molécule que l'on suit dans son mouvement (vitesse lagrangienne) : dans le cadre du mouvement Brownien, $\zeta(t)$ est une variable vectorielle aléatoire. Les molécules diffusantes étant en équilibre thermodynamique avec celles du milieu, leur énergie cinétique moyenne (que l'on peut relier à la température) est donc constante. On peut donc écrire

que $\langle \zeta^2 \rangle = \text{constante}$. On peut supposer également que la variable aléatoire $\zeta(t)$ est statistiquement stationnaire, c'est à dire que ses statistiques ne dépendent pas du temps. De plus, $\zeta(t)$ est statistiquement isotrope puisqu'aucune direction n'est privilégiée. Les particules sont donc indépendantes et complètement décorréllées dans le temps. La condition sur ζ peut alors être donnée par la relation :

$$\langle \zeta_i(t)\zeta_j(t') \rangle = 2D\delta_{ij}\delta(t-t') \quad (\text{H.5})$$

avec ζ un processus *Gaussien*, δ_{ij} le symbole de Kronecker et $\delta(t)$ est la distribution de Dirac. Le symbole $\langle . \rangle$ signifie que l'on prend la moyenne sur l'ensemble des réalisations.

Dans le cas d'un mouvement diffusif selon l'une des directions (z par exemple), l'équation H.5 devient :

$$\langle \zeta_z(t)\zeta_z(t') \rangle = 2D\delta(t-t') \quad (\text{H.6})$$

Si l'on calcule la variance de z , il vient :

$$\langle z^2 \rangle = \left\langle \int_0^t \zeta(t) dt \int_0^{t'} \zeta(t') dt' \right\rangle \quad (\text{H.7})$$

$$= \left\langle \int_0^t \int_0^{t'} \zeta(t)\zeta(t') dt dt' \right\rangle \quad (\text{H.8})$$

$$= \int_0^t \int_0^{t'} \langle \zeta(t)\zeta(t') \rangle dt dt' \quad (\text{H.9})$$

$$= \int_0^t \int_0^{t'} 2D\delta(t-t') dt dt' \quad (\text{H.10})$$

$$= 2D \int_0^t dt \quad (\text{H.11})$$

$$= 2Dt \quad (\text{H.12})$$

Ce résultat est conforme à l'expérience (loi de Fick). L'équation H.5 est donc en accord les observations expérimentales.

H.2.2 Création d'une variable aléatoire Gaussienne

Les langages de programmation (Fortran, C, Pascal, ...) ne comportent, généralement, qu'un générateur de bruit blanc plat. Quitte à rajouter des bibliothèques de fonctions (NAG, ...), on peut obtenir d'autres générateurs de nombres aléatoires, en particulier un générateur de variables aléatoires gaussien. Pour limiter les ressources nécessaires à mon programme, j'ai donc créé mon propre générateur gaussien grâce au *théorème de la limite centrale*.

Théorème de limite centrale

Théorème H.2.1. *Soit X_1, X_2, \dots, X_n un ensemble de variables aléatoires définies sur le même espace de probabilité, suivant la même loi \mathcal{D} et indépendantes. Supposons que l'espérance μ et l'écart-type Γ de \mathcal{D} existent et soient finis ($\Gamma \neq 0$). Considérons la somme $S_n = X_1 + X_2 + \dots + X_n$. Alors l'espérance de S_n est $n\mu$ et son écart type vaut $\Gamma n^{\frac{1}{2}}$. De plus, la loi S_n tend vers la loi normale $\mathcal{N}(n\mu, \Gamma^2 n)$ quand $n \rightarrow \infty$.*

La distribution 'plate' (centrée en 0 et d'extension $[-0.5, 0.5]$) a une moyenne nulle et un écart type de $\frac{1}{\sqrt{12}}$. En tirant n fois des X_i selon un bruit blanc plat, on obtient un distribution gaussienne de variables aléatoires S_n d'écart type $\frac{n}{12}$ et de moyenne nulle également.

De façon à avoir la relation H.5, on normalise la variable S_n et on la multiplie par $\sqrt{2D}$.

En définissant S'_n par :

$$S'_n = S_n \times \sqrt{\frac{12}{n}} \times \sqrt{2D} \quad (\text{H.13})$$

alors S'_n est une variable aléatoire gaussienne de moyenne nulle et de variance $\sqrt{2D}$.

Par H.4, il vient finalement :

$$z(t + dt) = z(t) + \frac{S'_n}{\sqrt{dt}} \times dt \quad (\text{H.14})$$

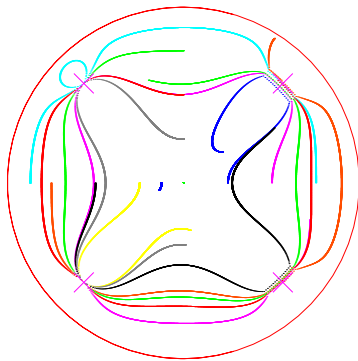
$$= z(t) + S'_n \sqrt{dt} \quad (\text{H.15})$$

Annexe I

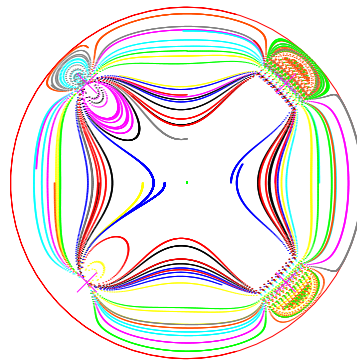
Catalogue des sections de Poincaré

I.1 Sections de Poincaré dans le cercle

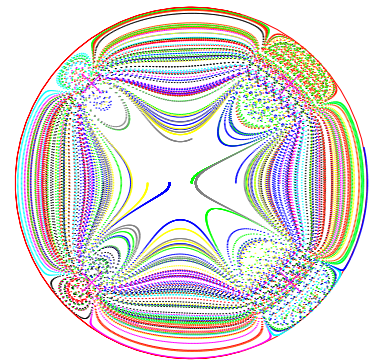
I.1.1 Protocole A



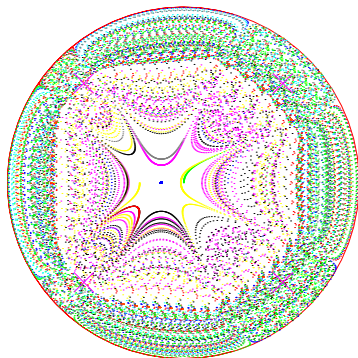
a)



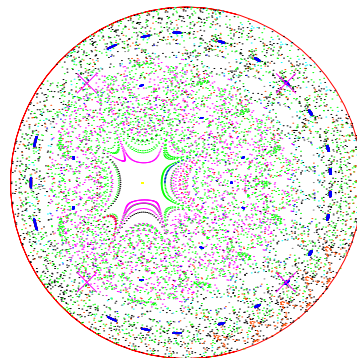
b)



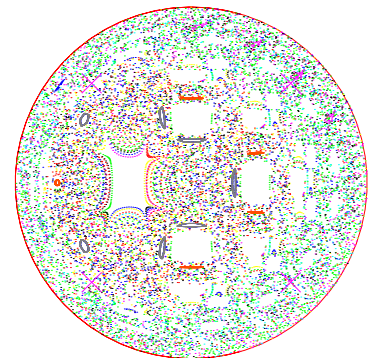
c)



d)



e)



f)

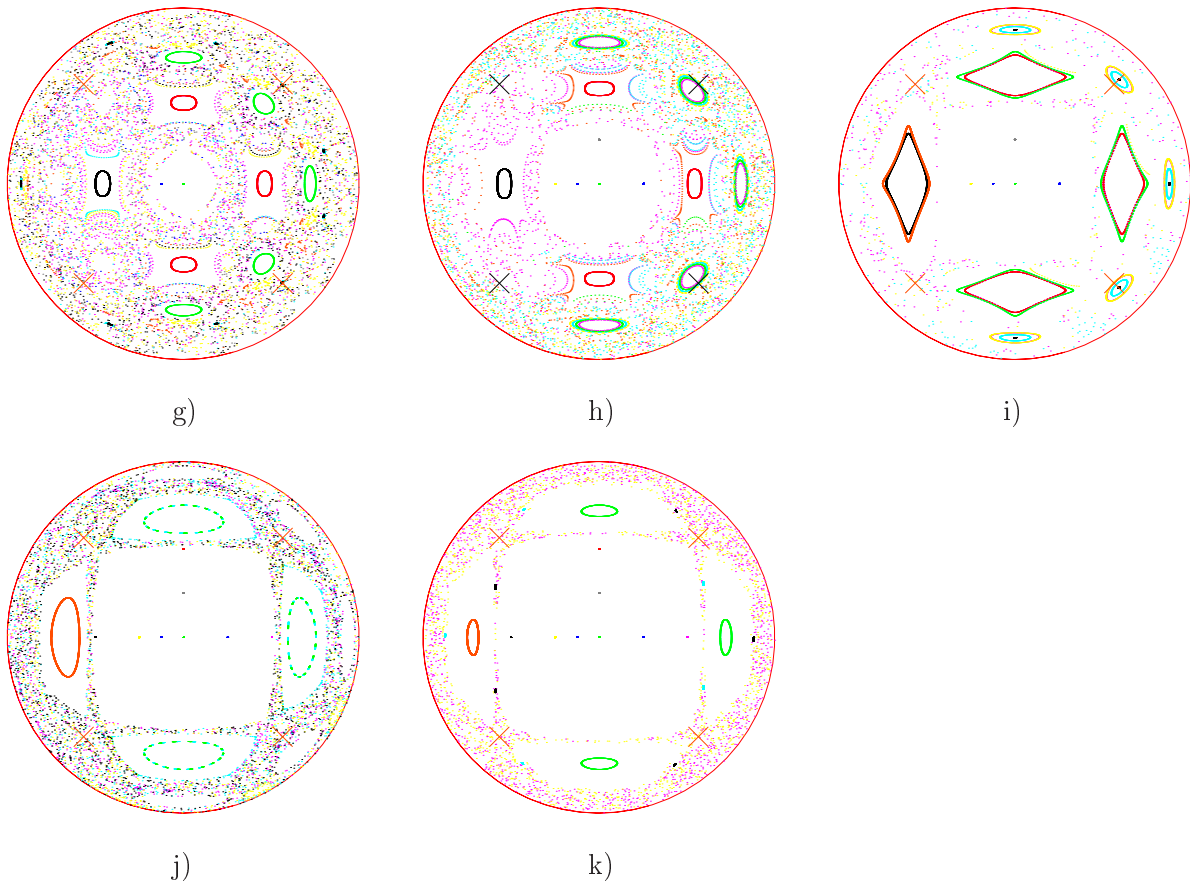
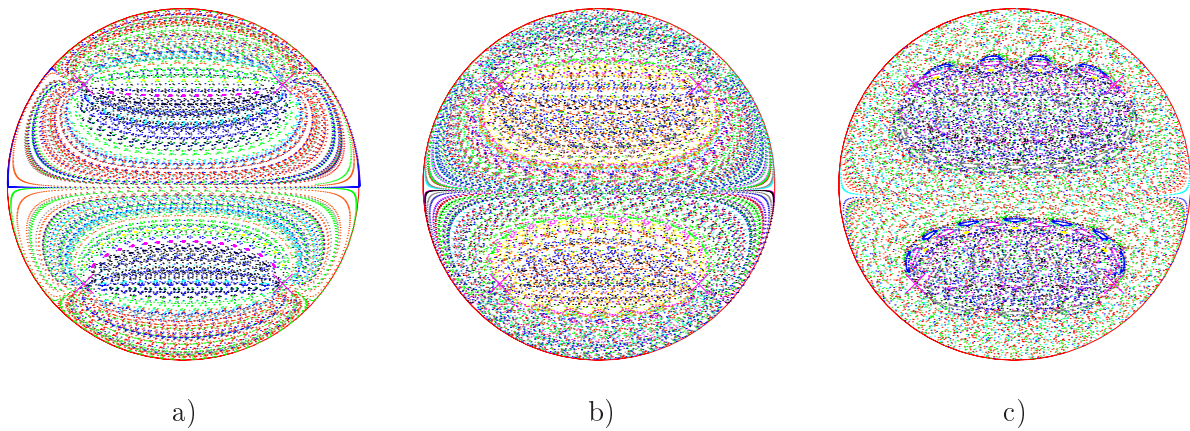


FIG. I.1 – Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s.

I.1.2 Protocole B



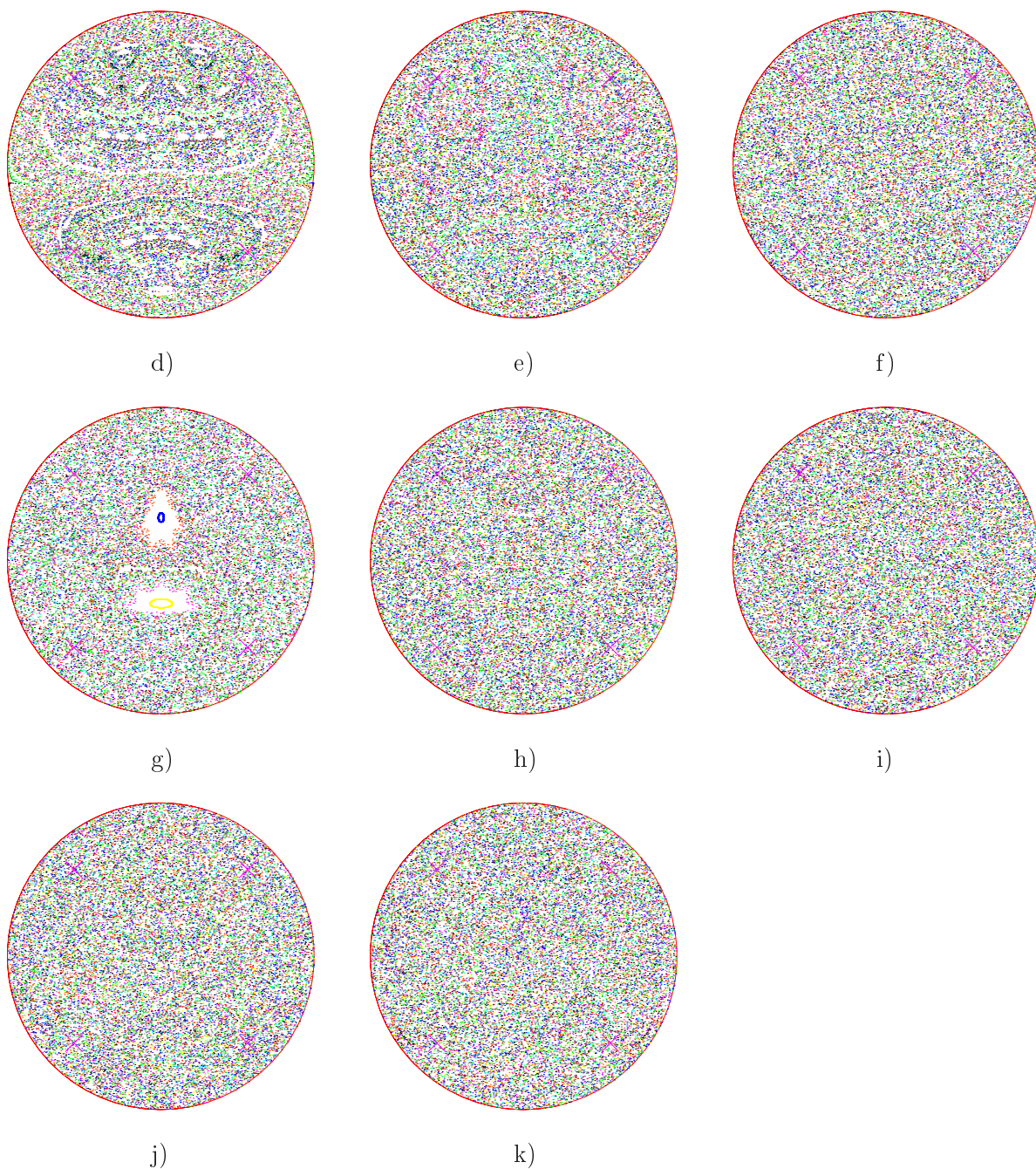
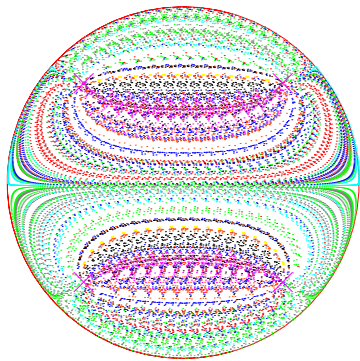
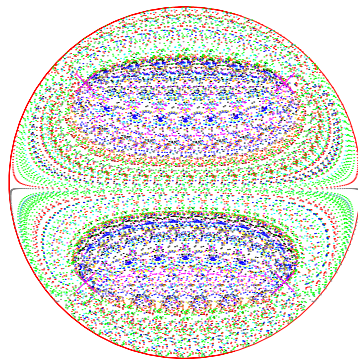


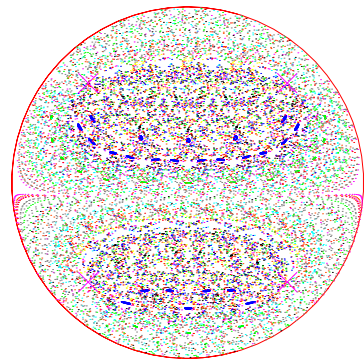
FIG. I.2 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$ et : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s.



a)



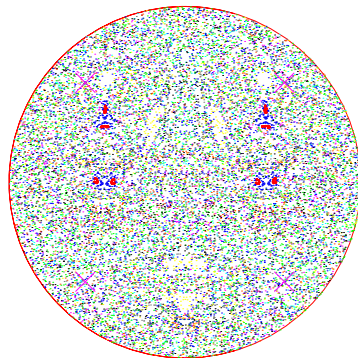
b)



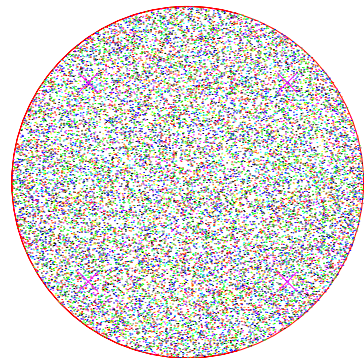
c)



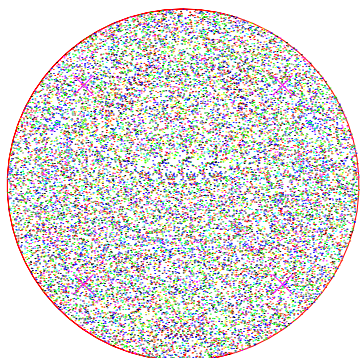
d)



e)



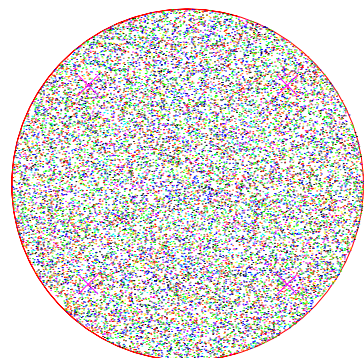
f)



g)



h)



i)

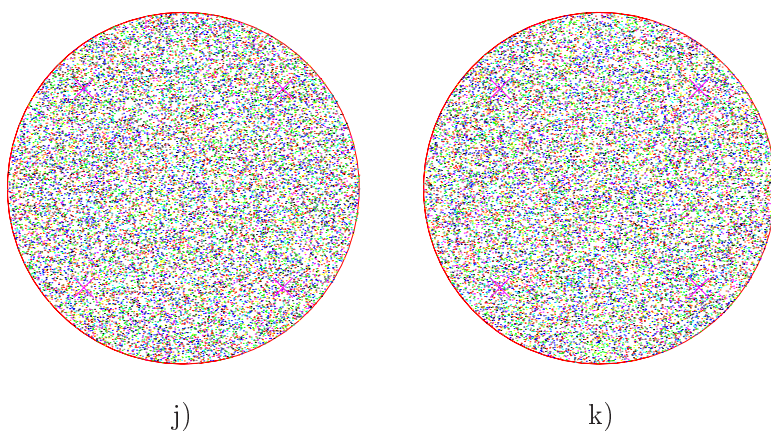


FIG. I.3 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$ et : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s.

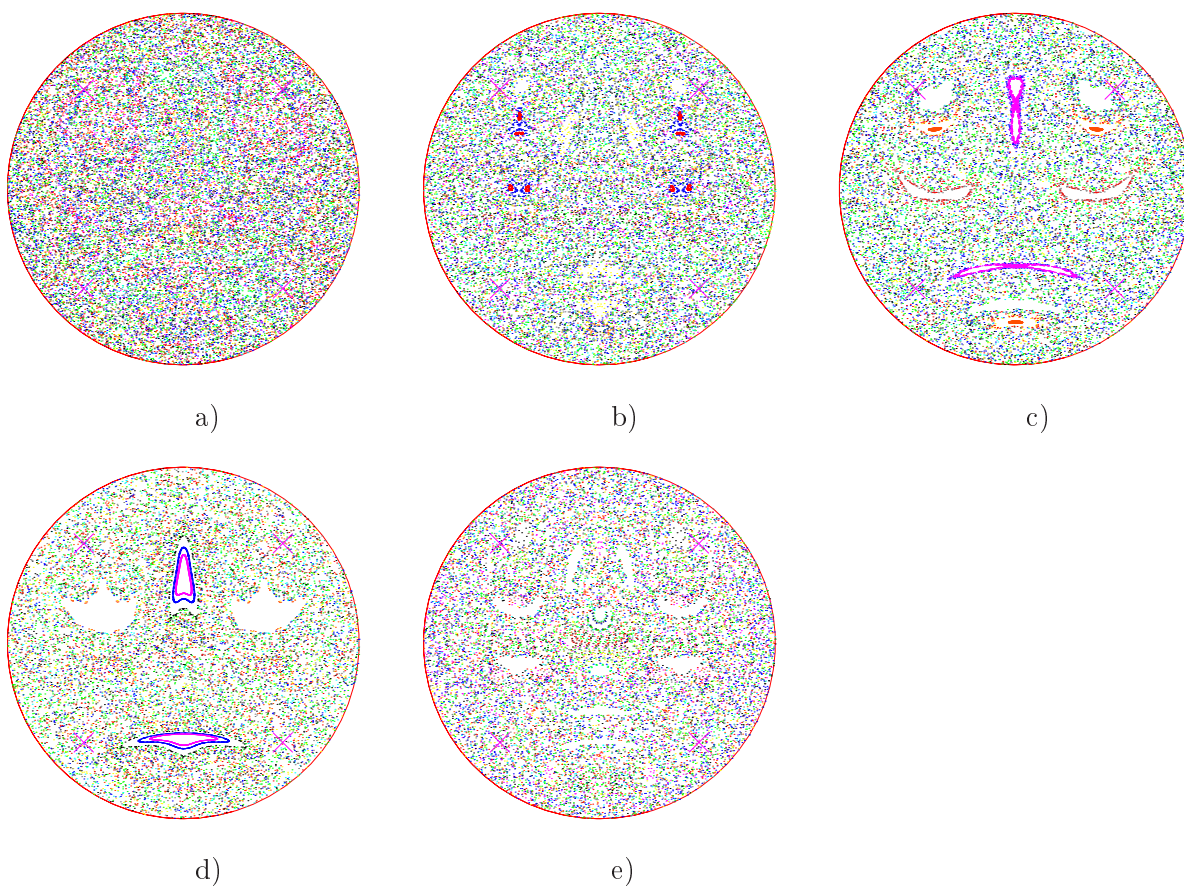
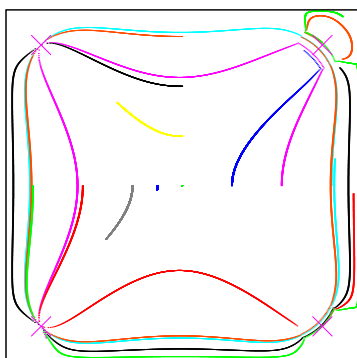


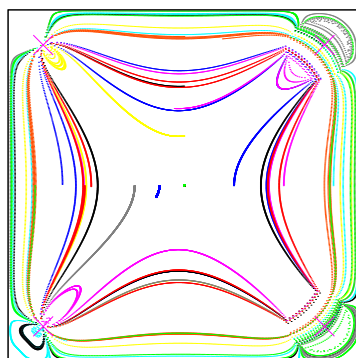
FIG. I.4 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $T = 4$ s et : a) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$; b) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$; c) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.3$; d) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.4$; e) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.5$.

I.2 Sections de Poincaré dans le carré

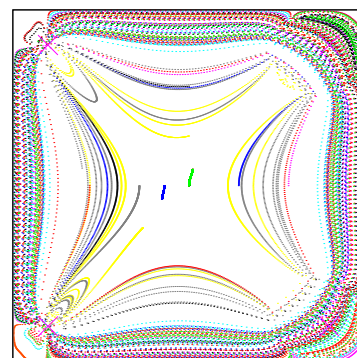
I.2.1 Protocole A



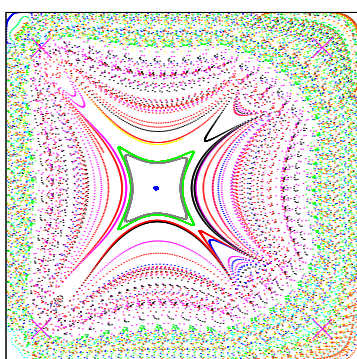
a)



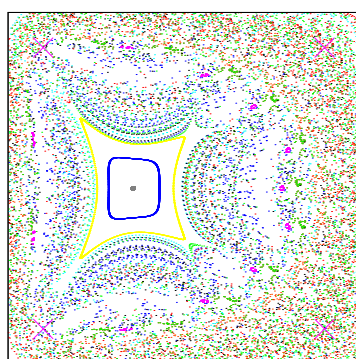
b)



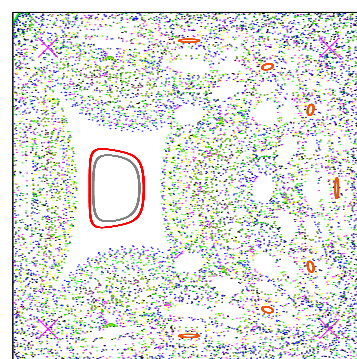
c)



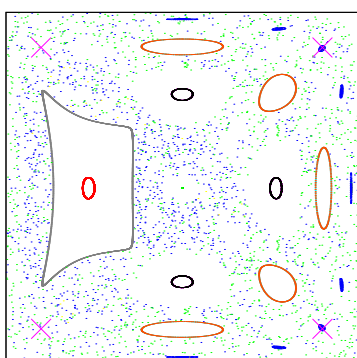
d)



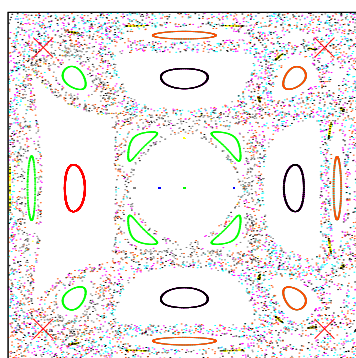
e)



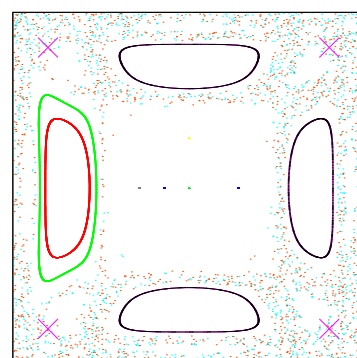
f)



g)



h)



i)

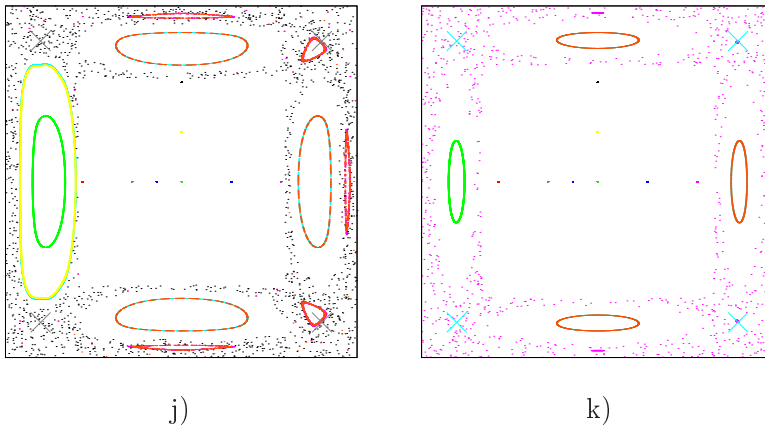
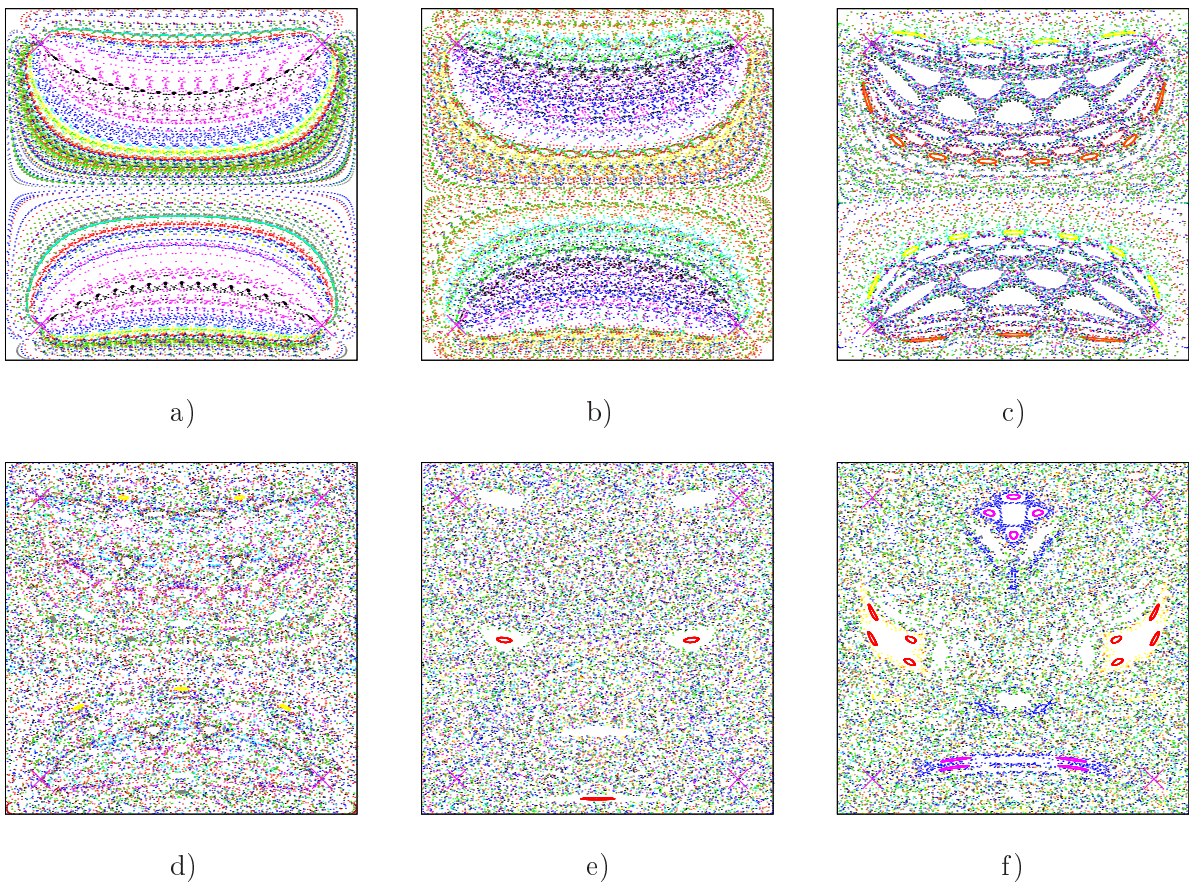


FIG. I.5 – Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s.

I.2.2 Protocole B



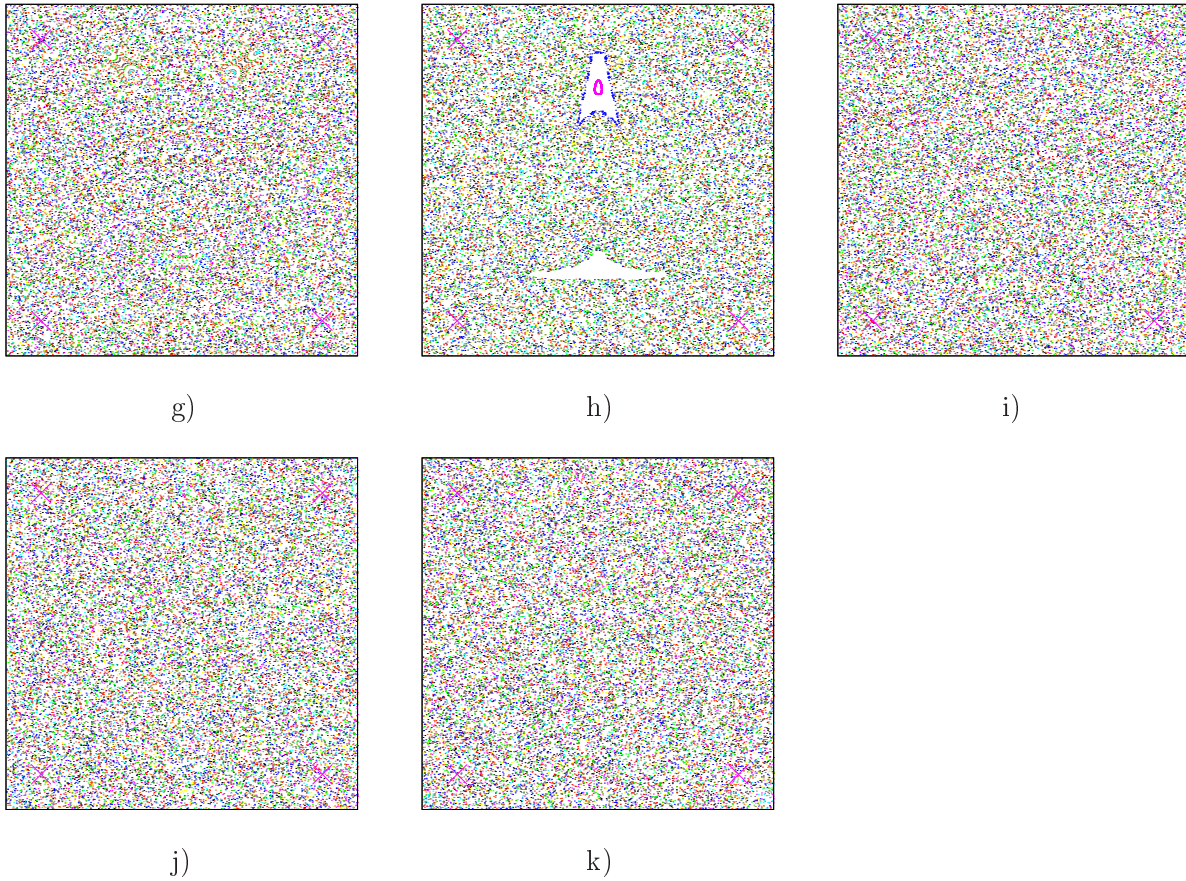


FIG. I.6 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$ et : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s.

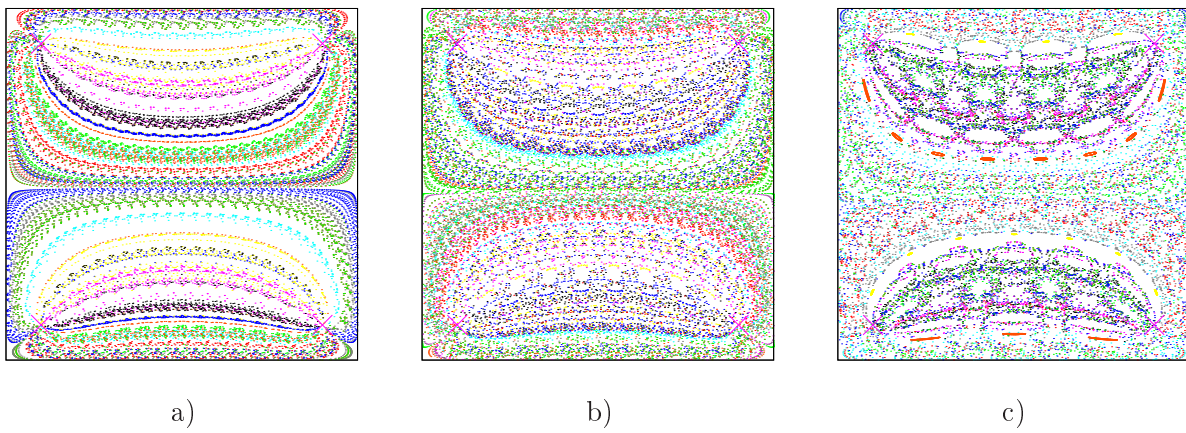




FIG. I.7 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$ et : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s.

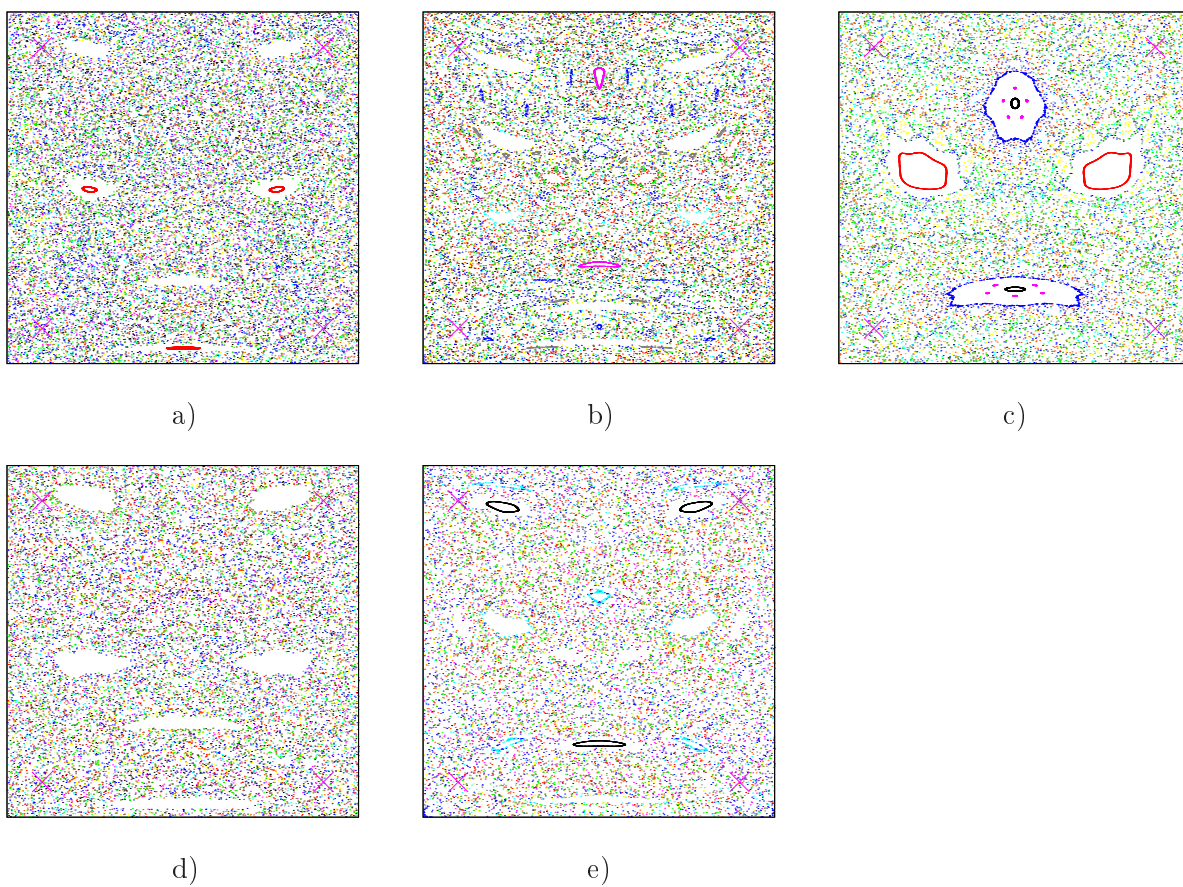
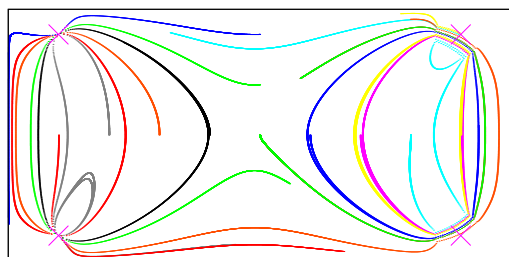


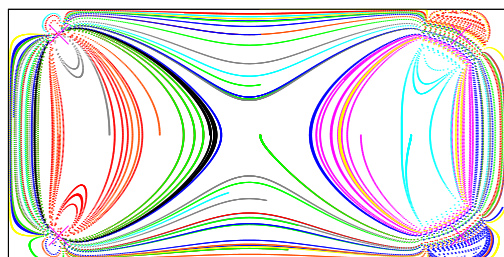
FIG. I.8 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $T = 4$ s et : a) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$; b) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$; c) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.3$; d) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.4$; e) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.5$.

I.3 Sections de Poincaré dans le rectangle 2 :1

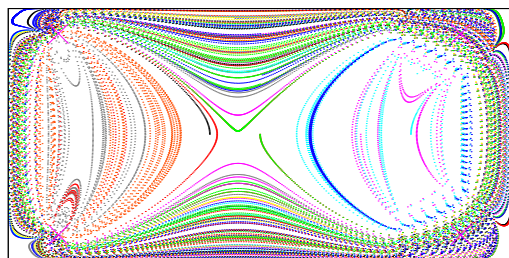
I.3.1 Protocole A



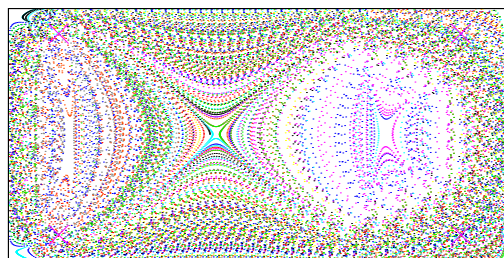
a)



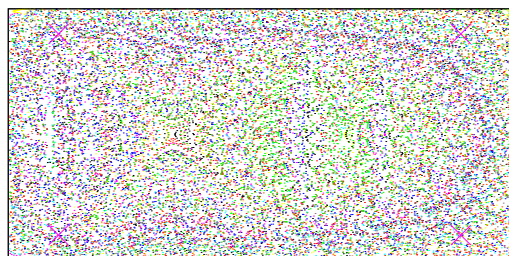
b)



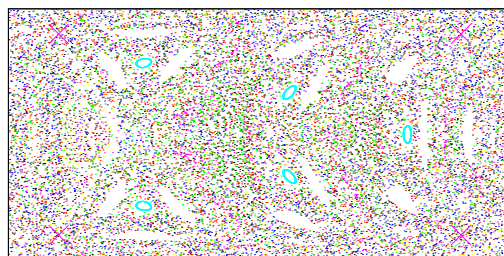
c)



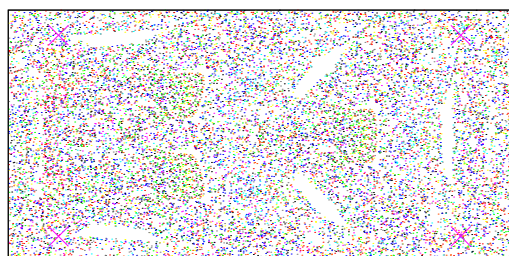
d)



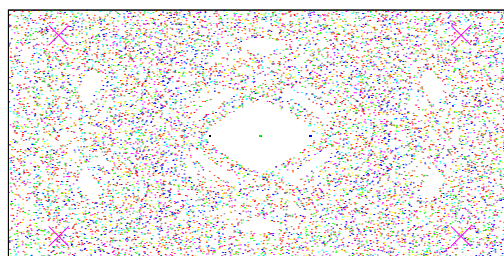
e)



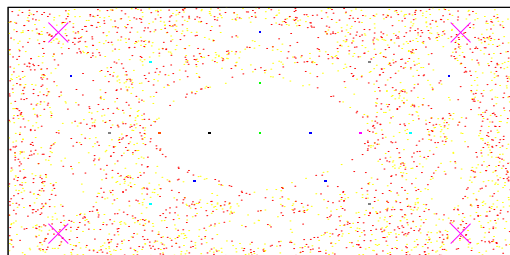
f)



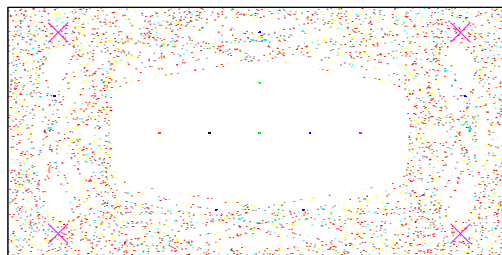
g)



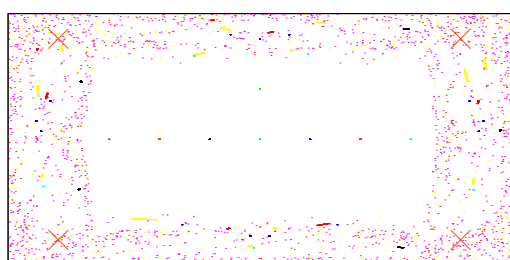
h)



i)



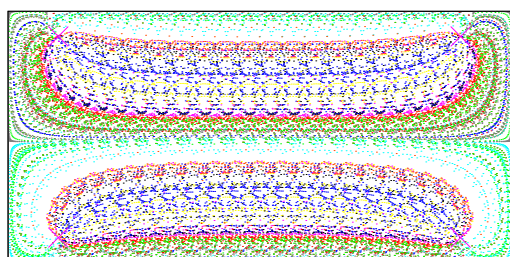
j)



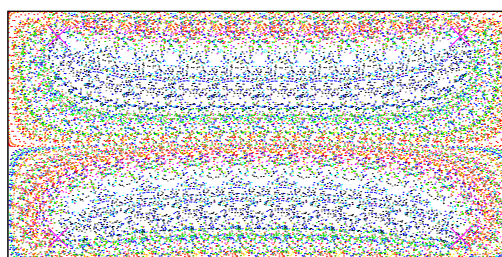
k)

FIG. I.9 – Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; j) $T = 16$ s.

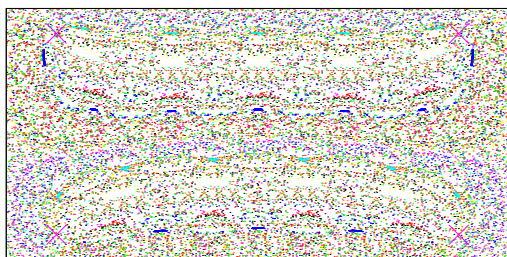
I.3.2 Protocole B



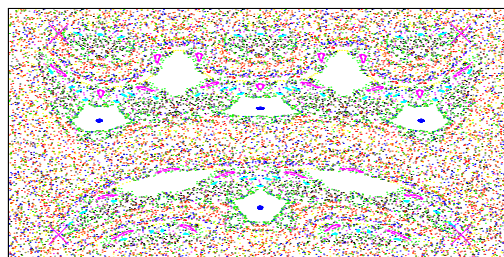
a)



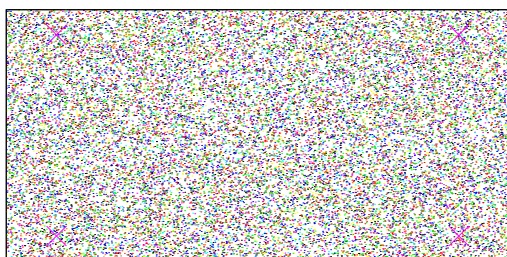
b)



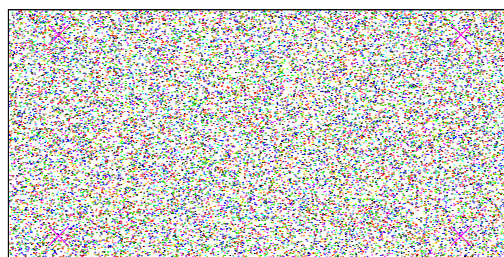
c)



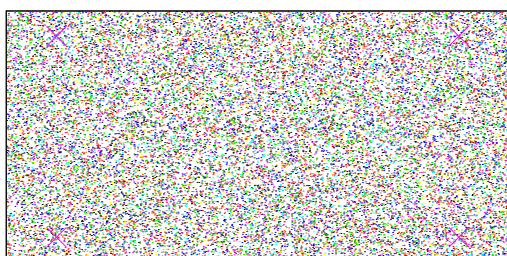
d)



e)



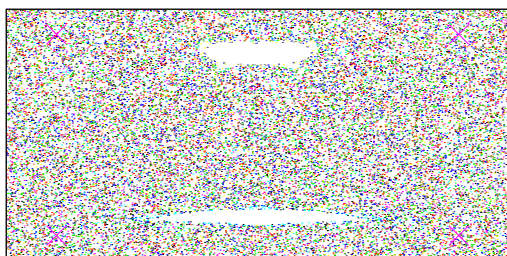
f)



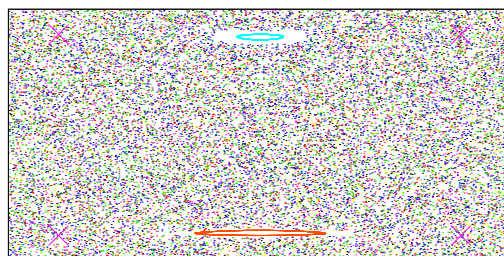
g)



h)



i)

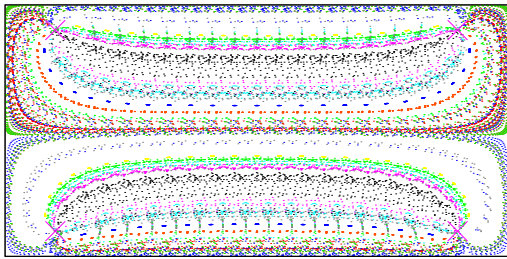


j)

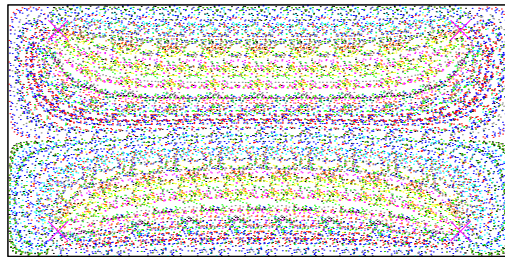


k)

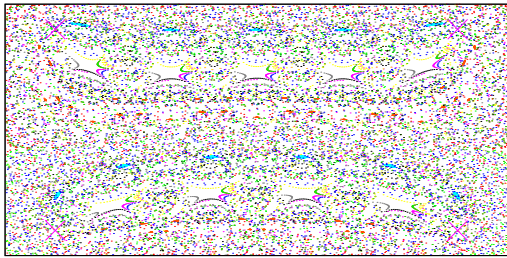
FIG. I.10 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$ et : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s.



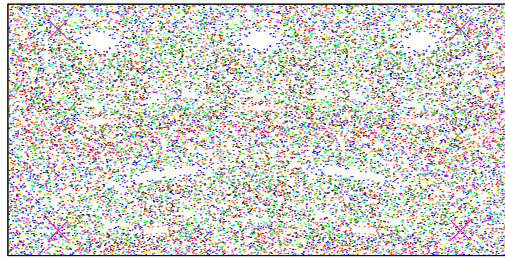
a)



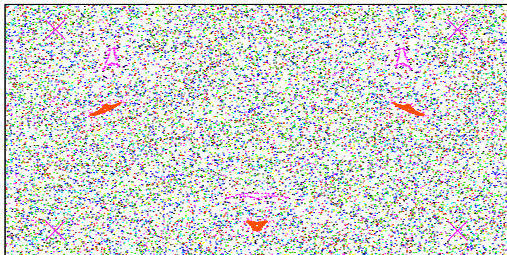
b)



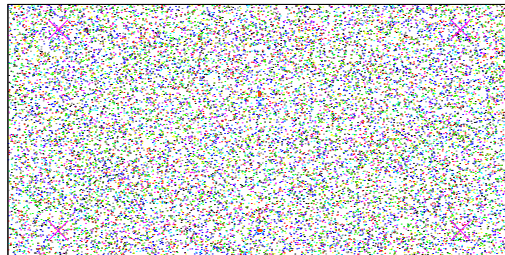
c)



d)



e)



f)

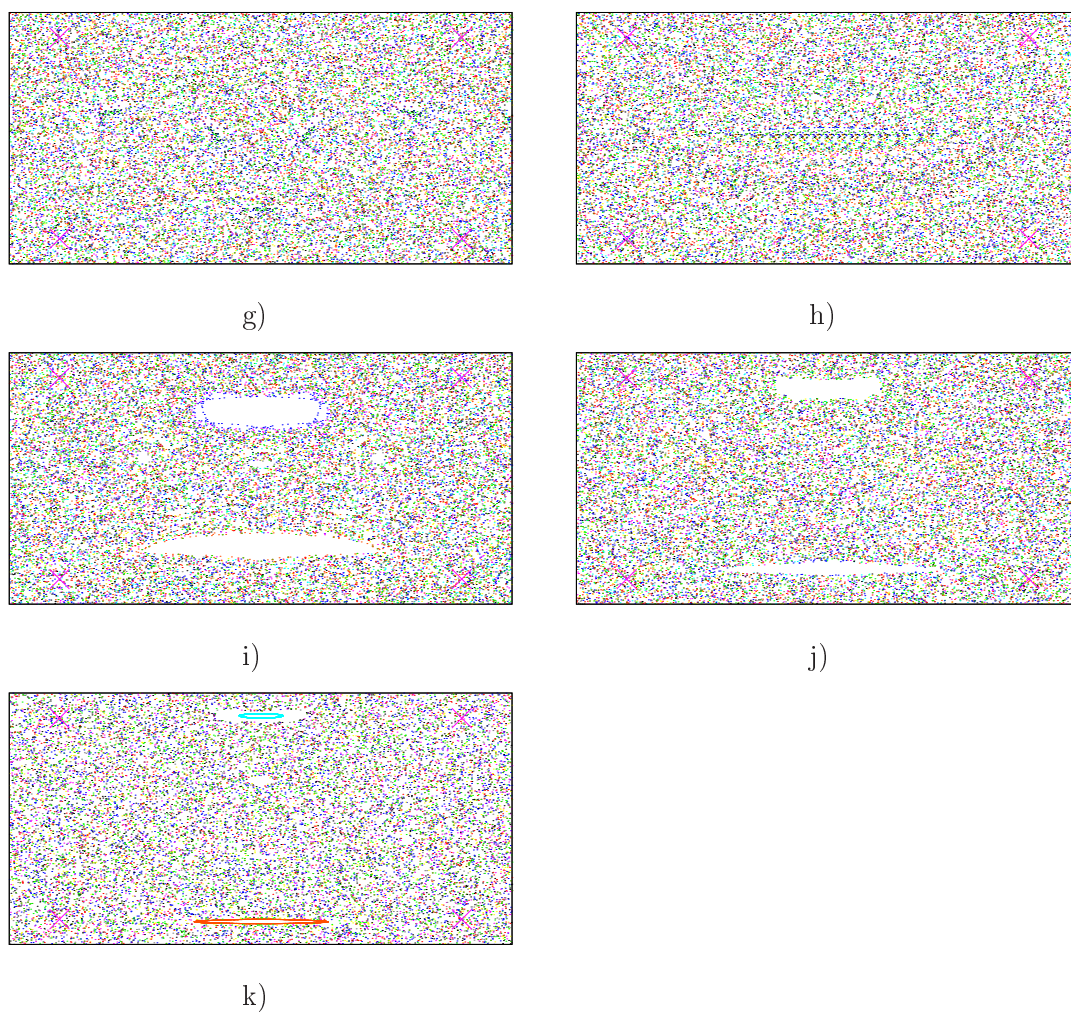
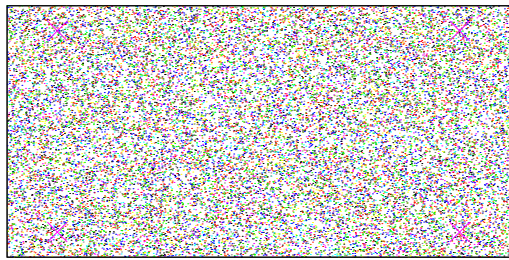
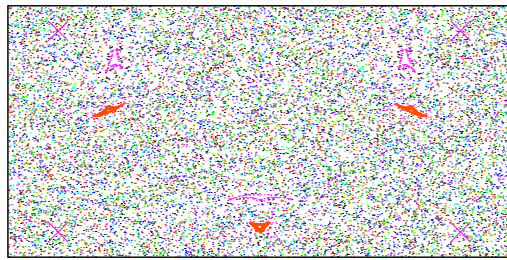


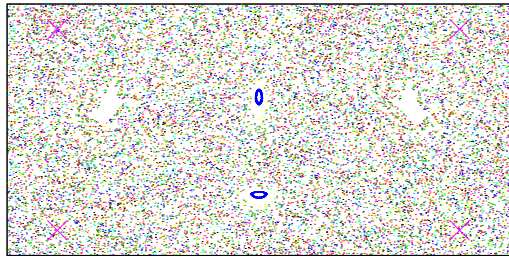
FIG. I.11 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$ et : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s.



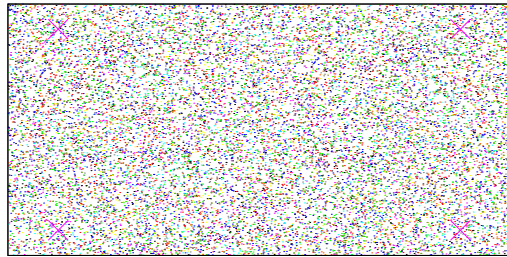
g)



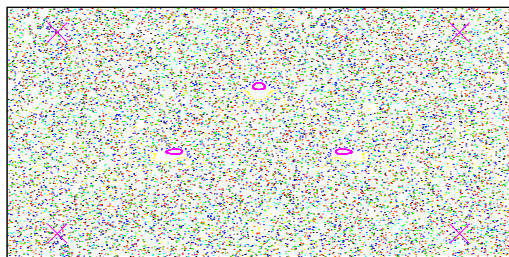
h)



i)



j)

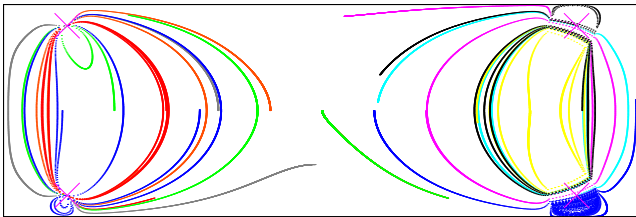


k)

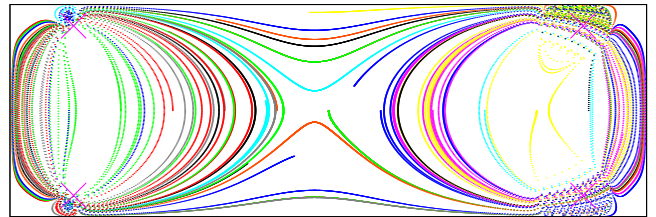
FIG. I.12 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $T = 4$ s et : a) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$; b) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$; c) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.3$; d) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.4$; e) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.5$.

I.4 Sections de Poincaré dans le rectangle 3 :1

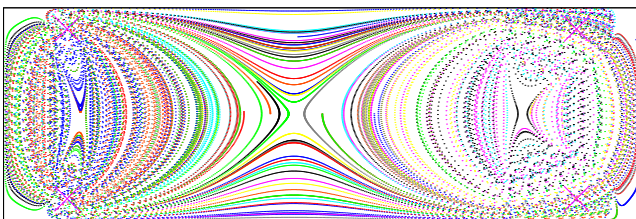
I.4.1 Protocole A



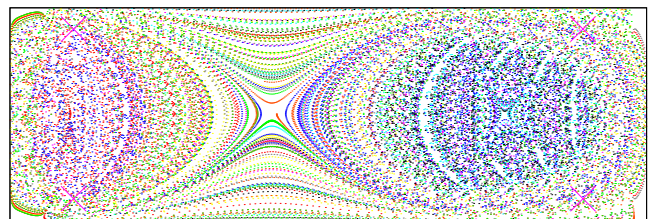
a)



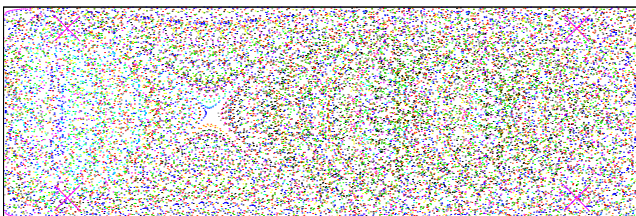
b)



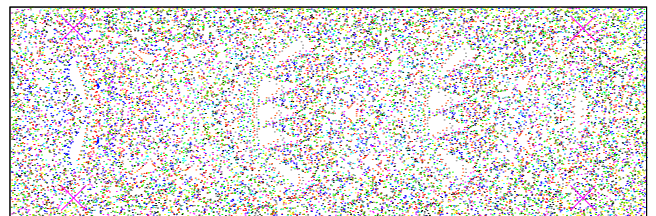
c)



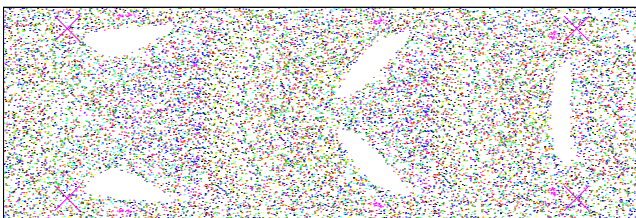
d)



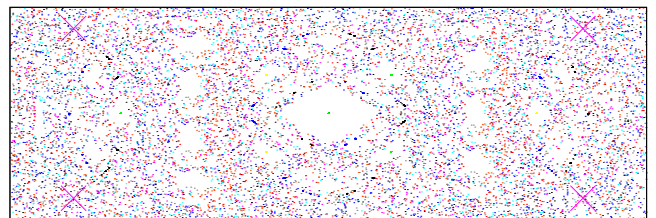
e)



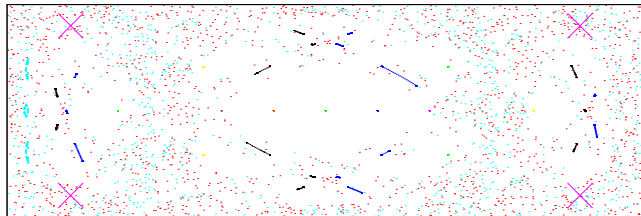
f)



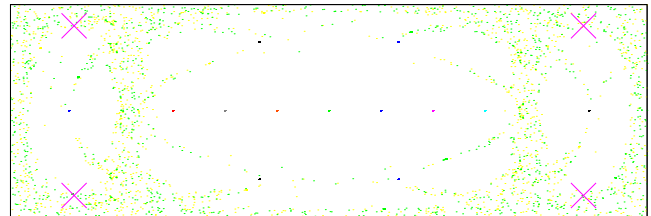
g)



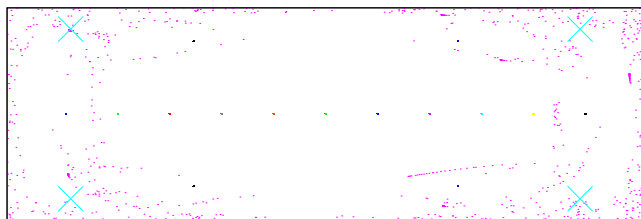
h)



i)



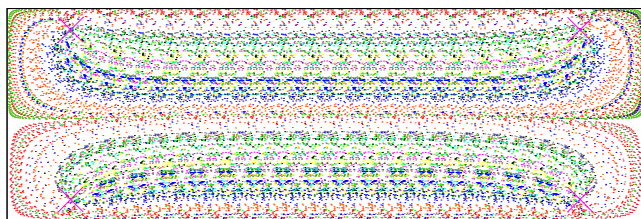
j)



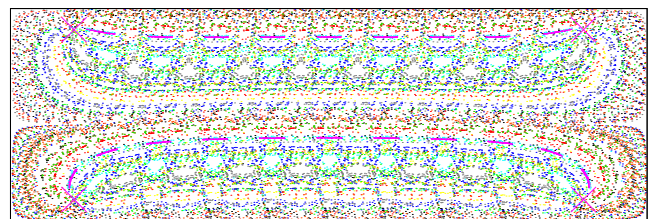
k)

FIG. I.13 – Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s

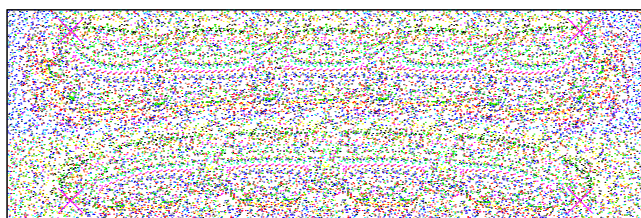
I.4.2 Protocole B



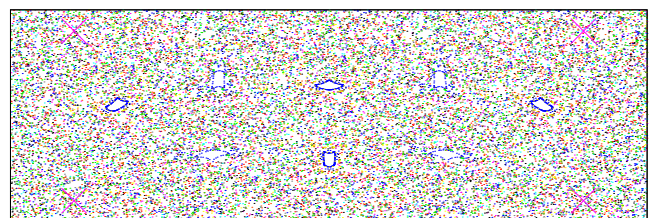
a)



b)



c)



d)

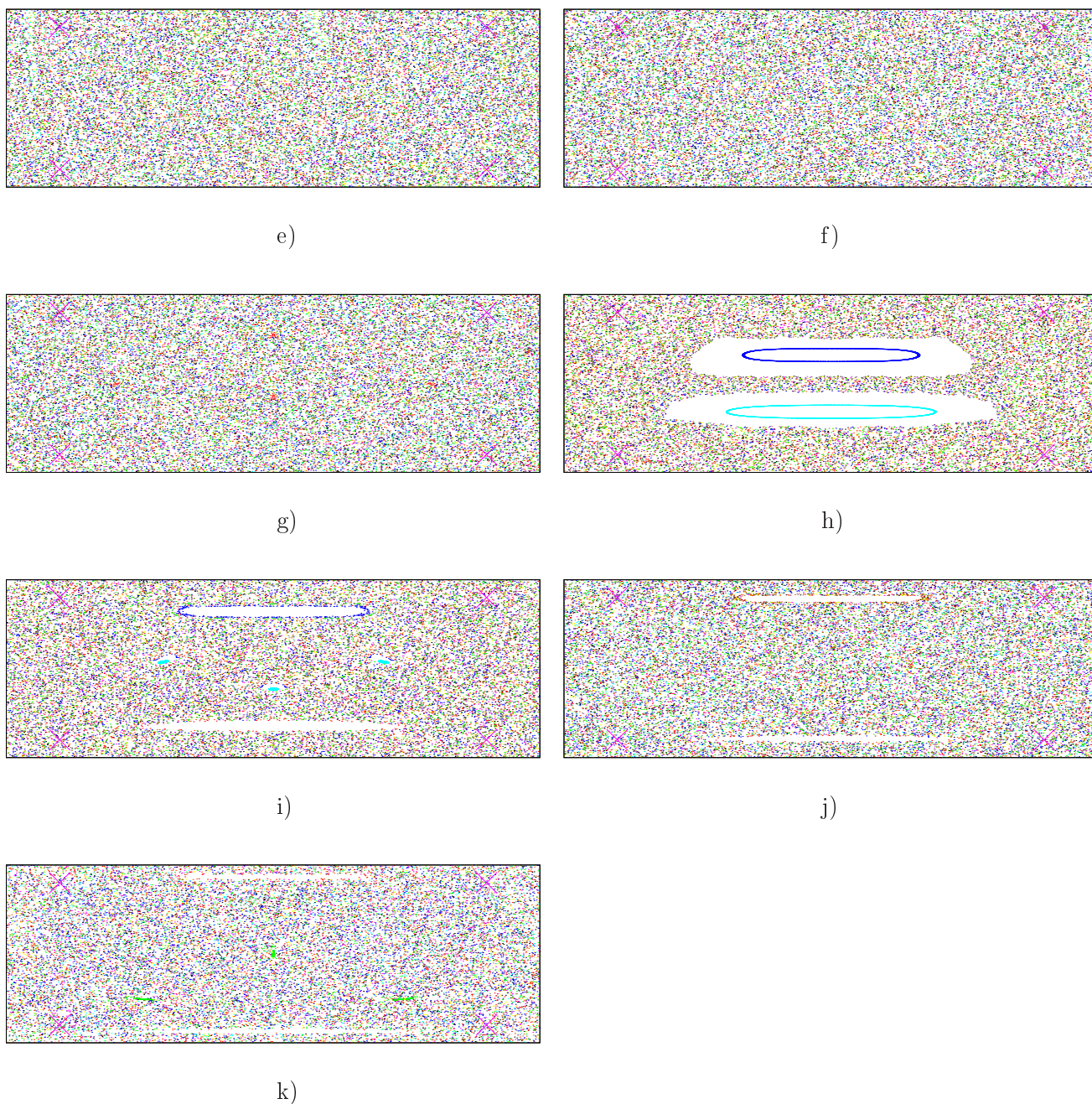
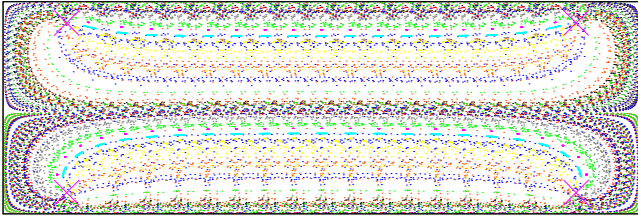
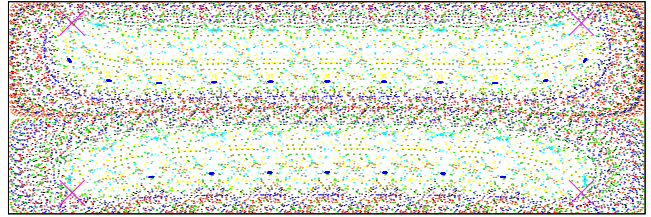


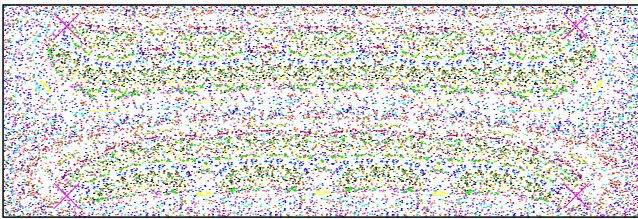
FIG. I.14 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$ et : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s



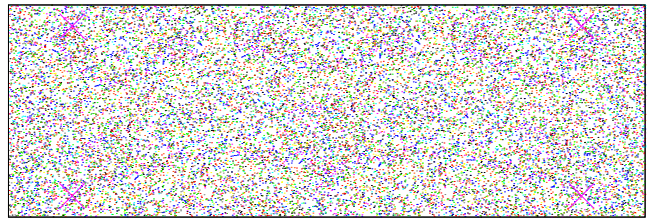
a)



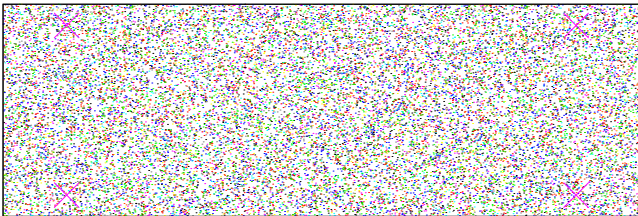
b)



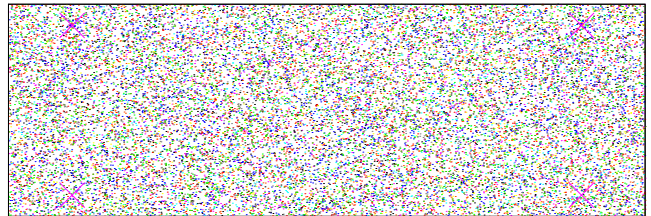
c)



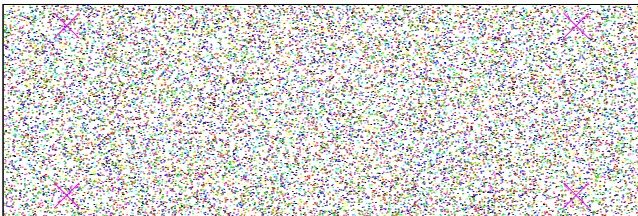
d)



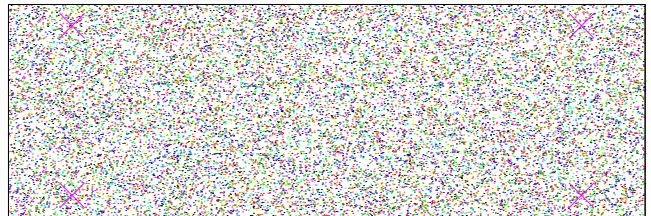
e)



f)



g)



h)

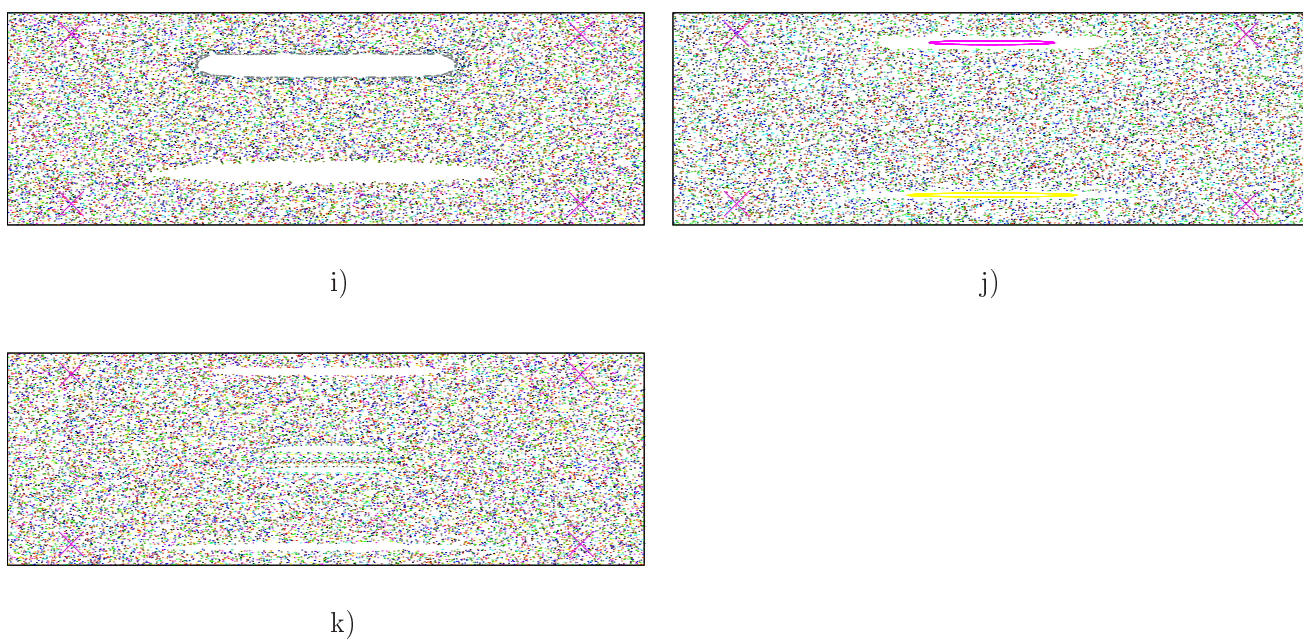


FIG. I.15 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$ et : a) $T = 0.25$ s ; b) $T = 0.5$ s ; c) $T = 1$ s ; d) $T = 2$ s ; e) $T = 4$ s ; f) $T = 6$ s ; g) $T = 8$ s ; h) $T = 10$ s ; i) $T = 12$ s ; j) $T = 14$ s ; k) $T = 16$ s.

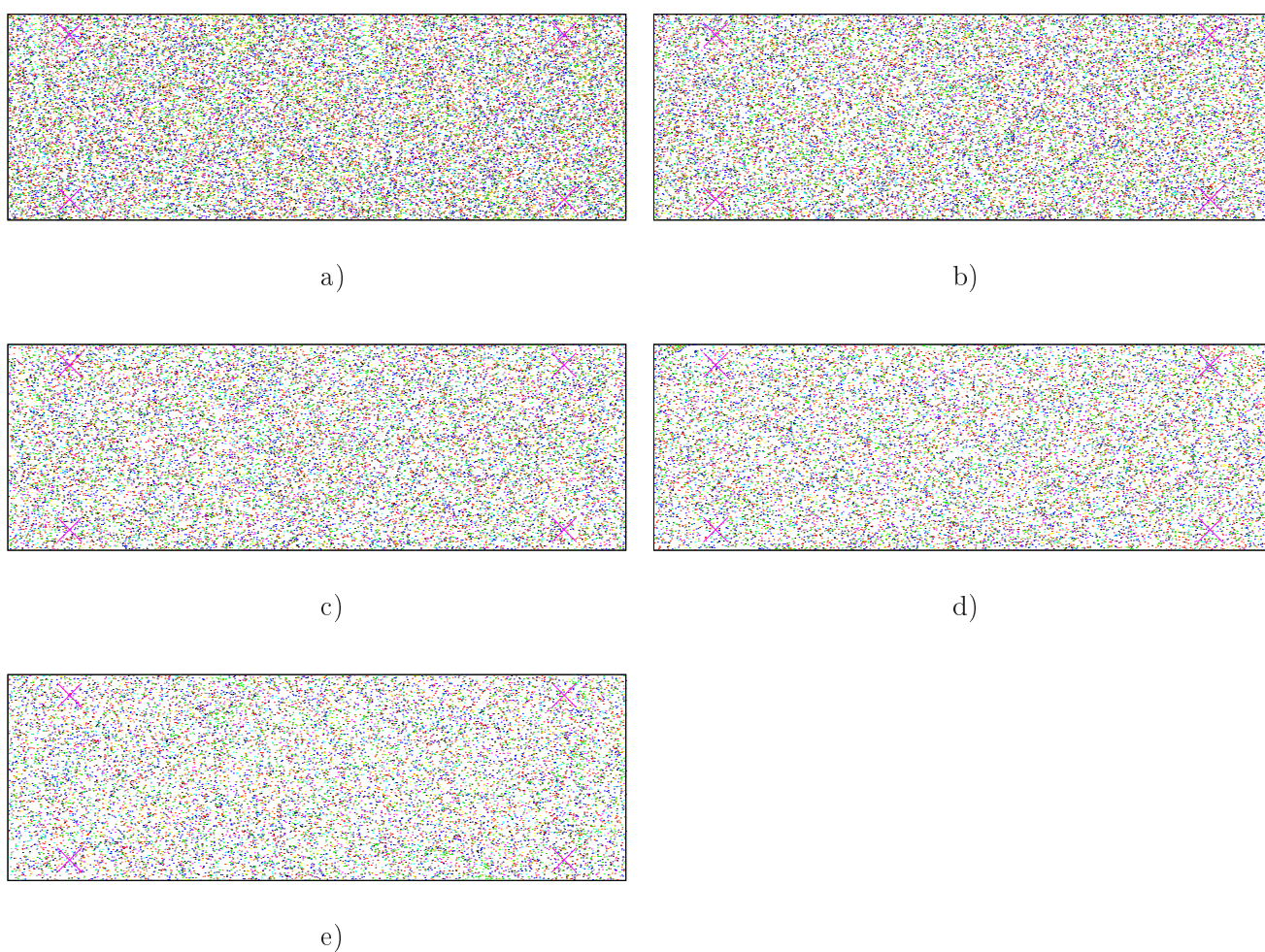


FIG. I.16 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $T = 4$ s et : a) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$; b) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.2$; c) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.3$; d) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.4$; e) $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.5$.

I.5 Sections de Poincaré dans le rectangle 4 :1

I.5.1 Protocole A

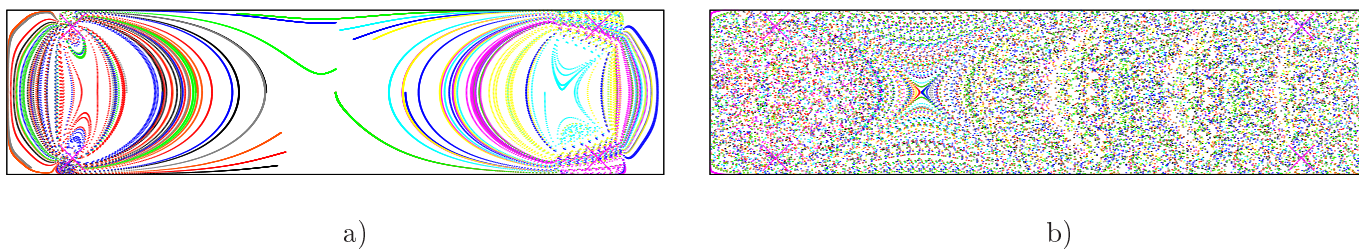


FIG. I.17 – Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 1$ s ; b) $T = 4$ s.

I.5.2 Protocole B

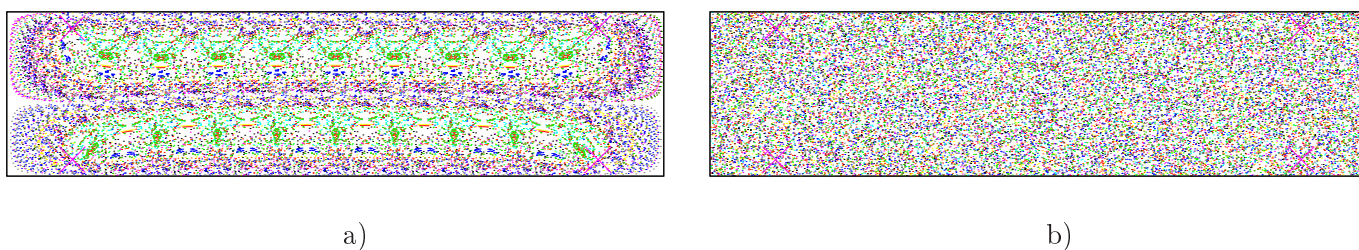


FIG. I.18 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$ et : a) $T = 1$ s ; b) $T = 4$ s.

I.6 Sections de Poincaré dans le rectangle 3 :2

I.6.1 Protocole A

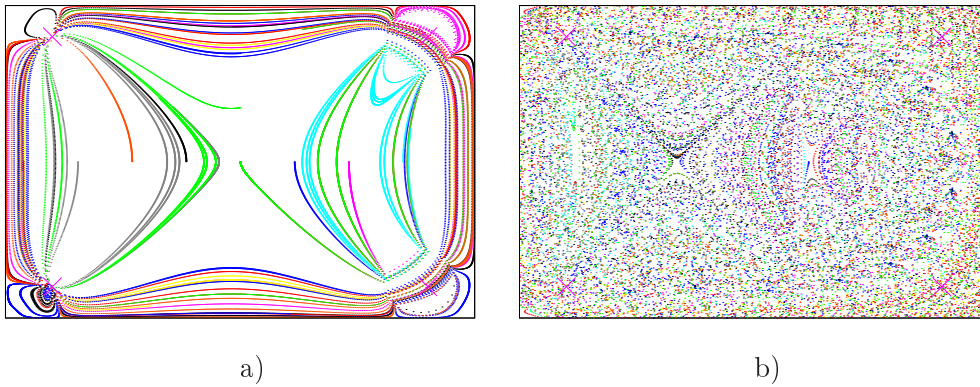


FIG. I.19 – Protocole A : Sections de Poincaré pour : a) $T = 0.5$ s ; b) $T = 4$ s.

I.6.2 Protocole B

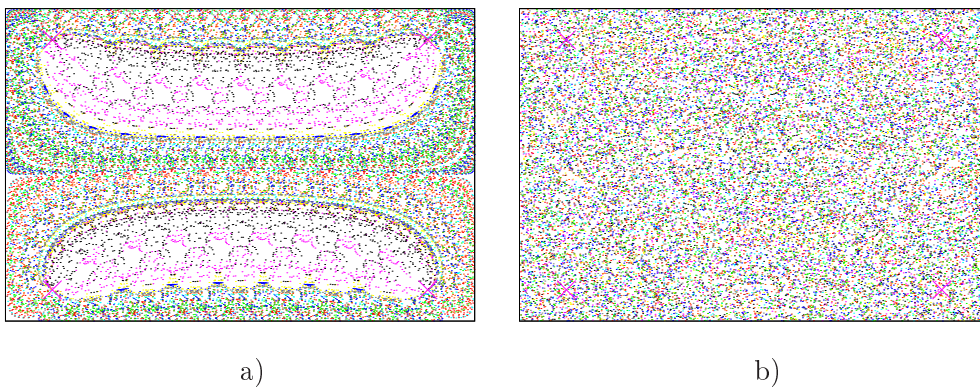


FIG. I.20 – Protocole B : Sections de Poincaré pour $V_{\text{tuyau}}/V_{\text{ch}} = 0.1$ et : a) $T = 0.5$ s ; b) $T = 4$ s.

Annexe J

Propriétés liées aux évolutions exponentielles

Nous allons montrer dans cette annexe quelques propriétés liées au comportement exponentiel d'une grandeur physique. C'est le cas par exemple de l'évolution du nombre de cibles libres soumises à une hybridation avec des sondes immobiles, lorsque l'homogénéisation du mélange est réalisée par advection chaotique. Nous utiliserons donc les notations de la thèse pour démontrer ces quelques résultats.

J.1 Temps moyen d'hybridation

Pour commencer, supposons que l'évolution soit véritablement de type exponentielle. On a donc :

$$N_c^l(t) = N_{c0}^l \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (\text{J.1})$$

où τ représente le temps caractéristique de la décroissance exponentielle. On a alors :

$$\frac{dN_c^l}{dt}(t) = -\frac{1}{\tau}N_c^l(t) \quad (\text{J.2})$$

Pendant dt , le nombre de particules hybridées est :

$$dN^{\text{hyb}} = N_c^l(t) - N_c^l(t + dt) \quad (\text{J.3})$$

$$= N_c^l(t) - \left(N_c^l(t) + \frac{dN_c^l}{dt}dt\right) \quad (\text{J.4})$$

$$= -\frac{dN_c^l}{dt}dt \quad (\text{J.5})$$

$$= \frac{1}{\tau}N_{c0}^l \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) dt \quad (\text{J.6})$$

Par définition du temps moyen d'hybridation \bar{t} , sachant qu'il y a eu pendant l'expérience

autant d'actes d'hybridations que de cibles libres introduites initialement ($N_{c_0}^l$) :

$$\bar{t} = \frac{1}{N_{c_0}^l} \int_0^{N_{c_0}^l} t_{\text{hyb}} dN^{\text{hyb}} \quad (\text{J.7})$$

$$= \int_{t=0}^{\infty} t \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \frac{dt}{\tau} \quad (\text{J.8})$$

$$= \tau \int_{t'=0}^{\infty} t' \exp(-t') dt' \quad (\text{J.9})$$

avec t_{hyb} les temps d'hybridation.

Or on montre que :

$$\int_0^{\infty} \exp(-\alpha x) dx = \frac{1}{\alpha} \int_0^{\infty} \exp(-\alpha x') dx' \quad (\text{J.10})$$

$$= \frac{1}{\alpha} [-\exp(-x')]_0^{\infty} \quad (\text{J.11})$$

$$= \frac{1}{\alpha} \quad (\text{J.12})$$

donc :

$$\frac{\partial}{\partial \alpha} \left(\frac{1}{\alpha} \right) = \frac{\partial}{\partial \alpha} \int_0^{\infty} \exp(-\alpha x) dx \quad (\text{J.13})$$

$$= \int_0^{\infty} -x \exp(-\alpha x) dx \quad (\text{J.14})$$

ainsi :

$$\int_0^{\infty} x \exp(-\alpha x) dx = \frac{1}{\alpha^2} \quad (\text{J.15})$$

avec $\alpha = 1$, il vient finalement :

$$\boxed{\bar{t} = \tau} \quad (\text{J.16})$$

J.2 Ecart type

De même, la définition de l'écart type est :

$$\sigma^2 = \frac{1}{N_{c_0}^l} \int_0^{N_{c_0}^l} (t_{\text{hyb}} - \bar{t})^2 dN^{\text{hyb}} \quad (\text{J.17})$$

Calculons :

$$\frac{1}{N_{c_0}^l} \int_0^{N_{c_0}^l} t_{\text{hyb}}^2 dN^{\text{hyb}} = \int_{t=0}^{\infty} t^2 \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \frac{dt}{\tau} \quad (\text{J.18})$$

$$= \tau^2 \int_{t'=0}^{\infty} t'^2 \exp(-t') dt' \quad (\text{J.19})$$

Or on a vu dans le paragraphe précédent que :

$$\int_0^{\infty} x \exp(-\alpha x) dx = \frac{1}{\alpha^2} \quad (\text{J.20})$$

donc par dérivation partielle par rapport à α , il vient :

$$\int_0^{\infty} x^2 \exp(-\alpha x) dx = \frac{2}{\alpha^3} \quad (\text{J.21})$$

En faisant $\alpha = 1$, on a finalement :

$$\sigma^2 = 2\tau^2 - \tau^2 = \tau^2 \quad (\text{J.22})$$

$$\boxed{\sigma = \tau = \bar{t}} \quad (\text{J.23})$$

J.3 Temps de demi-réaction

Le temps de demi-réaction $\tau_{1/2}$ correspond au temps nécessaire pour consommer la moitié de la quantité initiale d'un produit de réaction chimique. Cela correspond donc à :

$$N_c^l(\tau_{1/2}) = N_{c0}^l/2 \quad (\text{J.24})$$

Dans le cadre d'une évolution exponentielle, la valeur de $\tau_{1/2}$ vaut :

$$\frac{N_{c0}^l}{2} = N_{c0}^l \exp\left(-\frac{\tau_{1/2}}{\tau}\right) \quad (\text{J.25})$$

soit :

$$\frac{1}{2} = \exp\left(-\frac{\tau_{1/2}}{\tau}\right) \quad (\text{J.26})$$

soit :

$$\boxed{\tau_{1/2} = \tau \times \log(2)} \quad (\text{J.27})$$

Bibliographie

- [1] E. Vnuk. *Développement d'outils d'analyse de fluorescence appliqués au génotypage sur puce à ADN*. PhD thesis, École Centrale de Lyon, Laboratoire d'Électronique d'Optoélectronique et Microsystèmes, Ecully, France, 2005.
- [2] H. Aref. Stirring by chaotic advection. *J. Fluid Mech.*, 143 :1–21, 1984.
- [3] S.W. Jones and H. Aref. Chaotic advection in pulsed source-sink systems. *Phys. Fluids*, 31(3) :469–485, 1988.
- [4] M. Samimy, K.S. Breuer, L.G. Leal, and P.H. Steen. *A Gallery of Fluid Motion*. Cambridge University Press, 2003.
- [5] Émmanuelle Gouillart. *Étude de l'advection chaotique dans des mélangeurs à tiges, en écoulements ouverts et fermés*. PhD thesis, Service de Physique de l'État Condensé, CEA Saclay. Department of Mathematics, Imperial College London - Saint Gobain Recherche., 2007.
- [6] P. Carrière. On a three-dimensional implementation of the baker's transformation. *Phys. Fluids*, 19(118110) :1–4, 2007.
- [7] A. Gerschel. *Liaisons intermoléculaires*. InterÉdition / CNRS Éditions, 1995.
- [8] P. Granger. *Panorama des liaisons chimiques*. Masson, 1997.
- [9] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz. Surface plasmon resonance sensors : review. *Sensors and Actuators B*, 54 :3–15, 1999.
- [10] J. D. Watson and F. H. C. Crick. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171(4356) :737–738, 1953.
- [11] M. Cabrera, M. Jaber, J. Broutin, E. Vnuk, J.-P. Cloarec, and J.-R. Martin. Implementation of DNA chips obtained by microprojection for diagnostic and personalized medicine.. *Analytical Chemistry*, 50(3) :225–232, 2004.
- [12] M.S. Shchepinov, S.C. Case-Green, and E.M. Southern. Steric factors influencing hybridization of nucleic acids to nucleotid arrays. *Nucleic Acid Research*, 25 :1155–1161, 1997.
- [13] J. Wang. From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Research*, 25(16) :3011–3016, 2000.
- [14] Y. Okahata, Y. Matsunobo, K. Ijiro, A. Murakami, and M. Makino. Hybridization of nucleic-acids immobilized on a quartz crystal microbalance. *Journal of the American Chemical Society*, 114(21) :8299–8300, 1992.
- [15] J. Wang, P.E. Nielsen, M. Jiang, X. Cai, J. Fernandes, D. Grant, M. Ozsoz, A. Beglieter, and M. Mowat. Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance. *Analytical Chemistry*, 69(24) :5200–5202, 1997.

- [16] M. H. Rouillat. *Caractérisation par microscopie à force atomique d'une puce ADN, de l'élaboration à l'hybridation*. PhD thesis, École Centrale de Lyon, Laboratoire d'Électronique et Optoélectronique et Microsystèmes, Ecully, France, 2004.
- [17] L.A. Chrisey, G.U. Lee, and C.E. O'Ferall. Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayers films. *Nucleic Acid Research*, 24(15) :3031–3039, 1996.
- [18] M. Boncheva, L. Scheibler, P. Licoln, H. Vogel, and B. Akerman. Design of oligonucleotide arrays at interface. *Langmuir*, 15(13) :4317–4320, 1999.
- [19] S.R. Mikkelsen. Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. *Electroanalysis*, 8 :15–19, 1996.
- [20] J. Wang. Towards genelectronics : Electrochemical biosensing of dna hybridization. *Chemistry A - European Journal*, 5 :1681–1685, 1996.
- [21] R.F. Taylor. *Handbook of Chemical and Biological Sensors*. Institute of Physics Publishing, Bristol, 1996.
- [22] A.T. Wooley, D. Hadley, P. Landre, A. De Mello, R. Mathies, and J. O'Connell. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Analytical Chemistry*, 68(11) :4081–4086, 1996.
- [23] A.T. Wooley, G. Senasbaugh, and R. Mathies. High-speed DNA genotyping using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Analytical Chemistry*, 69(11) :2181–2186, 1997.
- [24] A. M. Maxam and W. Gilbert. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2) :560–564, 1977.
- [25] F. Sanger, S. Nicklen, and A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12) :5463–5467, 1977.
- [26] F. Raynal. *Étude des mécanismes de mélange dans les écoulements laminaires incompressibles en configuration plane ou tridimensionnelle*. PhD thesis, École Centrale de Lyon, Laboratoire de Mécanique des Fluides et Acoustique, Ecully, France, 1992.
- [27] S. Wiggins and J.M. Ottino. Foundations of chaotic mixing. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 362 :937–970, 2004.
- [28] R. Sturman, J. Ottino, and S. Wiggins. *The Mathematical Foundations of Mixing : The Linked Twist Map as a Paradigm in Applications, Micro to Macro, Fluids to Solids*. Cambridge University Press, 2006.
- [29] S. Colin. *Microfluidique*. Hermes Science Publications, 2004.
- [30] P. Tabeling. *Introduction à la microfluidique*. Paris : Belin, 2003.
- [31] J.H. Phelps and L. Tucker. Lagrangian particle calculations of distributive mixing : limitations and applications. *Chemical Engineering Science*, 61 :6826–6836, 2006.
- [32] A.J. Lichtenberg and M.A. Liberman. *Regular and Chaotic Dynamics*,. Springer, New-York, 1992.
- [33] A.A. Deshmukh, D. Liepmann, and A.P. Pisano. Continuous micromixer with pulsatile micropumps. In *Sensor and Actuator Center*, pages 73–76, June 4-8 2000. IEEE Workshop on Solid-State Sensor and Actuator Workshop.
- [34] C. J. Campbell and B.A. Grzybowski. Microfluidic mixers : from microfabricated to self-assembling devices. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 362 :1069–1086, 2004.

- [35] S.W. Jones. The enhancement of mixing by chaotic advection. *Phys. Fluids A*, 3(5) :1081–1086, 1991.
- [36] F. Raynal and J.N. Gence. Efficient stirring in planar, time-periodic laminar flows. *Chemical Engineering Science*, 50(4) :631–640, 1995.
- [37] F. Raynal, F. Plaza, A. Beuf, Ph. Carrière, É. Souteyrand, J.-R. Martin, J.-P. Cloarec, and M. Cabrera. Study of a chaotic mixing system for DNA chip hybridization chambers. *Physics of Fluids*, 16(9) :L63–L66, 2004.
- [38] F. Raynal, A. Beuf, F. Plaza, Julian Scott, P. Carriere, M. Cabrera, J.-P. Cloarec, and E. Souteyrand. Towards better DNA chip hybridization using chaotic advection. *Physics of Fluids*, 19(1) :017112, 2007.
- [39] F. Raynal, A. Beuf, F. Plaza, P. Carrière, M. Cabrera, J.-P. Cloarec, V. Dugas, E. Fradier, and É. Souteyrand. Chaotic mixing in a hele-shaw cell, with application to DNA chip hybridization. In *MicroTAS*, Octobre 2007.
- [40] A. Beuf, F. Raynal, J.-N. Gence, and P. Carrière. Optimisation du protocole de mélange et de la géométrie d’une chambre d’hybridation de puces à ADN. *Houille Blanche-Revue Internationale de l’eau*, 2007.
- [41] F. Raynal, F. Plaza, A. Beuf, P. Carrière, É. Souteyrand, J.-R. Martin, J.-P. Cloarec, and M. Cabrera. Micromélangeur à advection chaotique pour l’hybridation des puces à ADN. *Houille Blanche-Revue Internationale de l’eau*, 2006.
- [42] M.A. Stremmer and B. A. Cola. A maximum entropy approach to optimal mixing in a pulsed source-sink flow. *Phys. Fluids*, 18(011701) :1–4, 2006.
- [43] M.K. McQuain, K. Seale, J. Peek, T. S. Fisher, S. Levy, M.A. Stremmer, and F.R. Haselton. Chaotic mixer improves microarray hybridization. *Analytical Biochemistry*, 325 :215–226, 2004.
- [44] B.A. Cola, D.K. Schaffer, T.S. Fisher, and M.A. Stremmer. A pulsed source-sink fluid mixing device. *Journal of microelectromechanical systems*, 15(1) :259–266, 2006.
- [45] J.-M. Hertzsch, R. Sturman, and S. Wiggins. DNA microarrays : Design principles for maximizing ergodic, chaotic mixing. *Small*, 3(2) :202–218, 2007.
- [46] W.-L. Chien, H. Rising, and J.M. Ottino. Laminar mixing and chaotic mixing in several cavity flows. *J. Fluid Mech.*, 170 :355–377, 1986.
- [47] J. Chaiken, C. K. Chu, M. Tabor, and Q.M. Tan. Lagrangian turbulence and spatial complexity in a Stokes flow. *Phys. Fluids*, 30(3) :687–694, 1987.
- [48] H. Aref and S. Balachandar. Chaotic advection in a Stokes flow. *Phys. Fluids*, 29(11) :3515–3521, 1986.
- [49] H. Aref. Stochastic particle motion in laminar flows. *Phys. Fluids A*, 3(5) :1009–1016, 1991.
- [50] H. Aref and S. W. Jones. Enhanced separation of diffusing particles by chaotic advection. *Phys. Fluids A*, 1(3) :470–474, 1989.
- [51] T.J. Kaper and S. Wiggins. An analytical study of transport in Stokes flows exhibiting large scale chaos in the eccentric journal bearing. *J. Fluid Mech.*, 253 :211–243, 1993.
- [52] E. Saatdjian, N. Midoux, and J.C. André. On the solution of Stokes equations between confocal ellipses. *Phys. Fluids*, 6(12) :3833–3846, 1994.

- [53] C.W. Leong and J.M. Ottino. Experiments on mixing due to chaotic advection in a cavity. *J. Fluid Mech.*, 209 :463–499, 1989.
- [54] J.G. Franjione, C.W. Leong, and J.M. Ottino. Symetries within chaos : A route to effective mixing. *Phys. Fluids A*, 1(11) :1772–1783, 1989.
- [55] S.W. Jones, O.M. Thomas, and H. Aref. Chaotic advection by laminar flow in a twisted pipe. *J. Fluid Mech*, 209 :335–357, 1989.
- [56] C.H. Amon, A.M. Guzmán, and B. Morel. Lagrangian chaos, Eulerian chaos, and mixing enhancement in converging-diverging channel flows. *Phys. Fluids*, 8(5) :1192–1206, 1989.
- [57] M.R. Bringer, C.J. Gerdts, H. Song, J.D. Tice, and R.F. Ismagilov. Microfluidic systems for chemitcal kinetics that rely on chaotic mixing in droplets. *Phys. Fluids*, 8(5) :1192–1206, 1989.
- [58] C. Castelain, Y. Le Guer A. Mokrani, and H. Peerhossaini. Experimental study of chaotic advection regime in a twisted duct flow. *Eur. J. Mech. B-fluids.*, 20(2) :205–232, 2001.
- [59] V. Girault and P.A. Raviart. *Finite element methods for Navier–Stokes equations*. Springer–Verlag, 1986.
- [60] D. Erickson, D. Li, and J. Krull. Modelling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips. *Analytical biochemistry*, 317(2) :186–200, 2003.
- [61] V. Chan, D.J. Graves, and S.E. McKenzie. The biophysics of DNA hybridization with immobilized oligonucleotide probes. *Biophysical Journal*, 69 :2243–2255, 1995.
- [62] C. Gadgil, A. Yeckel, J. Derby, and W.S. Hu. A diffusion-reaction model for dna microarray assays. *Journal of Biotechnology*, 114 :31–45, 2004.
- [63] M. R. Henry. Real-time measurements of DNA hybridization on microparticles with fluorescence resonance energy transfer. *Analytical Biochemistry*, 276 :204–214, 1999.
- [64] M. Rigby, E.B. Smith, W.A. Wakeham, and G.C. Maitland. *The Forces between Molecules*. Oxford University Press, 1986.
- [65] L. Pauling. *Nature of the Chemical Bond*. Cornell University Press, 1967.
- [66] M.P. Allen and D.J. Tiddesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, 1987.
- [67] T. Dauxois, M. Peyrard, and A.R. Bishop. Dynamics and thermodynamics of a nonlinear model for DNA denaturation. *Physical Review E*, 47(1) :684–695, 1992.
- [68] G. Metcalfe and J. M. Ottino. Autocatalytic processes in mixing flows. *Physical Review Letters*, 72(18) :2875–2878, 1994.
- [69] H.T. Goinga and R. Pecora. Dynamics of low molecular weight DNA fragments in dilute and semidilute solutions. *Macromolecules*, 24 :6128–6138, 1991.
- [70] M.-K. Liu and C.J. Giddings. Separation and measurement of diffusion coefficients of linear and circular DNAs by flow-field flow fractionation. *Macromolecules*, 26 :3576–3588, 1993.
- [71] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, and G. Weill. Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules*, 30 :5763–5765, 1997.
- [72] H.-P. Lehr, M. Reimann, A. Brandenburg, G. Sulz, and H. Klapproth. Real-time detection of nucleic acid interactions by total internal reflection fluorescence. *Analytical Chemistry*, 75(10) :2414–2420, 2003.

- [73] F. Raynal and J.-N. Gence. Energy saving in chaotic laminar mixing. *Int. J. Heat and Mass Transfer*, 40 :3267–3273, 1997.
- [74] V. Toussaint, Ph. Carrière, and F. Raynal. A numerical Eulerian approach to mixing by chaotic advection. *Phys. Fluids*, 7 :2587–2600, 1995.
- [75] D. Kambhampati, P. E. Nielsen, and W. Knoll. Investigating the kinetics of DNA-DNA and PNA-DNA interactions using surface plasmon resonance-enhanced fluorescence spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 16 :1109–1118, 2001.
- [76] B. A. Stillman and J.L. Tonkinson. Expression microarray hybridization kinetics depend on length of the immobilized DNA but are independent of immobilization substrate. *Analytical Biochemistry*, 295 :149–157, 2001.
- [77] J. Zeng, A. Almadidy, J. Watterson, and U. J. Krull. Interfacial hybridization kinetics of oligonucleotides immobilized onto fused silica surfaces. *Sensors and Actuators B*, 90 :68–75, 2003.
- [78] Y. Zhang, D.A. Hammer, and D.J. Graves. Competitive hybridization kinetics reveals unexpected behavior patterns. *Biophysical Journal*, 89 :2950–2959, 2005.
- [79] R.J. Green, R.A. Frazier, K.M. Shakesheff, M.C. Davies, C.J. Roberts, and S.J.B. Tendler. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21 :1823–1835, 2000.
- [80] V. Dugas, J. Broutin, A. Peureux, E. Fradier, F. Raynal, and P. Carrière E. Souteyrand. Evaluation of an automated micro-mixer for hybridization of microarrays printed on glass slides. *unpublished*, 2008.
- [81] A. Otto. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik*, 216 :398–410, 1968.
- [82] M. Campàs and I. Katakis. DNA biochip arraying, detection and amplification strategies. *Trends in Analytical Chemistry*, 23(1) :49–62, 2004.
- [83] J.R. Bowden and P.A. Brennan. Dna microarray technology : insights for oral and maxillofacial surgeons. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42 :542–545, 2004.
- [84] P. Liepold, H. Wieder, H. Hillebrandt, A. Friebe, and G. Hartwich. DNA-arrays with electrical detection : A label-free low cost technology for routine use in life sciences and diagnostics. *Bioelectrochemistry*, 67(2) :143–150, 2005.
- [85] B. Fouqué, B. Schaack, P. Obeïd, S. Combe, S. Gétin, P. Barritault, P. Chaton, and F. Chatelein. Multiple wavelength fluorescence enhancement on glass substrates for biochip and cell analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 :2335–2340, 2005.
- [86] H. Kohlhammer, C. Schwaenen, S. Wessendorf, K. Holzmann, H.A. Kestler, D.Kienle, T.F.E. Barth, P. Möller, G. Ott, J. Kalla, B. Radlwimmer, A. Pscherer, S. Stilgenbauer, H.Döhner, P. Lichter, and M. Bentz. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood*, 104(3) :795–801, 2004.
- [87] J.Y. Deng, X.E. Zhang, Y. Mang, Z.P. Zhang, Y.F. Zhou, Q. Liu, H.B. Lu, and Z.J. Fu. Oligonucleotide ligation assay-based DNA chip for multiplex detection of single nucleotide polymorphism. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(10) :1277–2128, 2004.

- [88] L.G. Fagerstam, A. Frostell-Karlsson, R. Karlsson, B. Persson, and I. Ronnberg. Biospecific interaction analysis using SPR detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *Journal Chromatography*, 597 :397–410, 1992.
- [89] I. Lundstrom. Real-time biospecific interaction analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 9 :725–736, 1994.
- [90] J. Wiley. *Electromagnetic Surface Modes*. Boardman AD, editor, 1982.
- [91] E. Kretschmann and H. Raether. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Zeitschrift für Naturforsch A*, 23 :2135–2136, 1968.
- [92] E. Kretschmann. The determination of the optical constants of metals by excitation of surface plasmons. *Zeitschrift für Naturforsch A*, 241 :313–324, 1971.
- [93] G. Reid, H.J. Busscher, S. Sharma, M.W. Mittelman, and S. McIntyre. Surface properties of catheters, stents and bacteria associated with urinary tract infections. *Surface Science Reports*, 21 :251–273, 1995.
- [94] L. Haussling, H. Ringsdorf, F.-T. Schmitt, and W. Knoll. Biotin-functionalized self assembled monolayers on gold : surface plasmon optical studies of specific recognition reactions. *Langmuir*, 7 :1837–1840, 1991.
- [95] H.E. De Bruijn and J. Greve R.P.H. Kooyman. Determination of dielectric permittivity and thickness of a metal layer from SPR experiment. *Applied optics*, 29 :1974–1978, 1990.
- [96] R.J. Green, S. Corneillie, and M.C. Davis et al. The investigation of the hydration kinetics of novel PEO containing polyurethanes. *Langmuir*, 16 :2744–2750, 2000.
- [97] X. Chen, K.M. Shakesheff, and M.C. Davis et al. Degradation of a thin polymer film studied by simultaneous in situ atomic force microscopy and surface plasmon resonance analysis. *Journal of Physics and Chemicals*, 99 :11537–11542, 1996.
- [98] E. Wiczerzak, R. Hamel, V. Chabot, V. Aimez, M. Grandbois, P. G. Charette, and E. Escher. Monitoring of native chemical ligation on solid substrate by surface plasmon resonance. *Biopolymers*, 90(3) :415–420, 2008.
- [99] C. Nylander, B. Liedberg, and T. Lind. Gas detection by means of surface plasmon resonance. *Sensors Actuators*, 3 :79–88, 1982.
- [100] R.P.H. Kooyman, H.E. De Bruijn, R.G. Eenink, and J. Greve. Surface plasmon resonance as a bioanalytical tool. *Journal of Molecular Structure*, 218 :345–350, 1990.
- [101] L.G. Fagerstam, A. Frostell, R. Karlsson, and et al. Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. application to epitope mapping. *Journal of Molecular Recognition*, 3 :208–214, 1990.
- [102] M.T. Flanagan and R.H. Pantell. Surface plasmon resonance and immunosensors. *Electron Letter*, 20 :968–970, 1984.
- [103] H. Morgan, D.M. Taylor, and C. D’Silva. Surface plasmon resonance studies of chemisorbed biotin-streptavidin multilayers. *Thin Solid Films*, 209 :122–126, 1992.
- [104] M.-C. Dubs, D. Altschuh, and M.H.V. Van Regenmortel. Interaction between viruses and monoclonal antibodies studied by surface plasmon resonance. *Immunology Letter*, 31 :59–64, 1991.
- [105] A.L. Plant, M. Brigham-Burke, E.C. Petrella, and D.J. O’Shannessy. Phospholipid/alkanethiol bilayers for cell -surface receptor studies by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, 226 :342–348, 1995.

- [106] K. Asano, A. Ono, S. Hashimoto, T. Inoue, and J. Kanno. Screening of endocrine disrupting chemicals using a surface plasmon resonance sensor. *Analytical Sciences*, 20(4) :611–616, 2004.
- [107] P. Lecaruyer, I. Mannelli, V. Courtois, M. Goossens, and M. Canva. Surface plasmon resonance imaging as a multidimensional surface characterization instrument – application to biochip genotyping. *Analytica Chimica Acta*, 573-574 :333–340, 2006.
- [108] K. Matsubara, S. Kawata, and S. Minami. Optical chemical sensor based on surface plasmon measurement. *Appl. Opt.*, 27 :1160–1163, 1988.
- [109] L.M. Zhang and D. Uttamchandani. Optical chemical sensing employing surface plasmon resonance. *Electron. Lett.*, 23 :1469–1470, 1988.
- [110] H.E. Bruijn, B.S.F. Altenburg, R.P.H. Kooyman, and J. Greve. Choice of metal and wavelength for surface plasmon resonance sensors : some considerations. *Applied Optics*, 31 :440–442, 1992.
- [111] E.M. Yeatman. Resolution and sensitivity of surface plasmon microscopy and sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 11 :635–649, 1996.
- [112] D.C. Cullen, R.G. Brown, and C.R. Lowe. Detection of immunocomplex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction gratings. *Biosensors*, 3 :211–225, 1987.
- [113] R.C. Jorgenson and S.S. Yee. A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B*, 12 :213–220, 1993.
- [114] V. Chabot, C. M. Cuerrier, M. Grandbois E. Escher, and V. Aimez, and P. G. Charette. Measuring cellular activity using surface plasmon resonance. In *31st Canadian Medical and Biological Engineering Conference*, Montréal, Québec, Canada, 11-13 Jun 2008.
- [115] E. Wiczerzak, R. Hamel Jr, V. Chabot, V. Aimez, P. G. Charette, M. Grandbois, and E. Escher. Monitoring of native chemical ligation by surface plasmon resonance, 26-30 Jun 2007. Poster présenté au *American Peptide Society Symposium*.
- [116] V. Chabot, R. Hamel Jr, A. Jimenez, V. Aimez, J. Beauvais, and P. G. Charette. Multisensing platform based on surface plasmon resonance and fluorescence, 11 Mai 2007. Poster présenté au meeting *Center for Biorecognition and Biosensors*.
- [117] V. Chabot. Master’s thesis, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, 2008.
- [118] J.S. Darrozes and C. François. *Mécanique des fluides incompressibles*, volume 163. Springer-Verlag Berlin, 1982.
- [119] G.F. Carrier, M. Krook, and C.E. Pearson. *Functions of a complex variable-theory and technique*. McGraw-Hill, 1966.
- [120] L.M. Milne-Thomson. *Theoretical Hydrodynamics*. M Editions, 1968.
- [121] M. Abramowitz and I.A. Stegun. *Handbook of Mathematical Functions*. Dover Publications, 1968.
- [122] L.M. Milne-Thomson. *Theoretical Aerodynamics*. Dover Publications, Inc., New-York, 4 edition, 1958.
- [123] M.C. Wang and G. E. Uhlenbeck. On the theory of brownian motion II. *Review Modern Physics*, 17(2 and 3) :323–341, 1945.

dernière page de la thèse

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 7 août 2006,

Vu la demande du Directeur de Thèse

Monsieur Ph. CARRIERE

et les rapports de

Monsieur Y. LE GUER

Maître de Conférences (hdr) - LaTEP - Université de Pau et des pays de l'Adour - IUT des Pays de l'Adour - Département GTE - Campus Universitaire - 64000 PAU

et de

Monsieur P. CHARETTE

Professeur - Dépt. De Génie Electrique et Génie Informatique - Université de Sherbrooke - 2500 bd de l'Université - Sherbrooke Québec - Canada J1K 2R1

Monsieur BEUF Aurélien

est autorisé à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL ET ACOUSTIQUE (MEGA)

Fait à Ecully, le 6 novembre 2008

P/Le Directeur de l'E.C.L.
La Directrice des Etudes



Résumé La détection de séquences génétiques par la technologie des puces à ADN se heurte à des problèmes de fiabilité et de reproductibilité, dus en grande partie à des problèmes de mélange. Dans toute cette thèse, nous montrons à quel point le mélange par advection chaotique améliore les performances de ces puces. Pour cela nous comparons, par une étude principalement numérique, l'efficacité de deux protocoles de mélange basés sur le principe d'injection alternée et périodique de fluide (modèle puits/sources) : l'un utilise des seringues réversibles, l'autre des pompes recyclant le fluide extrait, conduisant globalement à un mélange bien plus efficace et rapide. En outre, nous mettons en évidence le rôle important de la géométrie de la chambre. Dans un second temps, nous introduisons un modèle de capture chimique entre les monobrans d'ADN libres en volume (cibles) et ceux fixés sur la puce (sondes). Nous montrons alors numériquement que la réaction est généralement grandement limitée par la diffusion, mais que l'advection chaotique améliore les choses de manière significative grâce au mélange. Ceci nous permet d'estimer les constantes de vitesses dans le cas statique (où la diffusion agit seule) et le cas dynamique (avec mélangeur). Enfin, profitant de l'opportunité d'un stage à l'Université de Sherbrooke, j'ai effectué un premier suivi en temps réel par SPR d'une cinétique de type "cibles en solution/sondes sur support" pour tenter de comparer les vitesses d'hybridation statique et dynamique (avec mélangeur).

Mots-clés Puce à ADN, mélange, sondes et cibles, hybridation, advection chaotique, sections de Poincaré, modèle puits/source, diffusion, constantes de vitesses, SPR, simulations numériques, modèles.

Summary Detection of genetic sequences using DNA chips technology faces problems of reliability and reproducibility, largely due to problems of mixing. Throughout this thesis, we show how mixing by chaotic advection improves the performances of these chips. To achieve this we compare, mainly by numerical experiments, the efficiency of two protocols of mixing based on the principle of alternated and time-periodic flow (sink/source model) : the first one uses reversible syringes, the second one uses pumps which recycle the extracted fluid, leading to a much faster and more efficient mixing. Moreover, we highlight the very important role of the geometry of the chamber. In a second step, we introduce a model of chemical capture between DNA monostrands available in volume (targets) and those fixed the chip surface (probes). We then numerically show that the hybridization reaction is generally mostly limited by diffusion, but that a good mixing can improve its speed and reliability. This also allows to estimate the chemical rates of reaction in the static case (only molecular diffusion allows targets to move) and in the dynamical case (with mixer). Finally, I seized the opportunity of a partnership with the University of Sherbrooke to perform a first real-time monitoring by SPR of a reaction of the type "targets in solution/fixed probes", so as to compare static and dynamic rates of reaction.

Keywords DNA chip, mixing, probes and targets, hybridization, chaotic advection, Poincaré sections, source/sink, diffusion, rates of reaction, SPR, numerical simulations, models.