

Description

PUCE FLUIDIQUE ET SYSTEME D'ENCAPSULATION DE CELLULES

- [0001] La présente invention concerne le domaine technique des puces fluidiques et des systèmes d'encapsulation de cellules comprenant une telle puce fluidique.
- 5 [0002] Une puce fluidique est un ensemble de canaux gravés ou moulés dans un matériau tel que du verre, du silicium ou encore un polymère tel que le PDMS pour PolyDiMethylSiloxane.
- [0003] Dans le domaine ci-dessus, il est connu des puces fluidiques comprenant des entrées pour recevoir diverses substances et une sortie unique à travers laquelle les substances
10 sont ainsi réunies. Les puces fluidiques comprennent des canaux avec des sections dont les dimensions sont de l'ordre du millimètre jusqu'au micromètre qui relient les entrées à la sortie.
- [0004] De telles puces fluidiques peuvent être fabriquées aux moyens de différentes techniques. La technique de fabrication la plus commune comprend des étapes de moulage de
15 matériau de type « PDMS » ou par embossage de matière thermoplastique ou encore par moulage injecté de thermoplastique voire également au moyen d'une technique de lithographie chimique ou d'une technique d'impression de résines.
- [0005] La plupart des puces fluidiques sont utilisées avec des interfaces liquide-liquide, entre deux liquides le plus souvent non miscibles et ont une architecture en deux dimensions
20 suffisantes pour cet usage. Ces interfaces peuvent servir à faire des réactions chimiques par exemple (microréacteurs) mais sont souvent utilisées pour former des billes ou capsules. Lorsqu'elles utilisent des interfaces liquides-liquides, les puces fluidiques ne sont que rarement utilisées pour former des jets et utilisent la plupart du temps des régimes de goutte à goutte. Pour former un jet stable dans l'air en sortie de la puce, une
25 architecture 3D est nécessaire. Comme pour toutes les puces fluidiques, et d'autant plus pour leurs structures internes, une grande précision est nécessaire pour éviter les instabilités.
- [0006] Pour la production de puces fluidiques 3D ou trois dimensions, la principale technique repose sur l'impression de résines photopolymérisables en 3D. Deux types de machines
30 peuvent alors être utilisées : des imprimantes largement commercialisées de stéréolithographie telles que les imprimantes « Formlab » ou « Envisiontech » et la polymérisation par laser femtoseconde. Alors que la première technique permet la

- production d'objets de plusieurs centimètres, la résolution ne descend qu'à la cinquantaine de micromètre et ne permet pas de produire des structures robustes et reproductibles de moins de quelques centaines de micromètres. La deuxième technique bénéficie d'une très grande résolution spatiale inférieure au micromètre mais n'est pas utilisable industriellement pour la production de pièces comprenant des dimensions de l'ordre du centimètre. De plus, ces techniques présentent les inconvénients des résines polymérisables qui peuvent les rendre impropres à leur utilisation dans certains domaines tels que la bio-production, soit en raison de leur composition chimique ou encore du manque de certification.
- 10 [0007] Une technique pour la production de puces fluidiques 3D repose sur l'impression 3D soustractive en verre (« Selective Laser Etching ») de type silice fondue, quartz, saphir ou borosilicate. Un laser vient ainsi irradier les parties à enlever, pour former des canaux dans une plaque de verre après révélation chimique. La technique est intrinsèquement limitée en hauteur en raison de la distance de travail limitée de l'optique, et ce d'autant plus que la précision à atteindre est grande. Les parties irradiées sont ensuite dissoutes dans un bain chimique acide ou basique. Ce procédé peut durer plusieurs jours, d'où l'intérêt de limiter également la longueur des canaux pour éviter des temps de résidence dans le bain trop longs. En plus de l'impact sur la productivité et la rapidité du process, des temps de bain trop long peuvent créer des altérations géométriques et dimensionnelles trop importante des structures proches des entrées et sorties. De plus, selon cette méthode, le coût de la pièce produite est proportionnel à la dimension selon l'axe central Z. Enfin, la présence de longs canaux dans les puces induit une plus grande perte de charge, ce qui représente un réel inconvénient à l'utilisation selon l'application et les liquides utilisés.
- 25 [0008] Il est alors nécessaire de trouver une manière de compacter les dimensions selon l'axe central Z.
- [0009] La méthode décrite ci-dessus est utilisée pour fabrication de puces fluidique 3D pour la production de structure de type « Core-shell » par double émulsion comme la technologie « Raydrop ». De telles puces comprennent une tête en verre imprimée en 3D et montée sur deux capillaires coaxiaux permettant ainsi une encapsulation en goutte à goutte en 3D. Limités par l'impression selon l'axe Z et le coût, seule la tête est imprimée en 3D ce qui rajoute donc une étape complexe de montage pour garder une certaine précision de capillaires coaxiaux. Ce type de structure se passe toujours en phase liquide
- 30

comprenant des liquides non miscibles tels que l'huile et l'eau. L'utilisation de deux capillaires coaxiaux représente une réelle résistance fluide qui peut représenter une réelle limitation dans son utilisation, en fonction des débits et fluides utilisés.

- 5 [0010] En fonction des débits et de la nature des substances injectées dans chacune des entrées de la puce fluide, il peut apparaître une instabilité dans les différents fluides parcourant les canaux de la puce fluide. Contrairement aux régimes de goutte à goutte, la production de jets nécessite des plus grands débits ce qui les rend plus sensibles aux instabilités, et ce d'autant plus pour les jets dans l'air plutôt que dans un autre liquide non miscible tel l'huile.
- 10 [0011] L'invention vise ainsi à pallier ces différents problèmes et propose une puce fluide de confection simple et permettant d'obtenir un jet coaxial en sortie de la puce constitué des différentes substances entrantes. L'invention permet de compacter les dimensions selon l'axe Z tout en assurant un jet stable coaxial et sans avoir besoin d'une injection entrante coaxiale des fluides.
- 15 [0012] L'invention concerne donc une puce fluide composée d'un corps comprenant une entrée principale et au moins une entrée secondaire non coaxiale à l'entrée principale, chaque entrée principale et secondaire étant destinée à recevoir une substance et une sortie, l'entrée principale est reliée à la sortie par un canal principal comprenant une portion sensiblement rectiligne définissant un axe central Z pour la puce fluide, l'entrée
20 secondaire est également reliée à la sortie par un canal secondaire.
- [0013] L'invention concerne donc une puce fluide pour l'obtention d'un jet coaxial dans un gaz en sortie composée d'un corps comprenant une entrée principale et au moins une entrée secondaire non coaxiale à l'entrée principale, chaque entrée principale et
25 secondaire étant destinée à recevoir une substance et une sortie, l'entrée principale est reliée à la sortie par un canal principal comprenant une portion sensiblement rectiligne définissant un axe central Z pour la puce fluide, l'entrée secondaire est également reliée à la sortie par un canal secondaire, la géométrie des canaux principale et secondaire est tridimensionnelle.
- [0014] Selon une forme de réalisation, le jet coaxial en sortie de la puce fluide se fait dans
30 l'air. D'autres milieux d'environnement gazeux sont compatibles avec l'invention.
- [0015] Selon l'invention, le canal secondaire se divise en au moins deux conduits secondaires de même dimension qui se rejoignent dans un conduit circulaire d'injection coaxial avec le canal principal de manière équirépartie autour de l'axe central Z. La mise en œuvre de

- conduits secondaires de même résistance hydraulique permet de diviser de manière homogène le flux de substance injecté dans l'entrée secondaire correspondante tout en maintenant une stabilité de la substance dans et en sortie de la puce. Toutes les entrées secondaires comprennent des canaux secondaires qui se divisent en conduits secondaires de même dimension signifiant aussi de même section et de même forme au sein du même canal secondaire.
- [0016] Tous les conduits secondaires issus d'une même entrée secondaire se rejoignent dans un canal d'injection circulaire, coaxial au canal principal, de manière équirépartie par rapport à l'axe principal et à la même coordonnée selon l'axe central Z pour assurer une injection homogène des flux autour de l'axe central.
- [0017] La géométrie tridimensionnelle des canaux principale et secondaire permet d'accroître la stabilité du jet coaxial en sortie. En effet, la répartition du ou des canaux secondaires autour du canal principal au niveau de la sortie de la puce fluide est une répartition coaxiale en trois dimensions. Avantagusement, la structure tridimensionnelle de la puce fluide selon l'invention assure un jet coaxial stable dans l'air à partir notamment de fluide visqueux.
- [0018] Une telle architecture de puce fluide tridimensionnelle implique qu'une portion non négligeable des flux traversant les canaux principal et secondaire ont des composantes selon les trois dimensions de l'espace, c'est-à-dire que lesdits flux ne peuvent pas être contenus dans quelques plans discrets, en particulier, ne peuvent être contenus dans quelques plans discrets parallèles.
- [0019] Les conduits d'injection secondaire provenant d'une même entrée secondaire rejoignent le canal principal à la même coordonnée selon l'axe central Z, ou selon des coordonnées différentes, permettant la création d'un flux composé de manière coaxial des différentes substances injectées à travers les différentes entrées principal et secondaire. La création de tels jets coaxiaux en sortie permet d'obtenir un flux isotrope selon les dimensions XY en sortie et ainsi d'éviter les instabilités. Les canaux d'injections secondaires venant d'entrées secondaires différentes ne rejoignent pas nécessairement le canal principal à la même coordonnée selon l'axe central Z.
- [0020] En sortie de la puce, en n'importe quels points du flux symétriques par rapport à l'axe de sortie, les propriétés du flux sont symétriques par rapport à l'axe de sortie.
- [0021] Pour n'importe quels points du flux symétriques en sortie par rapport à l'axe de sortie, le chemin minimum entre les points et leur entrée dans la puce est sensiblement égal.

- [0022] Selon certaines formes de réalisation de la puce fluidique, une portion non rectiligne et non alignée avec l'axe central relie l'entrée principale au canal principal. Cela permet de placer les entrées selon un axe différent de l'axe central Z.
- [0023] Selon une caractéristique de l'invention, la puce fluidique est obtenue par une technique d'impression 3D soustractive sur du verre (« Selective Laser Etching »). Le verre utilisé est de type silice fondue, quartz, saphir ou borosilicate, et préférentiellement en silice fondue. Selon une forme de réalisation, la puce fluidique est obtenue par une technique d'impression 3D soustractive sur un matériau le permettant. Un tel matériau lorsqu'on lui retire de la matière est capable de garder une grande précision pour la dimension des canaux tout en permettant la production de pièce de volume millimétrique pouvant être supérieur à 1 mm³ et de préférence supérieur à 10 mm³, 100 mm³ voire 1000mm³.
- [0024] Selon une forme de réalisation de l'invention, le corps de la puce fluidique comprend une face supérieure comprenant l'entrée principale et au moins l'entrée secondaire et une face inférieure à l'opposé de la face supérieure et comprenant la sortie. L'entrée principale est ainsi alignée avec le canal principal et la sortie de la puce.
- [0025] Selon une caractéristique de l'invention, la géométrie des canaux principal et secondaire est tridimensionnelle. Ainsi la géométrie ne peut être complète en moins de trois plans en deux dimensions.
- [0026] Selon une autre caractéristique de l'invention, la géométrie de la puce fluidique est compacte selon l'axe de sortie. Cela signifie que la dimension de l'ensemble des canaux selon l'axe de sortie n'est pas plus de deux fois supérieure aux dimensions de l'ensemble des canaux selon les plans perpendiculaires à l'axe de sortie. Il est ainsi possible de produire une puce fluidique dont la dimension ne dépasse pas 5 cm selon l'axe Z et selon d'autres formes de réalisation, la dimension selon l'axe Z de la puce fluidique peut être de 1 cm, voire inférieure.
- [0027] Selon une forme de réalisation de l'invention, l'axe de sortie coïncide avec l'axe central Z.
- [0028] Selon une caractéristique de l'invention, le canal secondaire comprend une première séparation à une ordonnée B de l'axe central Z et une deuxième séparation à une ordonnée D de l'axe central Z, définissant ainsi quatre conduits secondaires de même longueur. La mise en œuvre d'un canal secondaire comprenant quatre conduits secondaires de même dimension et même résistance hydraulique permet une optimisation maximale de l'occupation de la hauteur de la puce fluidique tout en assurant un jet coaxial stable en sortie.

- [0029] Selon une autre caractéristique de l'invention, le canal secondaire comprend au moins une portion rectiligne débouchant au centre d'une portion en forme d'arc de cercle s'étendant dans un plan perpendiculaire à l'axe central Z. Mettre en œuvre des séparations en arc de cercle pour former les conduits secondaires permet d'obtenir une architecture en arbre et donc de chemins équivalents pour le flux traversant le canal secondaire. De plus, une telle symétrie par rapport à l'axe central Z, axe coaxial pour la puce fluidique permet d'accroître la stabilité des flux.
- [0030] Selon une forme de réalisation de l'invention, la puce fluidique comprend une première et une deuxième entrées secondaires reliées respectivement à un premier et un deuxième canal secondaire, le premier canal secondaire comprenant une portion en forme d'arc de cercle de diamètre D1 par rapport à l'axe central Z s'étendant dans un plan perpendiculaire à l'axe central Z, et le deuxième canal secondaire comprenant une portion en forme d'arc de cercle de diamètre D2 par rapport à l'axe central Z s'étendant dans un plan perpendiculaire à l'axe central Z, avec le diamètre D1 inférieur au diamètre D2.
- [0031] Ainsi, les conduits secondaires respectifs de chacune des entrées secondaires s'étendent selon des arcs de cercle de diamètre différents. Cette architecture a notamment l'avantage de ne pas croiser les conduits secondaires tout en gardant le principe de chemin équivalent pour chaque canal secondaire. Les conduits secondaires respectifs ont donc des dimensions différentes selon le canal secondaire correspondant mais pour un même canal secondaire, chacun des conduits secondaires correspondants à la même dimension.
- [0032] Selon une caractéristique de l'invention, le premier et le deuxième canal secondaire comprennent chacun deux portions en arc de cercle à deux ordonnées différentes de l'axe central Z définissant ainsi chacun quatre conduits secondaires de même dimension. Les séparations se font ainsi à une même ordonnée ce qui facilite la fabrication de la puce fluidique.
- [0033] Selon une forme de réalisation de l'invention, le canal principal comprend quatre conduits principaux de même dimension. La mise en œuvre de quatre conduits principaux permet notamment de stabiliser le flux traversant le canal principal.
- [0034] Selon une autre caractéristique de l'invention, chaque canal principal et secondaire comprend une portion en forme de cercle débouchant sur la sortie, chaque portion en forme de cercle étant concentrique. Cette architecture a l'avantage de créer des jets

coaxiaux en sortie de la puce fluidique ce qui favorise certains procédés d'utilisation de la puce fluidique nécessitant des fluides concentriques.

- 5 [0035] L'invention concerne également un système d'encapsulation de cellules, le système comportant au moins deux conteneurs, l'un des conteneurs comportant une solution de cellules et l'autre des conteneurs comportant une solution apte à gélifier, un dispositif d'encapsulation comprenant une puce fluidique selon l'invention, les entrées principale et secondaire étant chacune reliée à l'un des conteneurs via un distributeur et apte à former un jet concentrique à partir des solutions fournies par les distributeurs, le dispositif d'encapsulation étant agencé de sorte que le jet se fractionne, en sortie du
- 10 dispositif d'encapsulation, en gouttes dont la couche extérieure est la solution apte à gélifier et le cœur la solution de cellules, et un bain de gélification agencé en aval du dispositif d'encapsulation pour collecter les gouttes formées par le dispositif d'encapsulation et agencé pour provoquer une gélification de la couche extérieure de chaque goutte lors de son immersion dans le bain.
- 15 [0036] L'utilisation d'une telle puce fluidique favorise le système d'encapsulation de cellules à haut débit (par rapport au goutte à goutte) notamment grâce à la création d'un jet concentrique en sortie de la puce fluidique selon l'invention. La puce fluidique selon l'invention peut également être utilisée pour une sortie goutte à goutte.
- 20 [0037] L'utilisation d'une puce fluidique selon l'invention permet de former un jet coaxial qui se fractionne en gouttes en sortie du dispositif d'encapsulation et donc favorise un système de culture tridimensionnel. De telles gouttes comprennent en leur cœur la solution de cellules qui est complètement entourée par la solution à gélifier. Ces gouttes sont ensuite collectées dans un bain de gélification permettant de rigidifier leur couche extérieure pour former une coque.
- 25 [0038] Les cultures en trois dimensions sont plus proches des systèmes naturels in vivo, et peuvent être utilisées pour de nombreuses applications en particulier dans le développement de thérapies. Par exemple, pour une culture de cellules souches, la solution apte à gélifier comprend de l'alginate et le bain de gélification comprend du calcium. Les cellules encapsulées ainsi formées permettent de cultiver les cellules en
- 30 milieu liquide, tandis que la coque protège les cellules des contraintes mécaniques liées aux collisions ou fusions lors de la culture en suspension liquide.
- [0039] Selon une variante, la solution de cellules peut contenir du milieu de culture et/ou une matrice extracellulaire et/ou un substitut de matrice extracellulaire et/ou une solution

aqueuse. Selon une autre variante, la solution intermédiaire peut contenir une matrice extracellulaire et/ou un substitut de matrice extracellulaire. Le cas échéant, le dispositif d'encapsulation sera agencé pour former, dans la cuve de collecte, des microcompartiments cellulaires dont la couche extérieure est la solution apte à gélifier, une couche intermédiaire formant une matrice cellulaire ou substitut de matrice extracellulaire et le cœur la solution de cellules. Cette matrice cellulaire permet aux cellules de la solution de cellules de se développer et de se multiplier. Par exemple, le substitut de matrice extracellulaire peut comprendre un mélange de protéines et de composés extracellulaires nécessaires à la culture cellulaire, et plus particulièrement de cellules pluripotentes. Préférentiellement, la matrice extracellulaire ou substitut de matrice extracellulaire peut comprendre des protéines structurales, telles que des laminines contenant les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 4$ ou $\alpha 5$, les sous-unités $\beta 1$ ou $\beta 2$, et les sous-unités $\gamma 1$ ou $\gamma 3$, de l'entactine, de la vitronectine, des laminines, du collagène, ainsi que des facteurs de croissance, tels que du TGF-béata et/ou de l'EGF. La matrice extracellulaire peut être une solution aqueuse et/ou un hydrogel, préférentiellement un hydrogel, différent de l'hydrogel formant la couche extérieure, tel que par exemple un hydrogel comprenant ou constitué d'alginate, de fibrine, de laminine, de fibronectine, d'entactine, d'acide hyaluronique et/ou de collagène. Il peut s'agir également d'une matrice extracellulaire ou d'un substitut de matrice extracellulaire tel que le Matrigel®. Dans l'invention, la solution de cellules comporte une pluralité de cellules. Les cellules peuvent être de tous types cellulaires. Plus préférentiellement, les cellules sont choisies parmi les cellules eucaryotes humaines, animales et végétales, encore plus préférentiellement les cellules souches pluripotentes, les progéniteurs les cellules en cours de différenciation et les cellules différenciées. Le cas échéant, lesdites cellules souches pluripotentes pourront être des cellules souches pluripotentes induites (IPS), des cellules MUSE (« Multilineage-differentiating Stress Enduring ») que l'on trouve dans la peau et la moelle osseuse des mammifères adultes, ou des cellules souches embryonnaires (ES). Dans un mode de réalisation particulier, et pour des raisons légales ou éthiques, les cellules souches s'entendent à l'exclusion des cellules souches embryonnaires humaines ou des cellules ayant nécessité la destruction d'embryons humains.

[0040] Dans un exemple de réalisation de l'invention, la solution apte à gélifier comporte ou est constitué par un hydrogel, de sorte que la couche extérieure soit une structure tridimensionnelle formée à partir d'une matrice de chaînes de polymères gonflée par un liquide, et préférentiellement de l'eau. Par exemple, la solution apte à gélifier comporte

ou est constituée d'alginate et, préférentiellement, consiste en de l'alginate. Dans le contexte de l'invention, on entend par « alginate » des polysaccharides linéaires formés à partir de β -D-mannuronate (M) et α -L-gulonate (G), des sels et dérivés de ceux-ci. Avantageusement, l'alginate est un alginate de sodium, composé à plus de 60%, voire plus de 80% de G et moins de 40%, voire moins de 20% de M, avec une masse moléculaire moyenne de 100 à 400 KDa et une à concentration totale comprise entre 0.5% et 5% en masse.

[0041] Dans les microcompartiments obtenus au moyen du système selon l'invention, les cellules présentes dans la partie interne peuvent être isolées et/ou sous forme d'au moins une couche et/ou ou sous forme d'au moins un agrégat en trois dimensions et/ou sous forme d'au moins un micro-tissu cellulaire en trois dimensions, éventuellement avec au moins une lumière.

[0042] Selon une variante, au moins un microcompartiment cellulaire obtenu au moyen du système selon l'invention comprend au moins une couche de cellules et au moins une lumière. Lorsque le microcompartiment comprend au moins une lumière, au moins une couche de cellules, la couche de solution intermédiaire de la partie interne et la couche externe sont préférentiellement, sont successivement organisées autour de ladite lumière. On parle d'une conformation en forme de cyste. Ainsi, selon une variante, au moins un microcompartiment cellulaire obtenu au moyen du système selon l'invention comprend au moins un cyste, dont le centre creux, ou lumière, est préférentiellement aqueux. Dans le contexte de l'invention, un « cyste » s'entend d'un agencement tridimensionnel en monocouche de cellules ou en assise épithéliale, sphérique, entourant une lumière centrale. Cette conformation sous forme de cyste(s) permet de réduire les pressions subies par les cellules. Cette configuration permet également de diminuer la mortalité cellulaire et d'augmenter le facteur d'amplification de la culture. Par conséquent cela permet de réduire le nombre de passages et dissociation nécessaire ; de réduire le temps en culture nécessaire pour atteindre le nombre de cellules final nécessaire.

[0043] Les microcompartiments cellulaires obtenus au moyen du système selon l'invention comprennent préférentiellement un ou plusieurs cystes, et/ou un ou plusieurs tissus et/ou micro tissus et/ou agrégats de cellules avec ou sans lumière(s).

[0044] Avantageusement, le système selon l'invention est agencé de sorte que chaque microcompartiment cellulaire obtenu au moyen de ce système étage soit clos. Dans un

- mode de réalisation, le système selon l'invention est agencé de sorte que chaque microcompartiment cellulaire obtenu au moyen de ce système présente une forme sphérique ou de goutte. Préférentiellement, le diamètre d'un tel microcompartiment est compris entre 10 μm et 1 mm, plus préférentiellement entre 50 μm et 700 μm , encore plus préférentiellement supérieur à 200 μm , de manière préférée inférieure à 600 μm .
- 5 [0045] Dans un autre mode de réalisation, le système selon l'invention peut être agencé de sorte que chaque microcompartiment cellulaire obtenu au moyen de ce système présente une forme allongée, notamment une forme ovoïde ou tubulaire.
- [0046] Avantageusement, chaque conteneur du système selon l'invention peut être une poche
10 souple, une seringue ou un tube à fond conique. Avantageusement toujours, chaque conteneur est relié à une entrée du dispositif d'encapsulation par un ou plusieurs distributeurs, comme des conduits, tuyaux ou tubulaires, un pousse seringue ou une pompe péristaltique permettant de distribuer, de façon continue ou par dose, la solution contenue dans ce conteneur vers ladite entrée du dispositif d'encapsulation.
- 15 [0047] Bien entendu, les différentes caractéristiques, variantes et formes de réalisation de l'invention peuvent être associées les unes avec les autres selon diverses combinaisons dans la mesure où elles ne sont pas incompatibles ou exclusives les unes des autres.
- [0048] De plus, diverses autres caractéristiques de l'invention ressortent de la description annexée effectuée en référence aux dessins qui illustrent des formes, non limitatives, de
20 réalisation de l'invention et où :
- [0049] [Fig.1] est une vue en perspective d'un exemple de réalisation d'une puce fluidique selon l'invention dont les canaux intérieurs sont visibles par transparence du corps de la puce fluidique,
- [0050] [Fig.2] est une vue en perspective de la puce fluidique de la figure 1 comprenant un angle
25 de vue différent,
- [0051] [Fig.3] est une vue en demi-coupe de la puce fluidique de la figure 1 selon un angle de vue différent au niveau du plan de coupe passant par l'ordonnée A de l'axe central Z,
- [0052] [Fig.4] est une vue en demi-coupe de la puce fluidique de la figure 1 selon un angle de vue différent au niveau du plan de coupe passant par l'ordonnée B de l'axe central Z,
- 30 [0053] [Fig.5] est une vue en demi-coupe de la puce fluidique de la figure 1 selon un angle de vue différent au niveau du plan de coupe passant par l'ordonnée C de l'axe central Z,

- [0054] [Fig.6] est une vue en demi-coupe de la puce fluidique de la figure 1 selon un angle de vue différent au niveau du plan de coupe passant par l'ordonnée D de l'axe central Z,
- [0055] [Fig.7] est une vue en demi-coupe de la puce fluidique de la figure 1 selon un angle de vue différent au niveau du plan de coupe passant par l'ordonnée E de l'axe central Z,
- 5 [0056] [Fig.8] est une vue en demi-coupe de la puce fluidique de la figure 1 selon un angle de vue différent au niveau du plan de coupe passant par l'ordonnée F de l'axe central Z,
- [0057] [Fig.9] est une vue en demi-coupe de la puce fluidique de la figure 1 selon un angle de vue différent au niveau du plan de coupe passant par l'ordonnée G de l'axe central Z,
- [0058] [Fig.10] est une vue d'un exemple de réalisation d'un système d'encapsulation de cellules
10 selon l'invention, et
- [0059] [Fig.11] une vue en coupe du dispositif d'encapsulation du système de la figure 10.
- [0060] Le trait en pointillé de la figure 1 correspond à l'axe central Z de la puce fluidique.
- [0061] Les traits en gras des figures 3 à 9 représentent les plans de coupe au niveau de chacune des ordonnées notées de A à G sur l'axe central Z de la figure 1.
- 15 [0062] Il est à noter que sur ces figures les éléments structurels et/ou fonctionnels communs aux différentes variantes peuvent présenter les mêmes références.
- [0063] L'invention vise à stabiliser le jet en sortie d'une puce fluidique.
- [0064] A ces fins, l'invention désignée par la référence 1 dans son ensemble une puce fluidique est composée d'un corps 2 comprenant une face supérieure 3 et à l'opposée une face
20 inférieure 4. La face supérieure 3 comprend une entrée principale 5 et au moins une entrée secondaire 6. La face inférieure 4 comprend une sortie 7.
- [0065] Les figures illustrent une puce fluidique 1 comprenant un corps 2 de forme cylindrique circulaire droit autour d'un axe central Z avec une face supérieure 3, une face inférieure 4 et une face latérale. D'autres formes de réalisation telles que polygonale sont
25 compatibles avec l'invention. Ainsi, les faces du corps 2 de la puce fluidique 1 ne sont pas systématiquement opposées.
- [0066] Un canal principal 8 relie l'entrée principale 5 à la sortie 7. Le canal principal 8 est sensiblement rectiligne. L'entrée principale 5 est ainsi alignée sur la sortie 7 selon l'axe central Z représenté à la figure 1. Selon la forme de réalisation illustrée, le canal principal
30 8 suit sensiblement l'axe central Z de la puce fluidique 1.

- [0067] Une puce fluidique 1 selon l'invention comprend également un canal secondaire 9 qui relie l'entrée secondaire 6 à la sortie 7. Une puce fluidique 1 selon l'invention peut comprendre plusieurs entrées secondaires 6, la puce fluidique 1 comprend alors un nombre égal de canaux secondaires 9 qui relient respectivement chaque entrée
5 secondaire 6 à la sortie 7.
- [0068] Selon la forme de réalisation illustrée, le canal principal 8 et le ou les canaux secondaires 9 comprennent des sections en partie circulaire dont les dimensions varient et également des sections de forme plus complexe, par exemple au niveau des séparations d'un canal en deux parties nommées conduits et décrits plus bas.
- 10 [0069] Les figures 1 et 2 illustrent une forme de réalisation d'une puce fluidique 1 comprenant une première entrée secondaire 6a et une deuxième entrée secondaire 6b disposées de part et d'autre de l'entrée principale 5, les trois entrées principale 5 et secondaires 6a,6b étant alignées. Selon d'autres formes de réalisation de l'invention non illustrées, une puce fluidique 1 comprend une seule entrée secondaire 6 ou encore trois ou plus entrées
15 secondaires 6. Le principe d'architecture des canaux secondaires 9 qui s'articulent autour du canal principal 8 est identique et expliqué ci-après. Selon d'autres formes de réalisation non illustrées, les entrées secondaires 6 peuvent ne pas être alignées.
- [0070] La figure 3 correspond à une coupe de la figure 1 au niveau de l'ordonnée notée A sur l'axe central Z sur la figure 1. L'entrée principale 5 est ainsi reliée au conduit principal 8.
20 La première entrée secondaire 6a est reliée au premier conduit secondaire 9a et la deuxième entrée secondaire 6b est reliée au deuxième conduit secondaire 9b.
- [0071] La figure 4 correspond à une coupe de la figure 1 au niveau de l'ordonnée notée B sur l'axe central Z sur la figure 1. Le canal principal 8 se divise en formant quatre conduits principaux 10 rectilignes et parallèles les uns aux autres. Et, les canaux secondaires 9a,9b
25 se divisent chacun en formant deux conduits secondaires 11a,11b. Le premier canal secondaire 9a comprend une portion rectiligne de manière à se rapprocher du canal principal 8 puis comprend une séparation formant un arc de cercle, de diamètre D1 par rapport à l'axe central Z. Le deuxième canal secondaire 9b comprend une séparation formant un arc de cercle, de diamètre D2 par rapport à l'axe central Z. Ainsi D1 est
30 inférieur à D2 de manière à optimiser l'espace compris dans le plan et notamment situé à l'ordonnée notée B.
- [0072] Selon une forme de réalisation non illustrées, la puce fluidique 1 comprend une troisième entrée secondaire 6 et donc un troisième canal secondaire 9. Ledit troisième canal

secondaire 9 comprend alors une séparation formant un arc de cercle de diamètre D3 supérieur au diamètre D2 de l'arc de cercle issu du deuxième canal secondaire 9. Selon la disposition de la troisième entrée secondaire, le troisième canal secondaire 9 comprend une portion rectiligne permettant de placer l'arc de cercle correspond au diamètre D3 voulu. Cette architecture comprenant des arcs de cercle concentrique est disposée selon le nombre d'entrées secondaires 6.

[0073] Avantageusement selon la forme de réalisation illustrée, la séparation de chaque canal secondaire 9 se fait au niveau du milieu de l'arc de cercle afin de former des conduits secondaires 11 de même longueur.

10 [0074] Un canal secondaire 9 d'une puce fluidique 1 selon l'invention comprend donc au moins une portion de canal rectiligne sensiblement parallèle à l'axe central Z.

[0075] Les quatre conduits 11a,11b sont également visibles à la figure 5 qui correspond à une coupe de la figure 1 au niveau de l'ordonnée notée C sur l'axe central Z sur la figure 1.

15 [0076] Selon la forme de réalisation illustrée, les canaux secondaires 6a,6b comprennent une deuxième division visible notamment à la figure 6 qui qui correspond à une coupe de la figure 1 au niveau de l'ordonnée notée D sur l'axe central Z sur la figure 1. Les canaux secondaires 6a,6b se divisent donc deux fois en formant quatre conduits secondaires 11a,11b. Cette deuxième séparation comprend également des portions en forme d'arc de cercle autour de l'axe central Z de la puce fluidique 1 selon les mêmes diamètres D1, D2 que pour la première séparation. Les arcs de cercles respectifs des premier et deuxième canaux secondaires 9a,9b sont symétriques.

20 [0077] Les quatre conduits secondaires 11a,11b ainsi formés de chacun des canaux secondaires 9a,9b sont visibles à la figure 7 qui correspond à une coupe de la figure 1 au niveau de l'ordonnée notée E sur l'axe central Z sur la figure 1. Douze conduits principaux 10 et secondaires 11a,11b sont ainsi visibles.

25 [0078] Tous les canaux principal 8 et secondaire 9 se rejoignent au niveau de la sortie 7 sur un conduit circulaire d'injection coaxial. Selon la forme de réalisation illustrée et notamment à la figure 8 qui correspond à une coupe de la figure 1 au niveau de l'ordonnée notée F sur l'axe central Z sur la figure 1, chaque conduit principal 10 et secondaires 11a,11b se rejoint respectivement sur un conduit unique respectif de forme circulaire. Chaque conduit principal 10 et secondaires 11a,11b étant concentrique afin que tous les conduits se rejoignent de manière concentrique vers la sortie 7 dans le conduit circulaire d'injection coaxial. Ainsi, tous les jets sont coaxiaux en sortie de la puce fluidique 1. Selon

la forme de réalisation illustrée, la sortie 7 est directement dans l'air. Selon d'autres formes de réalisation non illustrées, la sortie 7 est reliée à un accessoire ou une extension telle qu'une buse.

- [0079] Selon une forme d'utilisation, une puce fluidique 1 est utilisée pour un système
5 d'encapsulation de cellules.
- [0080] Le système d'encapsulation de cellules comporte au moins deux conteneurs, l'un des conteneurs comportant une solution de cellules et l'autre des conteneurs comportant une solution apte à gélifier.
- [0081] Le système d'encapsulation de cellules comprend également un dispositif
10 d'encapsulation comprenant une puce fluidique 1 selon l'invention, les entrées principale 5 et secondaire 6 étant chacune reliée à l'un des conteneurs via un distributeur. La puce fluidique 1 est apte à former un jet concentrique en sortie à partir des solutions fournies par les distributeurs. Le dispositif d'encapsulation est agencé de sorte que le jet se fractionne, en sortie du dispositif d'encapsulation, en gouttes dont la couche extérieure
15 est la solution apte à gélifier et le cœur la solution de cellules.
- [0082] Enfin, le système d'encapsulation de cellules comprend un bain de gélification agencé en aval du dispositif d'encapsulation pour collecter les gouttes formées par le dispositif d'encapsulation de cellules et agencé pour provoquer une gélification de la couche extérieure de chaque goutte lors de son immersion dans le bain.
- 20 [0083] La figure 10 représente un système d'encapsulation de cellules selon un mode de réalisation de l'invention.
- [0084] Le système comporte deux conteneurs 110 et 120. Un premier conteneur 110 comporte une solution comportant une pluralité de cellules souches pluripotentes humaines. Un deuxième conteneur 120 comporte une solution apte à gélifier, comportant par exemple
25 un hydrogel tel que de l'alginate. On pourra prévoir que le système comporte un troisième conteneur comportant une solution intermédiaire, par exemple comprenant une solution isotonique tel que du sorbitol.
- [0085] Le système comporte également un dispositif d'encapsulation 130 comprenant une puce fluidique 1 et agencé pour former, à partir des solutions des conteneurs 110 et 120, des
30 microcompartiments cellulaires dont la couche extérieure est la solution d'alginate et le cœur la solution de cellules.
- [0086] La figure 11 représente une vue en coupe du dispositif d'encapsulation 130.

- [0087] Comme représenté sur cette figure 11, le dispositif d'encapsulation 130 comporte plusieurs entrées 5,6 chacune reliée à l'un des conteneurs 110,120 via un distributeur 140. Dans l'exemple décrit, chaque distributeur 140 comporte ainsi un circuit de distribution et un organe de déplacement, comme un pousse seringue ou une pompe péristaltique, permettant de distribuer, de façon continue ou par dose, la solution contenue dans un conteneur 110, 120 vers l'entrée 5,6 du dispositif 130 à laquelle il est relié.
- [0088] Il est à relever que le distributeur 140 destiné à la distribution de la solution d'alginate est équipé, dans l'exemple décrit, d'un organe apte à charger électriquement la solution d'alginate avec un potentiel électrique. On pourra prévoir, en variante, que la solution d'alginate soit chargée directement dans son conteneur 120, via une électrode immergée dans cette solution.
- [0089] Le dispositif d'encapsulation 130 comprend une puce fluidique 1. Selon cet exemple de réalisation illustrée, la puce fluidique 1 comporte un corps 2, comprenant les entrées 5,6, et une buse 340 reliée à une sortie 7 unique du corps 2 et formant une sortie unique du dispositif 130. On pourra prévoir que le corps 2 et la buse 340 soient réalisés en verre ou en un autre matériau adapté au domaine de l'industrie pharmaceutique. On pourra prévoir que le corps 2 et la buse 340 forment une pièce unique ou au contraire qu'ils soient réalisés séparément puis assemblés pour former le dispositif d'encapsulation 130.
- [0090] Dans l'exemple décrit, le corps 2 comporte un canal principal 8 comprenant une portion sensiblement rectiligne définissant un axe central du dispositif d'encapsulation 130. Ce canal principal 8 relie l'entrée principale 5 à la sortie 7 unique du corps 2. Le corps 2 comporte un canal secondaire 9 reliant la deuxième entrée 6 à la sortie 7 unique. Ce canal secondaire 9 se subdivise en portions s'étendant autour du canal principal 8, lesdites subdivisions du canal secondaire 9 se rejoignant au niveau de la sortie 7 unique du corps 2 en une portion circulaire unique, concentrique avec le canal principal. Cette portion circulaire unique et le canal principal se rejoignent alors pour former la sortie 7 unique du corps 2.
- [0091] En d'autres termes, la puce fluidique 1 permet de former un flux concentrique à partir des solutions fournies par les conteneurs 110,120 via les distributeurs 140, un flux externe étant formé par la solution d'alginate et un flux interne étant formé par la solution de cellules.

- [0092] La buse 340 reçoit ainsi le flux concentrique. Compte tenu des débits des solutions, et de la force électrostatique que génèrent les charges électriques portées par la solution d'alginate, le dispositif d'encapsulation 130 génère ainsi, en sortie de la buse 340, un jet concentrique à partir du flux concentrique. Ce jet concentrique se fractionne, sous l'effet de l'instabilité Plateau-Rayleigh, en microcompartiments cellulaires dont la couche extérieure est la solution d'alginate et le cœur la solution de cellules.
- [0093] Le dispositif d'encapsulation 130 est ainsi du type « electro-jetting ». On notera que les tailles relatives de la couche extérieure et du cœur des microcompartiments peuvent être ajustées en modifiant les rapports de débit des deux solutions grâce aux distributeurs 140, tandis que la taille globale des microcompartiments peut être contrôlée en ajustant le débit global des solutions et le potentiel électrique de la solution d'alginate.
- [0094] On pourra prévoir en variante de dimensionner les débits des solutions ainsi que le potentiel électrique pour que le dispositif d'encapsulation 130 soit du type « electro-dripping », et forme ainsi les microcompartiments les uns après les autres directement depuis la buse 340.
- [0095] Comme montré en figure 11, un anneau métallique 160, relié à la masse par un connecteur 170, s'étend en aval de la sortie du dispositif d'encapsulation 130 de sorte que le jet ou les microcompartiments cellulaires traversent cet anneau. Le champ électrique généré par cet anneau métallique permet de favoriser la dispersion des microcompartiments cellulaires, dans le cas d'un dispositif de type « electro-jetting ».
- [0096] En référence de nouveau à la figure 10, le système comporte par ailleurs une cuve de collecte 150 agencée sous le dispositif d'encapsulation 130 et contenant une première solution destinée à collecter les microcompartiments cellulaires formés par ce dispositif d'encapsulation 130 et tombant par gravité. A ces fins, la cuve de collecte 150 comprend un bain de gélification.
- [0097] La solution de gélification comporte un surfactant et un sel de calcium permettant de réticuler une solution d'alginate, et permettant ainsi de provoquer une rigidification ou gélification de la couche extérieure de chaque microcompartiment cellulaire lors de son immersion dans la cuve de collecte.
- [0098] Chaque microcompartiment cellulaire obtenu au moyen de ce premier étage est ainsi clos et présente, dans l'exemple décrit, une forme sphérique ou de goutte allongée.

- [0099] Dans une variante, le conteneur comprenant la solution de cellules et/ou le conteneur comprenant la solution intermédiaire, comprend au moins une matrice extracellulaire et/ou un substitut de matrice extracellulaire. Dans ce cas, le dispositif d'encapsulation 130 pourra former des microcompartiments cellulaires dont la couche extérieure d'hydrogel provenant de la solution d'alginate, une couche intermédiaire formant une matrice cellulaire et/ou un substitut de matrice extracellulaire provenant de la solution de cellules et/ou de la solution intermédiaire et au moins une couche et/ou assise et/ou agrégat et/ou cyste de cellules provenant de la solution de cellules. Dans cet exemple, on pourra envisager que la solution chargée électriquement avec ledit potentiel électrique soit la solution d'alginate et/ou la solution intermédiaire de sorbitol.
- [0100] On notera que la cuve de collecte 150 comporte une sortie de soutirage 1510 de la solution de gélification et des microcompartiments immergés dans cette solution ainsi qu'une entrée d'injection 1520 de la solution de gélification dans la cuve de collecte 150. Ces entrée et sortie 1510 et 1520 sont reliées à un circuit de collecte.
- [0101] Dans l'exemple décrit, la cuve de collecte est formée par une partie inférieure 1530 contenant la solution de gélification et sur laquelle sont prévues la sortie de soutirage 1510 et l'entrée d'injection 1520 et par une partie supérieure 1540 formant un capot sur lequel est monté le dispositif d'encapsulation 130 et l'anneau métallique 160. L'ensemble cuve de collecte 1530 – capot 1540 définit ainsi une enceinte close, appropriée pour la production de microcompartiments cellulaires au regard des exigences de stérilité qui s'imposent.
- [0102] Bien entendu, diverses autres modifications peuvent être apportées à l'invention dans le cadre des revendications annexées.

Revendications

- [Revendication 1] Puce fluidique (1) composée d'un corps (2) comprenant une entrée principale (5) et au moins une entrée secondaire (6) non coaxiale à l'entrée principale (5), chaque entrée principale (5) et secondaire (6) étant destinée à recevoir une substance et une sortie (7), l'entrée principale (5) est reliée à la sortie (7) par un canal principal (8) comprenant une portion sensiblement rectiligne définissant un axe central Z pour la puce fluidique (1), l'entrée secondaire est également reliée à la sortie (7) par un canal secondaire (9), caractérisée en ce que le canal secondaire (9) se divise en au moins deux conduits secondaires (11) de même dimensions qui se rejoignent dans un conduit circulaire d'injection coaxial avec le canal principal (8) de manière équirépartie autour de l'axe central Z.
- [Revendication 2] Puce fluidique (1) selon la revendication précédente obtenue par une technique d'impression soustractive sur du verre.
- [Revendication 3] Puce fluidique (1) selon l'une des revendications précédentes dans laquelle le corps (2) comprend une face supérieure (3) comprenant l'entrée principale (5) et au moins l'entrée secondaire (6) et une face inférieure (4) à l'opposé de la face supérieure (3) et comprenant la sortie (7).
- [Revendication 4] Puce fluidique (1) selon l'une des revendications précédentes dans laquelle la géométrie des canaux principale (5) et secondaire (6) est tridimensionnelle.
- [Revendication 5] Puce fluidique (1) selon l'une des revendications précédentes dans laquelle la géométrie de la puce fluidique (1) est compacte selon l'axe de sortie.
- [Revendication 6] Puce fluidique (1) selon l'une des revendications précédentes dans laquelle le canal secondaire (9) comprend une première séparation à une ordonnée B de l'axe central Z et une deuxième séparation à une ordonnée D de l'axe central Z, définissant ainsi quatre conduits secondaires (11) de même longueur.
- [Revendication 7] Puce fluidique (1) selon l'une des revendications précédentes dans laquelle le canal secondaire (9) comprend au moins une portion rectiligne débouchant au centre d'une portion en forme d'arc de cercle s'étendant dans un plan perpendiculaire à l'axe central Z.
- [Revendication 8] Puce fluidique (1) selon l'une des revendications précédentes comprenant une première et une deuxième entrées secondaires (6a,6b) reliées respectivement à un premier et un deuxième canal secondaire (9a,9b), le premier canal secondaire (9a) comprenant une portion en forme d'arc de cercle de diamètre D1 par rapport à l'axe central Z s'étendant dans un plan perpendiculaire à l'axe central Z, et le

deuxième canal secondaire (9b) comprenant une portion en forme d'arc de cercle de diamètre D2 par rapport à l'axe central Z s'étendant dans un plan perpendiculaire à l'axe central Z, avec D1 inférieur à D2.

- 5 [Revendication 9] Puce fluidique (1) selon la revendication précédente dans laquelle le premier et le deuxième canal secondaire (9a,9b) comprennent chacun deux portions en arc de cercle à deux ordonnées différentes de l'axe central Z définissant ainsi chacun quatre conduits secondaires (11a,11b) de même longueur.
- [Revendication 10] Puce fluidique (1) selon l'une des revendications précédentes dans laquelle le canal principal (8) comprend quatre conduits principaux (10) de même longueur.
- 10 [Revendication 11] Puce fluidique (1) selon l'une des revendications précédentes dans laquelle chaque canal principal (8) et secondaire (9) comprend une portion en forme de cercle débouchant sur la sortie (7), chaque portion en forme de cercle étant concentrique.
- [Revendication 12] Système d'encapsulation de cellules, le système comportant au moins :
- 15 - deux conteneurs (110,120), l'un des conteneurs comportant une solution de cellules et l'autre des conteneurs comportant une solution apte à gélifier,
- un dispositif d'encapsulation (130) comprenant une puce fluidique (1) selon l'une des revendications 1 à 11, les entrées principale (5) et secondaire (6) étant chacune reliée à l'un des conteneurs (110,120) via un distributeur (140) et apte à former un jet concentrique à partir des solutions fournies par les distributeurs (140), le
- 20 dispositif d'encapsulation (130) étant agencé de sorte que le jet se fractionne, en sortie du dispositif d'encapsulation (130), en gouttes dont la couche extérieure est la solution apte à gélifier et le cœur la solution de cellules, et
- un bain de gélification agencé en aval du dispositif d'encapsulation (130) pour collecter les gouttes formées par le dispositif d'encapsulation (130) et agencé pour
- 25 provoquer une gélification de la couche extérieure de chaque goutte lors de son immersion dans le bain.