

(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
24 septembre 2020 (24.09.2020)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/188198 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61N 1/40 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2020/050527

(22) Date de dépôt international :
12 mars 2020 (12.03.2020)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1902686 15 mars 2019 (15.03.2019) FR

(71) Déposants : **UNIVERSITE DE MONTPELLIER**
[FR/FR] ; 163, rue Auguste Broussonnet, 34090 MONT-
PELLIER (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RE-**

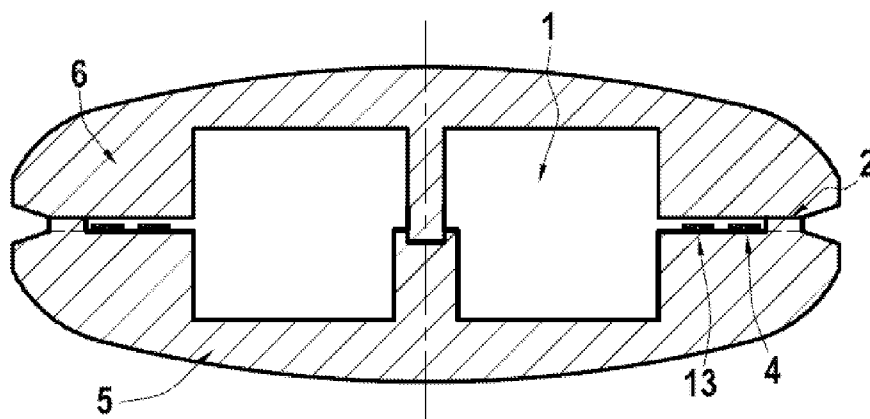
CHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR] ; 3 rue
Michel Ange, 75016 PARIS (FR). **ECOLE NATIONALE
SUPERIEURE DE CHIMIE DE MONTPELLIER**
[FR/FR] ; 240 avenue du Pr Emile Jeanbrau, CS60297,
34296 MONTPELLIER CEDEX 5 (FR).

(72) Inventeurs : **CHARLOT, Benoît** ; 4 rue rondelet, 34000
FR (FR). **RAMIREZ, Jean-Marie** ; 15 route de saint privat,
34700 USCLAS DU BOSQ (FR). **MEANCE, Sébastien**
; 210 rue Mathieu Laurens, 34000 MONTPELLIER (FR).
GARRIC, Xavier ; 35 rue des jonquilles, 34070 MONT-
PELLIER (FR). **PINESE, Coline** ; 127 rue de Marc Rigal,
B12, 34070 MONTPELLIER (FR). **GUIRAUD, Isabelle** ;
379 chemin du racas, 30560 SAINT HILAIRE DE BRETH-
MAS (FR).

(54) Title: MICROFLUIDIC CHIP FOR ATTRACTING AND DESTROYING A SPECIFIC BIOLOGICAL ELEMENT

(54) Titre : PUCE MICROFLUIDIQUE POUR ATTIRER ET DETRUIRE UN ELEMENT BIOLOGIQUE SPECIFIQUE

[Fig. 1]



(57) **Abstract:** The present invention relates to a microfluidic chip for attracting and destroying a specific biological element, said chip comprising: - a reservoir (1) consisting of a matrix comprising a chemoattractant compound capable of attracting the biological element; - at least one set of microchannels (2) arranged between the reservoir (1) and the external environment (3) of the chip and allowing the chemoattractant compound to move toward said medium and the biological element present in said medium to move in the direction of the reservoir (1); - at least one electrode (4) arranged between the reservoir (1) and the set of microchannels (2) or at the same location as the set of microchannels (2), said electrode (4) being capable of generating an electric field so as to destroy the biological element as it moves toward the reservoir (1).

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne une puce microfluidique pour attirer et détruire un élément biologique spécifique, ladite puce comprenant : - un réservoir (1) constitué d'une matrice comprenant un composé chimioattractant capable d'attirer l'élément biologique - au moins un réseau de microcanaux (2) disposé entre le réservoir (1) et le milieu extérieur (3) de la puce et permettant de laisser

[Suite sur la page suivante]



WO 2020/188198 A1

(74) **Mandataire : FLIJANE, Stéphanie** et al. ; CABINET
BEAU DE LOMENIE, Tour Méditerranée, 65 avenue Jules
Cantini, 13006 MARSEILLE (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, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, 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))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))

passer le composé chimioattractant vers ledit milieu et de laisser passer l'élément biologique présent dans ledit milieu en direction du réservoir (1) - au moins une électrode (4) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2) ou au même endroit que le réseau de microcanaux (2), ladite électrode (4) étant apte à générer un champ électrique de façon à détruire l'élément biologique lors de son passage vers le réservoir (1).

Description

Titre de l'invention : Puce microfluidique pour attirer et détruire un élément biologique spécifique

5 Domaine Technique

La présente demande concerne le domaine des dispositifs microfluidiques aptes à attirer et à détruire un élément biologique spécifique. Plus précisément, la présente demande concerne une puce microfluidique apte à attirer et à détruire *in vivo* un élément biologique spécifique, tel qu'une cellule procaryote ou eucaryote.

10 Technique antérieure

Chaque année en France environ 400 000 nouveaux cas de cancers sont identifiés avec environ 150 000 décès.

Il existe différents types de cancers en fonction du tissu dans lequel ils se développent. On peut ainsi distinguer les tumeurs solides qui se caractérisent par un amas localisé de cellules cancéreuses et les tumeurs des cellules sanguines, qui sont diffuses et dont les cellules cancéreuses circulent dans la moelle osseuse ou le sang. Les tumeurs des cellules sanguines aussi appelées cancers hématopoïétiques sont des cancers affectant le sang ou les organes lymphoïdes, tels que les leucémies et les lymphomes.

Pour ce qui est des tumeurs solides on distingue les carcinomes et les adénocarcinomes, cancers issus d'un tissu épithélial. On distingue également les sarcomes qui correspondent à des cellules cancéreuses apparaissant dans un tissu dit de support on parle alors d'ostéosarcome pour les os, de liposarcome pour la graisse ou encore de myosarcome pour les muscles.

Chez les hommes comme chez les femmes, les cancers solides représentent 90 % des cancers, avec les cancers de la prostate, du poumon et du colon-rectum représentant les trois cancers les plus fréquents chez les hommes et les cancers du sein, du colon-rectum et du poumon représentant les trois cancers les plus fréquents chez les femmes. Bien que la mortalité par cancer ait diminué de 1,5 % par an chez les hommes et de 1 % par an chez les femmes entre 1980 et 2012 (taux standardisés), il reste nécessaire de disposer de solutions efficaces pour traiter et prévenir ces tumeurs solides ainsi que leurs complications.

A ce jour, la chirurgie est l'un des traitements principaux d'une tumeur solide et correspond à la résection de la totalité de la tumeur lorsque cela est possible et éventuellement des tissus situés autour de la tumeur dite marge de résection. La chirurgie peut être utilisée en traitement unique lorsque la tumeur est très localisée, notamment lorsque la tumeur est à un stade précoce mais elle est souvent associée à d'autres traitements tels que la radiothérapie qui est aussi un traitement local et / ou à des traitements médicaux comme la chimiothérapie qui est un traitement systémique agissant potentiellement sur toutes les cellules cancéreuses du corps.

L'avantage de la chirurgie locale pour le traitement d'une tumeur solide est la possibilité de retirer la totalité de la tumeur lorsque cela est possible et de préserver les organes et les structures anatomiques non atteints par les cellules cancéreuses. Elle permet également de limiter les effets secondaires attribués au traitement par radiothérapie tels que les brûlures, ou la génération de cancers radio-induits, et à la chimiothérapie tels que les réactions cutanées, les nausées, vomissements, diarrhées, douleurs musculaires, fatigue, chute des cheveux ainsi que les cancers chimio-induits.

Afin de diminuer le taux de rechute la zone de résection inclut une zone de tissus sains présents autour de la tumeur, qui correspond à la marge de résection. A ce stade, plusieurs cas de figures doivent être considérés. Dans un premier cas de figure, les cellules tumorales de la tumeur primaire sont incluses dans la zone de résection et il n'y aura pas de récurrence. Dans un second cas de figure, certaines cellules tumorales sont localisées au delà de la zone de résection soit au niveau local soit à distance et alors une récurrence est envisageable soit localement ou à distance pour former des métastases, c'est-à-dire des colonies secondaires de cellules cancéreuses qui se propagent à distance de l'organe atteint par la tumeur initiale et qui sont à l'origine d'un cancer dit « métastatique » dans un organe autre que celui dans lequel se trouvait la tumeur solide.

Il est donc nécessaire de prévenir au mieux les risques de récurrence locale et de cancer métastatique après la résection d'une tumeur solide.

La chimiothérapie peut être utilisée après la chirurgie locale visant la résection de la tumeur, on parle de « chimiothérapie adjuvante » afin de prévenir la récurrence et / ou la formation d'un cancer métastatique. Cependant, tel qu'indiqué précédemment, de très nombreux effets secondaires sont engendrés par ce traitement médicamenteux. Parmi les effets secondaires les plus considérables liés à l'utilisation de la chimiothérapie on peut en particulier faire référence aux cancers chimio-induits qui par définition correspondent aux nouvelles tumeurs survenant chez des patients traités par des drogues cytotoxiques pour

une première tumeur maligne et causées par celles-ci, on peut également faire référence au risque de générer une résistance des cellules cancéreuses au traitement chimiothérapeutique limitant ainsi fortement les possibilités d'éliminer lesdites cellules.

Ainsi, il n'existe pas à ce jour de solution permettant d'éliminer efficacement les cellules cancéreuses restantes après la résection d'une tumeur solide afin de prévenir et / ou diminuer les risques de récurrence locale et / ou de développement de cancer métastatique, qui soit efficace et ne présente pas d'effets secondaires médicamenteux à court et moyen terme.

Pour répondre à ces besoins, la présente invention propose une puce microfluidique pour attirer et détruire un élément biologique spécifique et en particulier une cellule eucaryote telle qu'une cellule cancéreuse. Ladite puce étant particulièrement adaptée à être implantée *in vivo* au niveau de la zone de résection d'une tumeur solide afin d'attirer et détruire *in vivo* les cellules cancéreuses restantes.

Des dispositifs microfluidiques ont été décrits dans l'art antérieur pour leur utilisation dans le domaine du traitement du cancer. On peut notamment faire référence au document WO2018/089989 A1 qui décrit un dispositif *ex vivo* pour le traitement du cancer en soumettant un fluide biologique tel que le sang à rayonnement électromagnétique spécifique du type de cellule cancéreuse ciblée et apte à la détruire.

On peut également faire référence au document US2018111124 A1 qui décrit un dispositif microfluidique comprenant un ou plusieurs canaux microfluidiques et un ou plusieurs réseaux d'électrodes bipolaires sans fil permettant une capture à haut débit des cellules tumorales circulantes dans une solution ionique conductrice, en appliquant un champ électrique alternatif de 40 kHz à un échantillon biologique. Les cellules ainsi capturées peuvent être utilisées pour diagnostiquer un cancer ou évaluer l'effet d'un traitement anticancéreux.

Aucun document de l'art antérieur ne décrit ou ne suggère une puce microfluidique pour attirer et détruire, de préférence *in vivo*, une cellule cancéreuse après la résection d'une tumeur solide et ainsi prévenir et / ou diminuer les risques de récurrence locale et / ou de développement de cancer métastatique.

De façon plus générale, aucun document de l'art antérieur ne décrit ou ne suggère une puce microfluidique pour attirer et détruire de préférence *in vivo*, un élément biologique spécifique, ladite puce microfluidique comprenant un réservoir constitué d'une matrice

comprenant un composé chimioattractant capable d'attirer un élément biologique, au moins un réseau de microcanaux mettant en communication le réservoir et le milieu extérieur de la puce et au moins une électrode apte à générer un champ électrique pour détruire l'élément biologique.

5 Exposé de l'invention

La présente invention concerne une puce microfluidique pour attirer et détruire un élément biologique spécifique, ladite puce comprenant :

- un réservoir (1) constitué d'une matrice comprenant un composé chimioattractant capable d'attirer l'élément biologique
- 10 - au moins un réseau de microcanaux (2) disposé entre le réservoir (1) et le milieu extérieur (3) de la puce et permettant de laisser passer le composé chimioattractant vers ledit milieu et de laisser passer l'élément biologique présent dans ledit milieu en direction du réservoir (1)
- au moins une électrode (4) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux
15 (2) ou au même endroit que le réseau de microcanaux (2), ladite électrode (4) étant apte à générer un champ électrique de façon à détruire l'élément biologique lors de son passage vers le réservoir (1).

Brève description des figures

- 20 [Fig. 1] La figure 1 est une vue en coupe de la puce selon l'invention.
- [Fig. 2] La figure 2 représente la partie supérieure (6) de la puce vue du dessus.
- [Fig. 3] La figure 3 représente la partie inférieure (5) de la puce vue du dessus.
- [Fig. 4] La figure 4 représente une vue éclatée du dessous de la puce selon l'invention.
- [Fig. 5] La figure 5 représente une vue éclatée du dessus de la puce selon l'invention.
- 25 [Fig. 6] La figure 6 représente une vue en coupe de la puce selon l'invention à l'échelle 5 : 0,5 cm.
- [Fig. 7] La figure 7 représente une vue en coupe de la puce à l'échelle 5 : 1 cm.
- [Fig. 8] La figure 8 est une image par microscope inversé à fluorescence avec un objectif x5, au niveau des micro-canaux, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) (14) en l'absence de gradient.
- 30

[Fig. 9] La figure 9 est une image par microscope inversé à fluorescence avec un objectif x5, au niveau des micro-canaux, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) (14) attirées dans la puce à partir d'un gradient de sérum de veaux foetal (SVF) avec 1% SVF à l'extérieur de la puce et 10 µl de SVF pur à l'intérieur du réservoir.

- 5 [Fig. 10] La figure 10 est une image par microscope inversé à fluorescence avec un objectif x10, au niveau des micro-canaux, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) (14) en l'absence de gradient.

[Fig. 11] La figure 11 est une image par microscope inversé à fluorescence avec un objectif x5, au niveau du réservoir central de la puce, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) (14) en l'absence de gradient.

10

[Fig. 12] La figure 12 est une image par microscope inversé à fluorescence objectif x10, au niveau des micro-canaux, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) (14) attirées dans la puce à partir d'un gradient de sérum de veaux foetal (SVF) avec 1% SVF à l'extérieur de la puce et 10 µl de SVF pur à l'intérieur du réservoir.

- 15 [Fig. 13] La figure 13 est une image par microscope inversé à fluorescence objectif x5, au niveau du réservoir central de la puce, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) (14) attirées dans la puce à partir d'un gradient de sérum de veaux foetal (SVF) avec 1% SVF à l'extérieur de la puce et 10 µl de SVF pur à l'intérieur du réservoir.

[Fig. 14] La figure 14 est une image par microscope inversé à fluorescence objectif x 10, au niveau des micro-canaux, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) (14) attirées dans la puce à partir d'un gradient de chimioattractant SDF-1 (1 µg de chimioattractant SDF-1 présent dans le réservoir central de la puce).

20

[Fig. 15] La figure 15 est une image par microscope inversé à fluorescence objectif x 5, au niveau du réservoir central de la puce, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) (14) attirées dans la puce à partir d'un gradient de chimioattractant SDF-1 (1 µg de chimioattractant SDF-1 présent dans le réservoir central de la puce).

25

[Fig. 16] La figure 16 est une image par microscope inversé à fluorescence, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) sur une lame de verre contenant une électrode interdigitée, après 48h de culture dans un incubateur CO2 5% et humidité 95 %, en l'absence d'électroporation.

30

[Fig. 17] La figure 17 est une image par microscope inversé à fluorescence, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) sur une lame de verre contenant une

électrode interdigitée, détruites par électroporation par application d'un champ électrique par une électrode interdigitée de 5v 100µs 1 hertz à j0 et à j0+ 3heures.

[Fig. 18] La figure 18 est une image par microscope inversé à fluorescence, au niveau des micro-canaux, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) en l'absence de gradient et de champ électrique pulsé.

[Fig. 19] La figure 19 est une image par microscope inversé à fluorescence, au niveau des micro-canaux, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) attirées dans la puce à partir d'un gradient de SDF-1 (1 µg de chimioattractant SDF-1 présent dans le réservoir central de la puce) sans champ électrique pulsé.

[Fig. 20] La figure 20 est une image par microscope inversé à fluorescence, au niveau des micro-canaux, représentant les cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) attirées dans la puce à partir d'un gradient de SDF-1 (1 µg de chimioattractant SDF-1 présent dans le réservoir central de la puce) et d'un champ électrique pulsé de 5v 100 ms 1 hertz.

[Fig. 21] La figure 21 est un graphique présentant la libération de BSA-FITC (mimant le SDF-1) à partir d'une matrice d'alginate contenue dans une puce microfluidique selon l'invention sur une période de 50 jours.

[Fig. 22] La figure 22 est un graphique présentant la libération de SDF-1 à partir d'une matrice d'alginate sur une période de 50 jours.

Description détaillée

Les Demandeurs ont mis au point une puce microfluidique pour attirer et détruire un élément biologique, tel qu'une cellule procaryote ou eucaryote. Cette puce microfluidique est particulièrement intéressante pour attirer et détruire une cellule cancéreuse *in vivo* après la résection d'une tumeur solide afin de prévenir et / ou diminuer les risques de récurrence locale et / ou de développement de cancer métastatique.

Définitions

Une « puce microfluidique » est un dispositif comprenant un réseau de microcanaux, c'est-à-dire des canaux de taille micrométrique, gravés ou moulés dans un matériau, connectés entre eux et reliant l'intérieur de la puce à l'extérieur de la puce par des entrées et des sorties percées à travers la puce, pour réaliser une fonction voulue. La puce microfluidique

peut être obtenue par des procédés spécifiques tels que par déposition et électrodéposition, gravure, collage, moulage par injection, embossage, lithographie douce, soudure anodique, ou toutes autres technologies. Ces procédés de fabrication sont connus de l'Homme du métier. Dans le cadre de la présente invention, la fonction voulue de la puce microfluidique est de pouvoir attirer *in vivo* un élément biologique spécifique, de préférence une cellule eucaryote telle qu'une cellule cancéreuse, et de le détruire *in vivo*.

Le « réseau de microcanaux » correspond à une multitude de canaux, reliés à l'extérieur de la puce par des entrées et des sorties percées à travers la puce. Les microcanaux peuvent par exemple être fabriqués à partir d'un moule, ou directement dans le matériau de la puce microfluidique. Le nombre de microcanaux varie en fonction du diamètre de la puce, de la largeur des microcanaux ou encore de l'espacement entre lesdits microcanaux. A titre d'exemple, pour une puce d'un centimètre de diamètre avec des canaux de 10 μm de largeur, lesdits microcanaux peuvent être au nombre de 1500 environ.

Chaque microcanal composant le réseau de microcanaux correspond à un passage dont la hauteur peut être de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres avec une longueur de quelques centaines de micromètres jusqu'à quelques millimètres. La section transversale d'un microcanal peut en principe avoir n'importe quelle forme en deux dimensions, telle qu'un carré, un rectangle, un cercle ou une combinaison de ceux-ci. Un microcanal peut être droit ou courbé.

La largeur d'un microcanal correspond à la distance horizontale des deux points qui sont sur les bords opposés de la section transversale et qui sont les plus éloignés l'un de l'autre. La hauteur d'un microcanal correspond à la distance verticale des points situés sur les bords opposés de la section transversale et les plus éloignés les uns des autres. La longueur d'un microcanal est la distance entre les deux extrémités dudit canal, la longueur d'un microcanal correspond à la plus grande dimension. Les deux dimensions les plus courtes définissent généralement la section transversale susmentionnée.

Par « électrode » dans le cadre de la présente invention, on fait référence à tout élément capable de conduire un courant électrique et comprenant deux conducteurs séparés par un entrefer d'une distance comprise entre 1 μm à 1 mm. La présente demande fait référence à une électrode, au singulier pour des raisons de clarté, l'Homme du métier comprenant qu'une électrode est composée des deux dits conducteurs séparés par un entrefer pour que le courant puisse être conduit.

La puce microfluidique est de préférence « destinée à être implantée *in vivo* » c'est à dire que la puce microfluidique est destinée et apte à être implantée au sein d'un être vivant, de préférence un mammifère et en particulier un être humain. Plus particulièrement, cela signifie que la puce peut être implantée dans un être vivant sans interférer, ni dégrader les
5 tissus avec lesquels elle est en contact et que ladite puce est apte à fonctionner *in vivo* c'est-à-dire attirer et détruire un élément biologique spécifique *in vivo*, de préférence une cellule eucaryote telle qu'une cellule cancéreuse, et de le détruire *in vivo*.

Par « élément biologique » au sens de la présente invention on fait référence à tout élément comprenant de l'information génétique sous forme d'ARN ou d'ADN et susceptible de se
10 trouver au sein d'un organisme vivant c'est-à-dire *in vivo*, tels que les cellules procaryotes, les cellules eucaryotes et les microorganismes. Parmi les éléments biologiques envisageables on peut notamment faire référence à une cellule procaryote telle qu'une bactérie, à une cellule eucaryote telle qu'une cellule animale.

Par « élément biologique spécifique » ou « élément biologique cible » on fait référence à
15 l'élément biologique d'intérêt dans le cadre de l'utilisation de la puce c'est-à-dire l'élément biologique que l'on souhaite attirer et détruire *in vivo*. Le composé chimioattractant présent dans le réservoir étant choisi pour attirer l'élément biologique d'intérêt dans le cadre de l'utilisation de la puce microfluidique.

Par « au même endroit que le réseau de microcanaux » on fait référence au fait que
20 l'électrode est disposée au niveau du réseau de microcanaux, plus précisément sur ou sous le réseau de microcanaux. De préférence, l'électrode est disposée sur le réseau de microcanaux.

De préférence dans le cadre de l'invention, l'élément biologique d'intérêt est une cellule procaryote ou eucaryote, de préférence encore l'élément biologique d'intérêt est une cellule
25 eucaryote. De façon encore plus préférée, la cellule eucaryote est une cellule cancéreuse, de préférence une cellule cancéreuse métastatique.

Une « cellule cancéreuse » est une cellule dans laquelle une ou plusieurs lésions majeures de l'ADN se sont produites, transformant ainsi la cellule normale en cellule cancéreuse apte à proliférer pour former un groupe de cellules transformées identiques c'est-à-dire une
30 tumeur. On fait notamment référence à une cellule cancéreuse lorsque la cellule considérée présente un certain nombre de caractéristiques telles qu'une indépendance vis-à-vis des signaux de régulation de la croissance cellulaire, une capacité à échapper au processus de mort cellulaire programmée ainsi qu'une capacité à se diviser indéfiniment.

Plus particulièrement dans le cadre de la présente invention, on fait référence par « cellule cancéreuse » à une cellule issue d'une tumeur solide dite initiale ou d'origine ou primaire, présente au niveau ou à proximité de la zone de résection de la tumeur solide.

De préférence dans le cadre de la présente invention, on fait également référence par
5 « cellule cancéreuse » à une « cellule cancéreuse métastatique » c'est à dire une cellule cancéreuse, capable de ou ayant migré à travers le corps par la voie des vaisseaux sanguins ou lymphatiques à partir de la tumeur d'origine et capable de ou ayant colonisé un ou plusieurs autres tissus à proximité ou à distance de ladite tumeur formant ainsi des métastases, à l'origine de « cancers métastatiques » ou encore « tumeurs métastatiques ».

10 Dans ce cadre, la cellule cancéreuse est une cellule issue d'une tumeur solide dite secondaire ou tertiaire qui correspondent à des tumeurs métastatiques dans un second ou troisième tissu ou organe autre que celui de la tumeur initiale.

Il est fait référence à « élément biologique spécifique », « une cellule procaryote », « une cellule eucaryote », « une cellule cancéreuse », « une cellule métastatique » au singulier
15 pour des raisons de clarté, étant entendu que la puce microfluidique selon la présente invention est apte à attirer et détruire *in vivo* plusieurs desdits éléments et cellules. Il est également bon de noter que la puce microfluidique selon la présente invention est apte à attirer et détruire *in vivo* plusieurs éléments biologiques spécifiques qui peuvent être de nature différente, lesdits éléments étant attirés au sein de la puce par le choix spécifique du
20 ou des composés chimioattractants présents dans le réservoir.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « prévenir » désigne une réduction du risque d'acquisition d'une maladie ou d'un trouble spécifié, la réduction ou le ralentissement de l'apparition des symptômes de cette maladie. Par exemple dans le cadre de la présente invention, le terme « prévenir » peut correspondre à la réduction du risque de propagation
25 d'une infection lorsque l'élément biologique est une cellule procaryote ou à la réduction du risque de récurrence locale du cancer et / ou du risque d'apparition de métastases, plus précisément de cancers métastatiques lorsque l'élément biologique est une cellule eucaryote de type cancéreuse.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « traiter » désigne une amélioration ou
30 l'inversion d'une maladie ou d'un trouble spécifié ou d'au moins un symptôme discernable. Le terme « traiter » peut aussi désigner la réduction ou le ralentissement de la progression de la maladie ou du trouble, ou de l'apparition des symptômes de cette maladie ou trouble. Par exemple dans le cadre de la présente invention, le terme « traiter » peut correspondre à la réduction ou au ralentissement de la progression d'une infection lorsque l'élément

biologique est une cellule procaryote ou à la réduction ou le ralentissement d'apparition de métastases, plus précisément de cancers métastatiques lorsque l'élément biologique est une cellule eucaryote de type cancéreuse.

5 Au sens de la présente invention, la puce microfluidique est de préférence destinée à être implantée *in vivo* chez un sujet.

Le sujet dans le cadre de la présente invention est un être vivant, de préférence un mammifère et plus particulièrement les êtres humains, enfants, hommes ou femmes.

Par « cancer solide », ou « tumeur solide » on fait référence à une masse individualisée de cellules cancéreuses dans n'importe quel tissu tel que la peau, les muqueuses, les os, ou
10 tout autre tissu présent dans les organes, c'est-à-dire aux carcinomes issus de cellules épithéliales comme la peau, les muqueuses, les glandes et aux sarcomes issus de cellules des tissus conjonctifs et de soutien tels que l'os, le cartilage.

De préférence dans le cadre de la présente invention on fait référence par « cancer solide » ou « tumeur solide », à un carcinome tel que le cancer du sein, des poumons, de la
15 prostate, de la vessie, des glandes salivaires, de la peau, de l'intestin, du côlon-rectum, de la thyroïde, du col de l'utérus, de l'endomètre et des ovaires, du cancer lèvre-bouche-larynx, du rein, du foie, du cerveau, des testicules, du pancréas, préférentiellement le cancer du sein. Ces exemples de tumeurs solides n'étant pas limitatifs.

Par « composé chimioattractant » on fait référence à tout composé apte à attirer par
20 chimiotactisme un élément biologique, de préférence une cellule exprimant des récepteurs membranaires spécifiques de ce composé à sa surface, ledit élément biologique se déplaçant en fonction du gradient de concentration en composé chimioattractant. Dans le cadre de la présente invention, le composé chimioattractant est apte à induire le déplacement d'un ou plusieurs éléments biologiques spécifiques en fonction du gradient de concentration dudit
25 composé par chimiotactisme positif, l'élément biologique se déplaçant vers la région où la concentration en composé chimioattractant est la plus élevée.

En particulier dans le cadre de la présente invention, le composé chimioattractant est dit « apte à attirer » un élément biologique spécifique lorsqu'il permet le déplacement dudit élément à l'intérieur de la puce microfluidique et en particulier vers le réservoir de composé
30 chimioattractant dans lequel se trouve la concentration la plus élevée en composé chimioattractant. L'Homme du métier saura caractériser l'élément biologique spécifique d'intérêt afin de choisir le composé chimioattractant apte à attirer ledit élément au sein de la puce.

Dans le cadre de la présente invention, le composé chimioattractant est choisi en fonction de l'élément biologique spécifique d'intérêt.

Lorsque l'élément biologique est une cellule eucaryote, le composé chimioattractant est choisi en fonction du type de récepteurs membranaires que cette cellule exprime.

- 5 Plus précisément, lorsque l'élément biologique est une cellule eucaryote le composé chimioattractant peut être une cytokine c'est-à-dire un polypeptide ou une protéine soluble synthétisée par une cellule et agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, choisie parmi les chimiokines, les facteurs stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages tels que
- 10 M-CSF, G-CSF, CSF-1, les facteurs de croissance et facteurs de croissance transformant tels que TGF alpha, TGF beta, EGF, bétacelluline, amphiréguline, héréguline, HBEGF, FGF, VEGF, les facteurs de nécrose tumorale tels que NGF, TNF alpha, TNF beta, les interférons tels que IFN alpha, IFN beta, IFN gamma, IFN lambda et les interleukines telles que IL-1 à IL-38.

- De préférence lorsque l'élément biologique est une cellule eucaryote telle qu'une cellule
- 15 cancéreuse, le composé chimioattractant est choisi parmi les chimiokines, les facteurs de croissance et les facteurs de croissance de transformation.

- Une chimiokine est une petite protéine de 8 à 14 kilo daltons caractérisée par la présence de quatre résidus cystéine en des positions conservées permettant la formation de leur structure tridimensionnelle. Les chimiokines peuvent être classées en quatre sous-familles
- 20 en fonction de l'espacement entre deux de leurs cystéines en position N-terminale, on peut notamment faire référence à la famille CXC ou alpha c'est à dire dont les deux premières cystéines sont séparées par un acide aminé quelconque, la famille CC ou beta, la famille CX3C ou delta, la famille C ou gamma. La chimiokine dans le cadre de la présente invention peut par exemple être choisie parmi les chimiokines suivantes : CXCL12, appelée
- 25 également stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), CCL5, CCL2, CCL3, CCL7, CCL19, CCL21, CCL22, CCL25, CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CX3CL1.

- Un facteur de croissance est une protéine de faible poids moléculaire (inférieur à 30 kilo daltons) qui stimule la multiplication cellulaire et est reconnu par des récepteurs membranaires spécifiques qui sont le plus souvent des tyrosines kinases. Le facteur de
- 30 croissance dans le cadre de la présente invention peut par exemple être choisi parmi TGF alpha ou beta (facteur de croissance transformant alpha ou beta), FGF (facteur de croissance du fibroblaste alpha), EGF (facteur de croissance épidermique), la bétacelluline

l'amphiréguline, l'héréguline, HBEGF, VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), PDGF (facteur de croissance plaquette-dérivé).

Lorsque l'élément biologique est une cellule procaryote, telle qu'une bactérie, le composé chimioattractant peut être un peptide portant un groupe N formylé tel que le N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) ou encore des molécules glucidiques telles que le glucose.

Dans le cadre de la présente invention, le composé chimioattractant est compris dans une matrice qui est composée d'un matériau biocompatible tel que défini dans la présente invention. Le matériau biocompatible de la matrice étant choisi spécifiquement en fonction du composé chimioattractant, du profil de libération souhaité ainsi que du contexte d'utilisation de la puce microfluidique.

Par « milieu extérieur » dans le cadre de la présente invention on fait référence aux tissus situés autour de la puce microfluidique lorsque celle-ci est implantée *in vivo*, plus précisément aux tissus situés directement au contact de la puce, jusqu'à 300 mm, de préférence jusqu'à 150 mm, de préférence encore jusqu'à 100 mm autour de la puce.

Par « résection d'une tumeur solide » on entend le retrait, l'ablation ou encore l'exérèse d'une tumeur solide par exemple par chirurgie.

Ainsi, la présente invention concerne une puce microfluidique pour attirer et détruire *in vivo* un élément biologique spécifique.

Les références numériques utilisées dans le cadre de la présente description détaillée de l'invention font référence aux figures de la présente demande ayant pour objectif d'illustrer l'invention sans pour autant s'y limiter.

Un premier objet de l'invention concerne une puce microfluidique pour attirer et détruire un élément biologique spécifique, ladite puce comprenant :

- un réservoir (1) constitué d'une matrice comprenant le composé chimioattractant capable d'attirer un élément biologique
- au moins un réseau de microcanaux (2) disposé entre le réservoir (1) et le milieu extérieur (3) de la puce et permettant de laisser passer le composé chimioattractant vers ledit milieu et de laisser passer l'élément biologique présent dans ledit milieu en direction du réservoir (1)
- au moins une électrode (4) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2) ou au même endroit que le réseau de microcanaux (2), ladite électrode

étant apte à générer un champ électrique de façon à détruire l'élément biologique lors de son passage vers le réservoir (1).

Plus précisément, la présente invention concerne une puce microfluidique destinée à être implantée *in vivo* pour attirer et détruire un élément biologique spécifique, de préférence
5 une cellule eucaryote, ladite puce comprenant :

- un réservoir (1) constitué d'une matrice comprenant le composé chimioattractant capable d'attirer un élément biologique *in vivo*

- au moins un réseau de microcanaux (2) disposé entre le réservoir (1) et le milieu extérieur (3) de la puce et permettant de laisser passer le composé chimioattractant vers
10 ledit milieu et de laisser passer l'élément biologique présent dans ledit milieu en direction du réservoir (1)

- au moins une électrode (4) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2) ou au même endroit que le réseau de microcanaux (2), ladite électrode étant apte à générer un champ électrique de façon à détruire l'élément biologique *in vivo*
15 lors de son passage vers le réservoir (1).

Selon un aspect préféré, la présente invention concerne une puce microfluidique destinée à être implantée *in vivo* pour attirer et détruire une cellule eucaryote, de préférence une cellule cancéreuse, ladite puce comprenant :

- un réservoir (1) constitué d'une matrice comprenant le composé chimioattractant
20 capable d'attirer ladite cellule *in vivo*

- au moins un réseau de microcanaux (2) disposé entre le réservoir (1) et le milieu extérieur (3) de la puce et permettant de laisser passer le composé chimioattractant vers ledit milieu et de laisser passer ladite cellule présente dans ledit milieu en direction du réservoir (1)

- au moins une électrode (4) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2) ou au même endroit que le réseau de microcanaux (2), ladite électrode (4) étant apte à générer un champ électrique de façon à détruire ladite cellule lors de son passage vers le réservoir (1) *in vivo*.
25

Selon un premier mode de réalisation particulier, la présente invention concerne une puce
30 microfluidique destinée à être implantée *in vivo* pour attirer et détruire un élément biologique spécifique de préférence une cellule eucaryote, de préférence encore une cellule cancéreuse, ladite puce comprenant:

- un réservoir (1) constitué d'une matrice comprenant le composé chimioattractant capable d'attirer ladite cellule *in vivo*
- au moins un réseau de microcanaux (2) disposé entre le réservoir (1) et le milieu extérieur (3) de la puce et permettant de laisser passer le composé chimioattractant vers ledit milieu et de laisser passer ladite cellule présente dans ledit milieu en direction du réservoir (1)
- au moins une électrode (4) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2), ladite électrode (4) étant apte à générer un champ électrique de façon à détruire ladite cellule lors de son passage vers le réservoir (1) *in vivo*.

10 Selon un deuxième mode de réalisation particulier, la présente invention concerne une puce microfluidique destinée à être implantée *in vivo* pour attirer et détruire un élément biologique spécifique de préférence une cellule eucaryote, de préférence encore une cellule cancéreuse, ladite puce comprenant :

- 15 - un réservoir (1) constitué d'une matrice comprenant le composé chimioattractant capable d'attirer ladite cellule *in vivo*
- au moins un réseau de microcanaux (2) disposé entre le réservoir (1) et le milieu extérieur (3) de la puce et permettant de laisser passer le composé chimioattractant vers ledit milieu et de laisser passer ladite cellule présente dans ledit milieu en direction du réservoir (1)
- 20 - au moins une électrode (4) disposée au même endroit que le réseau de microcanaux (2), ladite électrode (4) étant apte à générer un champ électrique de façon à détruire ladite cellule lors de son passage vers le réservoir (1) *in vivo*.

De préférence dans ce mode de réalisation, l'électrode est disposée sur ou sous le réseau de microcanaux, de préférence encore l'électrode est disposée sur le réseau de microcanaux.

25 La matrice du réservoir (1) comprenant le composé chimioattractant est formée d'un matériau biocompatible.

Le composé chimioattractant compris dans la matrice du réservoir (1) permet d'attirer *in vivo* l'élément biologique spécifique au sein de la puce par chimiotactisme positif, l'élément biologique migrant en direction du réservoir (1) où la concentration en composé chimioattractant est la plus élevée. Le réseau de microcanaux (2) quant à lui, permet le passage par diffusion du composé chimioattractant depuis le réservoir (1) vers le milieu extérieur (3) de la puce ainsi que le passage de l'élément biologique spécifique depuis le

milieu extérieur (3) de la puce vers l'intérieur de la puce, en direction du réservoir (1). L'électrode (4), est disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2) de sorte que lorsque l'élément biologique spécifique entre dans la puce depuis le milieu extérieur (3) par le réseau de microcanaux (2) et en direction du réservoir (1), le champ électrique
5 généré par ladite électrode (4) détruit *in vivo* l'élément biologique lors de son passage en direction du réservoir (1).

Dans le cadre de la présente invention, l'élément biologique est de préférence une cellule cancéreuse et en particulier une cellule cancéreuse provenant d'un cancer ou d'une tumeur solide. La migration de cette cellule à l'intérieur de la puce s'effectue par adhérence au
10 support sur lequel l'électrode (4) est disposée, le champ électrique généré par l'électrode étant alors apte à détruire *in vivo* la cellule lors de son passage en direction du réservoir (1).

Le réseau de microcanaux (2) de la puce microfluidique selon la présente invention se situe de préférence sur la bordure externe de ladite puce c'est-à-dire au contact du milieu extérieur (3), assurant ainsi la communication entre ledit milieu et l'espace intérieur de la
15 puce.

La puce selon la présente invention peut comprendre plusieurs réseaux de microcanaux (2), par exemple deux réseaux de microcanaux. Selon un aspect préféré, la puce microfluidique selon l'invention comprend une seule électrode (4). Selon un autre aspect, la puce microfluidique selon l'invention comprend plusieurs électrodes (4).

20 Selon certains modes de réalisation particuliers de la présente invention, l'électrode peut plus particulièrement être disposée:

- de part et d'autre d'au moins un réseau de microcanaux,
- à l'intérieur d'au moins un réseau de microcanaux,
- entre au moins deux réseaux de microcanaux ou
- 25 - de façon adjacente à au moins un réseau de microcanaux.

La puce microfluidique selon le premier objet de l'invention comprend une partie inférieure (5) et une partie supérieure (6), le réservoir (1) comprenant la matrice de composé chimioattractant, le réseau de microcanaux (2) et l'électrode (4) pouvant être compris indépendamment l'un de l'autre dans la partie supérieure (6) et / ou la partie inférieure (5)
30 de ladite puce.

La partie supérieure (6) de la puce microfluidique est apte à être disposée sur la partie inférieure (5) pour former un couvercle, lesdites parties étant fixées entre elles.

Selon un aspect particulier, la puce microfluidique selon la présente invention comprend une partie inférieure (5) comprenant une partie du réservoir (1), le réseau de microcanaux (2) et l'électrode (4), et une partie supérieure (6) comprenant une partie du réservoir (1) et apte à être disposée sur la partie inférieure (5), lesdites parties étant fixées entre elles.

Selon un autre aspect particulier, la puce microfluidique selon la présente invention comprend une partie inférieure (5) comprenant une partie du réservoir (1), l'électrode (4), et une partie supérieure (6) comprenant une partie du réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2), ladite partie supérieure étant apte à être disposée sur la partie inférieure (5), lesdites parties étant fixées entre elles.

Concernant l'électrode (4), on entend par « comprise dans », le fait que l'électrode soit déposée et / ou intégrée sur la partie inférieure et/ou supérieure de la puce. De préférence, l'électrode est intégrée sur la partie inférieure de la puce.

Le réservoir (1) compris dans la partie inférieure (5) et dans la partie supérieure (6) correspond à un seul et même réservoir dont une partie se trouve dans la partie supérieure de la puce et l'autre partie se trouve dans la partie inférieure de la puce.

Dans le cadre de la présente invention, on entend par partie supérieure (6) « apte à être disposée sur la partie inférieure (5) pour former un couvercle » le fait que la forme de la partie supérieure (6) est telle qu'elle s'adapte à celle de la partie inférieure (5) sur laquelle elle repose sans entraver la fonctionnalité de chaque élément composant la partie inférieure (5) et permet de former un couvercle fermant la puce.

De façon avantageuse et préférée, la partie supérieure (6) et inférieure (5) de la puce microfluidique sont arrondies de manière à ce que la puce soit implantée *in vivo* sans endommager les tissus.

De préférence la puce est de forme arrondie, avec par exemple la partie supérieure et inférieure ayant une forme de demi-ovale ou de demi-sphère de sorte que lorsque la partie supérieure est disposée sur la partie inférieure, la puce microfluidique est respectivement de forme ovale ou sphérique.

La taille de la puce microfluidique selon le premier objet est adaptée à une implantation *in vivo* et est de l'ordre de quelques centimètres, de préférence entre 0,5 et 5 cm, de préférence encore entre 1 et 3 cm, de façon encore préférée de 1 cm.

Plus particulièrement, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle
5 le réservoir (1), le réseau de microcanaux (2) et l'électrode (4) sont de forme annulaire et dans laquelle le réservoir est situé au centre de la puce.

Comme son nom l'indique, la forme annulaire correspond à une forme d'anneau. Cette configuration particulière permet notamment d'assurer une diffusion radiale du composé chimioattractant compris dans le réservoir (1) en direction du milieu extérieur (3) et une
10 attraction homogène de l'élément biologique à partir dudit milieu en direction du réservoir (1), grâce à la situation centrale du réservoir (1) ainsi qu'à la forme annulaire du réseau de microcanaux (2). De même, la forme annulaire de l'électrode (4) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2) permet avantageusement d'assurer une destruction efficace de chaque élément biologique qui pénètre la puce et provenant d'une quelconque
15 direction.

La partie inférieure (5) et la partie supérieure (6) de la puce microfluidique peuvent être fixées l'une à l'autre par n'importe quel moyen physique ou chimique (12), adapté à une utilisation *in vivo*. A titre d'exemple de moyen de fixation physique ou chimique on peut faire
20 référence respectivement à une vis ou à une colle adaptées à une utilisation *in vivo* de la puce ou encore à un élément proéminent venant au regard d'un élément creux présents dans la partie inférieure et supérieure pour les assembler.

De préférence dans le cadre de la présente invention, la partie supérieure (6) comprend une ou plusieurs ouvertures par lesquelles une ou plusieurs vis peuvent être insérées et la partie inférieure (5) comprend un ou plusieurs écrous aptes à recevoir ladite ou lesdites vis.

De façon encore préférée, la partie supérieure (6) de la puce microfluidique selon l'invention comprend une ouverture centrale par laquelle une vis est apte à être insérée et la partie inférieure (5) comprend un écrou central apte à recevoir ladite vis. Dans ce mode de réalisation préféré, le réservoir (1) annulaire est disposé autour de l'ouverture centrale présente sur la partie supérieure (6) et de l'écrou central présent sur la partie inférieure (5)
30 de la puce.

En particulier, la puce microfluidique comprend un ou plusieurs joints (7) aptes à rendre la puce étanche, lesdits joints (7) étant disposés entre la partie inférieure (5) et la partie supérieure (6) au-dessus du réseau de microcanaux (2).

On entend ici par « joint apte à rendre la puce étanche », la propriété du joint à ne pas
5 laisser entrer au sein de ladite puce les fluides pouvant être présents dans le milieu extérieur (3) tel que le sang et à ne pas laisser sortir dans le milieu extérieur les liquides et matériaux présents à l'intérieur de ladite puce par un autre endroit que par le réseau de microcanaux (2). La position du ou desdits joints (7) au-dessus du réseau de microcanaux (2) permettant de ne pas entraver la diffusion du composé chimioattractant vers le milieu extérieur (3) ni le
10 passage de la cellule spécifique présente dans ledit milieu au sein de la puce, en direction du réservoir (1). De façon avantageuse, les joints permettent de créer une zone d'appui entre la partie supérieure et inférieure de la puce.

En particulier, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle la partie supérieure (6) et / ou la partie inférieure (5) comprennent une cavité annulaire i) (8) apte à
15 recevoir la matrice comprenant le composé chimioattractant, et une cavité annulaire ii) (10) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2), apte à recevoir un liquide dans lequel le composé chimioattractant est apte à diffuser.

Plus particulièrement, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle la partie supérieure (6) et / ou la partie inférieure (5) comprennent une cavité annulaire i)
20 (8) apte à recevoir la matrice comprenant le composé chimioattractant par l'intermédiaire d'une ou plusieurs ouvertures (9) communiquant avec le milieu extérieur (3) et débouchant dans ladite cavité, et une cavité annulaire ii) (10) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2), apte à recevoir un liquide dans lequel le composé chimioattractant est apte à diffuser, par l'intermédiaire d'une ou plusieurs ouvertures (11) communiquant avec le
25 milieu extérieur (3) et débouchant dans ladite cavité.

Plus particulièrement encore, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle la partie supérieure (6) et la partie inférieure (5) comprennent une cavité annulaire i) (8) apte à recevoir la matrice comprenant le composé chimioattractant par l'intermédiaire d'une ou plusieurs ouvertures (9) communiquant avec le milieu extérieur (3) et débouchant
30 dans ladite cavité, et une cavité annulaire ii) (10) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2), apte à recevoir un liquide dans lequel le composé chimioattractant est apte à diffuser, par l'intermédiaire d'une ou plusieurs ouvertures (11) communiquant avec le milieu extérieur (3) et débouchant dans ladite cavité.

De préférence le composé chimioattractant est ajouté à la matrice du réservoir (1) avant son ajout dans la cavité annulaire i) (8). Alternativement, le composé chimioattractant peut être ajouté dans la cavité annulaire i) (8) avant ou après l'ajout dans cette même cavité de la matrice formant le réservoir (1).

- 5 La matrice comprenant le composé chimioattractant et le liquide dans lequel le composé chimioattractant est apte à diffuser, sont ajoutés respectivement dans la cavité annulaire i) (8) et dans la cavité annulaire ii) par l'intermédiaire desdites ouvertures (9, 11), de préférence après que la partie supérieure (6) a été disposée sur la partie inférieure (5).

10 Le liquide dans lequel le composé chimioattractant est apte à diffuser est de préférence une solution aqueuse telle que du sérum physiologique ou une solution tampon physiologique telle qu'une solution aqueuse comprenant un tampon phosphate salin (PBS).

15 L'étanchéité de chacune des cavités après lesdits ajouts est assurée par l'obturation des ouvertures par l'intermédiaire de joints, par exemple en PDMS ou tout autre matériau adapté, lesdits joints étant situés à la sortie de ces ouvertures (9, 11) et communiquant avec le milieu extérieur (3).

20 De préférence, la cavité annulaire i) (8) est comprise dans la partie supérieure (6) et la partie inférieure (5) de la puce, la ou les ouvertures (9) débouchant dans cette cavité se trouvant dans la partie inférieure (5) de la puce, et la cavité annulaire ii) (10) ainsi que la ou les ouvertures (11) débouchant dans cette cavité sont comprises dans la partie supérieure (6) de la puce.

La puce selon la présente invention est en matériau biocompatible. En particulier, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle la partie supérieure (6) et la partie inférieure (5) sont composées d'un matériau biocompatible.

25 Plus précisément, la partie supérieure (6) et la partie inférieure (5) en tant que telles ainsi que les éléments qu'elles comprennent sont constitués d'un matériau biocompatible. Plus précisément encore, la partie supérieure (6), la partie inférieure (5), le réservoir (1) notamment la matrice comprenant le composé de chimioattractant, le réseau de microcanaux (2), l'électrode (4) et les joints (7) sont constitués d'un matériau biocompatible.

30 Par « matériau biocompatible » ou « biomatériau » on fait référence à un matériau ayant la capacité de ne pas interférer, de ne pas dégrader le milieu biologique dans lequel il est utilisé et ce, même en contact direct ou indirect, bref ou prolongé avec les tissus et fluides

internes du corps d'un être humain ou d'un animal. A titre d'exemple de matériau biocompatible utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut faire référence de façon non exhaustive au verre, aux céramiques telles que l'alumine, la zircone, l'hydroxyapatite, aux métaux et alliages métalliques tels que le titane, la platine, aux polymères d'origine naturelle tels que le collagène, l'agarose, le chitosan, le carraghénane, le xanthane et l'alginate ou synthétique dégradables tels que les polyesters et polyanhydrides ou non dégradables tels que les polyuréthanes, la cellulose et ses dérivés, les polymères vinyliques. De préférence dans le cadre de la présente invention les polymères d'origine synthétiques sont le PEEK (polyétheréthercétone) ou le PDMS (polydiméthylsiloxane).

De préférence, la partie supérieure (6), la partie inférieure (5) et le réseau de microcanaux (2) sont indépendamment l'un de l'autre, en polymères d'origine synthétique tels que le polydiméthylsiloxane (PDMS) ou le polyétheréthercétone (PEEK). De préférence encore, la partie supérieure (6), la partie inférieure (5) sont en polyétheréthercétone (PEEK).

De préférence, le réseau de microcanaux (2) est en polyétheréthercétone (PEEK).

De préférence, l'électrode (4) est en titane et / ou en platine, de préférence encore en titane et platine.

De préférence, le réservoir (1) et en particulier la matrice comprenant le composé chimioattractant est en collagène et / ou en alginate, de préférence encore ledit réservoir, en particulier ladite matrice est en alginate.

De façon particulière et préférée, la partie supérieure (6), la partie inférieure (5) et le réseau de microcanaux (2) de la puce selon l'invention sont en polyétheréthercétone (PEEK), le réservoir (1) de composé chimioattractant est en alginate et l'électrode (4) est en titane et en platine.

Selon un aspect particulier, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle la matrice comprenant le composé chimioattractant est composée d'un matériau biocompatible, de préférence un polymère réticulé. De préférence, le polymère réticulé composant la matrice est un polymère d'origine naturelle et en particulier le collagène et / ou en alginate, de préférence en alginate.

La réticulation d'un polymère correspond à la formation d'un ou de plusieurs réseaux tridimensionnels à partir de polymères linéaires ou ramifiés, par voie chimique et / ou physique. L'Homme du métier sait comment induire une réticulation des polymères selon les

polymères considérés, à titre d'exemple la réticulation peut être effectuée par chauffage et/ou par l'utilisation d'agent de réticulation. Un polymère dit « réticulé » est un polymère dont certaines de ses chaînes sont reliées entre elles par des liaisons fortes ou faibles.

A titre d'exemple, le collagène peut être réticulé par l'utilisation d'agents réticulants tels que l'ammoniac gazeux, des sucres oxydés ou des aldéhydes à température ambiante et l'alginate peut être réticulé dans un bain de chlorure de calcium à température ambiante.

De préférence encore, le matériau biocompatible composant la matrice comprenant le composé chimioattractant est en alginate réticulé dans un bain de chlorure de calcium de préférence à température ambiante.

La réticulation du matériau biocompatible composant la matrice comprenant le composé chimioattractant permet avantageusement une libération prolongée de ce composé. Par « libération prolongée » on fait référence à une cinétique de libération du composé chimioattractant contrôlée et continue sur une période de temps. De préférence dans le cadre de la présente invention, la libération du composé chimioattractant s'effectue entre 3 jours et 6 mois, de préférence entre 15 jours et 3 mois.

Selon un aspect particulier, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle le pourcentage massique composé chimioattractant / matrice du réservoir (1) est compris entre 0,1 et 20 %, de préférence entre 0,5 et 10 % et de préférence encore entre 0,5 et 5%.

L'Homme du métier saura déterminer la teneur du réservoir en composé chimioattractant en fonction du contexte de l'utilisation de la puce, de l'élément biologique spécifique d'intérêt, de la durée de libération du composé chimioattractant souhaitée et du biomatériau composant la matrice du réservoir.

Lorsque l'élément biologique spécifique est une cellule eucaryote, de préférence une cellule cancéreuse, le composé chimioattractant compris dans le réservoir de la puce microfluidique et en particulier dans la matrice du réservoir, est de préférence choisi parmi les chimiokines telles que CXCL12, appelée également stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), CCL5, CCL2, CCL3, CCL7, CCL19, CCL21, CCL22, CCL25, CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CX3CL1, les facteurs de croissance et les facteurs de croissance de transformation tels que TGF alpha ou beta (facteur de croissance transformant alpha ou beta), FGF (facteur de croissance du fibroblaste alpha), EGF (facteur de croissance épidermique alpha), la bétacelluline, l'amphiréguline, l'héréguline, HBEGF, PDGF (facteur de croissance plaquette-dérivé), VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire).

Plus particulièrement, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle le composé chimioattractant compris dans le réservoir (1) de la puce, est choisi parmi au moins un des composés suivants : CXCL12, CCL5, CCL2, CCL3, CCL7, CCL19, CCL21, CCL22, CCL25, CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CX3CL1, TGF alpha, TGF beta, FGF, PDGF, EGF, VEGF.

Selon un autre aspect, lorsque l'élément biologique spécifique est une cellule procaryote, de préférence une bactérie, le chimioattractant compris dans le réservoir (1) de la puce microfluidique et en particulier dans la matrice du réservoir (1), est de préférence choisi parmi les molécules glucidiques.

Le composé chimioattractant peut être utilisé seul ou en combinaison avec un ou plusieurs autres composés chimioattractants susmentionnés et / ou avec d'autres composés aptes à améliorer directement ou indirectement l'aptitude dudit composé chimioattractant à attirer un élément biologique spécifique, tel qu'une cellule eucaryote et en particulier une cellule cancéreuse comme par exemple des molécules glucidiques (glucose) et / ou lipidiques (acides gras) qui permettent d'apporter l'énergie nécessaire (énergie apportées sous forme d'ATP après dégradation du glucose ou des acides gras) à la survie de l'élément biologique, notamment d'une cellule eucaryote et en particulier d'une cellule cancéreuse. D'autres molécules comme l'oxygène peuvent être utilisées en association avec les chimioattractants. L'oxygène peut être transporté par l'hémoglobine ou par des hémoglobines synthétiques. L'oxygène est une molécule indispensable à la survie et prolifération des cellules et notamment des cellules cancéreuses. De préférence le composé chimioattractant est utilisé en combinaison avec une ou plusieurs molécules glucidiques (glucose) et / ou lipidiques (acides gras).

L'Homme du métier veillera à choisir le ou les composés chimioattractants en fonction de l'élément biologique spécifique ciblé.

A cet effet, lorsque l'élément biologique est une cellule eucaryote une analyse des récepteurs membranaires exprimés par la cellule ciblée devra être réalisée en amont afin de s'assurer de la spécificité du ou des composés chimioattractants choisis.

A titre d'exemple, lorsque l'élément biologique spécifique est une cellule cancéreuse exprimant le récepteur transmembranaire CXCR4 comme par exemple une cellule cancéreuse mammaire notamment humaine, le composé chimioattractant choisi est le stromal cell-derived factor 1 (SDF-1).

De même, lorsque l'élément biologique spécifique est une cellule cancéreuse provenant du cancer du poumon, le composé chimioattractant choisi est le facteur de croissance épidermique (EGF) ou le facteur de croissance transformant alpha (TGF alpha).

5 Les microcanaux composant le réseau de microcanaux (2) de la puce microfluidique selon la présente invention peuvent être de forme parallélépipédique, cylindrique, pavimenteuse, tronconique ou un mélange de ses formes.

Chaque microcanal compris dans le réseau de microcanaux (2) de la puce microfluidique selon la présente invention peut présenter une hauteur comprise entre 1 et 500 μm , de préférence entre 50 μm et 150 μm , une largeur comprise entre 1 et 500 μm , de préférence
10 entre 50 μm et 150 μm et une longueur comprise entre 30 μm et 1 mm, de préférence entre 30 μm et 500 μm .

En particulier dans le cadre de l'invention, chaque microcanal compris dans le réseau de microcanaux (2) présente une hauteur comprise entre 1 et 40 μm , une largeur comprise entre 1 et 40 μm , une longueur comprise entre 30 et 250 μm .

15 De préférence dans le cadre de la présente invention, chaque microcanal compris dans le réseau de microcanaux (2) présente une hauteur comprise entre 5 et 20 μm , une largeur comprise entre 5 et 20 μm , et une longueur comprise entre 100 et 200 μm , de préférence 200 μm .

Chaque microcanal compris dans un réseau de microcanaux peut présenter des dimensions
20 qui lui sont propres indépendamment des dimensions des autres microcanaux compris dans ce réseau de microcanaux.

De même, lorsque la puce comprend plusieurs réseaux de microcanaux chaque microcanal d'un même réseau ainsi que chaque microcanal compris dans les différents réseaux de microcanaux peut présenter indépendamment l'un de l'autre, des dimensions et des formes
25 qui lui sont propres.

De préférence, dans le cadre de la présente invention l'ensemble des microcanaux compris dans un réseau de microcanaux a la même forme et les mêmes dimensions.

Selon un aspect particulier, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle l'électrode (4) est une électrode interdigitée.

30 L'« électrode interdigitée » correspond à une électrode (4) dont chaque conducteur est multidenté. De préférence chaque conducteur présente un diamètre compris entre 200 et 400

μm, de préférence de 315 μm environ et chaque conducteur est espacé de l'autre par un entrefer compris entre 10 et 50 μm, de préférence de 15 μm environ.

De préférence encore, l'électrode (4) est une électrode sans fil, alimentée en énergie à distance par une antenne (13).

- 5 Par exemple l'alimentation en énergie à distance peut fonctionner par communication sans fil, par exemple à partir de la bande de fréquence ISM (industriel, scientifique et médical) utilisant une plage de fréquence comprise entre 13,553-13,567 MHz.

Plus particulièrement, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle l'électrode (4) est une électrode sans fil, ladite puce comprenant une antenne activable par
10 une deuxième antenne. De préférence la deuxième antenne est destinée à être placée *ex vivo* lorsque la puce microfluidique est destinée à être implantée *in vivo*.

Par « antenne » on fait référence à un composant électronique constitué d'un enroulement d'un matériau conducteur formant une ou plusieurs spires. Lorsque cette antenne est traversée par un courant, elle produit un champ magnétique. Ce champ magnétique peut
15 être libéré par l'antenne sous forme d'énergie électrique. Les antennes permettent ainsi la transmission de l'électricité à travers les tissus par inductance. De préférence, dans le cadre de la présente invention, l'antenne est une bobine d'inductance.

L'antenne (13) permet l'alimentation en énergie à distance de l'électrode (4).

L'antenne peut également permettre la transmission d'informations à distance.

- 20 La deuxième antenne destinée à être située *ex vivo* a une fonction d'émetteur et l'antenne comprise dans l'électrode sans fil une fonction de récepteur.

L'Homme du métier veillera à adapter la fréquence de résonance, la distance, et l'alignement entre l'émetteur et le récepteur en fonction de l'efficacité de la puissance sans fil à transmettre.

- 25 L'antenne comprise dans la puce ainsi que la deuxième antenne sont composées d'un matériau biocompatible, de préférence le même que celui dans lequel l'électrode (4) est composée, qui est de préférence le titane.

De façon encore plus particulière lorsque la puce est destinée à être implantée *in vivo*, le diamètre desdites antennes est suffisant pour la transmission de l'électricité à travers les
30 tissus par inductance, de préférence le diamètre des antennes est du même ordre de grandeur que l'épaisseur des tissus à traverser, de préférence le diamètre desdites antennes est compris entre 5 mm et 100 mm, de préférence encore entre 10 et 80 mm.

Selon un aspect préféré, la deuxième antenne est intégrée dans un patch destiné à une application topique sur la peau, ledit patch comprenant un support physiologiquement acceptable pour une application topique c'est-à-dire compatible avec la peau, les muqueuses et les phanères.

- 5 La deuxième antenne peut également se trouver dans un boîtier externe.

Selon un aspect particulier, la présente invention concerne une puce microfluidique dans laquelle le champ électrique généré par l'électrode (4) est apte à détruire par électroporation irréversible l'élément biologique.

- 10 De préférence, ledit champ électrique généré par l'électrode est un champ électrique pulsé, qui correspond à un traitement non-thermique sélectif de courte durée, généralement de quelques microsecondes à quelques millisecondes.

- 15 L'application d'un champ électrique pulsé sur une cellule spécifique engendre l'accumulation de charges sur la surface membranaire et l'augmentation du potentiel transmembranaire de la membrane cellulaire. L'attraction entre les charges de signes opposés accumulées de part et d'autre de la membrane cellulaire provoque une compression de cette dernière avec une force élastique tendant à s'opposer à cette électrocompression. Lorsque le champ électrique pulsé appliqué dépasse une valeur critique, la force électrocompressive devient supérieure à la force élastique, on assiste alors à l'apparition de pores au niveau de la membrane cellulaire. Lorsque l'intensité du champ électrique pulsé est grande et / ou que la durée du traitement est longue, on assiste à une intensification de la perméabilisation et une destruction irréversible de la membrane cellulaire.
- 20

- 25 Dans le contexte de la présente invention, le champ électrique pulsé généré par l'électrode sur l'élément biologique spécifique permet d'induire l'électroporation irréversible dudit élément biologique. Plus précisément, lorsque l'élément biologique est une cellule procaryote ou eucaryote, le champ électrique pulsé généré par l'électrode crée des pores, notamment des nanopores dans la membrane de la cellule, induisant une dérégulation de l'homéostasie cellulaire irréversible à l'origine de la mort de la cellule, par apoptose ou par nécrose.

- 30 Plus particulièrement, le champ électrique généré par l'électrode (4) est un champ électrique pulsé compris entre 1000 V/cm et 6500 V/cm de tension, de préférence entre 3000 V/cm et 5000 V/cm, 1 Hz de fréquence et une durée comprise entre 100 μ s et 200 μ s.

De préférence, le champ électrique pulsé d'une durée comprise entre 100 μ s et 200 μ s est généré par l'électrode plusieurs fois par jour, de préférence au moins 3 fois, pendant une période adaptée au contexte d'utilisation de la puce.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la puce microfluidique comprend un moyen de mesurer le nombre d'éléments biologiques spécifiques entrés dans la puce microfluidique et / ou le nombre d'éléments biologiques détruits par l'électrode.

Parmi les moyens envisageables on peut notamment faire référence à un système de mesure par impédance électrique via l'électrode générant le champ électrique détruisant l'élément biologique ou bien par d'autres électrodes dédiées à ladite mesure et pouvant être comprises dans la partie supérieure et / ou la partie inférieure de la puce microfluidique.

L'impédance électrique correspond à la mesure de l'opposition du système au déplacement de charges électriques lorsqu'une différence de potentiel lui est appliquée. En d'autres termes, cela correspond au rapport de la tension appliquée au système et du courant électrique qui en résulte. Dans le contexte de la présente invention, cette mesure est utilisée pour quantifier les éléments biologiques spécifiques entrés dans la puce microfluidique, leur adhésion au support induisant une modification de l'impédance électrique ainsi que pour quantifier les éléments biologiques spécifiques détruites par l'électrode, qui se détachent de l'électrode et induisent en conséquence une modification de l'impédance électrique.

De préférence, le moyen de mesurer le nombre d'éléments biologiques entrés dans la puce microfluidique et / ou d'éléments biologiques détruits par l'électrode est un moyen de mesure par impédance électrique. Dans ce mode de réalisation particulier de l'invention, les informations peuvent être collectées et transmises par technologie de communication sans fil, par exemple à partir de la bande de fréquence ISM (industriel, scientifique et médical) utilisant une plage de fréquence comprise entre 13,553-13,567 MHz.

Un second objet de l'invention concerne l'utilisation de la puce microfluidique selon le premier objet de l'invention pour attirer et détruire un élément biologique spécifique.

Plus particulièrement la présente invention concerne l'utilisation de la puce microfluidique selon le premier objet de l'invention ou une méthode pour attirer et détruire *in vivo* un élément biologique spécifique, ladite puce étant implantée *in vivo*.

Plus précisément, la présente invention concerne l'utilisation de la puce microfluidique selon le premier objet de l'invention ou une méthode pour traiter ou prévenir la prolifération et la

dissémination d'un élément biologique spécifique chez un sujet, tel qu'une cellule procaryote ou eucaryote dans laquelle la puce est implantée *in vivo* chez un sujet.

Selon un aspect, la présente invention concerne l'utilisation de la puce microfluidique selon le premier objet de l'invention ou une méthode pour traiter ou prévenir une infection causée
5 par une cellule procaryote telle qu'une bactérie dans laquelle la puce est implantée *in vivo* chez un sujet.

Selon un aspect préféré, la présente invention concerne l'utilisation de la puce microfluidique selon le premier objet de l'invention ou une méthode pour traiter ou pour prévenir la prolifération et la dissémination d'une cellule eucaryote et en particulier d'une cellule
10 cancéreuse, de préférence après la résection d'une tumeur solide chez un sujet, dans laquelle la puce est implantée *in vivo* chez un sujet.

Plus précisément, la présente invention concerne l'utilisation de la puce microfluidique selon le premier objet de l'invention ou une méthode pour prévenir les risques de récurrence locale d'un cancer et / ou de développement d'un cancer métastatique chez un sujet, dans laquelle
15 la puce est implantée *in vivo* chez un sujet.

Dans le cadre de ces utilisations et méthodes, la puce microfluidique est implantée à une distance de 0,1 à 20 cm, de préférence de 1 à 10 cm, de préférence encore à une distance de 5 cm de la zone de résection d'une tumeur solide ou du foyer d'infection bactérienne chez un sujet. La puce microfluidique est de préférence implantée au niveau de la zone de
20 résection dès le retrait de la tumeur solide, de préférence de suite après la résection de ladite tumeur.

Dans le cadre de ces utilisations et méthodes, le champ électrique pulsé est de préférence généré par l'électrode plusieurs fois par jour, de préférence au moins 3 fois par jour, de préférence encore 8 fois par jour, sur une période adaptée au contexte d'utilisation de la
25 puce.

On fait référence ici par « contexte d'utilisation de la puce », au type d'élément biologique spécifique ciblé, c'est-à-dire au type d'infection bactérienne lorsque ledit élément est une bactérie, ou au type de cellule cancéreuse ciblée et en particulier au type de tumeur solide retirée et le stade auquel se trouve ladite tumeur lorsque ledit élément est une cellule
30 cancéreuse.

En fonction dudit contexte, le champ électrique pulsé peut être généré sur une période de 3 jours à 6 mois, de préférence de 2 semaines à 4 mois, sous forme de cure pouvant être renouvelée en cycle avec ou sans période de repos.

5 Par exemple, si la tumeur solide retirée était à un stade avancé, le champ électrique pulsé est généré par l'électrode au moins 3 fois par jour, de préférence 8 fois par jour, sur une période comprise entre 8 et 16 semaines. Par exemple, si la tumeur solide retirée était à un stade avancé, le champ électrique pulsé est généré par l'électrode au moins 8 fois par jour, sur une période comprise entre 8 et 16 semaines.

10 Dans le contexte des utilisations susmentionnées, la puce microfluidique peut être utilisée seule ou combinée à l'administration simultanée ou séquentielle d'autres composés médicamenteux tels que composés anti-cancéreux, notamment des composés chimiothérapeutiques et/ou d'hormonothérapie et/ou d'immunothérapie et/ou de thérapie ciblées et/ou radiothérapie lorsque l'élément biologique spécifique est une cellule cancéreuse.

15 Enfin, la présente invention concerne également une puce microfluidique selon le premier objet pour son utilisation pour attirer et détruire *in vivo* un élément biologique spécifique, ladite puce étant implantée *in vivo*, conformément aux conditions de mise en œuvre susmentionnées.

20 Plus précisément, la présente invention concerne une puce microfluidique selon le premier objet pour son utilisation pour traiter ou prévenir la prolifération et la dissémination d'un élément biologique spécifique chez un sujet, tel qu'une cellule procaryote ou eucaryote, dans laquelle la puce est implantée *in vivo* chez un sujet conformément aux conditions de mise en œuvre susmentionnées.

25 Selon un aspect, la présente invention concerne une puce microfluidique selon le premier objet pour son utilisation pour traiter ou prévenir une infection causée par une cellule procaryote telle qu'une bactérie, dans laquelle la puce est implantée *in vivo* chez un sujet.

Selon un aspect préféré, la présente invention concerne une puce microfluidique selon le premier objet pour son utilisation pour traiter ou prévenir la prolifération et la dissémination d'une cellule eucaryote et en particulier d'une cellule cancéreuse, de préférence après la
30 résection d'une tumeur solide chez un sujet, dans laquelle la puce est implantée *in vivo* chez un sujet conformément aux conditions de mise en œuvre susmentionnées.

De façon encore préférée, la présente invention concerne une puce microfluidique selon le premier objet pour son utilisation pour prévenir les risques de récurrence locale d'un cancer et / ou de développement d'un cancer métastatique chez un sujet, dans laquelle la puce est implantée *in vivo* chez un sujet conformément aux conditions de mise en œuvre susmentionnées.

Dans le cadre de ces utilisations et méthodes, lorsque l'élément biologique spécifique est une cellule eucaryote et en particulier une cellule cancéreuse, ladite cellule provient de préférence d'un cancer du sein, des poumons, de la prostate, de la vessie, des glandes salivaires, de la peau, de l'intestin, du côlon-rectum, de la thyroïde, du col de l'utérus, de l'endomètre et des ovaires, du cancer lèvre-bouche-larynx, du rein, du foie, du cerveau, des testicules, du pancréas, préférentiellement le cancer du sein. Ces exemples de tumeurs solides n'étant pas limitatifs.

L'invention sera davantage illustrée par les figures et exemples suivants. Cependant, ces exemples et ces figures ne doivent en aucun cas être interprétés comme limitant la portée de l'invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : Fabrication de la puce microfluidique pour l'étude de concept *in vitro*

Pour réaliser la preuve de concept *in vitro*, une puce microfluidique contenant en son centre un réservoir dans lequel est placé un chimioattractant.

a) Intégration des microélectrodes

Un substrat de verre (dimension 50x50 mm) est préparé dans une solution dite « piranha » (H_2SO_4 : H_2O_2 , 3 : 1) afin de le nettoyer et d'augmenter ses propriétés hydrophiles, suivi d'une déshumidification pendant 15 minutes à 150°C sur plaque chauffante pour favoriser l'adhésion de la résine négative photosensible (AZ® nLOF 2020 de MicroChemicals).

La résine est déposée sur le substrat par enduction centrifuge (3000 tr/min, 30s) afin d'obtenir une épaisseur de 2 μm . Les solvants sont évaporés par un recuit d'une minute à 110°C sur plaque chauffante. Afin d'initier la réticulation dans certaines parties de la résine photosensible, l'échantillon est soumis à une exposition UV (70mJ/cm²). Cette activation modifiera les propriétés locales de la résine qui, après cuisson, sera soluble ou non dans un solvant. La résine étant négative, la partie exposée aux rayons ultraviolets deviendra solide alors que l'autre partie se dissoudra au cours du développement. Pour continuer la réaction

de réticulation initiée par l'exposition UV, la plaque est ensuite soumise à un recuit post insolation (« post exposure bake (PEB) ») afin de fournir l'énergie nécessaire pour terminer le processus pendant 1 min à 110°C. Enfin, le développement va permettre de diluer les parties non réticulées de la résine dans un solvant à base de tetramethyl-ammonium-hydroxide (TMAH, AZ ® 726 MIF de MicroChemicals).

Un dépôt titane/platine (20/200 nm) est ensuite réalisé par pulvérisation cathodique suivi d'un décollage dit « lift-off » (acétone et NANO™ REMOVER PG de MicroChemicals) pour enlever les résidus de résine. A la fin de cette étape, les électrodes sont structurées sur la plaque de verre.

Pour assurer l'isolation électrique sur les parties ne devant pas être conductrices, une micro-structuration de nitrure de silicium (Si_3N_4) est effectuée. Pour cela, le procédé de lithographie décrit précédemment est répété avec en plus une étape d'alignement. Le dépôt de 200 nm de Si_3N_4 est obtenu dans un bâti PECVD (dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma). Les zones non protégées par la résine sont ensuite gravées par un procédé de gravure ionique réactive (ICP RIE). A la fin du procédé, le dispositif est nettoyé avec du REMOVER PG de MicroChemicals et un plasma d'air.

b) Fabrication du moule en résine de type époxy photosensible SU-8 de MicroChemicals

Une plaque de silicium (diamètre 76,2 mm) est préparée dans une solution « piranha » suivie d'une déshumidification pendant 15 à 150°C. La résine SU-8 est déposée sur la plaque de silicium par enduction centrifuge (3000 tr/min, 30s) afin d'obtenir l'épaisseur voulue (10µm ou 100µm en fonction du type utilisé SU-8 2010 ou SU-8 2100). L'évaporation des solvants est obtenue avec des rampes de chauffage et de refroidissement très légères afin de minimiser le stress mécanique dans la résine (5°C/min). L'échantillon est soumis à une exposition UV 365 nm de 125mJ/cm² pour une épaisseur de 10µm, et de 250mJ/cm² pour une épaisseur de 100 µm. La plaque est ensuite soumise à un recuit post insolation (« post exposure bake (PEB) ») (4 min à 95°C pour une épaisseur de 10µm et 30 min à 95°C pour une épaisseur de 100µm). Enfin, le développement permet de diluer les parties non réticulées de la résine SU-8 dans un solvant (« SU-8 developer » composé principalement de PGMEA (propylene glycol monomethyl ether acetate)). A la fin de cette étape, les motifs permettant la structuration des microcanaux restent sur la plaque de silicium.

c) Structuration des microcanaux et assemblage final de la puce

Suite à la fabrication du moule, un polymère silicone polydiméthylsiloxane (PDMS) est préparé en le mélangeant avec son agent de durcissement (Sylgard [™]184 silicone elastomer kit de chez Dow, ratio 1:10). Les bulles formées pendant le mélange sont éliminées grâce à un dessiccateur et une pompe à vide. Une fois le PDMS dégazé, il est versé sur le moule SU-8 posé dans une boîte de Pétri, puis placé dans une étuve à 80°C pendant au moins 2 heures afin de terminer le processus de réticulation. Après refroidissement, le PDMS est décollé puis découpé à l'aide d'une lame circulaire afin d'obtenir les formes cylindriques des dispositifs. Ceux-ci sont alors percés à l'aide d'un emporte-pièce pour former le puit central qui contiendra les chimioattractants. La dernière étape consiste à coller le PDMS sur un substrat de verre pour encapsuler les canaux. Cela est obtenu en activant la surface pour transformer la fonction Si-CH₃ du PDMS en Si-OH grâce à un générateur de plasma O₂ ou air. Au contact du verre (SiO₂), une liaison covalente Si-O-Si permanente sera créée.

d) Instrumentation électrique

La puce est équipée d'électrodes interdigitées (distance : 15 µm) imposant un champ suffisamment intense (2000 à 5000 V/cm) pour provoquer l'électroporation irréversible des cellules spécifiques et ainsi induire l'apoptose ou la nécrose des cellules ayant pénétré le système. Un signal carré (tension/fréquence/temps haut : 3 à 7,5 V/1 Hz/100 µs) est délivré par un générateur de fonction (TG2511A TTI) et visualisé par un oscilloscope (TBS1032B Tektronix) pendant l'application sur la puce. La seconde voie de l'oscilloscope est connectée à une résistance de shunt haute précision (0.1 W, LVR01R1000FE70 de chez Vishay) permettant ainsi d'obtenir une image du courant électrique traversant les électrode (4)s. Afin de pouvoir automatiser l'expérience, les instruments sont reliés par un câble USB à un ordinateur (Raspberry Pi 3 Modèle B+, système d'exploitation : Linux Raspbian 9 (Stretch)). La communication « virtual instrument software architecture » (VISA) est assurée par la bibliothèque « open source » PyVISA et un script Python est exécuté régulièrement par le programme crontab du système d'exploitation.

e) Fabrication de la matrice de libération

Une solution aqueuse d'alginate à 3% (w/v) a été déposée dans un moule poreux ayant la forme du réservoir de la puce. Le moule est immergé dans un bain de réticulation de chlorure de calcium durant 24h. Après 3 lavages à l'eau miliQ, la matrice est congelée à -20°C puis lyophilisée.

Par la suite, la matrice est déposée délicatement dans la puce.

Exemple 2 : Etude du profil de libération de cytokine

(A) Afin de le protéger de la protéolyse enzymatique *in vitro* et *in vivo*, le composé chimioattractant SDF-1 est usuellement complexé à de la BSA (Bovine Serum Albumin) à raison de 1.51 molécules de BSA pour 10 molécules de SDF-1. La BSA est une grosse protéine de sérum de veau de 6 kDA alors que le SDF-1 est une petite cytokine de 8kDA. La libération de SDF-1 à partir de la matrice se faisant par diffusion, c'est la molécule de plus gros rayon hydrodynamique qui impactera le plus la diffusion du complexe : soit la BSA. C'est pourquoi, dans un premier temps, ce modèle a été utilisé pour étudier le profil de libération du composé SDF-1 à partir d'une puce microfluidique fabriquée selon l'exemple 1.

10 Afin de maximiser la détection de concentrations nanométriques, nous avons choisi de détecter la BSA couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur de fluorescence.

Préparation des échantillons :

- Dépôts de 3.2 µg de BSA-FITC sur la matrice lyophilisée d'alginate contenue dans la puce
- Incubation 30 min à 37°C

Début de l'étude :

- Immersion de la puce dans 1.5 ml de PBS dans une boîte hermétique
- Incubation sous agitation à 37°C durant le temps de l'étude, soit 50 jours.
- Prélèvement à différents temps de 750 µl de solution de libération qui seront analysés en HPLC (eau/ acétonitrile).

La colonne utilisée est une colonne prévue pour détecter des protéines telles que la BSA-FITC.

- 750 µl de nouveau PBS est rajouté dans le milieu de libération pour compenser le précédent prélèvement.

Résultats :

Cette étude a permis de mettre en évidence une libération prolongée de la BSA-FITC à partir d'une matrice d'alginate comprise dans une puce microfluidique selon l'invention durant 50 jours avec 99% de libération atteinte après 50 jours (Figure 21).

(B) Dans un deuxième temps, la libération de SDF-1 à partir d'une matrice d'alginate a été quantifiée sur une période de 50 jours à l'aide d'une méthode de détection par ELISA.

Préparation des échantillons :

- Complexation de SDF-1 à la BSA (0.1%)
- 5 - Dépôts de 1 µg de SDF-1 sur la matrice lyophilisée d'alginate
- Incubation 30 min à 37°C

Début de l'étude :

- Immersion de la matrice dans 1.5 ml de PBS dans une boîte hermétique
- Incubation sous agitation à 37°C durant le temps de l'étude, soit 50 jours.
- 10 - Prélèvement à différents temps de 750 µl d'échantillons de solution de libération qui seront analysés par un kit ELISA spécifique de la détection de SDF-1, suivant les indications du fournisseur.
- 750 µl de nouveau PBS est rajouté dans le milieu de libération pour compenser le précédent prélèvement.

15 Résultats :

Cette étude a permis de mettre en évidence une libération prolongée de SDF-1 à partir de la matrice d'alginate seule durant 23 jours avec 40 % de libération atteinte après 23 jours (Figure 22).

Exemple 3 : Mise en œuvre de la puce microfluidique *in vitro*

20 A) Capacité d'attraction des cellules à l'intérieur de la puce

La puce microfluidique a été mise en œuvre *in vitro* pour tester sa capacité à attirer les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 qui sont des cellules épithéliales de tumeurs mammaires. Le composé SDF-1 « stromal cell-derived factor » correspond au composé chimioattractant apte à attirer les cellules MDA-MB-231.

- 25 1) Les cellules MDA-MB-231 stablement transfectées avec la « green fluorescent protein » (GFP) sont trypsinisées à J0. Puis 20 000 cellules sontensemencées dans une boîte de pétri de 35 mm contenant en son centre la puce microfluidique. Les cellules sont cultivées dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12) + Glutamax + 1% sérum de veaux foetal (SVF) + 1% d'antibiotique (streptomycine, pénicilline).

Le réservoir central de la puce microfluidique est chargé soit avec 33 µl de DMEM F12 + Glutamax + 1% SVF+ 1% d'antibiotique (streptomycine, pénicilline) (Figure 8) soit avec 33 µl de DMEM F12 + Glutamax + 10 µl de SVF pur + 1% d'antibiotique (streptomycine, pénicilline). (Figure 9). Après 7 jours de culture dans un incubateur CO2 5% et une humidité de 95 % on réalise des photographies à partir d'un microscope inversé à fluorescence.

On constate que les cellules se déplacent en direction du et en particulier dans le réservoir dans les deux conditions testées, avec une plus grande quantité de cellules en présence de 10 µl de SVF pur au sein du réservoir.

2) Les cellules MDA-MB-231 stablement transfectées avec la « green fluorescent protein » (GFP) sont trypsinisées à J0. Puis 100 000 cellules sontensemencées dans une boîte de pétri de diamètre 50 mm, la puce microfluidique étant placée au centre de cette boîte de pétri. Les cellules sont cultivées dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12) + Glutamax + 1% sérum de veaux foetal (SVF) + 1% d'antibiotique (streptomycine, pénicilline).

Le réservoir central de la puce microfluidique est chargé soit avec 50 µl de DMEM F12 + Glutamax + 1% SVF+ 1% d'antibiotique (streptomycine, pénicilline) (Figures 10 et 11) soit avec 50 µl de DMEM F12 + Glutamax + SVF 10 µl + 1% antibiotique (streptomycine, pénicilline) (Figures 12 et 13) soit avec 50 µl de DMEM F12 + Glutamax + 1 µg SDF-1 + 1% antibiotique (streptomycine, pénicilline) (Figures 14 et 15).

Après 8 jours de culture dans un incubateur CO2 5% et humidité 95% on réalise des photographies à partir d'un microscope inversé à fluorescence.

On constate que les cellules se déplacent en direction du et en particulier dans le réservoir dans toutes les conditions testées, notamment en présence d'un gradient de sérum de veau foetal (Figures 12 et 13) et encore plus significativement en présence d'un gradient de composé SDF-1 (Figures 14 et 15).

B) Capacité de destruction des cellules par une électrode interdigitée

1) La capacité d'une électrode interdigitée générant un champ électrique à détruire les cellules MDA-MB-231 a été testée. Pour ce faire, les cellules MDA-MB-231 stablement transfectées avec la « green fluorescent protein » (GFP) sont trypsinisées à J0. Puis 60 000 cellules sontensemencées dans un puit en PDMS fixé sur une lame de verre à l'intérieur

duquel est disposée une électrode interdigitée circulaire. Le milieu de culture utilisé est : DMEM F12 + Glutamax + SVF 10% + 1% antibiotique (streptomycine, pénicilline).

Après 48h de culture dans un incubateur CO₂ 5% et humidité 95% on obtient un tapis cellulaire qui recouvre l'ensemble de la lame de verre contenant l'électrode interdigitée (Figure 16), puis on réalise une électroporation des cellules par application d'un champ électrique de 5v 100µs 1 hertz sur la lame, après 3 heures on réalise des photographies à partir d'un microscope inversé à fluorescence (Figure 17).

On constate qu'environ 70% des cellules sont détruites après 3 heures suivant l'électroporation.

2) La capacité d'une puce microfluidique selon l'invention à attirer et à détruire les cellules MDA-MB-231 par électroporation a été testée.

Pour ce faire, les cellules MDA-MB-231 stablement transfectées avec la « green fluorescent protein » (GFP) sont trypsinisées à J0. Puis 50 000 cellules sontensemencées dans une boîte de pétri de diamètre 50 mm, la puce microfluidique comprenant une électrode interdigitée et deux réseaux de microcanaux étant placée au centre de cette boîte de pétri. Les cellules sont cultivées dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12) + Glutamax + 1% sérum de veaux foetal (SVF) + 1% d'antibiotique (streptomycine, pénicilline).

Trois conditions sont testées :

- Le réservoir central de la puce est chargé avec 50 µl DMEM F12 + Glutamax + SVF 1% (sérum de veau foetal) + 1% antibiotique (streptomycine, pénicilline) en l'absence de gradient et sans champ électrique pulsé (Figure 18)
- Le réservoir central de la puce est chargé avec 50 µl de DMEM F12 + Glutamax + SDF-1 1 µg + 1% antibiotique (streptomycine, pénicilline) sans champ électrique pulsé (Figure 19)
- Le réservoir central de la puce est chargé avec 50 µl de DMEM F12 + Glutamax + SDF-1 1 µg + 1% antibiotique (streptomycine, pénicilline) avec champ électrique pulsé (Figure 20)

Après 3 jours de culture des électroporations sont appliquées en condition C toutes les 3 heures (5v 100 ms 1 hertz) durant 7 jours de culture dans un incubateur CO₂ 5% et

humidité 95%. On réalise des photographies à partir d'un microscope inversé à fluorescence.

Cette étude a permis de mettre en évidence que les cellules MDA-MB-231 sont attirées vers le réservoir central et restent localisées dans l'espace situé entre les deux réseaux de microcanaux en présence du gradient de chimioattractant SDF-1 et en absence de champ électrique.

En présence du chimioattractant SDF-1 et du champ électrique pulsé appliqué toutes les 3 heures (5v 100µs 1hertz), les cellules franchissent le premier réseau de microcanaux puis sont électroporées.

10 Dans tous les cas, les cellules ne sont pas capables de franchir les deux réseaux de microcanaux.

Ces différentes expériences ont permis de mettre en évidence la capacité de la puce microfluidique à attirer et à détruire un élément biologique, et en particulier que ladite puce est capable d'attirer des cellules tumorales du cancer du sein (MDA-MB-231) soit à partir d'un gradient de sérum de veaux fœtal soit de façon plus significative à partir d'un gradient de chimioattractant SDF-1 et qu'il est possible de détruire ces mêmes cellules tumorales à partir d'un champ électrique pulsé.

Revendications

[Revendication 1] Puce microfluidique pour attirer et détruire un élément biologique spécifique, ladite puce comprenant :

- un réservoir (1) constitué d'une matrice comprenant un composé chimioattractant capable d'attirer l'élément biologique
- au moins un réseau de microcanaux (2) disposé entre le réservoir (1) et le milieu extérieur (3) de la puce et permettant de laisser passer le composé chimioattractant vers ledit milieu et de laisser passer l'élément biologique présent dans ledit milieu en direction du réservoir (1)
- au moins une électrode (4) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2) ou au même endroit que le réseau de microcanaux (2), ladite électrode étant apte à générer un champ électrique de façon à détruire l'élément biologique lors de son passage vers le réservoir (1).

[Revendication 2] Puce microfluidique selon la revendication 1, comprenant une partie inférieure (5) comprenant une partie du réservoir (1), le réseau de microcanaux (2) et l'électrode (4), et une partie supérieure (6) comprenant une partie du réservoir (1) et apte à être disposée sur la partie inférieure (5), lesdites parties étant fixées entre elles.

[Revendication 3] Puce microfluidique selon l'une des revendications 1 à 2, dans laquelle le réservoir (1), le réseau de microcanaux (2) et l'électrode (4) sont de forme annulaire et dans laquelle le réservoir est situé au centre de la puce.

[Revendication 4] Puce microfluidique selon l'une des revendications 2 à 3, dans laquelle la partie supérieure (6) et / ou la partie inférieure (5) comprennent une cavité annulaire i) (8) apte à recevoir la matrice comprenant le composé chimioattractant par l'intermédiaire d'une ou plusieurs ouvertures (9) communiquant avec le milieu extérieur (3) et débouchant dans ladite cavité, et une cavité annulaire ii) (10) disposée entre le réservoir (1) et le réseau de microcanaux (2) apte à recevoir un liquide dans lequel le composé chimioattractant est apte à diffuser, par l'intermédiaire d'une ou plusieurs ouvertures (11) communiquant avec le milieu extérieur (3) et débouchant dans ladite cavité.

[Revendication 5] Puce microfluidique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, dans laquelle la partie supérieure (6) et la partie inférieure (5) sont composées d'un matériau biocompatible.

5 [Revendication 6] Puce microfluidique selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle la matrice comprenant le composé chimioattractant est composée d'un matériau biocompatible, de préférence un polymère réticulé.

10 [Revendication 7] Puce microfluidique selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle le pourcentage massique composé chimioattractant / matrice du réservoir (1) est compris entre 0,1 et 20 %, de préférence entre 0,5 et 10 % et de préférence encore entre 0,5 et 5%.

15 [Revendication 8] Puce microfluidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le composé chimioattractant compris dans le réservoir (1) est choisi parmi au moins un des composés suivants : CXCL12, CCL5, CCL2, CCL3, CCL7, CCL19, CCL21, CCL22, CCL25, CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CX3CL1, TGF alpha, TGF beta, FGF, PDGF, EGF, VEGF.

20 [Revendication 9] Puce microfluidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle chaque microcanal compris dans le réseau de microcanaux (2) présente une hauteur comprise entre 1 et 40 μm , une largeur comprise entre 1 et 40 μm , une longueur comprise entre 30 et 250 μm .

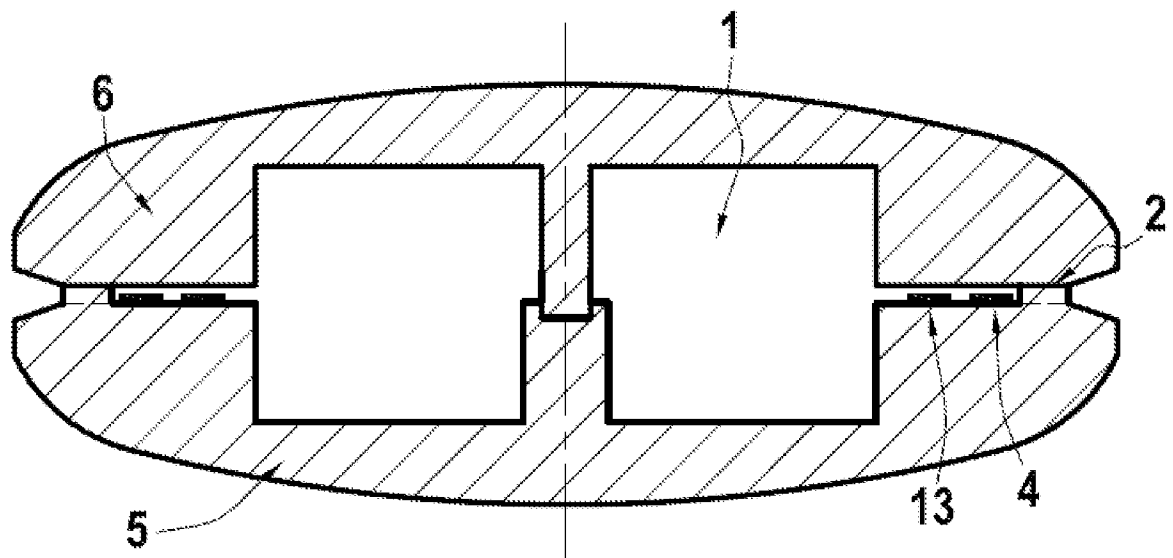
25 [Revendication 10] Puce microfluidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle l'électrode (4) est une électrode interdigitée.

[Revendication 11] Puce microfluidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle l'électrode (4) est une électrode sans fil ladite puce
30 comprenant une antenne activable par une deuxième antenne.

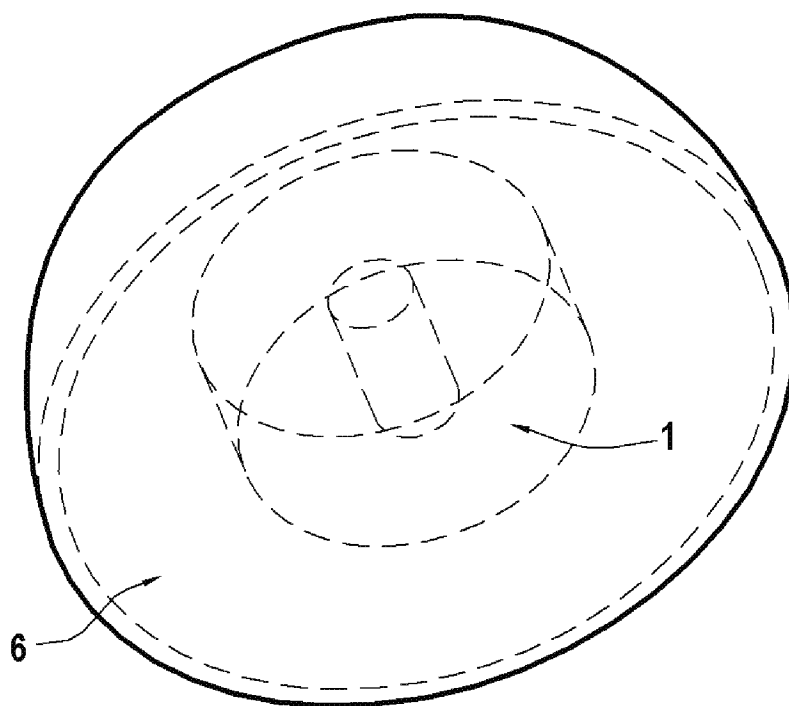
[Revendication 12] Puce microfluidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le champ électrique généré par l'électrode (4) est apte à détruire par électroporation irréversible l'élément biologique.

- 5 [Revendication 13] Puce microfluidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le champ électrique généré par l'électrode (4) est un champ électrique pulsé compris entre 1000 V/cm et 6500 V/cm de tension, de préférence entre 3000 V/cm et 5000 V/cm, 1 Hz de fréquence et une durée comprise entre 100 μ s et 200 μ s.

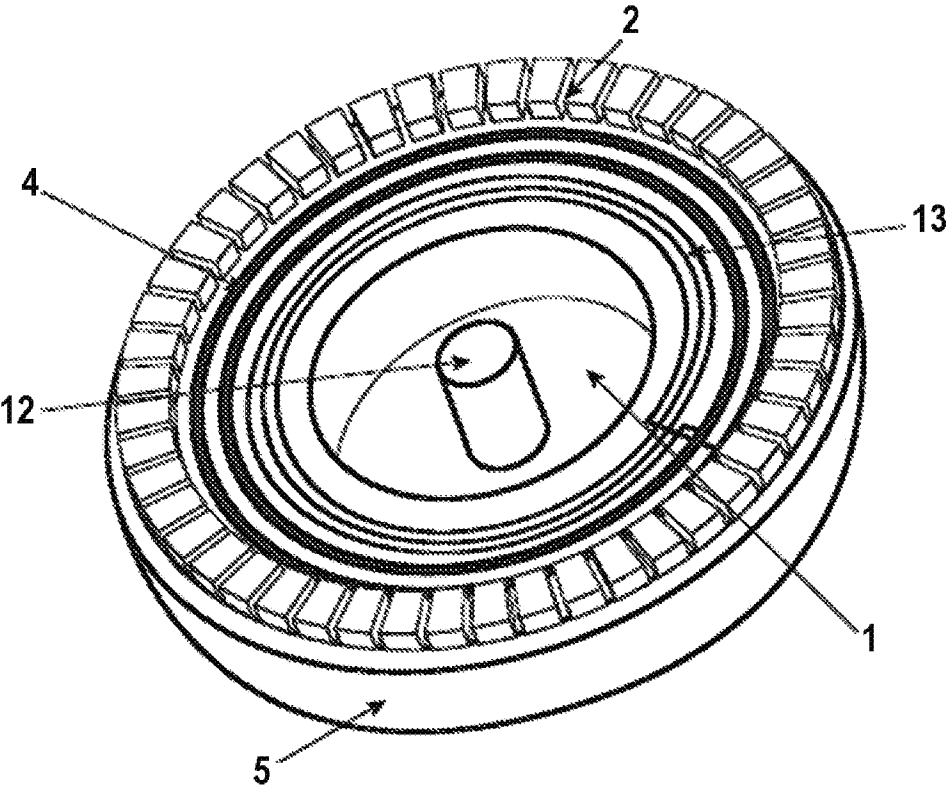
[Fig. 1]



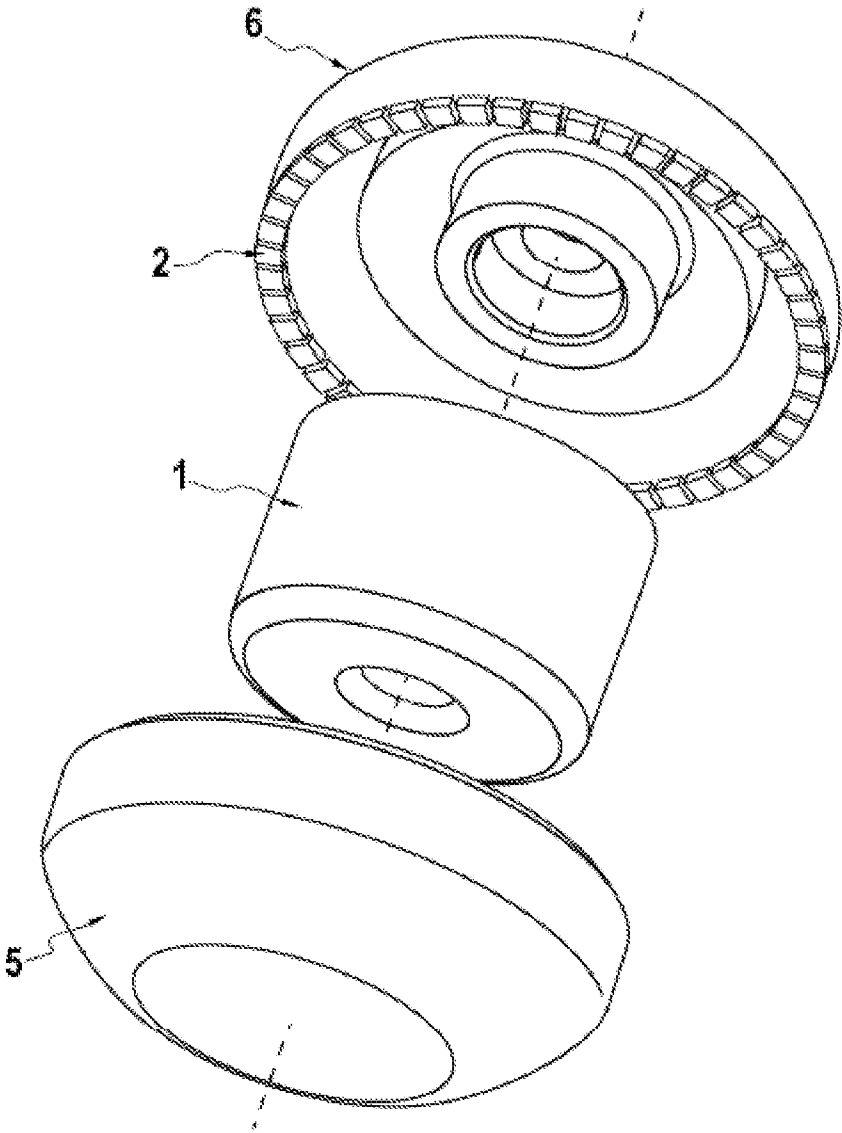
[Fig. 2]



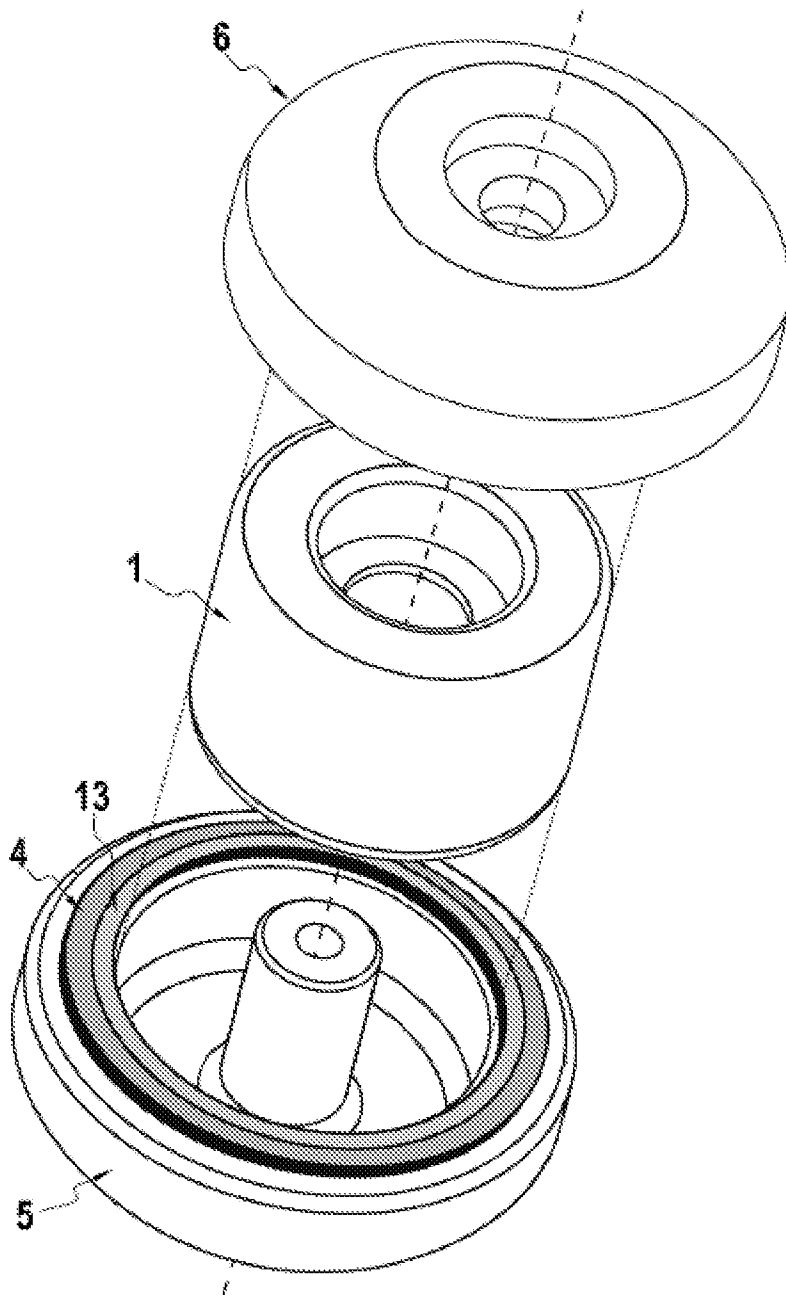
[Fig. 3]



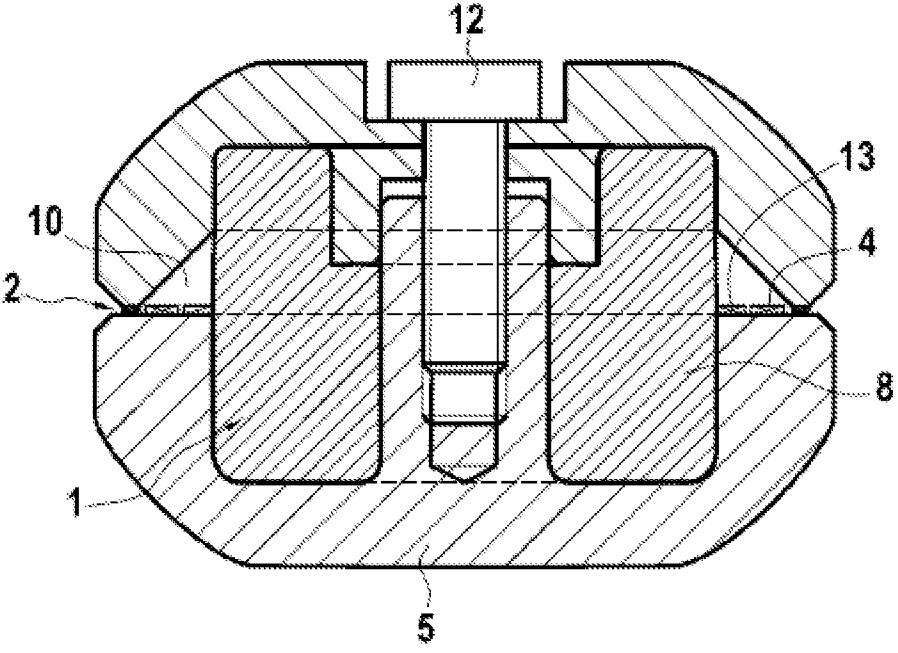
[Fig. 4]



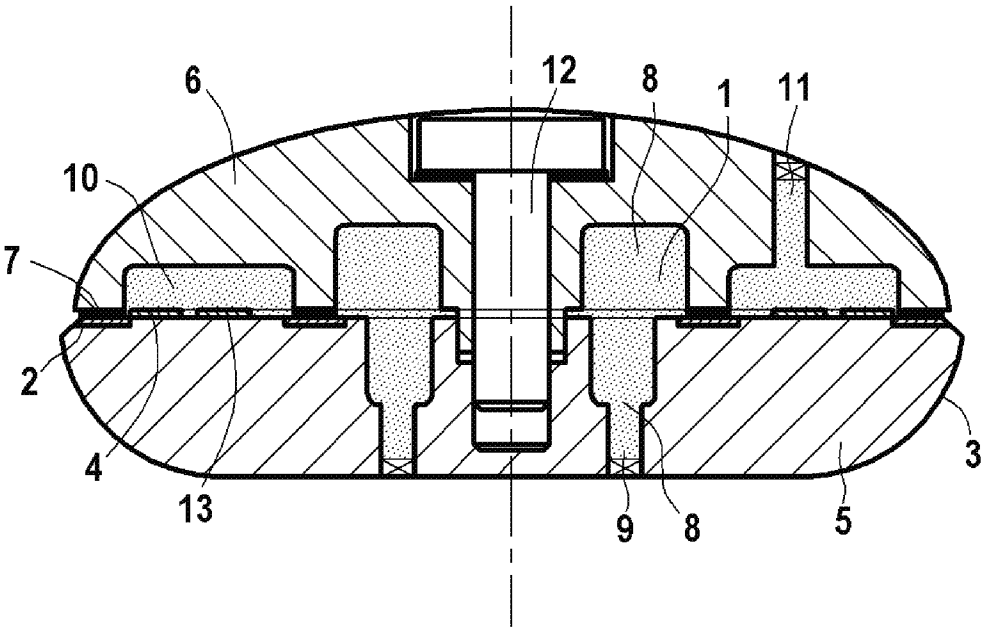
[Fig.5]



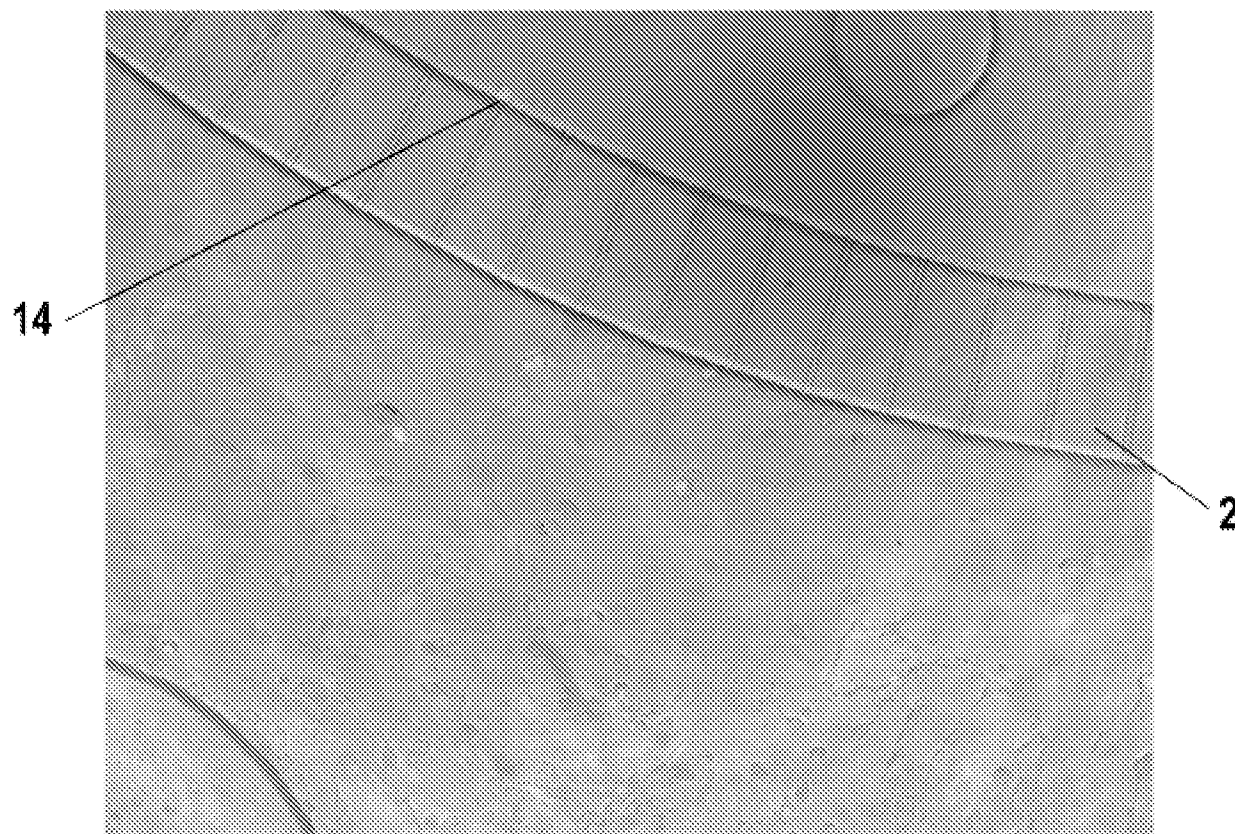
[Fig.6]



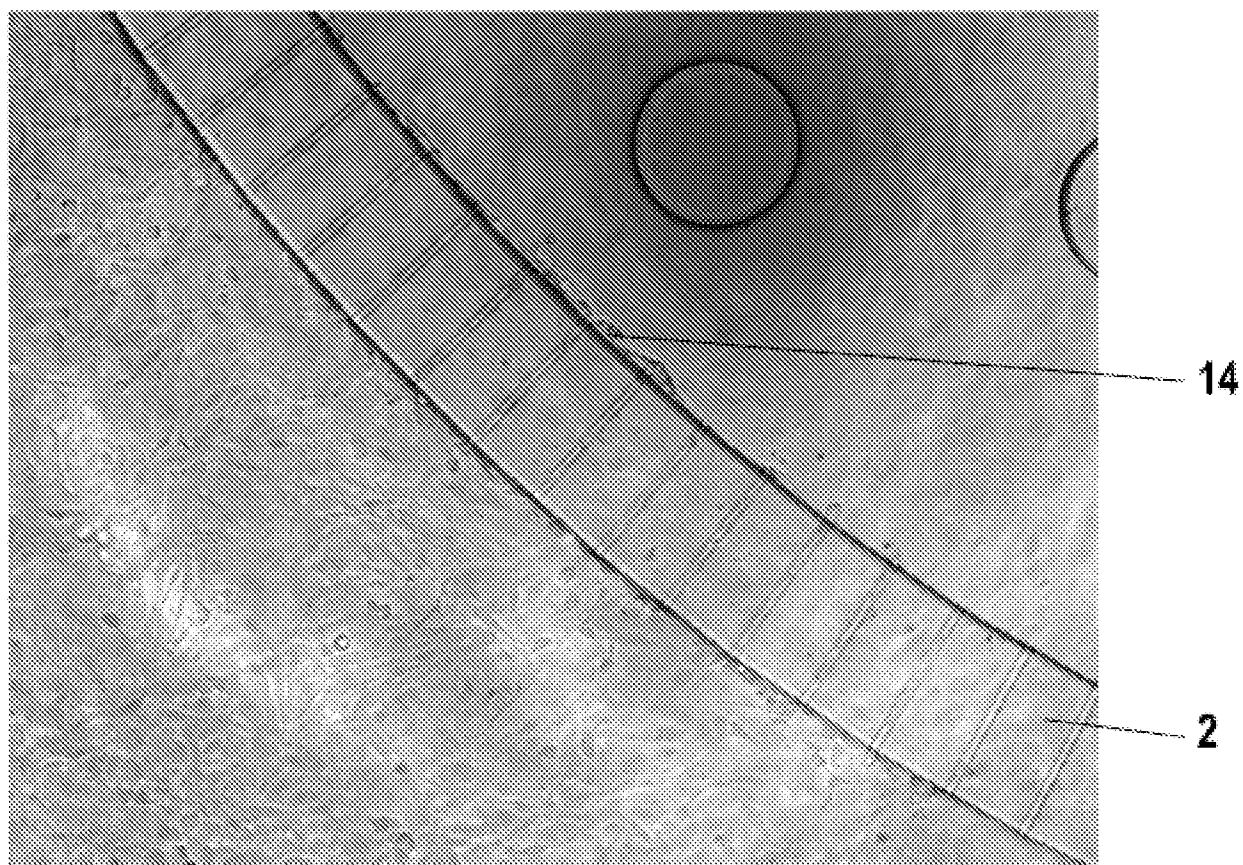
[Fig.7]



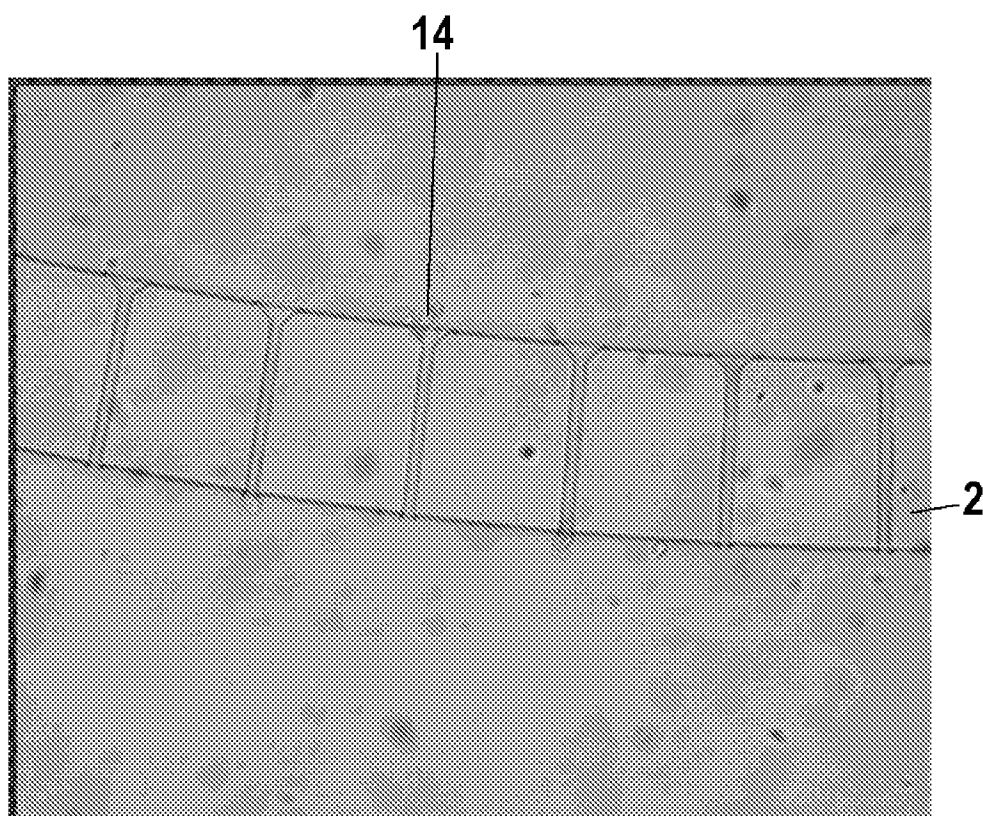
[Fig. 8]



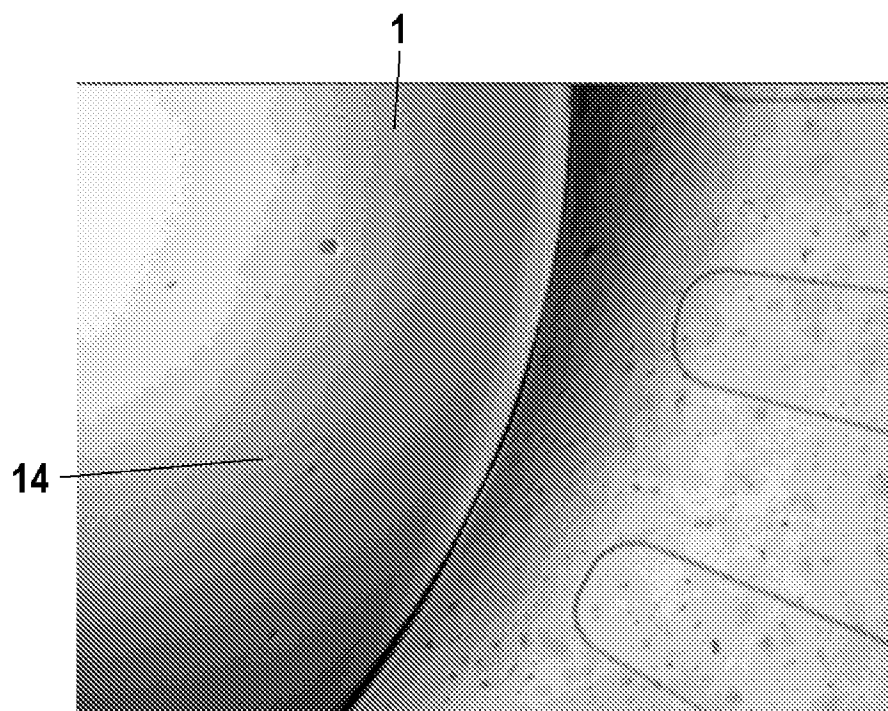
[Fig. 9]



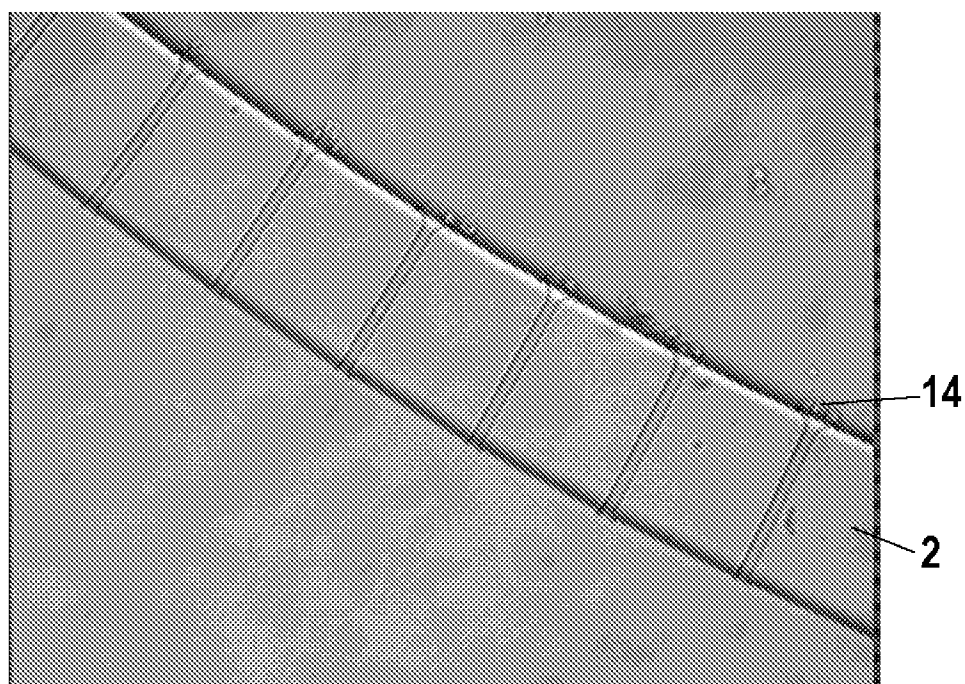
[Fig. 10]



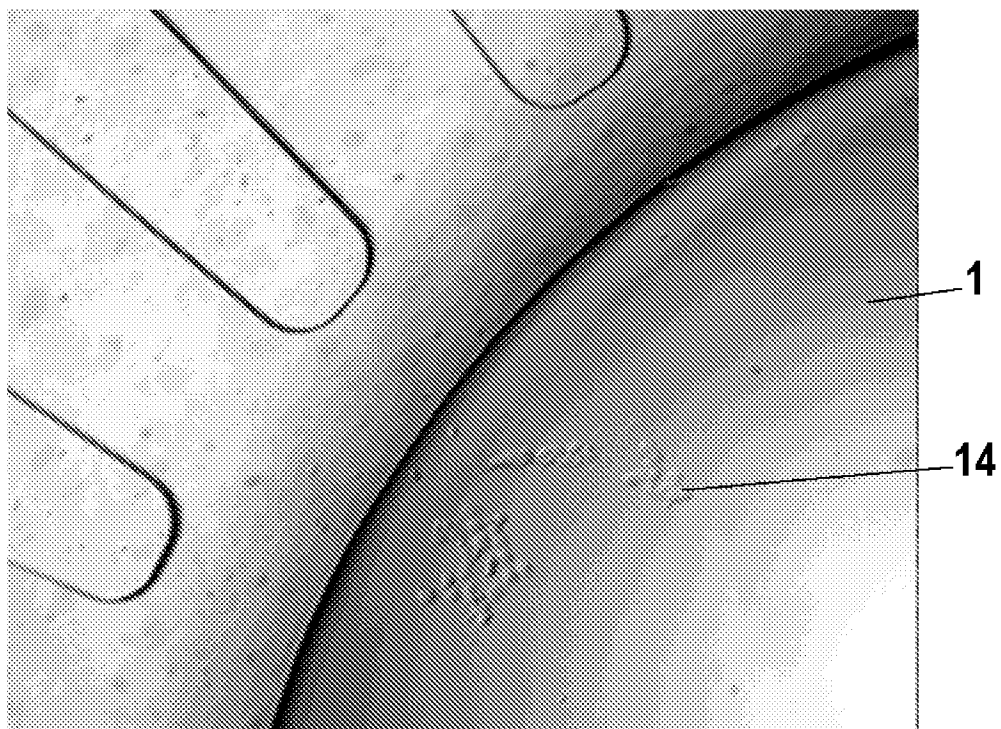
[Fig. 11]



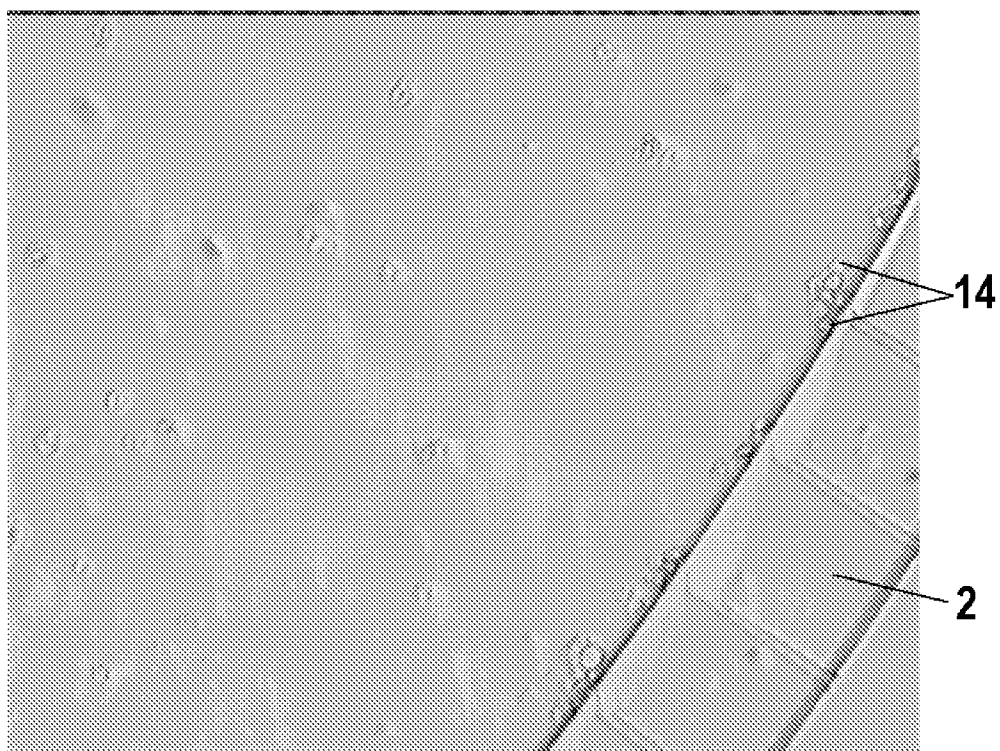
[Fig. 12]



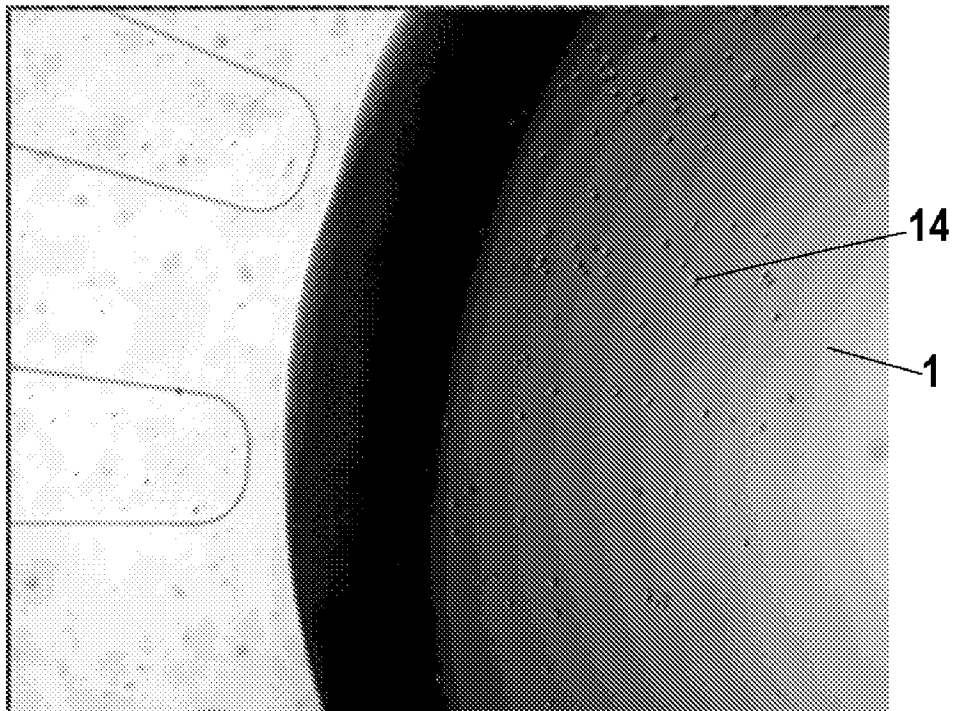
[Fig. 13]



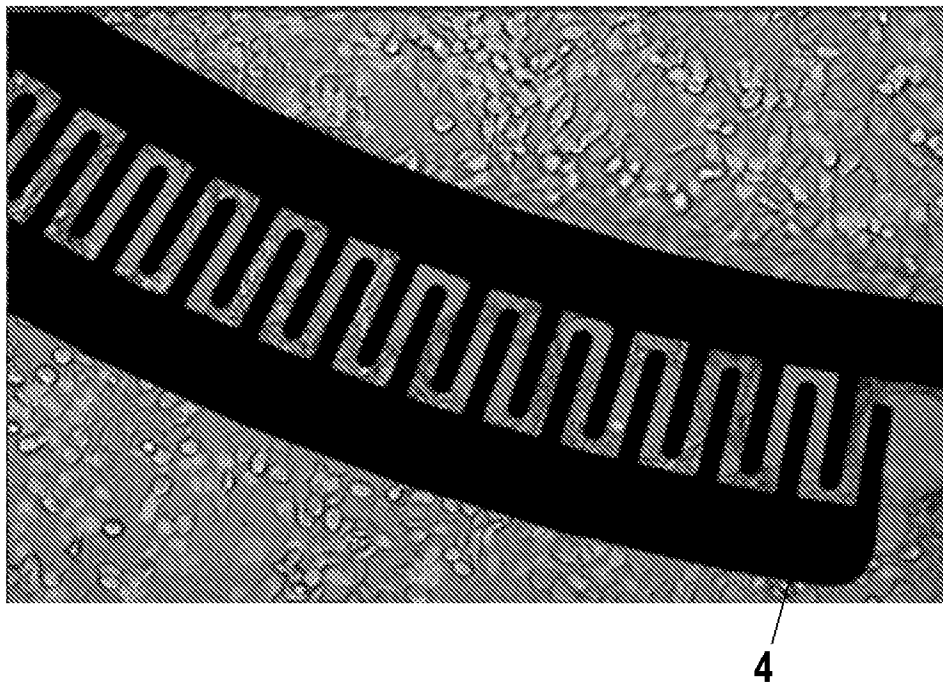
[Fig. 14]



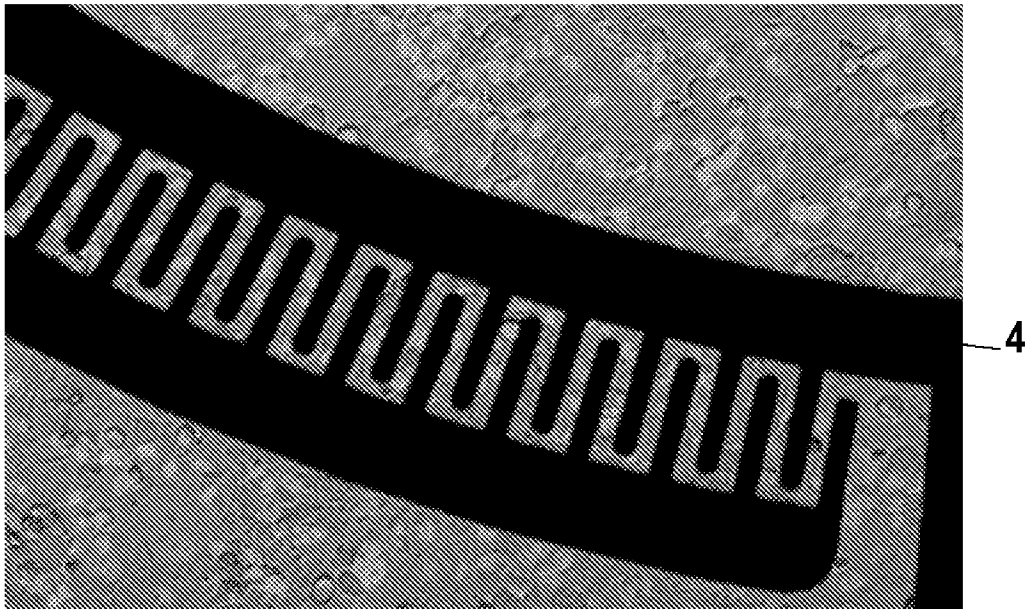
[Fig. 15]



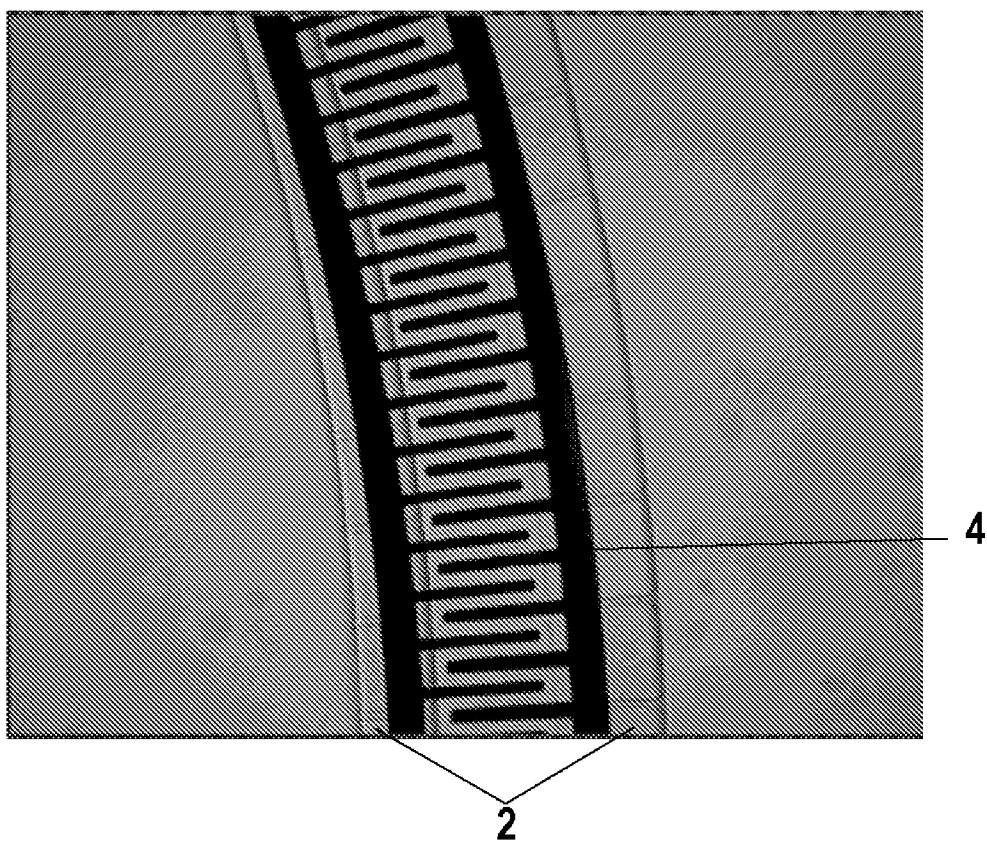
[Fig. 16]



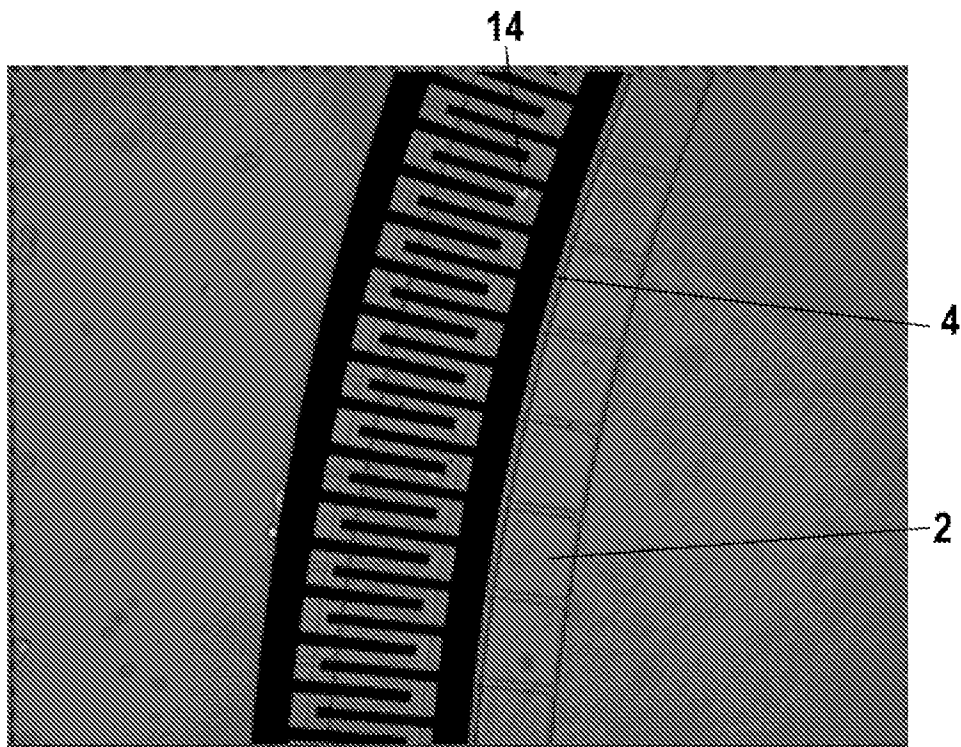
[Fig. 17]



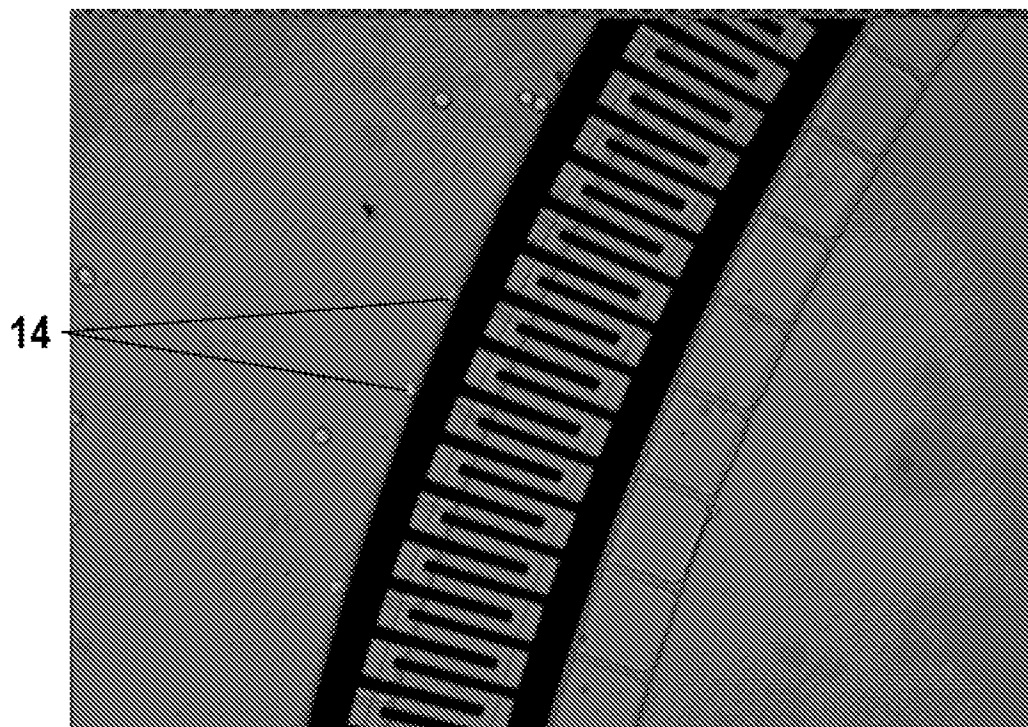
[Fig. 18]



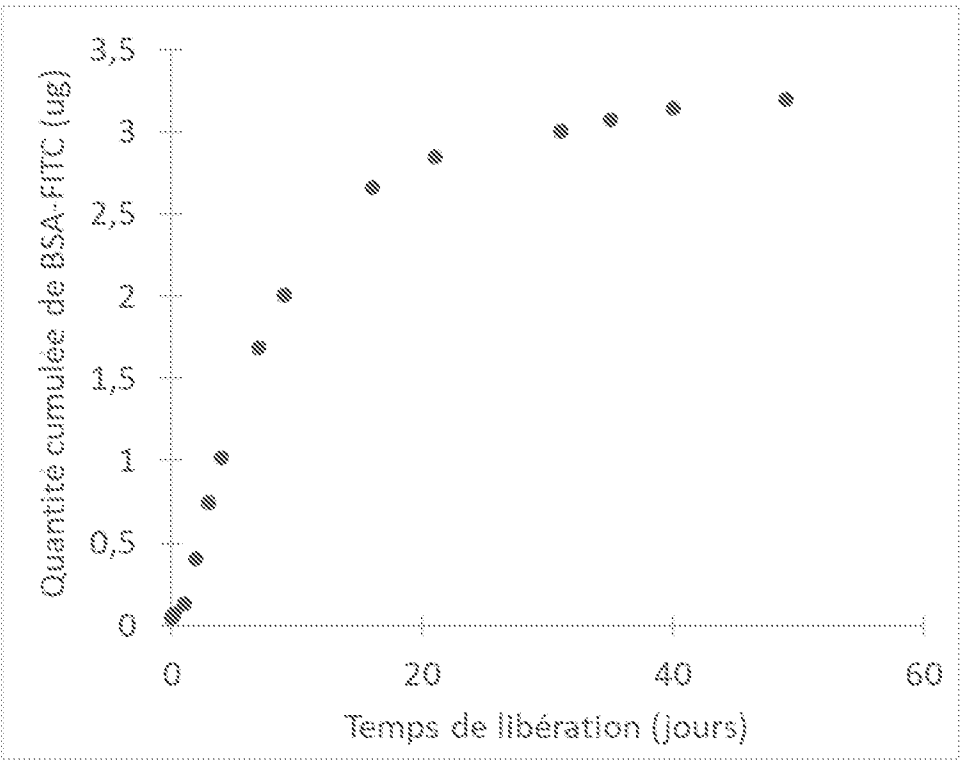
[Fig. 19]



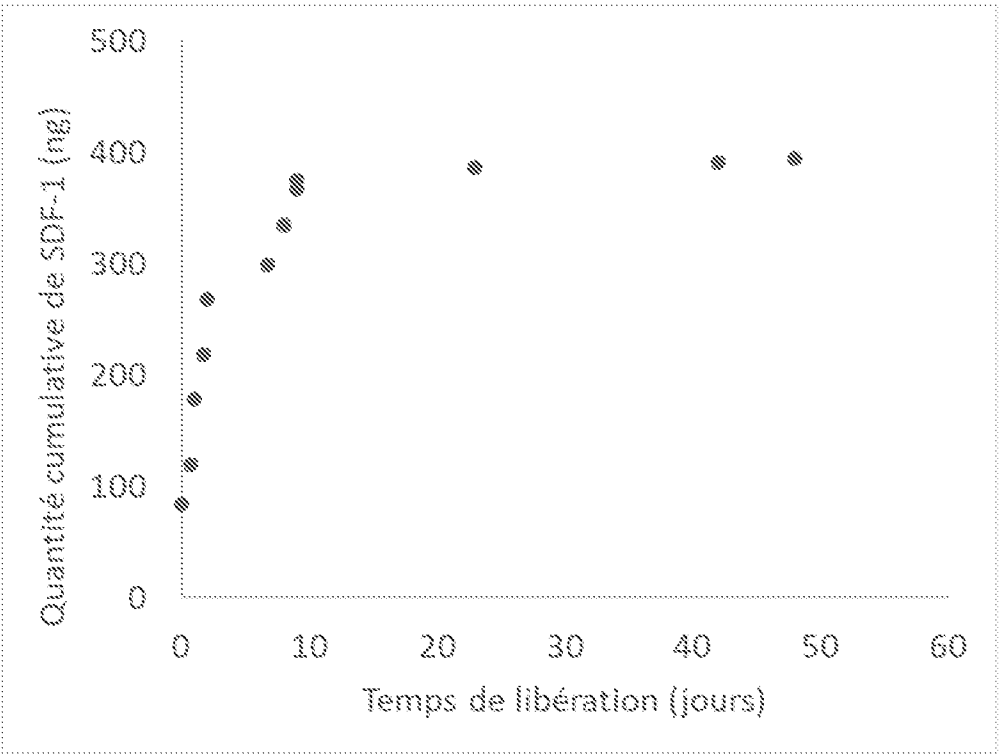
[Fig. 20]



[Fig. 21]



[Fig. 22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2020/050527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61N 1/40 (2006.01)i 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) A61N 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, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SANG KYUNG KIM ET AL. "Continuous Low-Voltage dc Electroporation on a Microfluidic Chip with Polyelectrolytic Salt Bridges" <i>ANALYTICAL CHEMISTRY</i> , Vol. 79, No. 20, 18 September 2007 (2007-09-18), pages 7761-7766 DOI: 10.1021/ac071197h ISSN: 0003-2700, XP055112911 the whole document	1-13
Y	US 2012322685 A1 (CONDEELIS JOHN S [US] ET AL) 20 December 2012 (2012-12-20) paragraphs [0052] - [0055]; figure 2	1-13
A	US 2018111124 A1 (ANAND ROBBYN K [US] ET AL) 26 April 2018 (2018-04-26) cited in the application the whole document	1-13
A	WO 2018089989 A1 (CHARLES STARK DRAPER LABORATORY INC [US]) 17 May 2018 (2018-05-17) cited in the application the whole document	1-13
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 22 July 2020		Date of mailing of the international search report 03 August 2020
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Aronsson, Fredrik Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2020/050527

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009043346 A1 (PALT I YORAM [IL] ET AL) 12 February 2009 (2009-02-12) the whole document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2020/050527

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2012322685	A1	20 December 2012	CA	2788556	A1	28 July 2011
				EP	2528510	A1	05 December 2012
				US	2012322685	A1	20 December 2012
				WO	2011090778	A1	28 July 2011
US	2018111124	A1	26 April 2018	NONE			
WO	2018089989	A1	17 May 2018	EP	3538215	A1	18 September 2019
				US	2018133500	A1	17 May 2018
				WO	2018089989	A1	17 May 2018
US	2009043346	A1	12 February 2009	CA	2696352	A1	19 February 2009
				CN	101820947	A	01 September 2010
				DK	2183024	T3	24 June 2019
				EP	2183024	A1	12 May 2010
				ES	2739384	T3	30 January 2020
				JP	5485153	B2	07 May 2014
				JP	2010536406	A	02 December 2010
				PT	2183024	T	01 August 2019
				US	2009043346	A1	12 February 2009
				WO	2009022225	A1	19 February 2009

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61N1/40
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)
A61N

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, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SANG KYUNG KIM ET AL: "Continuous Low-Voltage dc Electroporation on a Microfluidic Chip with Polyelectrolytic Salt Bridges", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 79, no. 20, 18 septembre 2007 (2007-09-18), pages 7761-7766, XP055112911, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac071197h le document en entier	1-13
Y	US 2012/322685 A1 (CONDEELIS JOHN S [US] ET AL) 20 décembre 2012 (2012-12-20) alinéas [0052] - [0055]; figure 2 ----- -/-	1-13



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

22 juillet 2020

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/08/2020

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

Aronsson, Fredrik

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2018/111124 A1 (ANAND ROBBYN K [US] ET AL) 26 avril 2018 (2018-04-26) cité dans la demande le document en entier -----	1-13
A	WO 2018/089989 A1 (CHARLES STARK DRAPER LABORATORY INC [US]) 17 mai 2018 (2018-05-17) cité dans la demande le document en entier -----	1-13
A	US 2009/043346 A1 (PALTI YORAM [IL] ET AL) 12 février 2009 (2009-02-12) le document en entier -----	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2020/050527

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2012322685 A1	20-12-2012	CA 2788556 A1	28-07-2011
		EP 2528510 A1	05-12-2012
		US 2012322685 A1	20-12-2012
		WO 2011090778 A1	28-07-2011

US 2018111124 A1	26-04-2018	AUCUN	

WO 2018089989 A1	17-05-2018	EP 3538215 A1	18-09-2019
		US 2018133500 A1	17-05-2018
		WO 2018089989 A1	17-05-2018

US 2009043346 A1	12-02-2009	CA 2696352 A1	19-02-2009
		CN 101820947 A	01-09-2010
		DK 2183024 T3	24-06-2019
		EP 2183024 A1	12-05-2010
		ES 2739384 T3	30-01-2020
		JP 5485153 B2	07-05-2014
		JP 2010536406 A	02-12-2010
		PT 2183024 T	01-08-2019
		US 2009043346 A1	12-02-2009
		WO 2009022225 A1	19-02-2009
