(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
10 novembre 2011 (10.11.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/138748 A1

(51) Classification internationale des brevets :
B01L 7/00 (2006.01) *G02B 21/28* (2006.01)
F28F 3/12 (2006.01) *G02B 21/30* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2011/051977

(22) Date de dépôt international :
4 mai 2011 (04.05.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1001905 4 mai 2010 (04.05.2010) FR

(71) Déposants *(pour tous les États désignés sauf US)* : **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). **ECOLE NORMALE SUPERIEURE** [FR/FR]; 45, rue d'Ulm, F-75230 Paris Cedex 05 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **CHEN, Yong** [CN/FR]; 7, Cité de Gênes, F-75020 Paris (FR). **LE BERRE, Maël** [FR/FR]; 33, rue de Torcy, F-75018 Paris (FR). **VELVE CASQUILLAS, Guilhem** [FR/FR]; 33, rue de Torcy, F-75018 Paris (FR). **PLECIS, Adrien** [FR/FR]; 59bis, avenue du Petit Chambord, F-92340 Bourg La Reine (FR).

(74) Mandataires : **CABINET ORES** et al.; 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : MICROFLUIDIC CHIP SUPPORT AND SYSTEM FOR THERMALLY REGULATING A SPECIMAN IN A SPATIALLY CONTROLLED AND RAPID MANNER

(54) Titre : SUPPORT DE PUCE MICROFLUIDIQUE ET SYSTEME DE REGULATION THERMIQUE D'UN ECHANTILLON

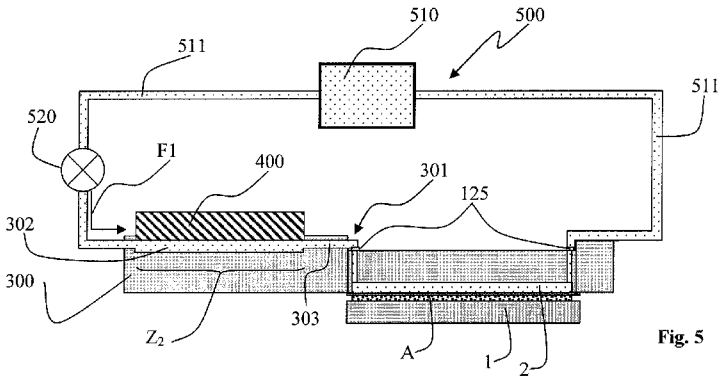


Fig. 5

(57) Abstract : The invention provides a microfluidic chip support and a system for thermally regulating a specimen, enabling the temperature of a viscous or liquid specimen to be rapidly regulated in a spatially controlled and reproducible manner, which can be used routinely, in a rapid cycle, and under satisfactory economic conditions, with improved reliability and providing reliable logistics within a laboratory. For this purpose, the subject of the invention is a system for thermally regulating a specimen, comprising: a chip (100) comprising a heat-conducting layer (200) and a layer (110) having a face (111) on which at least one grid of microchannels (120) is placed, the heat-conducting layer (200) being in contact with the face (111) bearing the grid of microchannels (120) so as to close off the microchannels; a support intended for accommodating the microfluidic chip; at least one means for thermally regulating the heat-transfer liquid; and at least one means for circulating the heat-transfer liquid in the chip.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2011/138748 A1

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))*

L'invention propose un support de puce microfluidique et un système de régulation thermique d'un échantillon permettant une régulation rapide, spatialement contrôlée et reproductible de la température d'un échantillon visqueux ou liquide, utilisable en routine, selon une cadence rapide et dans des conditions économiques satisfaisantes, avec une fiabilité améliorée et permettant une logistique fiable au sein d'un laboratoire. A cette fin, l'invention a pour objet un système de régulation thermique d'un échantillon comprenant : - une puce (100) comprenant une couche (200) conductrice de chaleur, et une couche (1 10) ayant une face (111) sur laquelle est disposé au moins un réseau de micro-canaux (120) la couche (200) conductrice de chaleur étant en contact avec la face (111) portant le réseau de micro-canaux (120) afin de fermer les micro-canaux; - un support destiné à recevoir la puce microfluidique; - au moins un moyen de régulation thermique du liquide caloporteur; - au moins un moyen de mise en circulation du liquide caloporteur dans la puce.

SUPPORT DE PUCE MICROFLUIDIQUE ET SYSTEME DE REGULATION THERMIQUE D'UN ECHANTILLON

L'invention se rapporte à un support de puce microfluidique et à un système de régulation thermique spatialement contrôlée et rapide d'un échantillon.

Dans de nombreux domaines de recherche et d'analyse, il est nécessaire de déterminer la présence ou l'absence de certaines particules d'intérêt dans un liquide, ou d'étudier le développement de particules d'intérêt présentes dans un liquide, ou de favoriser la formation de structures à partir de particules. Par la suite, le terme particule regroupe à la fois des objets biologiques tels que des cellules (animales ou végétales) vivantes ou non, des anticorps, des protéines, des virus, mais aussi des objets non biologiques, tels que des molécules d'intérêt (polymères, molécules chimiques), des liquides, etc. Par la suite, le terme « échantillon » se rapportera aux particules et au milieu (liquide, ou solide) qui les contient.

De nombreuses applications nécessitent un contrôle de la température rapide, précis et contrôlé spatialement, aussi bien pour chauffer que pour refroidir l'échantillon. Par spatialement contrôlé, il est entendu qu'il peut être nécessaire que la température soit parfaitement homogène sur tout l'échantillon ou suive un profil de température bien défini.

La plupart des protocoles d'étude actuellement mis en œuvre utilisent un support de l'échantillon et un instrument d'observation.

Le support d'échantillon est, dans la grande majorité des cas, une lame de verre sur laquelle on dépose l'échantillon liquide. Puis une lamelle de verre est déposée délicatement sur l'échantillon pour ne pas enfermer de bulle d'air ni abimer les particules (telles que des particules animales ou végétale) contenues dans le liquide de l'échantillon. La lamelle est maintenue par capillarité sur la lame de verre et peut, en outre, y être fixée par collage pour enfermer l'échantillon.

Dans ce type d'étude, l'échantillon est statique. Par statique, il est entendu que l'échantillon n'est soumis à aucune force mécanique extérieure de mise en mouvement, telle qu'un flux de liquide. Ceci est essentiel pour permettre une observation continue des échantillons et pour pouvoir utiliser des échantillons « fragiles » ne supportant pas les contraintes mécaniques induites par un écoulement de liquide.

L'instrument d'observation est généralement un microscope. Depuis de nombreuses années, les microscopes utilisent le plus souvent des objectifs dits « à immersion » en raison de leur excellente résolution. Cette résolution est obtenue en éliminant la lame d'air entre l'échantillon couvert par la lamelle et la lentille frontale de l'objectif. On utilise pour cela une goutte d'huile dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre.

Il est donc souhaitable de pouvoir mettre en œuvre les protocoles expérimentaux classiques et biens établis, tout en proposant une régulation thermique rapide et spatialement contrôlée de l'échantillon. Cette exigence de mise en œuvre des protocoles classiques permet de conserver les pratiques des laboratoires et une comparaison des résultats entre expériences.

De plus, pour permettre l'observation classique des échantillons, par exemple en biologie cellulaire, il est indispensable de pouvoir observer les échantillons à l'aide d'un système d'observation optique par lumière transmise ou par épifluorescence.

En outre, pour obtenir des images à hautes résolutions, il est indispensable de pouvoir utiliser un matériau d'indice optique supérieur ou égale à 1,4 et d'épaisseur inférieur à 150 µm entre l'objectif et l'échantillon à observer.

Un grand nombre de micro-échangeurs de chaleur ont été développés pour le refroidissement de composants électroniques. Dans ces systèmes, l'accent est mis sur la puissance et la conception de ces systèmes ne vise pas à contrôler de manière rapide et précise la température mais à minimiser cette dernière. En outre, la totalité de ces systèmes de

refroidissement ne permettent pas une observation simultanée des échantillons par exemple en lumière transmise.

Des systèmes microfluidiques ont été développés pour contrôler rapidement la température d'échantillons à l'intérieur même des supports. La majorité des solutions proposées utilisent des résistances de chauffe intégrée, généralement pour des applications de biologie moléculaire, et en particulier la PCR (polymérase Chain Reaction en langue anglo saxonne).

Dans le domaine de la biologie cellulaire, certains de ces systèmes utilisent des liquides caloporteurs pour contrôler rapidement la température d'échantillons injectés dans des micro-canaux. Cependant, il est nécessaire d'injecter l'échantillon dans un réseau de microcanaux ce qui peut détériorer les échantillons fragiles, être complexe ou impossible à mettre en œuvre avec les échantillons très visqueux, de type gel ou solide et, *de facto*, empêche de reproduire les expérimentations selon les protocoles développés à l'aide de porte échantillons statiques de type lame ou lamelle. En outre, ces systèmes interdisent toute étude d'échantillons statiques. Par exemple, lorsque l'on étudie l'évolution d'une population cellulaire en suspension, il est essentiel que les cellules restent immobiles sous l'objectif du microscope. Il est donc impossible d'injecter un fluide caloporteur dans l'échantillon, c'est-à-dire dans le milieu qui contient les particules d'intérêt, pour le réguler thermiquement, au risque de faire bouger les cellules sous l'effet du flux de fluide caloporteur.

Le document US3580658 décrit une lame de microscope avec une cavité reliée à des micro-canaux dans lesquels un gaz réfrigérant est injecté. En utilisation, l'échantillon est déposé sur la lame de microscope ainsi conçue, et une lamelle de verre est déposée au dessus de l'échantillon. La lame est ensuite mise en communication fluidique avec un circuit de gaz réfrigérant et l'opérateur commande la circulation de gaz en fonction des besoins de diminuer la température de l'échantillon.

Ce dispositif nécessite la fabrication d'une lame de microscopie spécialement adaptée. Par sa conception en trois couches, cette lame ne peut être adaptée à la microscopie haute résolution standard, qui nécessite généralement une lame d'épaisseur inférieure à 150 µm, épaisseur pour laquelle ledit dispositif serait trop fragile pour être manipulé. En outre, la présence d'une couche de gaz de faible indice optique entre les deux lamelles de verre empêche l'utilisation optimale des objectifs à haute résolution à forte ouverture numérique (1,4 NA).

Par ailleurs, le contrôle de la température est peu précis et non homogène du fait des échanges thermiques globalement non contrôlés dans l'ensemble du système et le dispositif ne permet pas de contrôler spatialement la température.

En outre, la manipulation de ce dispositif est envisageable pour des expérimentations ponctuelles, mais pas pour des opérations en routine, nécessitant généralement des lamelles de support de l'échantillon à usage unique, ayant subi un traitement de surface et pouvant avoir été incubé avec l'échantillon longtemps avant l'expérience dans un milieu de composition varié.

En effet, ce dispositif nécessite de démonter la lame de support de l'échantillon à chaque nouvelle analyse. Alternativement, on peut choisir d'éliminer l'échantillon pour laver la lame réfrigérante et y déposer un autre échantillon pour observation. Avec un tel dispositif, le maintien des mêmes conditions physico-chimiques et biologiques d'une expérience à une autre est donc quasiment impossible. En outre, l'utilisation d'un adhésif rend quasi-impossible l'incubation de l'échantillon sur sa lamelle de support auparavant. Ce dispositif est donc peu compatible avec la réalisation d'analyses aux cadences pratiquées dans les laboratoires d'analyses.

En outre, l'utilisation d'un gaz réfrigérant qui a une faible capacité thermique ne permet que de limiter la température de l'échantillon dans sa globalité mais ne permet pas un control suffisamment précis et rapide de la température de l'échantillon pour certaines expériences. Ce

dispositif ne répond donc pas à la problématique d'un contrôle dynamique, homogène et précis de l'échantillon observé.

Le document US20060188979 décrit un dispositif microfluidique constitué par une plaque en verre traversée de canaux de circulation d'échantillons liquides. Ces canaux sont disposés au milieu de la plaque en verre, alors que des fils résistifs chauffants sont placés à la surface de la plaque en verre, éventuellement dans des rainures. Les échantillons sont donc chauffés en faisant parcourir un courant dans les fils résistifs. Ce dispositif vise à permettre le contrôle de température d'un échantillon de PCR à l'aide de fils résistifs. Cependant, ce dispositif est d'installation complexe, ne permet qu'un chauffage des échantillons, induit de fort gradient de températures non contrôlé au sein de l'échantillon et est inadapté au contrôle de la température d'échantillons statiques utilisant les protocoles classiques sur lame ou lamelle.

Le document US5508197 décrit un dispositif de PCR permettant de contrôler en température des matrices de micro-puits baignés dans des liquides caloporteurs issus de différents réservoirs maintenus aux températures voulues et contrôlés a l'aide de pompes et de robinets. Cependant, cette installation est complexe, encombrante et inadaptée au contrôle de la température d'échantillons disposés sur des lames de microscope en verre. Elle ne permet pas en outre la génération de gradients de température contrôlés.

Les systèmes précédents ne permettent donc pas la mise en œuvre de protocoles déjà établis concernant les échantillons statiques en assurant un contrôle rapide, précis et spatialement contrôlé.

Ainsi, l'étude d'échantillons statiques nécessite l'utilisation de systèmes différents, comme des puces microfluidiques à plusieurs niveaux de canaux, comprenant des moyens de gestion de flux particulièrement complexe à mettre en œuvre, pour éviter tout mouvement de l'échantillon. Ces systèmes ne sont donc applicables qu'à un nombre restreint d'analyses

et exigent d'être mise en œuvre par des utilisateurs hautement spécialisés en micro-fluidique.

C'est pourquoi, à l'heure actuelle, tous les systèmes commerciaux contrôlent la température non pas de l'échantillon mais de son environnement : le microscope dans son ensemble, la platine du microscope, ou encore le support de l'échantillon (la boîte de pétri, la lame).

Cependant, les constantes de temps (vitesse de changement de la température) de ces systèmes lors d'un changement de température sont supérieures à la minute, et l'homogénéité de la température sur l'ensemble de l'échantillon observé est souvent mauvaise en raison des nombreuses pertes thermiques dues à la structure même de ces systèmes.

Pour tenter de remédier à ce problème d'homogénéité, des systèmes utilisant un substrat chauffant sont également proposés. Il s'agit, par exemple, de lames de verre recouvertes d'ITO (oxyde d'indium-étain). Néanmoins les constantes de temps de ces lames restent lentes (de l'ordre de la minute) et ne permettent pas de refroidir l'échantillon en dessous de la température ambiante. En outre, l'homogénéité de la température n'est pas assurée sous les objectifs à immersion. En effet, les objectifs à immersion provoquent une perte thermique locale et dans ces dispositifs, seule la température moyenne de la surface est contrôlée, indépendamment des variations locales de perte thermique.

Outre ces problèmes d'efficacité (amplitude, rapidité et homogénéité de la régulation thermique), les coûts des fournitures et appareils de mesure constituent un poste important dans la gestion des laboratoires de recherche et d'analyse.

Il est donc essentiel de prendre en compte ces paramètres et de proposer des appareils les plus économiques possibles sans, bien entendu, sacrifier leur qualité. Au contraire, l'évolution des connaissances étant, les appareils et les fournitures doivent être de plus en plus précis et performants pour répondre aux exigences de qualité et de reproductibilité des protocoles de mesure.

Un objectif de l'invention vise à proposer un dispositif microfluidique polyvalent, peu encombrant, garantissant l'intégrité de l'échantillon et du matériel connexe, permettant une régulation thermique rapide, précise et spatialement contrôlée d'un échantillon, y compris d'un échantillon statique.

Par polyvalent, on comprend que l'invention vise à proposer un dispositif pouvant être utilisé dans de nombreuses applications, selon différents protocoles, y compris des protocoles existants, et avec différentes exigences. Un aspect important de la présente invention est de permettre l'étude d'échantillons statiques ou dynamiques avec le même matériel.

En outre, le dispositif doit être facile à mettre en œuvre, pour limiter les coûts de fonctionnements induits par une infrastructure lourde et un personnel très spécialisé.

La présente invention vise donc à proposer un dispositif permettant une régulation rapide, spatialement contrôlée et reproductible de la température d'un échantillon visqueux (de type gels), solides, ou liquide, utilisable en routine avec des protocoles d'observation standard, selon une cadence rapide et dans des conditions économiques satisfaisantes, avec une fiabilité améliorée et permettant une logistique fiable au sein d'un laboratoire.

L'invention propose d'utiliser une puce microfluidique asymétrique par rapport à un réseau de micro-canaux de circulation d'un fluide caloporteur, et comprenant d'un côté du réseau de micro-canaux une couche n'absorbant pas de chaleur et de l'autre côté du réseau une couche conduisant la chaleur, cette dernière couche étant destinée à être mise en contact avec l'échantillon. L'invention, en régulant la température du fluide caloporteur en amont de l'échantillon, permet de réguler la température de l'échantillon en respectant les protocoles usuels des utilisateurs.

A cette fin, l'invention a pour objet un support de puce microfluidique selon la revendication 1.

D'autres modes de réalisation sont prévus aux revendications 2 à 8.

L'invention se rapporte également à un système de régulation selon la revendication 9.

D'autres modes de réalisation sont prévus aux revendications 10 à 22.

D'autres caractéristiques de l'invention seront énoncées dans la description détaillée ci-après, faite en référence aux figures annexées qui représentent, respectivement :

- la figure 1, une vue schématique en coupe transversale d'un exemple d'une puce microfluidique pour la mise en œuvre de l'invention ;
- la figure 2, une vue schématique en coupe longitudinale de la puce microfluidique de la figure 1, munie d'une entrée et d'une sortie de fluide dans le prolongement des micro-canaux ;
- la figure 3, une vue schématique en coupe longitudinale d'une puce microfluidique pour la mise en œuvre de l'invention munie d'une entrée et d'une sortie de fluide perpendiculaire aux micro-canaux ;
- la figure 4, une vue schématique en perspective d'un exemple de réalisation de la puce microfluidique de la figure 3 ;
- la figure 5, une vue schématique en coupe d'un premier exemple de système de régulation thermique selon l'invention ;
- la figure 6, une vue schématique en plan d'un exemple d'une puce microfluidique pour la mise en œuvre de l'invention comprenant une zone de régulation thermique d'un fluide caloporteur et une zone de régulation thermique d'un échantillon ;
- la figure 7, une vue schématique en coupe d'un deuxième exemple de système de régulation thermique selon l'invention pour la mise en œuvre de la puce de la figure 6 ;
- la figure 8, une vue schématique en coupe d'un troisième exemple de système de régulation thermique selon l'invention ;
- la figure 9, une vue schématique en coupe d'un quatrième exemple de système de régulation thermique selon l'invention ;

- la figure 10, un diagramme illustrant la variation de température d'un échantillon grâce à un système de régulation thermique selon l'invention ;
- la figure 11, une vue schématique en plan d'un exemple d'une puce microfluidique pour la mise en œuvre de l'invention comprenant une zone de régulation thermique d'un fluide caloporteur, une zone de régulation thermique d'un échantillon et un échangeur de chaleur ;
- la figure 12, une vue schématique en coupe d'un cinquième exemple de système de régulation thermique selon l'invention, permettant la mise en œuvre de la puce de la figure 11 ;
- la figure 13, une vue schématique en plan d'un sixième exemple de système de régulation thermique selon l'invention ;
- la figure 14, une vue schématique en plan d'un septième exemple de système de régulation thermique selon l'invention ;
- la figure 15, une vue schématique en plan d'un huitième exemple de système de régulation thermique selon l'invention ;
- la figure 16, une vue schématique en plan d'un neuvième exemple de système de régulation thermique selon l'invention ;
- la figure 17, une vue schématique en perspective d'un exemple d'une puce microfluidique pour la mise en œuvre de l'invention, permettant une électrophorèse capillaire ; et
- la figure 18, une vue schématique en plan d'un exemple d'une puce microfluidique pour la mise en œuvre de l'invention comprenant un moyen de mesure de la température d'un échantillon.

D'une manière générale, l'invention propose un système de régulation thermique d'un échantillon, comprenant au moins un réseau de micro-canaux de circulation d'un fluide caloporteur, et comprenant d'un côté du réseau de micro-canaux une couche présentant soit une capacité thermique par unité de surface, à 20°C inférieure à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$, soit une conductivité thermique, à 20°C, inférieure ou égale à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$ si elle

présente une capacité thermique par unité de surface, à 20°C supérieure ou égale à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$ et, de l'autre côté du réseau, une couche présentant une conductivité thermique, à 20°C, supérieure à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$ et d'épaisseur comprise entre 10 µm et 200 µm. Cette dernière couche est destinée à être mise en contact avec l'échantillon.

On entend par « réseau de micro-canaux », une pluralité de micro-canaux permettant une distribution simultanée de liquide caloporteur. Avantageusement, ces canaux sont parallèles. Chaque micro-canal peut être délimité par des parois continues ou par des parois discontinues. Dans ce dernier cas, le réseau de micro-canaux est formé par une cavité comprenant des piliers constituant les parois discontinues des micro-canaux qui communiquent entre eux.

Le système comprend, en outre, un système de mise en circulation d'un liquide caloporteur et au moins un moyen de régulation thermique du liquide caloporteur.

Avantageusement, le ou les réseau(x) de micro-canaux, la couche portant le ou les réseau(x) de micro-canaux, et la couche conduisant la chaleur sont localisés sur une puce de régulation thermique indépendante du système de mise en circulation du liquide caloporteur et du moyen de régulation thermique du liquide caloporteur

On entend par capacité thermique par unité de surface la quantité d'énergie nécessaire pour élever la puce d'une température donnée (1 degré Kelvin), sur toute sa hauteur, pour une unité de surface (le cm^2) de la puce.

- La capacité thermique par unité de surface de la couche portant le réseau de micro-canaux est calculée selon la formule $C_s = \rho.C.e$ où C est la capacité calorifique du matériau à 20°C mesurée selon la norme DIN EN 821-3 et ρ est la densité du matériau à 20°C mesurée selon la norme EN 623-2.

La conductivité thermique est calculée suivant la formule :

$$\lambda = \rho C D$$

Où :

- D est la diffusivité thermique du matériau à 20°C mesurée selon la norme DIN EN 821-2,
- C est la capacité calorifique du matériau à 20°C mesurée selon la norme DIN EN 821-3,
- ρ est la densité du matériau à 20°C mesurée selon la norme EN 623-2.

De préférence, cette puce est fixée de manière réversible (par exemple par un coincement en force) sur un support.

La figure 1 représente une puce microfluidique 100 disposée sur une couche 200, telle qu'une lamelle de verre, recouvrant un échantillon A posé sur une lame de verre de microscopie 1.

La puce 100 comprend une couche 110 de matériau d'une épaisseur E présentant soit une capacité thermique par unité de surface, à 20°C inférieure à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$, soit une conductivité thermique, à 20°C, inférieure ou égale à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$ si elle présente une capacité thermique par unité de surface, à 20°C supérieure ou égale à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$.

Avantageusement, la couche 110 portant les micro-canaux est choisie pour présenter une capacité thermique par unité de surface, à 20°C inférieure à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$. Grâce à cette sélection de propriété thermique, la couche peut avoir une épaisseur inférieure ou égale à 1 millimètre pour constituer une puce dite « mince ».

De telles propriétés thermiques permettent de réduire l'épaisseur de la couche portant les micro-canaux à une épaisseur inférieure à 1 millimètre, ce qui améliore sensiblement la vitesse de régulation thermique de l'échantillon par le liquide caloporteur. La constante de temps et l'homogénéité de la régulation sont améliorées, de sorte qu'il est possible d'obtenir une régulation de température rapide et spatialement contrôlée d'un échantillon, sans interférer mécaniquement avec l'échantillon.

Alternativement, la couche 110 portant les micro-canaux est choisie pour présenter une capacité thermique par unité de surface, à 20°C supérieure ou égale à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$. Dans ce cas, la couche doit présenter,

selon l'invention, une conductivité thermique, à 20°C, inférieure ou égale à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$. Grâce à cette combinaison de propriétés thermiques, la couche peut présenter une épaisseur supérieure à 1 millimètre pour constituer une puce dite « épaisse », tout en ayant amélioré, par rapport à l'état de la technique, la vitesse de régulation thermique de l'échantillon par le liquide caloporteur (la constante de temps) et le contrôle spatial de la température, sans interférer mécaniquement avec l'échantillon.

La couche 110 présente une face 111 sur laquelle est disposé au moins un réseau de micro-canaux 120.

Cette puce microfluidique est fonctionnellement asymétrique puisque, en utilisation, la couche portant les micro-canaux :

- soit absorbe très peu de la chaleur du liquide caloporteur (lorsque la couche présente une capacité thermique par unité de surface, à 20°C inférieure à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$),
- soit transmet très peu de chaleur (lorsque la couche présente une conductivité thermique, à 20°C, inférieure ou égale à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$ si elle présente une capacité thermique par unité de surface, à 20°C supérieure ou égale à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$).

la couche portant les micro-canaux est destinée à être mise en contact avec une couche de transmission thermique qui sépare mécaniquement l'échantillon du liquide caloporteur. Cette couche de transmission thermique présente une conductivité thermique, à 20°C, supérieure à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$ et d'épaisseur comprise entre 10 µm et 200 µm.

La puce et la couche de transmission thermique peuvent, en outre, être constituées de matériaux transparents dans la gamme de longueur d'onde du visible.

Cette puce microfluidique est optimale pour une régulation rapide, précise et spatialement contrôlée de la température d'un échantillon positionné au contact de la couche conductrice puisque : (i) la faible capacité thermique de la couche portant les micro-canaux permet de supprimer rapidement les pertes de chaleur au sein du fluide caloporteur ; (ii) la forte

conductivité thermique de la couche conductrice permet de transférer rapidement la chaleur entre le fluide caloporteur et l'échantillon à thermaliser et de maintenir une température stable quel que soit les conditions de pertes thermiques liées à l'échantillon; (iii) la distance thermique entre l'échantillon et le fluide caloporteur est limitée au sein de la zone de régulation thermique ce qui permet d'assurer un contrôle spatial précis.

Chaque micro-canal 120 présente une largeur d inférieure ou égale à 5 mm et supérieur ou égale à 10 µm et une hauteur h inférieure ou égale à 500 µm et supérieur ou égale à 10 µm.

Une largeur d maximum de 5 mm permet de limiter la déformation de la lame conductrice de chaleur. Une largeur d minimum de 10 µm permet d'éviter que la pression d'injection dans la puce nécessaire à la circulation du liquide caloporteur ne rompe la puce.

Chaque micro-canal 120 présente une hauteur h inférieure ou égale à 500 µm et supérieure ou égale à 10 µm.

La hauteur h maximum permet d'obtenir un transfert suffisant de chaleur par convection forcée, donc pour que la température du liquide caloporteur soit efficacement transmise à la couche conductrice de chaleur. Une hauteur h des canaux supérieure ou égale à 10 µm, permet d'éviter que la pression d'injection dans la puce nécessaire à la circulation du liquide caloporteur ne rompe la puce.

Avantageusement, la hauteur h des micro-canaux est choisie supérieure ou égale à leur largeur d. Ceci permet de faire circuler le liquide caloporteur avec un débit pouvant être important, sans risquer une déformation de la couche 200 et d'altérer la qualité optique de la puce microfluidique 100. Autrement dit, une hauteur h des canaux supérieure ou égale à leur largeur d permet une pression d'injection optimale.

La conformation en réseau de micro-canaux permet de limiter la pression d'injection du fluide caloporteur, tout en optimisant la rapidité et le contrôle spatial de la régulation de température.

La largeur l des piliers ou la distance l entre deux micro-canaux est supérieure au vingtième de la largeur d des micro-canaux. Cela permet d'éviter, en utilisation, que la pression nécessaire d'injection ne détruise la puce.

La largeur l des piliers ou la distance l entre deux micro-canaux est avantageusement inférieure ou égale à deux fois l'épaisseur de la couche 200 conductrice de chaleur (voir ci-après) pour obtenir un bon contrôle spatial de la température.

Les micro-canaux sont destinés à conduire un liquide caloporteur 2 lors de l'utilisation de la puce microfluidique 100.

La face 111 de la couche 110 portant les micro-canaux 120 est destinée à être mise en contact avec une couche 200 recouvrant l'échantillon A.

Cette mise en contact peut être faite au moment de l'utilisation. Par exemple, la puce 100 est disposée de façon réversible sur un ensemble couche 200/échantillon A/ lame de verre 1, préalablement préparé selon un protocole bien connu en soi, de sorte que la couche 200 est en contact avec les micro-canaux 120 de la puce 100. Cette puce est donc compatible avec des techniques de microscopie classique ou tout autre système de caractérisation de l'échantillon.

Dans ce cas, la puce peut être appliquée puis désolidarisée successivement de la couche 200 recouvrant l'échantillon A tout en évitant de le détériorer mécaniquement ou chimiquement puisqu'il est protégé par la couche 200 qui reste sur l'échantillon lorsque la couche 110 est retirée.

Ce montage permet une étude en routine rapide, selon une cadence élevée de plusieurs échantillons préparés selon un même protocole, et sans destruction ultérieure de l'échantillon. Des observations peuvent donc être facilement répétées dans les mêmes conditions expérimentales.

Alternativement, la couche 200 peut faire partie intégrante de la puce 100, c'est-à-dire qu'elle est fixée, au cours de la fabrication de la puce, de façon non réversible sur la puce 100 en contact avec les micro-canaux

120. Ensuite, c'est cet ensemble couche 110/couche 200 qui est appliqué sur l'échantillon A préalablement déposé sur une lamelle de microscopie, ou tout autre substrat.

Dans ce cas, l'ensemble couche 110/couche 200 peut être appliqué puis retiré successivement des échantillons tout en évitant que la régulation thermique les détériore mécaniquement ou chimiquement, la séparation physique avec le liquide caloporteur évitant une réaction chimique avec l'échantillon, une dilution, une dispersion ou une destruction mécanique de l'échantillon. Néanmoins, une conservation ultérieure de l'échantillon est délicate puisqu'il est remis à l'air libre, simplement déposé sur son substrat 1. Ce mode de réalisation de la puce devrait donc être réservé à des expérimentations dans lesquelles l'échantillon n'a pas besoin d'être conservé.

La couche 200 est conductrice de chaleur. Elle présente une épaisseur e supérieure à 10 µm et inférieure ou égale à 200 µm.

Une épaisseur e supérieure à 10 µm évite que la lame ne soit déformée ou détruite par la pression du liquide caloporteur.

Une épaisseur e inférieure à 200 µm permet une grande polyvalence de la puce. En effet, à constante de temps égale avec d'autres dispositifs connus de l'état de la technique (environ 1 minute), la puce permet une régulation thermique d'un échantillon allant jusqu'à 1 mm d'épaisseur. En outre, à épaisseur d'échantillon égale à celle des échantillons classiques de l'état de la technique (environ 100 µm entre lame et lamelle), la puce permet une régulation thermique de l'échantillon rapide et contrôlée spatialement. Ainsi, par exemple, pour une température ambiante de 23°C, une température initiale de l'échantillon de 23°C, et une température de consigne de l'échantillon de 3°C, la puce permet une régulation thermique homogène de l'échantillon en 10 secondes alors qu'avec un dispositif de l'état de la technique , par exemple avec le système de contrôle de température thermoélectrique de précision Linkam LTS 120, la régulation thermique de l'échantillon nécessite un temps supérieur ou égal à 40 secondes pour que cet échantillon atteigne la température de consigne et soit homogène

thermiquement, en outre, ce système Linkam LTS 120 n'est pas compatible avec la microscopie haute résolution utilisant un objectif à huile.

La couche 200 présente une conductivité thermique, à 20°C, supérieure à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$. Lorsqu'elle est en contact avec la face 111 portant le réseau de micro-canaux 120, cette couche ferme les micro-canaux. En utilisation, lorsque du liquide caloporteur circule dans les micro-canaux 120, la couche 200 conduit la chaleur (positive ou négative) et la transmet à l'échantillon A.

Avantageusement, la largeur l des piliers ou la distance l entre deux micro-canaux est choisie inférieure ou égale à deux fois l'épaisseur e de la couche 200 entre l'échantillon et le liquide caloporteur, ce qui permet de conserver une bonne homogénéité et un bon contrôle spatial de la température sur la surface de la couche 200 en contact avec l'échantillon.

De préférence, la distance l est sensiblement égale à l'épaisseur de la couche 200 conductrice de chaleur, ce qui optimise le bon contrôle spatial de la température.

La face 111 de la couche 110 portant les micro-canaux 120 est avantageusement adaptée pour être mise en contact étanche avec une couche 200 recouvrant l'échantillon A. Par exemple, la couche 110 portant les micro-canaux est en polydiméthylsiloxane (PDMS), et la couche 200 conductrice de chaleur est en verre.

Alternativement, il est possible de prévoir un joint pour assurer l'étanchéité entre la couche 110 et la couche 200. Ce joint peut être constitué par une colle entre les deux couches.

Dans le mode de réalisation illustré aux figures 1 et 2, les micro-canaux 120 sont séparés par des parois continues 121 d'épaisseur inférieure ou égale à 400 µm.

Dans un mode de réalisation alternatif non illustré, les micro-canaux peuvent être constitués par une cavité de hauteur inférieure ou égale à 500 µm, munie d'un réseau de piliers de diamètre inférieur ou égale à 400

µm, de préférence inférieur ou égale à 200 µm, et espacés d'une distance inférieure ou égale à 5 mm.

L'utilisation de canaux ou de piliers soutenant une cavité évite une déformation de la membrane de conduction thermique 200 sous l'action de la pression nécessaire à la circulation du liquide caloporteur sur la membrane de conduction thermique 200.

Avantageusement, les micro-canaux sont parallèles pour assurer une bonne homogénéité du transfert de chaleur entre le liquide caloporteur et l'échantillon via la couche conductrice de chaleur 200, tout en présentant une constante de temps optimale et en réduisant la pression nécessaire à la circulation du fluide caloporteur.

Alternativement ou en combinaison, la puce peut intégrer des structurations d'au moins une face interne des micro-canaux pour uniformiser la température dans le liquide caloporteur 2.

La figure 2 est une coupe longitudinale de la puce 100 de la figure 1. Cette figure 2 montre un exemple de réalisation où chaque micro-canal 120 s'étend tout le long de la puce 100.

On entend par « surface des micro-canaux », la surface égale à la distance d+ l couverte par chaque micro-canal multiplié par le nombre et la longueur de chaque micro-canal.

La partie de la surface des micro-canaux en regard de l'échantillon est appelée « zone de régulation thermique de l'échantillon ». Dans la figure 2, la zone de régulation thermique Z_1 de l'échantillon s'étend tout le long de la puce 100.

Dans la figure 2, chaque micro-canal 120 présente, dans son prolongement, une entrée 122 et une sortie 123 pour la circulation du fluide caloporteur 2. L'entrée 122 et la sortie 123 sont disposées sur les faces latérales 112 de la couche 110.

Les figures 3 et 4 illustrent un exemple de réalisation alternatif d'une puce 101, dans lequel l'entrée 122 et la sortie 123 sont disposées sur la face supérieure 113 de la couche 110, c'est-à-dire la face opposée à la face

portant les micro-canaux 120. Dans cet exemple, l'entrée 122 et la sortie 123 sont reliées au micro-canal 120 par des canalisations 124.

Avantageusement, les entrées 122 et sorties 123 des micro-canaux convergent vers une entrée et une sortie uniques, préférentiellement équipées chacune d'un moyen de connexion fluidique à un circuit fluidique.

La figure 4 illustre un exemple de réalisation particulier, dans lequel la puce 101 présente une couche 110 portant les micro-canaux fixée à une couche 200 de transfert thermique telle que décrite aux figures 1 à 3.

Les couches 110 et 200 de part et d'autre du réseau de micro-canaux doivent être transparentes aux signaux (ou rayonnements) émis et/ou reçus par le dispositif d'observation 1000 de l'échantillon.

Par exemple, lorsque le dispositif d'observation 1000 de l'échantillon est un microscope à lumière visible, les couches 110 et 200 doivent être transparentes aux longueurs d'ondes de la lumière visible par l'homme.

De même, l'indice de réfraction optique du liquide caloporteur pourra être ajusté avec celui des couches 110 pour rendre les canaux ou les piliers invisibles aux longueurs d'ondes utilisées et permettre une observation précise de l'échantillon.

Avantageusement, le liquide caloporteur présente une densité optique égale à la densité optique du capot microfluidique, ce qui permet d'éviter de voir le réseau microfluidique lorsque l'on est en observation microscopique.

La figure 5 illustre un support 300 de régulation thermique d'un échantillon comprenant un moyen de maintien 301 d'une puce microfluidique 101, illustrée en figure 3, en relation avec un moyen de régulation thermique 400 d'un fluide 2 destiné à s'écouler dans les micro-canaux de la puce.

La puce est « maintenue en relation » avec le moyen de régulation thermique 400 lorsque le positionnement et le maintien de la puce

dans le support permettent un écoulement dans les micro-canaux de la puce du fluide régulé thermiquement par le moyen de régulation thermique.

Le support 300 comprend une zone de régulation thermique Z_2 du fluide caloporteur 2 comportant au moins une conduite 302 du liquide caloporteur, destinée à être mise en relation thermique avec le moyen de régulation thermique 400. A cette fin, la conduite est conçue pour favoriser le transfert thermique entre le moyen de régulation thermique 400 et le fluide 2. Par exemple, la conduite 302 peut être en métal, tel que du cuivre ou de l'aluminium.

La conduite peut être disposée sur la face du support, directement en contact avec le moyen de régulation thermique 400. Alternativement, la conduite 302 peut être intégrée dans le support. Dans ce cas, le transfert thermique entre l'élément de régulation thermique et le liquide caloporteur se fait alors au travers de la partie du support située entre la conduite 302 et le moyen de régulation thermique.

Le moyen de régulation thermique 400 du liquide caloporteur présente, de préférence, une puissance calorifique d'au moins 0,8 W par cm^2 de surface des micro-canaux

Avantageusement, le moyen de régulation thermique 400 est un module thermoélectrique (tel qu'un module Peltier) permettant de réchauffer ou de refroidir le liquide caloporteur. Comme il sera expliqué plus tard, le moyen de régulation thermique 400 peut comprendre plusieurs unités comme, par exemple, plusieurs modules thermoélectriques.

La conduite 302 est reliée au réseau de micro-canaux de la puce microfluidique 101 par un moyen de connexion fluidique 125.

Dans le mode de réalisation de la figure 5, le support comprend également une canalisation de transport 303 du liquide caloporteur 2 depuis la conduite 302 jusqu'au moyen de connexion fluidique 125.

Cette canalisation de transport 303 présente, de préférence, une longueur inférieure à une longueur typique de 10 cm par cm^2 de surface de micro-canaux. Ceci a pour fonction de limiter les déperditions de chaleur

(positive ou négative) et de permettre un transport rapide du liquide régulé thermiquement vers les micro-canaux 120 en vue de la régulation thermique de l'échantillon A.

D'une manière générale, lorsque la ou les canalisation(s) est (sont) agencées en dehors de la puce et incorporée(s) dans le support 300, ladite au moins une canalisation de transport du liquide caloporteur présente avantageusement une longueur telle que la capacité thermique de l'ensemble canalisation/ plus dispositif reste inférieure à 0,5 J/K par cm^2 de surface de micro-canaux.

La capacité thermique de l'ensemble canalisation(s) plus couche portant le ou les réseau(x) de micro-canaux est calculée suivant la formule $C = C_1.V_1+C_2.V_2$

Où :

- C_1 est la capacité calorifique, à 20°C, du matériau de la couche,
- V_1 est le volume de la couche,
- C_2 est la capacité calorifique, à 20°C, du matériau de la ou des canalisation(s),
- V_2 est le volume de la ou des canalisation(s).

Le support 300 est mis en communication fluidique avec un système de gestion du liquide caloporteur 500 comprenant un réservoir 510 de liquide caloporteur et un moyen de mise en circulation 520 d'un liquide caloporteur. Le réservoir peut être constitué par une cuve 510 et/ou par une longueur suffisante de tubulure 511.

Le moyen de mise en circulation 520 du liquide caloporteur est, de préférence, apte à générer un débit de liquide caloporteur d'au moins 0,3 ml par minute et par cm^2 de surface des micro-canaux afin d'assurer une circulation rapide du liquide et une régulation thermique rapide et précise de l'échantillon.

Les moyens de mise en circulation d'un liquide caloporteur 520 et de régulation thermique 400 du fluide sont pilotés à l'aide d'un système de contrôle électronique/informatique (non représenté). Ce système de

contrôle comprend une unité central de traitement de données reliée à une ou plusieurs sondes thermiques placées en amont et/ou en aval de la puce microfluidique de manière à pouvoir quantifier les pertes thermiques entre l'échantillon et le milieu extérieur et ainsi corriger les consignes des moyens de génération de flux et/ou de thermalisation.

Lorsque la puce 100, le support 300 et le système 500 sont en communication fluidique, un circuit fluidique est créé. Ce circuit fluidique comprend le réservoir 510, les tubulures 511, la ou les conduites 302, la ou les canalisations 303, les micro-canaux 120, et la sortie de fluide 123 hors des micro-canaux. Avantageusement, cette sortie 123 est reliée au réservoir 510 pour une recirculation du fluide caloporteur. Le fluide ayant traversé la puce microfluidique est ainsi réinjecté en amont du moyen de régulation thermique du liquide caloporteur. Ce mode de réalisation permet de limiter la quantité de liquide caloporteur total nécessaire à un fonctionnement long du système de thermalisation.

Le liquide caloporteur est mis en circulation dans le circuit fluidique selon le sens de la flèche F1. Autrement dit, le liquide passe d'abord par la zone de régulation thermique Z_2 du liquide caloporteur, avant de circuler dans la zone de régulation thermique Z_1 des micro-canaux 120.

Dans le mode de réalisation de la figure 6, c'est la puce microfluidique elle-même qui comprend la zone de régulation thermique Z_2 du fluide caloporteur. Cette zone Z_2 comprend un réseau de conduites 130 du liquide caloporteur, destinées à être mises en relation thermique avec un moyen de régulation thermique (non représenté sur cette figure 6).

Le réseau de conduites 130 est relié de manière fluidique au réseau de micro-canaux 120 par un réseau de canalisations 140.

Ce mode de réalisation d'une puce permet une miniaturisation du système de régulation thermique.

En outre, à chaque fois que l'on change la puce, on change également la zone de thermalisation du liquide caloporteur, ce qui évite un

encrassement des zones de régulation thermique et assure une efficacité constante de la régulation thermique du liquide et de l'échantillon.

Dans ce cas, lorsque la puce intègre une zone Z2 de régulation thermique du fluide caloporteur, soit la couche 110 portant le réseau de micro-canaux présente une capacité thermique par unité de surface, à 20°C inférieure à 0,3 J.K-1.cm-^{2} et une conductivité thermique, à 20°C, supérieur ou égale à 0,5 W.m-1.K-1, auquel cas il est possible de réguler thermiquement le liquide suffisamment efficacement en mettant le moyen de régulation thermique 400 au regard de la zone Z2 du coté de la couche 110, soit cette couche 110 présente une conductivité thermique, à 20°C, inférieure ou égale à 0,5 W.m-1.K-1 (par exemple si elle est en PDMS), et la régulation thermique du liquide caloporteur doit alors se faire en regard de la zone Z2, mais à travers la couche conductrice de chaleur 200. Ce mode de réalisation est illustré en figure 7.

La longueur de la zone de régulation thermique Z_2 du liquide caloporteur est égale ou supérieur à la longueur des micro-canaux utilisée pour réguler thermiquement l'échantillon.

La figure 7 illustre un système de régulation thermique d'un échantillon A utilisant la puce illustrée en figure 6. Dans ce système, le moyen de régulation thermique 400 du fluide caloporteur est disposé en regard de la zone Z_2 et l'échantillon est disposé en regard de la zone Z_1. Les zones Z_2 et Z_1 sont reliées par les canalisations 140.

Dans le mode de réalisation de la figure 8 d'un système de régulation thermique selon l'invention, l'échantillon est déposé sur la puce de manière à pouvoir l'observer avec un microscope droit, tout en contrôlant rapidement et précisément sa température. La couche 200 permettant de réguler thermiquement l'échantillon est donc orientée vers le haut.

Le support 300 de la puce 100 contient, de préférence, des moyens de fixation réversible permettant le positionnement, le maintien et de serrage de la puce dans le support, et de l'échantillon au contact de la puce.

Dans cet exemple, le système comporte un moyen de mise en circulation 520 d'un liquide caloporteur, un moyen de régulation thermique 400 à température fixée et un réservoir de liquide caloporteur à température ambiante.

Les moyens de mise en circulation 520 d'un liquide caloporteur et de régulation thermique 400 du fluide sont pilotés à l'aide d'un système de contrôle électronique/informatique associé à une ou plusieurs sondes thermiques (non représentés).

Ce système permet de faire varier de manière spatialement contrôlée la température de l'échantillon entre la température du moyen de régulation thermique 400 et la température ambiante, simplement en changeant la direction d'écoulement du liquide caloporteur dans le système à l'aide du moyen de mise en circulation d'un liquide caloporteur 520. Ce dernier peut être, par exemple, un pousse seringue, une pompe pneumatique ou une pompe hydraulique.

Selon un exemple de réalisation, la puce 100 est constituée d'une lame de verre 110 de 300 µm d'épaisseur, dans laquelle sont gravés les micro-canaux 120, qui est collée sur une lamelle de verre 200 de 100 µm d'épaisseur. La zone de régulation thermique Z_1 est composée d'une série de canaux parallèles de 50 µm de hauteur, de 50 µm de largeur, et distants de 50 µm. L'ensemble couvre une surface de régulation thermique de 1 cm^2.

Le support 300 de puce 100 comprend un châssis métallique sur lequel est fixé un ensemble conduites 302/module Peltier 400/radiateur 401, agencé de manière à ce que les conduites 302 ne soit pas en contact thermique avec le châssis. Les conduites 302 sont reliées aux micro-canaux de la puce par une canalisation 303 en cuivre de 1 mm de diamètre extérieur et 0,5 mm de diamètre intérieur à travers un joint en caoutchouc directement en contact avec la puce. La canalisation 303 n'est pas en contact avec le châssis. La puce est maintenue dans le support puce par un capot vissé sur le support qui applique une pression contrôlé sur la puce à travers un joint en caoutchouc.

Le moyen de mise en circulation 520 permet d'injecter de l'eau dans le circuit à un débit de 50 µl/s, dans un sens ou dans l'autre.

La puce, le support et le système selon l'invention évitent que le microscope ne trouble la régulation thermique de l'échantillon. En effet, la régulation thermique selon l'invention se fait à une distance très faible de l'échantillon par rapport à la distance séparant le microscope et l'échantillon. Ceci est d'autant plus vrai lors de l'utilisation d'un microscope à immersion, alors que la goutte d'huile fait un pont thermique avec les systèmes de régulation thermique de l'art antérieur, générant un point chaud non maitrisable et dangereux pour l'échantillon. Ce phénomène est totalement absent dans la présente invention, ce qui permet une régulation thermique rapide et spatialement contrôlée de l'échantillon.

De la même manière, les propriétés thermiques (capacité thermique et conductivité thermique) et structurelles (épaisseur) de la couche 110 portant les micro-canaux sont telles, par rapport à l'épaisseur de la couche 200, que les déperditions de chaleur à travers la couche 110 soient faibles et/ou lentes, et ne perturbent pas la précision et la vitesse de la régulation thermique de l'échantillon.

Dans le mode de réalisation de la figure 9 d'un système de régulation thermique selon l'invention, l'échantillon est déposé sur la puce de manière à pouvoir l'observer avec un microscope inversé, configuration typiquement utilisée lors des observations en microscopie à haute résolution (épifluorescence, confocal, TIRF, etc.). Dans ce cas, la couche de conduction thermique 200 de la puce est orientée vers le bas.

L'échantillon peut être enfermé entre la couche 200 et une lame de microscopie classique.

La figure 9 illustre un support d'échantillon particulièrement avantageux pour l'étude statique d'échantillons liquide fragiles.

Ce support 600 d'échantillon présente une couche de dépôt de l'échantillon. Avantageusement, cette couche 601 présente une

conductivité thermique, à 20°C, inférieure à 2 $W.m^{-1}.K^{-1}$ et une épaisseur inférieure ou égale à 1 mm.

Un rebord périphérique 602 est disposé sur la couche 601, ménageant une cavité étanche de stockage de l'échantillon entre la couche de dépôt 601 et la couche conductrice de chaleur 200 de la puce. Avantageusement, le rebord présente une hauteur inférieure ou égale à 1mm.

De cette manière, la distance entre les micro-canaux de la puce et l'échantillon (cette distance étant égale à l'épaisseur de la couche 200) est suffisamment inférieure à la distance séparant l'échantillon de l'objectif du microscope (cette distance étant supérieure à l'épaisseur de la couche 601) pour que la chaleur dégagée par le microscope ne perturbe pas l'intensité et l'homogénéité de la régulation thermique de l'échantillon.

Un exemple de réalisation est décrit ci-après. La puce comprend une lamelle 200 de verre de 100 µm d'épaisseur sur laquelle est collé un bloc de PDMS de 5 mm d'épaisseur dans lequel est moulé une cavité où circule le liquide caloporteur. La zone de régulation thermique est composée d'une cavité de 1 cm^2 et de 50 µm de haut, soutenue par un réseau de piliers de 50 µm de diamètre, espacés de 100 µm.

La capacité thermique par unité de surface, à 20°C d'un bloc de PDMS de 5 mm d'épaisseur est égale à 0,75 $J.K^{-1}.cm^{-2}$, donc supérieure à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$. Cependant, sa conductivité thermique, à 20°C, est égale à 0,15 $W.m^{-1}.K^{-1}$, donc inférieure à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$.

Le support de la puce et le système de régulation thermique sont semblables fonctionnellement à ceux qui ont été décrit à la figure 8.

Un échantillon liquide est déposé dans un support 600 d'échantillon composé d'une lamelle 601 en verre ou en plastique moulée de 100 µm d'épaisseur, de manière à former un rebord périphérique de 10 µm de profondeur ménageant une cavité pour recevoir l'échantillon.

Le graphique de la figure 10 montre l'efficacité de la régulation thermique obtenue avec un système de régulation thermique semblable à celui de la figure 9.

Ce graphique montre qu'un tel système permet de changer la température d'un échantillon en moins de 10 secondes et d'obtenir une précision en température inférieure à 0,5°C. Ces constantes de temps sont très inférieures à celles (environ une minute) qui sont obtenues avec les systèmes de l'état de la technique. En outre, l'invention permet d'obtenir une température spatialement contrôlée de l'échantillon.

La figure 11 illustre une puce de régulation thermique semblable à celle décrite à la figure 6, et comprenant, en outre, un échangeur de chaleur 700 entre le liquide susceptible d'entrer dans le réseau de micro-canaux et le liquide susceptible de sortir du réseau de micro-canaux.

Grâce à l'échangeur de chaleur 700, la température du liquide sortant du réseau de micro-canaux de la puce est transférée au liquide entrant dans le réseau de micro-canaux de la puce. Cette structure permet de limiter la puissance nécessaire au fonctionnement du système et évite de faire circuler le liquide régulé thermiquement dans le moyen de mise en circulation 520 du liquide. Cette structure permet donc d'utiliser une pompe de circulation sans que la température du liquide pompé sorte des tolérances de la pompe

L'échangeur de chaleur peut être intégré dans le support de la puce.

Avantageusement, l'échangeur de chaleur est réalisé dans la puce elle-même, sous forme de deux micro-canaux parallèles, d'une longueur supérieure à 5 cm, encerclant le réseau de micro-canaux de régulation thermique de l'échantillon et, éventuellement, le réseau de thermalisation du liquide caloporteur, s'il est intégré dans la puce (ce qui est le cas dans l'exemple de la figure 11). Ceci permet de limiter la diffusion de la chaleur des zones de thermalisation vers la périphérie de la puce, limitant ainsi les pertes énergétiques. Cette structure permet également d'augmenter l'homogénéité de la température dans les zones de régulation thermique. Enfin, lorsque la puce est éliminée, l'échangeur et les zones de régulation thermiques le sont également, ce qui évite l'encrassement de ces différentes structures et un entretien coûteux du système.

Un exemple de réalisation est décrit ci-après. La puce 100 est constituée d'une lame de verre 110 de 300 µm d'épaisseur, dans laquelle sont gravés les micro-canaux 120, qui est collée sur une lamelle de verre 200 de 100 µm d'épaisseur. La zone de régulation thermique Z_1 est composée d'une série de micro-canaux 120 parallèles de 50 µm d'épaisseur, de 50 µm de largeur, et distants de 50 µm. L'ensemble couvre une surface de régulation thermique de 1 cm^2.

La capacité thermique par unité de surface, à 20°C est inférieure à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$: 0.063 $J.K^{-1}.cm^{-2}$

Cette puce comprend également un réseau fluidique comportant une entrée 122 et une sortie 123 de liquide entre lesquelles sont insérés, dans le sens de circulation du fluide :

i) un échangeur de chaleur 700 entre le liquide sortant et le liquide entrant, composé de deux canaux parallèles en spirale, de 200 µm de large, 50 µm d'épaisseur et 15 cm de long, l'un faisant circuler le liquide entrant dans un sens et l'autre faisant circuler le liquide sortant dans le sens opposé. Plus ces deux canaux sont proches l'un de l'autre, meilleur est l'échange de chaleur ;

ii) une zone de régulation thermique Z_2 du liquide caloporteur comprenant d'une série de conduites 130 parallèles de 100 µm de large et 50 µm d'épaisseur. Ces conduites sont destinées à être en contact avec un moyen de régulation thermique tel qu'un module Peltier ;

iii) une série de canalisations 140 de transport du liquide caloporteur provenant de la zone de régulation thermique Z_2 ;

iv) la zone de régulation thermique Z_1 de l'échantillon comprenant un réseau de micro-canaux 120 en contact avec l'échantillon.

La figure 12 illustre un système incorporant la puce de la figure 11. Ce système comprend un support de puce intégrant un moyen de régulation thermique 400 destiné à réguler thermiquement le liquide caloporteur circulant dans les conduites 130 de la puce.

Dans ce cas, comme expliqué en relation avec la figure 6, la couche 110 portant le réseau de micro-canaux présente une capacité thermique par unité de surface, à 20°C inférieure à 0,3 J.K-1.cm-^{2} et une conductivité thermique, à 20°C, supérieur ou égale à 0,5 W.m-1.K-1. Dans ce cas, la régulation thermique peut être réalisée en regard de la zone Z2 au travers de la couche 110.

Un porte échantillon comportant une cavité est disposé en vis-à-vis des micro-canaux 120 de la zone de régulation thermique de l'échantillon A.

Le système comprend également un moyen de mise en circulation du liquide caloporteur composé d'une pompe 520 et d'un réservoir de liquide 510.

Dans le mode de réalisation de la figure 13, le système de régulation thermique selon l'invention comprend une puce 100 semblable à celle qui a été décrite à la figure 4.

Dans ce mode de mise en œuvre, le moyen de mise en circulation du liquide caloporteur est une mini-pompe à membrane intégrée dans le support de la puce. Cette mini-pompe permet de faire circuler le liquide en boucle pour minimiser la quantité de liquide consommée et la quantité de liquide à réguler thermiquement.

De préférence, le moyen de régulation thermique 400 comporte deux modules Peltier agencés de part et d'autre des conduites 130 (non illustrées), et ayant une forte puissance surfacique pour obtenir une vitesse élevée de changement de température du liquide caloporteur.

Le moyen de régulation thermique 400 du liquide caloporteur est monté en communication fluidique avec un échangeur de chaleur 700 pour recycler la température du liquide caloporteur en sortie de la puce vers l'entrée du moyen de régulation thermique 400. Ceci permet de limiter la taille de la zone de régulation thermique du circuit fluidique.

Dans le mode de réalisation de la figure 14, le système de régulation thermique selon l'invention comprend une puce 100 semblable à

celle qui a été décrite à la figure 4, et deux moyen de régulation thermiques 400 et 400' indépendants reliés, d'une part, à deux moyens de mise en circulation du liquide 520 et 520' indépendants et, d'autre part à des moyens de mélange 800 situés entre la zone de régulation thermique de l'échantillon et les différents moyens de régulation thermique 400 et 400'. L'ensemble est préférentiellement piloté par ordinateur.

Les moyens de mise en circulation du liquide 520 et 520' sont, avantageusement, des mini-pompes à engrenage à débit variable.

Ce système permet d'effectuer des gradients temporels de température très précisément.

Ainsi, ce système permet de modifier très rapidement la température du liquide caloporteur en mélangeant deux liquides, de préférence de températures différentes, issus de deux éléments de régulation thermique 400 et 400' distincts (par exemple à module Peltier). La température de consigne peut alors être n'importe quelle température comprise entre les températures des deux éléments de régulation thermique.

Le mode de réalisation de la figure 15 est une alternative au mode de réalisation de la figure 14. Dans la figure 15, le système comporte deux éléments de régulation thermique 400 et 400' distincts avec un seul moyen de mise en circulation du liquide 520 et un commutateur 810 de type électrovanne.

Ce mode de mise en œuvre permet de commuter rapidement la température de régulation thermique entre deux valeurs de consigne.

Le commutateur 810 peut être une vanne de commutation proportionnelle ou bistable.

Le mode de réalisation de la figure 16 illustre la possibilité de générer un gradient spatial de température dans la zone de régulation thermique Z1 de l'échantillon.

A cette fin, la puce 104 présente, entre les moyens de régulation thermiques 400 et 400', un moyen de mélange 800' constitué par

un réseau microfluidique de génération de gradients par diffusion ou convection chaotique.

Ce mode de mise en œuvre permet d'obtenir n'importe quel gradient spatial de température, le gradient de température pouvant être modifié rapidement dans le temps en modifiant les températures de consigne des éléments Peltier.

En outre, l'invention permet de réguler la température d'un échantillon disposé, par exemple, au sein d'un support échantillon 600 présentant une structuration microfluidique ou des éléments actifs (électrodes par exemple) permettant d'appliquer d'autres opérations élémentaires à l'échantillon (application d'un champ électrique, d'un déplacement par gradient de pression,...). La figure 17 illustre ainsi la possibilité d'utiliser une puce de régulation thermique selon l'invention, pour de l'électrophorèse capillaire.

La puce de régulation thermique illustrée en figure 17 comporte l'empilement suivant : une couche 110 sur une face de laquelle est disposé un réseau de micro-canaux de circulation d'un fluide caloporteur, une couche 200 de transfert thermique, et une couche 900 sur une face de laquelle est disposé un réseau de micro-canaux d'électrophorèse capillaire.

Dans ce cas, le système comporte un système de régulation thermique comme l'un des modes de mise en œuvre présenté précédemment, ainsi que des éléments nécessaires au contrôle de la puce d'électrophorèse capillaire. Ce mode de mise en œuvre permet ainsi d'imposer une température constante lors de l'étape de séparation par électrophorèse capillaire, compensant l'effet joule qui peut être générée lors de la mise en œuvre de cette technique. Il est aussi possible d'imposer un gradient de température dans ce système afin d'effectuer des opérations de séparations sous gradient de température.

Enfin, la structuration d'un réseau microfluidique dans le support 600 d'échantillon et l'aménagement de connexions appropriées avec des moyens de mise en œuvres microfluidiques permet d'injecter

séquentiellement ou en continu un échantillon sous la puce microfluidique (portant elle même un réseau de micro-canaux pour la circulation d'un fluide caloporteur) afin d'observer le comportement d'un volume d'échantillon plus important en présence d'un gradient spatial et/ou temporel de température. Ainsi, il est possible de remplacer un échantillon dans la cavité aménagée par le support d'échantillon 600 par un nouvel échantillon issu d'un réservoir externe après une étape d'observation de l'échantillon pendant laquelle ce dernier aura été soumis à un choc thermique ou à une séquence de température précise. Cet échantillon peut aussi être injecté de façon continue au sein de la cavité ou du réseau microfluidique porté par le support d'échantillon 600.

Pour mettre en œuvre les systèmes de régulation thermique précédemment décrits, l'utilisateur dispose un échantillon en contact avec la couche 200 conductrice de chaleur d'une puce. Cette couche peut être rapportée à la puce ou faire partie intégrante de la puce.

Puis, l'utilisateur relie les micro-canaux 120 de la puce à un circuit fluidique d'un liquide caloporteur. Ensuite, il commande la régulation thermique du liquide caloporteur en dehors des micro-canaux 120, pour qu'il atteigne une température déterminée. Puis, l'utilisateur provoque l'écoulement du liquide caloporteur régulé thermiquement dans les micro-canaux 120 pendant toute la durée pendant laquelle l'échantillon doit resté à la température de consigne, et il évacue le liquide en dehors des micro-canaux.

Avantageusement, le liquide évacué est récupéré.

De préférence, le procédé de mise en œuvre comprend une étape d'échange de chaleur entre le liquide sortant des micro-canaux et le liquide entrant dans la zone de thermalisation du liquide caloporteur, ceci pour réduire la puissance calorifique nécessaire à la thermalisation du liquide caloporteur.

L'invention permet d'assurer l'homogénéité de la température dans l'échantillon lors de sa régulation thermique, en séparant le réseau de circulation du liquide caloporteur de l'échantillon, en isolant thermiquement le

réseau de circulation du liquide caloporteur, en régulant thermiquement ce liquide à distance de l'échantillon, et en optimisant le débit de liquide et la distance e entre l'échantillon et le liquide caloporteur.

L'invention permet de réaliser une puce en matériau transparent pour permettre l'utilisation de microscopes à lumière visible, et permet la mise en œuvre de protocole standard de réalisation d'échantillon sur lame de microscopie classique.

Par ailleurs, l'invention permet une utilisation très polyvalente puisque la puce peut être disposée au dessus ou en dessous de l'échantillon. Le système est donc compatible avec des techniques de microscopie classique ou tout autre système de caractérisation de l'échantillon et permet l'étude de cet échantillon en condition statique.

En outre, le système est réversible, c'est-à-dire qu'il peut être successivement appliqué puis désolidarisé de l'échantillon tout en évitant de le détériorer mécaniquement ou chimiquement.

D'autre part, le système de régulation thermique selon l'invention est très économique et peu encombrant. Il peut être mis en œuvre facilement, sans nécessiter des connaissances élevées en microfluidique.

Enfin, l'invention assure une qualité (rapidité et homogénéité) de régulation thermique beaucoup plus élevée que que celle obtenue par les dispositifs actuellement connus.

L'invention prévoit avantageusement un moyen 1100 de mesure de température du liquide caloporteur après que celui-ci est été régulé thermiquement par les moyens de régulation thermique 400-400', et avant que le liquide caloporteur régulé n'entre dans les micro-canaux. Avantageusement, les moyens de régulation thermique 400-400' sont asservis au moyen de mesure de température du liquide caloporteur. Ainsi, dès que ce moyen 1100 détecte un changement de température du liquide caloporteur, il commande les moyens de régulation thermique pour qu'ils baissent ou augmentent la température du liquide caloporteur.

Grâce moyen de mesure 1100 de la température du liquide caloporteur, on s'assure de la température du liquide après que celui-ci ait été régulé thermiquement. Or, grâce à la puce, la température de l'échantillon est identique à celle du liquide caloporteur. Donc en mesurant la température du liquide caloporteur juste avant son entrée dans les micro-canaux, on peut connaître très précisément la température de l'échantillon.

Sur une puce telle que celle qui est illustrée en figure 18, la couche conductrice de chaleur 200 et/ou le support d'échantillon 600 peu(ven)t porter le moyen de mesure de température du liquide caloporteur. Sur cette figure 18, le moyen de mesure de température du liquide caloporteur est agencé en relation thermique avec les canalisations 140 conduisant le liquide caloporteur depuis la zone de régulation thermique Z2 du liquide jusqu'aux micro-canaux 120 de la zone Z1 de régulation thermique de l'échantillon.

Par exemple, dans l'exemple illustré en figure 18, ce moyen de mesure de température 1100 est une piste métallique dont la résistance (proportionnelle la température) est mesurable par exemple par une technique de mesure quatre points. Cette piste peut être insérée avantageusement en amont de l'échantillon et en aval de la zone de régulation thermique du liquide caloporteur, entre les zones Z_1 et Z_2 de la figure 18, par exemple, ou en contact thermique avec la canalisation de transport 303 des figures 5, 8 et 9.

Dans l'exemple de réalisation de la figure 18, il peut s'agir d'une zone Z_3 dédiée à la mesure de la température du liquide caloporteur avant son entrée dans la zone de régulation thermique Z_1.

Grâce à cette disposition en amont des micro-canaux et en aval de la zone de régulation thermique du liquide caloporteur, le moyen de mesure de température 1100 n'est ni dans l'échantillon, ni dans le moyen de régulation thermique 400-400'. Cet agencement permet l'observation de l'échantillon sans être gêné par le capteur de température dans l'échantillon. En outre, cette disposition n'est pas invasive et respecte l'intégrité physique et chimique de l'échantillon

En outre, le moyen de mesure de température 1100 absorbe nécessairement une partie de la chaleur pour son fonctionnement, ce qui perturbe l'environnement thermique du capteur. Puisque le capteur n'est pas situé au dessus de ou en contact avec l'échantillon, il ne perturbe pas la température de l'échantillon.

De plus, le moyen de mesure de température 1100 n'est pas situé dans le moyen de régulation thermique 400-400', ce qui évite de mesurer la température du moyen de régulation thermique 400-400' qui peut être très différente de celle du liquide caloporteur s'il y a des pertes thermique avant les micro-canaux.

De nombreuses variantes et alternatives peuvent être apportées sans pour cela sortir de l'invention. Par exemple :

- le moyen de mise en circulation du fluide peut être une source de pression. Ce mode de mise en œuvre permet de contrôler le mouvement du liquide caloporteur en utilisant une source de pression plutôt qu'une pompe pour alimenter en continue la puce en liquide caloporteur sans limitation dans le temps. Dans ce cas, le liquide circulant dans la puce passe alternativement entre deux réservoirs ;
- deux puces microfluidiques peuvent être utilisées, une sur chaque face de l'échantillon, pour augmenter la rapidité et la précision du contrôle de température. L'échantillon est alors disposé entre les couches de conduction thermique 200 de chaque puce ;
- le support de puce et la puce peuvent contenir un certain nombre de réseaux fluidiques ou électriques disjoint du réseau de fluide caloporteur, ces réseaux dits secondaires servant à contrôler des paramètres liés à l'échantillon à analyser. Dans cette configuration, l'échantillon à analyser pourra être solidaire de la puce microfluidique de contrôle de la température, ou pourra être rendu solidaire grâce à un système de positionnement et de serrage intégré dans le support puce ;
- la puce peut intégrer plusieurs entrées indépendantes acceptant des fluides caloporteurs à des températures distincts, ainsi qu'un ou plusieurs

réseaux de micro-canaux permettant la génération de profil spatial et temporel de température.

- l'ensemble puce /support échantillon peut prévoir d'inclure des moyen de contrôle des paramètres thermiques, chimiques ou cinétiques de l'échantillon, les dits moyens de contrôle étant soit situés sur la face inférieure de la couche conductrice de chaleur, soit sur la phase supérieure du support.
- la puce peut en outre contenir des moyens de mesure des propriétés thermiques, chimiques et de vitesse du fluide caloporteur.
- Le système selon l'invention peut comprendre une réserve de liquide caloporteur qui est pré-régulée thermiquement et disposée en amont de la zone de régulation thermique Z_2 pour permettre un écoulement rapide d'une grande quantité de liquide caloporteur dans la puce microfluidique, la rapidité de l'écoulement étant permise par le faible ajustement en température devant être effectué dans la zone de régulation thermique Z_2 par le moyen de régulation, avant l'entrée du liquide dans la zone de régulation de l'échantillon Z_1.

***

REVENDICATIONS

1. Support (300) de régulation thermique d'un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend un moyen de maintien (301) destiné à maintenir en position d'utilisation au moins une puce microfluidique (100) de régulation thermique d'un échantillon comprenant une couche (200) dite « conductrice de chaleur » présentant une conductivité thermique, à 20°C, supérieure à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$ et d'épaisseur (e) comprise entre 10 µm et 200 µm, et une couche (110) de matériau d'épaisseur (E) présentant soit une capacité thermique par unité de surface, à 20°C inférieure à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$, soit une conductivité thermique, à 20°C, inférieure ou égale à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$ si elle présente une capacité thermique par unité de surface, à 20°C supérieure ou égale à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$, la couche (110) ayant une face (111) sur laquelle est disposé au moins un réseau de micro-canaux (120) dans lequel :

- chaque micro-canal présente une largeur (d) supérieure ou égale à 10 µm et inférieure ou égale à 5 mm,
- chaque micro-canal présente une hauteur (h) supérieure ou égale à 10 µm et inférieure ou égale à 500 µm,
- la distance (l) entre deux micro-canaux étant supérieure ou égale au vingtième de la largeur (d) des micro-canaux, et inférieure ou égale à 400 µm,

la couche (200) conductrice de chaleur étant en contact avec la face (111) portant le réseau de micro-canaux (120) afin de fermer les micro-canaux et de conduire la chaleur du fluide caloporteur (2) susceptible de circuler dans ces micro-canaux,

et en ce que le moyen de maintien de la puce est agencé pour permettre, en utilisation, le maintient de la puce en relation avec un moyen de régulation thermique (400, 400') d'un fluide (2) destiné à s'écouler dans les micro-canaux (120) de la puce (100).

2. Support selon la revendication précédente, comprenant une zone de régulation thermique (Z_2) d'un fluide caloporteur comportant au moins une conduite (302) du liquide caloporteur, destinée à être mise en relation thermique avec un moyen de régulation thermique (400, 400'), ladite au moins une conduite (302) étant reliée à au moins une canalisation de transport (303) du liquide caloporteur (2) depuis ladite au moins une conduite (302) jusqu'à un moyen de connexion fluidique (125) avec un réseau de micro-canaux (120) de la puce microfluidique.

3. Support de régulation thermique selon la revendication 2, comprenant, en outre, au moins un moyen de régulation thermique (400, 400') du liquide caloporteur dans ladite au moins une conduite (302).

4. Support de régulation thermique selon la revendication précédente, dans lequel le moyen de régulation thermique (400, 400') du liquide caloporteur présente une puissance calorifique d'au moins 0,8 W par cm^2 de surface des micro-canaux.

5. Support de régulation thermique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant, en outre, un échangeur de chaleur (700) entre le liquide susceptible d'entrer dans la zone de régulation thermique (Z_2) et le liquide susceptible de sortir du réseau de micro-canaux (120) de la puce.

6. Support de régulation thermique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant, en outre un support d'échantillon (600) présentant une couche (601) de conductivité thermique inférieure à 2 $W.m^{-1}.K^{-1}$ et d'épaisseur inférieure ou égale à 1 mm, et un rebord ou une structuration (602) de hauteur inférieure ou égale à 1mm agencé(e) pour ménager, lorsque une puce microfluidique (100) est supportée par le support, une cavité entre ladite couche du support d'échantillon et la couche conductrice de chaleur de la puce, la cavité étant destinée à recevoir un échantillon.

7. Support de régulation thermique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comprenant, en outre un moyen de mesure de température du liquide caloporteur.

8. Support de régulation thermique selon les revendications 2 et 7, dans lequel le moyen de mesure de température du liquide caloporteur est agencé en relation thermique avec ladite au moins une canalisation (303).

9. Système de régulation thermique d'un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une puce (100) de régulation thermique d'un échantillon comprenant une couche (200) dite « conductrice de chaleur » présentant une conductivité thermique, à 20°C, supérieure à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$ et d'épaisseur (e) comprise entre 10 µm et 200 µm, et une couche (110) de matériau d'épaisseur (E) présentant soit une capacité thermique par unité de surface, à 20°C inférieure à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$, soit une conductivité thermique, à 20°C, inférieure ou égale à 0,5 $W.m^{-1}.K^{-1}$ si elle présente une capacité thermique par unité de surface, à 20°C supérieure ou égale à 0,3 $J.K^{-1}.cm^{-2}$, la couche (110) ayant une face (111) sur laquelle est disposé au moins un réseau de micro-canaux (120) dans lequel :
  - chaque micro-canal présente une largeur (d) supérieure ou égale à 10 µm et inférieure ou égale à 5 mm,
  - chaque micro-canal présente une hauteur (h) supérieure ou égale à 10 µm et inférieure ou égale à 500 µm,
  - la distance (l) entre deux micro-canaux étant supérieure ou égale au vingtième de la largeur (d) des micro-canaux, et inférieure ou égale à 400 µm,

  la couche (200) conductrice de chaleur étant en contact avec la face (111) portant le réseau de micro-canaux (120) afin de fermer les micro-canaux et de conduire la chaleur du fluide caloporteur (2) susceptible de circuler dans ces micro-canaux, ;

- un support destiné à recevoir la puce microfluidique ;
- au moins un moyen de régulation thermique du liquide caloporteur ;
- au moins un moyen de mise en circulation du liquide caloporteur dans la puce.

10. Système de régulation thermique d'un échantillon selon la revendication précédente, dans lequel le moyen de mise en circulation (520, 520') du liquide caloporteur est apte à générer un débit de liquide caloporteur d'au moins 0,3 ml par minute et par cm^2 de surface des micro-canaux.

11. Système de régulation thermique d'un échantillon selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10, comprenant, en outre, un circuit de recirculation du liquide caloporteur.

12. Système de régulation thermique d'un échantillon selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, comprenant, en outre, une zone de régulation thermique d'un fluide caloporteur comportant au moins une conduite du liquide caloporteur en relation thermique avec ledit au moins un moyen de régulation thermique, ladite au moins une conduite étant reliée à au moins une canalisation de transport (303) du liquide caloporteur (2) depuis ladite au moins une conduite (302) jusqu'à un moyen de connexion fluidique (125) avec la puce microfluidique.

13. Système de régulation thermique selon l'une quelconque des revendications 9 ou 12, comprenant, en outre, un échangeur de chaleur entre le liquide susceptible d'entrer dans la zone de régulation thermique et le liquide susceptible de sortir du réseau de micro-canaux de la puce.

14. Système de régulation thermique selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, comprenant au moins un moyen de circulation de liquide caloporteur, deux zones de régulation thermique pour réguler thermiquement les liquides caloporteur à deux températures différentes, et un moyen de mélange (800, 800', 810), apte à permettre, en utilisation, un mélange ratiométrique contrôlé des liquides à deux

températures différentes pour modifier de manière contrôlée la température du liquide caloporteur circulant dans le réseau de micro-canaux.

15. Système de régulation thermique d'un échantillon selon la revendication 14, dans lequel le moyen de mélange est un commutateur (810) proportionnel ou bistable.

16. Système de régulation thermique d'un échantillon selon la revendication 14, dans lequel le moyen de mélange est un réseau micro-fluidique de génération de gradients par diffusion ou convection chaotique permettant de réalisé par mélange diffusif ou convectif des liquides un profil de température spatialement contrôlé.

17. Système de régulation thermique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans lequel la puce microfluidique comprend, en outre au moins une zone de régulation thermique (Z_2) d'un fluide caloporteur comportant au moins une conduite (130) du liquide caloporteur en amont des micro-canaux (120), et destinée à être mise en relation thermique avec un moyen de régulation thermique (400, 400').

18. Système de régulation thermique selon la revendication précédente, dans lequel la puce microfluidique comprend, en outre, au moins une canalisation (140) de transport du liquide caloporteur depuis ladite au moins une conduites (130) jusqu'au réseau de micro-canaux (120).

19. Système de régulation thermique selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18, dans lequel la puce microfluidique comprend, en outre, un échangeur de chaleur (700) entre le liquide susceptible d'entrer dans la zone de régulation thermique (Z_2) et le liquide susceptible de sortir du réseau de micro-canaux (120).

20. Système de régulation thermique selon l'une quelconque des revendications 9 à 19, comprenant, en outre un moyen de mesure de température du liquide caloporteur.

21. Système de régulation thermique selon la revendication précédente, dans lequel le moyen de mesure de température du liquide

caloporteur est agencé en relation thermique avec ladite au moins une canalisation (140 - 303).

22. Système de régulation thermique d'un échantillon selon l'une quelconque des revendications 9 à 21, dans lequel le support de puce est un support selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

Fig. 1

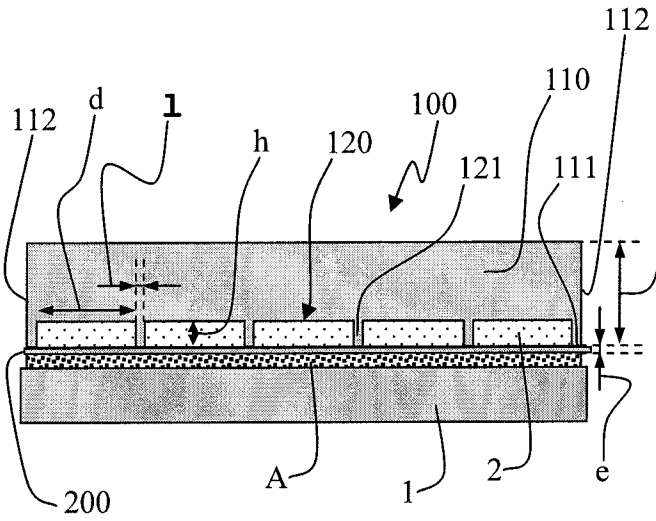
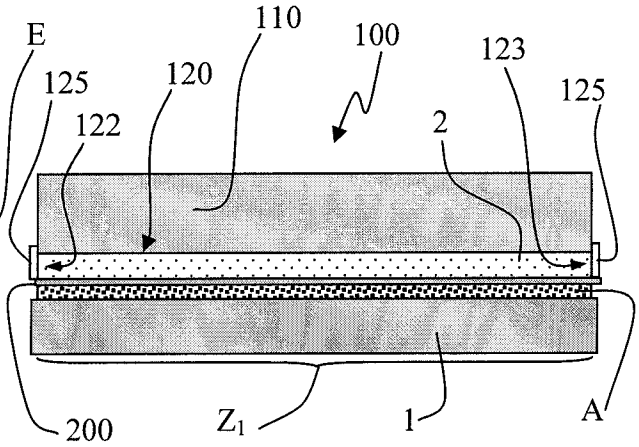


Fig. 2



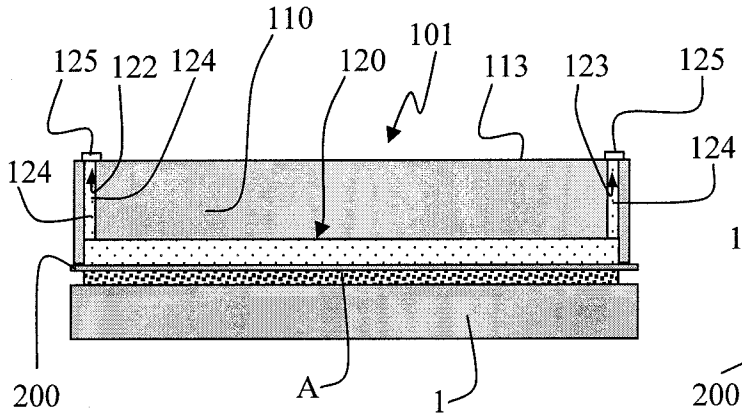


Fig. 3

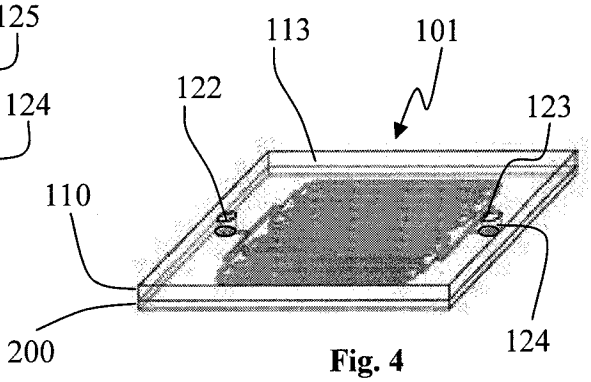


Fig. 4

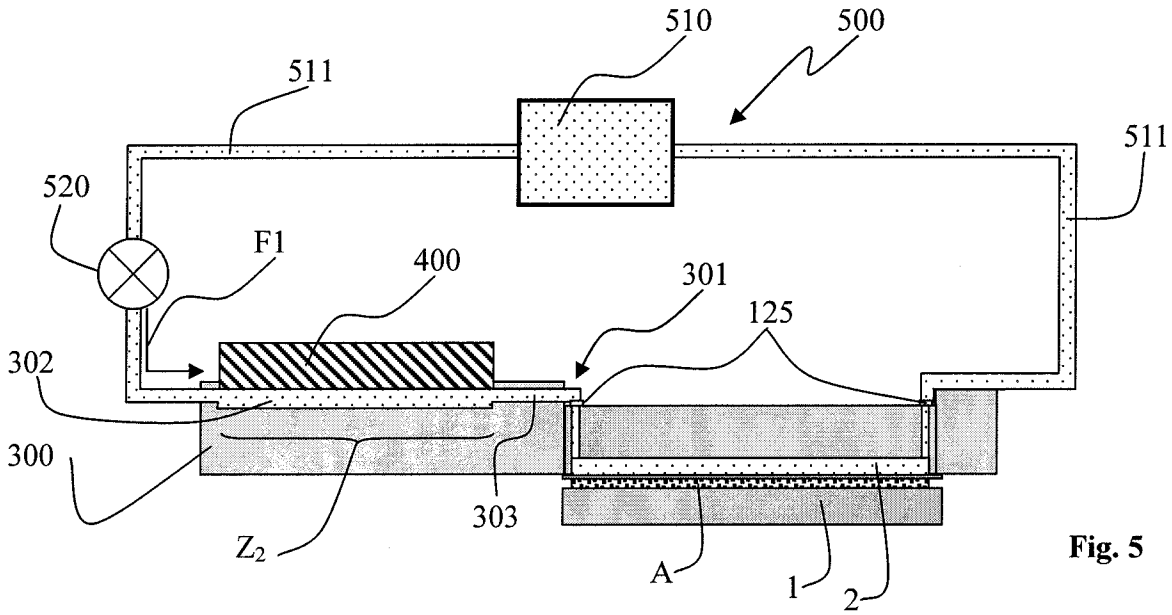


Fig. 5

Fig. 6

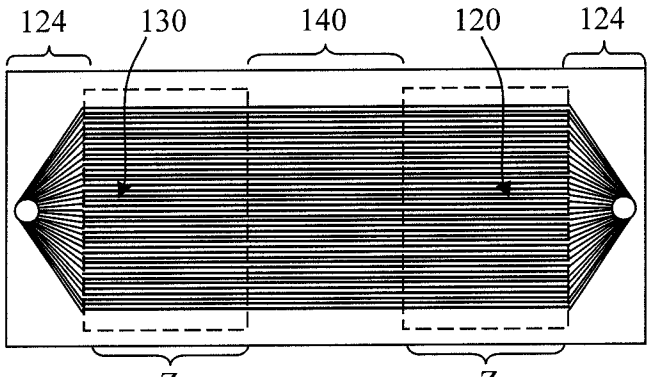
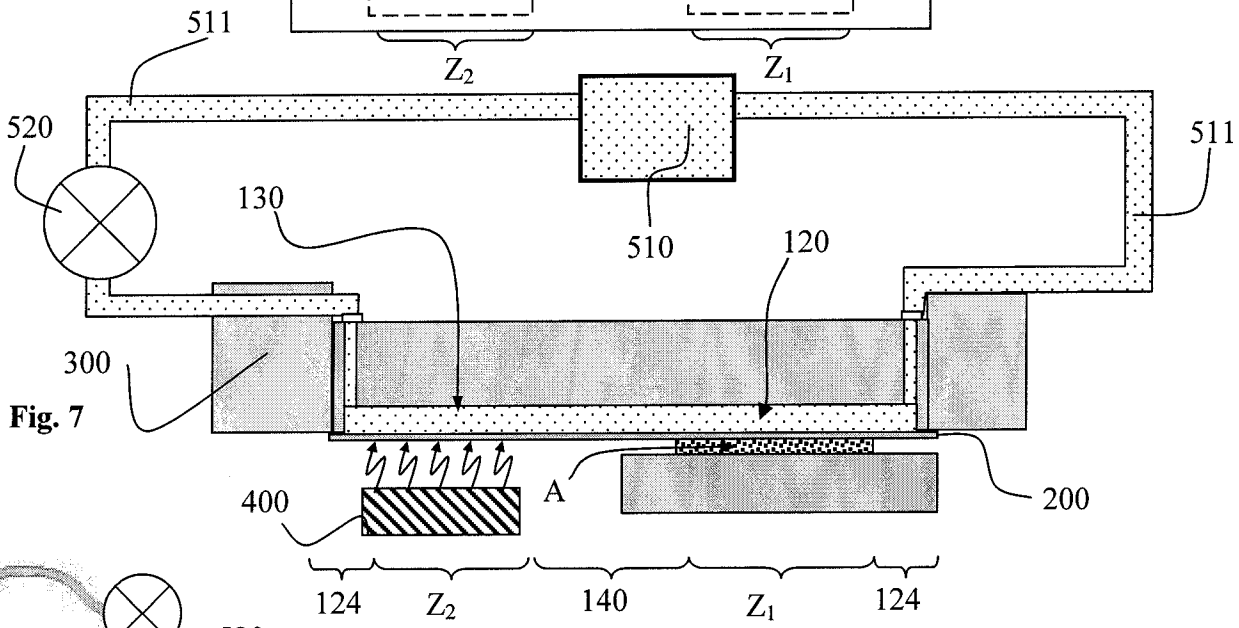


Fig. 7



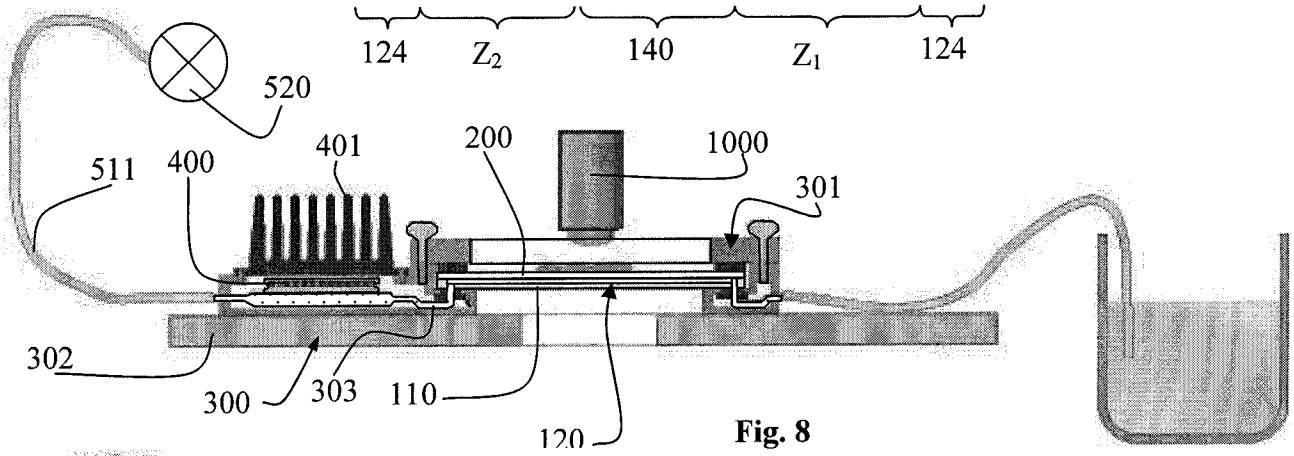


Fig. 8

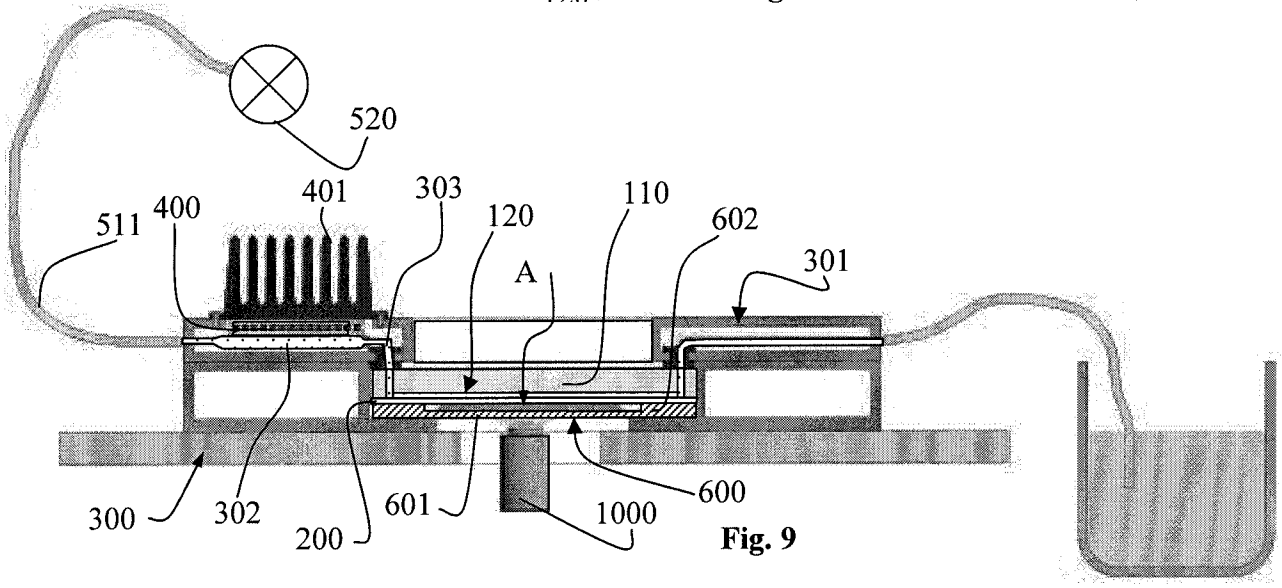
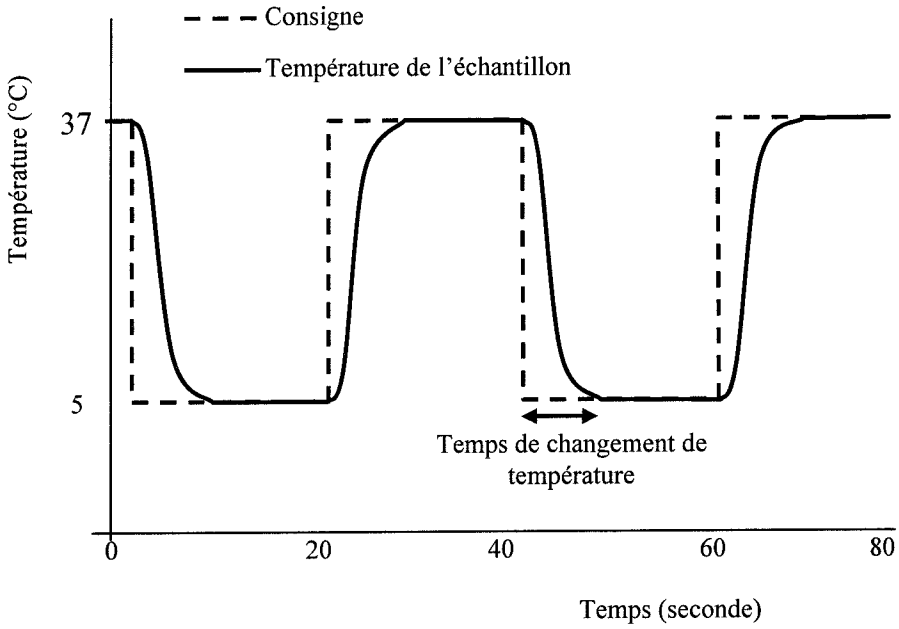


Fig. 9

Fig. 10



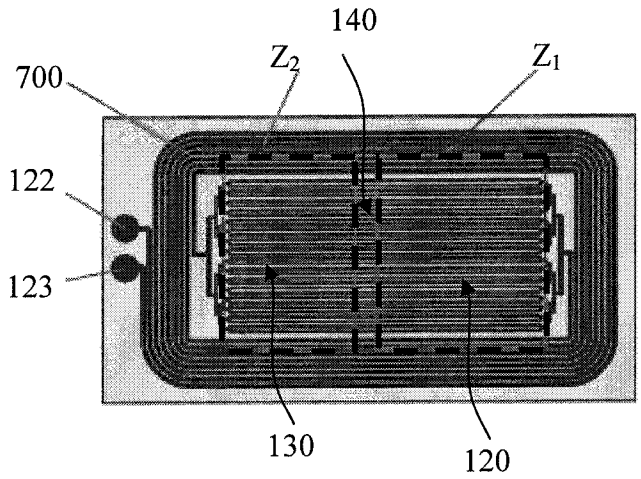


Fig. 11

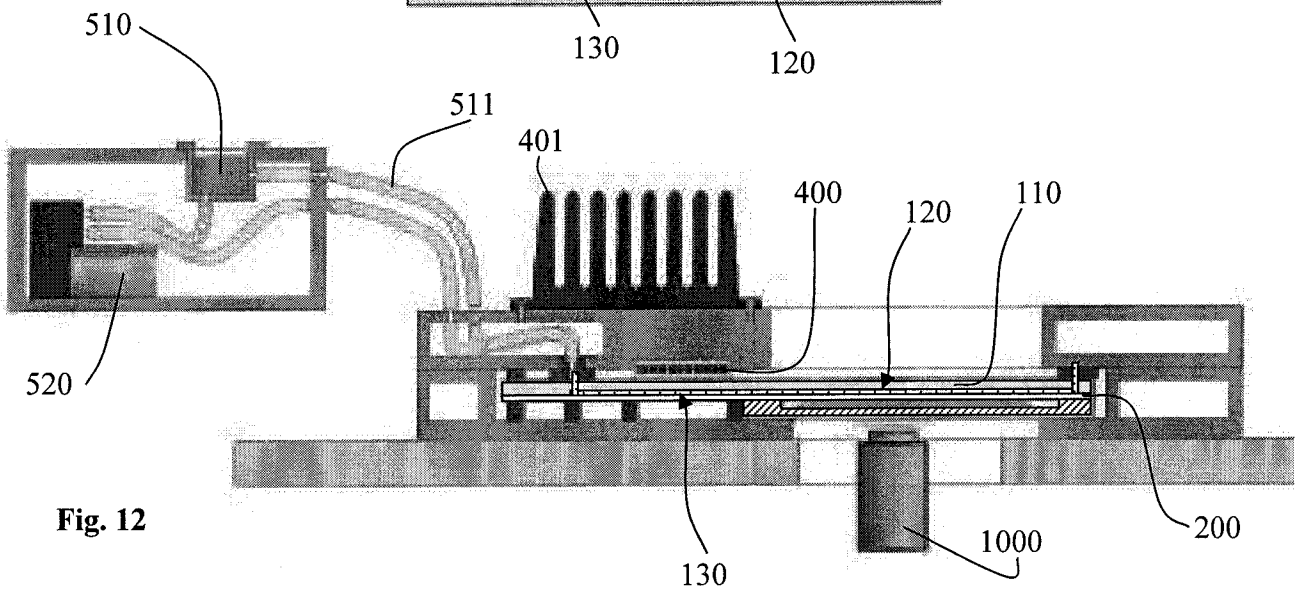


Fig. 12

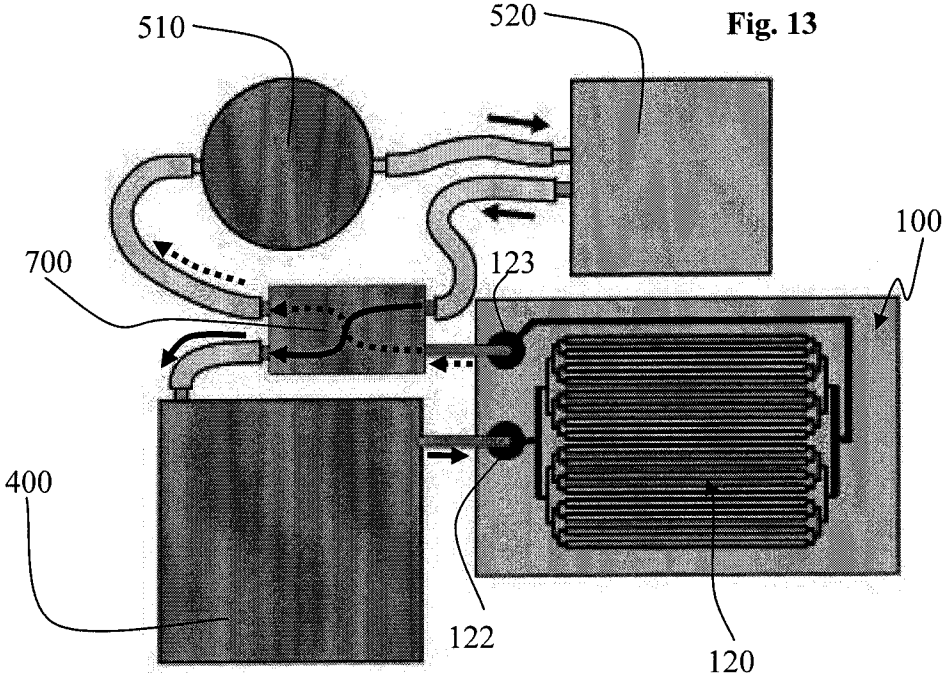


Fig. 13

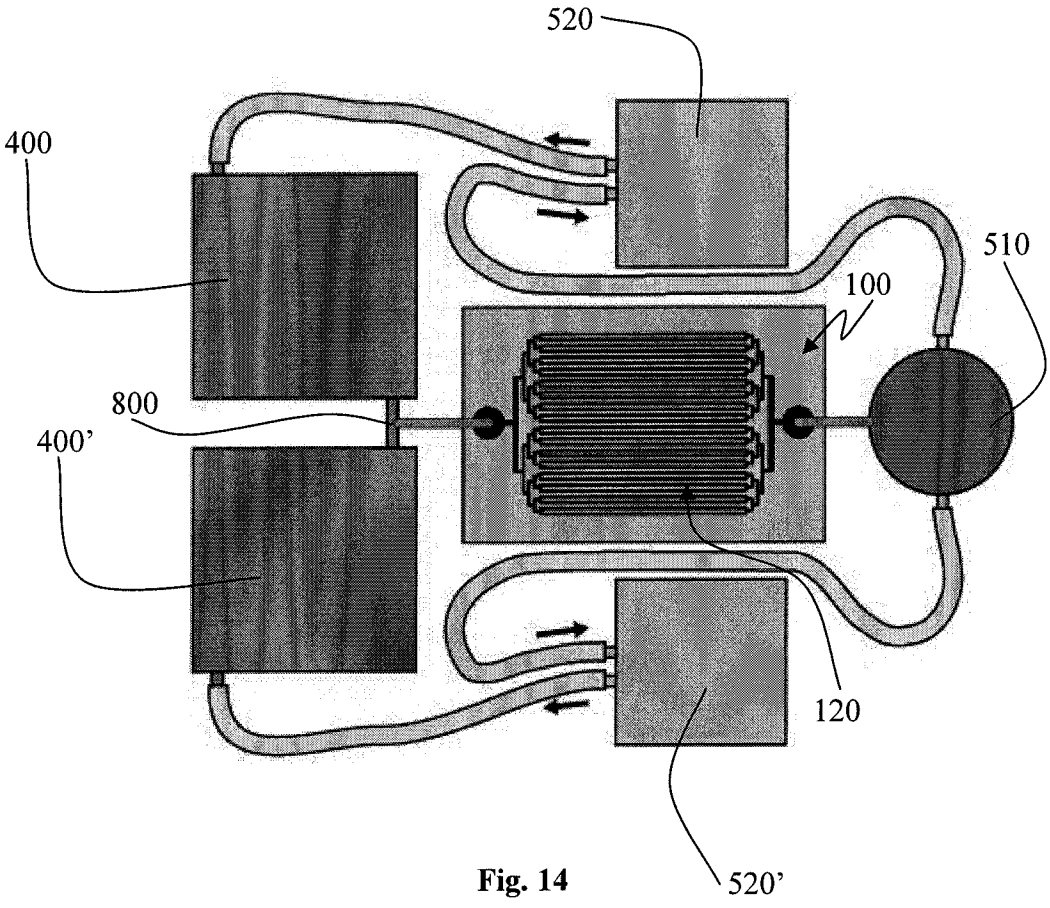


Fig. 14

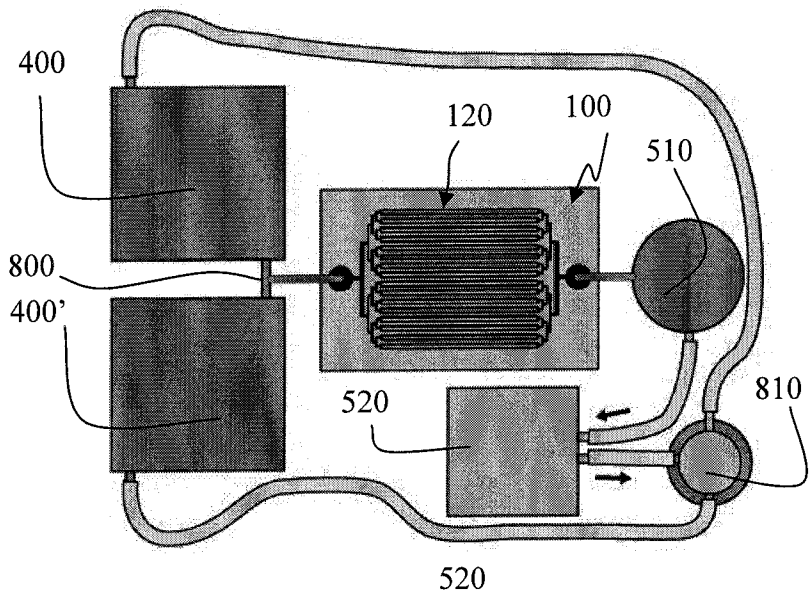


Fig. 15

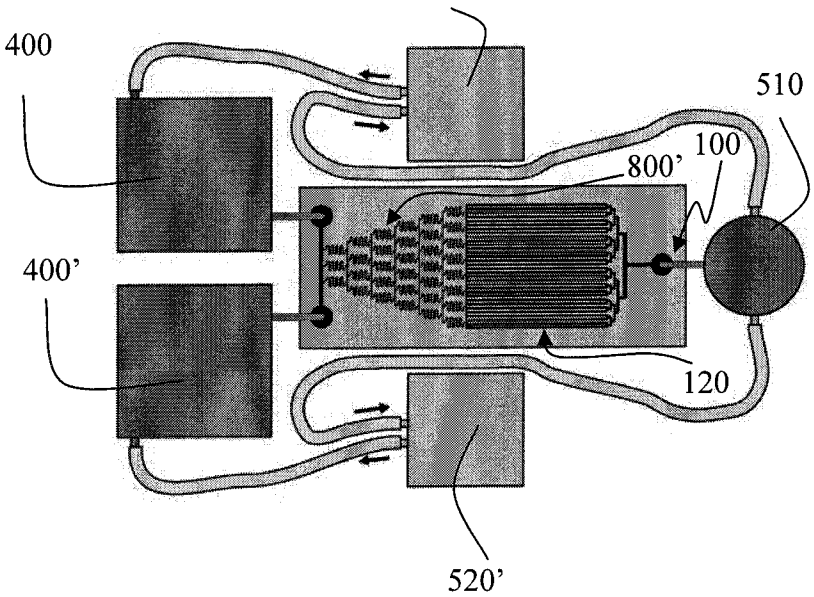


Fig. 16

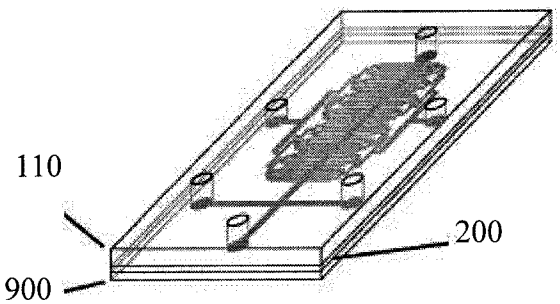


Fig. 17

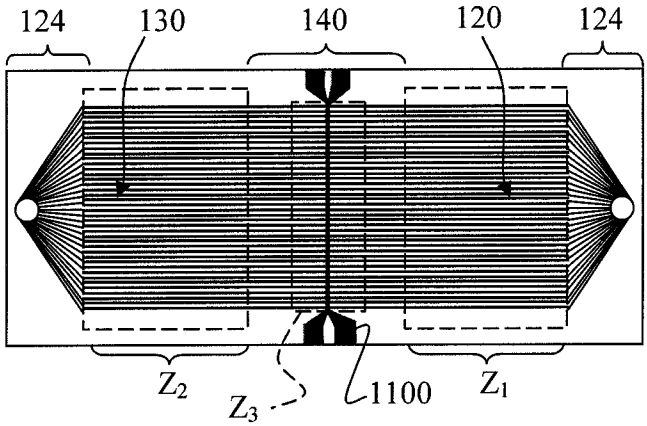


Fig. 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/051977

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. B01L7/00 F28F3/12 G02B21/28 G02B21/30
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
B01L F28F G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/66282 A1 (3M INNOVATIVE PROPERTIES CO [US]) 23 December 1999 (1999-12-23) page 14 - pages 1-13; claim 9; figures 1,2	1-22
A	US 2006/113063 A1 (CHORDIA LALIT [US] ET AL) 1 June 2006 (2006-06-01) paragraph [0021]; figure 2	1-22
A	WO 2004/040645 A1 (STICHTING TECH WETENSCHAPP [NL]; GUIJT ROSANNE MARIEKE [AU]; DODGE ARA) 13 May 2004 (2004-05-13) the whole document	1-22
A	WO 2004/027336 A1 (MIDWEST RESEARCH INST [US]; HENDRICKS TERRY JOSEPH [US]; HEBEN MICHAEL) 1 April 2004 (2004-04-01) the whole document	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 September 2011	12/09/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Skowronski, Maik

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2011/051977

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9966282 A1	23-12-1999	AU 750275 B2	11-07-2002
		AU 4003199 A	05-01-2000
		CN 1305580 A	25-07-2001
		DE 69905882 D1	17-04-2003
		DE 69905882 T2	24-12-2003
		EP 1088195 A1	04-04-2001
		JP 2002518661 A	25-06-2002
		US 2002011330 A1	31-01-2002
		US 2001016985 A1	30-08-2001
US 2006113063 A1	01-06-2006	NONE	
WO 2004040645 A1	13-05-2004	AU 2003276783 A1	25-05-2004
WO 2004027336 A1	01-04-2004	AU 2002334664 A1	08-04-2004
		US 2004194944 A1	07-10-2004

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/IB2011/051977

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. B01L7/00 F28F3/12 G02B21/28 G02B21/30
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
B01L F28F G02B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99/66282 A1 (3M INNOVATIVE PROPERTIES CO [US]) 23 décembre 1999 (1999-12-23) page 14 - pages 1-13; revendication 9; figures 1,2	1-22
A	US 2006/113063 A1 (CHORDIA LALIT [US] ET AL) 1 juin 2006 (2006-06-01) alinéa [0021]; figure 2	1-22
A	WO 2004/040645 A1 (STICHTING TECH WETENSCHAPP [NL]; GUIJT ROSANNE MARIEKE [AU]; DODGE ARA) 13 mai 2004 (2004-05-13) le document en entier	1-22
A	WO 2004/027336 A1 (MIDWEST RESEARCH INST [US]; HENDRICKS TERRY JOSEPH [US]; HEBEN MICHAEL) 1 avril 2004 (2004-04-01) le document en entier	1-22

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
2 septembre 2011	12/09/2011

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Skowronski, Maik

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/IB2011/051977

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9966282 A1	23-12-1999	AU 750275 B2	11-07-2002
		AU 4003199 A	05-01-2000
		CN 1305580 A	25-07-2001
		DE 69905882 D1	17-04-2003
		DE 69905882 T2	24-12-2003
		EP 1088195 A1	04-04-2001
		JP 2002518661 A	25-06-2002
		US 2002011330 A1	31-01-2002
		US 2001016985 A1	30-08-2001
US 2006113063 A1	01-06-2006	AUCUN	
WO 2004040645 A1	13-05-2004	AU 2003276783 A1	25-05-2004
WO 2004027336 A1	01-04-2004	AU 2002334664 A1	08-04-2004
		US 2004194944 A1	07-10-2004