

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication : **3 038 719**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **15 60595**

⑤1 Int Cl⁸ : **G 01 N 1/40 (2015.01), G 01 N 27/447**

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 **SYSTEME DE CONCENTRATION, PRECONCENTRATION PAR EMPILEMENT D'ECHANTIL-
LON ET/OU PURIFICATION POUR ANALYSE.**

②2 **Date de dépôt** : 04.11.15.

③0 **Priorité** : 10.07.15 FR 1556605.

④3 **Date de mise à la disposition du public
de la demande** : 13.01.17 Bulletin 17/02.

④5 **Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention** : 29.04.22 Bulletin 22/17.

⑤6 **Liste des documents cités dans le rapport de
recherche** :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 **Références à d'autres documents nationaux
apparentés** :

Demande(s) d'extension :

⑦1 **Demandeur(s)** : *PICOMETRICS TECHNOLOGIE
Société par actions simplifiée — FR.*

⑦2 **Inventeur(s)** : *GINOT FREDERIC et
ANDRIAMANAMPISOA COMTET-LOUIS.*

⑦3 **Titulaire(s)** : *PICOMETRICS TECHNOLOGIE
Société par actions simplifiée.*

⑦4 **Mandataire(s)** : *CASSIOPi Société à responsabilité
limitée.*

FR 3 038 719 - B1



DOMAINE TECHNIQUE DE L'INVENTION

La présente invention vise un système de concentration, préconcentration par empilement d'échantillon (« stacking ») et/ou de purification pour analyse ou pour préparation d'échantillons chimiques ou biologiques. Elle s'applique, en particulier, à la concentration, à la préconcentration (« stacking ») et à la purification en ligne en amont d'instruments de préparation d'analyses ou d'instruments d'analyse, par exemple par électrophorèse capillaire.

ETAT DE LA TECHNIQUE

En chimie analytique, ou en analyse biologique in vitro, il est très fréquent de devoir concentrer et purifier un échantillon avant de l'analyser.

Ainsi, une analyse par électrophorèse capillaire nécessite des échantillons suffisamment purs et concentrés. L'électrophorèse capillaire est une technique analytique qui permet une haute efficacité de séparation sur les petites et grosses molécules. L'instrument d'électrophorèse capillaire est composé d'un capillaire de silice fondue avec fenêtre de détection, une source de haute tension, deux électrodes, deux réservoirs de tampon et un détecteur optique d'absorbance ou de fluorescence.

Après avoir rempli le capillaire de solution tampon, on injecte l'échantillon à l'entrée du capillaire. Une tension est appliquée aux bornes du capillaire. Les molécules sont alors séparées selon un flux électroosmotique et électrophorétique.

Pour augmenter la sensibilité de l'analyse, on utilise souvent une détection à fluorescence induite par laser (LIF) ou diode électroluminescente (LEDIF), dans laquelle l'analyte est marqué par un fluorochrome qui est détecté et/ou quantifié par fluorescence induite. Cette technique de détection est plus sensible et plus sélective que la détection classique par absorbance de lumière UV. En effet, seules les molécules qui fluorescent naturellement ou dérivées chimiquement sont détectées.

Une autre façon d'augmenter la sensibilité de l'analyse, avec ou sans détection de fluorescence induite par laser ou diode électroluminescente, est d'utiliser des techniques de pré-concentration en ligne, encore appelée « stacking ».

La technique de la préconcentration par empilement d'échantillon (plus connue de l'homme du métier sous le terme anglais de « stacking » et ci-après désignée par « stacking ») la plus fréquemment utilisée (Field-Amplified Sample Stacking) est basée sur une différence de conductivité entre le tampon d'analyse et l'échantillon.

5 Le fait de diluer l'échantillon dans l'eau avant injection plutôt que dans du tampon entraîne une accumulation frontale de l'échantillon et contribue à obtenir des pics plus hauts et plus fins, donc une meilleure sensibilité d'analyse et une meilleure résolution. D'autres techniques de pré-concentration en ligne existent pour l'électrophorèse capillaire. Elles nécessitent presque toutes de pouvoir maîtriser
10 finement le contenu en ions de l'échantillon et du tampon d'analyse, ce qui peut obliger à devoir purifier préalablement l'échantillon.

Ces techniques d'augmentation de la sensibilité de l'analyse ne sont pas toujours suffisantes pour éviter de devoir concentrer l'échantillon au préalable. Le chimiste ou le biologiste doit alors concentrer l'échantillon en amont de l'analyse,
15 souvent manuellement. Ainsi, en biologie moléculaire, ou en immunologie, il existe de nombreux kits manuels permettant de purifier et de concentrer son échantillon avant analyse. Ces étapes off-line de purification et de concentration sont longues et fastidieuses, parfois coûteuses, et comportent un risque de perdre ou de détériorer l'échantillon au cours des opérations.

20 Cette problématique de pureté des échantillons et de leur concentration est une problématique générale de l'analyse en chimie ou en biologie. Elle est présente pour toutes les analyses, comme l'électrophorèse en gel, les chromatographies, les analyses optiques (spectrales, chirales, de fluorescence, d'absorption, de turbidité,...), les spectrométries de masse, les tests homogènes de binding comme
25 les immunoanalyses, les tests électrochimiques, le séquençage de l'ADN, etc. Quelles que soient les analyses, il est souvent intéressant de disposer d'une méthode de pré-concentration en ligne des échantillons, qui fonctionne même avec des échantillons non ou faiblement purifiés. Dans le cas contraire, l'opérateur doit mettre en œuvre des méthodes de purification et/ou de concentration en amont de
30 l'analyse, avec les inconvénients déjà cités ci-dessus dans le cas de l'électrophorèse capillaire.

La pureté et la concentration des produits biochimiques ou biologiques est aussi une problématique que l'on rencontre en bio-production de produits actifs pour la santé. Dans ce type de production, on part d'un grand volume de produit, par

exemple un volume de cellules, contenant le produit d'intérêt, suspendues dans leur milieu de culture, et on veut obtenir en fin de processus le produit thérapeutique extrêmement pur dans un volume typiquement 100 à 1000 fois plus faible que le volume de départ. Le processus est composé en général de plusieurs étapes, qui
5 dépendent du produit thérapeutique à purifier. Très souvent, les premières étapes comportent une ou plusieurs chromatographies qui permettent à la fois de purifier et de concentrer en partie le produit. Très souvent aussi, la dernière étape est une ultra-filtration pour concentrer le produit purifié. Dans ces procédés, le rendement et la vitesse de chaque étape sont des critères clés de pilotage pour le développement
10 du processus industriel. Multiplier les étapes permet souvent d'obtenir de très bonnes puretés de produit, mais augmente les coûts directs et indirects de production, d'autant plus que cette multiplication d'étapes diminue les rendements. Il est donc avantageux de disposer de procédés permettant à la fois de purifier et de concentrer dans un temps court, donc avec un fort débit.

15

OBJET DE L'INVENTION

La présente invention vise à remédier à tout ou partie de ces inconvénients.

A cet effet, selon un premier aspect, la présente invention vise un système de traitement de molécules ou particules d'intérêt véhiculées par un liquide viscoélastique, système qui comporte :
20

- un moyen de mise en écoulement laminaire, pendant au moins une partie, dite « phase de concentration », de la durée de fonctionnement du système, du liquide dans un dispositif de concentration, préconcentration par empilement d'échantillon (stacking) et/ou de purification, ledit dispositif comportant une zone de
25 concentration présentant, dans le sens dudit écoulement, un canal d'arrivée et une pluralité de canaux de sortie et

- un moyen d'application d'un champ électrique entre l'entrée et la sortie de la zone de concentration pendant la phase de concentration, l'action du champ électrique sur les molécules ou particules d'intérêt étant, dans la zone de
30 concentration, opposée au sens dudit écoulement et provoquant la retenue de molécules ou particules d'intérêt au moins dans la zone de concentration.

Grâce à ces dispositions, on augmente la section du canal d'arrivée et le nombre de cols de la zone de concentration, ce qui permet d'accroître le phénomène de concentration et le volume de l'échantillon traité. Ainsi, les systèmes de traitement

objets de la présente invention, qui comportent une pluralité de canaux, se prêtent facilement à un changement d'échelle, pour passer d'un capillaire à une canalisation ou tuyau millimétrique, voire à des conduites plus grosses. On obtient alors un dispositif d'ultrafiltration avec des pores de microfiltration, donc avec des débits
5 potentiellement plus élevés et moins de colmatage. Des calculs simples montrent qu'une plaque de cinq mm d'épaisseur percée de trous de $7,5 \mu\text{m}$ de diamètre au pas carré de $20 \mu\text{m}$ présenterait un débit sous 1 bar de 2500 L/heure.m^2 , performance bien supérieure aux membranes d'ultrafiltration utilisées dans les laboratoires. De tels dispositifs devraient donc trouver des applications dans les
10 procédés aval de purification/concentration en bioproduction (« DownStream Processes »).

Sans aller jusqu'à des installations industrielles de bioproduction, les systèmes de traitement objets de la présente invention peuvent fournir des systèmes de concentration et de purification à l'échelle du laboratoire, par exemple pour la
15 purification d'anticorps, de nanoparticules, ou d'acides nucléiques, où l'opérateur manie de l'ordre du microgramme de produit.

On note que l'on peut réaliser la plaque dotée de la pluralité de canaux par usinage laser, par DRIE (acronyme de Deep Reactive Ion Etching) ou une autre méthode d'usinage de micro-précision, pour obtenir des perçages dont le diamètre
20 est de l'ordre de quelques microns à quelques dizaines de microns.

Dans des modes de réalisation, les canaux de sortie sont dimensionnés de telle sorte que le cisaillement moyen dans ces canaux est strictement supérieur au cisaillement moyen présent dans le canal d'arrivée dudit dispositif.

Typiquement, le rapport de cisaillement moyen entre le canal d'arrivée et
25 chacun des canaux de sortie de la zone de concentration doit être inférieur à 0,01.

Dans des modes de réalisation, le système objet de la présente invention comporte un multi-capillaire présentant des canaux linéaires, la zone de concentration se trouvant d'un côté de ce multi-capillaire. On rappelle qu'un multi-capillaire est un capillaire présentant plusieurs canaux, ou voies. Pour l'insérer dans
30 le dispositif, on peut le couper et le coller entre le canal d'arrivée et la conduite de sortie.

Ces modes de réalisation peuvent, par exemple, être réalisés par manchonnage ou collage ou soudage de leurs constituants. On évite ainsi un usinage coûteux et on peut avoir des canaux ou voies de toutes longueurs

souhaitées. Des multi-capillaires existent comme fibres optiques à cristaux photoniques. On peut également fabriquer des multi-capillaires par assemblage d'un faisceau de capillaires individuels, et en remplissant les interstices entre capillaires à l'aide d'une résine.

5 Dans des modes de réalisation, la zone de concentration comporte une pluralité de cônes formés dans un diaphragme perpendiculaire à l'axe central d'écoulement du fluide en sortie de la zone de concentration.

En usinage laser d'une plaque de silice, on obtient plus facilement une telle disposition à cônes parallèles plutôt qu'une disposition à cylindres parallèles.

10 Dans des modes de réalisation, le moyen d'application du champ électrique est configuré pour appliquer une décroissance progressive du champ électrique après la phase de concentration, pour séparer les molécules concentrées au préalable.

15 Selon un deuxième aspect, la présente invention vise un kit pour le fonctionnement du système objet de la présente invention, qui comporte le liquide viscoélastique.

20 Selon un troisième aspect, la présente invention vise un kit pour le fonctionnement du système objet de la présente invention, qui comporte le dispositif de concentration, préconcentration par empilement d'échantillon (stacking) et/ou de purification, ledit dispositif comportant une zone de concentration présentant, dans un sens d'écoulement, une pluralité de canaux de sortie.

25 Dans des modes de réalisation du kit objet du troisième aspect de la présente invention, les canaux de la pluralité de canaux de sortie sont dimensionnés de telle sorte que le cisaillement moyen dans ces canaux est très supérieur au cisaillement moyen présent dans le canal d'arrivée dudit dispositif.

Ces kits objets de la présente invention peuvent être combinés en un seul kit. On note que l'un ou l'autre de ces kits objets de la présente invention peut comporter, de plus :

- 30
- d'autres réactifs, selon l'application visée par exemple un échantillon de contrôle pour vérifier le bon fonctionnement,
 - un standard de poids moléculaire,
 - un standard de masse et/ou
 - un loading buffer à ajouter dans l'échantillon.

Les avantages, buts et caractéristiques particulières de ces kits étant similaires à ceux du système objet de la présente invention, ils ne sont pas rappelés ici.

5 BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

D'autres avantages, buts et caractéristiques particulières de l'invention ressortiront de la description non limitative qui suit d'au moins un mode de réalisation particulier des dispositifs et du procédé objets de la présente invention, en regard des dessins annexés, dans lesquels :

- 10 - les figures 1, 2 et 3 représentent, schématiquement et en coupe, des modes de réalisation particuliers d'un dispositif de concentration pour le système objet de la présente invention,
- la figure 4 représente, schématiquement et en coupe, un mode de réalisation particulier d'un dispositif de concentration pour le système objet de la présente invention,
- 15 - la figure 5 représente un mode de réalisation particulier du système objet de la présente invention,
- les figures 6 et 7 représentent, en vue en coupe axiale et en vue longitudinale, respectivement, un multicapillaire et
- 20 - la figure 8 représente une variante du dispositif illustré en figure 3.

DESCRIPTION D'EXEMPLES DE REALISATION DE L'INVENTION

On note, dès à présent, que les figures ne sont pas à l'échelle.

25 Les domaines d'application de la présente invention comportent le domaine préanalytique (notamment purification, concentration hors ligne et préparation physique d'échantillons), le domaine de la chimie et le domaine de la biologie (notamment l'électrophorèse capillaire pour séparer des molécules ou des particules par tailles, ou séparer des fragments isolés).

30 La technologie séparative utilisée dans le système objet de la présente invention est fondée sur la combinaison de trois paramètres :

- un gradient de pression provoquant un écoulement de l'échantillon à analyser, l'échantillon étant dans un fluide viscoélastique,

- un champ électrique appliquant une force électrophorétique sur les molécules (et notamment sur les macromolécules), force opposée au sens dudit écoulement,
- une géométrie particulière de l'écoulement laminaire.

5 Par exemple, pour rendre le fluide viscoélastique, on peut lui ajouter un polymère ou utiliser un surfactant qui forme des micelles.

On utilise une pluralité de canaux dans lesquels s'écoule un fluide viscoélastique grâce à l'application d'une différence de pression entre les deux extrémités des canaux. Chaque canal est suffisamment fin pour que l'écoulement soit laminaire, et avec un cisaillement significatif à l'échelle des molécules ou des particules à concentrer. Les molécules à analyser se trouvent dans cet écoulement. Lorsqu'un champ électrique est appliqué parallèlement à la direction de l'écoulement, les molécules chargées électriquement subissent une force électrique et se déplacent à une vitesse différente de celle du fluide qui les entoure. De ce fait, les molécules déforment l'écoulement à leur voisinage. A cause du cisaillement non négligeable à l'échelle des macromolécules et à cause des propriétés viscoélastiques du fluide, l'écoulement exerce une contre-réaction sur les molécules, perpendiculaire à l'écoulement. Les caractéristiques principales de cette force de contre-réaction sont :

- 20 - quand la force d'électrophorèse s'oppose à l'écoulement, le fluide exerce une force qui repousse les molécules vers les parois. Au contraire, quand la force d'électrophorèse accélère l'écoulement, le fluide exerce une force qui confine les molécules au centre de l'écoulement ;
- l'intensité de la force dépend de la nature du fluide, du taux de cisaillement, de la taille de la molécule et de l'intensité de la force d'électrophorèse et donc du champ électrique appliqué. Le taux de cisaillement est dicté par la différence de pression appliquée aux extrémités de chaque canal et par la géométrie de chaque canal.

Les molécules se répartissent donc le long d'un axe transverse à l'écoulement, selon leur taille. Dans un flux laminaire, la vitesse de l'écoulement dépend de la position. Les molécules sont donc poussées par l'écoulement à des vitesses différentes et sont donc séparées selon leur taille.

La séparation de fragments ADN est particulièrement intéressante car ils ne sont pas séparables par électrophorèse en solution.

La technique exposée ci-dessus permet de s'affranchir de l'électrophorèse en gel et d'obtenir des séparations en quelques minutes, alors qu'il faut une à plusieurs heures dans les systèmes d'électrophorèse en gel connus.

La performance de la séparation décrite ci-dessus a bien été mise en évidence pour les grands fragments d'ADN. Cette technique s'adapte à tout type de nano-objets ou de micro-objets, tels que :

- d'autres macromolécules, comme des protéines ou des glucides,
- des complexes, qui peuvent comprendre beaucoup de petites molécules, comme des polluants, des stéroïdes, ...
- 10 - des nanoparticules, notamment celles utilisées comme vecteur de délivrance de médicaments par l'industrie pharmaceutique,
- des particules virales ou bactériennes.

On trouve plus de détails sur cette technique de séparation dans le document FR 2 994 103.

15 En choisissant la géométrie de l'écoulement laminaire, on peut créer par ailleurs des conditions où les molécules d'intérêt sont arrêtées en un point précis du dispositif, alors même que l'écoulement de l'échantillon est toujours présent. On peut ainsi concentrer en ligne ces molécules pour ensuite les analyser ou les purifier. L'analyse se fait ainsi avec une très haute sensibilité du fait de la concentration
20 réalisée par le dispositif objet de la présente invention.

Par exemple, pour un canal présentant un cône d'entrée, formant un goulet d'étranglement, avec une réduction linéaire de la plus grande dimension de la section perpendiculaire à la direction d'écoulement, la restriction progressive génère une accélération du fluide et donc du cisaillement, ainsi qu'une augmentation du
25 champ électrique opposé à l'écoulement. Il y a donc, dans le sens où la section du canal décroît, un accroissement de la force transverse au fur et à mesure de l'avancée vers la restriction. Quand les molécules se trouvent à une distance de la paroi telle que leur vitesse liée à l'écoulement est égale à leur vitesse d'électrophorèse en direction contraire, les molécules s'arrêtent. On note que le
30 mouvement brownien provoque une répartition aléatoire dans le profil parabolique de l'écoulement. La force de portance modifie le barycentre du nuage de points, en tassant les molécules vers la paroi, et c'est la vitesse de l'écoulement à cette position du barycentre que l'on observe.

Il est aussi possible d'arrêter les molécules ou les particules d'intérêt avec de simples canaux droits. Pour cela, on fixe des conditions d'écoulement et de champ électrique telles que les molécules, dans les canaux de sortie de la zone de concentration, sont plaquées si proches de la paroi que la force d'électrophorèse est plus forte que l'entraînement par l'écoulement. Dans ce cas, les molécules présentes dans le canal remontent l'écoulement le long de la paroi. Si l'écoulement présente un profil de Poiseuille jusqu'à l'entrée du canal, les molécules sortent du canal, et se concentrent en amont des canaux, dans la zone de concentration de plus grande section. Si l'écoulement présente des perturbations du profil de Poiseuille à l'entrée du canal, les molécules se concentrent dans cette zone de perturbation à l'entrée du canal.

La mise en œuvre de la présente invention concentre les molécules ou particules de grandes tailles et charges électriques et laisse passer les molécules ou particules plus petites ou moins chargées. Cette caractéristique est mise à profit pour purifier et concentrer un échantillon avant analyse.

On note que le dispositif objet de la présente invention permet non seulement de concentrer les molécules, mais aussi éventuellement de les séparer. La séparation dépend de la géométrie de restriction de chaque canal : un cône long, avec un angle faible, répartit les molécules selon leur taille sur une plus grande longueur qu'un cône court présentant un angle élevé.

On note aussi que le dispositif objet de la présente invention constitue aussi un filtre passe-bas : toutes les molécules en dessous d'une certaine taille ou d'une certaine charge passent librement dans les canaux.

On observe, en figure 1, une partie 100 d'un premier mode de réalisation du dispositif de concentration, stacking et/ou de purification pour analyse objet de la présente invention. Cette partie 100 comporte un canal d'arrivée 105, une zone de concentration 110 en entrée de canaux de sortie parallèles 135 et une conduite de sortie 115.

Comme illustré en figure 1, pour mettre en œuvre le premier mode de réalisation du dispositif, on réalise, d'abord, une injection hydrodynamique ou électrocinétique d'un échantillon 130, selon des méthodes classiques en électrophorèse capillaire ou en chromatographie. On note cependant que, du fait du diamètre du canal d'arrivée 105, qui peut être grand, on peut injecter ici un volume beaucoup plus important qu'en électrophorèse capillaire classique, par exemple

entre 0,01 et 10 ml pour une échelle de préparation d'échantillons de laboratoire, voire un à plusieurs litres pour une échelle pilote ou industrielle. Le canal d'arrivée 105, la zone de concentration 110 et la conduite de sortie 115 ont été remplis au préalable du fluide viscoélastique. Préférentiellement, l'échantillon 130 a également
5 été dilué dans ce fluide viscoélastique.

Comme illustré en figure 1, après l'injection, l'entrée du canal d'arrivée 105 étant mise en communication avec un flacon (non représenté) contenant le fluide ou tampon viscoélastique, on applique un différentiel de pression et un différentiel de
10 de sortie 115. L'action du champ électrique E est opposée au flux F de tampon viscoélastique, la direction du champ électrique E dépendant du signe de la charge de la molécule/particule à concentrer. Comme expliqué ci-dessus, les particules ou molécules de l'échantillon 130 se concentrent dans la zone de concentration 110 en amont des canaux parallèles, avec éventuellement, une séparation selon la taille et
15 la charge électrique, le long de lignes d'isocisaillement (c'est-à-dire de cisaillements égaux).

Une fois que tout l'échantillon 130 est passé dans la zone de concentration 110, il y reste les particules ou molécules concentrées et éventuellement séparées. On effectue alors un lavage en faisant passer un excès de fluide viscoélastique.
20 Ainsi, les molécules ou particules non retenues dans la zone de concentration 110 sont entraînées hors du dispositif de concentration, par la conduite de sortie 115 et ne gênent donc pas la détection ultérieure des molécules ou particules d'intérêt. Cela permet aussi de purifier les molécules ou particules d'intérêt avant de les collecter en aval du dispositif de concentration.

25 On fait alors migrer les molécules concentrées par simple pression, avec un champ électrique nul, comme illustré en figure 2. On transfère ainsi le concentrât de la zone de concentration à la conduite de sortie 115.

On note qu'il n'y a pas de stacking lors de ce transfert : c'est l'étape de concentration qui a joué le rôle de stacking, qui fait que le plug de molécules ou
30 particules concentrées a un volume en sortie de la zone de concentration 110 qui est indépendant du volume initial de l'échantillon.

Alternativement, on peut faire migrer les molécules concentrées par électrophorèse. Dans ce cas, on arrête l'écoulement, et on applique un champ électrique emmenant les molécules vers la sortie du dispositif 100.

Dans un premier mode d'utilisation du dispositif, on veut récupérer l'ensemble des molécules ou particules qui ont été concentrées. Il suffit alors de collecter l'échantillon en aval du dispositif, selon les méthodes de l'état de l'art, par exemple en utilisant un collecteur de fraction, ou une vanne adéquate.

5 Dans un second mode d'utilisation du dispositif, on veut récupérer seulement une partie des molécules ou particules qui ont été concentrées. Par exemple, on est intéressé par récupérer une taille d'acides nucléiques donnée, en éliminant les fragments plus courts et les fragments plus longs que cette taille. Il peut en être de même pour des protéines, des particules, des cellules,...

10 Dans ce second mode d'utilisation, on réalise une phase de séparation entre la phase de concentration et la phase de collecte.

La séparation peut avoir lieu par électrophorèse simple, dans la conduite de sortie 115. Dans ce cas, on choisit un polymère neutre pour rendre le liquide viscoélastique, de telle sorte que le fluide viscoélastique constitue aussi une matrice
15 de séparation par électrophorèse des molécules ou particules d'intérêt.

La séparation peut aussi avoir lieu comme exposée ci-dessus et dans la demande de brevet FR 2 994 103 ; dans ce mode de réalisation, les canaux de sortie 135 de la zone de concentration 110 sont allongés au-delà de ce qui est nécessaire pour la seule phase de concentration, et peuvent d'ailleurs se substituer à la conduite
20 de sortie 115. On applique alors des pressions et tension en sens opposés, et les particules ou molécules se séparent selon une distribution. Elles passent éventuellement devant le détecteur 120 optionnel, pour y être détectées et analysées. La collecte des molécules ou particules d'intérêt a alors lieu en sortie du multi-capillaire 135, éventuellement prolongé par une conduite de sortie 115, par les
25 moyens de l'état de l'art, par exemple à l'aide d'un collecteur de fraction ou d'une vanne adéquate. Le détecteur 120 peut avantageusement être utilisé pour piloter la fonction de collecte des molécules ou particules d'intérêt, par exemple pour commander le démarrage et la fin de la collecte en fonction des temps de migration mesurées.

30 Dans des modes de réalisation, on réalise la séparation en configurant le moyen d'application du champ électrique pour faire appliquer une décroissance progressive du champ électrique E après la phase de concentration, pour séparer les molécules.

La séparation a ainsi lieu en diminuant progressivement, ou par paliers, le champ électrique E appliqué pendant la concentration. On note en effet que si, après la phase de concentration, on réduit progressivement l'intensité du champ électrique E, par exemple selon une fonction linéaire décroissante, cela a pour effet de faire
5 passer les molécules ou particules d'intérêt dans les canaux 135 définissant la zone de concentration 110, puis dans la conduite de sortie 115 et le détecteur 120 (s'il existe), successivement en fonction de leurs tailles et charges électriques.

On réalise ainsi une séparation ordonnée des molécules ou particules d'intérêt qui passent devant le détecteur optionnel 120, et qui peuvent être collectées
10 par les moyens de l'état de l'art.

On note que l'on a intérêt à mettre le détecteur 120 et les moyens de collecte le plus près possible de la zone de concentration 110, pour réduire au maximum les effets de diffusions axiale, brownienne ou liée au profil parabolique de l'écoulement laminaire, qui risquent de re-mélanger les molécules et particules
15 d'intérêt de différentes charges et tailles.

On note que, selon ce perfectionnement, on peut ajuster la séparation entre deux pics de détection de molécules ou particules en modulant la vitesse de diminution de l'intensité du champ électrique E. On peut, par exemple, réaliser des paliers, ce qui conduit à la formation de paliers de tailles et charges des molécules et
20 particules passant devant le détecteur 120 et étant collectées.

Ce perfectionnement présente des avantages complémentaires :

- il n'est pas nécessaire de prévoir un long canal de séparation et conduite de sortie 115 ; les dimensions du dispositif objet de la présente invention sont donc réduites ;
- 25 - le problème de pollution éventuelle de la conduite de sortie 115 par les impuretés non concentrées étant proportionnel à la longueur de cette conduite de sortie 115, il est grandement résolu par la très petite longueur de cette conduite de sortie 115.

On note que l'ensemble de ces modes d'utilisation et de réalisation du
30 dispositif objet de la présente invention peut être réalisé avec une zone de concentration 110 comportant une pluralité de cônes (voir figure 8) formés dans un diaphragme perpendiculaire à l'axe central d'écoulement du fluide en sortie de la zone de concentration 110. L'angle formé par les parois d'entrée des canaux avec l'axe commun aux canaux a un effet sur la concentration. Un angle important,

donnant un cône court, génère des gradients de force abrupts et une zone de concentration 110 ramassée. Au contraire, un angle faible, correspondant à un cône allongé, génère des gradients de force plus faibles et une zone de concentration 110 plus étendue.

5 Un avantage des modes de réalisation dans lesquels les canaux 135 présentent des cônes d'entrée, notamment par rapport aux modes de réalisation dans lesquels les canaux 135 débouchent perpendiculairement à la paroi, tient en ce que le dispositif de concentration opère en même temps un certain degré de
10 séparation parmi les molécules ou particules concentrées. Les molécules ou particules les plus petites ou les moins chargées se trouvent les plus proches du col des cônes de la zone de concentration 110. Lors de l'éventuelle étape de séparation et de détection, elles restent devant les molécules ou particules plus lentes et n'ont donc pas besoin de les doubler.

Grâce à la mise en œuvre de la présente invention, on peut injecter un
15 volume d'échantillon 130 dans le dispositif bien supérieur à ce qui est possible en électrophorèse capillaire classique ou avec un dispositif de concentration formé d'un seul canal 135.

Un autre avantage de la mise en œuvre de la présente invention est que l'échantillon 130 subit une purification : les molécules ou particules non chargées ou
20 chargées en signe opposé des molécules ou particules d'intérêt sont éliminées de l'échantillon. Les molécules ou particules chargées de même signe que les molécules ou particules d'intérêt mais trop petites ou insuffisamment chargées sont également éliminées de l'échantillon. En particulier, les sels contenus dans l'échantillon sont éliminés lors de la concentration. Cette purification fait gagner en
25 qualité de séparation, en degré de pureté des molécules ou particules après collecte.

Dans le dispositif 100 illustré partiellement en figures 1 et 2, une plaque 140
présentant des perçages traversant linéaires, ou lumières, 135 sépare deux canaux 105 et 115 de mêmes sections intérieures et extérieures. Ce mode de réalisation peut, par exemple, être réalisé par manchonnage ou collage ou soudage de ses
30 constituants. Ce mode de réalisation a l'avantage d'augmenter le nombre de cols de la zone de concentration, ce qui peut permettre d'accroître le phénomène de concentration et le volume de l'échantillon traité. On note que la conduite de sortie 115 peut avoir une section interne différente de celle du canal d'arrivée 105.

On note que l'on peut réaliser la plaque 140 par usinage conventionnel, par usinage laser, DRIE (acronyme de Deep Reactive Ion Etching) ou une autre méthode d'usinage de micro-précision, pour obtenir des perçages dont le diamètre est de l'ordre de quelques microns à quelques dizaines de microns. On note aussi
5 que l'on peut utiliser des perçages coniques, appelés « taper » en usinage laser.

On note aussi qu'il est plus avantageux pour la fabrication de réaliser une pluralité de canaux parallèles en sortie de la zone de concentration 110. Mais le parallélisme n'est pas nécessaire au bon fonctionnement du système.

Dans le dispositif 400 illustré partiellement en figure 3, un multi-capillaire 410
10 présentant des canaux de sortie linéaires 415 sépare deux canaux 405 et 420 de mêmes sections intérieures et extérieures. Ce mode de réalisation peut, par exemple, être réalisé par manchonnage ou collage ou soudage de ses constituants. On note que la conduite de sortie 420 peut avoir une section interne différente de celle du canal d'arrivée 405.

On note qu'un multi-capillaire 410 est un capillaire présentant plusieurs
15 canaux, ou voies. Pour l'insérer dans le dispositif, on le coupe et on le colle entre les canaux 405 et 420. Par rapport au mode de réalisation illustré en figures 1 et 2, on évite un usinage coûteux et on peut avoir des canaux ou voies de toutes longueurs souhaitées. Des multi-capillaires existent comme fibres optiques à cristaux
20 photoniques, par exemple sous la marque déposée NKT Photonics.

En ce qui concerne les dispositifs à plusieurs capillaires montés en parallèle, tels que ceux illustrés en figures 1, 2 et 3, on note que des cônes peuvent remplacer les capillaires cylindriques, avec les effets expliqués ci-dessus pour la partie conique. De plus, en usinage laser d'une plaque de silice, on obtient plus facilement une telle
25 disposition à cônes parallèles plutôt qu'une disposition à cylindres parallèles.

Le schéma illustré en figures 1, 2 et 3 se prête facilement à un changement d'échelle, pour passer d'un capillaire à une canalisation ou tuyau millimétrique, voire à des conduites plus grosses. On obtient alors un dispositif d'ultrafiltration avec des pores de microfiltration, donc avec des débits potentiellement plus élevés et moins
30 de colmatage.

Des calculs simples montrent qu'une plaque de cinq mm d'épaisseur percée de trous de 7,5 μm de diamètre au pas carré de 20 μm présenterait un débit sous 1 bar de 2500 L/heure.m², performance bien supérieure aux membranes d'ultrafiltration

utilisées dans les laboratoires (par exemple le système Vivaflow de Sartorius, ou le système Pellicon de Millipore, marques déposées).

De tels dispositifs devraient donc trouver des applications dans les procédés avals de purification/concentration en bioproduction (« DownStream Processes » dans le vocabulaire de cette communauté).

On observe, en figure 4, un mode de réalisation 500 du dispositif de concentration, constitué d'un canal d'arrivée 520 débouchant sur des capillaires de sortie 530 de concentration parallèles entre eux et formant, chacun, un angle avec le canal d'arrivée. La zone de concentration 525 se trouve là où le canal 520 débouche sur les capillaires 530 et/ou dans les entrées des capillaires 530.

Dans le mode de réalisation illustré en figure 4, un écoulement minoritaire, ou tout au moins partiel, va dans les capillaires de sortie 530, donc la concentration n'est pas de 100%. Cependant, en faisant circuler l'échantillon en circuit fermé, on peut obtenir une concentration proche de 100%.

On note que la somme des sections des canaux parallèles peut être égale ou supérieure à la section du canal d'arrivée et/ou de la conduite de sortie. En effet, la résistance hydrodynamique d'un ensemble de capillaires est bien supérieure à la résistance hydrodynamique d'un canal cylindrique de section égale à la somme des sections des capillaires. On obtient bien un accroissement du gradient de pression, et donc du cisaillement, sans qu'il y ait réduction de section.

Le dispositif de concentration, stacking ou séparation décrit en regard des figures 1, 2, 3 et 4 fonctionne pour l'analyse de macromolécules et de nanoparticules pour les sciences de la vie, donc en solution aqueuse, ainsi que pour des solutions organiques et les microparticules.

On observe, en figure 5, un système 700 comportant un dispositif de concentration, stacking et/ou de purification 705 et un instrument optionnel de préparation d'analyse et/ou d'analyse 710.

Le dispositif 705 est n'importe lequel des dispositifs décrits en regard des figures 1 à 4. Il comporte :

- un moyen 715 de mise en écoulement laminaire, pendant au moins une partie, dite « phase de concentration », de la durée de fonctionnement du système, du liquide viscoélastique, dans un dispositif de concentration, stacking et/ou de purification ledit dispositif comportant une zone de concentration 720 présentant, dans le sens dudit écoulement, une pluralité de canaux de sortie dimensionnés de

telle sorte que le cisaillement moyen dans ces canaux est très supérieur au cisaillement moyen présent dans le canal d'arrivée dudit dispositif,

- un moyen 725 d'application d'un champ électrique entre l'entrée et la sortie de la zone de concentration, l'action du champ électrique sur les molécules ou particules d'intérêt étant, dans la zone de concentration, opposée au sens dudit écoulement et provoquant la retenue de molécules ou particules d'intérêt au moins dans la zone de concentration et

- un moyen 730 de transfert de l'échantillon concentré depuis la zone de concentration 720 vers la sortie.

10 Comme exposé ci-dessus, après la phase de concentration, le champ électrique présente une intensité inférieure ou égale au champ électrique appliqué pendant la phase de concentration, par exemple selon une pente décroissante linéaire ou par palier ou encore une intensité nulle immédiatement après la fin de l'application de la phase de concentration. Il peut aussi être en direction inverse de
15 celle utilisée pour la concentration, et fort ou faible selon les caractéristiques de l'électrophorèse qu'on applique alors.

Parmi les types d'instruments d'analyse 710 optionnels, on cite notamment :

- l'électrophorèse capillaire, auquel cas, il est avantageux d'utiliser l'alimentation électrique de l'électrophorèse capillaire comme moyen 725 d'application du
20 champ électrique, et le générateur de pression de l'électrophorèse capillaire comme moyen 715 de mise en écoulement capillaire,
- le spectromètre de masse,
- le gel filtration ou chromatographie d'exclusion de taille,
- les spectromètres et
- 25 - la chromatographie liquide, sous toutes ses formes (LC, HPLC, UPLC, micro-LC, nano-LC).
- un simple détecteur, par exemple optique (absorbance, fluorescence, réfraction), conductimétrique, électrochimique,...
- Un collecteur de fraction,
- 30 - Un système de vannes permettant de collecter uniquement les molécules ou particules sélectionnées par le dispositif de concentration et de séparation.

On observe, en figures 6 et 7, un multicapillaire 800 comportant, dans un cylindre 805, des canaux parallèles cylindriques 810. Un manchon 815 peut être

ajouté pour aider l'assemblage du multicapillaire 800 à un moyen 715 de mise en écoulement laminaire du liquide.

On observe, en figure 8, un dispositif de concentration 900 comportant un multi-capillaire 910 présentant des canaux de sortie linéaires 915 sépare deux canaux 405 et 420 de mêmes sections intérieures et extérieures. Les canaux de sortie 915 comportent, chacun, un cône d'entrée 920. Ces cônes 920 et les canaux de sortie 915 sont, par exemple, formés dans un diaphragme perpendiculaire à l'axe central d'écoulement du fluide en sortie de la zone de concentration.

On donne, ci-dessous, un complément de description pour le dimensionnement des canaux de sortie de la zone de concentration et, notamment, des explications sur le calcul du dimensionnement

L'homme de l'art sait dimensionner le nombre et la section des canaux de telle sorte que le cisaillement dans les canaux de sortie de la zone de concentration dépasse le cisaillement dans le canal d'entrée.

Si tous les canaux sont cylindriques, et pour des écoulements laminaires d'un liquide incompressible, il est possible d'avoir une résolution analytique du problème, comme nous le montrons ci-dessous (équations de Poiseuille).

Si les canaux sont des canaux plans, avec une hauteur très petite devant leur largeur, une solution analytique au problème existe également (équations de Poiseuille plan).

Enfin, pour d'autres formes de section des canaux, les outils de modélisation multi physique de l'état de l'art, comme le logiciel COMSOL, permettent de trouver le dimensionnement nécessaire, en résolvant par éléments finis les équations de Navier-Stokes.

Considérons le cas de base, où le canal d'arrivée dans la zone de concentration est une conduite cylindrique de rayon R_1 , et où la pluralité de canaux de sortie de la zone de concentration est constituée de n canaux cylindriques identiques de rayon R_2 .

D'une façon générale, dans un écoulement laminaire dans une conduite, on a la relation :

$$\text{Équation 1 : } \Delta P = R_h \times Q ,$$

avec ΔP chute de pression aux bornes de la conduite, R_h résistance hydraulique de la conduite, et Q le débit de l'écoulement.

Par unité de longueur de la conduite, on a :

Équation 2 : $\frac{dP}{dz} = \frac{dRh}{dz} \times Q$, dz étant une unité infinitésimale de longueur.

Le débit Q est identique dans le canal d'arrivée et dans la pluralité des canaux de sortie. D'où :

5 Équation 3 : $Q = \frac{\frac{dP_1}{dz}}{dRh_1} = \frac{\frac{dP_2}{dz}}{dRh_2}$, les indices 1 et 2 se référant au canal d'arrivée et à la pluralité des canaux de sortie respectivement.

10 Pour un écoulement laminaire d'un fluide newtonien dans une conduite cylindrique, on a, selon les équations de Poiseuille, que l'on trouve par exemple dans l'article [Wikipedia](https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89coulement_de_Poiseuille) correspondant (https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89coulement_de_Poiseuille):

Équation 4 : $v(r) = v_{\max} \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right)$, avec $v(r)$ la vitesse du fluide en tout point situé à la distance r de l'axe de la conduite, et v_{\max} la vitesse maximale du fluide, au centre de la conduite.

15 v_{\max} s'exprime aussi simplement de façon analytique :

Équation 5 : $v_{\max} = \frac{R^2}{4\mu} \frac{dP}{dz}$

La contrainte de cisaillement vaut par définition :

Équation 6 : $\sigma(r) = \mu \frac{dv(r)}{dr}$, μ viscosité dynamique du fluide.

20 En dérivant Équation 4, en reportant $\frac{dv(r)}{dr}$ dans l'Équation 6, et en reportant également l'expression de v_{\max} de l'Équation 5, on obtient :

Équation 7 : $\sigma(r) = \frac{r}{2} \frac{dP}{dz}$

A mi-rayon de la conduite, le cisaillement moyen vaut donc :

25 Équation 8 : $\sigma_{\text{moy}} = \frac{R}{4} \frac{dP}{dz}$

Ceci donne la valeur de $\frac{dP}{dz}$ que l'on peut reporter dans Équation 3.

De la même façon, les équations de Poiseuille donnent la valeur de R_h :

Équation 9 : $R_h = \frac{8\mu L}{\pi R^4}$, L longueur de la conduite. Donc, par unité de
5 longueur :

Équation 10 : $\frac{dR_h}{dz} = \frac{8\mu}{\pi R^4}$

Nous avons donc, en reportant Équation 8 et Équation 10 dans Équation 3 :

Équation 11 : $Q = \frac{4\sigma_{moy,1}}{R_1} \times \frac{\pi R_1^4}{8\mu} = \frac{\pi \sigma_{moy,1} R_1^3}{2\mu}$

10

Puisque les n canaux de sortie sont identiques, on a $Q=n q_2$, q_2 étant le débit dans chacun des canaux de sortie.

Les équations précédentes s'appliquent pour chaque canal de sortie, et l'Équation 11 devient :

Équation 12 : $Q = \frac{\pi \sigma_{moy,1} R_1^3}{2\mu} = n \frac{\pi \sigma_{moy,2} R_2^3}{2\mu}$

15

On en déduit que le rapport des cisaillements moyen dans le système vaut :

Équation 13 : $\frac{\sigma_{moy,2}}{\sigma_{moy,1}} = \frac{1}{n} \times \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^3$

Ainsi, si on conçoit un dispositif avec un canal d'arrivée de rayon 1,5 mm, et
20 1000 canaux de sortie de rayon 25 μm , on obtient un rapport des cisaillements moyens de (Équation 13) :

$$\frac{\sigma_{moy,2}}{\sigma_{moy,1}} = \frac{1}{1000} \times \left(\frac{1500}{25}\right)^3 = 216$$

On note qu'il est plus facile d'obtenir un fort cisaillement dans les canaux de sortie si la somme des sections de ces canaux est très inférieure à la section du
25 canal d'arrivée.

Pendant, si le nombre des canaux de sortie est au moins égal à 10000, alors on peut obtenir un rapport de cisaillement supérieur ou égal à 100, alors que la

somme des sections des canaux de sortie est égale à la section d'entrée. Plus le nombre de canaux est grand, et plus cela est possible.

Ainsi, si on conçoit un dispositif avec un canal d'arrivée de rayon 1,5 mm, et 10000 canaux de sortie de rayon de 15 μm , on obtient un rapport des cisaillements moyens de (Équation 13) :

$$\frac{\sigma_{moy,2}}{\sigma_{moy,1}} = \frac{1}{10000} \times \left(\frac{1500}{15}\right)^2 = 100$$

alors que la section du canal d'arrivée et la section totale des canaux de sortie sont égales et valent 7,07 mm^2 .

Enfin, il faut noter que les équations de Poiseuille utilisées ci-dessus sont vraies pour un liquide newtonien, alors que la mise en œuvre de la présente invention requiert un liquide viscoélastique. En fait, les équations de Poiseuille sont vraies quand la viscosité μ est indépendante du cisaillement. La viscosité d'un fluide est une propriété distincte de ses propriétés élastiques, et il existe des polymères qui rendent le liquide viscoélastique, alors que la viscosité reste constante sur une large gamme de cisaillement. L'article de Del Giudice et al., 2015, Lab Chip 15, 783-792 montre ainsi que des solutions aqueuses contenant du Poly Ethylene Oxide (PEO) jusqu'à 0,3%, ou du polyacrylamide (PAM) jusqu'à 0,1%, ont une viscosité constante pour des taux de cisaillement allant de 0 (fluide au repos) à 200 s^{-1} , qui sont des valeurs de cisaillement très suffisantes pour faire fonctionner le système objet de la présente invention. Il en est de même avec des solutions de Polyvinylpyrrolidone 8% (PVP), selon Romeo et al., 2013, 13, 2802-2807.

Au cas où le développeur d'un dispositif selon l'invention ne dispose pas d'un fluide viscoélastique permettant la concentration de molécules ou particules d'intérêt dans des conditions où la viscosité du fluide est constante, le développeur utilise une simulation multiphysique comme mentionnée plus haut, en utilisant la forme la plus générale des équations de Navier-Stokes, qui fait intervenir un tenseur de contraintes visqueuses, et en déterminant expérimentalement les paramètres de ce tenseur.

Le rapport des cisaillements à mettre en œuvre entre le canal d'arrivée et les canaux de sortie de la zone de concentration dépend de l'application visée, et du temps que l'on se donne pour la concentration voulue.

Si l'échantillon à concentrer est constitué d'une population de molécules ou particules strictement identiques, le rapport des cisaillements n'a pas nécessairement besoin d'être important ; il suffit de régler la vitesse de flux et le champ électrique de telle façon que la molécule à concentrer avance avec l'écoulement dans le canal d'arrivée, et recule par électrophorèse le long des parois dans les canaux de sortie, comme expliqué ci-dessus.

Toutefois, si le rapport des ratios est faible, les molécules à concentrer sont assez fortement plaquées vers les parois dans le canal d'arrivée, et elles avancent seulement lentement dans ce canal, limitant la vitesse de concentration. Pour aller plus vite, on a intérêt à augmenter le rapport des cisaillements, de façon à ce que les molécules soient peu plaquées vers les parois, et donc peu ralenties, dans l'écoulement du canal d'entrée. En pratique, on a intérêt à avoir un rapport de cisaillement d'au moins 2, et préférentiellement d'au moins 10, entre le canal d'entrée et les canaux de sortie.

Si maintenant l'échantillon à concentrer est constitué d'une population hétérogène de molécules ou particules, qui subissent donc une force différente de placage à la paroi selon leur taille et leur charge, il faut régler le cisaillement de telle façon que les molécules les plus petites et/ou les moins chargées, qui sont les plus difficiles à arrêter dans l'écoulement, reculent par électrophorèse dans les canaux de sortie, pendant que les molécules les plus grosses et/ou les plus chargées, qui subissent le placage vers la paroi le plus important, avancent suffisamment vite dans le canal d'arrivée. Dans ces cas, le ratio des cisaillements à mettre en œuvre dépend donc de l'hétérogénéité des molécules à concentrer. Pour des fragments d'ADN compris entre 0,1 et 1,5 kb, ou entre 0,5 et 50 kb, on utilise préférentiellement un ratio de cisaillement supérieur à 100.

La présente invention vise aussi un kit pour mettre en œuvre le système procédé objet de la présente invention ou pour le fonctionnement du système objet de la présente invention, qui comporte le liquide viscoélastique.

La présente invention vise aussi un kit pour mettre en œuvre le système objet de la présente invention ou pour le fonctionnement du système objet de la présente invention, qui comporte le dispositif de concentration, stacking et/ou de purification, ledit dispositif comportant une zone de concentration présentant, dans un sens d'écoulement, une pluralité de canaux de sortie, préférentiellement

dimensionnés de telle sorte que le cisaillement moyen dans ces canaux est très supérieur au cisaillement moyen présent dans le canal d'arrivée dudit dispositif.

Ces kits objets de la présente invention peuvent être combinés en un seul kit. On note que l'un ou l'autre de ces kits objets de la présente invention peut

5 comporter, de plus :

- d'autres réactifs, selon l'application visée par exemple un échantillon de contrôle pour vérifier le bon fonctionnement,

- un standard de poids moléculaire,

- un standard de masse,

10

- un loading buffer à ajouter dans l'échantillon.

REVENDEICATIONS

1. Système (770) de traitement de molécules ou particules d'intérêt véhiculées par un liquide viscoélastique, système qui comporte :

5 - un moyen (715) de mise en écoulement laminaire (F), pendant au moins une partie, dite « phase de concentration », de la durée de fonctionnement du système, du liquide viscoélastique dans un dispositif (100, 400, 500, 705) de concentration, préconcentration par empilement d'échantillon et/ou de purification, ledit dispositif comportant une zone de concentration (110, 525) présentant, dans le sens dudit écoulement, un canal d'arrivée (105) et une pluralité de canaux de sortie
10 (135, 530) et

- un moyen (725) d'application d'un champ électrique (E) entre l'entrée et la sortie de la zone de concentration pendant la phase de concentration, l'action du champ électrique sur les molécules ou particules d'intérêt étant, dans la zone de concentration, opposée au sens dudit écoulement et provoquant la retenue de
15 molécules ou particules d'intérêt au moins dans la zone de concentration ; caractérisé en ce que les canaux de sortie (135, 530) sont dimensionnés de telle sorte que le cisaillement moyen dans les canaux de sortie est strictement supérieur au cisaillement moyen présent dans le canal d'arrivée (105) dudit dispositif.

20 2. Système selon la revendication 1, dans lequel le rapport de cisaillement moyen entre le canal d'arrivée (105) et chacun des canaux de sortie (135, 530) de la zone de concentration (110) est inférieur à 0,5.

3. Système selon la revendication 2, dans lequel le rapport de cisaillement moyen
25 entre le canal d'arrivée (105) et chacun des canaux de sortie (135, 530) de la zone de concentration (110) est inférieur à 0,1.

4. Système selon la revendication 3, dans lequel le rapport de cisaillement moyen
30 entre le canal d'arrivée (105) et chacun des canaux de sortie (135, 530) de la zone de concentration (110) est inférieur à 0,01.

5. Système selon l'une des revendications 1 à 4, qui comporte un multi-capillaire (135) présentant des canaux linéaires, la zone de concentration (110) se trouvant d'un côté de ce multi-capillaire.
- 5 6. Système selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel la zone de concentration (110, 525) comporte une pluralité de cônes formés dans un diaphragme perpendiculaire à l'axe central d'écoulement du fluide en sortie de la zone de concentration.
- 10 7. Système selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel le moyen d'application du champ électrique (E) est configuré pour appliquer une décroissance progressive du champ électrique après la phase de concentration, pour séparer les molécules concentrées au préalable.
- 15 8. Kit pour le fonctionnement du système selon l'une des revendications 1 à 7, qui comporte ledit système et le liquide viscoélastique.
9. Kit pour le fonctionnement du système selon l'une des revendications 1 à 7, qui comporte le dispositif (100, 400, 500) de concentration, préconcentration par empilement d'échantillon et/ou de purification, ledit dispositif comportant une zone de concentration (110, 525) présentant, dans un sens d'écoulement, une pluralité de canaux de sortie (135, 530).
- 20 empilement d'échantillon et/ou de purification, ledit dispositif comportant une zone de concentration (110, 525) présentant, dans un sens d'écoulement, une pluralité de canaux de sortie (135, 530).
10. Kit selon la revendication 9, dans lequel les canaux (135, 530) de la pluralité de canaux de sortie sont dimensionnés de telle sorte que le cisaillement moyen dans ces canaux est strictement supérieur au cisaillement moyen présent dans le canal d'arrivée (105) dudit dispositif (100).
- 25

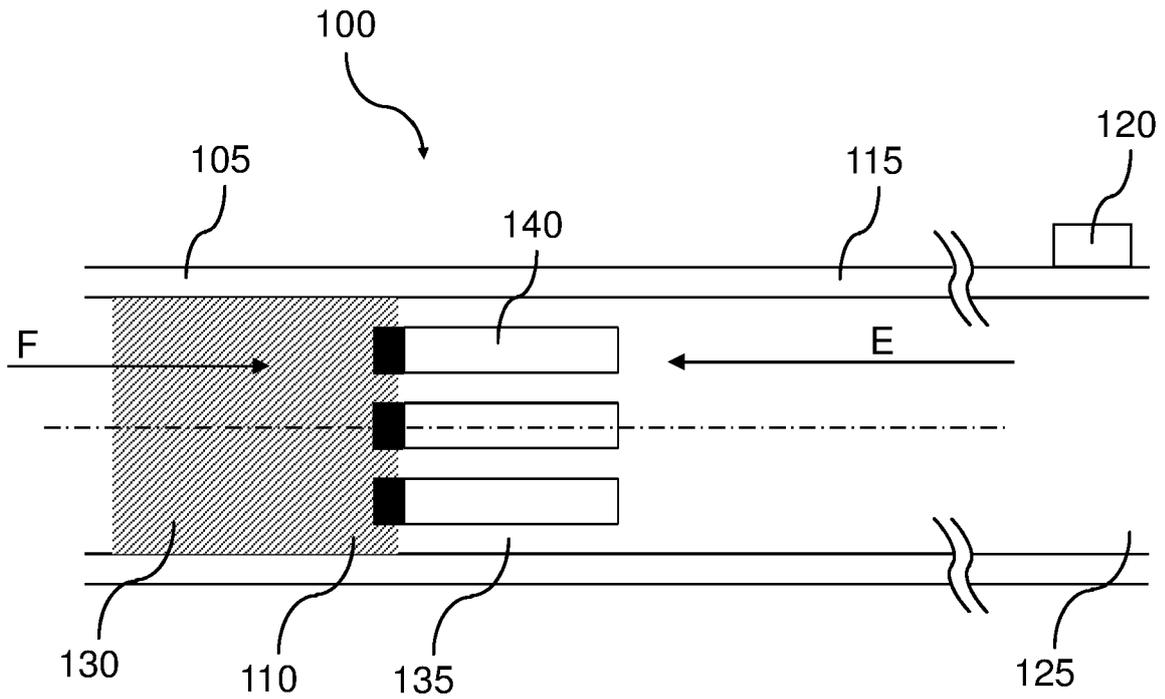


Figure 1

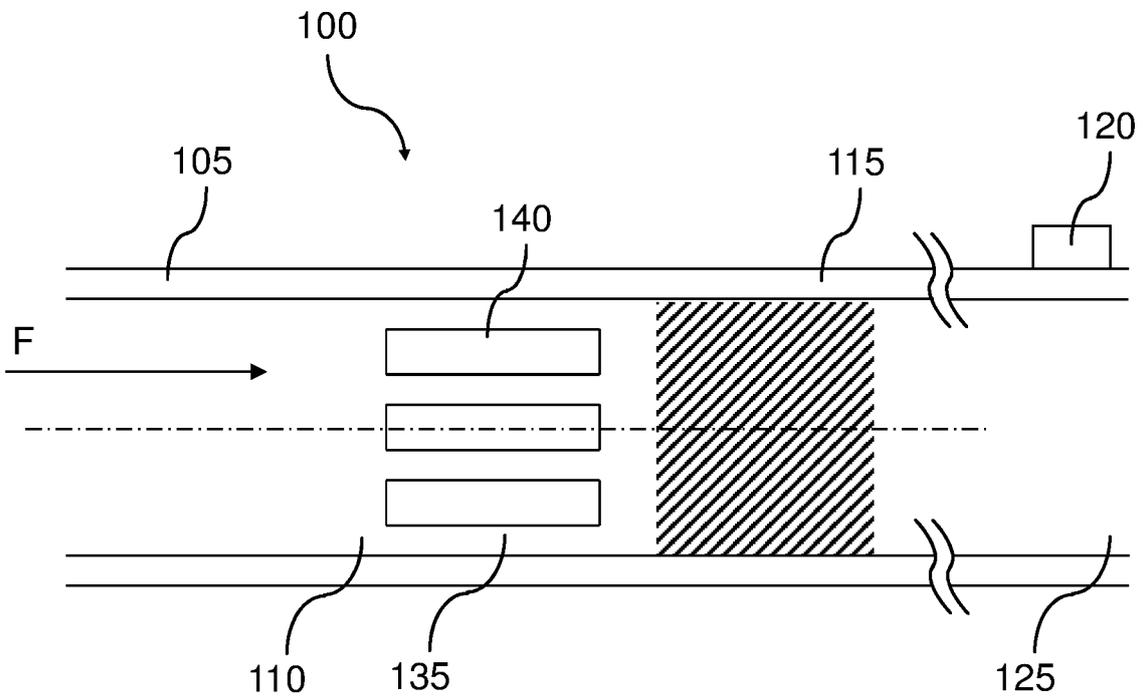


Figure 2

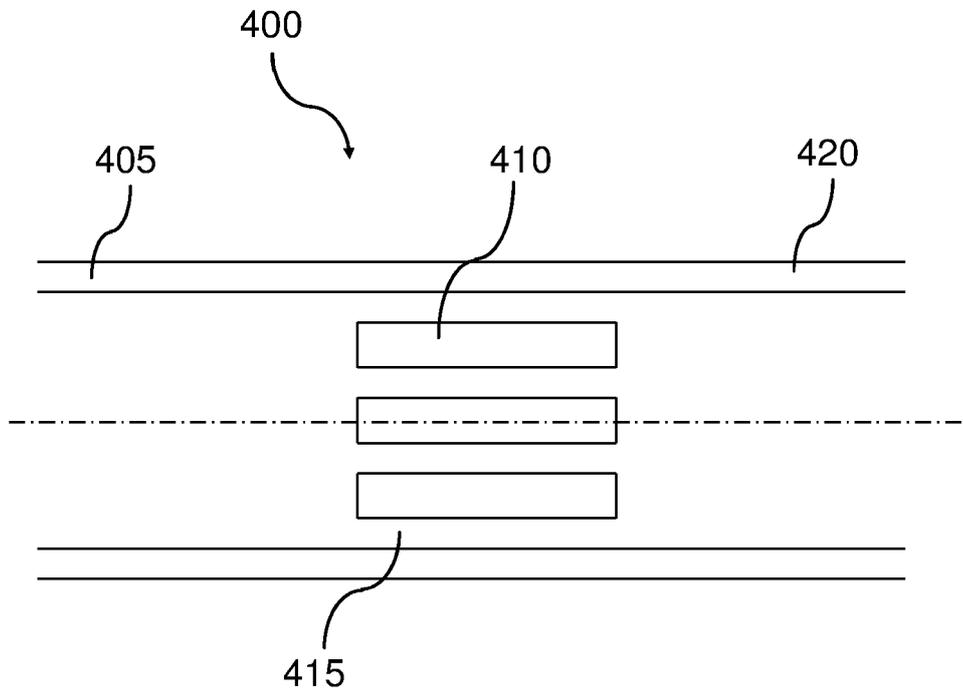


Figure 3

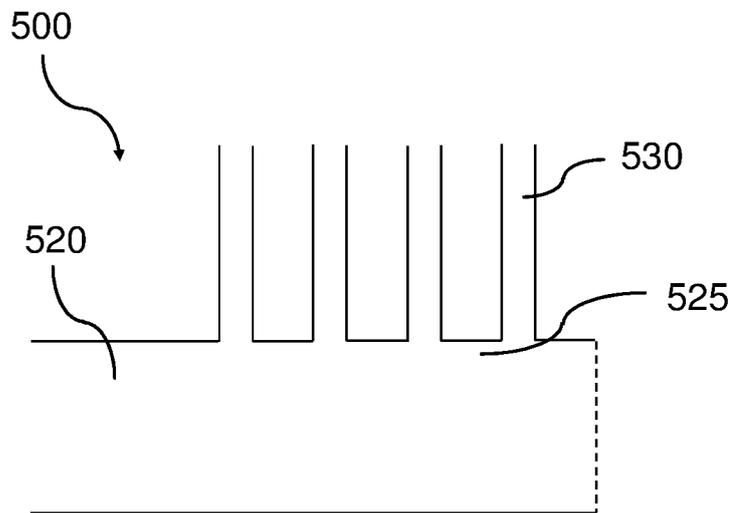


Figure 4

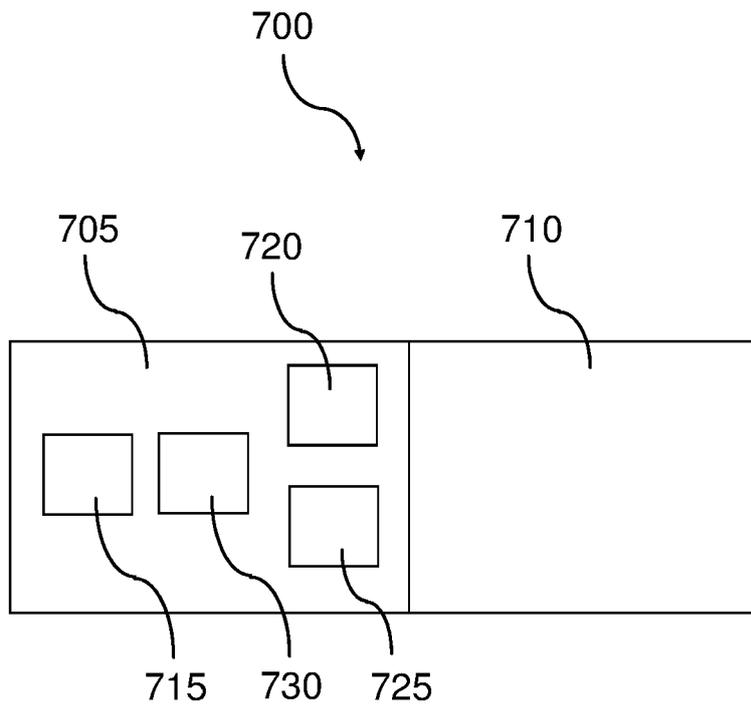


Figure 5

Figure 6

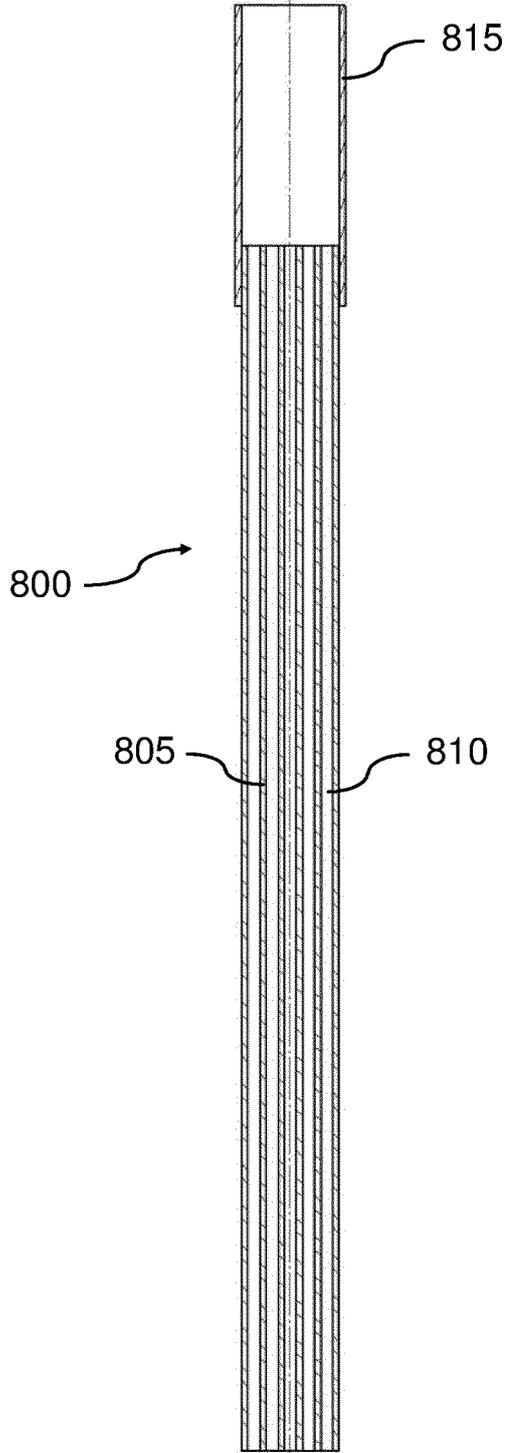
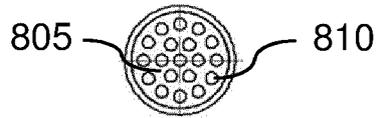


Figure 7

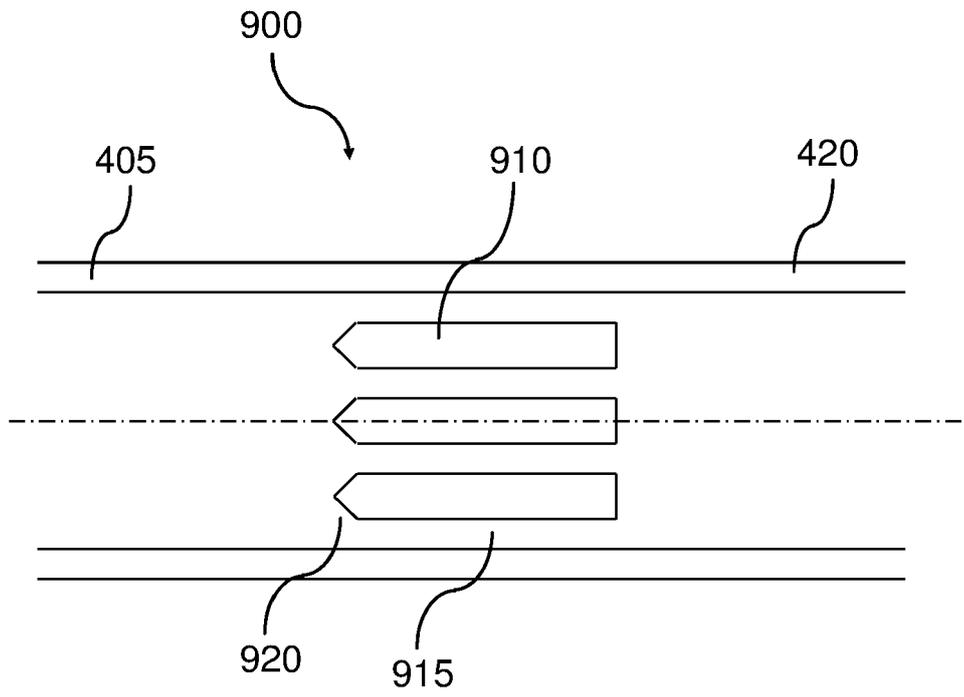


Figure 8

RAPPORT DE RECHERCHE

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

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

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

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

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

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

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

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

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

US 2005/034990 A1 (CROOKS RICHARD M [US] ET AL) 17 février 2005 (2005-02-17)

US 2006/042948 A1 (SANTIAGO JUAN G [US] ET AL) 2 mars 2006 (2006-03-02)

US 2009/071828 A1 (SQUIRES TODD M [US] ET AL) 19 mars 2009 (2009-03-19)

US 2008/087546 A1 (STRAND DAVID [US] ET AL) 17 avril 2008 (2008-04-17)

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

NEANT

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

FR 3 024 544 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 5 février 2016 (2016-02-05)