

## (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  
28 juin 2018 (28.06.2018)

(10) Numéro de publication internationale

WO 2018/114620 A1

(51) Classification internationale des brevets :  
B01L 3/00 (2006.01) B01L 7/00 (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/EP2017/082898(22) Date de dépôt international :  
14 décembre 2017 (14.12.2017)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
16/01823 19 décembre 2016 (19.12.2016) FR  
1762058 13 décembre 2017 (13.12.2017) FR

(71) Déposant : ELVESYS [FR/FR] ; 83 avenue Philippe Auguste, 75011 Paris (FR).

(72) Inventeurs : LEBERRE, Maël ; 73 rue Alexandre Dumas, 75020 Paris (FR). PLESSIS, Adrien ; 59 bis avenue du petit Chambord, 92340 Bourg la reine (FR). MINNELLA, Walter ; 87 rue Defrance, 94300 Vincennes (FR).

(74) Mandataire : CABINET SÉBASTIEN MARCONNET ; 4Ter Route des Gardes Bâtiment A, 92190 MEUDON (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,

(54) Titre: THERMALIZING MICROFLUIDIC CHIP EMPLOYING VARIABLE TEMPERATURE CYCLES, SYSTEM USING SUCH A CHIP AND PCR METHOD FOR DETECTING DNA SEQUENCES

(54) Titre : PUCE MICRO FLUIDIQUE DE THERMALISATION À CYCLES DE TEMPÉRATURE VARIABLE, SYSTÈME UTILISANT UNE TELLE PUCE ET PROCÉDÉ PCR POUR LA DÉTECTION DE SÉQUENCES ADN

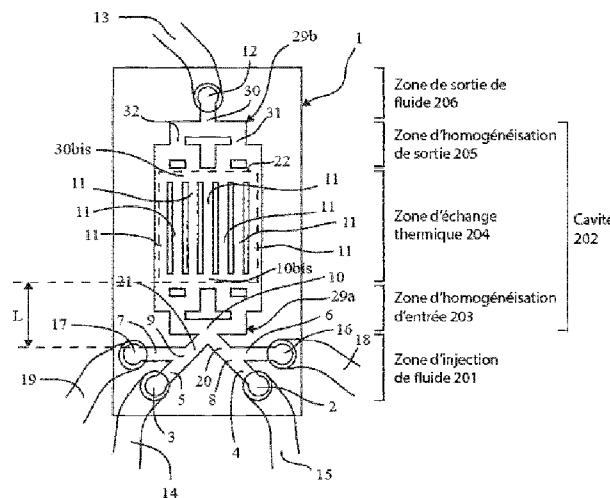


Figure 1

Fluid outlet zone 206  
Outlet homogenization zone 205  
Heat exchange zone 204  
Inlet homogenization zone 203  
Fluid injection zone 201  
Cavity 202

(57) Abstract: The présent invention relates to a thermalizing microfluidic chip, to a System using such a chip and to a PCR method for detecting DNA séquences. The chip consists of a block of material in which a cavity that is able to contain at least one fluid is located, this cavity including at least one inlet orifice and at least one outlet orifice, the inlet orifice for fluid being connected to at least one and preferably at least two fluid-injecting channels. According to the invention, the chip furthermore includes at least one microfluidic channel for bypassing the cavity, said channel being connected by a first end to at least one of the fluid-injecting channels, the junction between the bypassing channel and the fluid-injecting channel being located at a distance L from the inlet orifice of the fluid-injecting channel, said distance preferably being smaller than 2 cm.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une puce micro fluidique de thermalisation, un système utilisant une telle puce et un procédé PCR pour la détection de séquences ADN. La puce est constituée d'un bloc de matériau dans lequel se trouve une cavité pouvant contenir au moins un fluide, cette cavité comportant au moins un orifice d'entrée et au moins un orifice de sortie, l'orifice d'entrée de fluide étant reliée à au moins un, de préférence au moins deux canaux d'injection de fluide. Selon l'invention la puce comporte en outre au moins un canal micro fluidique de contournement de la cavité, relié par une première extrémité à l'un au moins des canaux d'injection de fluide, l'embranchement du canal de contournement sur le canal d'injection de fluide étant situé à

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*) : ARIGO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## **Publiée:**

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

**Puce micro fluidique de thermalisation à cycles de température variable, système utilisant une telle puce et procédé PCR pour la détection de séquences ADN**

5

L'invention concerne, selon un premier aspect, une puce micro fluidique de thermalisation à cycles de température variable constituée d'un bloc de matériau dans lequel se trouve une cavité pouvant contenir au moins un fluide, cette cavité comportant au moins un orifice d'entrée et au moins un orifice de sortie, l'orifice d'entrée de fluide étant reliée à au moins deux canaux d'injection de fluide.

Elle concerne également selon ce premier aspect, un système utilisant une telle puce de thermalisation pour le changement rapide de température d'échange thermique avec un échantillon contenant de l'ADN ainsi qu'un procédé PCR pour la détection de séquences ADN dans un échantillon.

L'invention concerne également, selon un deuxième aspect, une puce échantillon micro fluidique pour le test d'échantillons biologiques, notamment pour une analyse de type PCR et/ou de fluorescence, ayant la forme d'un bloc creux comportant au moins une chambre délimitée par une paroi supérieure, une paroi

20

25

inférieure et au moins une paroi latérale, dans laquelle peut être introduit un échantillon à tester.

Elle concerne également, selon ce deuxième aspect, un système d'analyse d'un échantillon de type PCR contenu dans une chambre ménagée dans une puce échantillon, ainsi qu'un procédé PCR pour la détection de séquences ADN utilisant la puce et le système permettant une mesure fluorescence de l'échantillon.

Selon le premier aspect, un état de la technique détaillé concernant les différents procédés et dispositifs permettant la détection de séquences d'ADN dans un échantillon liquide en utilisant une réaction nécessitant des cycles de température répétés (que l'on appellera ci-après « cyclage » thermique d'échantillons ADN pour la réalisation d'une réaction de type « PCR » (« Polymerase chain reaction» en anglais) ou plus simplement « cyclage thermique ») est décrit par exemple dans la demande de brevet WO2009/105499.

Parmi ces procédés de cyclage thermique, certains utilisent avantageusement un liquide caloporteur que l'on fait circuler à proximité de l'échantillon pour contrôler sa température. L'utilisation d'un liquide caloporteur permet d'obtenir une température de thermalisation de l'échantillon très homogène, car la convection limite l'apparition de gradients de température dans le liquide, contrairement aux

5

10

15

20

25

solutions basées sur un chauffage local ou pompage local de chaleur avec un élément thermoélectrique, qui peuvent créer localement des gradients de températures. L'utilisation d'un liquide caloporteur permet également un transfert de chaleur vers l'échantillon très efficace car il ne dépend que de la proximité thermique de l'échantillon avec le liquide caloporteur et du coefficient de convection du liquide caloporteur qui peut être très important lorsque ce liquide est transporté dans des canalisations de faibles dimensions (canaux micro fluidiques). Par ailleurs, l'utilisation d'un liquide caloporteur permet d'obtenir rapidement un contrôle précis et homogène de la température d'un échantillon ayant un volume important (supérieur au microlitre) car quelle que soit sa taille, la température de l'échantillon tend rapidement vers la température du liquide caloporteur lorsqu'il est à proximité, contrairement aux systèmes basés sur l'injection d'une énergie thermique comme le chauffage par effet joule pour lesquels il est difficile de contrôler de manière homogène la température sur la seule base du contrôle de la puissance injectée.

US-A-5508197 décrit la thermalisation de puits aux parois très fines contenant des échantillons de PCR en faisant circuler successivement autour de ces puits des liquides caloporteurs préalablement « thermalisés »

(c'est à dire amenés à une température précise et homogène) à différentes températures, à l'aide d'une série de vanne qui redirigent les liquides provenant de réservoirs thermalisés vers plusieurs échantillons. Ce système, qui permet un changement de la température de l'échantillon en environ 8 secondes, est limité en vitesse par le transfert de la chaleur à travers les puits et le volume de 15 µl de l'échantillon, dont la géométrie et la taille ne permettent pas un transfert plus rapide. Dans ce système, le volume de liquide utilisé pour thermaliser les échantillons est important (~150 ml), si bien que les débits de liquide sont importants (~10 L/min), les volumes de liquides dans les réservoirs doivent être importants (~25 L) pour assurer une bonne stabilité de la température. Ces contraintes de volume rendent le système encombrant et très consommateur d'énergie. De plus un tel système est difficilement transportable compte tenu de sa taille.

EP-A-2415855 décrit une réaction de PCR en faisant circuler successivement deux liquides caloporteurs à températures différentes pour thermaliser un échantillon dans un puit réalisé dans une feuille d'aluminium fine permettant d'obtenir avec une forme aplatie des puits, des changements de température très rapides (jusqu'à 0.3 s). Les volumes de liquide

utilisés dans ce système restent importants, de l'ordre de plusieurs dizaines de millilitres et le débit également (plus de 60 mL/min) ce qui en fait encore un système encombrant et consommateur d'énergie.

5 WO 2011/138748 décrit une puce micro fluidique et un système de régulation de la température d'un échantillon comportent une pluralité de canaux micro fluidiques disposés au fond d'une cavité de forme généralement parallélépipédique et comportant une paroi inférieure de faible conductivité thermique pour éviter les pertes thermiques lors de son utilisation et une paroi supérieure de forte conductivité thermique sur laquelle est déposée un échantillon à analyser , permettant un bon échange thermique entre le liquide caloporteur circulant dans les canaux et l'échantillon.

10 Le liquide caloporteur est injecté à travers un orifice d'entrée dans les canaux micro fluidiques et récupéré à travers un orifice de sortie à l'autre extrémité des canaux micro fluidiques. La température du liquide caloporteur est régulée en amont de l'orifice d'entrée à l'extérieur et à distance de la puce. Un exemple d'un procédé de fabrication d'une puce de ce type est décrit 15 sur le site internet de la société ELVESYS à l'adresse [www.elveflow.com](http://www.elveflow.com) dans l'article intitulé « la micro fluidique et les puces micro fluidiques : Revue ». 20 25

Ce type de puce a été utilisé par les auteurs Houssin et al. d'un article publié en 2016 par « The royal society of chemistry 2016 » sous le titre « Ultrafast sensitive and large volume on-chip real time PCR for the molecular diagnosis of bacterial and viral infections », dans lequel ils décrivent la mise en œuvre d'un procédé de « cyclage » thermique pour réaliser une réaction de PCR qui n'est pas entièrement satisfaisant : le changement de température de l'échantillon est réalisé en faisant circuler alternativement dans la puce micro fluidique, qui contient une zone d'échange de chaleur avec l'échantillon, deux liquides caloporteurs thermalisés auparavant à l'aide de deux modules thermoélectriques (dispositifs à effet Peltier). Par échange thermique entre la puce et l'échantillon, on réalise cette alternance de température de l'échantillon liquide, permettant ainsi d'amplifier une séquence d'ADN présente dans l'échantillon.

Si ce système permet de réaliser des thermalisations rapides (de l'ordre de 2s. également) avec un débit de liquide faible (de l'ordre de 10 mL/min ou 160 pL/s), les performances de ce système restent limitées par le volume et la thermalisation des canalisations alimentant la puce. En effet, lorsque le liquide ne circule pas dans la puce, la température des canalisations (le diamètre d'une canalisation micro

fluidique varie du micron à plusieurs centaines de microns) qui ont un faible volume, donc une faible inertie thermique, tend en quelques secondes vers la température ambiante. Lorsque le liquide circule à nouveau, il faut tout d'abord évacuer tout le liquide à température proche de l'ambiente qui se trouve dans la canalisation (ce qui d'après les expériences conduites par les inventeurs prend environ 0.5 seconde), puis « thermaliser » la canalisation, c'est à dire l'amener à une température stable, ce qui d'après les expérimentations conduites par les inventeurs, prend de quelques secondes à quelques dizaines de secondes. Avant d'atteindre cette stabilité, la température du liquide injecté dans la puce est perturbée par le transfert de chaleur vers la canalisation. Ainsi, il faut environ deux secondes pour réaliser 95% du changement de température souhaité mais une dérive de la température pouvant atteindre plusieurs degrés est observée sur un temps plus long en fonction des conditions, typiquement de l'ordre de la dizaine de secondes. Cette dérive de température n'étant pas reproductible puisqu'elle dépend de la température de la canalisation avant le changement imposé de température, il n'est donc pas possible avec ce système d'obtenir un contrôle rapide et précis de la température d'un échantillon avec de petits débits permettant la

miniaturisation du système et le rendant ainsi aisément transportable.

Il est connu de US2006/188979 un système pour faire réagir simultanément une pluralité de réactifs avec l'échantillon, dans une pluralité de canaux parallèles à la même température, le nombre de canaux étant égal au nombre de réactifs prévus pour être utilisés dans ce système.

Les différentes solutions de changement de température rapide proposées dans l'art antérieur utilisant des liquides caloporteurs ne permettent donc pas à ce jour, un contrôle rapide de la température d'un échantillon (c'est à dire en moins de cinq secondes environ), précis, homogène, reproductible et peu consommateur d'énergie et utilisant un appareillage peu encombrant.

Pourtant, les besoins actuels de tests rapides d'orientation du diagnostic nécessitent de pouvoir réaliser des réactions telles que la PCR en quelques minutes dans un dispositif léger et peu consommateur d'énergie, qui puisse fonctionner éventuellement sur le site (« on-site ») c'est à dire ayant d'une part une petite taille et pouvant éventuellement d'autre part être alimenté par une batterie.

Sachant qu'une analyse de type PCR nécessite entre 30 et 40 cycles de température dont la durée minimale

pour chaque cycle est de l'ordre de 8 s, chaque seconde gagnée sur la durée du changement de température de l'échantillon est un gain significatif sur la durée totale de ce type de test.

5 Par ailleurs, la complexification des kits de détection moléculaires basés sur la PCR, notamment pour la détection multiplexe, impose le contrôle précis des températures aux différentes phases du cycle pour fonctionner correctement.

10 La puce micro fluidique de thermalisation, le système et le procédé selon le premier aspect de l'invention permettent de résoudre le problème ainsi posé.

La puce micro fluidique de thermalisation selon l'invention est constituée d'un bloc de matériau dans 15 lequel sont disposées successivement :

- une zone d'injection de fluide comportant au moins un canal micro fluidique d'injection de fluide,
- une cavité de forme parallélépipédique ayant une face supérieure comprenant une zone d'échange thermique munie d'une zone de thermalisation de surface S au niveau de la face supérieure de la cavité, la zone de thermalisation comprenant au moins un canal microfluidique de circulation de fluide, cette cavité étant munie d'au moins un orifice d'entrée de fluide issu de la zone d'injection de fluide et d'au moins un orifice de sortie de fluide, entre lesquels s'étend la zone

d'échange thermique caractérisée en ce qu'elle comporte de préférence un seul orifice d'entrée de fluide, de préférence un seul orifice de sortie de fluide, et en outre au moins un canal micro fluidique de contournement de la cavité, relié par une première extrémité à l'un au moins des canaux micro fluidiques d'injection de fluide, l'embranchement du canal de contournement sur le canal d'injection de fluide étant situé à une distance  $L$  de l'orifice d'entrée de fluide de la cavité, la distance  $L$  entre chaque embranchement et l'orifice d'entrée de fluide étant telle que :

$$L < S/a$$

$S$  étant la surface de la zone de thermalisation de la face supérieure de la cavité exprimée en  $m^2$

$a$  étant un coefficient de correction égal à 0,005 m.

De préférence,  $L$  sera inférieure ou égale à 0,02 m, tandis que chaque canal d'injection de fluide sera de préférence relié à au moins un canal de contournement.

La puce comportera de préférence au moins deux canaux micro fluidiques d'injection du fluide.

Selon un mode préférentiel de réalisation, la puce comportera le même nombre, de préférence deux, de canaux d'injection et de canaux de contournement, chaque canal de contournement étant relié à un seul canal d'injection.

Avantageusement, la cavité comportera une pluralité de canaux de circulation de fluides disposés parallèlement pour éviter la formation de bulles.

Selon un autre mode de réalisation la puce est caractérisée en ce que la cavité comporte en outre une zone d'homogénéisation d'entrée située entre l'orifice d'entrée et l'entrée de fluide dans les canaux micro fluidiques de circulation de fluide correspondant à la zone d'échange thermique de manière à homogénéiser notamment la vitesse du fluide avant son injection dans les canaux de circulation de fluide.

Cette zone d'homogénéisation d'entrée pourra par exemple comporter un arbre d'homogénéisation créant une pluralité de chemins d'écoulement pour le fluide entre l'orifice d'entrée et l'entrée de fluide, ces chemins étant sensiblement de même longueur.

Selon une autre variante, la puce sera constituée par un bloc de matériau parallélépipédique dont la cavité est fermée par une plaquette supérieure, solidaire ou indépendante des parois latérales de la cavité cette plaquette ayant une face supérieure destinée à être en contact avec l'échantillon et ayant de préférence une épaisseur inférieure à 0,002 m. La plaquette supérieure est soit intégrée à la puce, soit indépendante et rajoutée sur la puce lors de l'utilisation.

Cette plaquette supérieure pourra par exemple être en

verre et/ou en métal.

Selon encore une autre variante, la cavité pourra comporter en outre une zone d'homogénéisation de sortie située entre la sortie de fluide des canaux micro fluidiques et l'orifice de sortie de fluide de la cavité, de manière à homogénéiser notamment la température du fluide avant son injection dans l'orifice de sortie de fluide.

Selon un mode préférentiel de réalisation, la zone d'homogénéisation de sortie comportera un arbre d'homogénéisation créant une pluralité de chemins d'écoulement pour le fluide entre la sortie de fluide des canaux micro fluidiques et l'orifice de sortie de fluide de la cavité, ces chemins étant sensiblement de même longueur.

De préférence, l'épaisseur de la cavité parallélépipédique sera inférieure à 0,001 m, de préférence inférieure ou égale à 500 micromètres.

Selon encore une autre variante, la puce comportera au moins une vanne disposée dans au moins un de ses canaux d'injection et/ou de contournement.

De préférence, une vanne distributrice à trois voies de type 3/2 est positionnée à l'entrée de la cavité permettant de commuter la source du liquide entrant dans la cavité entre deux entrées de liquides à températures différentes, tandis que deux vannes de

5

10

15

20

25

type 2/2 situées respectivement sur les deux canaux de contournement permettent de fermer ces canaux lorsque le liquide d'un canal est orienté vers la zone de thermalisation dans la cavité. Dans cette configuration,  
5 la voie commune (sortie) de la vanne 3/2 est reliée à l'entrée de la cavité et les deux autres voies (entrées) sont reliées respectivement aux canaux d'injection de fluide. Une vanne distributrice possédant n positions (n supérieur à deux) associée à n vannes de type 2/2 pourra être utilisée suivant le même schéma pour  
10 commuter la source de liquide entrant dans la cavité entre les canaux.

Selon une autre variante de réalisation, il est possible d'utiliser plusieurs vannes de type 3/2 positionnées sur les embranchements permettant de rediriger le liquide en provenance des canaux d'injections soit vers la cavité, soit vers les canaux de contournement. Dans cette configuration, la voie commune de chaque vanne de type 3/2 est reliée au canal d'injection de liquide correspondant et les 2 autres voies de ces mêmes vannes sont reliées à la cavité d'une part et à la voie de contournement correspondante d'autre part.  
15

Un autre mode de réalisation consiste à positionner des vannes 2/2 sur chacune des voies de contournement et des portions de canal situés entre la zone de thermalisation et les embranchements de manière à  
20

pouvoir rediriger les liquides injectés soit dans la zone de thermalisation, soit dans les canaux de contournement.

Préférentiellement, les vannes sont intégrées à la puce.

5 Pour cela, des vannes miniatures de type à montage sur embase (par exemple des vannes de la série LVM09 du fabricant SMC) peuvent être montées directement sur la puce, ou des vannes à commande par pression ou par solénoïde peuvent être intégrées dans la puce de manière à minimiser la longueur des chemins fluidiques situés entre la zone de thermalisation et les embranchements avec les canaux de contournement.

L'invention concerne également un système microfluidique comportant une puce telle que décrite ci-avant, ayant de préférence un premier film conducteur thermique disposé au-dessus de la cavité et fermant celle-ci de manière de préférence étanche sur lequel est fixé, de préférence collé, un porte échantillon destiné à recevoir le réactif de PCR mélangé à l'échantillon d'ADN à analyser.

Le film de matériau conducteur de la chaleur pourra par exemple être disposé au moins partiellement sur la surface plane de la puce et maintenu, par exemple, sous pression sur celle-ci de manière à assurer l'étanchéité au niveau du liquide caloporeur au contact du film.

Selon une variante, le porte échantillon comportera un second film de matériau conducteur de la chaleur dans sa partie inférieure, destiné à être au contact du premier film.

5 De préférence, le système selon l'invention comportera également des moyens pour faire circuler au moins un liquide caloporteur sous pression dans les canaux.

10 Selon un mode préférentiel de réalisation, le système selon l'invention comportera des moyens pour faire circuler une pluralité, de préférence deux liquides caloporteurs à différentes températures dans les canaux d'injection et/ou les canaux de contournement et alimenter alternativement la cavité avec l'un de ces liquides tandis que les autres liquides caloporteurs, de 15 préférence un seul, circuleront dans les canaux d'injection jusqu'à l'embranchement puis dans les canaux de contournement associés.

En règle générale mais sans que cela soit cependant nécessaire, l'alimentation alternative de la cavité par différents liquides caloporteurs s'effectuera en faisant varier les pressions respectives des liquides caloporteurs.

20 Selon une variante, l'alimentation alternative de la cavité par différents liquides caloporteurs s'effectuera à l'aide de vannes disposées dans les différentes canalisations.

L'invention concerne également un procédé pour réaliser une réaction de type PCR utilisant de préférence la puce décrite ci-dessus, avec ou sans le porte échantillon décrit ci-dessus, dans lequel on place un échantillon d'ADN alternativement en contact thermique indirect avec au moins un premier et un second liquides caloporteurs à températures différentes circulant dans des canaux micro fluidiques et alimentant alternativement une cavité permettant un échange thermique avec l'échantillon, procédé dans lequel lorsque l'un des liquides est envoyé vers la cavité, l'autre liquide contourne la cavité et vice-versa, les deux liquides pénétrant alternativement dans la cavité par une canalisation d'alimentation possédant un embranchement permettant au liquide d'aller soit dans la cavité, soit de contourner la cavité, la distance entre l'embranchement et l'entrée de la cavité étant inférieure à 0,02 mètre.

De préférence ce procédé utilisera une puce de thermalisation et/ou un système tels que décrit dans cette demande.

D'une manière générale, l'entrée et/ou la sortie de la cavité comporteront un réseau d'équilibrage des pressions (arbre d'homogénéisation) en entrée (et/ou en sortie) de la zone de thermalisation (échange de chaleur avec l'échantillon), constitué d'une succession

de divisions du canal entre les orifices d'entrée et/ou de sortie et les entrées et/ou sorties de fluide des canaux de circulation de fluide de manière à ce que le chemin parcouru par le fluide entre les orifices et/ou les entrées/sorties de fluide, (donc la résistance à l'écoulement du fluide) soit sensiblement identique sur toute la distance séparant les orifices d'entrée et/ou de sortie de fluide. Cet arbre d'homogénéisation permet un flux sensiblement parallèle de fluide de vitesse homogène sur toute la surface  $S$ , ce qui permet une convection homogène sur toute la surface d'échange  $S$  permettant une vitesse, et plus précisément une cinétique (courbe de l'évolution dans le temps) du changement de température spatialement homogène.

Le matériau choisi pour réaliser la puce pourra être très varié dès lors que l'on peut créer le réseau de canaux nécessaire par usinage, moulage, à l'aide d'une imprimante 3D, etc... De préférence il pourra être choisi notamment parmi les polymères, tels que le PDMS ou le polycarbonate, la céramique, le verre et/ou une combinaison de ceux-ci.

Selon un mode préférentiel, le bloc constituant la puce de thermalisation comportera au moins une cavité dont les parois définissent une surface supérieure plane sur laquelle débouchent une pluralité de canaux de préférence disposés sensiblement parallèlement entre

eux et constituant la cavité, tandis que, selon une variante de réalisation, la surface plane sera surmontée d'une plaquette mince ou d'un film de matériau bon conducteur de la chaleur, de préférence en métal ou en verre, de manière à fermer la cavité. Cette plaquette et/ou ce film seront soit solidaires des parois latérales de la cavité soit posés sur les bords supérieurs de ces parois et maintenus par pression et/ou par gravité de façon à être mobiles et séparables de la puce proprement dite.

Selon une autre variante de réalisation, la puce comportera au moins une vanne disposée dans au moins un de ses canaux. De préférence, elle comportera une vanne par canal d'alimentation en liquide et une vanne par canal de contournement. Bien entendu ces vannes ne sont pas nécessairement intégrées dans la puce et peuvent être localisées hors de la puce, dans les canalisations d'alimentation de fluide ou dans les canalisations de contournement.

L'invention concerne également un système micro fluidique comportant une puce telle que décrite ci-avant, un premier film conducteur thermique disposé sur la cavité de façon à fermer celle-ci et un porte échantillon posé sur ce film (ou plaquette) destiné à recevoir l'échantillon d'ADN à analyser.

Selon une première variante, l'alimentation alternative de la cavité par différents liquides caloporteurs s'effectue en faisant varier les pressions respectives des liquides caloporteurs. Ainsi, lorsque les canaux d'alimentation en liquide caloporteur se rejoignent, avant l'entrée dans la cavité, c'est le liquide ayant la pression la plus élevée qui forcera le passage vers cette cavité, le ou les autres liquides se trouvant stoppés et détournés vers l'embranchement correspondant (et le canal de contournement associé lorsque ces canaux existent) permettant leur circulation continue (avec ou sans retour vers les réservoirs d'alimentation en liquide caloporteur). En général, le liquide caloporteur qui pénètre dans la cavité s'écoulera simultanément dans le canal de contournement qui lui est associé, lorsque celui-ci existe. Dans le cas où un seul canal de contournement existe et que le fluide caloporteur pénétrant dans la cavité circule dans un canal d'alimentation qui n'est pas associé à un canal de contournement de la cavité, le liquide caloporteur cessera de circuler dans ce canal d'alimentation. On comprend donc que cette solution peut se révéler dans certains cas moins performante que la solution préférée associant un canal d'alimentation à un canal de contournement.

Selon une seconde variante du système selon le premier aspect de l'invention, l'alimentation alternative de la cavité par différents liquides caloporteurs s'effectuera à l'aide de vannes disposées dans les différentes canalisations.

On disposera alors généralement mais pas nécessairement, au moins une vanne dans chaque canal d'alimentation en liquide caloporteur, en aval de chaque embranchement, mais en amont de l'embranchement entre les différents canaux d'alimentation en liquide caloporteurs lorsque ceux-ci se rejoignent avant d'atteindre la cavité. Cette vanne pourra éventuellement être une vanne de type 3/2 située au niveau de l'embranchement et permettant, pour chaque canal d'alimentation, d'orienter le liquide soit vers le canal le contournement, soit vers la cavité.

Le système pourra également comporter de préférence plusieurs sources de liquides caloporteurs dont les températures respectives sont contrôlées indépendamment par des moyens de contrôle de la température du liquide caloporteur. Les sources de liquide caloporteur comportent en outre un moyen de circulation du liquide (pression, pompe, etc.), qui peut être disposé en amont ou en aval des moyens de contrôle de température.

5

10

15

20

25

Le système pourra également comporter des canalisations de transfert permettant de transporter le liquide caloporteur d'une source de liquide caloporteur aux entrées d'injection de la puce.

5 Les moyens de contrôle de la température du liquide caloporteur peuvent être constitués par un bain de liquide contrôlé en température ou un contrôleur de température en ligne utilisant, l'un et l'autre un système de chauffage à effet joule ou un dispositif thermoélectrique pour modifier la température du liquide circulant ainsi qu'un capteur de température permettant de contrôler la température précisément en boucle fermée à l'aide d'un contrôleur (par exemple de type PID).

15 Préférentiellement, les moyens de circulation du liquide sont disposés en amont de la puce de manière à éviter un transfert de chaleur parasite entre les moyens de circulation et le liquide caloporteur, qui pourrait modifier de manière imprévisible la température du liquide avant qu'il ne pénètre dans la zone d'échange.  
20 Ces moyens de circulation peuvent être communs à l'ensemble des sources de liquide caloporteur. Ils peuvent être constitués par une source de pression permettant de pousser le liquide caloporteur dans un réservoir ou une pompe, qui permet avantageusement la recirculation du liquide.

Le système comportera en outre de préférence des moyens de commutation du chemin pris par le liquide caloporteur de manière à ce que chaque liquide caloporteur passe soit par la zone d'échange, soit par le canal de contournement.

Selon le premier aspect, l'invention concerne enfin également un procédé pour réaliser une réaction de type PCR dans lequel on utilise de préférence une puce et/ou un système tel que décrit ci-dessus.

Selon le deuxième aspect de l'invention, la réaction de PCR est généralement mise en œuvre dans un récipient jetable car à l'issue de la réaction, l'amplification à grande échelle de la cible ADN à détecter contamine la surface du récipient avec la cible à amplifier ce qui empêche sa réutilisation. Les récipients des réactions de PCR sont donc des récipients dits consommables.

Un enjeu important des technologies de cyclage rapide est la conception d'un consommable recevant le réactif de PCR qui permette une bonne transmission de la température à l'échantillon afin que la température de l'échantillon s'équilibre rapidement avec la température du l'appareil de cyclage thermique.

Une mise en œuvre spécifique de la PCR est la PCR en temps réel où l'amplification de l'ADN est mesurée au cours de la réaction par un signal de fluorescence issu d'une sonde dont la fluorescence dépend de

5

l'avancement de la réaction d'amplification. Dans ce cas, un enjeu important des technologies de cyclage rapide est la conception d'un consommable recevant le réactif de PCR qui permette une bonne transmission thermique à l'échantillon afin que la température de l'échantillon s'équilibre rapidement avec la température du cycleur thermique.

10

Dans les cycleurs thermiques de PCR standard, le réactif de PCR est stocké dans des tubes micro-centrifuge standard ou dans des plaques multi-puits prévues à cet effet composées de réceptacles pour le réactif ayant un fond conique qui permet de rassembler le liquide au fond du tube lorsqu'il est centrifugé. Ce consommable est introduit dans un bloc de thermalisation (cycleur de température) dont la géométrie est adaptée à celle du consommable. Dans le cas particulier des PCR en temps réel, le consommable doit permettre de mesurer la fluorescence du réactif.

15

20

25

Lorsque le consommable est un tube ou une plaque multi-puit en matière plastique, la température est transmise à travers la paroi en matière plastique qui sépare l'échantillon du bloc de thermalisation. Les matières plastiques étant mauvaises conductrices thermiques, la vitesse de thermalisation de l'échantillon est alors limitée. Par ailleurs, la forme ramassée du

volume de PCR au fond du tube n'est pas adaptée à un changement de température rapide car le rapport entre la plus petite dimension de l'échantillon à travers laquelle la chaleur doit se transmettre et le volume de l'échantillon est élevé, donc très défavorable. En effet, il faut parfois plusieurs dizaines de secondes pour réaliser l'équilibre thermique à travers l'épaisseur de l'échantillon. Par ailleurs, la présence d'air au-dessus du réactif aqueux provoque une évaporation de celui-ci lorsqu'il est chauffé, se traduisant par un refroidissement de l'échantillon et une variation de la concentration des réactifs qui est nuisible à la réaction.

Ces méthodes de conditionnement trouvent leur limite de vitesse dans des appareils hautes performances tels que le modèle eco48 de la société PCRMax qui permet des vitesses de changement de température du bloc de 5.5 °C/s mais ne permet pas un changement de température complet de l'échantillon en moins de 10s.

US-A-5958349 décrit une chambre de réaction mince en plastique ayant des parois minces en matière plastique en contact de part et d'autre avec des éléments thermalisants. Dans cette configuration, l'épaisseur de l'échantillon à thermaliser est faible et donc particulièrement adaptée à des changements de température rapide. Par ailleurs, la configuration plane et allongée du tube limite la surface de contact entre

l'échantillon et l'air, dont l'évaporation de l'échantillon. Mais la conductivité thermique de parois en matière plastique ne permet pas un changement de température rapide inférieur à 10 s.

5 Globalement, la vitesse des systèmes de PCR est limitée par 2 aspects : d'une part la vitesse de changement de température des éléments thermoélectriques qui permet difficilement des changements de température de durée inférieure à 10 s et d'autre part, la faible conductivité thermique des consommables en matière plastique qui empêche un transfert rapide (< 10s) de la température à l'échantillon.

Pour pallier à ces inconvénients, EP2787067 décrit un porte échantillon constitué d'une mince feuille d'aluminium dans laquelle sont embouties des cavités permettant de recevoir les échantillons. Ces portes échantillons sont directement en contact avec un liquide de thermalisation dont la température est modifiée à l'aide de vannes, ce qui permet un changement de température beaucoup plus rapide que ceux permis par les éléments thermoélectriques. Ce système permet des changements de température en moins de 3 s, mais la configuration utilisée dans laquelle le porte-échantillon est en contact direct avec le liquide de thermalisation rend peu pratique son

utilisation car elle peut être notamment source de fuites de liquide de thermalisation dans l'environnement. En outre, la configuration ouverte du porte-échantillon ne permet pas de limiter l'évaporation du liquide.

Dans leur publication « Under-Three Minute PCR: Probing the Limits of Fast Amplification », Wheeler et al. (Analyst, 2011, 136, 3707) utilisent un support d'échantillon composé d'un bloc de cuivre comprenant un milieu métallique poreux à travers lequel deux liquides caloporteurs à deux températures différentes sont circulés alternativement pour permettre des changements très rapides de température du bloc. Dans ce système, l'échantillon est ici déposé dans un puit de  $5\mu\text{L}$  réalisé dans une mince feuille de polypropylène qui est insérée dans le bloc de cuivre et couverte par une feuille de polyimide, substitué ou non, telle que celles vendues sous la dénomination commerciale « KAPTON », chauffante permettant à la fois de limiter l'évaporation et de maintenir la température de la face supérieure de l'échantillon. Cette configuration a l'avantage d'être adaptée dans son format car l'échantillon n'est pas en contact avec le liquide de thermalisation, mais a l'inconvénient d'utiliser comme interface un film mince en matière plastique qui est fragile et peu adapté à un usage routinier par un personnel non formé. Par ailleurs, la

5

10

15

20

25

feuille de polyimide chauffante doit être alimentée électriquement pour servir d'élément de chauffe ce qui complexifie le consommable et augmente son cout de production.

5 Des exemples particuliers de réactions de PCR sont la PCR dite « digitale » ou l'amplification de chaque brin d'ADN cible individuel est réalisée dans un volume distinct de petites tailles afin de pouvoir être identifié séparément. La quantité de cible est alors mesurée par le nombre de volume distincts présentant une réaction positive. Il peut s'agir de PCR en goutte ou ddPCR (droplet digital PCR en anglais) comme réalisé sur la plateforme Naica commercialisée par la société Stilla technologies, ou des PCR réalisées dans des micro-  
10 puits ou des micro-chambres comme réalisé sur la plateforme EPI commercialisée par la société Fluidigm,. Avantageusement, ce type de PCR peut également être réalisé en temps réel ce qui permet de discriminer les amplifications parasites ou la présence de plus d'une cible dans le volume de réaction. Pour mettre en œuvre une telle détection, il est nécessaire que la mesure de fluorescence ait une bonne résolution spatiale pour permettre de détecter un grand nombre de cibles (soit, un grand nombre de gouttes ou un grand nombre de chambres)et ainsi obtenir une dynamique élevée de la réaction, c'est-à-dire de permettre d'énumérer aussi bien un petit nombre qu'un grand nombre d'ADN cible.  
15  
20  
25

Zongh et al. font état des enjeux de la PCR digitale dans la revue "Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR" (Lab on Chip no 11, pp 2167 (2011)).

5

L'ensemble de ces systèmes permettent d'obtenir des vitesses de changement de température rapide ou une observation résolue spatialement, mais souffrent de certaines limitations qui ne permettent pas un contrôle rapide et précis de la température tout en permettant une mesure optique de l'échantillon spatialement résolue.

Egalement, les consommables de PCR de l'art antérieur ne permettent pas un contrôle rapide (< 5 s), précis, homogène et reproductible de la température tout en permettant une mesure de la fluorescence de l'échantillon avec une résolution spatiale et/ou une interface d'échange thermique entre l'échantillon et le moyen de thermalisation simple à mettre en œuvre.

Pourtant, les besoins actuels de tests rapides d'orientation du diagnostic ou dans les contextes d'urgence nécessitent de pouvoir réaliser des réactions telles que la PCR en quelques minutes.

Selon le deuxième aspect de l'invention, les inventeurs ont remarqué que l'observation avec une résolution

25

spatiale a plusieurs avantages : d'une part, sur une PCR en solution homogène, elle permet de contrôler l'homogénéité de la réaction, d'autre part, elle permet en utilisant un consommable contenant plusieurs chambres de réaliser plusieurs réactions en parallèle dans les mêmes conditions de température afin de tester plusieurs cibles ou plusieurs échantillons en parallèle, enfin elle permet de réaliser des PCR digitales qui confèrent l'avantage de permettre une quantification plus précise, d'obtenir des seuils de sensibilité plus bas et une moindre sensibilité de la quantification aux inhibiteurs de PCR et au rendement de la PCR, la mesure en temps réel de la réaction permettant en outre une meilleure discrimination des amplifications parasites.

Par ailleurs, l'un des objectifs des inventeurs est de concevoir des tests qui doivent être peu coûteux. Pour cela, la simplicité de fabrication du consommable est un enjeu primordial pour la mise sur le marché de ce type de test.

Une PCR nécessite 30 à 40 cycles de température dont la durée minimale est de l'ordre de 8 s, chaque seconde gagnée sur le temps de changement de température permet donc de réduire le temps de la réaction de 60 à 80 s. Par ailleurs, la complexification des kits de détection moléculaires basés sur la PCR,

notamment pour la détection multiplexe nécessite que les températures aux différentes phases du cycle soient contrôlées de manière très précise pour fonctionner correctement.

5 En outre, le volume important de réaction (de l'ordre de 20 µL) généralement nécessaire pour ces tests est adapté à un système de thermalisation par liquide caloporteur car la puissance instantanée nécessaire à thermaliser l'échantillon lors du changement de température est si importante qu'elle s'est avérée généralement incompatible avec l'utilisation d'autres technologies.

10 Enfin, un contrôle rapide, précis, homogène et 15 reproductible de la température a un intérêt pour l'analyse de nombreuses autres réactions chimiques, biochimiques, physiologiques impliquant la température, que ce soit dans un réactif artificiel ou au sein d'un échantillon naturel, vivant ou non, solide, liquide ou gazeux.

20 Un système de contrôle de température d'un échantillon basé sur l'échange de liquide caloporteur qui soit rapide (<5 s), précis, homogène, reproductible combinée à une mesure de la fluorescence ayant une résolution spatiale est donc d'un grand intérêt pour de 25 nombreux domaines.

L'invention selon son deuxième aspect permet de résoudre les différents problèmes posés rappelés ci-dessus.

Selon le deuxième aspect, l'invention concerne une puce échantillon micro fluidique pour le test d'échantillons biologiques, notamment pour une analyse de type PCR et/ou de fluorescence, ayant la forme d'un bloc creux comportant au moins une chambre délimitée par une paroi supérieure, une paroi inférieure et au moins une paroi latérale, dans laquelle peut être introduit un échantillon à tester, caractérisée en ce que le bloc est pourvu d'au moins une première face et une deuxième face parallèles entre elles, la première face (ou face inférieure) étant disposée sous la paroi inférieure constituée d'un matériau à forte conductivité thermique, de préférence supérieure à 1 W.m<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup> la seconde face (ou face supérieure) étant disposée sur la paroi supérieure constituée d'un matériau à faible conductivité thermique et en outre perméable au moins au niveau de l'une des chambres, aux rayonnements de longueur d'onde comprise entre 300 nm et 900 nm, de préférence perméable aux rayonnements dans le spectre visible entre 400 et 700 nm, ce bloc possédant au moins deux ouvertures permettant l'introduction de l'échantillon dans l'une au moins des chambres et l'évacuation de l'atmosphère présente dans la chambre lors de l'introduction de

5

10

15

20

25

l'échantillon.

De préférence, la puce échantillon est caractérisée en ce que au moins une ouverture est disposée sur la seconde face et traverse la paroi supérieure pour atteindre l'une des chambres au moins.

Selon une variante, la puce est caractérisée en ce que au moins une ouverture est disposée sur au moins une paroi latérale et traverse celle-ci pour atteindre l'une des chambres au moins.

Selon une variante, la puce est caractérisée en ce que au moins une ouverture est en communication avec un circuit micro fluidique intégré dans une autre partie de la puce échantillon et comportant des moyens de prétraitement de l'échantillon (par exemple filtrer ou retenir d'une manière connue en soi certains éléments de l'échantillon avant le traitement par PCR), de post-traitement de l'échantillon (rajouter un additif ou autre après le traitement par PCR) ou toute autres opérations qui peuvent s'avérer nécessaires ou utiles.

De préférence, le bloc a une forme extérieure d'un parallélépipède ou d'un cylindre dont les faces des parois supérieure et inférieure sont parallèles entre elles.

Plus préférentiellement, les ouvertures sont scellées après introduction de l'échantillon dans une chambre au moins, les différentes parois de la puce étant

rendues solidaires de manière à résister sans endommagement à une pression interne et/ou externe supérieure ou égale à 500 mbar, de préférence supérieure ou égale à 1 bar.

5 Selon un mode de réalisation, la puce selon ce deuxième aspect de l'invention est caractérisée en ce que sa paroi inférieure est réalisée en un matériau d'une part de conductivité thermique supérieure ou égale à 15 w.m-l.K-1, de préférence supérieure ou égale à 100 w.m-l.K-let d'autre part de préférence qui n'est pas un inhibiteur de réaction de type PCR tel que notamment l'aluminium pur et/ou ses mélanges ou dérivés et plus particulièrement l'aluminium 6010 (défini par le système international de désignation des alliages), ayant ou non subi un traitement anticorrosion tel qu'un traitement d'anodisation.

10

15 Selon encore une autre variante, la puce est caractérisée en ce que la conductivité thermique de sa paroi supérieure est inférieure ou égale à 1 w.m-l.K-1, et en ce que son effusivité est de préférence inférieure ou égale à 1000 J.m-2.K-l.s-0,5 et supportant de préférence une température supérieure ou égale à 95°C sans se déformer( c'est-à-dire une température de fléchissement sous charge (norme ISO 75), et de transition vitreuse du matériaux > 95°C).

20

25

De préférence, la paroi supérieure de la puce est constituée d'une matière plastique transparente choisie parmi les polycarbonates et leurs dérivés et/ou les polymères ou copolymères oléfiniques cycliques (communément désignés par les acronymes COC et COP) et leurs dérivés.

Selon une configuration préférée, la puce comporte de une à quatre chambres de forme parallélépipédique reliées chacune à de préférence deux ouvertures au moins.

Selon le deuxième aspect, l'invention concerne également un système d'analyse d'un échantillon de type PCR contenu dans une chambre ménagée dans une puce échantillon telle que décrite dans la présente demande, comportant notamment :

- des moyens de thermalisation permettant d'augmenter ou de diminuer par cyclage thermique la température de la puce et de ses échantillons, en contact thermique avec la face inférieure de la puce échantillon, qui est caractérisé en ce qu'il comporte en outre :

-des moyens pour fermer les ouvertures des chambres utilisées dans la puce échantillon permettant de maintenir une pression intérieure relative d'au moins 5000 Pascal (50 mbar), de préférence d'au moins 50000 Pa (500 mbar), dans lesdites chambres,

l'augmentation de température de l'échantillon engendrant une dilatation des chambres, améliorant ainsi le contact thermique entre la face inférieure et les moyens de thermalisation,

- 5 - des moyens de maintien d'une pression extérieure relative supérieure à 50 mbar sur l'ensemble de la face supérieure de la puce échantillon de manière à assurer un contact thermique sensiblement uniforme entre la face inférieure de la puce et les moyens de thermalisation, la partie transparente de la paroi supérieure de la puce pouvant être traversée par des rayons lumineux étant située au-dessus d'au moins une des chambres contenant un des échantillons.

Le système selon ce deuxième aspect de l'invention 15 comporte de préférence des moyens de mesure optique, permettant de préférence une observation optique des échantillons avec une résolution spatiale.

Selon une première variante, le système comporte une 20 pièce conductrice de la chaleur, de préférence une pièce métallique d'épaisseur inférieure ou égale à 1 mm disposée entre la face inférieure de la puce échantillon et les moyens de thermalisation, de préférence un film métallique d'aluminium.

Selon une autre variante, le système comporte des 25 moyens de thermalisation rapide capables d'engendrer

un changement de température de l'échantillon supérieur ou égal à 5°C/s.

De préférence, le système comporte des moyens de maintien d'une pression extérieure relative supérieure à 1 bar sur une partie au moins, de préférence l'ensemble de la face supérieure de la puce échantillon

Selon un mode préférentiel, le système comporte des moyens de mise sous pression extérieure constitués d'une plaque de matériau transparent, de préférence du verre, associée à un cadre disposé à la périphérie de la plaque et des moyens élastiques tels que des ressorts appliquant une pression sur ledit cadre.

Selon une variante, le système comporte des moyens de mise sous pression extérieure constitués d'un logement aux dimensions extérieures identiques à celles de la puce permettant l'introduction de celle-ci dans le logement à température ambiante, logement dont les parois exercent une pression sur les parois supérieure et inférieure de la puce lors d'une élévation de température d'un échantillon emprisonné dans une chambre au moins de ladite puce, du fait de la dilatation des chambres.

Selon une autre variante, le système comporte des moyens d'injection d'un échantillon dans l'une au moins des chambres lorsque cette puce est déjà positionnée dans le système.

5

10

15

20

25

Selon encore une autre variante, le système comporte également des moyens pour sceller les ouvertures de la puce après le remplissage d'une au moins des chambres.

5 L'invention concerne également un appareil, un système et un procédé mettant en œuvre le premier et le second aspect de l'invention, c'est-à-dire comportant à la fois un système de cyclage thermique avec une puce de thermalisation selon le premier aspect de l'invention, combiné à une puce échantillon de dimensions adaptées à celles du logement complémentaire dans lequel s'insère la puce échantillon qui comporte notamment une paroi supérieure transparente selon le deuxième aspect de l'invention, ainsi que de préférence un système optique de mesure de fluorescence de l'échantillon, le cyclage thermique réalisé alternativement à des températures différentes permettant de multiplier l'ADN contenu dans l'échantillon de la puce échantillon maintenue sous pression tout au long du cyclage thermique.

10

15

20

Dans toute la description, les termes suivants auront en outre la signification suivante :

-Thermalisation d'un échantillon (ou thermaliser en général) signifie en modifier la température de manière

à ce que la température de l'échantillon atteigne une température voulue.

-Vitesse de changement de température d'un échantillon d'une température T<sub>1</sub> à une température T<sub>2</sub> différente de T<sub>1</sub>, signifie le temps nécessaire pour que l'échantillon passe de la température T<sub>1</sub> à une température effective T<sub>2eff</sub> tel que (T<sub>2</sub>- T<sub>2eff</sub>)/(T<sub>2</sub>-T<sub>1</sub>) < 5%.

-Un changement de température est dit reproductible si les profils de changement de température dans le temps pour deux changements de températures successifs peuvent se superposer quelque soient les conditions précédentes de changement de température (superposition sur l'axe des températures à 5% près du différentiel de température ou superposition sur l'axe du temps à 5% près de la vitesse de changement de température).

-Arbre d'homogénéisation signifie un réseau microfluidique, typiquement constitué d'une série de division d'un canal, permettant d'homogénéiser le débit suivant sur le grand axe de la section d'une chambre de taille importante par rapport à la taille d'une entrée (ou sortie) de liquide dans cette chambre. Cette dénomination « arbre d'homogénéisation » sera utilisée dans la présente description et les revendications pour désigner tout moyen en général permettant

5

10

15

20

25

d'homogénéiser la pression à l'entrée et/ou la sortie de la zone de thermalisation, en particulier des zones d'homogénéisation de la pression constituées de volumes parallélépipédique ou tout autre forme avoisinante juxtaposés respectivement à l'entrée et à la sortie de la zone de thermalisation 202 de manière à ce que ces volumes augmentent l'épaisseur de la zone de thermalisation à son entrée et sa sortie. La plus faible résistance à l'écoulement du liquide dans ces volumes en comparaison de la résistance à l'écoulement dans la zone de thermalisation homogénéisant la pression sur toute la largeur de la zone de thermalisation. Ces volumes parallélépipédiques ou assimilés ayant une largeur égale à la largeur la zone de thermalisation 202 de manière à homogénéiser la pression sur toute cette largeur, une épaisseur comprise entre 2 et 6 fois l'épaisseur du ou des canaux de la zone de thermalisation, et une longueur comprise entre 2 et 6 fois l'épaisseur du ou des canaux de thermalisation leur conférant une résistance à l'écoulement plus faible.

Il est important de noter que la zone d'homogénéisation ou arbre d'homogénéisation fait partie de la longueur L (autrement dit, que la zone d'échange thermique ou de thermalisation de surface S n'englobe pas les zones éventuelles d'homogénéisation)

5

10

15

20

25

Le terme cavité désigne une cavité de forme généralement parallélépipédique (sachant qu'il est toujours possible sans sortir du cadre de l'invention de lui donner une forme cylindrique, tronconique, etc.. la forme (section horizontale) de la cavité étant essentiellement dépendante de la forme de la plaquette (ou de la puce) utilisée pour déposer l'échantillon qui doit être soumis à un cyclage thermique ou autre)

La plaquette de capteurs optiques étant habituellement de forme rectangulaire, la ou les chambres contenant l'échantillon sont avantageusement rectangulaires, si bien que la section horizontale de la cavité sera généralement de mêmes dimensions que la plaquette rectangulaire utilisée, le terme sensiblement indiquant que ces dimensions peuvent varier (essentiellement pour des raisons pratiques) de plus ou moins 10% par rapport aux dimensions de la plaquette prévue pour être utilisée avec la cavité dans laquelle elle vient se loger. En règle générale, les plaquettes porte échantillon utilisées ont des dimensions de l'ordre de 14 mm X 14 mm contenant par exemple une chambre de 10 mm X 10 mm

Le terme canal de contournement désigne un canal permettant de dériver à partir d'un canal d'injection au moins une partie du liquide caloporteur et éviter son passage dans la cavité tout en permettant d'assurer

une circulation continue de liquide caloporteur dans la canalisation d'injection située en amont de l'embranchement de ces deux canaux.

Le terme PCR digitale (ou numérique) est défini et décrit dans l'article « The digital MIQUE guidelines : minimum information for publication of quantitative digital PCR equipments » de J.F.Hugget et al.-Clinical Chemistry- 2013 » ainsi que dans US 6143496 de Brown JF et al.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples de réalisation suivants illustrant les premier et deuxième aspects de l'invention, donnés à titre non-limitatif conjointement avec les figures qui représentent :

La figure 1, un exemple de réalisation d'une puce microfluidique selon l'invention,

Les figures 2a, 2b et 2c, une variante de réalisation de la puce de la figure 1, dans laquelle on a intégré des vannes de commutation de fluide,

La figure 3, représente sur les figures 3a, 3b, 3c d'autres variantes de la puce associées à un porte échantillon contenant un échantillon à analyser, selon le système de l'invention,

Les figures 4a et 4b, deux variantes du système selon l'invention dans lesquelles les différents liquides caloporteurs circulent alternativement grâce à un

ensemble de vannes (fig. 4a) ou grâce aux variations de pression imposées aux liquides (fig. 4b)

La figure 5, une autre variante du système selon l'invention dans laquelle tous les liquides des canaux de contournement sont récupérés dans le même récipient,

La figure 6, une autre variante avec un système de thermalisation des liquides caloporeurs à l'aide de pompes,

Les figures 7a à 7d, une autre variante avec une puce de thermalisation représentée en trois dimensions et équipée des vannes miniatures de type à montage sur embase.

Les figures 8a et 8b, la réalisation d'un cycle de PCR et le signal de fluorescence obtenu.

La figure 9, une vue en coupe schématique d'une puce échantillon selon le deuxième aspect de l'invention,

La figure 10, un exemple de réalisation d'un système selon le deuxième aspect de l'invention, comportant notamment des moyens de mesure optiques.

La figure 11, différentes représentations de puces échantillons à une ou plusieurs chambres, contenant un échantillon ou des gouttes échantillons.

Sur l'ensemble des figures, les mêmes éléments portent les mêmes références.

Sur la figure 1, est représentée schématiquement une puce micro fluidique 1 d'échange de chaleur entre les liquides caloporteurs lorsque ceux-ci sont injectés dans la puce et l'échantillon (ADN par exemple), non représenté sur cette figure, en contact avec la puce. La puce 1 est constituée d'un bloc de matériau en forme de parallélépipède ayant une face supérieure, comprenant une zone d'échange thermique 204 munie d'une zone de thermalisation (échange de chaleur) 22 de surface S (entourée d'un trait en pointillés sur les figures) vers laquelle convergent des canaux d'injection 4, 5 de liquide caloporteur.

La zone d'injection de fluide 201 comporte une canalisation 15 d'un premier liquide caloporteur reliée à la puce 1 par l'intermédiaire d'un premier port de connexion 2 tandis qu'une seconde canalisation 14 est reliée à la puce 1 par l'intermédiaire d'un second port de connexion 3. Les ports d'entrée 2 et 3 sont respectivement reliés aux canaux d'alimentation 4 et 5 se prolongeant respectivement jusqu'aux embranchements 8 et 9, auxquels sont reliés également respectivement les canaux de contournement 6 et 7 qui se prolongent respectivement jusqu'aux ports de sortie 16 et 17 permettant l'évacuation de liquide caloporteur vers les canalisations de contournement 18 et 19.

respectivement. (les canaux d'alimentation peuvent être les canaux de contournement et vice-versa).

Chaque embranchement 8, 9 se prolonge par une portion de canal d'alimentation 20, 21 respectivement qui se rejoignent en leurs autres extrémités à l'entrée 10 de la cavité 202 pour introduire le liquide caloporteur dans la zone d'homogénéisation d'entrée 203 qui comporte un arbre d'homogénéisation du liquide 29a (afin de lui conférer une bonne homogénéité de débit à l'entrée de la zone de thermalisation 22). La zone d'échange thermique 204 comprend la zone de thermalisation 22 proprement dite, de préférence constituée d'une pluralité de canaux parallèles 11, de préférence régulièrement répartis sur sensiblement toute la largeur de la puce, dans la zone 22 destinée au contact avec l'échantillon à analyser. A l'autre extrémité de ces canaux 11, le liquide caloporteur est récupéré à la sortie 30 bis de la zone de thermalisation 22 (qui fait partie de la zone d'échange thermique 204) puis après passage dans la zone d'homogénéisation de sortie 205 comportant un arbre d'homogénéisation 29b semblable de préférence à celui 29a disposé dans la zone d'homogénéisation d'entrée 203, est récupéré au niveau de la zone de sortie de fluide 206 via la sortie 30 de la cavité 202 reliée au port de connexion 12 de la puce 1 dans la canalisation

5

10

15

20

25

de sortie 13 (les canalisations 13, 14, 15, 18 et 19 ne font pas partie dans cet exemple de la puce 1).

Selon une variante de réalisation, on prévoit une sortie indépendante par liquide à différentes températures, par exemple à l'aide d'une ou plusieurs vannes après le port de connexion 12 permettant d'orienter le liquide dans différents réservoirs afin de limiter le mélange entre les liquides de différentes températures). Chaque canal d'injection 4, 5 comporte un embranchement 8, 9 vers une sortie 16, 17 de liquide supplémentaire permettant de faire circuler le liquide caloporteur en continu dans la canalisation 18, 19 en amont de la puce 1 et stabiliser ainsi la température de ce liquide afin d'éviter de créer des perturbations dues au changement de température de liquide caloporteur.

La distance L entre les embranchements 8 et 9 et la zone de thermalisation 22 dépend des caractéristiques thermiques de la puce et doit être tel que :

$$L < S/a$$

S étant la surface de la face supérieure de la cavité (202) exprimée en m<sup>2</sup>, a étant un coefficient de correction égal à 0,005 m.

De cette manière, l'effet transitoire des matériaux entourant le liquide de thermalisation en amont de la zone de thermalisation n'est pas suffisant pour

empêcher un changement de température reproductible comme défini auparavant.

Ainsi pour un débit de liquide caloporeur de préférence de l'ordre de 10 mL/min ( $1.6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$ ), cette distance L entre les embranchements 20 et 21 et l'entrée de fluide 10 bis de la zone de thermalisation 22 sera de préférence inférieure à 2 cm.

La figure 2A représente une variante de réalisation de la puce de la figure 1, dans laquelle on a intégré des vannes de commutation de liquide 23, 24, 25 et 26 permettant à chaque liquide issu des canalisations 14 et 15 de passer soit dans les canaux 11 soit dans le canal de contournement 6, 7 prévu à cet effet.

Ainsi lorsqu'on ferme la vanne de commutation 23 et que l'on ouvre simultanément la vanne 24, le liquide issu de la canalisation 15 est alors envoyé dans la canalisation de contournement 18. Simultanément (si on le souhaite) le liquide issu de la canalisation 14, si l'on ouvre la vanne 25 et que l'on ferme la vanne 26, va pouvoir pénétrer dans la puce et après homogénéisation, va pénétrer dans les canaux 11 pour réaliser la thermalisation de l'échantillon ADN qui sera mis au contact de la puce.

Sur les figures 2B et 2C sont respectivement représentés un détail agrandi d'un exemple de réalisation d'une vanne à commande pneumatique

intégrée à la puce en position d'ouverture (fig. 2B) et de fermeture (fig.2C) sous l'action d'un signal de commande.

De manière connue en soi (Unger et al. Science 288:7, 113, 2000), chaque vanne consiste par exemple en une membrane 28 qui en position de repos ( $P=0$ , fig. 2B) est ouverte et qui est fermée lorsqu'elle est activée par injection d'un gaz de commande sous pression (fig. 2C) qui vient coller cette membrane 28 sur la partie opposée 27 de la canalisation sur laquelle elle est fixée.

La figure 3A représente une vue de dessus de la puce de la figure 1, sur laquelle on a représenté quelques détails de réalisation additionnels notamment au niveau des arbres d'homogénéisation 29 a et b. Chaque arbre possède un premier embranchement à proximité de l'entrée 10 ou de la sortie 30 divisant le canal d'entrée ou de sortie de fluide en deux canaux latéraux 31 et 32 qui se divisent une seconde fois au niveau des embranchements 34 et 35 ce qui permet l'homogénéisation du débit de liquide le long de la grande section de l'entrée 10 bis et de la sortie 30 bis de la zone de thermalisation 22. Cette homogénéisation résulte du fait que chaque extrémité des branches des arbres formées par les canaux latéraux est à égale distance de l'entrée ou de la sortie de liquide ce qui

10

15

20

25

confère à ces différents chemins une résistance à l'écoulement équivalente.

Les figures 3b et 3c représentent des vues en coupe selon A-A de la puce 1 surmontée d'un porte échantillon (non représenté sur la figure 3a)

Sur la première variante de la figure 3b, est représentée la puce 1 réalisée dans un bloc parallélépipédique 40 de matériau polymère(ici de hauteur 5 mm) tel que du polydiméthylsiloxane (PDMS) dans la partie supérieure duquel se trouvent une pluralité (sept sur la figure) de canaux parallèles 11 (de section rectangulaire) débouchant à la surface de la puce 1, d'une profondeur de 100 microns dans cet exemple de réalisation, ces canaux ayant une largeur de préférence comprise entre 1 et 2 mm, chaque canal 11 étant séparé du canal voisin d'une distance de préférence inférieure à la distance de la surface de la puce à l'échantillon (soit environ 170 microns dans cet exemple, correspondant à l'épaisseur de la lame de verre 41). La lame de verre 41 (ou tout autre matériau permettant un bon transfert de chaleur entre le liquide caloporteur qui circule dans les canaux 11 en utilisation) supportant l'échantillon est appliquée sur les canaux 11 afin de fermer ceux-ci de manière de préférence étanche, tandis que la face supérieure de cette lame 41 est traitée localement à l'aide d'un

5

10

15

20

25

traitement à base de polyéthylène glycol (PEG) permettant d'éviter l'adsorption de l'ADN sur la surface en verre, par exemple plus particulièrement à l'aide d'un copolymère polylysine-polyéthylène glycol qui possède une bonne capacité d'adsorption sur le verre.

Tout autour de la zone ainsi traitée 42 s'étend une couronne de silicone 43 formant récipient porte échantillon 45, qui après introduction de l'échantillon est fermée à l'aide d'un film 44, par exemple en matière plastique (ici un film de polypropylène de 100 microns d'épaisseur). Dans cette version, l'ensemble puce et porte échantillon est de préférence scellé, l'ensemble étant jeté après utilisation.

Il est à noter que dans toutes les réalisations selon l'invention, le film ou la paroi 44(généralement transparent) et la paroi latérale 43 délimitant la cavité 45, peuvent ne constituer qu'une seule pièce, selon une variante de l'invention, par exemple moulée, en matière plastique transparente.

Sur la seconde variante de la figure 3c , les canaux 11 sont fermés à l'aide d'une feuille d'aluminium 41 de 300 microns d'épaisseur, sur laquelle repose le porte échantillon composé d'une pièce de serrage 48 en forme de couronne pour maintenir le film 41 sur les canaux de manière étanche, au fond de laquelle est placé un film d'aluminium 42 (dans cet exemple

5

10

15

20

25

identique au film 41) supportant une pièce porte échantillon 43 en polycarbonate munie d'une cavité de hauteur 200 microns dont le fond est constitué par le film 42 et de ports de remplissage 47 qui sont fermés par un film adhésif polyester/silicone 46 dans cet exemple. L'ensemble 42, 43, 46, après remplissage et test de l'échantillon peut être jeté, le reste pouvant être réutilisé.

Les films de séparation 41 et 42 entre le liquide caloporteur et l'échantillon sont d'une manière générale réalisés dans un matériau conducteur de la chaleur dont le rapport conductivité thermique/épaisseur ( $\lambda/e$ ) est supérieur à  $1000 \text{ Wm}^{-2}\text{K}^{-1}$  et dont le rapport diffusivité thermique sur épaisseur au carré ( $D/e^2$ ) est supérieur à  $2 \text{ s}^{-1}$  [A titre d'exemple, une lamelle de verre de  $500 \mu\text{m}$  répond à ces critères , ce qui correspond à la limite raisonnable en terme de conductivité et diffusivité pour obtenir un changement de température en quelques secondes].

Le débit de liquide caloporteur par unité de surface à thermaliser (surface de la zone d'échange) nécessaire à la thermalisation de l'échantillon sera de préférence inférieur à  $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$

La figure 4 décrit deux variantes d'utilisation de la puce et de son système décrit sur les figures 1 à 3, pour réaliser le « cyclage » thermique nécessaire dans une analyse de type PCR grâce à des liquides caloporteurs de températures différentes successivement circulés dans les canaux 11 de la puce, en contact thermique avec l'échantillon. Pour cela, le système de la figure 4 dispose de moyens de commutation du chemin suivi par le liquide caloporteur de manière à ce que pour chaque liquide caloporteur, celui-ci passe soit par les canaux 11 de la zone de thermalisation 22, soit par un canal de contournement. Plusieurs configurations sont possibles pour réaliser cette commutation.

Par exemple, selon la variante de la figure 4a, on utilise des vannes de commutation pneumatiques, par exemple intégrées dans la puce (comme représenté sur la figure 3), disposées en amont de la zone de thermalisation 22 avec l'échantillon et sur les deux embranchements de circulation, permettant de diriger le liquide sortant de la source 60 de liquide caloporteur, s'écoulant dans le canal 61, les moyens de thermalisation 62 du liquide caloporteur (pour amener le liquide à bonne température), le canal 63, soit vers la zone d'échange 67 par l'intermédiaire de la vanne ouverte 64 (et la vanne fermée 65) et le canal 66, soit

vers le canal de contournement 68, par l'intermédiaire de la vanne 65 ouverte (et de la vanne 64 fermée reliée à l'embranchement 69 à la vanne 65). Lorsqu'une vanne 64 est ouverte permettant au liquide caloporteur de la branche de circuler, toutes les autres vannes 64 sont fermées (sauf exception) tandis que la vanne 65 (de la branche dont la vanne 64 est ouverte) est fermée, toutes les autres vannes 65 étant ouvertes pour permettre le contournement de la puce 1. Ces vannes pneumatiques vont obturer les canaux micro fluidiques concernés à l'aide d'un gaz sous pression appliqué sur une membrane déformable positionnée au-dessus du canal (voir les figures 2B et 2C) comme il est d'usage courant dans les puces microfluidiques réalisées en élastomère comme le PDMS.

Selon la variante de la figure 4b, on utilise des sources de liquide caloporteur indépendantes et à pression variable. Pour cela, la pression du liquide caloporteur transféré à la zone d'échange 22 doit être plus élevée que la pression des autres liquides caloporteurs. La pression des autres sources doit être dimensionnée, de manière connue en soi, en fonction de la résistance à l'écoulement des différentes branches du circuit de manière à ce que cette pression soit suffisamment faible pour éviter tout transfert de liquide dans la zone d'échange en provenance de ces sources. Cette

solution nécessite cependant un réglage fin des pressions des différents liquides caloporteurs pour obtenir un fonctionnement correct.

Avantageusement, quelle que soit la variante utilisée, le liquide caloporteur peut être re-circulé par exemple de manière indépendante pour chaque source à l'aide de pompes. Cela permet de limiter la consommation énergétique nécessaire au contrôle de température de chaque source en réutilisant le liquide caloporteur préalablement thermalisé. Pour cela, on peut par exemple utiliser une pompe volumétrique à piston ou à engrenage qui permet d'assurer un débit de liquide caloporteur constant pour chaque source ce qui rend plus aisé un contrôle précis de la température (par exemple des pompes en céramique qui peuvent supporter des températures élevées). D'une manière générale en effet, tous les matériaux et appareillages utilisés dans le cadre de la présente invention sont généralement prévus pour pouvoir supporter (et fonctionner à) des températures d'au moins 100°Celsius lorsqu'on veut réaliser des analyses de type PCR.

Pour ce faire, chaque embranchement de circulation est redirigé de préférence vers la source de liquide caloporteur dont il provient et la sortie de la zone d'échange peut être distribuée vers l'ensemble des

5

10

15

20

25

sources. La sortie de la puce peut être également redirigée vers sa source d'origine, mais dans ce cas, il est nécessaire d'ajouter une vanne pour rediriger le liquide vers le réservoir. (Voir figure 6).

5 Un réservoir pourra également être inséré dans le circuit en amont de la pompe pour assurer un bon remplissage du circuit en liquide caloporteur. Dans certaines configurations, les débits peuvent ne pas être équilibrés dans les différentes voies du circuit et certains réservoirs peuvent se remplir plus vite que d'autres. Il peut être alors avantageux de faire communiquer les réservoirs entre eux par la canalisation 121 (figure 6) de manière à ce que leurs niveaux s'équilibrent, ce qui a également l'avantage de pourvoir remplir l'ensemble des réservoirs à partir d'une unique ouverture. Avantageusement, ces réservoirs pourront avoir un volume inférieur à 20 ml, permettant un faible encombrement, une capacité thermique réduite et de faibles pertes thermiques.

10

15

20 Deux exemples de réalisation de l'invention vont maintenant être décrits à l'aide des figures 5 et 6 :

Exemple 1 :

Sur la figure 5, un premier générateur de gaz sous pression 80 engendre un gaz comprimé (air et/ou gaz 25 inerte tel qu'azote et/ou argon.) qui s'écoule via la ligne 84 dans le ciel gazeux 89a du réservoir 87 d'un

5 premier liquide caloporeur 89b. Un second générateur de gaz sous pression 81 engendre un gaz comprimé (de préférence le même que le premier générateur) qui s'écoule via la ligne 85 dans le ciel gazeux 90a du réservoir 88 d'un second liquide caloporeur 90b. Les deux liquides 89b et 90b sont injectés respectivement par la pression exercée par les ciels gazeux respectifs, dans les canalisations respectivement 91 et 92 jusqu'aux ports d'entrée respectifs 93 et 94 de la puce 10 1, du type décrit sur les figures 1 à 3. Les flux de liquides se rencontrent à l'embranchement 98 situé sensiblement à l'entrée de la zone d'échange 95 dans laquelle circuleront alternativement l'un ou l'autre des liquides caloporeurs. Lorsque la pression d'un liquide 15 est supérieure à celle de l'autre (d'au moins 40%, de préférence d'au moins 42%, mais moins de 55% pour ne pas créer de reflux de ce liquide sur l'autre voie. Ces valeurs minimales et maximales sont dépendantes de la géométrie de la puce et de la température du liquide 20 à injecter. Elles sont déterminées expérimentalement par imagerie thermique ou modélisation de manière à obtenir les écoulements voulus comme décrit plus bas), c'est ce liquide qui va pénétrer dans la zone d'échange ainsi que dans le canal de contournement qui lui est 25 associé, tandis que l'autre liquide continue à circuler dans le canal de contournement qui lui est associé (96

pour le premier liquide 89b, 97 pour le second liquide 90b). A l'embranchement 99 à la sortie de la puce où convergent les canalisations 96 et 97, les liquides sont dirigés vers le port de sortie 100 et s'écoulent par la canalisation 101 vers le récipient de récupération 102 qui contient un mélange de liquides 103b. L'alternance des liquides dans la zone d'échange 95 et les variations de température dans cette zone sont pilotées par le système de pilotage 83. Les canalisations 96 et 97 permettent de faire circuler les liquides en continu. De cette manière, la distance entre l'embranchement 98 et l'entrée de la chambre 95 peut rester selon l'invention, inférieure à la valeur définie ci-dessus pour L. Dans le présent exemple du système selon l'invention, les générateurs de gaz dont la pression est contrôlée par ordinateur (par exemple les systèmes de la société ELVESYS vendus sous la dénomination commerciale « Elveflow OBI mk3 ») sont utilisés comme moyen de circulation qui mettent sous pression les deux réservoirs 87 et 88 contrôlés en température avec un module thermoélectrique. Les pressions des gaz délivrés sont réglées suivant deux configurations permettant d'obtenir un contrôle en température de l'échantillon ADN (ou autre) suivant deux températures distinctes. Dans la première configuration, la pression du gaz délivré par le deuxième générateur 81 est au

moins 1,5 fois plus élevée que la pression du gaz délivré par le premier générateur 80 (déterminées expérimentalement par imagerie thermique ou modélisation de manière à obtenir les écoulements voulus comme décrit plus bas), si bien que le liquide 89b contenu dans le réservoir 87 à une première température est circulé uniquement dans le canal de contournement 96 alors que le liquide 90b contenu dans le réservoir 88 à une seconde température est circulé dans le canal de contournement 97 et dans la zone d'échange 95. Dans cette configuration, l'échantillon est donc très rapidement amené à la seconde température par échange thermique indirect avec le second liquide caloporteur 90b. Le rapport précis entre les pressions de chaque générateur dépend de la géométrie précise de la puce, des températures des liquides caloporteurs qui affectent leur viscosité et de la voie sélectionnée pour être circuler dans la zone d'échange. Les valeurs précises de ces pressions peuvent être déterminées expérimentalement par imagerie thermique de la face conductrice thermique de la puce qui permet d'imager la température des liquides circulants respectivement dans les voies 4, 5, 95, 96 et 97 à travers la couche conductrice thermique.

Pour cela, les valeurs de pression des générateurs doivent être ajustées pour chaque source de liquide

(chaque température) pouvant être circulée dans la zone d'échange (deux, dans le cas présent). Pour chaque source de liquide circulé, le bon équilibre de pression est atteint lorsque l'imagerie thermique fait apparaître que la totalité de la surface de la zone d'échange 95 est à la température voulue et que la voie de contournement 96 ou 97 est bien à la température du liquide qui doit passer dans celle-ci. Il est également possible de prédire ces pressions par une modélisation hydrodynamique en prenant en compte les paramètres géométriques et de dépendance de la viscosité du liquide caloporteur à la température.

Inversement, dans la seconde configuration, la pression du gaz délivré par le premier générateur 80 est plus élevée (dans les mêmes conditions qu'expliqué ci-dessus) que la pression du gaz délivré par le second générateur 81 si bien que le liquide 90b contenu dans le réservoir 88 à une seconde température est circulé uniquement dans le canal de contournement 97 alors que le liquide 89b contenu dans le réservoir 87 à une première température est circulé dans le canal de contournement 96 et dans la zone d'échange 95. Dans cette configuration, l'échantillon est donc très rapidement amené à la première température par échange thermique indirect avec le premier liquide caloporteur 89b.

5

10

15

20

25

À tout moment, du liquide caloporteur circule dans les canalisations notamment 91, 92, 96, 97, si bien que le changement de température dans la zone d'échange est rapide (inférieur à 5s), reproductible et la température de l'échantillon peut être contrôlée de manière précise, même lorsqu'on utilise de faibles débits de liquide caloporteur, par exemple des débits inférieurs ou égaux à 10 ml/min.

Un tel système peut être utilisé pour réaliser des réactions de PCR, mais également des observations sur des échantillons biologiques vivants. Avantageusement, l'utilisation d'un module thermoélectrique permet de contrôler la température de l'échantillon à des températures inférieures à la température ambiante.

Cette possibilité peut être utile pour étudier des phénomènes physiques, chimiques ou biologiques tels que la dynamique de polymérisation des microtubules au sein des cellules vivantes, qui nécessite de thermaliser les cellules à des températures inférieures à 5°C.

Selon une autre variante de réalisation, les canaux d'injection 63 peuvent se rejoindre en un unique canal avant les embranchements 69 (voir fig. 4) comme c'est le cas sur la figure 5. Le transport du liquide dans les puces microfluidiques étant laminaire (absence de turbulence), les liquides dans le canal unique 63 ne se

5

mélangent pas et conservent leurs températures respectives jusqu'aux embranchements 69 ou ils peuvent être séparés de nouveau entre le canal de contournement 68 et le canal 66 qui conduit le liquide à la zone de thermalisation 67

10

En règle générale, La hauteur de la zone de thermalisation 22 sera inférieure au millimètre, de préférence inférieur à 400  $\mu\text{m}$ , ce qui permet un coefficient de convection élevé et un temps de renouvellement faible du liquide caloporteur dans la puce pour de faibles débits d'injection dans la puce.

### Exemple2 :

15

Dans cet exemple correspondant à la figure 6, la puce micro fluidique 1 de contrôle de température comporte une cavité de forme sensiblement parallélépipédique dont la face supérieure correspondant à la zone de thermalisation 22 a une surface S de 1  $\text{cm}^2$  et une hauteur de 300  $\mu\text{m}$ . Elle comporte 5 ports 2, 3, 16, 17, 20 12 (comme sur la figure 1) et permet de commuter deux liquides caloporteurs 112 et 114 à températures différentes entre la zone d'échange thermique 22 et deux embranchements de circulation à l'aide de quatre vannes intégrées 23, 24, 25 et 26 comme montré sur les figures 1 à 3. Elle est réalisée en PDMS par moulage et collée sur une feuille d'aluminium de 300  $\mu\text{m}$

25

d'épaisseur à l'aide d'une colle photo-activable (par exemple la colle vendue sous la dénomination commerciale « loctite 3922 ») sur laquelle est mis en contact thermique le porte échantillon. La puce est alimentée par deux réservoirs 110 et 111 de liquide caloporteur respectivement 112 et 114 reliés chacun à une pompe volumétrique 116, 117 fournissant un débit de 10 ml/min quelle que soit la pression dans le circuit et un dispositif de thermalisation en ligne du liquide caloporteur comportant un corps en aluminium permettant un échange thermique important entre ce corps et le liquide, un élément de chauffe à effet joule en céramique en contact avec le corps (tel que ceux commercialisés par la société Thorlabs), une sonde de température miniature (telle que commercialisée par la société Radiospares sous la dénomination »PT100 » ) et une carte électronique de contrôle de température munie d'un système de contrôle PID permettant d'asservir la température du corps à l'aide de la sonde de température.

Les deux réservoirs 110 et 111 sont disposés respectivement en amont des pompes 116, 117 de manière à servir de réserve de liquide. Les niveaux des réservoirs peuvent être ajustés entre eux par un système de vases communicants. En outre, une vanne 118 de type « 3/2 » permet de rediriger le liquide

sortant de la puce par la canalisation 13 vers le réservoir 110 ou 111 alimentant le contenu de la zone de thermalisation 22, sous le contrôle d'un système de pilotage non représenté sur la figure, contrôlé par un ordinateur ordonnançant les différentes vannes selon le liquide et la durée souhaitée d'injection.

Pour réaliser une analyse de type PCR avec un système tel que décrit sur cette figure 6, on utilise de préférence une cartouche composée d'une chambre micro fluidique parallélépipédique de  $20 \mu\text{l}$ , ayant une surface de  $1 \text{ cm}^2$  et une hauteur de  $200 \mu\text{m}$ , par exemple moulée dans une pièce en polycarbonate collée (au niveau des micro canaux 11) sur une feuille d'aluminium de  $200 \mu\text{m}$  d'épaisseur : cette chambre est remplie du mélange réactif de PCR et de l'échantillon à analyser (voir pour plus de détails concernant la procédure décrite dans l'article de Houssin et al. cité ci-dessus). Cette cartouche est mise en pression contre la feuille d'aluminium de la puce de thermalisation pour réaliser un bon contact thermique. On peut également réaliser une analyse de type PCR en temps réel dans les mêmes conditions que dans l'article de Houssin et al. en plaçant sous la puce une chambre permettant de recevoir le réactif tout en mesurant la fluorescence. L'échantillon est tout d'abord thermalisé à  $95^\circ\text{C}$  pendant 30 s en faisant circuler le liquide caloporeur

5

10

15

20

25

thermalisé à 95°C par le contrôleur de température en ligne alors que le liquide caloporteur thermalisé à 65°C est redirigé vers l'embranchement de circulation. Pour ce faire, la vanne 24 positionnée sur l'embranchement de circulation de la source de liquide caloporteur à 95°C ainsi que la vanne 25 de transmission du liquide vers la zone d'échange en provenance de la source 111 à 65°C sont fermées. D'autre part, la vanne 26 positionnée sur l'embranchement de circulation de la source de liquide caloporteur à 65°C ainsi que la vanne 23 de transmission du liquide vers zone d'échange en provenance de la source à 95°C sont ouvertes. La vanne 118 de redirection du liquide sortant de la zone d'échange est positionnée de manière à rediriger le liquide sortant de la chambre vers la canalisation 120 et le réservoir 110 situé en amont du système de thermalisation à 95°C.

Ensuite, 40 cycles de variation de température entre 95°C et 65°C, avec une alternance de 5 s. sont réalisés de manière à amplifier l'ADN contenu dans l'échantillon par la réaction de PCR. Pour cela, l'état des vannes 23, 24, 25, 26 et 118 est inversé toute les 5 s.

Exemple 3 :

Dans cet exemple correspondant aux figures 7a à 7d, la puce micro fluidique 1 de contrôle de température comporte une cavité de même géométrie que l'exemple

2. Elle comporte 4 ports 2, 3, 16, 17 et permet de commuter deux liquides caloporeurs 112 et 114 à températures différentes entre la zone d'échange thermique 22 et deux embranchements de circulation à l'aide de quatre vannes intégrées 23, 24, 36 et 37. Elle est réalisée dans une pièce en polycarbonate formée d'un sandwich de 2 pièces en polycarbonate micro-usiné (par CNC), puis collées par fusion à chaud ou assisté par un solvant par les méthodes bien connue de la plasturgie ce qui permet de réaliser des canaux à l'intérieur de la pièce en polycarbonate évitant leur contact avec la couche en aluminium ce qui limite les échanges thermiques parasites avec la zone de thermalisation (22). A la surface de cette pièce en polycarbonate sur la cavité 202 est fixée (de préférence collée) une feuille d'aluminium 41 de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur par pressage qui permet de sceller la cavité et assurer l'échange thermique avec l'échantillon. Avantageusement, cette feuille d'aluminium ne recouvre pas de préférence toute la surface de la puce, mais uniquement la zone de thermalisation 22, (en débordant légèrement de celle-ci) afin de limiter les pertes thermiques par conduction le long de la feuille. Les vannes 24, 26, 36, 37 utilisées sont des vannes miniatures de type à montage sur embase fixées directement sur la puce afin d'éviter toute canalisation

hors de la puce. La puce est alimentée par deux réservoirs et deux pompes suivant un schéma identique à celui de l'exemple 2 à la différence près que la vanne 118 de l'exemple 2 est remplacé par une vanne 37 intégrée dans la puce et que les voies de recirculations 119 et 120 sont partiellement intégrées dans la puce, ce qui a l'avantage d'être moins encombrant, moins cher à réaliser, de limiter les déperditions de chaleur et d'augmenter la fiabilité du système par la diminution du nombre de connecteurs fluidiques.

En outre, une vanne 36 de type « 3/2 » qui remplace les vannes 23 et 25 de l'exemple 2 permet de commuter la source de liquide entrant dans la puce par les entrées 2 et 3 vers la zone de thermalisation 22, ce qui permet de minimiser la distance L par l'utilisation d'une unique vanne à encombrement réduit positionné au plus proche de l'orifice d'entrée du fluide 10. L'ensemble est contrôlé par un ordinateur ordonnançant les différentes vannes selon le liquide et la durée souhaitée d'injection.

Pour réaliser une analyse de type PCR avec un système tel que décrit sur cette figure 7, on utilise de préférence une cartouche telle que décrite dans l'exemple 2. L'échantillon est tout d'abord thermalisé à 95°C pendant 30 s en faisant circuler le liquide

caloporeur thermalisé à 95°C par le contrôleur de température en ligne alors que le liquide caloporeur thermalisé à 65°C est redirigé vers l'embranchement de circulation. Pour ce faire, la vanne 36 positionnée de manière à faire circuler le liquide en provenance de la source de liquide caloporeur à 95°C entrant par l'entrée 2, alors que la vanne 24 est en position fermée de manière à bloquer la recirculation du liquide à 95°C par sa voie de contournement. Dans le même temps, la vanne 26 est ouverte pour permettre la recirculation du liquide à 65°C par sa voie de contournement et la vanne 37 est positionnée de manière à ce que le liquide sortant de la zone de thermalisation 22 soit redirigé vers la canalisation 120 et le réservoir 110 situé en amont du système de thermalisation à 95°C.

Ensuite, 40 cycles de variation de température entre 95°C et 65°C, avec une alternance de 5 s. sont réalisés de manière à amplifier l'ADN contenu dans l'échantillon par la réaction de PCR. Pour cela, l'état des vannes 23, 24, 25, 26 et 118 sur la fig.6 (24, 26, 36, 37 sur la figure 7a) est inversé toute les 5 s.

Sur la figure 8a, sont représentés les résultats mesurés à l'aide d'une caméra thermique et exprimé en % du changement de température total : on constate que la température de l'échantillon a atteint 95% de la valeur de consigne de température après environ 1,5 s.

Après 40 cycles, le système selon l'invention est configuré de manière à faire circuler en continu le liquide caloporteur 114 à 65°C dans la zone de thermalisation 22, puis la température du liquide 114 de la source est progressivement augmentée (jusqu'à 5 85°C) de manière linéaire dans le temps afin de réaliser ce qui est couramment appelé par ceux qui sont familiers de ce type d'analyse, « une courbe de fusion », c'est-à-dire une courbe établissant la correspondance entre la température et le niveau de 10 fluorescence de l'échantillon. Cette courbe permet de vérifier la température d'hybridation de la séquence amplifiée, cette information étant utilisée comme contrôle qualité de la réaction de PCR. Le signal de 15 fluorescence obtenu est représenté sur la figure 8b où l'on voit clairement l'amplification progressive au cours du temps du signal de fluorescence, suivie par la courbe de fusion.

Le système selon le deuxième aspect de l'invention comporte, comme représenté schématiquement sur la 20 figure 9 un consommable ou puce échantillon micro fluidique permettant de réaliser des réactions de PCR en temps réel rapides. La puce échantillon peut contenir une ou plusieurs chambres (figure 11) dans 25 lesquelles sont réalisées les réactions de PCR en temps réel. Elle comporte deux parois 42 et 44 aux faces

extérieures parallèles, dont l'une 42 (face inférieure) est destinée à permettre de contrôler la température de l'échantillon et de son éventuel réactif placés dans la chambre de réaction 45 et l'autre 44 (face supérieure) est destinée à la mesure optique, notamment de fluorescence. Pour permettre un bon transfert de température entre le moyen de thermalisation 41 et l'échantillon et le réactif, il est préférable que l'une au moins des conditions suivantes (de préférence plusieurs et plus préférentiellement toutes) soit remplie :

1. le consommable soit maintenu au contact du moyen de thermalisation avec une pression supérieure ou égale à 5000 Pa (50 mBar), mais de préférence supérieure ou égale à 100000 Pa (1 Bar) (pression moyenne sur la surface de contact) et

2-que la chambre de réaction soit scellée de manière à pouvoir supporter une pression au moins égale à 50000 Pa (500 mBar), de préférence supérieure ou égale à 100000 Pa (1 bar) ou soit maintenue sous pression artificiellement (extérieur) avec un moyen de mise sous pression à une pression supérieure ou égale à 5000 Pa (50 mBar), de préférence supérieure ou égale à 50000 Pa (500 mBar). De cette manière, le transfert thermique entre l'échantillon et le moyen de

thermalisation peut se faire dans de bonnes conditions.

3-que la couche conductrice de chaleur entre le réactif et le moyen de thermalisation soit suffisamment conductrice c'est-à-dire supérieure ou égale à  $15 \text{ W.m}^{-1.\text{K}^{-1}}$  de préférence supérieure ou égale à  $100 \text{ W.m}^{-1.\text{K}^{-1}}$  et ne soit pas en un matériau inhibiteur de PCR, tel que par exemple l'aluminium ou ses dérivés.

4-que la paroi et la face supérieure de la puce échantillon destinée à permettre la mesure optique soit réalisée dans un matériau de conductivité thermique de préférence inférieure ou égale à  $1 \text{ W.m}^{-1.\text{K}^{-1}}$  et de préférence d'effusivité inférieure ou égale à  $1000 \text{ J.m}^{-2.\text{K}^{-1}.s^{-0,5}}$ , de préférence transparent dans les longueurs d'ondes visibles, de préférence supportant des températures supérieure ou égale à  $95^\circ\text{C}$  sans se déformer et n'étant pas de préférence un inhibiteur de PCR, qui pourra par exemple être une matière plastique choisie parmi les polycarbonates et/ ou les polymères et/ou copolymères cycliques d'oléfines COP (Cyclic Polymer Olefin en anglais), COC (Cyclic Olefin Copolymer en anglais) et leurs dérivés. Tous ces matériaux sont bien connus de l'homme du métier de la micro fluidique.(voir par exemple l'article de K. Jena et al. Intitulé : »cyclic olefin copolymer based microfluidic devices for biochips applications :... »)

5. Que la couche conductrice de chaleur entre le réactif et le moyen de thermalisation soit suffisamment fine ( $\leq 500 \mu\text{m}$ , de préférence  $\leq 300 \mu\text{m}$ ) pour que sa surface puisse se conformer à la surface du moyen de thermalisation sous l'effet de la pression présente notamment dans la chambre de thermalisation.

Avantageusement, le moyen de thermalisation 1 peut utiliser un liquide caloporteur permettant un transfert de température rapide (inférieur ou égal à 5 s.) comme décrit notamment selon le premier aspect de l'invention.

Le moyen de mise sous pression 213 de la puce sur le moyen de thermalisation 1 peut être composé par exemple d'une pièce transparente en verre (293) qui est pressée sur la puce à l'aide de ressorts s'appuyant sur un cadre (294, 295, 296) et permettant d'appliquer une pression suffisante sur la puce (voir figure 10). Un mécanisme de glissières (non représenté) est par exemple prévu pour soulever le cadre et ainsi donner accès à l'espace prévu pour la puce afin de la placer avant la mise en œuvre de la réaction ou après sa mise en œuvre.

Mais le moyen de mise sous pression peut également être un cadre maintenant une pression sur le pourtour

de la puce (si celle-ci est suffisamment rigide) pour éviter sa déformation sous l'effet de la pression présente dans les chambres de réaction.

5 La puce échantillon peut comporter une chambre 45 unique (figure 11 a) : dans ce mode de mise en œuvre, la mesure optique à l'aide des moyens 210 et de la source lumineuse 211 peut être réalisée avec un simple capteur de type diode à avalanche sur lequel est refocalisée la lumière émise par la chambre 45. Cette configuration a l'avantage de permettre une mesure avec une sensibilité égale sur toute la surface de la chambre, le signal engendré par le capteur étant proportionnel à l'augmentation de la fluorescence dans la chambre, même si la répartition de la fluorescence dans la chambre ne l'est pas, ce qui peut être le cas lorsqu'un faible nombre de copies d'ADN cible est présent initialement. Une caméra peut également être utilisé comme capteur, ce qui permet de mesurer l'homogénéité de la fluorescence dans la chambre à des fins de mise au point ou pour contrôler l'homogénéité de la réaction sur la surface de la chambre. Dans ce cas, le capteur utilisé sera avantageusement de technologie sCMOS, qui permet d'obtenir une sensibilité importante et un faible rapport signal sur bruit pour des temps d'exposition faible, afin de pouvoir suivre si nécessaire en temps réel le signal de fluorescence.

10

15

20

25

L'introduction de l'échantillon et du réactif dans la chambre de réaction 45 est réalisée via les ouvertures 47 ici représentées dans la paroi supérieure transparente 44 : mais l'une au moins de ces ouvertures peut être réalisée au travers des parois latérales 43 de la puce échantillon qui peut être de forme parallélépipédique rectangle ou carré ou cylindrique. Après introduction de l'échantillon, les ouvertures 47 sont de préférence fermées avec un adhésif de scellement.

Sur la figure 10 sont représentés schématiquement l'appareil et la puce constituant le système selon le deuxième aspect de l'invention et décrit dans l'exemple 4 ci-dessous.

La puce échantillon de la figure 11 b comporte quatre chambres (ou plus si nécessaire), chaque chambre pouvant contenir notamment un réactif de PCR différent, les différentes conditions de test dans les différentes chambres pouvant être comparées dans les mêmes conditions de température. La détection peut dans ce cas être réalisée avec une matrice de capteurs ayant la même organisation spatiale que les chambres et sur lesquels sont refocalisés l'image des chambres (quatre capteurs sur la fig. 11b) ou sur un capteur de caméra comme décrit précédemment.

La fig. 11c représente un autre mode de mise en œuvre

avec une chambre unique pour réaliser une PCR sur des gouttes d'échantillon pour réaliser une PCR dite « digital ». Une caméra est alors utilisée pour filmer la réaction dans les gouttes.

5 Sur toutes les figures lia à 11c, les zones noires indiquent la présence de fluorescence, indicateur d'une réaction de PCR positive.

10 Les exemples de réalisation suivants permettent d'illustrer en particulier le deuxième aspect de l'invention décrit ci-dessus :

#### Exemple 4

Dans ce quatrième exemple, le moyen de contrôle de la température des échantillons contenus dans la puce échantillon micro fluidique est une puce de thermalisation micro fluidique dans laquelle on fait circuler alternativement deux liquides caloporteurs ayant deux températures différentes (typiquement 65°C et 95°C) comme décrit ci-dessus et de la manière représentée sur la figure 4a.

15 20 Sur la figure 10, la puce échantillon 289 comporte par exemple, une chambre unique 45 qui peut être remplie à l'aide de deux ouvertures (un port d'entrée 290 de l'échantillon et des réactifs et un port d'évacuation de l'air 291 -ou vice-versa - voir fig. 3b, 3c et 7d) à l'aide 25 par exemple d'une pipette. Elle est composée d'un film

en aluminium 41 de 200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur pour sa paroi inférieure et sa face inférieure conductrice de chaleur et d'une pièce 44 transparente en polycarbonate dans laquelle sont percés les ports 290 et 291 (47 sur la fig. 3c) permettant le remplissage.

5

Après remplissage, les ouvertures 290, 291 de la puce échantillon sont scellées avec un adhésif silicone/polyester afin de pouvoir maintenir une pression en son sein. La puce échantillon est alors installée (fig. 10) dans un logement délimité latéralement par un cadre de calage 48 au-dessus de l'interface de thermalisation 41 (film métallique) disposé au-dessus de la puce de thermalisation 1 selon le premier aspect de l'invention et comme décrit en regard de la fig. 3c. Un système à levier (non représenté) permet à titre d'exemple d'abaisser un cadre 296 sur lequel est fixée une pièce en verre 293 montée sur 4 ressorts 294, 295 qui va appliquer une pression contrôlée et uniformément répartie de 20 N sur la surface de la puce échantillon 289 une fois le système armé (équivalent à 100000 Pa (1 bar)). Une couche mince 292 d'élastomère transparent (dite couche molle) est fixée sous la pièce en verre 293 afin d'homogénéiser la pression sur la surface de la puce et d'éviter le décollement de l'adhésif de scellement dans

10

15

20

25

les ouvertures 290 et 291.

Un détecteur optique est monté sur le cadre 296, comprenant

- Une diode LED 297 décalée sur la droite de la figure dont la longueur d'onde est adaptée à la longueur d'onde d'excitation de fluorescence de l'intercalant Cybergreen communément utilisé (et ajouté dans l'échantillon) pour la mesure des PCR en temps réel. Cette LED 297 pointe sur la chambre de réaction 45 de la puce.

- Une lentille 298 permettant de collimater la lumière émise par la LED et de produire une excitation homogène sur toute la surface de la chambre 45.

- Un filtre d'excitation 299 permettant de restreindre à la valeur souhaitée le spectre de la lumière émise par la LED.

- Un capteur optique 300 placé au-dessus de la chambre 45, de forme carrée de type MPPC (de la société Hamamatsu) de 3x3 mm sur lequel est focalisée l'image de la chambre à l'aide de deux lentilles plan-convexes 301 et 302, positionnées de manière à ce que l'image projetée de la chambre ne déborde pas de la surface du capteur 300.

- Un filtre d'émission 303 adapté à la mesure de

la fluorescence de l'intercalant Cybergreen et compatible avec le spectre de lumière délivré par le filtre d'excitation 299, ce filtre d'émission 303 étant positionné entre les deux lentilles 301 et 302.

5 Un système d'acquisition de données (non représenté sur la figure) permet de mesurer en temps réel le signal de fluorescence délivré par le capteur 300. Le système est mis en œuvre de manière à réaliser 40 cycles de température avec une alternance de 5 s. pour  
10 amplifier l'ADN contenu dans l'échantillon par la réaction de PCR.

Après 40 cycles, le système est configuré de manière à progressivement augmenter la température de manière linéaire dans le temps. On réalise ainsi ce qu'on appelle  
15 dans le jargon de la PCR, « une courbe de fusion » (fig. 8), c'est-à-dire la correspondance entre la température et le niveau de fluorescence de l'échantillon. Cette courbe permet de vérifier la température d'hybridation de la séquence amplifiée, cette information étant  
20 utilisée par l'homme de métier pour contrôler la qualité de la réaction de PCR. Le signal de fluorescence obtenu est représenté sur la figure 8b.

Exemple 5 :

Cet exemple de réalisation est en tous points identique  
25 à l'exemple 4, la puce échantillon comportant quatre

chambres tandis que le capteur est remplacé par une matrice de capteurs 2x2 du même type.

### Exemple 6

Dans cet exemple, la puce comporte une seule chambre 45 et le capteur est une caméra sCMOS Hamamatsu C13770-50U permettant d'observer la chambre de PCR avec une résolution spatiale élevée. La PCR est réalisée dans des microgouttes de 10 nL de réactifs baignant dans de l'huile Fluorinert FC-40 (Sigma-aldrich) qui sont réalisées avec un dispositif micro fluidique adéquat (par exemple le Droplet Generator Pack de la marque Elveflow) et sont injectées dans la chambre 45. L'amplification dans chaque goutte peut être observée en temps réel par la caméra. Les résultats obtenus sont semblables à ceux obtenus sur la fig. 8.

Ces différents exemples permettent de constater que la pression appliquée simultanément sur la puce et dans la puce (passivement par la pression naturellement induite par l'augmentation de la température du réactif ou activement par la mise sous pression du réactif) permet un bon contact thermique entre la feuille d'aluminium de la puce contenant l'échantillon et la feuille d'aluminium de la puce de thermalisation. Grâce notamment à ce bon contact, il est possible de réaliser des PCR rapides.

## REVENDICATIONS

1 - Puce micro fluidique de thermalisation à cycles de température variable, constituée d'un bloc de matériau dans lequel sont disposées successivement :

- 5 - une zone d'injection de fluide (201) comportant au moins un canal micro fluidique d'injection de fluide (4, 5),
- une cavité (202) de forme parallélépipédique ayant une face supérieure comprenant une zone d'échange thermique (204) munie d'une zone de thermalisation (22) de surface S au niveau de la face supérieure de la cavité (202), la zone de thermalisation (22) comprenant au moins un canal micro-fluidique (11) de circulation de fluide, cette cavité (202) étant munie d'au moins un orifice d'entrée de fluide (10) issu de la zone d'injection de fluide (201) et d'au moins un orifice de sortie de fluide (30), entre lesquels s'étend la zone d'échange thermique (204) caractérisée en ce qu'elle comporte de préférence un seul orifice d'entrée de fluide (10) , de préférence un seul orifice de sortie de fluide (30), et en outre au moins un canal micro fluidique (6, 7) de contournement de la cavité (202), relié par une première extrémité à l'un au moins des canaux micro fluidiques d'injection de fluide (4, 5), l'embranchement (8, 9) du canal de contournement (6, 7) sur le canal d'injection de fluide (4, 5) étant situé à

une distance L de l'orifice d'entrée de fluide (10) de la cavité, la distance L entre chaque embranchement (8, 9) et l'orifice d'entrée de fluide étant telle que :

$$L < S/a$$

5 S étant la surface de la zone de thermalisation (22) de la face supérieure de la cavité (202) exprimée en  $m^2$

a étant un coefficient de correction égal à 0,005 m.

2-Puce micro fluidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que  $L < 0,02$  m.

10 3-Puce selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que chaque canal d'injection de fluide (4, 5) est relié à au moins un canal de contournement (6, 7).

15 4-Puce selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins deux canaux micro fluidiques d'injection du fluide (4, 5).

20 5-Puce selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte le même nombre, de préférence deux, de canaux d'injection (4, 5) et de canaux de contournement (6, 7), chaque canal de contournement étant relié à un seul canal d'injection.

25 6-Puce selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la cavité comporte en outre une zone d'homogénéisation d'entrée (203) située entre l'orifice d'entrée (10) et l'entrée de fluide (10 bis) dans les canaux micro fluidiques (11) de circulation de fluide

correspondant à la zone d'échange thermique (204) de manière à homogénéiser notamment la température du fluide avant son injection dans les canaux de circulation de fluide (11).

5 7-Puce selon la revendication 6, caractérisée en ce que la zone d'homogénéisation d'entrée (203) comporte un arbre d'homogénéisation créant une pluralité de chemins d'écoulement pour le fluide entre l'orifice d'entrée (10) et l'entrée de fluide (10 bis), ces chemins étant sensiblement de même longueur.

10 8-Puce selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la puce est constituée par un bloc de matériau parallélépipédique dont la cavité (202) est fermée par une plaquette supérieure (41), solidaire ou indépendante des parois latérales de la cavité (202) cette plaquette (41) ayant une face supérieure destinée à être en contact avec l'échantillon et ayant de préférence une épaisseur inférieure à 0,002m.

15 20 9-Puce selon la revendication 8, caractérisée en ce que la plaquette supérieure (41) est en verre et/ou en métal.

25 10-Puce selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la cavité comporte en outre une zone d'homogénéisation de sortie (205) située entre la sortie de fluide (30 bis) des canaux micro fluidiques

(11) et l'orifice de sortie de fluide (30) de la cavité (202), de manière à homogénéiser notamment la température du fluide avant son injection dans l'orifice de sortie (30) de fluide.

5 11- Puce selon la revendication 10, caractérisée en ce que la zone d'homogénéisation de sortie (205) comporte un arbre d'homogénéisation créant une pluralité de chemins d'écoulement pour le fluide entre la sortie de fluide (30 bis) des canaux micro fluidiques 10 (11) et l'orifice de sortie de fluide de la cavité (30), ces chemins étant sensiblement de même longueur.

12- Puce selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'épaisseur de la cavité (202) parallélépipédique est inférieure à 0,001 m, de préférence inférieure ou égale à 500 micromètres.

15 13- Puce selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une vanne disposée dans au moins un de ses canaux d'injection et ou de contournement.

20 14- Puce selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'au moins une vanne est à commande pneumatique.

15- Système micro fluidique caractérisé en ce qu'il comporte une puce selon l'une des revendications précédentes, un premier film conducteur thermique disposé au-dessus de la cavité et un porte échantillon 25 destiné à recevoir l'échantillon d'ADN à analyser

16-Système selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comporte un film de matériau conducteur de la chaleur disposé au moins partiellement sur la surface plane de la puce et maintenu sur celle-ci de manière à assurer l'étanchéité au niveau du liquide caloporteur au contact du film.

17-Système selon l'une des revendications 15 ou 16, caractérisé en ce que le porte échantillon comporte un second film de matériau conducteur de la chaleur dans sa partie inférieure, au contact du premier film.

18-Système selon l'une des revendications 15 à 17, caractérisé en ce qu'il comporte également des moyens pour faire circuler au moins un liquide caloporteur sous pression dans les canaux.

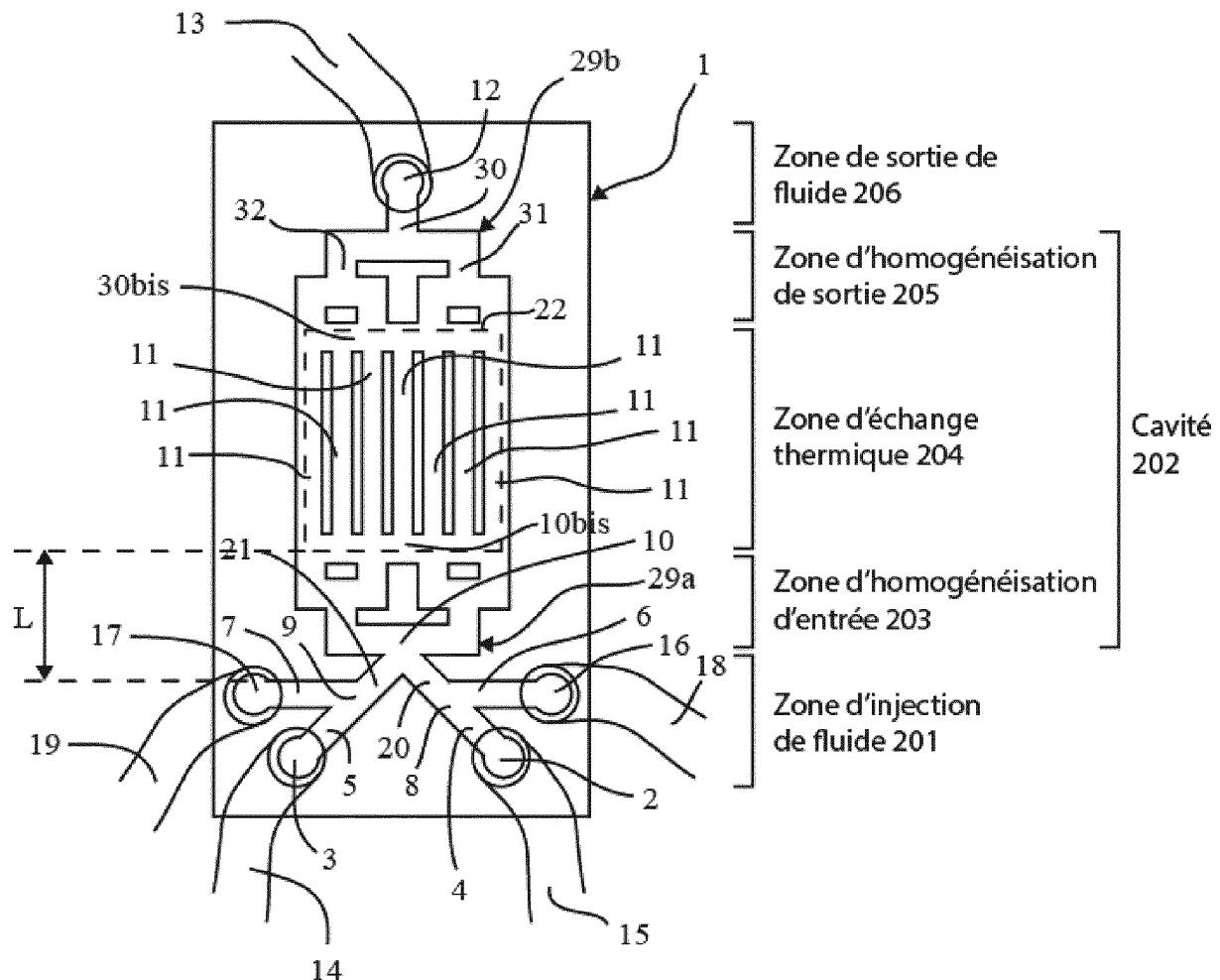
19-Système selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comporte des moyens pour faire circuler une pluralité, de préférence deux liquides caloporteurs à différentes températures dans les canaux d'injection et les canaux de contournement et alimenter alternativement la cavité avec l'un de ces liquides tandis que les autres liquides caloporteurs, de préférence un seul, circulent dans les canaux d'injection jusqu'à l'embranchement puis dans les canaux de contournement associés.

20-Système selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'alimentation alternative de la cavité par

différents liquides caloporteurs s'effectue en faisant varier les pressions respectives des liquides caloporteurs.

21-Système selon l'une des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce que l'alimentation alternative de la cavité par différents liquides caloporteurs s'effectue à l'aide de vannes disposées dans les différentes canalisations.

22-Procédé pour réaliser une réaction de type PCR dans lequel on utilise une puce et/ou un système selon l'une des revendications 1 à 21 et dans lequel on place un échantillon d'ADN alternativement en contact thermique indirect avec au moins un premier et un second liquides caloporteurs à températures différentes circulant dans des canaux micro fluidiques et alimentant alternativement une cavité permettant un échange thermique avec l'échantillon, caractérisé en ce que lorsque l'un des liquides est envoyé vers la cavité, l'autre liquide contourne la cavité et vice-versa, les deux liquides pénétrant alternativement dans la cavité par une canalisation d'alimentation possédant un embranchement permettant au liquide d'aller soit dans la cavité, soit de contourner la cavité, la distance entre l'embranchement et l'entrée de la cavité étant inférieure à 0,02 mètre.



**Figure 1**

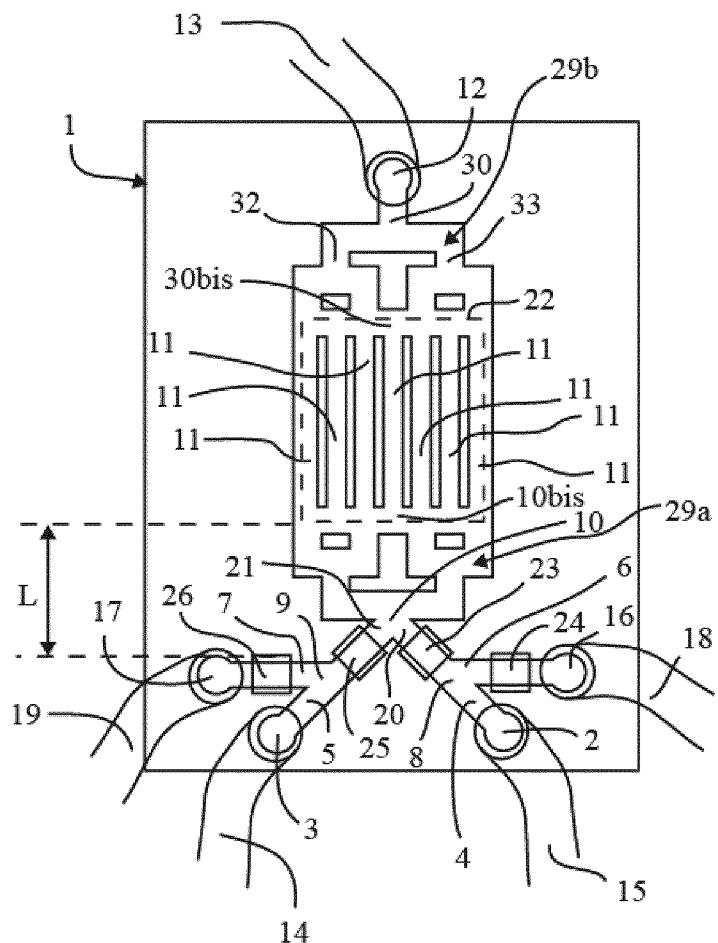
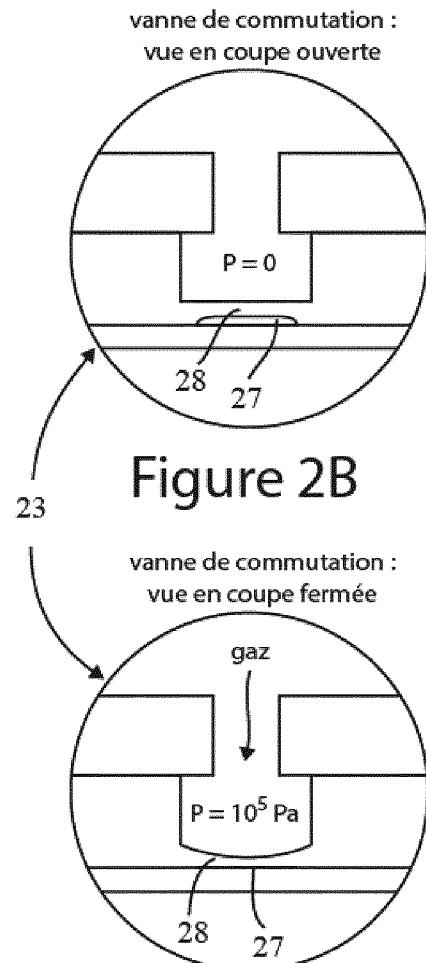
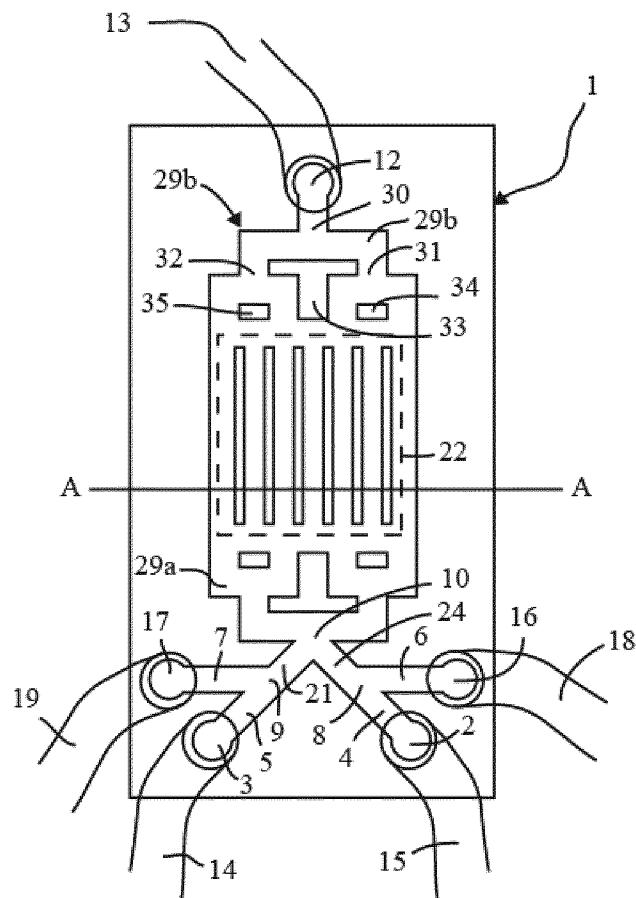
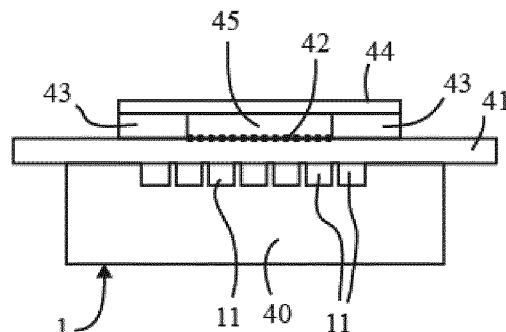


Figure 2A

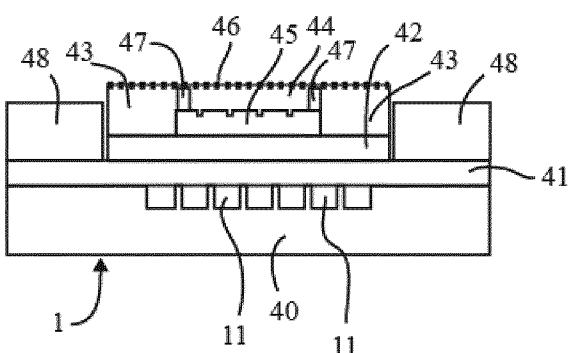




**Figure 3A**



**Figure 3B**



**Figure 3C**

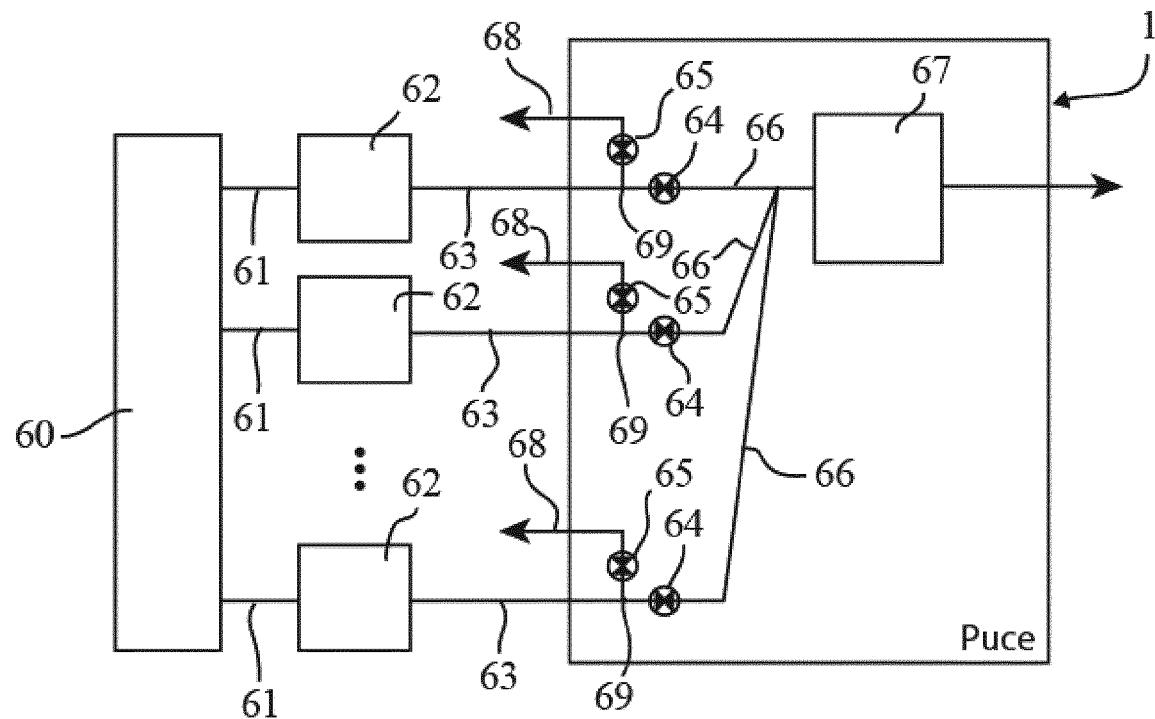


Figure 4A

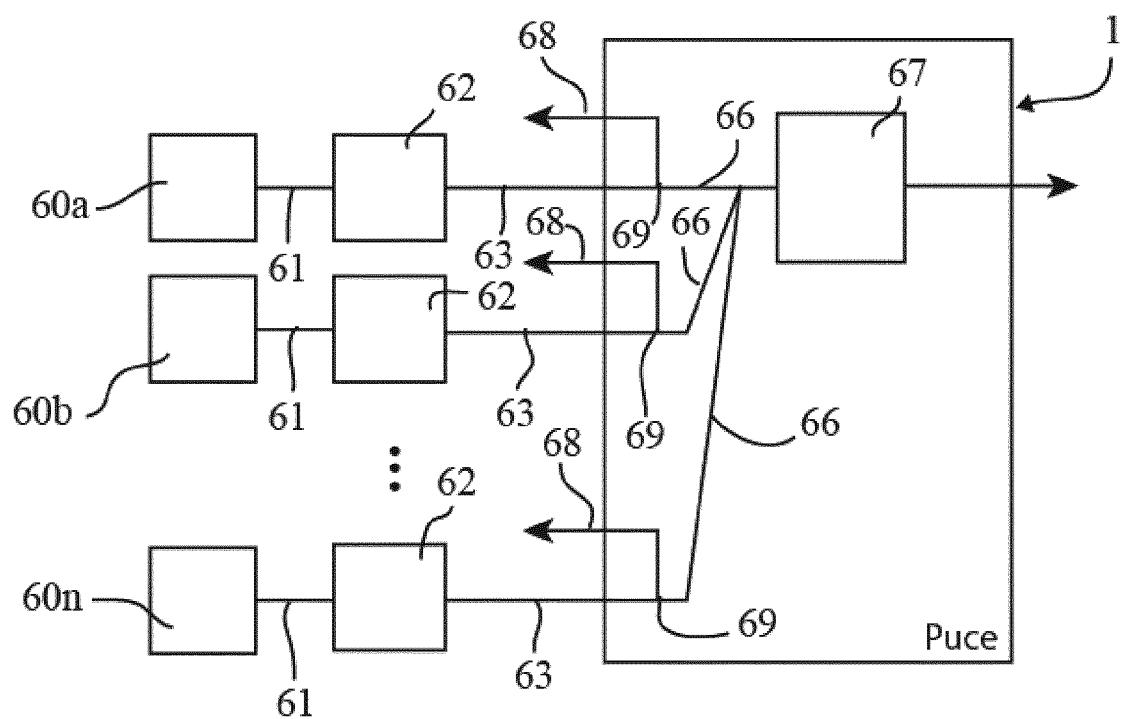


Figure 4B

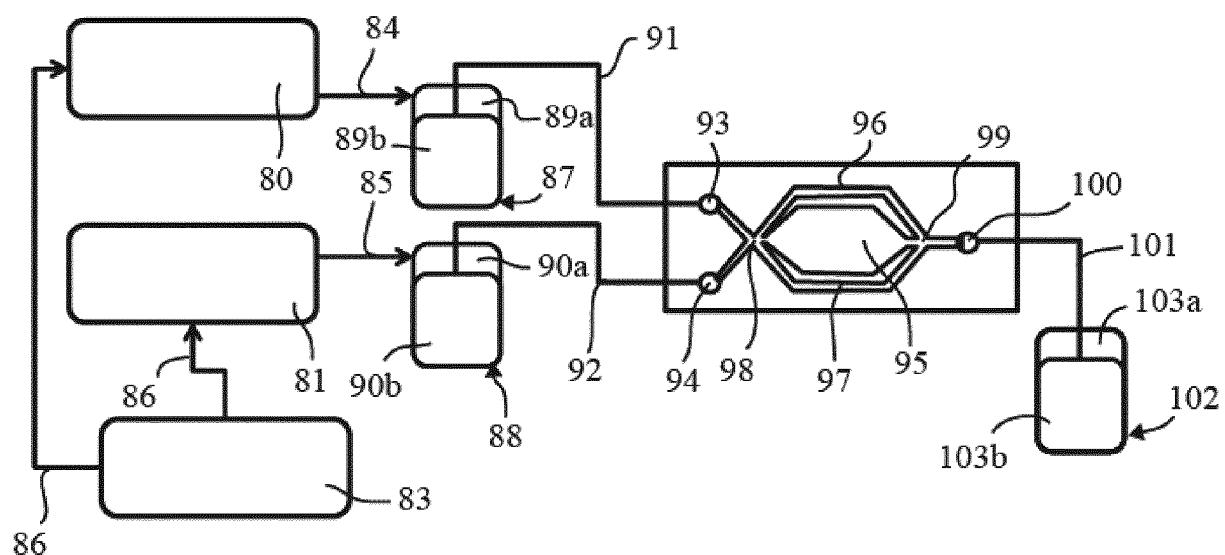


Figure 5

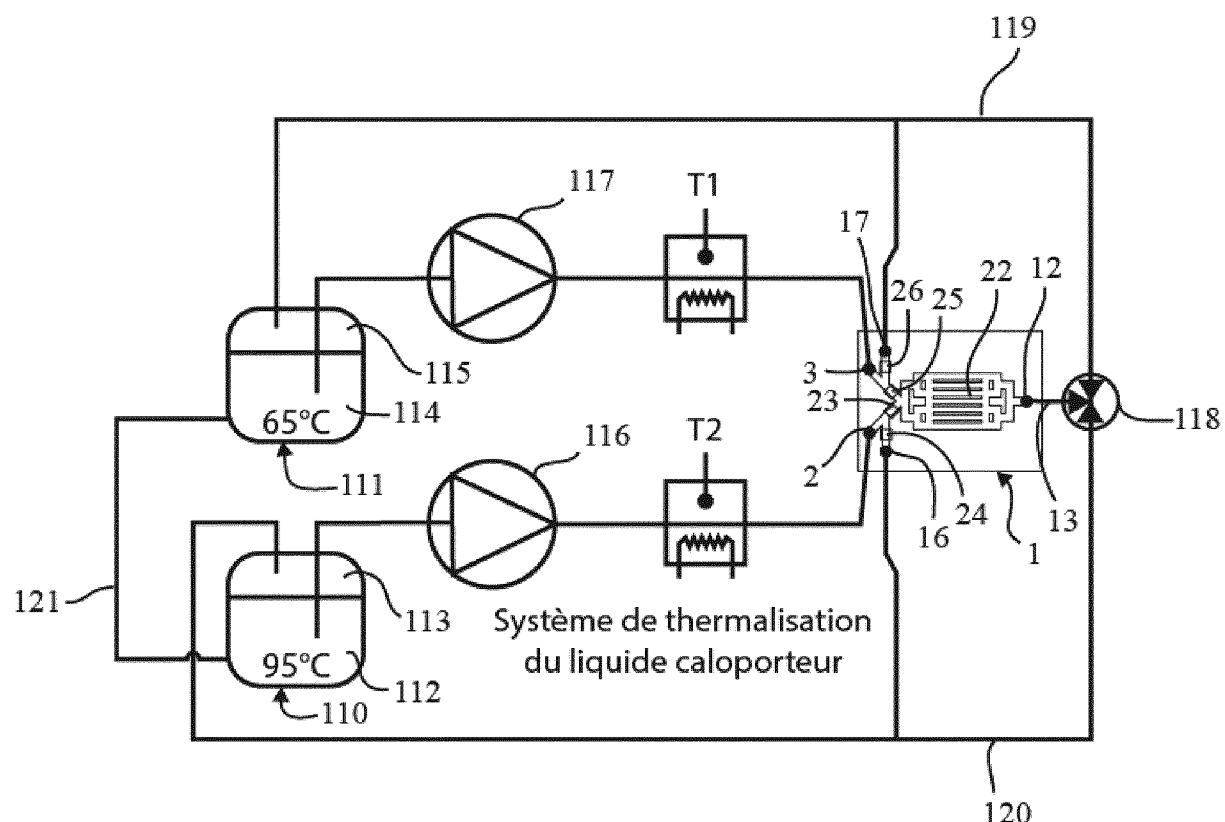


Figure 6

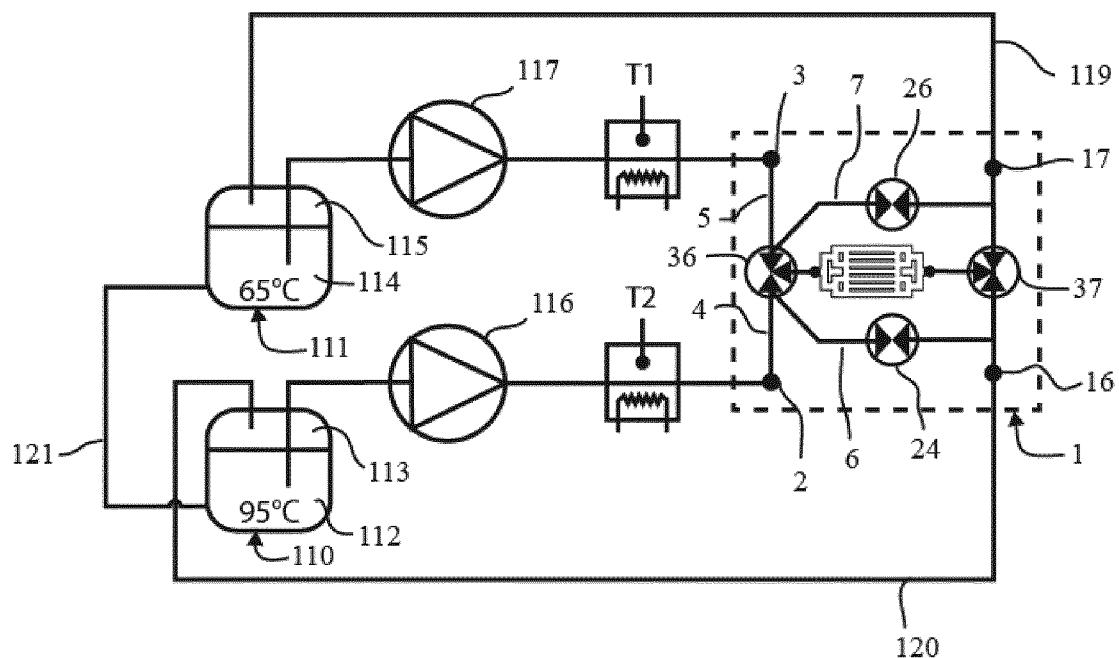


Figure 7a

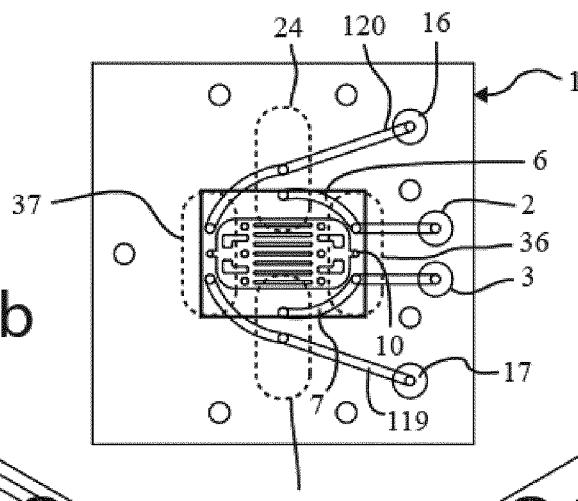


Figure 7b

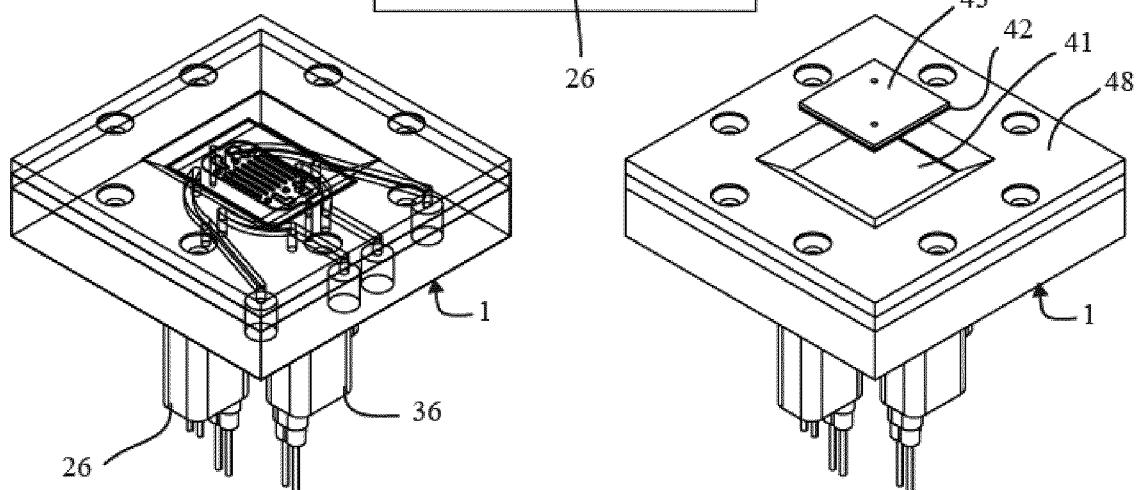


Figure 7c

Figure 7d

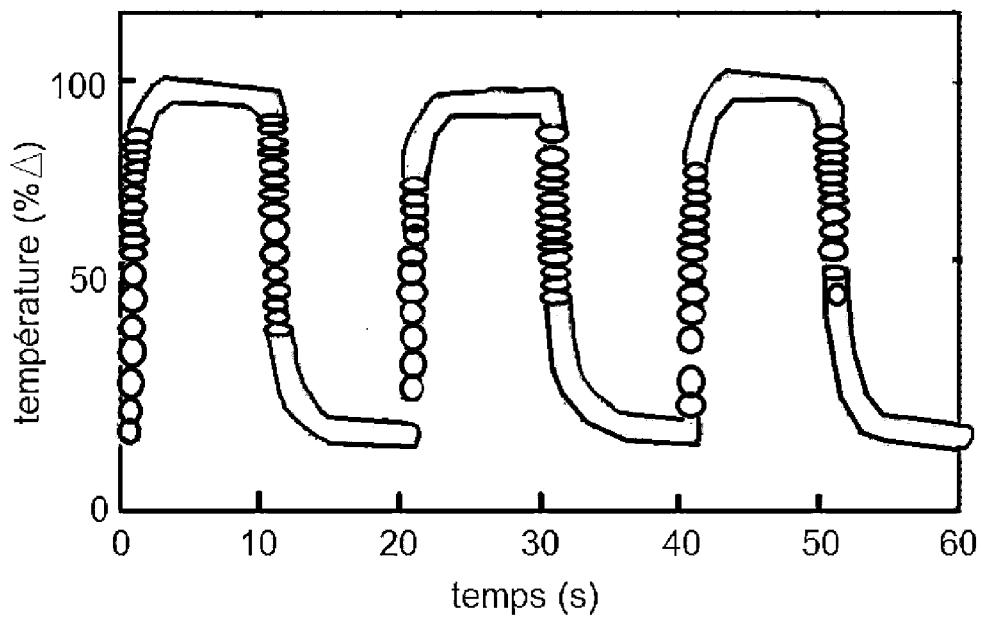


Figure 8a

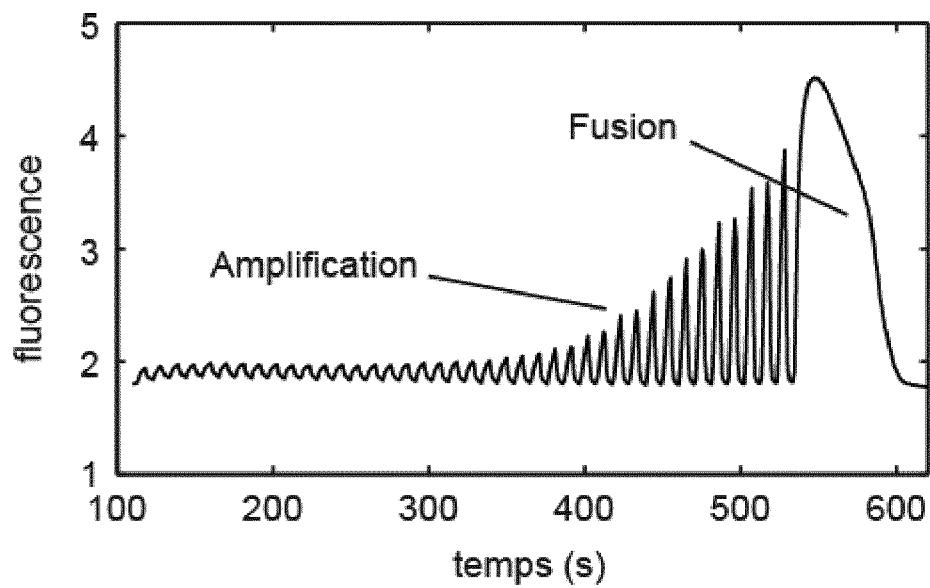


Figure 8b

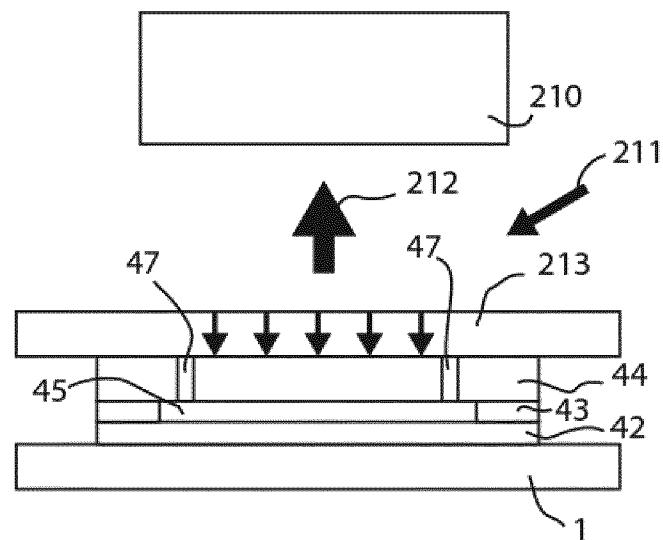
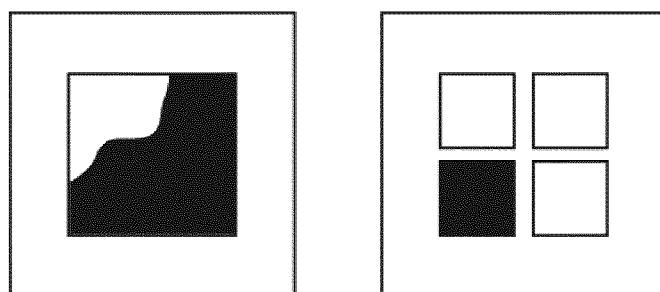


Figure 9



11a

11b

11c

Figure 11

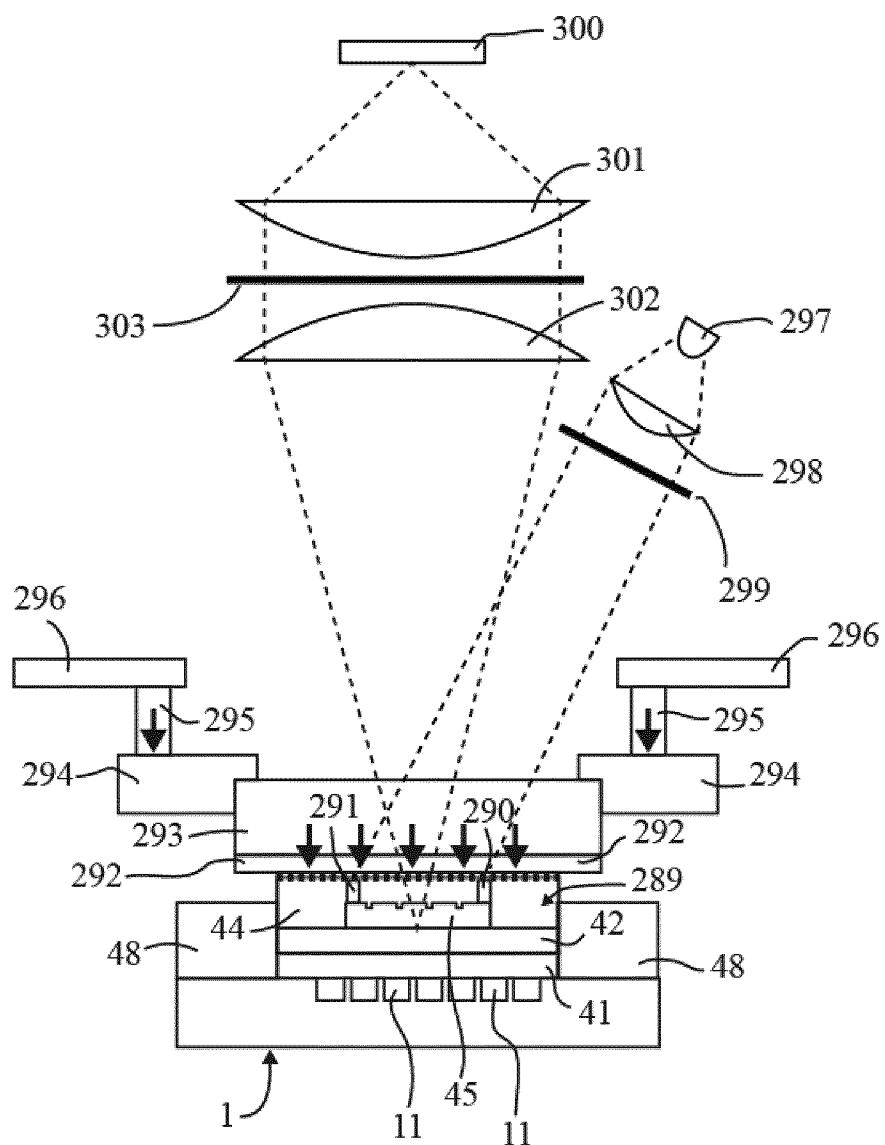


Figure 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/082898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. B01L3/00 B01L7/00  
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 F28D F28F

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal , 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	US 2006/188979 AI (SPAID MICHAEL A [US] ET AL) 24 August 2006 (2006-08-24)	1-21
A	paragraphs [0009] , [0010] figure 1 -----	22
X	WO 2011/138748 AI (CENTRE NAT RECH SCI ENT [FR] ; ECOLE NORMALE SUPERIEURE [FR] ; CHEN YONG) 10 November 2011 (2011-11-10)	1-21
A	page 11, line 0 - page 12, line 23 page 14, line 9 - line 13 page 15, line 13 - line 14 page 17, line 29 - page 18, line 5 page 19, line 3 - line 9 page 26, line 7 - line 10 page 27, line 10 - line 26 figures 1, 2, 4, 6, 7, 12 ----- -/- .	22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Spécial catégories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent 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
29 March 2018	06/04/2018

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

Authorized officer

Bi schoff, Laura

## **INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2017/082898

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TIMOTHÈE HOUSSIN ET AL: "Ultrasound, sensitive and large-volume on-chip real-time PCR for the molecular diagnosis of bacterial and viral infections", LAB ON A CHIP, vol. 16, no. 8, 25 February 2016 (2016-02-25), pages 1401-1411, XP055463521, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/C5LC01459J page 1403 - page 1404 figures 1a, 1b -----	1-21
A		22
A	US 5 508 197 A (HANSEN ANTHONY D A [US] ET AL) 16 April 1996 (1996-04-16) the whole document -----	1-22

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2017/082898

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006188979	A1 24-08-2006	None	
WO 2011138748	A1 10-11-2011	EP 2566621 A1 13-03-2013	
		FR 2959678 A1 11-11-2011	
		WO 2011138748 A1 10-11-2011	
US 5508197	A 16-04-1996	None	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/082898

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
INV. B01L3/00 B01L7/00

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 F28D F28F

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 , 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	US 2006/188979 AI (SPAID MICHAEL A [US] ET AL) 24 août 2006 (2006-08-24)	1-21
A	al i néas [0009] , [0010] f i gure 1 -----	22
X	WO 2011/138748 AI (CENTRE NAT RECH SCI ENT [FR] ; ECOLE NORMALE SUPERI EURE [FR] ; CHEN YONG) 10 novembre 2011 (2011-11-10)	1-21
A	page 11, ligne 0 - page 12, ligne 23 page 14, ligne 9 - ligne 13 page 15, 1ligne 13 - ligne 14 page 17, ligne 29 - page 18, ligne 5 page 19, 1ligne 3 - ligne 9 page 26, 1ligne 7 - ligne 10 page 27, 1ligne 10 - ligne 26 f i gures 1, 2, 4, 6, 7, 12 ----- -/- .	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

29 mars 2018

06/04/2018

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

Fonctionnaire autorisé

Bi schoff, Laura

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

## Demande internationale n°

PCT/EP2017/082898

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TIMOTHÉE HOUSSIN ET AL: "Ultrasound, sensitive and large-volume on-chip real-time PCR for the molecular diagnosis of bacterial and viral infections", LABORATORY CHIP, vol. 16, no. 8, 25 February 2016 (2016-02-25), pages 1401-1411, XP055463521, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/C5LC01459J page 1403 - page 1404 figures 1a, 1b ----- -----	1-21
A	----- -----	22
A	US 5 508 197 A (HANSEN ANTHONY D A [US] ET AL) 16 April 1996 (1996-04-16) Le document en entier -----	1-22

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/082898

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2006188979	A 1 24-08-2006	AUCUN	
WO 2011138748	A 1 10-11-2011	EP 2566621 A 1 FR 2959678 A 1 WO 2011138748 A 1	13-03-2013 11-11-2011 10-11-2011
US 5508197	A 16-04-1996	AUCUN	