

⑤④ PROCÉDE MICROFLUIDIQUE DE MANIPULATION DE MICROGOUTTES.

②② Date de dépôt : 30.09.16.

③③ Priorité :

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *ECOLE POLYTECHNIQUE  
Etablissement public —FR et CENTRE NATIONAL DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement  
public — FR.*

④③ Date de mise à la disposition du public  
de la demande : 06.04.18 Bulletin 18/14.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 09.07.21 Bulletin 21/27.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑦② Inventeur(s) : BAROUD CHARLES et TOMASI  
RAPHAEL.

⑦③ Titulaire(s) : *ECOLE POLYTECHNIQUE  
Etablissement public, CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement public.*

⑦④ Mandataire(s) : CABINET NONY.



## PROCEDE MICROFLUIDIQUE DE MANIPULATION DE MICROGOUTTES

La présente invention concerne un procédé microfluidique de manipulation de plusieurs microgouttes dans au moins un piège capillaire d'un système microfluidique. L'invention se rapporte également à un dispositif microfluidique pour mettre en œuvre un tel procédé.

### Art Antérieur

Il est connu de la demande de brevet FR 2 950 544, de piéger des microgouttes circulant dans un ou plusieurs microcanaux dans des pièges de forme sensiblement circulaire ou ovale, chaque zone de piégeage étant dimensionnée pour piéger un nombre prédéfini de microgouttes.

Il est également connu de E. Fradet, C. McDougall, P. Abbyad, R. Dangla, D. McGloin, and C. N. Baroud, "Combining rails and anchors with laser forcing for selective manipulation within 2D droplet arrays." *Lab Chip*, vol. 11, no. 24, pp. 4228–34, Dec. 2011, et J. Tullis, C. L. Park, and P. Abbyad, "Selective Fusion of Anchored Droplets via Changes in Surfactant Concentration." *Lab Chip*, 2014, de piéger et fusionner des microgouttes de tailles sensiblement identiques ou différentes dans un piège peu profond de forme sensiblement circulaire d'un système microfluidique, ce dernier étant bidimensionnel et présentant une pluralité de pièges. Les microgouttes piégées dans un même piège sont différentes.

De tels pièges ne permettent pas une manipulation et/ou un contrôle précis des microgouttes piégées, notamment d'adapter les pièges à des microgouttes de tailles différentes, ni un piégeage des microgouttes de façon prédéfinie spatialement.

E. Fradet, P. Abbyad, M. H. Vos, and C. N. Baroud, "Parallel measurements of reaction kinetics using ultralow-volumes." *Lab Chip*, vol. 13, no. 22, pp. 4326–30, Oct. 2013, décrit un piège peu profond présentant deux zones identiques de forme sensiblement circulaire qui se chevauchent partiellement pour donner au piège une forme de lunette. Chacune des deux zones permet de piéger une microgoutte. La forme du piège permet de maintenir les deux microgouttes piégées en contact l'une avec l'autre pour les fusionner en une seule microgoutte. Un tel piège est limité à la manipulation de deux microgouttes de tailles sensiblement identiques et n'est pas adapté à traiter un grand nombre de microgouttes, ce qui réduit les applications possibles.

Il est encore connu de A. M. Huebner, C. Abell, W. T. S. Huck, C. N. Baroud, and F. Hollfelder, "Monitoring a Reaction at Submillisecond Resolution in Picoliter Volumes.", *Anal Chem.* 2011 Feb 15;83(4):1462-8, un piège en forme de C pour

immobiliser deux microgouttes et les fusionner. Le piège est formé par des reliefs en saillie venant bloquer les microgouttes dans leur écoulement. Cependant, la manipulation des microgouttes est limitée du fait notamment de la forme des pièges et le maintien des microgouttes dans les pièges nécessite la présence d'un flux de fluide orientée selon un sens précis.

La demande WO 2016/059302 décrit un procédé de manipulation de microgouttes dans un système microfluidique comportant l'étape consistant à piéger les microgouttes dans un piège capillaire et à gélifier au moins partiellement les microgouttes ou leur environnement. Le piège capillaire peut recevoir plusieurs microgouttes dans sa profondeur, laquelle est plus grande que le diamètre des microgouttes piégées. Cependant, la manipulation des microgouttes, notamment celles piégées, en profondeur est limitée.

Il existe donc un besoin pour un procédé de manipulation de microgouttes permettant un contrôle des microgouttes piégées aisé et un piégeage de ces dernières de façon prédéfinie spatialement. Il existe également un besoin pour un procédé permettant une manipulation séquentielle des microgouttes.

### **Résumé**

#### **I. Premier aspect - Procédé de manipulation**

A cette fin, l'invention propose, selon un premier de ses aspects, un procédé de manipulation d'au moins une première microgoutte et d'au moins une deuxième microgoutte dans un système microfluidique comportant un piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, le procédé comportant les étapes consistant à :

(i) piéger la première microgoutte dans la première zone de piégeage,

et

(ii) piéger la deuxième microgoutte dans la deuxième zone de piégeage,

la première et la deuxième zone de piégeage étant agencées pour que la première et la deuxième microgoutte soient en contact l'une avec l'autre,

la première et la deuxième zone de piégeage étant conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

On désigne par « système microfluidique » un système mettant en jeu le transport d'au moins un produit et qui comporte, sur au moins une de ses portions, une

section dont au moins une dimension mesurée en ligne droite d'un bord à un bord opposé est inférieure au millimètre.

Par « microgoutte », on comprend une goutte ayant un volume inférieur ou égale à 1  $\mu\text{l}$ , mieux inférieur ou égal à 10 nl. La microgoutte peut être liquide, gazeuse ou solide.

Par « piège capillaire », on comprend une zone spatiale du système microfluidique permettant l'immobilisation provisoire ou permanente d'une ou plusieurs microgouttes circulant dans le système microfluidique. Le piège capillaire peut être formé par un ou plusieurs reliefs, notamment des reliefs en creux, et/ou par une ou plusieurs modifications locales de la surface en contact avec les microgouttes, notamment une ou plusieurs modifications locales de l'affinité de la surface avec au moins une partie du contenu de la microgoutte.

Par forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes différentes on comprend que si la première microgoutte est piégée dans la première zone de piégeage seule, elle sera retenue dans cette dernière par capillarité avec une force de piégeage qui est différente de la force de piégeage que la deuxième zone de piège exercerait sur cette même première microgoutte prise seule. Ainsi, il est plus facile de libérer la première microgoutte de la zone de piégeage qui exerce la plus petite force de piégeage. Le même raisonnement peut s'appliquer à la deuxième microgoutte. La force de piégeage d'une zone de piégeage dépend notamment de sa forme, de ses surfaces en contact avec la microgoutte et/ou des propriétés, notamment des dimensions, des microgouttes à piéger.

Le fait que le piège capillaire présente deux zones ayant des forces de piégeage différentes ramenées à l'une des microgouttes, permet d'avoir à la fois une sélectivité des microgouttes piégées et une sélectivité spatiale, notamment d'éviter que la première microgoutte occupe la deuxième zone de piégeage empêchant ainsi la deuxième microgoutte de se piéger dans cette deuxième zone de piégeage. Ceci est particulièrement intéressant lorsqu'une pluralité de premières et deuxièmes microgouttes sont introduites dans le système microfluidique.

Le fait que les première et deuxième microgouttes soient en contact permet soit qu'elles interagissent, soit qu'elles coalescent.

De préférence, la première microgoutte est piégée dans la première zone de piégeage avec une force de piégeage qui est plus grande que celle que la deuxième zone de piégeage exercerait sur la première microgoutte. Ainsi, la première microgoutte est préférentiellement piégée par la première zone de piégeage.

En variante, la deuxième microgoutte est piégée dans la deuxième zone de piégeage avec une force de piégeage qui est plus petite que celle que la première zone de piégeage exercerait sur la deuxième microgoutte. Dans ce cas, les première et deuxième microgouttes sont préférentiellement introduites et piégées dans le système microfluidique de manière séquentielle.

De préférence, la première microgoutte piégée par la première zone de piégeage dans le système microfluidique avant que la deuxième microgoutte ne soit piégée par la deuxième zone de piégeage dans le système microfluidique. Ainsi, lorsque la deuxième microgoutte est introduite, elle ne peut pas occuper la première zone de piégeage car cette dernière est déjà occupée par la première microgoutte.

Une force d'entraînement supérieure à la force de piégeage de la deuxième zone de piégeage et inférieure ou égale à la force de piégeage de la première zone de piégeage peut être exercée à l'étape (i) sur la première microgoutte. La première goutte est alors piégée uniquement dans les premières zones de piégeage.

La force d'entraînement peut être exercée au moins partiellement par

- un flux de fluide orienté s'écoulant dans le système microfluidique. En particulier, les microgouttes peuvent être entraînées en déplacement dans le système microfluidique par un flux orienté d'un fluide, dans lequel les microgouttes ne sont, de préférence, pas miscibles, le flux de fluide étant tel que, notamment ayant un débit et une orientation tels que, la première microgoutte soit seulement piégée par la première zone de piégeage. La force que le fluide en mouvement exerce sur la première goutte empêche cette dernière de se piéger dans la deuxième zone de piégeage ;
- la gravité, la première microgoutte étant entraînée en déplacement le long d'une pente du système microfluidique par son propre poids. Ainsi, selon la vitesse à laquelle la première microgoutte arrive sur la première zone de piégeage du fait de la pente du système microfluidique, la première microgoutte est ou non retenue par la première zone de piégeage ;
- la tendance de la première microgoutte à minimiser sa tension de surface. En particulier, le système microfluidique peut comporter des reliefs qui entraînent la première microgoutte en déplacement, notamment une rainure s'élargissant en direction du piège capillaire.

De préférence, la deuxième microgoutte est soumise à une force d'entraînement telle que décrit en relation avec la première microgoutte, inférieure ou égale à la force de piégeage de la deuxième zone de piégeage. Dans le cas où la force d'entraînement sur la deuxième microgoutte est exercée par un flux de fluide orienté, la force qu'exerce le flux de fluide sur la première microgoutte piégée dans la première zone de piégeage est, de préférence, insuffisante pour extraire la première microgoutte de la première zone de piégeage.

Dans le cas où la force d'entraînement sur la deuxième microgoutte est exercée par un flux de fluide orientée, ce dernier peut être orienté de sorte que la deuxième microgoutte ne puisse être piégée que dans les deuxièmes zones de piégeage ayant une orientation particulière par rapport à l'orientation du flux, notamment disposé en amont de la première zone de piégeage par rapport à la direction du flux de fluide.

### Microgouttes

De préférence, la force de piégeage qu'exerce la première zone de piégeage sur la première microgoutte est différente de la force de piégeage qu'elle exercerait sur la deuxième microgoutte et la force de piégeage qu'exerce la deuxième zone de piégeage sur la deuxième microgoutte est différente de la force de piégeage qu'elle exercerait sur la première microgoutte. En effet, la force de piégeage dépend également de la forme de la microgoutte à piéger en relation avec la forme de la zone de piégeage. Ceci facilite le piégeage séquentiel des première et deuxième microgouttes.

De préférence, la première zone de piégeage exerce sur la première microgoutte une force de piégeage supérieure à celle qu'elle exercerait sur la deuxième microgoutte. Ceci permet d'éviter que la deuxième microgoutte ne déloge et prenne la place de la première microgoutte.

La première et la deuxième microgoutte peuvent être différentes, en particulier de tailles différentes, notamment la première microgoutte étant de plus grande dimension et/ou de plus grand volume que la deuxième microgoutte, et/ou de contenus différents.

La première zone de piégeage peut piéger une ou plusieurs premières microgouttes.

La deuxième zone de piégeage peut piéger une ou plusieurs deuxièmes microgouttes.

En variante, les première(s) et deuxième(s) microgouttes sont différentes par au moins l'une de leurs propriétés, notamment leur viscosité et/ou leur tension

interfaciale et/ou leur affinité avec un revêtement particulier d'au moins l'une des zones de pièges.

De préférence, la première zone de piégeage ne piège qu'une première microgoutte et/ou la deuxième zone de piégeage ne piège qu'une deuxième microgoutte.

5 En particulier :

- la plus grande dimension de la première microgoutte lorsqu'elle est piégée en vue du dessus peut être supérieure ou égale à la plus grande dimension de la première zone de piégeage en vue de dessus, et/ou
- 10 – la plus grande dimension de la deuxième microgoutte lorsqu'elle est piégée en vue du dessus peut être supérieure ou égale à la plus grande dimension de la deuxième zone de piégeage en vue de dessus, et/ou
- la première microgoutte, lorsqu'elle est piégée, remplit au moins 70%, mieux 80%, encore mieux 90%, du volume de la première zone de piégeage, et/ou
- 15 – la deuxième microgoutte, lorsqu'elle est piégée, remplit au moins 70%, mieux 80%, encore mieux 90%, du volume de la deuxième zone de piégeage, et/ou
- le volume de la première microgoutte, lorsqu'elle est piégée, est supérieure ou égale à celui de la première zone de piégeage de sorte que la première microgoutte s'étend partiellement en dehors de la
- 20 première zone de piégeage, et/ou
- le volume de la deuxième microgoutte, lorsqu'elle est piégée, est supérieure ou égale à celui de la deuxième zone de piégeage de sorte que la deuxième microgoutte s'étend partiellement en dehors de la
- 25 deuxième zone de piégeage.

Une des première(s) ou deuxième(s) microgouttes peut être une microbulle d'air.

#### **Pluralité de deuxièmes et/ou première zones de piégeage**

- 30 Le piège capillaire peut comporter une pluralité de deuxièmes zones de piégeage, l'étape (ii) consistant à piéger une deuxième microgoutte par deuxième zone de piégeage, la première et les deuxièmes zones de piégeage étant agencées de telle sorte que chaque deuxième microgoutte soit en contact avec au moins une de la première ou des deuxièmes microgouttes.

Le piège capillaire peut comporter une pluralité de premières zones de piégeage, l'étape (i) consistant à piéger une première microgoutte par première zone de piégeage, les première et la ou les deuxièmes zones de piégeage étant agencées de telle sorte que chaque première microgoutte soit en contact avec au moins une de la ou des

5 deuxièmes microgouttes ou des premières microgouttes.

De préférence, chaque deuxième microgoutte est reliée à la ou chaque première microgoutte.

Par « reliée à », on comprend que chaque deuxième microgoutte est soit directement en contact avec ladite première microgoutte, soit en contact avec une autre

10 deuxième microgoutte ou un chapelet de deuxièmes et/ou premières microgouttes elle-même en contact avec ladite première microgoutte.

Par « chapelet de microgouttes », on comprend une pluralité de microgouttes formant une ligne droite ou courbe en contact les unes avec les autres.

Les deuxièmes microgouttes peuvent être toutes en contact avec au moins une

15 première microgoutte piégée dans ledit piège capillaire.

Au moins deux deuxièmes zones de piégeage peuvent être conformées pour que leurs forces de piégeage ramenées à l'une desdites deuxièmes microgouttes soient différentes. Les deuxièmes microgouttes piégées par au moins deux deuxièmes zones de piégeage peuvent être différentes de par au moins l'une de leurs propriétés, notamment

20 leur plus grande dimension.

En variante, toutes les deuxièmes zones de piégeage du piège capillaire sont identiques.

#### **Pluralité de piège capillaire**

Le système microfluidique peut comporter une pluralité de pièges capillaires

25 comportant chacun une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, l'étape (i) consistant à piéger une première microgoutte dans la première zone de piégeage de chaque piège capillaire, l'étape (ii) consistant à piéger une deuxième microgoutte dans la deuxième zone de piégeage de chaque piège capillaire, la première et la deuxième zone de piégeage de chaque piège capillaire de la pluralité de pièges

30 capillaires étant agencées de telle sorte que la première et la deuxième microgoutte piégée dans ledit piège capillaire soient en contact l'une avec l'autre dans ce dernier.

Chaque piège capillaire peut comporter une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment.

Tous les pièges du système microfluidique peuvent comporter chacun une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage agencées de telle sorte que la première et la deuxième microgoutte piégée dans ledit piège capillaire soient en contact l'une avec l'autre dans ce dernier.

5 En variante, seules une partie des pièges capillaires du système microfluidique comportent chacun une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage agencées de telle sorte que la première et la deuxième microgoutte piégée dans ledit piège capillaire soient en contact l'une avec l'autre dans ce dernier.

10 Le procédé peut comporter l'étape consistant à piéger une microbulle de gaz, notamment d'air, dans l'une des premières ou deuxièmes zones de piégeage. Ceci permet de rendre la zone de piégeage en question inactive. En effet, du fait de la présence de la microbulle de gaz, les première ou deuxième microgouttes ne peuvent pas se piéger dans la zone de piégeage concernée.

#### **Flux de fluide orienté**

15 L'étape (ii) peut comporter les sous-étapes (ii') consistant à piéger, sous l'effet d'un premier flux de fluide orienté, une deuxième microgoutte dans une ou une partie des deuxième zones de piégeage et (ii'') consistant à piéger, sous l'effet d'un deuxième flux de fluide orienté, une deuxième microgoutte dans une autre ou une autre partie des deuxième zones de piégeage, le premier et le deuxième flux de fluide étant  
20 d'orientation différentes.

Les deuxième microgouttes des étapes (ii') et (ii'') peuvent être différentes notamment par au moins l'une de leurs propriétés et/ou leur contenu. Les deuxième zones de piégeage des étapes (ii') et (ii'') peuvent être identiques.

25 Ainsi, il est possible, en choisissant l'orientation du flux de fluide, de piéger des microgouttes sélectivement dans une des deux zones de piégeage, ce qui permet un positionnement spatial prédéfini des microgouttes en contact les unes avec les autres. Il est alors possible de mettre en contact une première microgoutte avec des deuxième microgouttes différentes de façon contrôlée, notamment dans le cadre de la chimie combinatoire. Il est également possible, dans le cadre de microgouttes comportant des  
30 gels de contrôler spatialement la disposition de microgoutte de gels dans le piège capillaire de sorte à obtenir après fusion une microgoutte de forme et de composition contrôlées.

### Coalescence

Le procédé peut comporter l'étape (iii) consistant à fusionner avec la première microgoutte la ou chacune des deuxièmes microgouttes piégées dans la ou chacune des deuxièmes zones de piégeage. Une telle coalescence permet notamment de mélanger le contenu des deux microgouttes.

Une telle coalescence peut être sélective, c'est-à-dire que l'on peut choisir la ou les deuxièmes microgouttes en contact avec la première microgoutte que l'on veut fusionner avec cette dernière, notamment par l'utilisation d'un laser infra-rouge comme cela est par exemple décrit dans le document E. Fradet, P. Abbyad, M. H. Vos, and C. N. Baroud, "*Parallel measurements of reaction kinetics using ultralow-volumes.*," *Lab Chip*, vol. 13, no. 22, pp. 4326–30, Oct. 2013, dont le contenu est incorporé par référence, d'électrodes adressables disposées au niveau du piège capillaire ou d'ondes mécaniques.

En variante, la coalescence des microgouttes est non sélective, c'est-à-dire que l'ensemble des deuxièmes microgouttes du piège capillaire fusionne simultanément avec la première microgoutte, notamment par l'ajout d'un produit favorisant cette coalescence dans l'environnement du piège capillaire ou l'application d'un stimulus physique externe tel que des ondes mécaniques, des ondes de pression, un changement de température ou un champ électrique.

### Libération des deuxièmes microgouttes

En variante, l'étape (iii) consiste à évacuer la ou au moins une deuxième microgoutte piégée dans la deuxième zone de piégeage hors du piège capillaire. L'étape (iii') peut consister à appliquer un flux de fluide orienté, configuré pour exercer sur une ou plusieurs deuxièmes microgouttes une force d'entraînement supérieure à la force de piégeage de la deuxième zone de piégeage, le flux de fluide étant configuré pour exercer sur la ou les premières microgouttes une force d'entraînement inférieure ou égale à la force de piégeage de la première zone de piégeage, de sorte que la ou les premières microgouttes restent piégées dans la première zone de piégeage.

A cette étape, on peut évacuer une ou plusieurs des deuxième microgouttes des deuxièmes zones de piégeage, le piège capillaire étant configuré de sorte que, du fait de son orientation, le flux de fluide exerce des forces d'entraînement différentes sur les deuxièmes zones de piégeage, le procédé comportant de préférence l'étape (iv) consistant à changer l'orientation du flux de fluide de sorte à évacuer au moins une ou plusieurs des deuxièmes microgouttes d'au moins une autre zone de piégeage. Ceci permet une libération sélective des deuxièmes microgouttes. Ainsi, une première microgoutte et une

ou plusieurs deuxièmes microgouttes peuvent être mises en contact les unes avec les autres pendant un temps déterminé suffisant pour que, en particulier du fait des interactions entre la première microgoutte et la ou les deuxièmes microgoutte, la ou les deuxièmes microgouttes subissent un changement, par exemple un changement de contenu, puis libérées pour être analysé. Cela peut également permettre de changer les deuxièmes microgouttes par d'autres deuxièmes microgouttes dans le cas d'une erreur dans le protocole avant la coalescence des microgouttes.

### **Troisième microgoutte**

Le procédé peut comporter, après l'étape (iii) ou (iii'), l'étape (v) consistant à piéger une troisième microgoutte dans la ou les deuxièmes zones de piégeage n'ayant plus de deuxième microgoutte, de sorte que la première et la troisième microgoutte soient en contact l'une avec l'autre. La troisième microgoutte peut être identique ou différente de la deuxième microgoutte. La troisième microgoutte peut être fusionnée avec la microgoutte piégée dans la première zone de piégeage ou libérée comme cela est décrit précédemment pour la deuxième microgoutte. L'étape (vi) peut être répétée plusieurs fois. Ceci permet par exemple de :

- diluer de manière séquentielle le contenu des première(s) ou deuxième(s) microgouttes,
- d'apporter un réactif supplémentaire au contenu de la ou des premières microgouttes piégées dans la première zone de piégeage,
- de renouveler à plusieurs reprises le milieu de culture d'une ou des premières microgouttes contenant des cellules piégées dans la première zone de piégeage,
- d'apporter à plusieurs reprises à une ou plusieurs premières microgouttes contenant un pathogène ou des cellules malades, à des intervalles de temps donnés, un médicament pour évaluer sa posologie pour un traitement, ou
- d'apporter à plusieurs reprises des cellules afin de former un microtissu présentant plusieurs couches cellulaires.

### **Libération du piège capillaire**

Le procédé peut comporter l'étape (vi) consistant à évacuer l'ensemble des microgouttes présentes dans le piège capillaire hors du piège capillaire, notamment à l'aide d'un flux de fluide exerçant une force d'entraînement supérieure aux forces de

piégeage s'exerçant sur les microgouttes. Une telle étape peut permettre de libérer les microgouttes pour les analyser.

Le procédé peut comporter l'étape consistant à prendre une mesure de l'état du système microfluidique. Cette mesure peut être effectuée avant et/ou après fusion et/ou libération des gouttes.

De préférence, la ou les microgouttes finales obtenues peuvent comporter un moyen d'identification de leur contenu, notamment un marquage par la présence de billes ou de particules en nombre, par la présence de couleurs ou de formes variées et/ou par un signal colorimétrique ou de fluorescence proportionnel à une concentration initiale en un composé compris dans une de la première et de la deuxième microgoutte.

Le procédé décrit ci-dessus peut être réalisé à l'aide du système microfluidique qui est décrit ci-après.

#### **Etapas supplémentaires**

Le procédé peut comporter une étape supplémentaire

- d'incubation, et/ou
- d'observation ou de mesure, notamment par la prise d'une image, par une mesure colorimétrique, de fluorescence, spectroscopique (UV, Raman) ou de température.

Ces étapes peuvent avoir lieu avant et/ou après la coalescence des microgouttes.

L'étape d'observation ou de mesure peut permettre de déterminer le contenu de chaque microgoutte avant et/ou après fusion et par exemple de déterminer les modifications intervenues suite à la fusion.

L'étape d'observation est, par exemple, particulièrement utile dans le cadre de l'utilisation d'une librairie de microgouttes différentes pour faire une cartographie des différentes microgouttes avant fusion.

## **II. Dispositif microfluidique**

L'invention a également trait à un dispositif microfluidique de piégeage de microgouttes, notamment pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comportant un piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage disposées de sorte qu'une première microgoutte piégée dans la première zone de piégeage et qu'une deuxième microgoutte piégée dans la deuxième zone de piégeage soient en contact l'une avec l'autre dans le piège capillaire, la première et la deuxième zone de piégeage étant conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Le fait que le piège capillaire présente deux zones ayant des forces de piégeage différentes ramenées à l'une des microgouttes, permet d'avoir à la fois une sélectivité des microgouttes piégées et un piégeage des microgouttes de façon prédéfini spatialement, notamment d'éviter que la première microgoutte occupe la deuxième zone de piégeage empêchant ainsi la deuxième microgoutte de se piéger dans cette dernière. Ceci est particulièrement vrai lorsqu'une pluralité de premières et deuxièmes microgouttes sont introduites dans le système microfluidique.

Le fait que les première et deuxième microgouttes soient en contact permet soit qu'elles interagissent, soit de pouvoir les fusionner facilement.

#### 10 Zones de piégeage

La première et la deuxième zone de piégeage sont, de préférence, des cavités. L'utilisation de zones de piégeage sous forme de cavité facilite la manipulation des microgouttes et notamment leur piégeage et/ou leur libération.

La première et la deuxième zone de piégeage peuvent être disjointes.

15 En variante, la première et la deuxième zone de piégeage sont jointes.

De préférence, le piège capillaire est dépourvu de symétrie de révolution, en vue de dessus. Cette anisotropie permet d'avoir un piégeage des microgouttes de façon prédéfini spatialement.

20 De préférence, la première zone de piégeage et la deuxième zone de piégeage sont disposées l'une à côté de l'autre, en vue du dessus.

La première et la deuxième zone de piégeage sont, de préférence, différentes par au moins l'une de leurs dimensions. En particulier, la première et la deuxième zone de piégeage sont de hauteurs différentes, la première zone de piégeage étant notamment plus haute que la deuxième zone de piégeage ou la première et la deuxième zone de piégeage sont de formes différentes, en vue de dessus, la première zone de piégeage présentant notamment une section plus grande que la deuxième zone de piégeage. La différence de force de piégeage est alors liée au moins partiellement à la taille, notamment la hauteur ou la section en vue du dessus, des zones de piégeage.

30 Par « hauteur de la zone de piégeage », on comprend, en section transversale, la hauteur moyenne de la zone de piégeage du système microfluidique.

La deuxième zone de piégeage peut s'élargir dans au moins une direction en rapprochement de la première zone de piégeage. Ceci permet de guider la deuxième microgoutte en direction de la première microgoutte pour la maintenir en contact avec cette dernière. En effet, afin de minimiser son énergie de surface, la deuxième

microgoutte tend à se déplacer le long de la deuxième zone de piégeage vers la zone de plus grande dimension.

La deuxième zone de piégeage peut s'élargir en rapprochement de la première zone de piégeage, en vue de dessus. De préférence, l'angle de divergence  $\alpha$  est tel que la deuxième microgoutte soit toujours en contact des deux parois opposées le définissant. La deuxième zone de piégeage peut s'élargir avec un angle de divergence  $\alpha$  non nul, notamment compris entre  $10^\circ$  et  $120^\circ$ . La deuxième zone de piégeage peut avoir une forme sensiblement triangulaire ou triangulaire tronquée.

La deuxième zone de piégeage peut présenter une hauteur croissante en direction de la première zone de piégeage.

De préférence, la hauteur de la deuxième zone de piégeage est inférieure ou égale à la plus grande dimension de la première zone de piégeage, mieux à la moitié de la plus grande dimension de la première zone de piégeage. Le fait que la hauteur de la deuxième zone de piégeage soit limitée permet d'éviter que les lignes de flux du fluide soient perturbées par la deuxième zone de piégeage au point d'empêcher la deuxième microgoutte d'être piégée.

La hauteur de la première zone de piégeage peut être telle que le volume de cette dernière est supérieur ou égal au volume de la première microgoutte. Ceci permet d'avoir une première zone de piégeage présentant une grande force de piégeage, dans laquelle la première microgoutte est peu déformée, en particulier présentant une interface inférieure concave, ce qui peut faciliter, après sédimentation, la mise en contact d'éléments encapsulés pour former un amas, par exemple des cellules pour former un sphéroïde.

#### **Pluralité de deuxièmes et/ou premières zones de piégeage**

Le piège capillaire peut comporter une pluralité de deuxièmes zones de piégeage agencées de telle sorte que chaque deuxième microgoutte piégée soit en contact avec au moins une de la première ou des deuxièmes microgouttes piégées dans le piège capillaire.

Le piège capillaire peut comporter une pluralité de premières zones de piégeage agencées de telle sorte que chaque première microgoutte piégée soit en contact avec au moins une de la ou des deuxièmes microgouttes ou des premières microgouttes piégées dans le piège capillaire.

De préférence, les première(s) et deuxième(s) zones de piégeage sont agencées pour que chaque deuxième microgoutte soit reliée à la ou chaque première microgoutte.

Les première(s) et deuxième(s) zones de piégeage peuvent être agencées de sorte que les deuxièmes microgouttes soient toutes en contact avec au moins une première microgoutte piégée dans ledit piège capillaire.

Au moins deux deuxièmes ou premières zones de piégeage peuvent être conformées pour que leurs forces de piégeage ramenées à l'une desdites deuxièmes microgouttes soient différentes. Les deuxièmes microgouttes piégées par au moins deux deuxièmes zones de piégeage peuvent être différentes de par au moins l'une de leurs propriétés, notamment leur plus grande dimension.

En variante, toutes les deuxièmes zones de piégeage du piège capillaire sont identiques.

#### **Pluralité de pièges capillaires**

De préférence, le dispositif comporte une pluralité de pièges capillaires comportant chacun une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, de préférence agencées de telle sorte que la deuxième microgoutte piégée dans la deuxième zone de piégeage du piège capillaire soit en contact avec la première microgoutte piégée dans la première zone de piégeage dudit piège capillaire.

Chaque piège capillaire peut comporter une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment.

Tous les pièges capillaires du dispositif peuvent comporter chacun au moins une première zone de piégeage et au moins une deuxième zone de piégeage.

En variante, une partie des pièges capillaires comporte chacun au moins une première zone de piégeage et au moins une deuxième zone de piégeage et une partie des pièges capillaires ne comporte qu'une seule zone de piégeage ne permettant de piéger qu'une seule première microgoutte. De tels pièges capillaires comportant une seule zone de piégeage peuvent servir de contrôle lors d'une expérience.

Le dispositif peut comporter au moins 10 pièges capillaires par centimètre carré, mieux au moins 100 pièges capillaires par centimètre carré. Un grand nombre de pièges capillaires permet notamment de faire de la chimie combinatoire, d'effectuer un criblage de médicaments, d'étudier la cristallisation des protéines, d'effectuer un titrage d'une espèce chimique, ou de personnaliser un traitement notamment dans le cas du traitement du cancer.

Au moins deux pièges capillaires peuvent être différents. Par exemple, le dispositif comporte un premier piège capillaire comportant  $n$  deuxièmes zones de piégeage et un deuxième piège capillaire comportant  $p$  deuxièmes zones de piégeage,  $n$  étant différent de  $p$ . De tels pièges capillaires permettent d'avoir après coalescence des  
 5 deuxièmes microgouttes avec les premières microgouttes des microgouttes piégées dans les premières zones de piégeage ayant des concentrations et/ou des tailles de gouttes différentes. Le système microfluidique peut présenter plus de deux pièges capillaires ayant des quantités de deuxièmes zones de piégeage différentes afin de réaliser plusieurs concentration et/ou tailles de microgouttes, notamment un gradient de concentrations  
 10 et/ou de tailles de microgouttes. Les microgouttes obtenues, de concentrations différentes, peuvent former une panel de microgouttes utile dans le domaine de la chimie combinatoire, pour étudier la cristallisation des protéines, effectuer un titrage d'une espèce chimique ou personnaliser un traitement, notamment dans le cas du cancer.

En variante, les pièges capillaires sont tous identiques.

15 Le dispositif peut comporter un canal présentant une chambre de piégeage, le ou les pièges capillaires étant dans la chambre de piégeage.

### III. Deuxième aspect - Procédé de manipulation

L'invention a également pour objet, selon un deuxième aspect, un procédé de manipulation d'une pluralité de premières microgouttes et d'une pluralité de deuxièmes  
 20 microgouttes dans un système microfluidique comportant un canal présentant une chambre de piégeage comportant un pluralité de pièges capillaires répartis selon au moins deux directions différentes, chaque piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, le procédé comportant les étapes consistant à  
 :

- 25
- (i) piéger une première microgoutte dans la première zone de piégeage de chaque piège capillaire, et
  - (ii) piéger une deuxième microgoutte dans la deuxième zone de piégeage de chaque piège capillaire,

la première et la deuxième zone de piégeage d'un même piège capillaire étant  
 30 agencées pour que la première et la deuxième microgoutte soient en contact l'une avec l'autre dans le piège capillaire, les pièges capillaires présentant chacun une forme anisotrope.

Le fait qu'il y ait une pluralité de pièges capillaires permet de former une pluralité de paires de première et deuxième microgouttes simultanément. Les différentes paires de première et deuxième microgouttes peuvent alors être différentes ou identiques.

Le fait que les pièges capillaires soient anisotropes permet d'avoir un positionnement spatial prédéfini des microgouttes une fois qu'elles sont piégées par les zones de piégeage.

De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage de chaque piège capillaire sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec le procédé ou le dispositif selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au procédé selon cet aspect de l'invention.

Le procédé peut être mis en œuvre à l'aide d'un système microfluidique de piégeage de microgouttes comportant un canal présentant une chambre de piégeage comportant une pluralité de pièges capillaires répartis selon au moins deux directions différentes, chaque piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage disposées de sorte qu'une première microgoutte piégée dans la première zone de piégeage et qu'une deuxième microgoutte piégée dans la deuxième zone de piégeage du même piège capillaire soient en contact l'une avec l'autre, les pièges capillaires présentant chacun une forme anisotrope.

De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage de chaque piège capillaire sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec le système microfluidique selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au système microfluidique selon cet aspect de l'invention.

#### **IV. Troisième aspect – Procédé de manipulation**

L'invention a encore pour objet, selon un troisième aspect, un procédé de manipulation d'au moins une première microgoutte et d'au moins une deuxième microgoutte dans un système microfluidique comportant un piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, la deuxième zone de piégeage s'élargissant dans au moins une dimension en rapprochement de la première zone de piégeage, le procédé comportant les étapes consistant à :

- (i) piéger la première microgoutte dans la première zone de piégeage, et

(ii) piéger la deuxième microgoutte dans la deuxième zone de piégeage, les première et deuxième zones de piégeage d'un même piège capillaire étant agencées pour que la première et la deuxième microgoutte soient en contact l'une avec l'autre dans le piège capillaire.

5 Le fait que la deuxième zone de piégeage s'élargisse dans au moins une dimension en rapprochement de la première zone de piégeage permet de guider la deuxième microgoutte vers la première microgoutte lors de son piégeage et de maintenir cette dernière en contact avec la première microgoutte. En effet, afin de minimiser son énergie de surface, la deuxième microgoutte tend à se déplacer le long de la deuxième  
10 zone de piégeage vers la zone de plus grande dimension.

La deuxième zone de piégeage s'élargit, de préférence, en vue de dessus en rapprochement de la première zone de piégeage.

La deuxième zone de piégeage peut s'élargir avec un angle de divergence  $\alpha$  compris entre  $10^\circ$  et  $120^\circ$ .

15 La deuxième zone de piégeage peut présenter une hauteur croissante en direction de la première zone de piégeage. )

De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

20 Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec les procédés ou les dispositifs selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au procédé selon cet aspect de l'invention.

Le procédé peut être mis en œuvre à l'aide d'un système microfluidique de piégeage de microgouttes comportant un piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage disposées de sorte qu'une première  
25 microgoutte piégée dans la première zone de piégeage et qu'une deuxième microgoutte piégée dans la deuxième zone de piégeage du même piège capillaire soient en contact l'une avec l'autre, la deuxième zone de piégeage s'élargissant dans au moins une dimension en rapprochement de la première zone de piégeage.

30 De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec les systèmes microfluidique selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au système microfluidique selon cet aspect de l'invention.

## V. Quatrième aspect – Procédé d'assemblage cellulaire

L'invention a encore pour objet, selon un quatrième aspect, un procédé d'assemblage cellulaire d'au moins une première microgoutte contenant des premières cellules et d'au moins une deuxième microgoutte contenant des deuxièmes cellules, dans un système microfluidique comportant un piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, ce procédé comportant les étapes consistant à :

- (i) piéger la première microgoutte dans la première zone de piégeage, et
- (ii) piéger la deuxième microgoutte dans la deuxième zone de piégeage,
- la première et la deuxième zone de piégeage d'un même piège capillaire étant agencées pour que la première et la deuxième microgoutte soient en contact l'une avec l'autre dans le piège capillaire,
- (iii) fusionner la première microgoutte avec la deuxième microgoutte pour former un microtissu par adhérence des premières et deuxièmes cellules entre elles.

Un tel procédé peut permettre de créer in vitro des microtissus avec une architecture contrôlée pour mimer de manière très fidèle les conditions rencontrées in vivo. En effet, dans le corps, les différents types cellulaires sont souvent agencés en tissus selon une architecture spécifique qu'il est important de reproduire au mieux pour recréer une fonction au niveau d'un organe. Cette culture tridimensionnelle à architecture contrôlée peut être utilisée en vue d'une transplantation sur un patient. Il est, par exemple, possible de faire une culture de cellules alpha, productrices de glucagon, et de cellules bêta, productrices d'insuline, pour créer des ilots de Langerhans que l'on peut transplanter dans le pancréas d'un patient pour soigner son diabète. De manière similaire des hépatocytes et des cellules stellaires peuvent être associés dans le cadre d'une transplantation du foie.

L'étape (ii) peut être réalisée après agrégation des premières cellules, en particulier après formation d'un premier sphéroïde formé par adhérence des premières cellules entre elles. Si la première microgoutte contenant le premier sphéroïde est liquide, les deuxièmes cellules vont, après fusion des deux microgouttes, se mélanger au contenu de la première microgoutte puis sédimenter pour atteindre directement le premier sphéroïde. Si l'étape (iii) a lieu avant que les deuxièmes cellules aient eu le temps de

former un deuxième sphéroïde, celles-ci vont venir se déposer après sédimentation à la surface du premier sphéroïde initialement dans la première microgoutte.

L'étape (iii) peut être réalisée après agrégation des deuxièmes cellules, en particulier après formation d'un deuxième sphéroïde formé par adhérence des deuxièmes cellules entre elles. Ainsi, on peut faire fusionner le premier et le deuxième sphéroïde ensemble.

L'architecture des microtissus obtenus dépend donc des conditions expérimentales.

Le procédé peut comporter une étape additionnelle de gélification des premières microgouttes, une telle étape ayant lieu avant l'étape (iii) et préférentiellement avant l'étape (ii). Ceci permet de compartimenter les cellules. En effet, si les premières microgouttes, qui contiennent les sphéroïdes sont gélifiées avant l'arrivée des deuxièmes microgouttes, les deuxièmes cellules contenues ne pourront plus, après coalescence, entrer directement en contact avec le premier sphéroïde, par exemple des cellules mammifères ne peuvent pas traverser une matrice d'agarose à 0.9 % en masse. Les premières et les deuxièmes cellules ne peuvent alors communiquer ensemble que par voie paracrine.

Les premières et deuxièmes cellules peuvent être de types cellulaires différents.

De préférence, les premières et les deuxièmes zones de piégeage sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec les procédés ou les dispositifs selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au procédé selon cet aspect de l'invention.

Le procédé peut être mis en œuvre à l'aide de l'un des systèmes microfluidiques selon les aspects précédents.

## **VI. Cinquième aspect – Procédé de culture cellulaire**

L'invention a encore pour objet, selon un cinquième aspect, un procédé de culture cellulaire dans un système microfluidique d'au moins une première microgoutte contenant une culture cellulaire et d'au moins une deuxième microgoutte contenant un milieu de culture, le système microfluidique comportant un piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, le procédé de culture comportant les étapes consistant à :

(i) piéger la première microgoutte dans la première zone de piégeage, et

(ii) piéger la deuxième microgoutte dans la deuxième zone de piégeage,

la première et la deuxième zone de piégeage d'un même piège capillaire étant agencées pour que la première et la deuxième microgoutte soient en contact l'une avec l'autre dans

5 le piège capillaire,

(iii) fusionner la première microgoutte avec la deuxième microgoutte pour renouveler le milieu de culture de la culture cellulaire opérée dans la première microgoutte.

10 L'injection séquentielle du milieu de culture peut permettre de renouveler plusieurs fois ce dernier afin par exemple de permettre la culture de la ou des cellules dans la première microgoutte.

La deuxième microgoutte peut comporter un actif à tester afin de modéliser le caractère intermittent de la prise d'un médicament. Par exemple une goutte contenant un sphéroïde de cellules mammifères peut être fusionnée toutes les 6 heures avec une  
15 microgoutte contenant un actif à tester, notamment un médicament.

Le procédé peut comporter, après l'étape (iii), l'étape (iv) consistant à répéter les étapes (ii) et (iii) pour renouveler encore le milieu de culture de la culture cellulaire opérée dans la première microgoutte.

20 De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec les procédés ou les dispositifs selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au procédé selon cet aspect de l'invention.

25 Le procédé peut être mis en œuvre à l'aide de l'un des systèmes microfluidiques selon les aspects précédents.

#### **VII. Sixième aspect – Procédé de formation de microgouttes gélifiées**

L'invention a encore pour objet, selon un sixième aspect, un procédé de formation de microgouttes gélifiées multicouches d'au moins une première microgoutte d'un premier milieu gélifiable et d'au moins une deuxième microgoutte d'un deuxième  
30 milieu gélifiable sous forme liquide dans un système microfluidique comportant un piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, ce procédé comportant les étapes consistant à :

(i) piéger la première microgoutte dans la première zone de piégeage,

(ii) gélifier le premier milieu gélifiable dans la première zone de piégeage,

(iii) piéger la deuxième microgoutte dans la deuxième zone de piégeage,

la première et la deuxième zone de piégeage d'un même piège capillaire étant agencées pour que la première et la deuxième microgoutte soient en contact l'une avec l'autre dans

5 le piège capillaire,

(iv) fusionner la première microgoutte avec la deuxième microgoutte.

Ceci permet de former des microgouttes de gel complexe ayant des formes et/ou des propriétés mécaniques, par exemple une porosité et/ou rigidité, et/ou chimiques, par exemple une composition et/ou une concentration, variables.

10 Le procédé peut comporter une étape (v) ayant lieu avant ou après l'étape (iv) et consistant à gélifier le deuxième milieu gélifiable.

Lorsque l'étape (v) a lieu après l'étape (iv), la gélification permet de former une couche externe du deuxième gel sur la première microgoutte. Ceci permet de former des microgouttes de gel complexe ayant des propriétés mécaniques et/ou chimiques variables radialement. De telles microgouttes de gels pourraient être utilisées avec des  
15 cellules souches dont la différenciation est, notamment, contrôlée par la rigidité du gel. Des microgouttes de gels avec des couches d'hydrogels différents contenant des types cellulaires différents peuvent également permettre de modéliser les différentes couches de la peau dans le cadre de tests cosmétiques. Une microgoutte présentant un cœur de  
20 collagène et une couche externe d'agarose avec des pores suffisamment petits peut être utilisée pour créer un sphéroïde de neurones dont seuls les projections axonales peuvent s'extraire par les pores de la couche externe.

Lorsque l'étape (v) a lieu avant l'étape (iv), le deuxième milieu gélifiable est gélifié dans la deuxième zone de piégeage. Ceci permet de former des microgouttes de  
25 gel complexe ayant des formes, et/ou propriétés mécaniques et/ou chimiques variables radialement. Les microgouttes formées gardent alors la forme et l'agencement des première et deuxième microgouttes avant fusion. La disposition, la forme et le nombre des différentes zones de piégeage permettent donc de contrôler directement la forme de la microgoutte finale. De telles microgouttes peuvent permettre de modéliser des formes  
30 complexes. Les formes contrôlées des microgouttes peuvent également servir d'identifiant de ces dernières.

L'étape (v) peut avoir lieu avant ou après l'étape (iii) de piégeage dans la deuxième zone de piégeage.

L'étape (ii) peut avoir lieu avant ou après l'étape (i) de piégeage dans la première zone de piégeage.

Le procédé comporte, de préférence, une étape (vi) consistant à répéter les opérations (iii) à (v).

5 Les premier et deuxième milieux gélifiables peuvent être différents.

De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec les procédés ou les dispositifs selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer  
10 au procédé selon cet aspect de l'invention.

Le procédé peut être mis en œuvre à l'aide de l'un des systèmes microfluidiques selon les aspects précédents.

#### **VIII. Septième aspect – Procédé pour encapsuler des cellules**

L'invention a encore pour objet, selon un septième aspect, un procédé pour  
15 encapsuler au moins une première microgoutte et au moins une deuxième microgoutte dans un système microfluidique comportant un piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, l'une de la première microgoutte et de la deuxième microgoutte comportant un milieu gélifiable et l'autre comportant une pluralité de cellules, ce procédé comportant les étapes consistant à :

- 20 (i) piéger la première microgoutte dans la première zone de piégeage,  
(ii) piéger la deuxième microgoutte dans la deuxième zone de piégeage,  
la première et la deuxième zone de piégeage d'un même piège capillaire étant agencées pour que la première et la deuxième microgoutte soient en contact l'une avec l'autre dans le piège capillaire,
- 25 (iii) fusionner la première microgoutte avec la deuxième microgoutte,  
(iv) gélifier le milieu gélifiable pour encapsuler la pluralité de cellule dans le gel.

Ce procédé permet notamment d'obtenir des sphéroïdes encapsulés dans des hydrogels biologiques. En effet, pour pouvoir former des sphéroïdes dans des  
30 microgouttes de manière contrôlée, il faut pouvoir garder le contenu de la goutte liquide pendant le temps de la formation du sphéroïde. L'agarose se prête très bien à ce protocole car c'est un hydrogel thermosensible. Il reste liquide à 37 °C puis se solidifie après 30 min à 4 °C et demeure solidifié après retour à 37 °C. Seulement, les cellules mammifères ne peuvent pas adhérer sur l'agarose et elles ne peuvent pas non plus le digérer. Cette

matrice est donc très différente de la matrice extracellulaire rencontrée dans le corps. L'utilisation d'hydrogels tels que par exemple le collagène de type I, la fibronectine, le Matrigel® ou la gélatine pourrait être préférable pour mieux mimer les conditions naturelles. Seulement, le contrôle de leur gélification est plus ardu. On ne peut par exemple pas garder du collagène de type I liquide pendant longtemps avec des conditions favorables à la culture de cellules (basse température ou pH acide). Si l'on encapsule des cellules dans une goutte de collagène que l'on fait gélifier rapidement après piégeage les cellules, plutôt qu'adhérer entre elles et former un sphéroïde, les cellules vont adhérer au collagène et migrer individuellement le long de ses fibres.

10 Ce problème peut être résolu grâce au procédé ci-dessus. En effet, on peut encapsuler des cellules dans les premières microgouttes liquides au sein de la première zone de piégeage de sorte à former un sphéroïde. On peut ensuite apporter des deuxièmes microgouttes qui vont se loger dans la deuxième zone de piégeage et qui contiennent un des hydrogels biologiques mentionné plus haut, notamment en forte concentration. Une fois ces deuxièmes microgouttes piégées on fait immédiatement fusionner première et deuxième microgouttes en contact et l'hydrogel biologique, encore liquide, va se mélanger avec la première microgoutte qui contient le sphéroïde. La gélification peut ensuite avoir lieu et va donc encapsuler le sphéroïde dans une matrice extracellulaire représentative des conditions biologiques rencontrées in vivo.

20 L'étape (ii) peut être réalisée après agrégation des premières cellules, en particulier après formation d'un sphéroïde formé par adhérence des premières cellules entre elles.

De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

25 Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec les procédés ou les dispositifs selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au procédé selon cet aspect de l'invention.

Le procédé peut être mis en œuvre à l'aide de l'un des systèmes microfluidiques selon les aspects précédents.

### 30 IX. Huitième aspect – Procédé de dilution

L'invention a encore pour objet, selon un huitième aspect, un procédé de dilution d'un composé d'intérêt dans un système microfluidique comportant un premier piège capillaire comportant une première zone de piégeage et n deuxièmes zones de piégeage et un deuxième piège capillaire comportant une première zone de piégeage et p

deuxièmes zones de piégeage,  $n$  étant différent de  $p$ , ce procédé comportant les étapes consistant à:

- (i) piéger une première microgoutte comportant le composé d'intérêt dans chaque première zone de piégeage, les premières microgouttes étant de même concentration en composé d'intérêt, puis à
- (ii) piéger une deuxième microgoutte d'un composé de dilution dans chaque deuxième zone de piégeage,

la première et les deuxième zones de piégeage d'un même piège capillaire étant agencées pour que chaque deuxième microgoutte soit en contact avec au moins une de la première ou des deuxièmes microgouttes du même premier ou deuxième piège capillaire et pour que, dans chacun du premier et du deuxième piège capillaire, au moins une des deuxièmes microgouttes soit en contact avec la première microgoutte du même premier ou deuxième piège capillaire, puis à

- (iii) fusionner les premières et deuxièmes microgouttes en contact entre elles de sorte à obtenir des microgouttes de concentrations différentes dans le premier et le deuxième piège capillaire.

Si les premières gouttes contiennent un composé d'intérêt à concentration constante, on peut obtenir un gradient spatial de concentration après la coalescence avec les deuxièmes microgouttes qui peuvent par exemple contenir un diluant. Un tel procédé peut permettre d'obtenir un panel de microgouttes avec des concentrations contrôlées différentes, à partir de microgouttes de même concentration. Cela peut avoir un intérêt par exemple pour former un panel de microgouttes de concentrations différentes pour être utilisée en la chimie combinatoire, dans l'étude la cristallisation des protéines, dans un procédé ultérieur de titrage d'une espèce chimique, ou dans la personnalisation d'un traitement, notamment dans le cas du cancer.

De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage de chaque piège capillaire sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec les procédés ou les dispositifs selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au procédé selon cet aspect de l'invention.

Le procédé peut être mis en œuvre par le système microfluidique de dilution de microgouttes comportant un premier piège capillaire comportant une première zone de piégeage et  $n$  deuxièmes zones de piégeage et un deuxième piège capillaire comportant

une première zone de piégeage et p deuxièmes zones de piégeage, n étant différent de p, le premier et deuxième piège capillaire étant configurés pour que les deuxièmes microgouttes piégées dans chacune des deuxièmes zones de piégeage soient en contact avec la première microgoutte piégée dans la première zone de piégeage correspondante dans le premier et le deuxième piège capillaire.

De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage de chaque piège capillaire sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec les systèmes microfluidique selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au système microfluidique selon cet aspect de l'invention.

#### **X. Neuvième aspect – Procédé de criblage**

L'invention a encore pour objet, selon un neuvième aspect, un procédé de criblage d'une pluralité de premières microgouttes avec une pluralité de deuxièmes microgouttes dans un système microfluidique comportant une pluralité de pièges capillaires, chaque piège capillaire présentant une première zone de piégeage et une deuxième zone de piégeage, les premières microgouttes formant un premier panel de microgouttes identiques ou dont au moins y sont différentes et les deuxièmes microgouttes formant un deuxième panel de microgouttes dont au moins z sont différentes, le procédé comportant les étapes consistant à :

- (i) piéger une première microgoutte dans chaque première zone de piégeage, et
- (ii) piéger une deuxième microgoutte dans chaque deuxième zone de piégeage,

la première et la deuxième zone de piégeage de chaque piège capillaire étant agencées pour que la première et la deuxième microgoutte piégée dans ledit piège capillaire soient en contact l'une avec l'autre dans ce dernier,

- (iii) fusionner chaque première microgoutte avec la deuxième microgoutte à son contact de sorte à obtenir dans le système microfluidique un panel de microgouttes correspondant chacune à une combinaison parmi les différentes combinaisons de premières et deuxièmes microgouttes possibles.

Un tel procédé permet de cribler un grand nombre de conditions de réactions rapidement dans un seul système microfluidique

Le fait que les microgouttes soient statiques durant la réaction facilite l'obtention de données cinétiques. On tire aussi partie de l'économie en composés obtenue grâce à l'utilisation de volumes très faibles dans les microgouttes.

5 Le premier panel de microgouttes peut comporter des microgouttes différentes au moins par leur contenu, notamment leur concentration en un premier composé d'intérêt.

Le deuxième panel de microgouttes peut comporter des microgouttes différentes au moins par leur contenu, notamment leur concentration en un deuxième composé d'intérêt.

10 Les premières ou deuxièmes microgouttes peuvent être obtenues par le procédé selon le neuvième aspect de l'invention.

Les premier et deuxième composés peuvent être des composés qui réagissent ensemble et dont on cherche à optimiser les concentrations initiales. Ainsi on va pouvoir réaliser plusieurs réactions en parallèles sur un petit volume afin de déterminer les  
15 concentrations en composés initiales donnant les meilleurs résultats.

De préférence, le procédé comporte une étape supplémentaire (iv) d'observation ou de mesure, notamment par la prise d'une image, par une mesure colorimétrique, de fluorescence, spectroscopique (UV, Raman) ou de température, avant l'étape (iii). Une telle étape permet de faire une cartographie de la disposition des  
20 différentes microgouttes.

De préférence, le procédé comporte une étape supplémentaire (v) d'observation ou de mesure, notamment par la prise d'une image, par une mesure colorimétrique, de fluorescence, spectroscopique (UV, Raman) ou de température, après l'étape (iii).

25 En variante, le premier panel de microgouttes comporte des protéines, les premières microgouttes étant identiques, et le deuxième panel de microgouttes comporte à différentes concentrations une solution permettant la cristallisation des protéines, notamment une solution saline. Le procédé peut alors permettre d'étudier la cristallisation des protéines en fonction de la concentration en solution de cristallisation. En effet, les  
30 conditions de cristallisation optimales varient d'une protéine à l'autre.

En variante encore, le premier panel de microgouttes comporte un composé, les premières microgouttes étant identiques et le deuxième panel de microgouttes comporte à différentes concentrations une espèce titrante. Cette application peut être

particulièrement intéressante dans le cas du dosage de réactifs chers ou disponibles en faibles quantités.

En variante encore, le premier panel de microgouttes comporte une ou plusieurs cellules et les deuxièmes microgouttes comporte chacune un médicament à  
5 cribler à une concentration déterminée.

Dans une configuration similaire on réalise la culture de cellules du foie sous forme de sphéroïdes dans les premières microgouttes et l'apport dans chacune des deuxièmes zones de piégeage d'une deuxième microgoutte contenant un médicament avec des concentrations différentes, dont on cherche à évaluer la toxicité.

10 En analysant les résultats de viabilité quelques jours après la coalescence des microgouttes, la concentration qui tue la moitié de la population cellulaire peut être déterminée.

Ce procédé peut aussi permettre d'évaluer les interactions entre différents antibiotiques. Il est possible de créer des microgouttes formant un panel de microgouttes  
15 ayant des concentrations en antibiotique A et B différentes et les faire fusionner avec des microgouttes contenant des bactéries. Les microgouttes contenant les bactéries peuvent former un panel de microgouttes de concentrations en bactéries différentes. Ceci permet de faire varier trois paramètres différents dans une seule chambre de piégeage, à savoir la concentration en antibiotique A, la concentration en antibiotique B et la concentration  
20 initiale en bactéries.

L'utilisation de la microfluidique permet en outre l'utilisation de très faibles volumes, ce qui peut être très avantageux dans le cadre d'échantillons rares tels que des cellules issues d'une biopsie. Le système peut par exemple être utilisé dans le cadre de la médecine personnalisée et du traitement du cancer. Grâce à ce système on peut mettre en  
25 culture, par exemple sous forme de sphéroïdes dans les premières microgouttes, des cellules tumorales d'un patient qui a subi une biopsie et les soumettre à différents actifs à des concentrations multiples via l'apport des deuxièmes microgouttes. Après fusion des couples de microgouttes cellules-actifs, on peut déterminer quel actif va être le plus efficace, et en quelle concentration, pour un patient en particulier, en n'utilisant qu'une  
30 seule puce et un nombre minimal de cellules issues de la biopsie.

De préférence, la première et la deuxième zone de piégeage d'un même piège capillaire sont conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes soient différentes.

Une ou plusieurs des caractéristiques décrites précédemment en lien avec les procédés ou les dispositifs selon les aspects précédents de l'invention peuvent s'appliquer au procédé selon cet aspect de l'invention.

Le procédé peut être mis en œuvre à l'aide de l'un des systèmes  
5 microfluidiques selon les aspects précédents.

L'invention pourra être mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre d'exemples de mise en œuvre non limitatifs de l'invention, en regard du dessin ci-annexé, sur lequel :

- 10 - la figure 1A illustre en section transversale un piège capillaire selon l'invention,
- la figure 1B est une vue du dessus selon I du piège capillaire de la figure 1A,
- la figure 2 représente de façon schématique en vue du dessus le piège capillaire de la figure 1 après piégeage de deux microgouttes,
- 15 - les figures 3 et 4 sont, en vue du dessus, des variantes de piège capillaire avec des microgouttes,
- la figure 5A représente en section transversale une variante de piège capillaire,
- 20 - la figure 5B est une vue du dessus selon V du piège capillaire de la figure 5A,
- les figures 6 à 44 sont des variantes, en vue du dessus, de pièges capillaires avec des microgouttes,
- les figures 45 à 47 sont, en section transversale, des variantes de pièges capillaires avec des microgouttes,
- 25 - la figure 48 représente, en section transversale, une variante de piège capillaire,
- la figure 49 représente, de façon schématique, en vue du dessus, une chambre de piégeage,
- 30 - la figure 50 représente de façon schématique, en vue du dessus, une chambre de piégeage,
- la figure 51 est une vue, en section transversale, d'un piège capillaire,
- la figure 52 est une représentation schématique d'un procédé selon l'invention,

- la figure 53 illustre une variante de procédé de manipulation des microgouttes dans un piège capillaire selon l'invention,
- les figures 54 à 59 illustrent des variantes de procédés de manipulation de microgouttes dans un piège capillaire selon l'invention,
- 5 - les figures 60 à 62 illustrent des exemples de mise en œuvre de l'invention, et
- les figures 63 à 65 illustrent, en vue du dessus, des variantes de pièges capillaires.

10 L'invention se rapporte à un procédé de manipulation d'au moins une première et une deuxième microgoutte dans un système microfluidique.

Le système microfluidique 5 comporte une paroi supérieure 7 et une paroi inférieure 8 formant entre elles un canal 9 de circulation des microgouttes et au moins un piège capillaire 12.

#### Piège capillaire

15 Dans l'exemple illustré sur les figures 1A et 1B, le piège capillaire 12 forme, en section transversale du système microfluidique, une cavité dans la paroi inférieure 8 de hauteur constante dans laquelle des microgouttes peuvent se loger. Il présente, en vue du dessus, une première zone de piégeage 15 de forme circulaire sur laquelle est adossée une deuxième zone de piégeage 18 de forme triangulaire.

20 La première et la deuxième zones de piégeage 15 et 18 exercent des forces de piégeage différentes sur une microgoutte donnée, en particulier du fait de leur différence de forme. Ici, la première zone de piégeage 15 exerce une force de piégeage plus grande que la deuxième zone de piégeage 18.

25 Lors de l'introduction d'une première microgoutte 20 dans le système microfluidique, cette dernière est piégée dans la zone de piégeage ayant, pour cette microgoutte, la plus grande force de piégeage, ici la première zone de piégeage 15. Lors de l'introduction de la deuxième microgoutte 25, cette dernière est piégée dans la zone de piégeage libre, ici la deuxième zone de piégeage 18, comme cela est illustré sur la figure 2.

30 Sur les figures, les premières microgouttes 20 sont représentées en noir et les deuxièmes microgouttes 25 sont représentées transparentes sans pour autant que cela représente une différence de contenu particulière entre les deux microgouttes.

La première zone de piégeage 15 présente un diamètre  $\alpha$  sensiblement égal au diamètre apparent  $D_1$ , en vue du dessus, de la première microgoutte 20, une fois piégée dans la première zone de piégeage.

Les deux microgouttes piégées 20 et 25 sont en contact l'une avec l'autre du fait notamment de la faible distance entre les deux zones de piégeage 15 et 18 relativement aux diamètres des deux microgouttes 20 et 25. De plus, les deux microgouttes 20 et 25 sont maintenues en contact du fait de la forme triangulaire de la deuxième zone de piégeage 18. En effet, la deuxième microgoutte 25, en étant en contact avec deux parois opposées 27 et 28 de la deuxième zone de piégeage 18 s'éloignant l'une de l'autre en direction de la première zone de piégeage 15, est entraîné, par sa tendance naturelle à toujours minimiser son énergie de surface, à se déplacer en translation entre les deux parois opposées 27 et 28 en direction de l'élargissement des parois 27 et 28, c'est à dire vers la première zone de piégeage 15 et donc la première microgoutte 20.

Sur les figures 1A et 2, les deux parois 27 et 28 forment entre elles un angle de divergence  $\alpha$  sensiblement égal à  $45^\circ$ .

Dans l'exemple illustré sur la figure 2, la première microgoutte 20 présente un diamètre  $D_1$  plus grand que celui  $D_2$  de la deuxième microgoutte 25.

La deuxième zone de piégeage 18 exerce sur la deuxième microgoutte 25 une force de piégeage plus grande que celle qu'elle exercerait sur la première microgoutte 20. En effet, bien que le design de la deuxième zone de piégeage soit le même quel que soit le diamètre de la microgoutte, le diamètre de la deuxième microgoutte 25 s'adapte mieux à la forme et à la taille de la deuxième zone de piégeage 18 que celui de la première microgoutte 20. Mais il peut en être autrement et la deuxième microgoutte 25 peut être de même diamètre que la première microgoutte 20.

En variante, la première et la deuxième microgoutte 20 et 25 sont différentes l'une de l'autre par une autre de leur propriétés, notamment leur état de surface, leur viscosité ou leur poids.

En variante illustré sur les figures 3 et 4, le piège capillaire 10 comporte deux cavités disjointes juxtaposées formant respectivement la première zone de piégeage 15 de forme circulaire et la deuxième zone de piégeage 18 de forme triangulaire. Les deux zones de piégeage 15 et 18 du piège capillaire sont suffisamment proches pour que les deux microgouttes 20 et 25 piégées soient en contact l'une avec l'autre. De préférence, la distance  $e$  entre les centres de gravité des zones de piégeage 15 et 18 est inférieure,

comme illustré sur la figure 4, ou égale, comme illustré sur la figure 3, à la somme  $S_R$  des rayons des deux microgouttes.

En variante encore illustré sur les figures 5A et 5B, la première zone de piégeage peut être de forme hexagonale et la première zone de piégeage 15 peut présenter une hauteur  $h_1$  différente de celle  $h_2$  de la deuxième zone de piégeage 18, notamment  $h_1$  est supérieure à  $h_2$ . La première zone de piégeage 15 exerce alors une force de piégeage plus grande que la deuxième zone de piégeage 18.

En variante illustré sur la figure 6, la deuxième zone de piégeage 18 a la forme d'un long triangle présentant un angle de divergence  $\alpha$  faible, ici sensiblement égale à  $10^\circ$ , permettant de piéger un chapelet de deuxièmes microgouttes 25, ici deux deuxièmes microgouttes 25a et 25b, en contact entre elles. On peut alors considérer que la deuxième zone de piégeage 18 est en fait composé de deux deuxièmes zones de piégeage 18a et 18b permettant de piéger chacune une deuxième microgoutte 25a et 25b. La deuxième microgoutte 25a est ici reliée à la première goutte 20 par l'intermédiaire de la deuxième microgoutte 25b. Les forces de piégeage qu'exerce les deuxièmes zones de piégeage 18a et 18b sur les deuxièmes microgouttes 25a et 25b peuvent être différentes en fonction de leurs positions. Ici, la deuxième zone de piégeage 18b exerce une force de piégeage plus forte sur la deuxième microgoutte 25b la plus proche de la première zone de piégeage 15. Mais il pourrait en être autrement selon la forme de la deuxième zone de piégeage 18.

En variante non illustré, les deux deuxièmes zones de piégeage 18a et 18b peuvent exercer des forces identiques sur les deuxièmes microgouttes 25a et 25b piégées.

En variante non illustré, le piège capillaire peut présenter plus de deux deuxièmes zones de piégeages configurées pour former un chapelet de deuxièmes microgouttes piégées lui-même en contact, par au moins une des deuxièmes microgouttes le formant, avec la première microgoutte piégée dans la première zone de piégeage.

Il est ainsi possible d'envisager des formes de pièges capillaires plus complexes comportant une pluralité de zones de piégeage configurées pour que les microgouttes piégées soient toutes reliées entre elles directement ou par l'intermédiaire des autres microgouttes.

En variante illustré sur les figures 7 à 9, le piège capillaire 12 présente une pluralité de deuxièmes zones de piégeage 18 identiques réparties autour de la première zone de piégeage 15 de sorte que chaque deuxième microgoutte 25 piégée par une des deuxièmes zones de piégeage 18 soit en contact avec la première microgoutte 20.

Les deuxièmes zones de piégeage 18 peuvent être équiréparties autour de la première zone de piégeage 15 comme cela est illustré. Mais il peut en être autrement.

En variante illustré sur la figure 10, le piège capillaire 12 présente une pluralité de premières zones de piégeage 15 disposées de sorte que les premières  
5 microgouttes piégées par ces dernières sont chacune en contact avec au moins une autre première microgoutte et une pluralité de deuxième zone de piégeage 18. Ici, le piège capillaire 12 présente deux premières zones de piégeage 15 accolées et deux deuxième zones de piégeage, une accolée à chaque première zone de piégeage.

En variante illustré sur la figure 11, le piège capillaire 12 peut présenter une  
10 pluralité de deuxièmes zones de piégeage 18a et 18b de formes différentes. Les deuxièmes zones de piégeages peuvent être destinées à recevoir des deuxièmes microgouttes 25a et 25b différentes. Par exemple, comme illustré, le piège capillaire présente une deuxième zone de piégeage 18a formant une unique cavité avec la première zone de piégeage 15 et une deuxième zone de piégeage 18b disjointe de la première zone de piégeage 15. Les  
15 deuxièmes zones de piégeage 18a et 18b exercent des forces de piégeage différentes sur une même microgoutte. La deuxième zone de piégeage 18a est destinée à piéger une deuxième microgoutte 25a de diamètre plus grand que celui de la deuxième microgoutte 25b piégée par la deuxième zone de piégeage 18b.

L'invention n'est pas limitée aux exemples de forme du piège capillaire 12  
20 décrits ci-dessus. Le piège capillaire 12 peut prendre différentes formes, notamment en fonction de l'application recherchée. Les figures 12 à 45 illustrent des formes envisageables.

Par exemple, comme illustré sur la figure 12, la première zone de piégeage 15 peut être de forme polygonale, notamment carré, et la deuxième zone de piégeage 18 de  
25 forme triangulaire et accolée à un côté du carré.

En variante illustré à la figure 13, la deuxième zone de piégeage 18 est accolée à un angle du carré formant la première zone de piégeage 15.

En variante encore illustré sur la figure 14, la deuxième zone de piégeage 18 est de forme rectangulaire, notamment carré.

30 Comme illustré sur la figure 15, la deuxième zone de piégeage 18 peut s'élargir en direction de la première zone de piégeage 15 et présenter des parois opposées 27 et 28 présentant en vue de dessus un profil courbe, la deuxième zone de piégeage 18 s'effilant vers son extrémité.

Comme illustré sur la figure 16, le piège capillaire 12 peut présenter une forme de cœur, les lobes du cœur formant deux premières zones de piégeage 15 et la pointe du cœur formant la deuxième zone de piégeage 18.

Comme illustré sur la figure 17, la première zone de piégeage 15 peut être de forme pentagonale, la deuxième zone de piégeage 18 s'étendant à partir d'un coin du pentagone.

Comme illustré sur la figure 18, le piège capillaire 12 peut être de forme hexagonale, la deuxième zone de piégeage 18 s'étendant à partir d'un côté de l'hexagone.

La première zone de piégeage 15 peut être de forme carré, comme illustré sur la figure 19, ou de forme circulaire, comme illustré sur la figure 20, et la deuxième zone de piégeage 18 peut être de forme circulaire.

En variante, la deuxième zone de piégeage 18 est de forme triangulaire mais raccordé à la première de piégeage 15 par un de ses angles, comme illustré sur la figure 21. La deuxième zone de piégeage 18 s'élargit donc vers l'extérieur.

En variante encore, la deuxième zone de piégeage 18 est de forme polygonale, notamment hexagonale, comme illustré sur la figure 22.

En variante encore, le piège capillaire 12 peut comporter deux deuxièmes zones de piégeage 18 accolées à la première zone de piégeage 15 à des angles opposés de cette dernière, comme illustré sur la figure 33.

Comme illustré sur la figure 23, le piège capillaire 12 peut présenter une première zone de piégeage 15 de forme ovale et deux deuxièmes zones de piégeage 18 de forme triangulaire accolées à la première zone de piégeage et s'étendant en regard l'une de l'autre de part et d'autre de cette dernière à partir des grands côtés de l'ovale.

En variante illustré sur la figure 34, les deuxièmes zones de piégeage 18 sont de la même forme que celle de la figure 15

Comme illustré sur la figure 24, le piège capillaire 12 peut présenter deux deuxièmes zones de piégeage 18 non équiréparties autour de la première zone de piégeage 15 mais formant entre elles un angle d'écartement  $\beta$ .

La première zone de piégeage 15 peut être de forme rectangle et la deuxième zone de piégeage 18 de forme carré accolée à la première zone de piégeage 15 par un petit côté du rectangle. Selon la taille des premières microgouttes 20, la première zone de piégeage 15 peut alors piéger une unique première microgoutte 20, comme illustré sur la figure 25, ou une pluralité de premières microgouttes 20, comme illustré sur la figure 26

En variante illustré sur la figure 27, la deuxième zone de piégeage 18 peut être accolée à la première zone de piégeage 15 par un des grand côté du rectangle.

La première zone de piégeage 15 peut être de forme ovale et la deuxième zone de piégeage 18 accolé à cette dernière à partir de son grand côté, comme illustré sur la figure 28, ou par son petit côté, comme illustré sur la figure 29.

Le piège capillaire peut comporter une pluralité de deuxièmes zones de piégeage 18, dont au moins deux sont différentes, notamment par leurs tailles, comme cela est illustré sur la figure 30.

Dans l'exemple illustré sur la figure 31, le piège capillaire 12 présente une forme de courge calebasse dont la base forme la première zone de piégeage 15 et la tête forme la deuxième zone de piégeage 18.

En variante illustré sur la figure 32, le piège capillaire 12 est de forme triangulaire, la partie proche de la base plus large formant la première zone de piégeage 15 et la pointe formant la deuxième zone de piégeage 18.

Dans l'exemple illustré sur la figure 35, la première zone de piégeage 15 est de forme carré et le piège capillaire 12 présente deux deuxièmes zones de piégeage 18 de même forme carrée accolées chacune par un de leur coin à un coin de la première zone de piégeage 15.

Dans les exemples illustré sur les figures 36 à 41, le piège capillaire 12 présente trois deuxièmes zones de piégeage 18, la première et les deuxièmes zones de piégeage 15 et 18 pouvant avoir chacune toute les formes décrites précédemment.

Dans les exemples illustrés sur les figures 42 à 44, le piège capillaire 12 présente une pluralité de deuxièmes zones de piégeage différentes par leurs formes. Par exemple, une des deuxièmes zones de piégeage 18a est de forme triangulaire et l'autre des deuxièmes zones de piégeage 18b est de forme rectangle, le rectangle étant suffisamment long pour former une pluralité de deuxièmes zones de piégeage et piéger un chapelet de deuxième microgoutte 25, comme cela est illustré sur la figure 42, ou les deuxièmes zones de piégeage peuvent avoir les formes décrites précédemment.

En coupe transversale, la première zone de piégeage 15 et la deuxième zone de piégeage 18 peuvent être de hauteur constante sur toute leur largeur.

En variante illustré sur la figure 45, la première zone de piégeage 15 présente, en coupe transversale, un bord incliné vers le fond de la cavité.

En variante encore illustré sur la figure 46, la deuxième zone de piégeage 18 présente une paroi inclinée vers la première zone de piégeage. Ceci permet notamment de maintenir la deuxième microgoutte 25 en contact avec la première microgoutte 20.

En variante encore illustré sur la figure 47, la première et la deuxième zone de piégeage présente au moins une paroi inclinée.

En variante illustré sur la figure 48, le piège capillaire 12 est formé au moins partiellement par une cavité de la paroi supérieure 7 du système microfluidique.

En variante, le piège capillaire 12 est formé au moins partiellement par une cavité d'une des parois latérales du système microfluidique.

En variante illustré sur la figure 47, le piège capillaire est formé à la fois par une cavité de la paroi inférieure 8 et de la paroi supérieure 7.

En variante illustré sur les figures 63 à 65, le piège capillaire est anisotrope et il comporte une pluralité de zones de piégeage présentant une même force de piégeage, de sorte que le piège capillaire piège une pluralité de microgouttes identiques dans ses différentes zones. Par exemple, comme illustré sur les figures 61 et 62, le piège capillaire 12 peut être de forme sensiblement triangulaire et piéger, selon la taille des microgouttes, 3 ou 4 microgouttes identiques. En variante illustré sur la figure 63, le piège capillaire 12 présente une forme en étoile à cinq branches et peut piéger 5 ou 6 microgouttes identiques.

## **Dispositif microfluidique**

Le canal 9 de circulation des microgouttes peut comporter une pluralité de pièges capillaires 12.

En particulier, le canal 9 peut comporter une chambre de piégeage 30 bidimensionnelle dans laquelle les pièges capillaires 12 sont répartis spatialement selon deux directions spatiales en tableau ou matrice, comme cela est illustré sur la figure 49. Sur cette figure, les pièges capillaires 12 sont agencés à égale distance les uns des autres sous forme d'une pluralité de rangées, mais il peut en être autrement. Ils peuvent être disposés selon n'importe quel schéma, périodique ou non.

Le nombre de pièges capillaires 12 dans la chambre de piégeage 30 peut aller d'un seul par chambre à plusieurs milliers par  $\text{cm}^2$ .

La distance  $p$  définie entre les centres de gravité des pièges capillaires 12 est de préférence supérieure ou égale à la taille des microgouttes les plus grosses destinées à être piégées, notamment supérieure ou égale au diamètre apparent, en vue du dessus,

d'une première goutte confiné dans le canal entre les parois 7 et 8 en dehors des piège capillaire, par exemple compris entre 20  $\mu\text{m}$  et 1 cm .

Le nombre de pièges capillaires peut être supérieur ou égal à 200 pièges capillaires par  $\text{cm}^2$ , mieux 2000 pièges capillaires par  $\text{cm}^2$ . Ainsi on peut réaliser la  
 5 combinaison contrôlée de microgouttes dans des centaines, voire des dizaines de milliers de pièges en parallèle dans la même chambre de piégeage 30.

Les pièges capillaires 12 peuvent être tels que décrits précédemment.

Les pièges capillaires 12 peuvent tous être identiques.

En variante, au moins deux pièges capillaires 12 peuvent être différents,  
 10 notamment par leurs formes, tailles, hauteurs ou orientations, ou par le nombre, la forme, la hauteur ou l'orientation des première(s) et deuxième(s) zones de piégeage 15 et 18. Ceci permet d'avoir des conditions différentes en fonction du piège capillaire 12.

En variante non illustré, le canal 9 peut être unidimensionnel et comporter une rangée de pièges capillaires 12 réparties sur sa longueur.

15 L'invention n'est pas limitée aux formes de système microfluidique décrits ci-dessus. Le système microfluidique peut prendre différentes formes, notamment en fonction de l'application recherchée.

### Microgouttes

De préférence, le canal 9 est rempli d'un fluide dans lequel les microgouttes  
 20 ne sont pas miscibles. Ce fluide peut être immobile ou en mouvement. Lorsque ce dernier est en mouvement, le flux de fluide est, de préférence, orienté selon des lignes de circulation de fluide (non représentée) et circule d'une entrée de fluide 31 à une sortie de fluide 32.

Les microgouttes sont, par exemple, des microgouttes aqueuses dans un  
 25 liquide huileux ou des microgouttes d'huile dans un liquide aqueux.

De préférence, les premières et deuxièmes microgouttes 20 et 25 présentent des diamètres  $D_1$  et  $D_2$  de l'ordre du micromètre, notamment compris entre 20 et 5000  $\mu\text{m}$ .

Les premières microgouttes 20 sont, de préférence, différentes des deuxièmes  
 30 microgouttes 25, notamment de par leurs tailles et/ou leurs compositions.

Les premières microgouttes 20, respectivement les deuxièmes microgouttes 25, peuvent former un panel de microgouttes dont au moins un certains nombres sont différentes.

Les premières et/ou les deuxièmes microgouttes 20 et 25 peuvent comporter un composé d'identification permettant leur identification avant, pendant et/ou après la coalescence des première(s) et deuxième(s) microgouttes 20 et 25 en contact. Ce ou ces composés d'identification peuvent être par exemple des billes ou des particules en un certain nombre, des composés de couleurs ou de formes variées ou des composés émettant un signal colorimétrique ou de fluorescence proportionnelle à leur concentration dans la microgoutte. Dans le cas d'un panel de premières microgouttes et/ou d'un panel de deuxièmes microgouttes comportant un composé d'intérêt dans des concentrations différentes et/ou des composés d'intérêt différents, il est ainsi possible d'associer la position d'une première et/ou deuxième microgoutte dans la chambre de piégeage avec sa composition afin d'établir une cartographie des microgouttes piégées dans la chambre de piégeage.

En variante, le ou les composés d'identification des premières microgouttes interagissent avec un ou plusieurs composés d'identification des deuxièmes microgouttes de sorte à permettre l'identification de la microgoutte obtenue après fusion. Par exemple, la fusion des microgouttes peut entraîner une réaction chimique dont au moins un des produits peut être identifié.

De préférence, le canal 9 est rempli d'un fluide contenant un surfactant. Ce dernier permet la stabilisation des microgouttes et la reproductibilité de leur formation. Les surfactants permettent de plus d'empêcher la coalescence spontanée des microgouttes en cas de contact pendant leur acheminement du dispositif de production aux pièges capillaires ou dans les pièges capillaires.

Le surfactant est, par exemple, pour des microgouttes aqueuses un composé choisi parmi le PEG-di-Krytox dans une huile fluorée ou le SPAN®80 dans une huile minérale.

Le surfactant est, par exemple, pour des microgouttes d'huile du sodium dodecyl sulfate.

En variante, les microgouttes sont stabilisées par un autre moyen, notamment les microgouttes peuvent être gélifiées, ou stabilisé par adsorption de nanoparticule amphiphiles comme cela est décrit dans l'article de Pan, M., Rosenfeld, L., Kim, M., Xu, M., Lin, E., Derda, R., & Tang, S. K. Y. (2014). Fluorinated Pickering Emulsions Impede Interfacial Transport and Form Rigid Interface for the Growth of Anchorage-Dependent Cells. *Applied Materials & Interfaces*, 6, 21446–21453.

### Procédé de manipulation

Un exemple de procédé de manipulation des premières et deuxièmes microgouttes est illustré sur la figure 52.

Dans l'étape 40, les premières microgouttes 20 sont produites. De nombreux procédés ont déjà été proposés pour former de telles premières microgouttes dans une phase mobile. On peut par exemple citer les exemples de procédé :

- a) procédé dit de « flow-focusing » décrit par exemple dans S.L. Anna, N. Bontoux et H.A. Stone, « Formation of dispersions using 'Flow-Focusing' in microchannels », *Appl. Phys. Lett.* 82, 364 (2003),
- 10 b) procédé dit de « step emulsification » décrit par exemple par R. Seemann, M. Brinkmann, T. Pfohl, and S. Herminghaus, dans "Droplet based microfluidics," *Rep. Prog. Phys.*, vol. 75, no. 1, p. 016601, Jan. 2012,
- 15 c) procédé combinant les procédés de « flow-focusing » et de « step emulsification », décrit par exemple par V. Chokkalingam, S. Herminghaus, and R. Seemann, dans "Self-synchronizing pairwise production of monodisperse droplets by microfluidic step emulsification," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 93, no. 25, p. 254101, 2008,
- 20 d) procédé dit à « jonction en T » décrit par exemple par G. F. Christopher and S. L. Anna, dans "Microfluidic methods for generating continuous droplet streams," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 19, pp. R319–R336, Oct. 2007,
- 25 e) procédé dit « à gradient de confinement » décrit par exemple par R. Dangla, S. C. Kayi, and C. N. Baroud, dans "Droplet microfluidics driven by gradients of confinement," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 3, pp. 853–8, Jan. 2013., ou
- 30 f) Procédé de « micro-segmented flows » décrit par exemple par A. Funfak, R. Hartung, J. Cao, K. Martin, K. H. Wiesmüller, O. S. Wolfbeis, and J. M. Köhler, dans "Highly resolved dose-response functions for drug-modulated bacteria cultivation obtained by fluorometric and photometric flow-through sensing in microsegmented flow," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 142, no. 1, pp. 66–72, 2009, dans lequel deux solutions en proportions différentes et contrôlées sont mélangées au niveau d'une fonction hors du

système microfluidique pour former des gouttes microlitriques séparées par une phase immiscible puis procédé de division de ces gouttes en microgouttes en les injectant par exemple dans un système microfluidique contenant une pente.

5 Ces procédés permettent notamment de former une pluralité de microgouttes de dimensions sensiblement égales. Les dimensions des microgouttes obtenues peuvent être contrôlées en modifiant les paramètres de formation des microgouttes, notamment la vitesse de circulation des fluides dans le dispositif et/ou la forme du dispositif.

10 La production des premières microgouttes 20 peut être faite sur le même système microfluidique que le procédé ou sur un dispositif différent. Dans ce dernier cas, les premières microgouttes 20 peuvent être stockées dans un ou plusieurs récipients extérieurs avant d'être injectées dans le système microfluidique. Ces premières microgouttes 20 peuvent être toutes identiques ou certaines d'entre elles peuvent être de différentes compositions, concentrations et/ou tailles.

15 Après formation de ces premières microgouttes 20, ces dernières peuvent être acheminées jusqu'au piège capillaires 12 par entraînement par un flux d'un fluide et/ou par des pentes ou des reliefs en forme de rails du canal 9. Dans les deux cas, l'addition de rails peut permettre d'optimiser le remplissage des pièges capillaires 12, de manière sélective, par exemple en combinaison avec l'utilisation d'un laser infra-rouge, comme  
20 cela est décrit par E. Fradet, C. McDougall, P. Abbyad, R. Dangla, D. McGloin, and C. N. Baroud, dans "*Combining rails and anchors with laser forcing for selective manipulation within 2D droplet arrays.*," *Lab Chip*, vol. 11, no. 24, pp. 4228–34, Dec. 2011.

25 Si la production des microgouttes est réalisée hors du système microfluidique, leur transport du stockage au système microfluidique peut se faire directement via un tube reliant par exemple le système de production et le système de piégeage ou par aspiration et injection avec une seringue.

30 Les premières microgouttes 20 sont entraînées dans le système microfluidique de sorte que la force d'entraînement qu'elles subissent soit inférieure à la force de piégeage des premières zones de piégeage 15 sur les premières microgouttes 20. Les premières microgouttes 20 sont alors piégées, dans l'étape 42, dans les pièges capillaire 12, en particulier dans les premières zones de piégeage 15. Si le flux d'entraînement exerce sur les premières microgouttes 20 une force d'entraînement sur les premières microgouttes 20 supérieure à la force de piégeage des deuxièmes zones de

piégeage 18, ces dernières ne sont pas piégées dans les deuxièmes zones de piégeage 18 qui restent libres.

Dans le cas contraire, les premières microgouttes 20 peuvent être piégées dans les deuxièmes zones de piégeage 18, en particulier si les tailles des pièges et des gouttes sont adaptées. Il est alors possible de les chasser de ces dernières en augmentant la force d'entraînement appliquée à l'ensemble des premières microgouttes 20, par exemple en augmentant la vitesse du flux de fluide ou, lorsqu'il n'y en a pas, en ajoutant un flux de fluide dans une étape 44.

En variante, les premières microgouttes 20 peuvent être formées par un procédé dit de « cassage des gouttes dans des pièges capillaires » décrit par exemple dans la demande internationale WO 2016/059302. Dans ce cas, les premières microgouttes 20 sont directement formées dans les premières zones de piégeage 15.

Dans l'étape 46, les deuxièmes microgouttes 25 sont produites. Cette étape est représentée après l'étape 44 mais elle pourrait avoir lieu avant. Les deuxièmes microgouttes 25 peuvent être produites et introduites dans le système microfluidique tel que décrit précédemment en relation avec les premières microgouttes 20.

Les deuxièmes microgouttes 25 sont entraînées dans le système microfluidique de sorte que la force d'entraînement qu'elles subissent soit inférieure à la force de piégeage des deuxièmes zones de piégeage 18 sur les deuxièmes microgouttes 25. Les deuxièmes microgouttes 25 sont alors piégées, dans l'étape 48, dans les deuxièmes zones de piégeage 18. Lorsque les deuxièmes microgouttes 25 sont entraînées par un flux de fluide, ce dernier exerce sur les premières microgouttes 20 piégées dans les premières zones de piégeage 15 une force d'entraînement, de préférence inférieure ou égale à la force de piégeage des premières zones de piégeage 15 sur les premières microgouttes 20 de sorte que ces dernières restent piégées.

A chaque stade, le procédé peut comporter une étape de première mesure de l'état du système. Cette mesure peut être une simple image, ou par exemple une mesure colorimétrique, de fluorescence, spectroscopique (UV, Raman) ou de température. Cette mesure peut être particulièrement utile dans le cadre de l'utilisation de panels de premières et/ou deuxièmes microgouttes 20 différentes comportant un composé d'identification tel que décrit précédemment.

Lorsque plusieurs microgouttes sont en contact dans un même piège, il est possible de les fusionner de façon contrôlé pour mélanger leurs contenu dans l'étape 50. Cette coalescence peut être sélective ou non.

Pour fusionner l'ensemble des microgouttes en contact dans le système microfluidique, notamment dans la chambre de piégeage 30, ce dernier est perfusé avec un fluide dépourvu de surfactant. La concentration de surfactant dans le fluide du système microfluidique diminue, ce qui permet de déplacer l'équilibre d'adsorption de surfactant à l'interface vers la désorption. Les microgouttes perdent leur effet stabilisateur et fusionnent spontanément avec les microgouttes avec lesquelles elles sont en contact.

En variante, le système microfluidique est perfusé avec un fluide contenant un agent déstabilisant. L'agent déstabilisant est par exemple le 1H,1H,2H,2H-perfluorooctan-1-ol dans une huile fluorée dans le cas de microgouttes aqueuses.

En variante encore, l'ensemble des microgouttes en contact dans le système microfluidique, notamment dans la chambre de piégeage 30, sont fusionnées en amenant un stimulus physique externe, comme des ondes mécaniques, des ondes de pression, un changement de température ou un champ électrique. Comme cela est illustré sur la figure 50, des électrodes 35 peuvent être placées de part et d'autre de la chambre de piégeage de sorte à fusionner l'ensemble des microgouttes en contact entre ces dernières.

Pour fusionner les microgouttes de manière sélective, un laser infra-rouge peut être utilisé, comme cela est décrit par E. Fradet, P. Abbyad, M. H. Vos, and C. N. Baroud, dans "*Parallel measurements of reaction kinetics using ultralow-volumes.*," *Lab Chip*, vol. 13, no. 22, pp. 4326–30, Oct. 2013, ou des électrodes localisées 37 au niveau des interfaces de microgouttes entre les zones de piégeage peuvent être activées, comme cela est illustré sur la figure 51, ou des ondes mécaniques peuvent être focalisées en un ou plusieurs points.

L'invention n'est pas limitée aux exemples de coalescence décrits ci-dessus. Toute méthode permettant de déstabiliser l'interface entre deux microgouttes en contact peut être utilisée pour fusionner les microgouttes.

Il est alors possible d'effectuer une mesure de l'état des microgouttes obtenues et/ou d'observer en temps réel ces dernières. Cela permet par exemple l'étude cinétique de réactions chimiques ou biochimiques.

#### **Piégeage sélectif**

Lorsque le ou les pièges capillaires 12 présentent une pluralité de deuxièmes zones de piégeage 18, la position de la ou des deuxièmes zones de piégeage 18 par rapport à la direction et au sens de la force d'entraînement s'exerçant sur les deuxièmes microgouttes 25 peut permettre d'effectuer un piégeage sélectif.

Prenons le cas d'un piège capillaire avec deux deuxième zones de piégeage 18m et 18v disposés de part et d'autre d'une première zone de piégeage 15 et aligné selon la direction de la force d'entraînement exercée, comme cela est illustré sur la figure 53. Après le piégeage de la première microgoutte 20 au niveau de la première zone de piégeage 15 selon l'étape 44, on apporte des deuxième microgouttes 25m avec une force d'entraînement orientée selon la direction  $F_1$  selon une étape 48a. Si les forces de piégeage dans les deuxième zones de piégeage 18m et 18v sont suffisamment faibles, une deuxième microgoutte 25m n'est piégée que dans la deuxième zone de piégeage 18m situé en amont de la première microgoutte 20 piégée relativement à la direction  $F_1$ . Même si la deuxième zone de piégeage 18v en aval est identique, sa situation vis-à-vis des deuxième microgouttes 25m est différente car, dans le cas d'un fluide, les lignes de circulation de deuxième microgouttes 25, en contournant la première microgoutte 20, évite la deuxième zone de piégeage 18v. De plus, le maintien de la deuxième microgoutte 25m piégée en amont est favorisé par la présence de la première microgoutte 20 piégée sur laquelle elle peut s'appuyer. Après avoir piégée une deuxième microgoutte 25m en amont, il est possible d'exercer une force d'entraînement orientée selon une direction  $F_2$  opposée à  $F_1$  sur des deuxième microgouttes 25v pour piéger une de ces dernières dans la deuxième zone de piégeage 18v encore libre, selon une étape 48b.

Comme cela est illustré sur la figure 54, il est également possible d'utiliser la position de la ou des deuxième zones de piégeage 18 par rapport à la direction et au sens de la force d'entraînement s'exerçant sur les deuxième microgouttes 25 pour effectuer une libération sélective en vue par exemple de piéger une autre deuxième microgoutte 25 différente dans un ou plusieurs des deuxième zones de piégeage 18. Prenons le cas du piège capillaire précédent, si les forces de piégeage dans les deuxième zones de piégeage 18m et 18v sont suffisamment fortes pour piéger chacune une deuxième microgoutte 25m quel que soit la direction de la force d'entraînement exercée sur les deuxième microgouttes 25m à l'étape 48a, le fait que la deuxième microgoutte 25m en amont par rapport à une force d'entraînement orientée selon la direction  $F_3$  est mieux retenue que celle en aval lorsqu'une telle force d'entraînement est appliquée peut être utilisé pour libérer sélectivement la deuxième microgoutte 25m piégée en aval selon une étape 52. En effet, la première microgoutte 25m peut se déformer et s'appuyer sur la première microgoutte 20 piégée dans la première zone de piégeage 15, il faut donc une force plus forte pour la libérer que pour libérer la deuxième microgoutte 25m en aval. Il est alors

possible de piéger dans la deuxième zone de piégeage 18v libérée une deuxième microgoutte 25v différente de la deuxième microgoutte 25m déjà piégée dans l'étape 48b.

#### **Piégeage selon la taille des microgouttes**

Les deuxièmes zones de piégeage 18 des différents pièges capillaires 12 dans un même système microfluidique peuvent avoir des propriétés différentes, notamment des tailles différentes. Ceci permet, par exemple, de piéger des deuxièmes microgouttes 25 différentes dans les pièges capillaires 12 différents afin d'obtenir des microgouttes différentes. Par exemple, pour une concentration donnée d'un élément compris dans les deuxièmes microgouttes, la quantité de ses éléments contenus dans une deuxième microgoutte dépend de la taille de ladite deuxième microgoutte. Ainsi, en produisant des deuxièmes zones de piégeage 18 par exemple de tailles différentes dans la même chambre de piégeage 30, il est possible de piéger sélectivement des deuxièmes microgouttes 25 de tailles différentes, à chaque taille de deuxième zone de piégeage 18 correspondant une taille de deuxième microgoutte 25.

La Figure 55 illustre trois pièges capillaires 12a, 12b et 12c présentant des deuxièmes zones de piégeage 18a, 18b et 18c de tailles différentes. Les premières zones de piégeage 15 sont remplies avec des premières microgouttes 20. Des deuxièmes microgouttes 25a, 25b et 25c, toutes de même concentration mais de tailles différentes sont apportées. Les deuxièmes zones de piégeage 18a, 18b et 18c correspondent chacune à une taille de deuxième microgoutte, les deuxièmes microgouttes 25a, 25b et 25c sont alors piégées dans la deuxième zone de piégeage 18a, 18b ou 18c qui leur correspond le mieux.

Il est préférable de placer les pièges capillaires 12a, 12b et 12c par forces de piégeage des deuxièmes zones de piégeage 18a, 18b et 18c par rapport à la plus grande des deuxièmes microgouttes 18a croissantes dans le sens de la force d'entraînement des deuxièmes microgouttes, notamment dans le sens du flux de fluide, dans le système microfluidique. Ainsi les deuxièmes microgouttes 25a, 25b et 25c rencontrent d'abord les deuxièmes zones de piégeage 18c dans lesquels seuls les deuxièmes microgouttes 25c les plus petites sont piégées, puis les deuxièmes zones de piégeage 18b dans lesquels seules les deuxièmes microgouttes 25b sont piégées et enfin les deuxièmes zones de piégeage 18a dans lesquels les deuxièmes microgouttes 25a les plus grandes sont piégées.

En variante, les microgouttes 25a, 25b et 25c sont différentes par un autre de leurs paramètres, notamment comportent des éléments différents.

Ceci permet d'obtenir un panel de microgouttes dont au moins certaines sont différentes, notamment par leur concentration en un composé et/ou par leur composition.

### Coalescence séquentielle

Les étapes 46, 48 et 50 peuvent être répétées comme cela est illustré sur la figure 56 pour effectuer une coalescence séquentielle. Dans chaque piège capillaire 12, la microgoutte obtenue après l'étape 50 devient la nouvelle première microgoutte 80 ayant pour volume la somme des volumes de la ou des premières microgouttes 20 et de la ou des deuxièmes microgouttes 25 fusionnées dans le piège capillaire 12. Comme la ou les deuxièmes zones de piégeage 18 sont à nouveau libres, on peut amener une ou plusieurs troisièmes microgouttes 58 identiques ou différentes de la ou des deuxièmes microgouttes 25 initiales pour réaliser une nouvelle coalescence et obtenir une nouvelle microgoutte 90 devenant elle-même la nouvelle première microgoutte et ainsi de suite. Au fur à mesure des coalescences successives, la microgoutte va grossir du fait de l'addition des différents volumes des microgouttes coalescées jusqu'à être tellement grosse qu'elle empêche le piégeage d'une nouvelle microgoutte dans la deuxième zone de piégeage 18. Le nombre maximal de coalescence réalisable dans un même piège capillaire 12 dépend du volume des microgouttes successives coalescées.

A noter que si l'étape de coalescence consiste à enlever le surfactant de la phase externe ou à le déstabiliser par voie chimique, une étape de stabilisation peut être nécessaire entre les différentes coalescences. En pratique, il faut perfuser la chambre de piégeage avec un fluide non miscible avec les microgouttes contenant du surfactant avant d'amener une ou plusieurs nouvelles microgouttes dans le piège capillaire.

La capacité à pouvoir effectuer une coalescence séquentielle a plusieurs applications. Si une première microgoutte 20 piégée dans une première zone de piégeage 15 d'un piège capillaire 12 contient des cellules (par exemple des bactéries, levures ou cellules mammifères), la coalescence séquentielle peut permettre de renouveler plusieurs fois le milieu de culture en fusionnant séquentiellement des deuxièmes microgouttes 25 contenant un milieu de culture à des temps prédéterminés.

Cela peut aussi servir à modéliser le caractère intermittent de la prise d'un médicament. Par exemple, une première microgoutte 20 contenant un sphéroïde de cellules mammifères et piégée dans un piège capillaire 12 est fusionnée toutes les 6 heures avec une deuxième microgoutte 25 de médicament.

### Gradient de concentrations de goutte

Les pièges capillaires 12 dans la chambre de piégeage 30 peuvent être différents et leurs emplacements peuvent être contrôlés. Il est possible par exemple d'avoir des pièges capillaires 12 présentant un nombre différent de deuxièmes zones de piégeage.

5 Comme cela est illustré sur la figure 57, la chambre de piégeage 30 peut comporter des pièges capillaires 12a, 12b, 12c et 12d ayant respectivement un, deux trois et quatre deuxièmes zones de piégeage 18 identiques équiréparties autour d'une première zone de piégeage 15. Si les premières microgouttes 20 sont identiques et comporte un composé d'intérêt, il est possible obtenir dans la chambre microfluidique des  
10 microgouttes 100, 105, 110 et 115 formant un gradient spatial de quatre concentrations en composé d'intérêt, représentée ici par différents niveaux de gris, après la coalescence avec les deuxièmes microgouttes 25 piégées qui peuvent par exemple contenir un diluant.

#### **Panels de microgouttes**

15 L'injection de panels de microgouttes comportant des composés différents et/ou des concentrations différentes dans une chambre contenant des pièges capillaires 12 tels que décrits précédemment permet de nombreuses applications.

Prenons l'exemple d'une chambre de piégeage de 2 cm<sup>2</sup> présentant 1000 pièges capillaires permettant chacun de piéger une première et une deuxième microgoutte 20 et 25. Les premières microgouttes 20 forment un panel de microgouttes contenant un  
20 premier composé dans 20 concentrations différentes. Les deuxièmes microgouttes 25 contiennent elles un deuxième composé dans 10 concentrations différentes. En fusionnant les premières et les deuxièmes microgouttes 20 et 25 dans les pièges capillaires 12, il est possible d'obtenir une matrice de microgouttes correspondant chacune statistiquement à une combinaison parmi les 200 combinaisons de premières et deuxièmes microgouttes 20  
25 et 25 possibles.

Le fait que les microgouttes soient statiques facilite également l'obtention de données cinétiques. On tire aussi partie de l'économie en réactifs obtenue grâce à l'utilisation de volumes très faibles dans les microgouttes.

30 La chambre de piégeage 30 peut avoir une surface plus grande que 2 cm<sup>2</sup> ce qui augmente encore largement le nombre de réactions différentes pouvant être menées en parallèle dans un système microfluidique.

Les composés contenus dans les premières et deuxièmes microgouttes 20 et 25 peuvent être des molécules chimiques qui vont réagir ensemble et dont on cherche à optimiser les concentrations initiales. Le procédé décrit ci-dessus permet d'effectuer de la

chimie combinatoire à grande échelle. Les microgouttes peuvent alors comporter un ou plusieurs moyens d'identification. Cela permet par exemple de pouvoir mesurer la concentration du produit final, par exemple par fluorescence ou spectroscopie.

En variante, les premières et/ou deuxièmes microgouttes 20 et/ou 25 peuvent  
5 contenir des protéines, des enzymes, des cellules à concentrations variées.

Le système microfluidique et le procédé décrit ci-dessus peuvent permettre l'étude de la cristallisation de protéines. En effet, obtenir un cristal à partir d'une solution purifiée de protéine est une étape essentielle pour la détermination de sa structure tridimensionnelle puisque cela permet d'obtenir une figure de diffraction aux rayons X.  
10 Seulement la protéine est toujours disponible en très faibles quantités et les conditions de cristallisation optimales varient d'une protéine à l'autre.

Utiliser une chambre de piégeage 30 de plusieurs pièges capillaires 12 permettant chacun de piéger une première et une deuxième microgoutte 20 et 25 permet par exemple d'avoir un panel de première microgoutte comportant une solution saline  
15 dans différentes concentrations et un panel de deuxième microgoutte comportant une protéine d'intérêt dans différentes concentrations. En fusionnant les premières et les deuxièmes microgouttes 20 et 25 dans les pièges capillaires 12, il est possible d'obtenir une matrice de microgouttes représentant des conditions de concentrations en solution saline et protéines différentes de sorte à pouvoir déterminer les concentrations permettant  
20 une cristallisation des protéines optimale.

En immobilisant sur les pièges capillaires 12 des premières microgouttes 20 comportant un élément d'intérêt en concentration identique dans toute la chambre de piégeage et en fusionnant ces dernières avec des deuxièmes microgouttes 25 issues d'un panel de microgouttes comportant une espèce titrante dans différentes concentrations, il  
25 est possible de réaliser un titrage de l'espèce d'intérêt contenue dans les premières microgouttes 20. Cette application peut être particulièrement intéressante dans le cas de réactifs chers ou disponibles en faibles quantités.

Le procédé présenté ici peut également être très utile pour le criblage de médicaments. Par exemple, des cellules cancéreuses peuvent être mises en culture, sous  
30 forme individualisées ou sous forme de sphéroïdes, dans des premières microgouttes 20 piégées dans chacun des première zone de piégeage 15 des pièges capillaires 12, et après quelques jours de culture, il est possible de les faire coalescer dans chaque piège avec une deuxième microgoutte 25 contenant un médicament à cribler, les deuxièmes microgouttes 25 étant issues d'un panel de microgouttes contenant des médicaments différents.

Dans une configuration similaire on peut imaginer la culture de cellules du foie sous forme de sphéroïdes dans des premières microgouttes 20 piégées et l'apport dans chacun des pièges capillaires 12 d'une deuxième microgoutte 25 contenant un médicament dont on cherche à évaluer la toxicité, chaque microgoutte étant issue d'un

5 panel de microgoutte comportant le médicament dans différentes concentrations. En analysant les résultats de viabilité quelques jours après la coalescence, il est possible par exemple de déduire la concentration en ce médicament qui tue la moitié de la population cellulaire.

Ce procédé peut aussi permettre d'évaluer les interactions entre différents

10 antibiotiques. On peut créer un panel de deuxième microgouttes 25 contenant un ou plusieurs antibiotiques dans différentes concentrations et les faire fusionner dans la chambre de piégeage 30 avec des premières microgouttes 20 contenant des bactéries. Les premières microgouttes 20 peuvent comporter une bactérie dans différentes concentrations. Ceci permet d'explorer un espace à 3 paramètres.

15 L'utilisation de la microfluidique peut être très avantageuse dans le cadre d'échantillons rares tels que des biopsies. Le système microfluidique peut par exemple être utilisé dans le cadre de la médecine personnalisée et du traitement du cancer. Grâce à ce système on peut mettre en culture, par exemple sous forme de sphéroïdes dans des premières microgouttes 20 piégées, des cellules tumorales d'un patient qui a subi une

20 biopsie et les soumettre à différents médicaments à des concentrations multiples via l'apport des deuxième microgouttes 25 dans la chambre de piégeage 30. Après coalescence des couples de microgouttes cellules-médicament, le médicament le plus efficace et sa concentration pour un patient en particulier peuvent être déterminés en n'utilisant qu'une seule chambre de piégeage 30 et un nombre minimal de cellules issues

25 de la biopsie.

### Ingénierie tissulaire

Le procédé tel que décrit précédemment peut permettre de fusionner des microgouttes contenant des cellules de types cellulaires différents ou non pour former de manière précise des microtissus.

30 Le piège capillaire peut être telle qu'illustré sur les figures 5A et 5B. De préférence, la première zone de piégeage 15 présente une hauteur telle que son volume est supérieur à celui de la première microgoutte de sorte que la première microgoutte 20 piégée à un fond non plat, notamment convexe, comme cela est illustré sur la figure 5A. Ainsi, les cellules contenues dans ladite première microgoutte 20 glissent le long de

l'interface de cette dernière lors de leur sédimentation pour s'agréger au fond de la première microgoutte 20 piégée et former un sphéroïde, comme cela est décrit dans la demande internationale WO 2016/059302.

Une première microgoutte 20 peut contenir des cellules d'un premier type cellulaire dans un milieu liquide et être piégée dans la première zone de piégeage 15 dudit piège capillaire 12 pour, après un jour d'immobilisation, former spontanément un premier sphéroïde par sédimentation des cellules. De préférence, le système microfluidique est dépourvu de flux de fluide à proximité du piège capillaire pendant la formation du premier sphéroïde afin que le liquide de la première microgoutte 20 ne soit pas entraîné en mouvement. Une deuxième microgoutte 25 contenant des cellules d'un deuxième type cellulaire dans un milieu liquide peut être piégée dans la deuxième zone de piégeage 18. Après coalescence de la première et de la deuxième microgoutte, on obtient une culture de cellules de deux types différents dont l'architecture dépend en particulier des conditions expérimentales.

Si la première microgoutte 20 est liquide, les cellules de la deuxième microgoutte 25 se mélangent, après coalescence, au contenu de la première microgoutte 20 puis sédimentent pour atteindre directement le sphéroïde de cellules du premier type cellulaire.

Si les cellules de la deuxième microgoutte 25 ont eu le temps avant la coalescence de former un deuxième sphéroïde, la coalescence des deux microgouttes 20 et 25 entraîne la fusion du premier et du deuxième sphéroïde.

Si la coalescence a lieu avant que les cellules de la deuxième microgoutte 25 aient eu le temps de former un sphéroïde, ces dernières vont se déposer après sédimentation à la surface du premier sphéroïde.

Si maintenant une des deux microgouttes 20 ou 25 est gélifiée avant l'opération de coalescence, les deux populations cellulaires sont compartimentées. En effet, si la première microgoutte 20, qui contient le premier sphéroïde, est gélifiée avant l'arrivée de la deuxième microgoutte 25, les cellules de deuxième types cellulaire ne pourront plus, après coalescence des microgouttes 20 et 25, entrer directement en contact avec le premier sphéroïde du fait de la présence du gel. Par exemple des cellules mammifères ne peuvent pas traverser une matrice d'agarose à 0.9 % en masse. Les deux groupes de cellules ne peuvent alors communiquer ensemble que par voie paracrine.

L'exemple est ici donnée pour un piège capillaire 12 piégeant une première et une microgoutte 20 et 25 mais il est possible d'obtenir des architectures de microtissus

plus complexes avec un piège capillaires 12 permettant de piéger plus de deux microgouttes et/ou des procédés telles que décrits précédemment consistant à coalescer séquentiellement plusieurs microgouttes en faisant varier ou non l'orientation du flux de fluide. Il est également possible d'utiliser une pluralité de pièges capillaires telles que

5 décrits ci-dessus pour former une pluralité de microtissus en parallèle.

Cette technique de formation de microtissus peut permettre de créer in vitro des microtissus avec une architecture contrôlée pour mimer de manière très fidèle les conditions rencontrées in vivo. En effet dans le corps les différents types cellulaires sont souvent agencés en tissus selon une architecture spécifique qui est importante pour

10 recréer une fonction au niveau d'un organe.

Cette dernière peut également être utilisée en vue d'une transplantation sur un patient. Par exemple, des cellules alpha, productrices de glucagon, et de cellules bêta, productrice d'insuline peuvent être associées pour créer des ilots de Langerhans destinés à être transplanté dans le pancréas d'un patient pour soigner son diabète. De manière

15 similaire des hépatocytes et des cellules stellaires pourraient être associés dans le cadre d'une transplantation du foie.

### Hydrogels

Le procédé tel que décrit précédemment peut également être utilisé pour créer des microgouttes de gel multicouches.

20 Le piège capillaire 12 peut être telle que décrit précédemment et comporter une première zone de piégeage 15 et une deuxième zone de piégeage 18.

Comme cela est illustré sur la figure 58, une première microgoutte 20 contenant un premier milieu gélifiable peut être piégée dans la première zone de piégeage 15, puis le premier milieu gélifiable peut être gélifié pour former, comme illustré à

25 l'étape 54, une microgoutte 200 d'un premier gel. La première microgoutte 200 gélifiée peut alors fusionner, selon l'étape 58, avec une deuxième microgoutte 25 contenant un deuxième milieu gélifiable et piégée dans l'étape 56 dans la deuxième zone de piégeage 18. Après cette coalescence, le deuxième milieu gélifiable peut être gélifié pour constituer une couche externe 202 d'un deuxième gel sur le premier gel. Cette opération

30 peut être répétée plusieurs fois séquentiellement pour former une microgoutte présentant un cœur du premier gel et une pluralité de couches externes successives des autres gels.

En variante illustré sur la figure 59, le deuxième milieu gélifiable contenu dans la deuxième microgoutte 25 est gélifiée pour former une microgoutte 204 d'un deuxième gel avant de fusionner avec la première microgoutte. Lorsque les deux

microgouttes sont fusionnées, elles gardent leur forme et position avant fusion et forme une microgoutte gélifiée 210 de forme dépendante de la forme, de l'agencement et du nombre des zones de piégeage.

Le procédé peut aussi permettre d'obtenir des sphéroïdes encapsulés dans des  
5 hydrogels biologiques.

Pour pouvoir former des sphéroïdes dans des microgouttes de manière contrôlée il faut pouvoir garder le contenu de la microgoutte liquide pendant le temps de la formation du sphéroïde. L'agarose se prête très bien à ce protocole car c'est un hydrogel thermosensible. Il reste liquide à 37 °C (agarose ultra-low gelling) puis se  
10 solidifie après 30 min à 4 °C et demeure solidifié après retour à 37 °C. Seulement les cellules mammifères ne peuvent pas adhérer sur l'agarose et elles ne peuvent pas non plus le digérer. Cette matrice est donc très différente de la matrice extracellulaire rencontrée dans le corps. L'utilisation d'hydrogels tels que par exemple le collagène de type I, la fibronectine, le Matrigel® ou la gélatine pourrait être préférable pour mieux  
15 mimer les conditions naturelles. Seulement le contrôle de leur gélification est plus difficile. On ne peut par exemple pas garder du collagène de type I liquide pendant longtemps avec des conditions favorables à la culture de cellules (basse température ou pH acide). Si on encapsule des cellules dans une microgoutte de collagène que l'on fait gélifier rapidement après son piégeage, les cellules, plutôt qu'adhérer entre elles et  
20 former un sphéroïde, vont adhérer au collagène et migrer individuellement le long de ses fibres.

Ce problème peut être résolu grâce au procédé selon l'invention.

Le piège capillaire peut être telle qu'illustré sur les figures 5A et 5B. De préférence, la première zone de piégeage 15 présente une hauteur telle que la première  
25 microgoutte 20 piégée à un fond non plat, notamment convexe, comme cela est illustré sur la figure 5A de sorte que les cellules contenues dans ladite première microgoutte 20 glissent le long de l'interface de cette dernière lors de leur sédimentation pour s'agréger au fond de la première microgoutte 20 piégée et former un sphéroïde, comme cela est décrit dans la demande internationale WO 2016/059302.

Une première microgoutte 20 peut contenir des cellules d'un premier type cellulaire dans un milieu liquide et être piégée dans la première zone de piégeage 15 dudit  
30 piège capillaire 12 pour, après un jour d'immobilisation, former spontanément un sphéroïde par sédimentation des cellules. De préférence, le système microfluidique est dépourvu de flux de fluide à proximité du piège capillaire pendant la formation du

sphéroïde afin que le liquide de la première microgoutte 20 ne soit pas entraîné en mouvement. Une deuxième microgoutte 25 contenant un des hydrogels biologiques mentionné plus haut en forte concentration peut être piégée dans la deuxième zone de piégeage 18. Une fois cette deuxième microgoutte piégée, les deux microgouttes sont  
 5 fusionné immédiatement de sorte que l'hydrogel biologique, encore liquide, se mélange avec la première microgoutte qui contient le sphéroïde. La gélification a ensuite lieu et le sphéroïde se trouve encapsulé dans une matrice extracellulaire représentative des conditions biologiques rencontrées *in vivo*.

Cette technique d'encapsulage de sphéroïde peut être combinée avec la  
 10 technique de formation des microtissus décrits précédemment pour permettre d'obtenir des architectures de microtissus plus complexe.

Les exemples ci-dessous, non limitatifs décrivent des exemples de mise en œuvre de l'invention telle que décrit ci-dessus.

### **Exemple 1**

15 Une expérience a été réalisée pour démontrer la faisabilité du procédé.

La chambre de piégeage 30 utilisée fait 2 cm<sup>2</sup> et contient 393 pièges capillaires identiques similaires à celui des figures 1A, 1B et 2 et présentant les dimensions suivantes :

20  $a = 250 \mu\text{m}$ ,  
 $b = c = 150 \mu\text{m}$ ,  
 $H = 100 \mu\text{m}$ , et  
 $h = 50 \mu\text{m}$ .

Les pièges capillaires 12 sont répartis selon une matrice telle qu'illustré à la figure 49.

25 Les microgouttes comportent des colorants alimentaires. Des gouttes de 1  $\mu\text{L}$  avec cinq couleurs différentes allant du bleu au jaune en passant par le vert ont été formées par la technique des « micro-segmented flows ». Ces gouttes de 1  $\mu\text{L}$  ont été fractionnées en de nombreuses premières microgouttes 20 nanolitriques monodisperses en utilisant une pente (procédé décrit au point f) précédemment). Ces premières  
 30 microgouttes 20 de couleurs différentes ont alors été mélangées pour former un premier panel de microgouttes comportant différentes couleurs puis injectées dans la chambre de piégeage 30 contenant les pièges capillaires 12. La taille des premières microgouttes 20 a été ajustée pour qu'elles occupent pleinement les premières zones de piégeage 15. Les deuxièmes zones de piégeage 18 restent vides.

sphéroïdes de type cellulaires complémentaires pour créer des microtissus fonctionnels à l'architecture bien déterminée.

### Exemple 3

Une expérience a été réalisée pour déterminer sur un seul système microfluidique la concentration au-delà de laquelle un médicament (l'acétaminophène) devient toxique pour des cellules de foie (hépatome de rat, cellules H4IIEC3).

La chambre microfluidique utilisée contenant sur 2 cm<sup>2</sup> 252 pièges identiques aux figures 5Ae t 5B.

Des premières microgouttes 20 d'agarose liquide à 37 °C (ultra-low gelling), à 0.9 % en masse dilué dans du milieu de culture contenant des cellules H4IIEC3, ont été piégées dans les premières zones de piégeage 15, la deuxième zone de piégeage 18 restant libre. Les premières microgouttes 20 ont ensuite été gardées un jour en culture pour permettre aux cellules d'adhérer les unes aux autres pour former un sphéroïde par premières microgouttes 20. Les premières microgouttes 20 sont ensuite gélifiées par application d'une température de 4 °C pendant 30 min.

Parallèlement, de l'acétaminophène a été solubilisé à haute concentration dans du milieu de culture. De la fluorescéine à concentration élevée a été ajoutée à cette solution. La solution obtenue a été diluée en différentes concentrations avec du milieu de culture pure pour former des gouttes de 1 µL à concentrations différentes. Ces gouttes ont ensuite été fractionnées en deuxièmes microgouttes 25 à l'aide d'une pente puis mélangées avant d'être injectées dans la chambre de piégeage 30 qui contient les premières microgouttes 20. Ces deuxièmes microgouttes 25 étaient plus petites que les premières microgouttes 20 et ont été piégées dans les deuxièmes zones de piégeage 18.

En prenant une image en fluorescence avant la fusion, les différents niveaux de fluorescence qui sont corrélés à la concentration en médicament des deuxièmes microgouttes 25 ont pu être identifiés. Même si ces gouttes ont été immobilisées dans des pièges de manière statistique, il est alors possible de faire correspondre à chaque sphéroïde la concentration d'acétaminophène à laquelle il a été associé dans le piège capillaire 12.

La chambre a été perfusée avec du HFE-7500 (huile fluorée) contenant du 1H,1H,2H,2H-perfluorooctan-1-ol à une concentration de 20 % en volume pour faire fusionner les microgouttes en contact. L'acétaminophène a alors diffusé à travers l'agarose gélifié pour agir sur les cellules. Après un jour d'exposition à l'acétaminophène, l'huile qui sépare les microgouttes entre elles est remplacée par une

dans les deuxièmes zones de piégeage 18, comme cela est visible sur la figure 61A. Celles-ci contiennent aussi des cellules H4IIEC3 mais, à la différence des premières, elles ont été colorées en rouge avec un marqueur fluorescent (CellTracker Red®). Ces doublets de première et deuxième microgouttes 20 et 25 ont été gardés en l'état pendant

5 un jour pour que les cellules rouges des deuxièmes microgouttes 25 se rassemblent et forment un deuxième sphéroïde 135 au fond de chaque deuxième microgoutte 25. Les première et deuxième microgouttes en contact ont ensuite été fusionné en perfusant la chambre avec du HFE-7500 (huile fluorée) contenant du 1H,1H,2H,2H-perfluorooctan-1-ol à une concentration de 20 % en volume.

10 Après coalescence dans chaque piège, le deuxième sphéroïde 135 sédimente et rentre en contact au fond de la première microgoutte avec le premier sphéroïde 130 dans une nouvelle première microgoutte 140, comme cela est visible sur la figure 61B. Ces deux sphéroïdes en contact vont adhérer l'un à l'autre et fusionner pour ne former qu'un seul nouveau sphéroïde à deux parties 130 et 135 clairement identifiables par

15 imagerie en fluorescence (les cellules issues du deuxième sphéroïde vont continuer à apparaître rouge dans le sphéroïde fusionné). La chambre est ensuite perfusée avec de l'huile contenant du surfactant pour rétablir la stabilité des nouvelles premières microgouttes en vue de la suite de l'expérience.

Cette opération a ensuite été répétée en amenant cette fois des troisièmes

20 microgouttes 85 encapsulant des cellules H4IIEC3 qui avaient été colorées en vert (CellTracker Green®), comme cela est visible sur la figure 61C. Pareillement, les troisièmes sphéroïdes verts 145 sont formés dans les troisièmes microgouttes 85, comme illustré sur la figure 61D, puis les troisièmes microgouttes 25 ont été fusionnées avec les nouvelles premières microgouttes, comme cela est illustré sur la figure 61E. Les

25 troisièmes sphéroïdes verts 145 et le nouveau sphéroïde 140 en contact vont adhérer l'un à l'autre et fusionner pour ne former qu'un seul sphéroïde à trois parties clairement identifiables par imagerie en fluorescence.

On obtient donc au final une matrice de sphéroïdes tricolores, comme illustré sur la figure 62 dans chacune desquels les trois sphéroïdes de couleurs différentes sont

30 identifiables.

Cette expérience démontre le potentiel de la technique pour des applications liées à l'ingénierie tissulaire. En effet, plutôt que fusionner des sphéroïdes d'un même type cellulaire mais de couleurs différentes, on peut facilement imaginer fusionner des

phase aqueuse comme cela est décrit dans la demande internationale WO 2016/059302 pour colorer les sphéroïdes avec des marqueurs de viabilité fluorescents présents dans la phase aqueuse. En prenant une image de la matrice finale, les sphéroïdes dont la viabilité a été la plus affectée ont pu être déterminés. Il a été constaté que plus la concentration en

5 acétaminophène est élevée et moins les cellules survivent. Ainsi, en corrélant le résultat de viabilité et la concentration d'acétaminophène dans les deuxièmes microgouttes, on a pu déterminer que la gamme de toxicité de l'acétaminophène sur ces cellules hépatiques est entre 10 et 30 mmol/L pour une exposition statique de 1 jour.

Les travaux ayant conduit à cette invention ont reçu un financement du

10 Conseil Européen de la Recherche dans le cadre du septième programme cadre de l'Union (FP7/2007-2013)/ERC convention de subvention n° 278248.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de manipulation d'au moins une première microgoutte liquide (20) et d'au moins une deuxième microgoutte liquide (25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) dans un système microfluidique comportant un piège capillaire (12, 12a, 12b, 12c) présentant une première zone de piégeage (15) et une deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v), le procédé comportant les étapes consistant à :

(i) piéger la première microgoutte (20) dans la première zone de piégeage (15), et

(ii) piéger la deuxième microgoutte (25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) dans la deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v),

la première et la deuxième zones de piégeage (15 ; 18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) étant agencées pour que la première et la deuxième microgouttes (20 ; 25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) soient en contact l'une avec l'autre,

la première et la deuxième zones de piégeage (15 ; 18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) étant conformées pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes (20, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) soient différentes,

les microgouttes (20, 25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) étant entraînées en déplacement dans le système microfluidique par un flux orienté ( $F_1$  ;  $F_2$ ) d'un fluide.

2. Procédé selon la revendication 1, la première microgoutte (20) étant piégée dans la première zone de piégeage (15) avec une force de piégeage qui est plus grande que celle que la deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) exercerait sur la première microgoutte (20).

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, la première et la deuxième microgoutte (20 ; 25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) étant différentes, en particulier de tailles différentes, notamment la première microgoutte (20) étant de plus grande dimension et/ou de plus grand volume que la deuxième microgoutte (25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v), et/ou de contenus différents.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, le piège capillaire (12, 12a, 12b, 12c) comportant une pluralité de deuxième zones de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v), l'étape (ii) consistant à piéger une deuxième microgoutte (25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) par deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v), la première et les deuxième zones de piégeage (15 ; 18, 18a, 18b, 18c,

18m, 18v) étant agencées de telle sorte que chaque deuxième microgoutte (25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) soit en contact avec au moins une de la première ou des deuxième microgouttes (20, 25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v).

5. Procédé selon la revendication 4, l'étape (ii) comportant les sous-étapes (ii') consistant à piéger, sous l'effet d'un premier flux de fluide orienté ( $F_1$ ), une deuxième microgoutte (25m) dans une ou une partie des deuxième zones de piégeage (18m) et (ii'') consistant à piéger, sous l'effet d'un deuxième flux de fluide orienté ( $F_2$ ), une deuxième microgoutte (25v) dans une autre ou une autre partie des deuxième zones de piégeage (18v), le premier et le deuxième flux de fluide étant d'orientation ( $F_1$ ,  $F_2$ ) différentes.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comportant l'étape (iii) consistant à fusionner avec la première microgoutte (20) la ou chacune des deuxième microgouttes (25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) piégées dans la ou chacune des deuxième zones de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v).

7. Procédé selon la revendication 6, comportant, après l'étape (iii), l'étape (v) consistant à piéger une troisième microgoutte (85) dans la ou les deuxième zones de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) n'ayant plus de deuxième microgoutte, de sorte que la première et la troisième microgoutte (20 ; 85) soient en contact l'une avec l'autre.

8. Dispositif microfluidique de piégeage de microgouttes, notamment pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comportant un piège capillaire (12, 12a, 12b, 12c) présentant une première zone de piégeage (15) et une deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) disposées de sorte qu'une première microgoutte liquide (20) piégée dans la première zone de piégeage (15) et qu'une deuxième microgoutte liquide (25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) piégée dans la deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) soient en contact l'une avec l'autre dans le piège capillaire (12, 12a, 12b, 12c), le premier et le deuxième piège capillaire (15 ; 18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) étant conformés pour que les forces de piégeage ramenées à l'une desdites microgouttes (20, 25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) soient différentes, les microgouttes (20, 25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) étant entraînées en déplacement dans le dispositif microfluidique par un flux orienté ( $F_1$  ;  $F_2$ ) d'un fluide.

9. Dispositif selon la revendication 8, la première et la deuxième zone de piégeage (15 ; 18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) étant des cavités.

10. Dispositif selon la revendication 8 ou 9, la première et la deuxième zone de piégeage (15 ; 18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) étant différentes par au moins l'une de leurs dimensions.

11. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, la première et la deuxième zone de piégeage (15 ; 18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) étant de hauteurs ( $h_1$  ;  $h_2$ ) différentes, la première zone de piégeage (15) étant notamment plus haute que la deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v).

12. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, la première et la deuxième zone de piégeage (15 ; 18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) étant de formes différentes, en vue de dessus, la première zone de piégeage (15) présentant notamment une section plus grande que la deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v).

13. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, la deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) s'élargissant dans au moins une direction en rapprochement de la première zone de piégeage (15).

14. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 13, la hauteur ( $h_1$ ) de la première zone de piégeage (15) étant telle que le volume de cette dernière est supérieur ou égal au volume de la première microgoutte.

15. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, le piège capillaire (12, 12a, 12b, 12c) comportant une pluralité de deuxièmes zones de piégeage (18a, 18b, 18c, 18m, 18v) agencées de telle sorte que chaque deuxième microgoutte piégée (25a, 25b, 25c, 25m, 25v) soit en contact avec au moins une de la première (20) ou des deuxièmes microgouttes (25a, 25b, 25c, 25m, 25v) piégées dans le piège capillaire.

16. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 15, comportant une pluralité de pièges capillaires (12, 12a, 12b, 12c) comportant chacun une première zone de piégeage (15) et une deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v), de préférence le première zone de piégeage (15) et la deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) étant agencées de telle sorte que la deuxième microgoutte (25, 25a, 25b, 25c, 25m, 25v) piégée dans la deuxième zone de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) du piège capillaire (12, 12a, 12b, 12c) soit en contact avec la première

microgoutte (20) piégée dans la première zone de piégeage (15) dudit piège capillaire (12, 12a, 12b, 12c).

17. Dispositif selon la revendication 16, comportant au moins 10 pièges capillaires (12, 12a, 12b, 12c) par centimètre carré, mieux au moins 100 pièges capillaires (12, 12a, 12b, 12c) par centimètre carré.

18. Dispositif selon la revendication 16 ou 17, comportant un premier piège capillaire (12, 12a, 12b, 12c) comportant n deuxièmes zones de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v) et un deuxième piège capillaire comportant p deuxièmes zones de piégeage (18, 18a, 18b, 18c, 18m, 18v), n étant différent de p.

19. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 18, comportant un canal (9) présentant une chambre de piégeage (30), le ou les pièges capillaires (12, 12a, 12b, 12c) étant dans la chambre de piégeage (30).

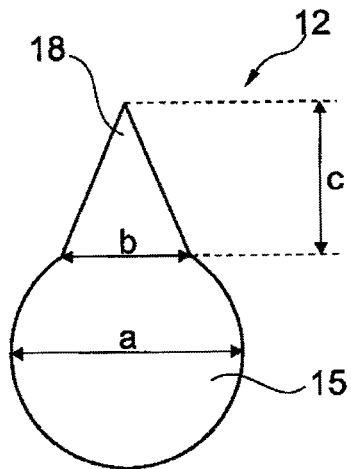


Fig. 1B

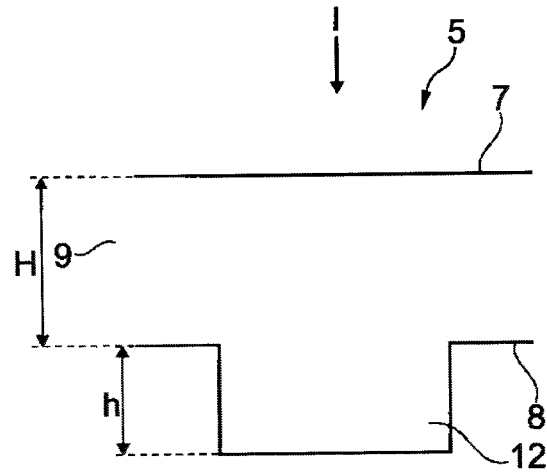


Fig. 1A

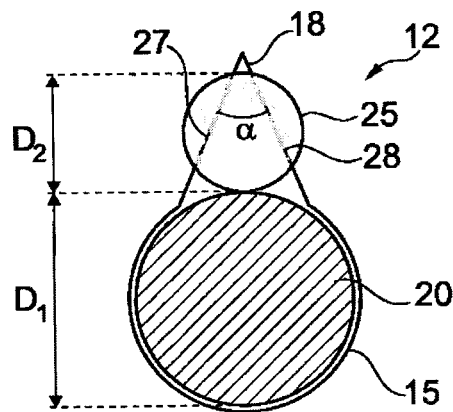


Fig. 2

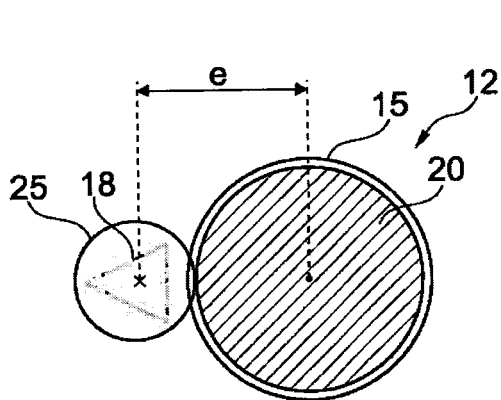


Fig. 3

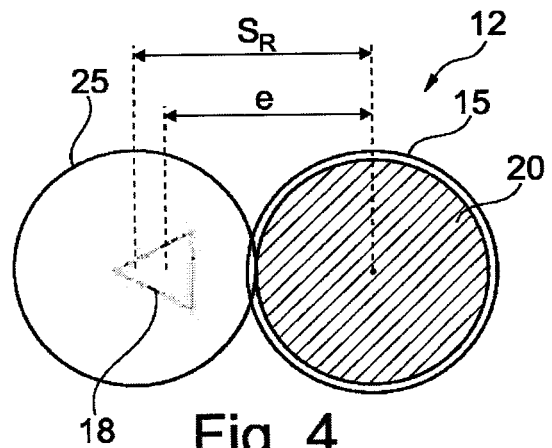


Fig. 4

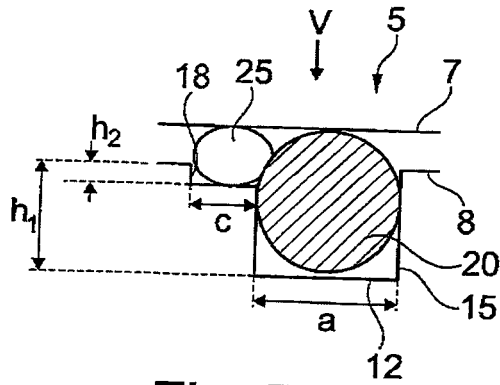


Fig. 5A

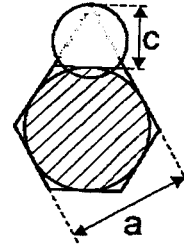


Fig. 5B

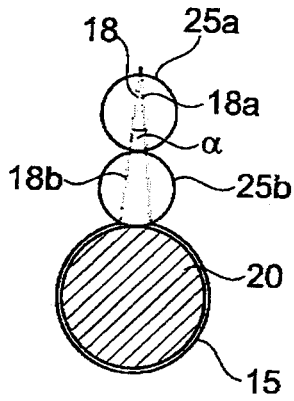


Fig. 6

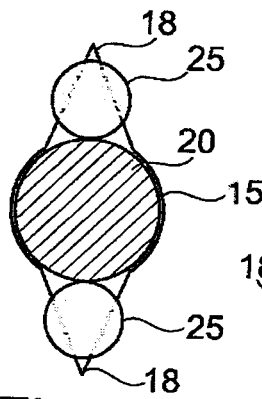


Fig. 7

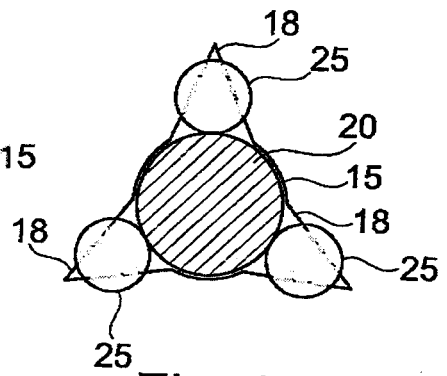


Fig. 8

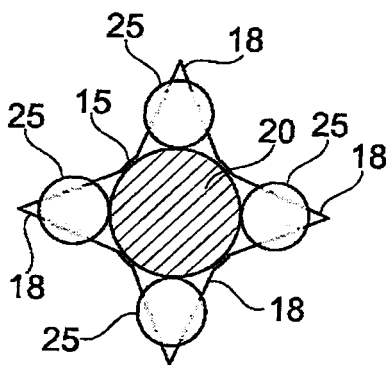


Fig. 9

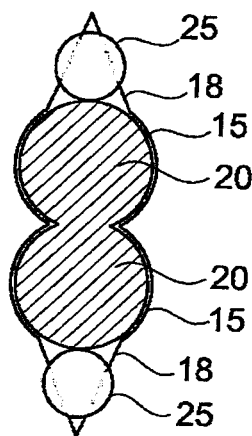


Fig. 10

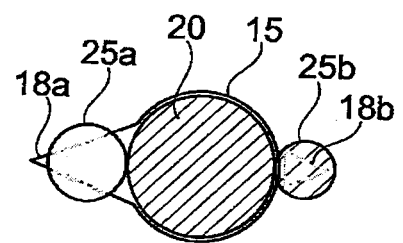


Fig. 11

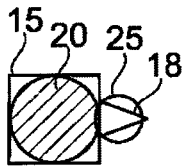


Fig. 12

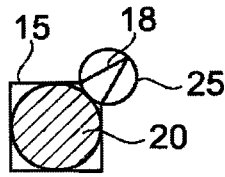


Fig. 13

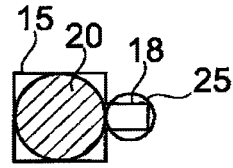


Fig. 14

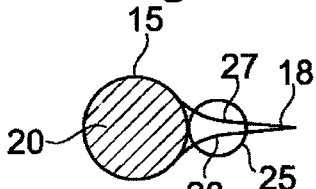


Fig. 15

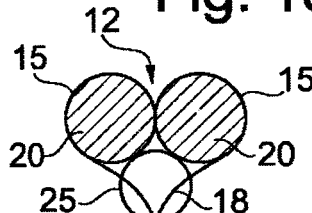


Fig. 16

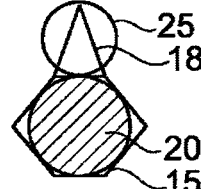


Fig. 17

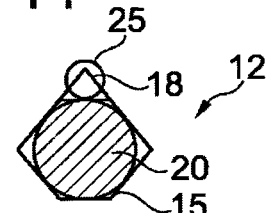


Fig. 18

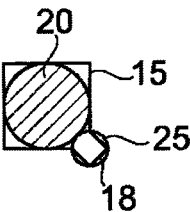


Fig. 19

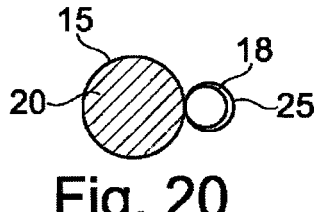


Fig. 20

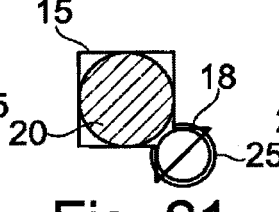


Fig. 21

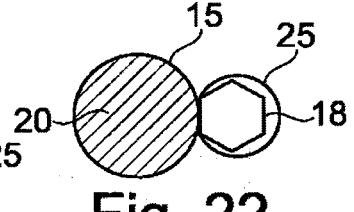


Fig. 22

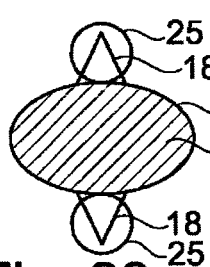


Fig. 23

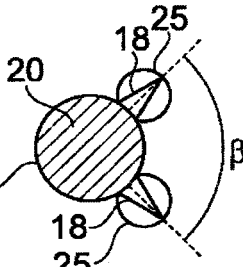


Fig. 24

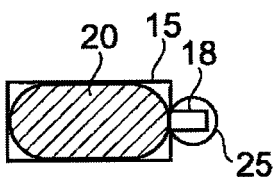


Fig. 25

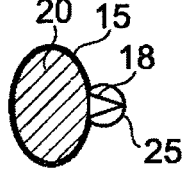


Fig. 28

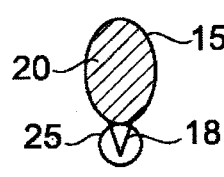


Fig. 29

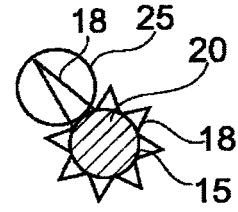


Fig. 30

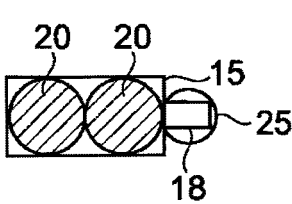


Fig. 26

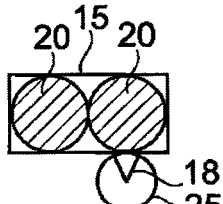


Fig. 27

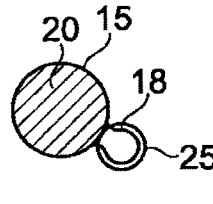


Fig. 31

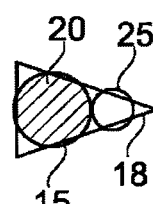


Fig. 32

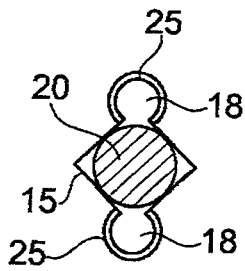


Fig. 33

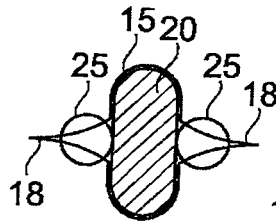


Fig. 34

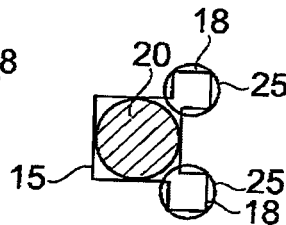


Fig. 35

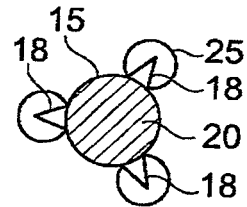


Fig. 36

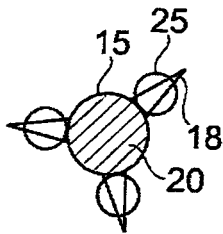


Fig. 37

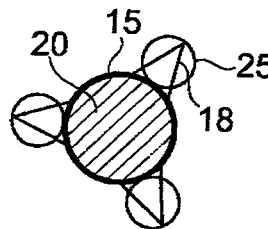


Fig. 38

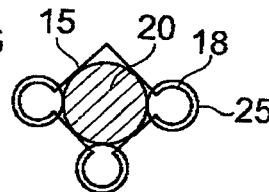


Fig. 39

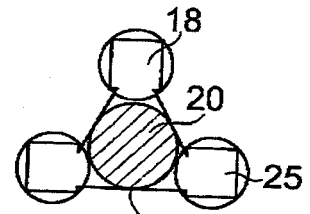


Fig. 40

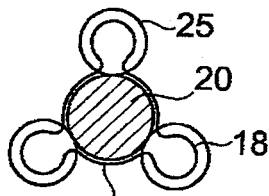


Fig. 41

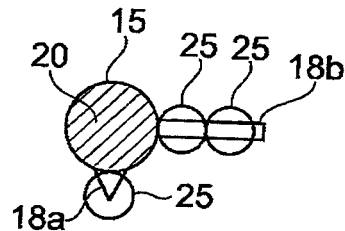


Fig. 42

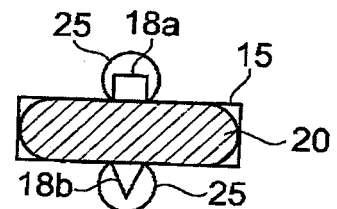


Fig. 42

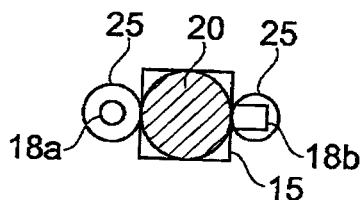


Fig. 43

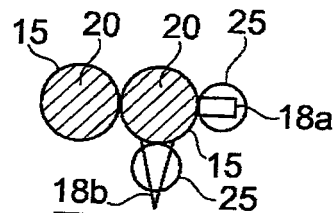


Fig. 44

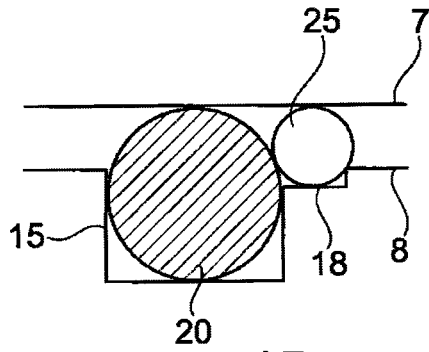


Fig. 45

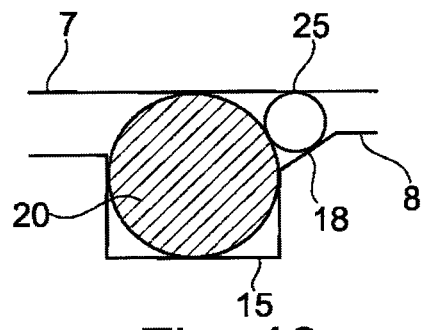


Fig. 46

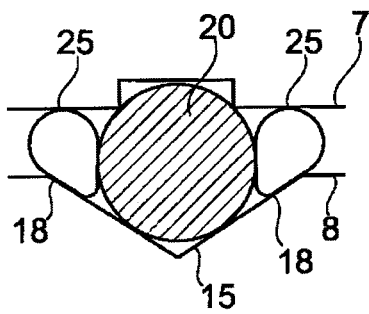


Fig. 47

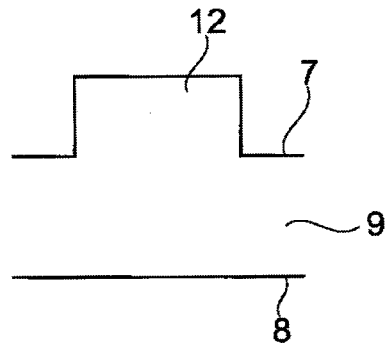


Fig. 48

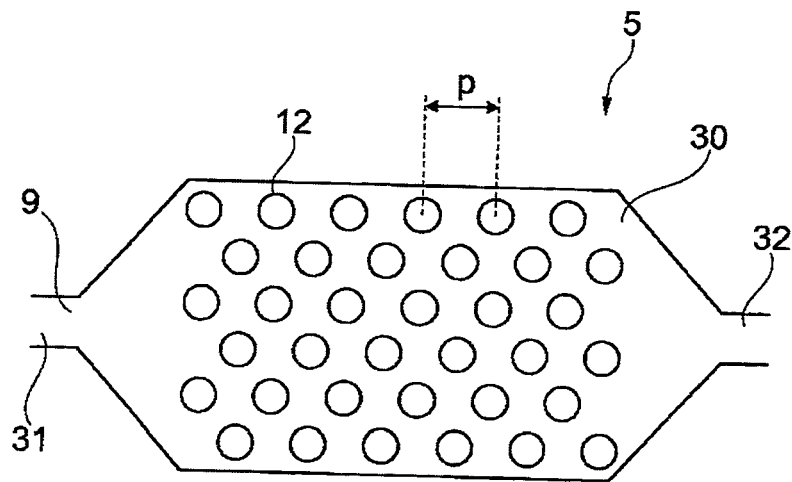


Fig. 49

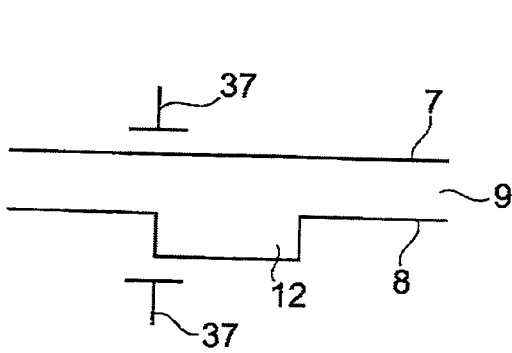


Fig. 51

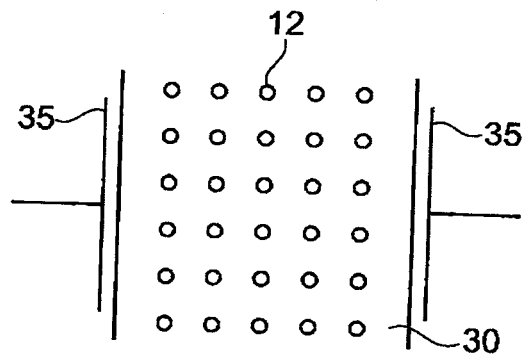


Fig. 50

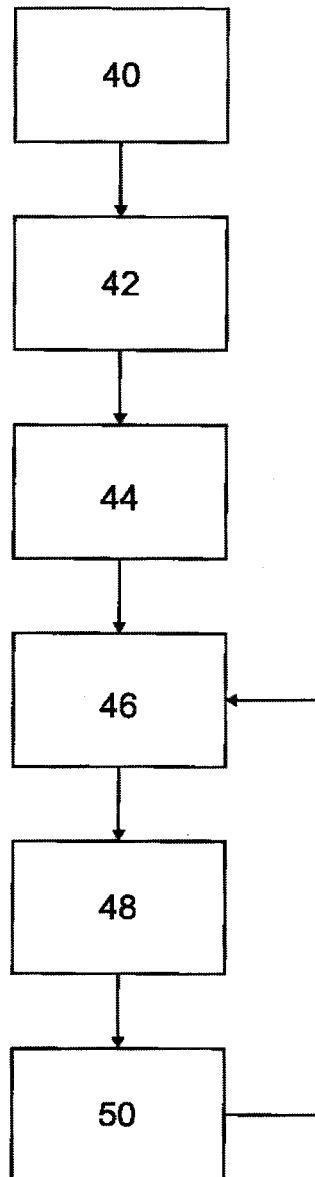
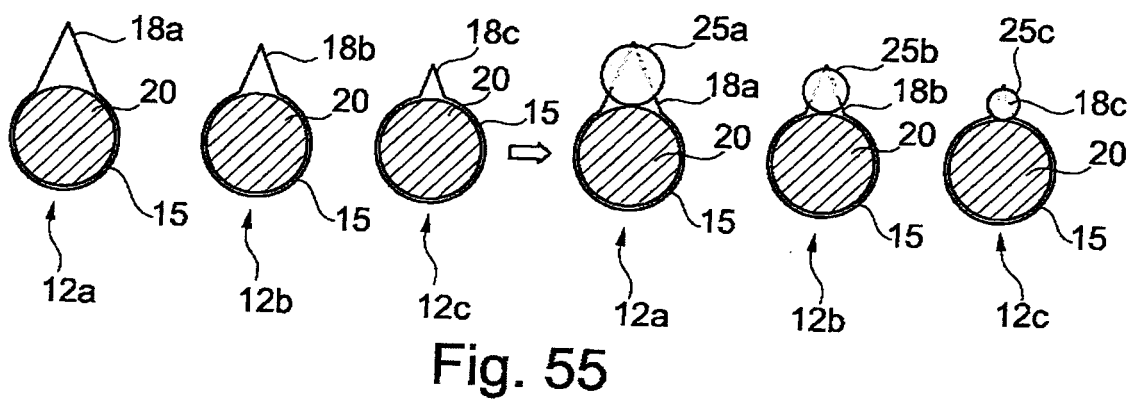
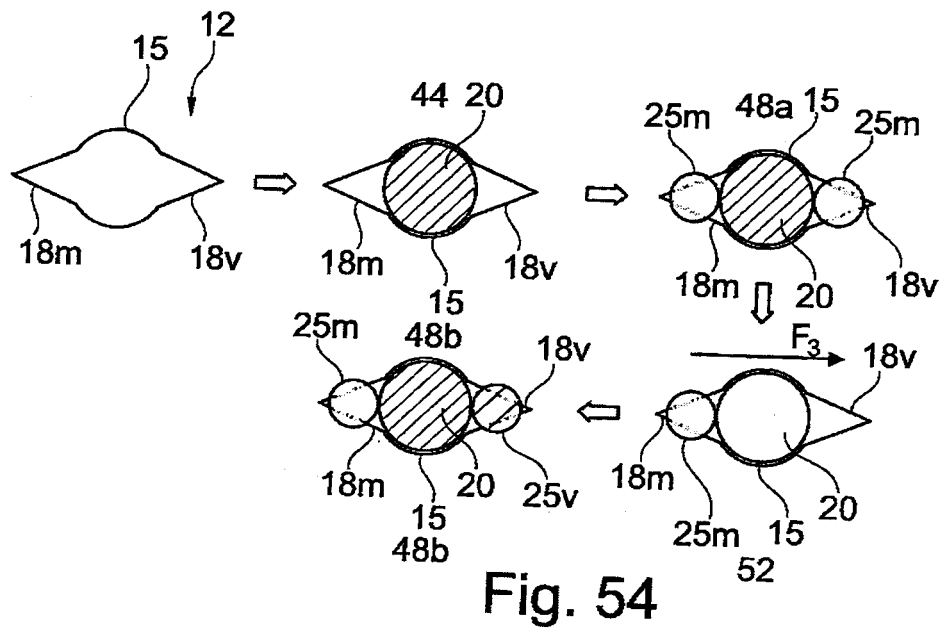
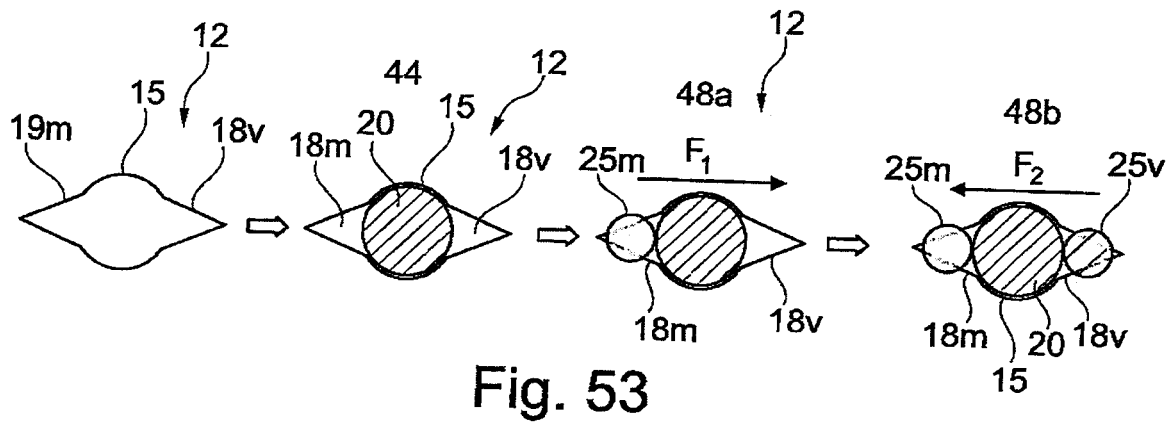


Fig. 52



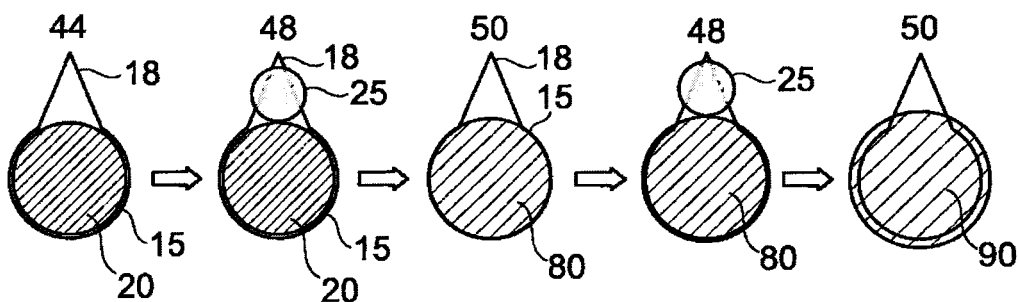


Fig. 56

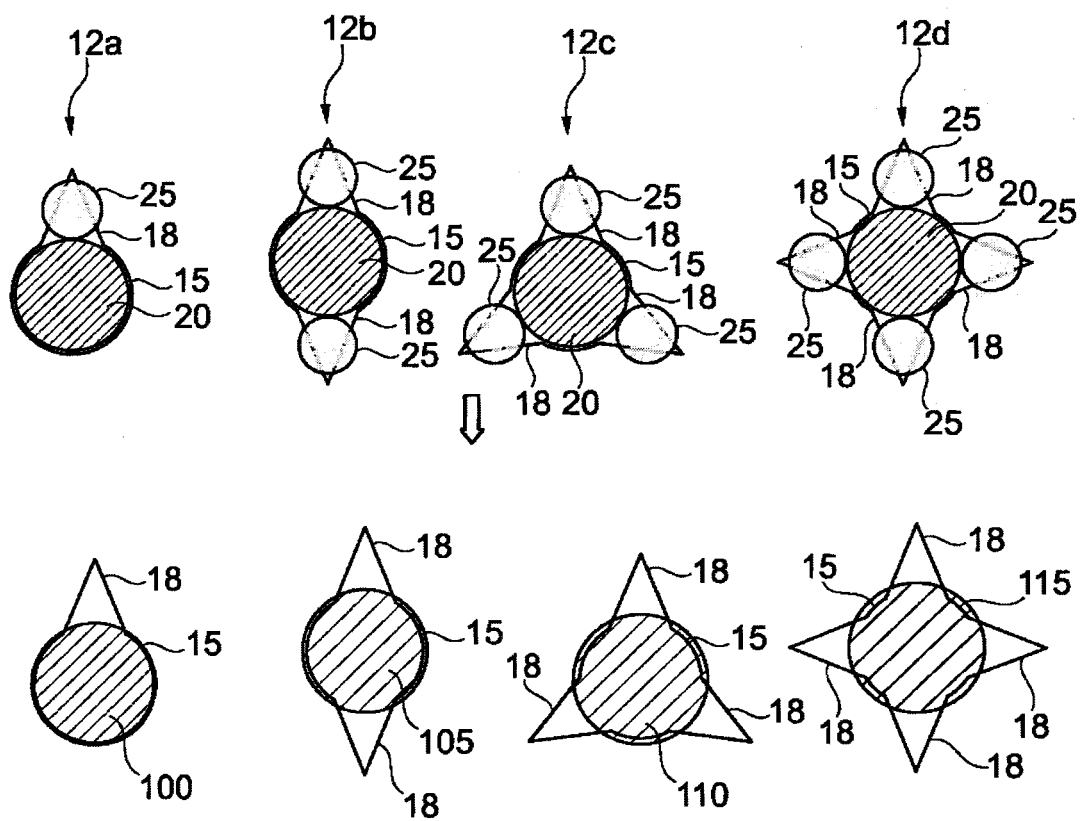


Fig. 57

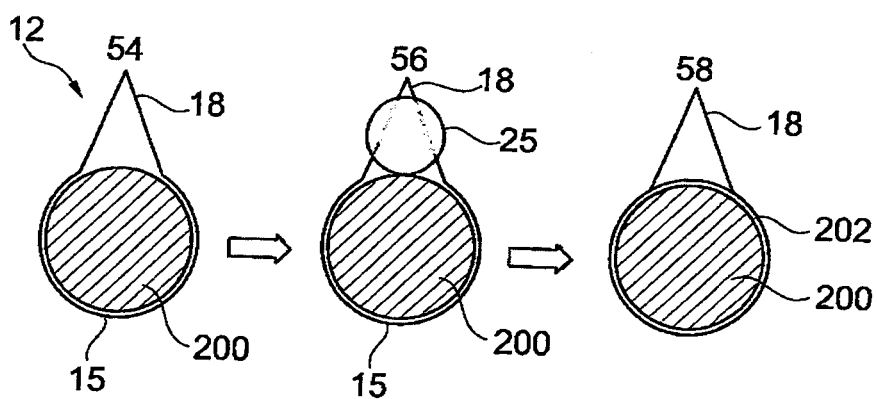


Fig. 58

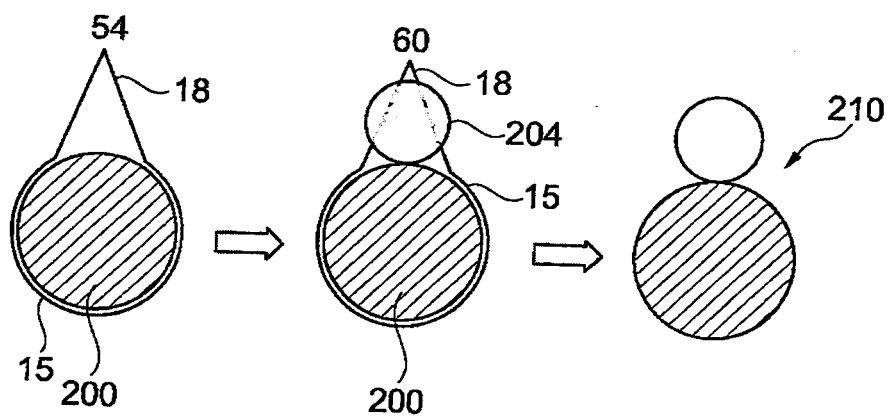


Fig. 59

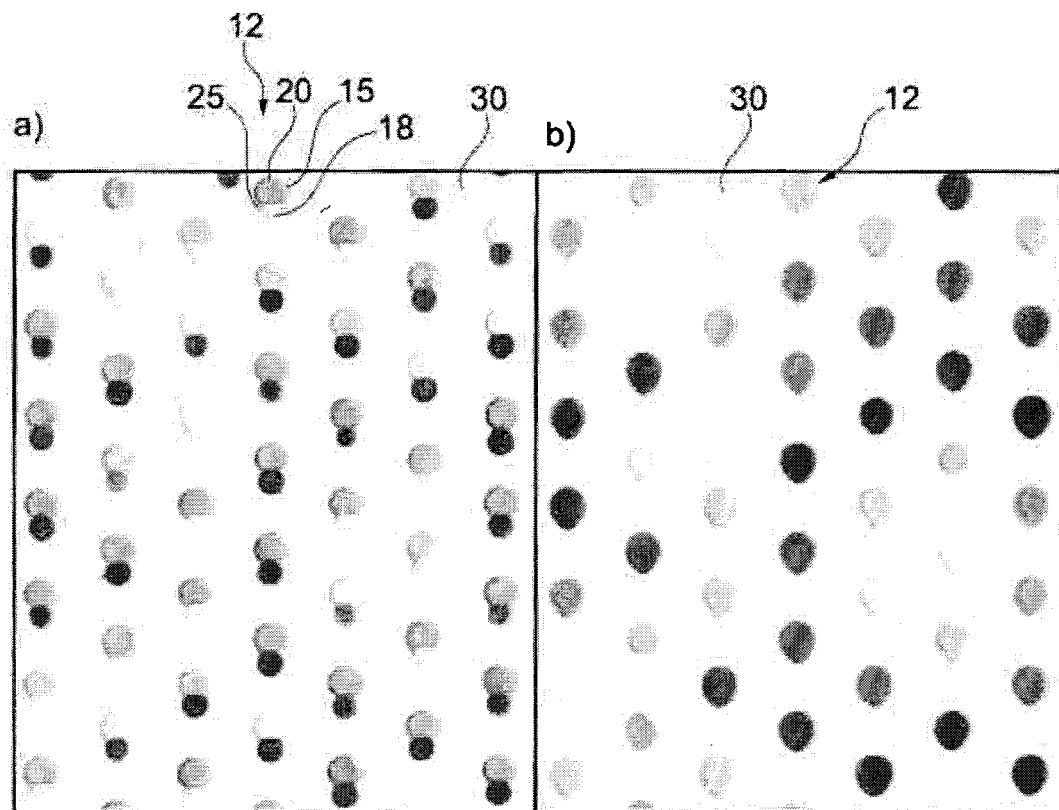


Fig. 60

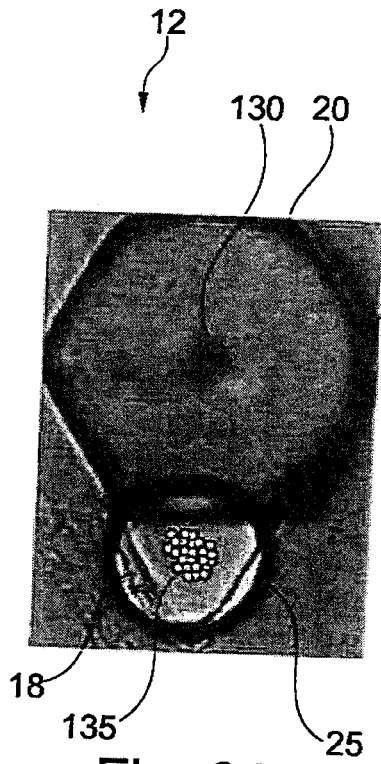


Fig. 61A

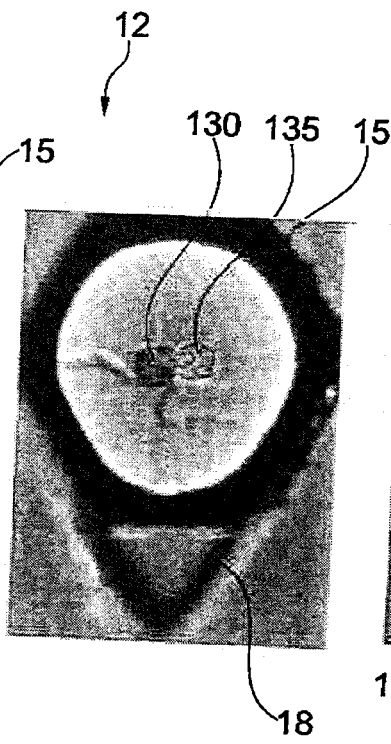


Fig. 61B

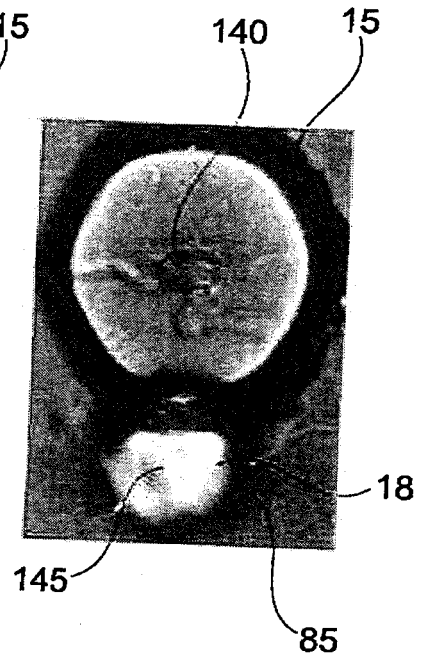


Fig. 61C

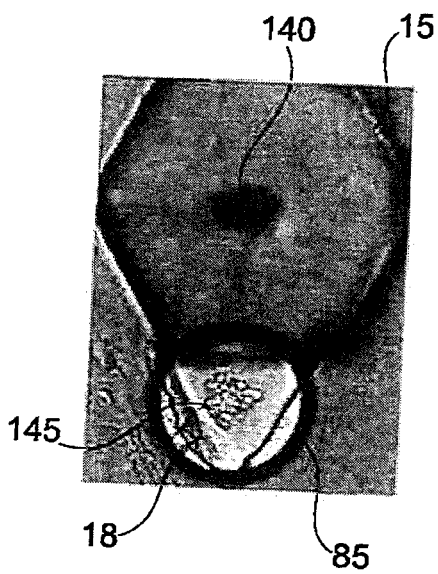


Fig. 61D

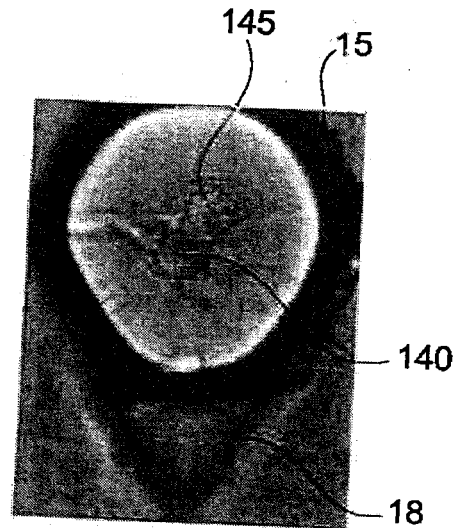


Fig. 61E

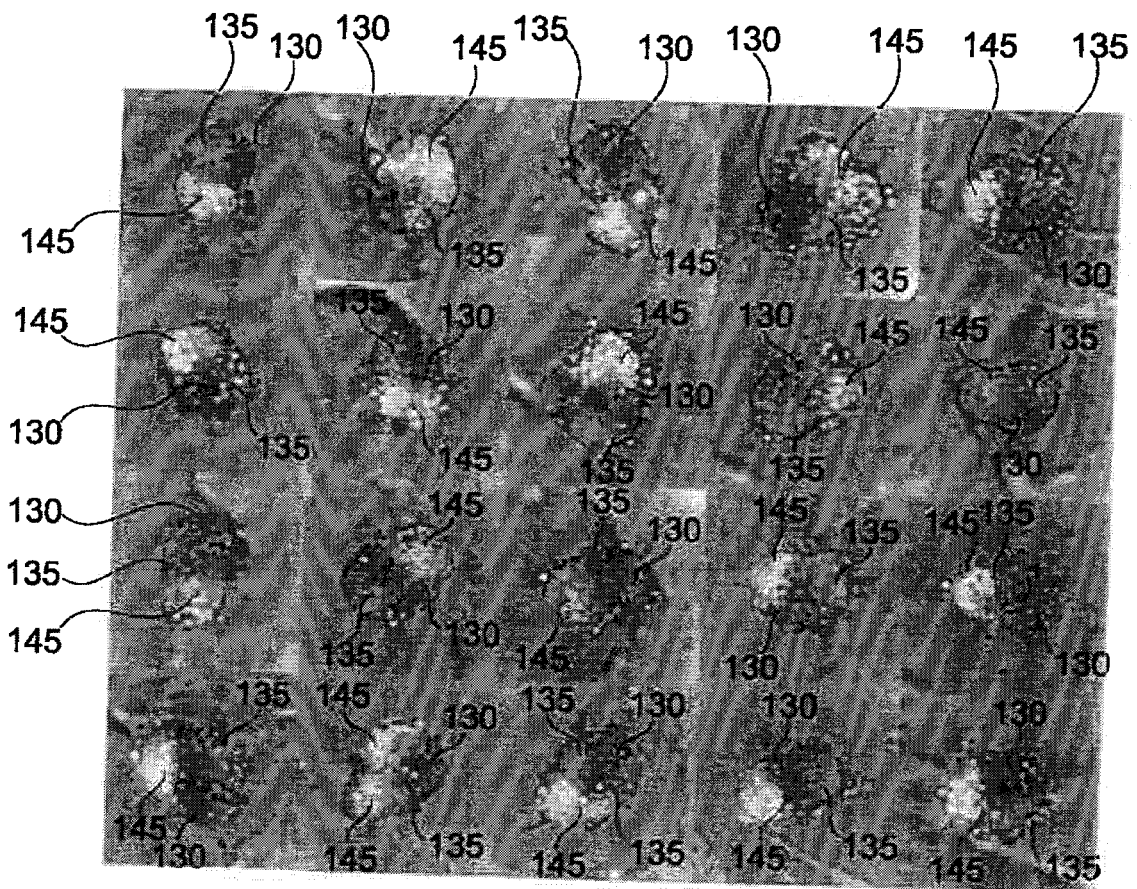


Fig. 62

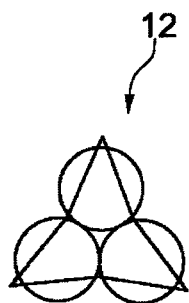


Fig. 63

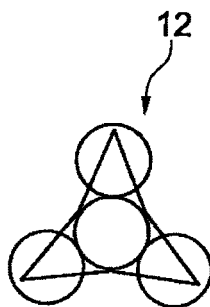


Fig. 64

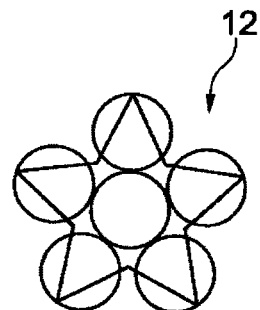


Fig. 65

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

☐ Le demandeur a maintenu les revendications.

☒ Le demandeur a modifié les revendications.

☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

US 2015/258543 A1 (BAROUD CHARLES [FR] ET AL) 17 septembre 2015 (2015-09-17)

US 2010/190263 A1 (SRINIVASAN VIJAY [US] ET AL) 29 juillet 2010 (2010-07-29)

WO 2016/059302 A1 (ECOLE POLYTECH [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 21 avril 2016 (2016-04-21)

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT