

Système de culture cellulaire en bioréacteur

L'invention concerne les systèmes de culture de cellules en bioréacteur. Le système selon l'invention peut être utilisé pour la production de cellules d'intérêt, d'ensembles cellulaires (organoïdes, tissus) et/ou la production de molécules d'intérêt, ou d'assemblages moléculaires complexes (composants de matrices extracellulaires, organites cellulaires, anticorps, vaccins, exosomes, viroïdes), ou autres matériels d'intérêt provenant des cellules ou produits par les cellules cultivées dans de tels systèmes.

Les systèmes de culture de cellules en bioréacteur revêtent un intérêt grandissant pour l'industrie pharmaceutique entre autres. En effet, les cellules eucaryotes sont de plus en plus utilisées en tant qu'outil thérapeutique, notamment en thérapie cellulaire et tissulaire, et en tant qu'outil de bioproduction de molécules d'intérêt, depuis des fractions protéiques (insuline, anticorps, etc.), en passant par les complexes de protéines, lipides et sucres issus des cellules ou les organites cellulaires, les vésicules extracellulaires et les exosomes, jusqu'aux dérivés viraux (pour la production de vaccins notamment). Les systèmes de culture de cellules en bioréacteur permettent de cultiver en masse ces cellules et de répondre ainsi aux besoins en cellules et/ou molécules d'intérêt à l'échelle industrielle.

Actuellement, il existe trois grandes classes de méthodes de culture de cellules en bioréacteur :

- Les méthodes permettant la culture par lots (« batch »), dans lesquelles les cellules sont ensemencées dans un volume fixe de milieu de culture. Après un temps de culture adéquat pour permettre une croissance suffisante, les molécules et/ou cellules sont récoltées. Le problème majeur de ces méthodes est que les nutriments présents dans le milieu s'épuisent au cours du temps, et que les métabolites toxiques s'accumulent ;
- Les méthodes permettant la culture en lots nourris (« fed batch »), dans lesquelles du milieu de culture est rajouté au fur et à mesure pour nourrir les cellules tout en gardant une densité cellulaire acceptable. Le problème principal de ces systèmes est que les déchets du métabolisme ne sont pas retirés et s'accumulent dans le bioréacteur, ce qui finit par affecter le rendement ;
- Les méthodes permettant la culture en perfusion, dans lesquelles le milieu de culture est changé en continu, afin de nourrir les cellules et d'éliminer les déchets. De tels systèmes permettent un plus haut rendement mais le changement rapide et continu du milieu de culture nécessite de retenir les cellules sans les endommager (stress mécanique généré par le flux).

Dans l'état de l'art, ces méthodes de bioproduction de masse ne sont pas ou peu applicables aux cellules fragiles ou aux assemblages cellulaires fragiles. En effet, en suspension, en agrégat ou sur des micro-carriers, les cellules et les assemblages cellulaires sont directement exposés dans le milieu de culture aux contraintes mécaniques (choc, stress de cisaillement, pression, etc.).

- 5 Lorsque les volumes deviennent importants, les forces mécaniques utilisées pour brasser ou faire circuler le milieu peuvent détruire les cellules ou les assemblages cellulaires notamment par le stress de cisaillement appliqué par les flux de liquide ou l'impact avec les éléments mobiles qui brassent le milieu.

Résumé de l'invention

- 10 En travaillant sur ces problématiques de culture cellulaire en bioréacteur, les inventeurs ont découvert qu'il est possible de ménager un espace de culture au sein de microcompartiments délimités par une couche externe en hydrogel pour cultiver un grand nombre de cellules au sein d'un bioréacteur. La niche cellulaire d'intérêt est ainsi entourée d'une coque d'hydrogel laissant
15 avantageusement infiltrer les nutriments et exfiltrer les protéines et métabolites mais conservant les éléments dont la taille dépasse 150KDa (matrice extracellulaire, exosomes, particules virales, cellules). En outre, les cellules étant protégées des contraintes pouvant exister au sein du réacteur par la coque d'hydrogel, le flux au travers du bioréacteur peut être aussi fort que la coque d'hydrogel peut le soutenir. En outre, la coque d'hydrogel des microcompartiments cellulaires, contrairement aux systèmes de culture existants, préserve les cellules des contraintes
20 mécaniques liées aux collisions et prévient les fusions des éléments multicellulaires (agrégats, micro-carriers) qui existent lors de la culture en suspension liquide, et qui causent des problèmes de reproductibilité en faisant varier les conditions locales ressenties par les cellules (distance de diffusion au milieu, contraintes mécaniques). Les microcompartiments sont en suspension dans le bioréacteur, ce qui permet un accès au milieu de culture et une diffusion
25 dans les microcompartiments homogènes, ainsi qu'une bonne convection. De plus, la niche cellulaire étant protégée par la coque d'hydrogel, il est possible de cultiver les types cellulaires les plus fragiles dans les conditions de rendement optimal avec une mort cellulaire faible et un phénotype bien contrôlé. Contrairement au simple sphéroïde enchâssé dans un gel, la cavité dans la capsule laisse la place aux cellules de se multiplier et/ou de s'auto-organiser sur de la
30 matrice extra-cellulaire. Avantageusement, chaque microcompartiment comprend une unique niche cellulaire. Autrement dit, une coque d'hydrogel donnée entoure une seule niche cellulaire. La couche externe des microcompartiments étant en hydrogel, elle peut facilement être dissoute pour récupérer les cellules à l'issue de la production. Ces microcompartiments étant en 3D, ils permettent avantageusement une amplification cellulaire dans le microcompartiment d'un
35 facteur pouvant aller jusqu'à 100.000.

L'invention a donc pour objet un système de culture cellulaire en bioréacteur comprenant une enceinte close contenant une pluralité de microcompartiments cellulaires, dans lequel les microcompartiments comprennent chacun une couche externe en hydrogel ménageant une cavité contenant un ensemble de cellules autoorganisées et de la matrice extracellulaire ou un substitut de matrice extra-cellulaire.

Selon l'invention, une couche externe en hydrogel entoure un ensemble de cellules. La couche en hydrogel forme une capsule creuse, ménageant une cavité contenant l'ensemble de cellules.

Avantageusement, la capsule d'hydrogel contient un unique ensemble de cellules.

Selon l'invention, la pluralité de microcompartiments cellulaires est en suspension dans l'enceinte du bioréacteur. Plus particulièrement, les microcompartiments flottent dans le milieu de culture contenu dans l'enceinte du bioréacteur.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel système de culture cellulaire en bioréacteur, comprenant une enceinte close, pour la production et/ou amplification de cellules d'intérêt. L'amplification est avantageusement d'un facteur 2 à 100.000 entre chaque passage. Ce facteur d'amplification correspond au nombre de cellules vivantes récolté à l'issue de l'amplification, divisé par le nombre de cellules vivantesensemencé.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel système de culture cellulaire en bioréacteur pour la production de molécules d'intérêt et/ou d'assemblages moléculaires complexes, tels que des composants de matrices extracellulaires, organites cellulaires, anticorps, vaccins, exosomes, viroïdes, etc., lesdites molécules et/ou assemblages étant excrétés par les cellules des microcompartiments hors desdits microcompartiments jusque dans le milieu de culture, ou inversement accumulés à l'intérieur du microcompartiment pour une récolte ultérieure.

L'invention a aussi pour objet un procédé de production d'organoïdes ou de cellules d'intérêt comprenant les étapes selon lesquelles :

- on introduit une pluralité de microcompartiments cellulaires dans un bioréacteur, comprenant une enceinte close, lesdits microcompartiments comprenant chacun une couche externe en hydrogel encapsulant des cellules et de la matrice extracellulaire ou un substitut de matrice extra-cellulaire ;
- on cultive les microcompartiments dans des conditions permettant la multiplication des cellules à l'intérieur des microcompartiments, et/ou l'auto organisation des cellules en organoïdes ;

- on récupère les microcompartiments cellulaires ;
- et optionnellement, on hydrolyse la couche d'hydrogel pour récupérer les organoïdes ou les cellules d'intérêt.

L'invention a aussi pour objet un procédé de production de cellules différenciées à partir de
5 cellules multipotentes, pluripotentes ou totipotentes comprenant les étapes selon lesquelles :

- on introduit une pluralité de microcompartiments cellulaires dans un bioréacteur, lesdits microcompartiments comprenant chacun une couche externe en hydrogel encapsulant des cellules multipotentes, pluripotentes ou totipotentes et de la matrice extracellulaire ou un substitut de matrice extra-cellulaire ;
- 10 - on cultive les microcompartiments dans des conditions permettant la multiplication des cellules à l'intérieur des microcompartiments, et/ou la différenciation dans un ou des types cellulaires d'intérêt ;
- on récupère les microcompartiments cellulaires ;
- et optionnellement, on hydrolyse la couche d'hydrogel pour récupérer le ou les types
15 cellulaires d'intérêt.

Description détaillée

Les inventeurs ont découvert qu'il est possible et particulièrement avantageux de cultiver des cellules au sein d'un réacteur comprenant une enceinte close, en maintenant les cellules à l'intérieur d'une capsule externe en hydrogel réticulé. Plus précisément, les inventeurs ont mis
20 au point des microcompartiments cellulaires comprenant chacun une couche externe en hydrogel encapsulant un ensemble de cellules autoorganisées et de la matrice extracellulaire ou un substitut de matrice extra-cellulaire. Selon l'invention, les microcompartiments cellulaires sont en suspension dans le bioréacteur.

Selon l'invention, on entend par cellules autoorganisées un ensemble de cellules positionnées
25 de manière particulière les unes par rapport aux autres pour créer des interactions et communications cellulaires et former une microstructure tridimensionnelle d'intérêt. Chaque microcompartiment comprend ainsi une couche externe d'hydrogel, ou capsule d'hydrogel, renfermant un ensemble de cellules autoorganisées. Les cellules peuvent se multiplier, s'organiser et/ou se différencier au sein de la capsule d'hydrogel.

30 Dans un mode de réalisation, la capsule d'hydrogel renferme un unique ensemble de cellules autoorganisées. Par unique, on entend que la capsule ne contient qu'un groupe de cellules, qui

peut être plus ou moins cohésif. Notamment, un ensemble de cellules unique s'entend d'une structure cellulaire tridimensionnelle dans laquelle chaque cellule dudit ensemble est en contact avec physique avec au moins une autre cellule dudit ensemble.

Selon l'invention, il est possible d'encapsuler toutes sortes de cellules eucaryotes, et plus particulièrement des cellules de mammifères. Notamment, les cellules sont choisies parmi les
5 cellules différenciées, les progéniteurs, les cellules souches, les cellules multipotentes, les cellules pluripotentes, les cellules totipotentes, les cellules génétiquement modifiées, et leurs mélanges etc. Dans un mode de réalisation, les cellules encapsulées sont des cellules souches pluripotentes, choisies notamment parmi les cellules souches embryonnaires et/ou les cellules
10 induites à la pluripotence (IPS). Dans un mode de réalisation, les cellules encapsulées sont des cellules souches embryonnaires, notamment des cellules souches embryonnaires pluripotentes. Dans un mode de réalisation, les cellules encapsulées sont des cellules souches embryonnaires, à l'exclusion des cellules souches embryonnaires humaines ayant nécessité la destruction d'un embryon humain. Dans un autre mode de réalisation, les cellules encapsulées sont des cellules
15 souches embryonnaires humaines issues d'embryons humains surnuméraires conçus dans le cadre d'une procréation médicalement assistée ne faisant plus l'objet d'un projet parental, dans le respect des lois bioéthiques en vigueur au moment et dans le pays de prélèvement desdites cellules souches embryonnaires. Dans un autre mode de réalisation, les cellules encapsulées sont des cellules induites à la pluripotence (IPS), et notamment des cellules humaines induites
20 à la pluripotence (hIPS). Dans un autre mode de réalisation, les cellules encapsulées sont des cellules souches embryonnaires et des cellules induites à la pluripotence. Dans un mode de réalisation, les cellules encapsulées comprennent un mélange de cellules souches embryonnaires et de cellules induites à la pluripotence.

Dans le contexte de l'invention, « la couche externe d'hydrogel », ou « coque d'hydrogel »,
25 désigne une structure tridimensionnelle formée à partir d'une matrice de chaînes de polymères gonflée par un liquide, et préférentiellement de l'eau. Une telle couche externe d'hydrogel est obtenue par réticulation d'une solution d'hydrogel. Avantagusement, le ou les polymères de la solution d'hydrogel sont des polymères réticulables lorsque soumis à un stimulus, tel qu'une température, un pH, des ions, etc. Avantagusement, la solution d'hydrogel utilisée est
30 biocompatible, en ce sens qu'elle n'est pas toxique pour les cellules. La couche d'hydrogel permet avantagusement la diffusion de gaz dissous (et notamment d'oxygène et/ou de dioxyde de carbone), de nutriments, et de déchets métaboliques pour permettre la survie, la prolifération, la différenciation, la maturation des cellules et/ou la production de molécules ou d'assemblages moléculaires d'intérêt et/ou la récapitulation de comportements cellulaires d'intérêt. Les
35 polymères de la solution d'hydrogel peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Par exemple, la solution d'hydrogel contient un ou plusieurs polymères parmi les polymères à base de sulfonate, tel que le polystyrène sulfonate de sodium, les polymères à base d'acrylate, tel

que le polyacrylate de sodium, le polyéthylène glycol diacrylate, le composé gélatine méthacrylate, les polysaccharides, et notamment les polysaccharides d'origine bactérienne, tels que la gomme gellane, ou d'origine végétale, tels que la pectine ou l'alginate. Dans un mode de réalisation, la solution d'hydrogel comprend au moins de l'alginate. Préférentiellement, la solution d'hydrogel ne comprend que 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-guluronate (G), des sels et dérivés de ceux-ci. Avantageusement, l'alginate est un alginate de sodium, composé à plus de 80% de G et moins de 20% de M, avec une masse moléculaire moyenne de 100 à 400 kDa (par exemple : PRONOVA® SLG100) et une concentration totale comprise entre 0.5% et 5% en masse volumique (poids/volume).

Selon l'invention, le microcompartiment cellulaire est clos. C'est la couche externe en hydrogel qui confère sa taille et sa forme au microcompartiment cellulaire. Le microcompartiment peut avoir n'importe quelle forme compatible avec l'encapsulation de cellules.

Préférentiellement, la couche de matrice extracellulaire forme un gel. La couche de matrice extracellulaire comprend un mélange de protéines et de composés extracellulaires nécessaires à la culture cellulaire, par exemple de cellules pluripotentes. Préférentiellement, la matrice extracellulaire comprend des protéines structurales, telles que de la laminine 521, 511 ou 421, 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. Dans un mode de réalisation, la couche de matrice extracellulaire consiste en, ou contient du Matrigel® et/ou de la Geltrex®.

Selon l'invention, le microcompartiment peut contenir, à la place de la matrice extracellulaire, un substitut de matrice extra-cellulaire. Un substitut de matrice extracellulaire s'entend d'un composé capable de favoriser l'attachement et/ou la survie des cellules en interagissant avec les protéines de membranes et/ou les voies de transduction du signal extracellulaire. Par exemple, un tel substitut comprend les polymères biologiques et leurs fragments notamment les protéines (laminines, vitronectines, fibronectines et collagènes), les glycosaminoglycanes non sulfatés (acide hyaluronique) ou sulfatés (chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, kératane sulfate, héparane sulfate), et polymères synthétiques contenant des motifs issus des polymères biologiques ou reproduisant leurs propriétés (motif RGD) et les petites molécules mimant l'attachement à un substrat (inhibiteurs de Rho-A kinase tel que Y-27632 ou thiazovivin).

Toute méthode de production de microcompartiments cellulaires contenant à l'intérieur d'une capsule d'hydrogel de la matrice extracellulaire et des cellules peut être utilisée pour la mise en œuvre du procédé de préparation selon l'invention. Notamment, il est possible de préparer des microcompartiments en adaptant la méthode et le dispositif microfluidique décrits dans Alessandri *et al.*, 2016 (« A 3D printed microfluidic device for production of functionalized

hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC) », Lab on a Chip, 2016, vol. 16, no. 9, p. 1593-1604).

- Avantageusement, les dimensions du microcompartiment cellulaire sont contrôlées. Dans un mode de réalisation, le microcompartiment cellulaire selon l'invention a une forme sphérique.
- 5 Préférentiellement, le diamètre d'un tel microcompartiment est compris entre 10 μm et 1 mm, plus préférentiellement entre 50 μm et 500 μm , encore plus préférentiellement inférieur à 500 μm , de manière préférée inférieur à 400 μm . Dans un autre mode de réalisation, le microcompartiment cellulaire selon l'invention a une forme allongée. Notamment, le microcompartiment peut avoir une forme ovoïde ou tubulaire. Avantageusement, la plus petite
- 10 dimension d'un tel microcompartiment ovoïde ou tubulaire est comprise entre 10 μm et 1 mm, plus préférentiellement entre 50 μm et 500 μm , encore plus préférentiellement inférieure à 500 μm , de manière préférée inférieure à 400 μm . Par « plus petite dimension », on entend le double de la distance minimale entre un point situé sur la surface externe de la couche en hydrogel et le centre du microcompartiment.
- 15 Dans un mode de réalisation particulier, l'épaisseur de la couche externe en hydrogel représente 5 à 40% du rayon du microcompartiment. L'épaisseur de la couche de matrice extracellulaire représente 5 à 80 % du rayon du microcompartiment et est avantageusement accrochée sur la face interne de la coque en hydrogel. Cette couche de matrice peut combler l'espace entre les cellules et la coque en hydrogel. Dans le contexte de l'invention, « l'épaisseur » d'une couche
- 20 est la dimension de ladite couche s'étendant radialement par rapport au centre du microcompartiment.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le bioréacteur comprend des microcompartiments dans lesquels les cellules sont autoorganisées en cyste.

- Dans le contexte de l'invention, on désigne par cyste au moins une couche de cellules pluripotentes ou totipotentes organisées autour d'une lumière centrale. Selon l'invention, un tel microcompartiment comprend donc successivement, autour d'une lumière centrale, ladite
- 25 couche de cellules pluripotentes, une couche de matrice extracellulaire, ou d'un substitut de matrice extra-cellulaire, et la couche externe en hydrogel. La lumière est générée, au moment de la formation du cyste, par les cellules qui se multiplient et se développent en couches sur la
- 30 couche de matrice extracellulaire. Avantageusement, la lumière contient un liquide et plus particulièrement du milieu de culture.

- Selon l'invention, un cyste contient avantageusement une ou plusieurs couches de cellules souches pluripotentes d'un mammifère, humain ou non humain. Une cellule souche pluripotente, ou cellule pluripotente, s'entend d'une cellule qui a la capacité de former tous les
- 35 tissus présents dans l'organisme d'origine entier, sans pour autant pouvoir former un organisme

entier en tant que tel. Notamment, un cyste peut contenir des cellules souches embryonnaires (ESC), des cellules souches induites à la pluripotence (IPS), ou des cellules MUSE (« Multilineage-differentiating Stress Enduring ») que l'on trouve dans la peau et la moelle osseuse des mammifères adultes.

- 5 Avantageusement, l'épaisseur de la couche externe en hydrogel représente 5 à 40% du rayon du microcompartiment, l'épaisseur de la couche de matrice extracellulaire représente 5 à 80 % du rayon du microcompartiment et l'épaisseur de la couche de cellule pluripotentes représente environ 10% du rayon du microcompartiment. La couche de cellules pluripotente est en contact au moins en un point avec la couche de matrice extra cellulaire, un espace rempli par du milieu de culture peut être présent entre la couche de matrice et le cyste. La lumière représente alors de 5 à 30% du rayon du microcompartiment. Dans un exemple particulier, le microcompartiment cellulaire a une forme sphérique de rayon égal à 100µm. La couche en hydrogel a une épaisseur de 5µm à 40µm. La couche de matrice extracellulaire a une épaisseur de 5µm à environ 80µm. La couche de cellules pluripotentes a une épaisseur de 10 à 30 µm, la lumière ayant un rayon de 5 à 30 µm, environ.

Selon un exemple de réalisation de l'invention, il est possible de cultiver en bioréacteur par exemple de 150mL de tels microcompartiments, dans lesquels les cellules forment des cystes, selon les étapes ci-dessous :

- (a) incuber de 600.000 à 2 millions de cellules souches pluripotentes de mammifère dans un milieu de culture contenant un inhibiteur des voies RHO/ROCK ;
- (b) mélanger ces cellules souches pluripotentes issues de l'étape (a) avec une matrice extracellulaire ;
- (c) encapsuler le mélange de l'étape (b) dans une couche d'hydrogel ;
- (d) cultiver les capsules obtenues à l'étape (c) dans un milieu de culture contenant un inhibiteur des voies RHO/ROCK ;
- (e) rincer les capsules issues de l'étape (d), de manière à éliminer l'inhibiteur des voies RHO/ROCK ;
- (f) cultiver dans un mode de production de type fed-batch les capsules issues de l'étape (e) pendant 3 à 20 jours, préférentiellement 5 à 10 jours, en diluant le volume de milieu d'un facteur deux chaque jour avec un milieu de culture de cellules pluripotentes tel que le MTESR1 (Stemcell technologies) dépourvu d'inhibiteur des voies RHO/ROCK, et optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

L'homme du métier saura adapter le nombre de cellules et le volume du bioréacteur en fonction des besoins.

L'étape (a) d'incubation et l'étape (d) de culture dans un milieu contenant un ou plusieurs inhibiteurs des voies RHO/ROCK (« Rho-associated protein kinase »), tels que du thiazovivin ($C_{10}H_{15}N_3OS$) et/ou Y-27632 ($C_{14}H_{21}N_3O$) permettent de promouvoir la survie des cellules souches pluripotentes, et l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire au moment de la formation de la couche externe d'hydrogel autour de ladite matrice extracellulaire. Il est toutefois souhaitable que ces étapes soient limitées dans le temps, afin que les inhibiteurs des voies RHO/ROCK n'empêchent pas la formation des cystes.

10 Ainsi, préférentiellement, l'incubation de l'étape (a) est conduite pendant un temps compris entre quelques minutes et quelques heures, préférentiellement entre 2 minutes et 2 heures, plus préférentiellement entre 10 minutes et 1 heure.

De même, préférentiellement, l'étape (d) de culture est conduite pendant un temps compris entre 2 et 48 heures, préférentiellement pendant un temps compris entre 6 et 24 heures, plus
15 préférentiellement pendant un temps compris entre 12 et 18 heures.

L'étape (e) est nécessaire pour garantir l'élimination de toute trace d'inhibiteurs des voies RHO/ROCK. L'étape (e) est par exemple réalisée par rinçage, et préférentiellement par plusieurs rinçages, dans des milieux de cultures successifs exempts d'inhibiteurs des voies RHO/ROCK.

20 Avantageusement, l'étape (f) est conduite pendant un temps suffisant pour obtenir un microcompartiment cellulaire dans lequel les couches de matrice extracellulaire et de cellules pluripotentes présentent une épaisseur cumulée égale à 50 à 100% de l'épaisseur de la couche externe en hydrogel. Tout milieu de culture adapté à la culture de cellules souches pluripotentes peut être utilisé.

25 Dans un mode de mise en œuvre, le procédé selon l'invention comprend une étape intermédiaire (a') consistant à dissocier les cellules souches pluripotentes issues de l'étape (a) avant l'étape (b), préférentiellement au moyen d'un réactif exempt d'enzyme. Avantageusement, ledit réactif est inhibé ou rincé avant l'étape d'encapsulation, notamment par rinçage successif dans un milieu spécifique pour cellules pluripotentes. Par exemple, le réactif utilisé est le ReLeSR®.
30 Bien entendu, il est également possible d'utiliser de la trypsine ou un réactif contenant une enzyme, mais le taux de survie des cellules pluripotentes à l'issue de cette étape peut alors être moindre comparativement à l'utilisation d'un réactif exempt d'enzyme.

Alternativement, de tels microcompartiments peuvent être obtenus selon les étapes ci-dessous :

(A) mélanger des cellules différenciées de mammifères avec une matrice extracellulaire et des agents de reprogrammation cellulaire ;

(B) encapsuler le mélange de l'étape (A) dans une couche d'hydrogel ;

(C) cultiver les capsules issues de l'étape (B) pendant au moins 3 jours, et optionnellement
5 récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

Par exemple, les cellules différenciées utilisées sont des fibroblastes, des cellules mononucléées sanguines périphériques, des cellules épithéliales et plus généralement des cellules issues de biopsie liquides ou solides de tissus humain.

L'homme du métier sait procéder à la reprogrammation d'une cellule différenciée en une cellule
10 souche en réactivant l'expression des gènes associés au stade embryonnaire au moyen de facteurs spécifiques. A titre d'exemples, on peut citer les méthodes décrites dans Takahashi et al., 2006 (« Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors » Cell, 2006 Vol 126, pages 663-676) et dans la demande internationale WO2010/105311 ayant pour titre « Production of reprogrammed pluripotent
15 cells ».

Les agents de reprogrammation sont avantageusement co-encapsulés avec les cellules différenciées, de manière à concentrer le produit et à favoriser le contact avec l'ensemble des cellules.

Les agents de reprogrammation permettent d'imposer aux cellules une succession de
20 changements phénotypiques jusqu'au stade pluripotent. Avantageusement, l'étape (A) de reprogrammation est réalisée en utilisant des milieux de cultures spécifiques, favorisant ces changements phénotypiques. Par exemple, les cellules sont mis en culture dans un premier milieu comprenant 10% de sérum humain, ou bovin, dans un milieu minimum essentiel de Eagle (DMEM) supplémenté avec un inhibiteur des récepteurs sérine/thréonine protéine kinase
25 (tel que le produit SB-431542 ($C_{22}H_{16}N_4O_3$)), un ou plusieurs inhibiteurs des voies RHO/ROCK (« Rho-associated protein kinase »), tels que du thiazovivin et/ou Y-27632, des facteurs de croissance des fibroblastes, tel que du FGF-2, de l'acide ascorbique et des antibiotiques, tels que le Trichostatin A ($C_{17}H_{22}N_2O_3$). Puis le milieu de culture est remplacé par du milieu favorisant la multiplication des cellules pluripotentes, tel que le milieu mTeSR®1.

30 De tels cystes peuvent ensuite être forcés dans une voie de différenciation d'intérêt, de manière à obtenir des microcompartiments contenant un ou plusieurs types cellulaires d'intérêt, notamment pour la production de molécules d'intérêt, ou la production d'organoïdes d'intérêt.

Dans un mode de réalisation, le bioréacteur comprend des microcompartiments comprenant des cellules autoorganisées en organoïdes.

5 Dans le contexte de l'invention, on désigne par organoïde une structure multicellulaire organisée en trois dimensions de manière à reproduire la microstructure d'au moins une partie d'un organe. Selon l'invention, un tel microcompartiment comprend donc une structure multicellulaire en 3 dimensions, entourée de matrice extracellulaire, le tout étant encapsulé dans la couche externe en hydrogel.

10 Selon l'invention, les organoïdes peuvent être obtenus en encapsulant des cellules pluripotentes ou progéniteurs qui sont ensuite différenciées à l'intérieur de la capsule d'hydrogel, ou en encapsulant directement des cellules différenciées ou des cellules matures.

Dans un mode de réalisation, les microcompartiments cellulaires introduits dans le bioréacteur contiennent des cellules pluripotentes. Une étape de différenciation cellulaire en au moins un type cellulaire d'intérêt est alors réalisée à l'intérieur du bioréacteur, et optionnellement une étape de multiplication desdites cellules différenciées dans les microcompartiments.

15 Dans un mode de réalisation, les microcompartiments cellulaires introduits dans le bioréacteur contiennent des cellules déjà différenciées ou des progéniteurs. Une étape de multiplication et/ou de maturation desdites cellules différenciées dans les microcompartiments est alors réalisée à l'intérieur du bioréacteur.

20 Avantageusement, les microcompartiments introduits dans le bioréacteur ont une densité cellulaire initiale inférieure à 10% d'occupation du volume interne des microcompartiments, préférentiellement inférieure à 1%, encore plus préférentiellement inférieure à 0.1%.

Avantageusement, les microcompartiments récupérés à l'issue de l'étape de culture dans le bioréacteur ont une densité cellulaire supérieure à 10% d'occupation du volume interne des microcompartiments.

25 Selon l'invention, les cellules contenues dans les capsules d'hydrogel sont soumises au flux de milieu contenu dans le bioréacteur et qui passe à travers la couche d'hydrogel.

Avantageusement, le ratio volume convectif à l'extérieur des microcompartiments sur volume diffusif à l'intérieur des microcompartiments est compris entre 1 et 10.000, préférentiellement entre 1 et 1000, plus préférentiellement entre 1 et 100.

30 Selon l'invention, le volume convectif désigne le volume de milieu de culture à l'intérieur de l'enceinte du réacteur, entre les microcompartiments. Les microcompartiments étant en

suspension dans le bioréacteur, le volume convectif représente ainsi le milieu circulant entre les microcompartiments. A l'inverse, le volume diffusif désigne le volume de milieu de culture diffusant à l'intérieur des microcompartiments, c'est-à-dire dans le ou les espaces/les vides ménagés autour/entre/par les cellules une fois autoorganisées.

- 5 Ainsi, dans le cas d'un microcompartiment contenant un cyste, le volume diffusif est principalement constitué par la lumière centrale et au début de la croissance dudit cyste, de l'espace entre la paroi de la capsule et le cyste. Dans le cas d'un microcompartiment contenant un organoïde, le volume diffusif est principalement constitué des espaces ménagés au sein de la structure multicellulaire en 3 dimensions.
- 10 Les microcompartiments selon l'invention sont avantageusement caractérisés par la présence au sein de la capsule d'hydrogel d'une ou plusieurs lumières, ou un ou plusieurs espaces, dépourvu(e)s de cellules et permettant justement la multiplication ou l'auto-organisation des cellules à l'intérieur du microcompartiment. L'homme du métier saura récolter les cellules au moment le plus adéquat pour son procédé d'amplification ou de différenciation correspondant
- 15 à un certain niveau de saturation de l'espace optimal dans ce cadre.

Dans un mode de réalisation, les microcompartiments occupent entre 0,01% et 74% du volume de l'enceinte du bioréacteur.

- L'utilisation de microcompartiments cellulaires permet de cultiver les cellules dans n'importe quel type de bioréacteur, muni d'une enceinte close, et notamment dans un bioréacteur en mode
- 20 d'alimentation par « batch », en mode d'alimentation par « fed batch » ou en mode d'alimentation continu (perfusion). L'utilisation de ces microcompartiments est particulièrement avantageuse dans le cas de culture en mode d'alimentation continu. En effet, les cellules étant protégées par la coque d'hydrogel, il est possible de les soumettre à des flux continus, sans risque de les fragiliser.

- 25 Dans un mode de réalisation, le bioréacteur comprend une enceinte pouvant être fermée hermétiquement. Cela permet de contrôler l'atmosphère à l'intérieur du bioréacteur, et par exemple de cultiver les microcompartiments sous atmosphère inerte.

- Le système de culture cellulaire selon l'invention peut comporter une enceinte ayant un volume compris entre 1 mL et 10 000L, préférentiellement entre 5 mL et 10.000 L, entre 10 mL et
- 30 10.000 L, entre 100 mL et 10.000 L, entre 200 mL et 10.000 L, entre 500 mL et 10.000 L. Dans un mode de réalisation, l'enceinte a un volume d'au moins 1 mL. Dans un mode de réalisation, l'enceinte a un volume d'au moins 10 mL. Dans un mode de réalisation, l'enceinte a un volume d'au moins 100 mL. Dans un mode de réalisation, l'enceinte a un volume d'au moins 500 mL. Dans un mode de réalisation, l'enceinte a un volume d'au moins 1 L. Dans un mode de

réalisation, l'enceinte a un volume d'au moins 10 L. Dans un mode de réalisation, l'enceinte a un volume de 100 L, ou plus. Avantageusement, tout bioréacteur comprenant une enceinte close, et apte à produire à l'échelle industrielle des cellules, organoïdes, molécules et/ou assemblages molécules complexes peut être utilisé.

- 5 D'une manière générale, l'utilisation d'une enceinte close permet un contrôle fin de l'environnement de culture, sans risque de perturbation par l'environnement extérieur. Il est par ailleurs aisé d'obtenir des produits stériles. Cela permet également un meilleur rendement volumétrique.

- 10 Dans un mode de réalisation, les microcompartiments comprennent entre 10% et 98% en volume de cellules à la récolte, soit entre 100 et 1.000.000 de cellules suivant le diamètre du compartiment concerné et la taille des cellules produites, ce qui peut être calculé en réalisant le rapport entre le nombre total de cellules produites (tel que mesuré par l'homme de l'art avec une cellule de Malassez ou un compteur de cellules automatisé) et le nombre de capsules obtenu
15 (tel que mesuré par l'homme de l'art en caractérisant le volume de capsules par comptage manuel sous un microscope optique ou par une analyse d'image automatisée). Bien entendu, il est possible de commencer la culture cellulaire avec des microcompartiments comprenant un nombre plus restreint de cellules au départ, et notamment entre 1 et 1.000 cellules, soit 0.01% et 10% en volume occupé par les cellules au sein du microcompartiment suivant le diamètre du compartiment concerné et la taille des cellules produites. Plus généralement, les
20 microcompartiments selon l'invention comprennent entre 0,01% et 98% en volume de cellules.

Les cellules peuvent ensuite se multiplier à l'intérieur du microcompartiment et s'autoorganiser, notamment en organoïdes.

- Dans un mode de réalisation, les cellules d'un microcompartiment sont toutes du même type cellulaire. Selon l'invention, on considère que les cellules d'un même microcompartiment sont
25 toutes du même type cellulaire si au moins 50%, préférentiellement 70%, plus préférentiellement 90%, encore plus préférentiellement 98% ou plus des cellules dudit microcompartiments ont le même phénotype, suivant les connaissances de l'homme de l'art permettant de caractériser ce type cellulaire. Dans un autre mode de réalisation, les cellules d'un microcompartiment sont d'aux moins deux types cellulaires différents. Avantageusement,
30 entre 20 et 100% des cellules d'un compartiment présentent un même phénotype.

Selon l'invention, il est possible de cultiver au sein d'un même bioréacteur des microcompartiments comprenant tous les mêmes types cellulaires, ou inversement présentant des types cellulaires différents. Par exemple, le bioréacteur peut contenir deux types de microcompartiments, contenant chacun un type cellulaire particulier.

Le système de culture selon l'invention est particulièrement avantageux pour la production et/ou l'amplification de cellules d'intérêt. En effet, l'organisation des cellules au sein de la capsule d'hydrogel, avec la matrice extracellulaire, permet leur multiplication d'un facteur 2 à 100.000 entre chaque passage.

- 5 Par passage, on entend la manipulation des cellules pour ajouter de l'espace ou de la surface de culture afin de continuer l'amplification ou de lancer la différenciation ou l'auto-organisation en organoïdes. Cette opération peut nécessiter dans l'exemple des micro-carriers de recharger le bioréacteur avec de nouveaux micro-carriers. Pour la culture standard à deux dimensions de cellules souches pluripotentes, adhérentes, cette opération consiste à détacher les cellules de
10 l'ancien support de culture afin de réensemencer un nouveau support de culture avec plus de surface, pour l'homme de l'art cette opération peut entraîner la perte de 50% des cellules. Pour la culture en microcompartiments selon l'invention, cela correspond à la dissociation des microcompartiments, la dissociation des ensemble cellulaires autoorganisés ou à leur dispersion en ensembles cellulaires suffisamment petits pour être encapsulés à nouveau dans de nouveaux
15 microcompartiments.

L'invention a notamment pour objet l'utilisation d'un tel système de culture cellulaire en bioréacteur pour la production de masse de cellules pluripotentes.

- L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel système de culture cellulaire en bioréacteur pour la production de progéniteurs unipotents ou multipotents à partir de cellules
20 pluripotentes.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel système de culture cellulaire en bioréacteur pour la production de cellules terminalement différenciées (c'est-à-dire correspondant à une ou des fonctions spécifiques) à partir de cellules pluripotentes et/ou de progéniteurs unipotents ou multipotents et/ou de combinatoires de ces progéniteurs.

- 25 L'invention a notamment pour objet un procédé de production d'organoïdes ou de cellules d'intérêt comprenant les étapes selon lesquelles :

- on introduit une pluralité de microcompartiments cellulaires dans un bioréacteur comprenant une enceinte close, lesdits microcompartiments comprenant chacun une couche externe en hydrogel encapsulant des cellules et de la matrice extracellulaire ou un substitut de matrice
30 extra-cellulaire ;

- on cultive les microcompartiments dans des conditions permettant la multiplication des cellules à l'intérieur des microcompartiments, et/ou l'auto-organisation des cellules en organoïdes ;

- on récupère les microcompartiments cellulaires
- et optionnellement, on hydrolyse la couche d'hydrogel pour récupérer les organoïdes ou les cellules d'intérêt.

L'homme du métier est à même d'adapter les conditions de culture au type cellulaire des
5 microcompartiments, afin de favoriser leur multiplication et/ou auto-organisation.

Dans un mode de réalisation, les microcompartiments cellulaires introduits contiennent des
cellules pluripotentes, ledit procédé comprenant, à l'intérieur du bioréacteur, une étape de
différenciation cellulaire en au moins un type cellulaire d'intérêt et une étape de multiplication
desdites cellules différenciées dans les microcompartiments. Par exemple, la production
10 d'organoïdes d'endoderme primitif pour l'étude de la différenciation en tissus endodermiques
humains peut être réalisée selon le protocole suivant :

- A partir de l'étape f) d'obtention de microcompartiments, décrite ci-dessus, à 2-3 jour de culture :
- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu STEMdiff™ Pancreatic stage
15 1 du STEMdiff™ Pancreatic Progenitor Kit commercialisé par STEMCELL technologies
pendant 3 à 6 jours.
- Utilisation de l'endoderme primitif obtenu pour des études développementales.

Dans un autre mode de réalisation, les microcompartiments cellulaires introduits contiennent
des cellules déjà différenciées ou des progéniteurs, ledit procédé comprenant, à l'intérieur du
20 bioréacteur, une étape de multiplication desdites cellules différenciées dans les
microcompartiments.

Lors de l'étape de multiplication et/ ou de maturation, les cellules vont avantageusement
s'autoorganiser en un organoïde spécifique, selon une organisation propre audit type cellulaire.

Dans un mode de réalisation concernant l'amplification, les microcompartiments introduits
25 dans le bioréacteur ont une densité cellulaire inférieure à 10% d'occupation du volume interne
des microcompartiments, préférentiellement 1% encore plus préférentiellement 0.1%. Les
cellules vont ensuite se multiplier à l'intérieur des microcompartiments, lors de l'étape de
culture.

Dans un mode de réalisation concernant la différenciation et/ou la maturation sans
30 amplification, les microcompartiments introduits dans le bioréacteur ont une densité cellulaire
supérieure à 1% d'occupation du volume interne des microcompartiments. Les cellules vont
ensuite se différencier et/ou maturer et/ou s'autoorganiser à l'intérieur des microcompartiments,

lors de l'étape de culture. Par exemple, un premier type de production d'organoïdes neuraux pour la greffe de neurones dans le cadre de la thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson a été réalisée selon le protocole suivant :

- Décongélation de 5 millions de progéniteurs dopaminergiques tels que ceux commercialisés par Cellular Dynamics international (iCell® DopaNeurons),
- Encapsulation de progéniteurs neuraux pré-différenciés selon le protocole décrit dans Alessandri et Al. 2016.
- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans le milieu de culture fourni par Cellular Dynamics.
- Maturation et structuration des organoïdes neuraux dopaminergiques pendant deux semaines au sein du bioréacteur.
- Préparation de la greffe par dissociation de la capsule d'hydrogel à l'aide de deux rinçages de trente secondes dans 1 mL de ReLeSR® (Stemcell technologies) puis resuspension dans une solution de 11% en masse de dextran 70KDa dans le milieu de culture des neurones, distribution dans une canule en verre fabriquée par nos soins.
- Greffe dans un animal modèle de la maladie de Parkinson.

Dans un mode de réalisation combinant amplification et différenciation/maturation, les microcompartiments introduits dans le bioréacteur ont avantageusement une densité cellulaire inférieure à 10% d'occupation du volume interne des microcompartiments, préférentiellement 1% encore plus préférentiellement 0.1%. Les cellules vont ensuite se multiplier à l'intérieur des microcompartiments, lors de l'étape de culture puis lors de l'étape de différenciation. Les cellules vont ensuite s'autoorganiser à l'intérieur des microcompartiments, lors d'une seconde étape de culture qui peut être déclenchée par un changement de la nature du milieu nutritif ou d'un déclencheur physique (température, illumination). Par exemple, un second type de production d'organoïdes neuraux pour la greffe de neurones dans le cadre de la thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson a été réalisé selon le protocole suivant :

- A partir de l'étape f) d'obtention de microcompartiments décrite ci-dessus à 2-3 jour de culture :
- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu d'induction neurale contenant des inhibiteurs des voies de signalisation BMP2 (Dorsomorphin 2 μ M ou LDN 193189 0.5 μ M) et TGFbeta (+SB 431542 10 μ M), 24(S),25-epoxycholesterol 10 μ M sur base neurobasal/DMEM-F12 complémenté N2 et B27 pendant 1 à 2 jours.
- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu de régionalisation neurale contenant des inhibiteurs des voies de signalisation BMP2 (Dorsomorphin 2 μ M ou LDN 193189 0.5 μ M) et TGFbeta (+SB 431542 10 μ M), deux activateurs de la voie SHH (SHH 200 ng/mL ; Purmorphamine 1 μ M) et du FGF8 (100 ng/ml), un inhibiteur de la voie WNT

Chir99021 3 μ M), 24(S),25-epoxycholesterol 10 μ M sur base neurobasal/DMEM-F12 complémenté N2 et B27 pendant 6 jours.

- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un second milieu de régionalisation neurale contenant un inhibiteur de la voie de signalisation BMP2 (Dorsomorphin 2 μ M ou LDN 193189 0.5 μ M), un inhibiteur de la voie WNT Chir99021 3 μ M), 24(S),25-epoxycholesterol 10 μ M sur base neurobasal/DMEM-F12 complémenté N2 et B27 pendant 1 jours.
- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu de maturation et structuration des organoïdes neuraux dopaminergiques pendant deux semaines au sein du bioréacteur contenant AMP cyclique (500 μ M) + acide ascorbique (200 μ M) + GDNF (20ng/mL) + BDNF (20ng/mL) + FGF-20 (5ng/mL) + TGFbeta (1ng/mL) + trichostatine (10nM) + Compound E (1 μ M).
- Préparation de la greffe par dissociation de la capsule d'hydrogel à l'aide de deux rinçages de trente secondes dans 1 mL de ReLeSR® (Stemcell technologies) puis resuspension dans une solution de 11% en masse de dextran 70KDa dans le milieu de culture des neurones, distribution dans une canule en verre fabriquée par nos soins.
- Greffe dans un animal modèle de la maladie de Parkinson.

Dans un autre mode de réalisation combinant amplification et différenciation/maturation, les microcompartiments introduits dans le bioréacteur ont avantageusement une densité cellulaire inférieure à 10% d'occupation du volume interne des microcompartiments, préférentiellement 1% encore plus préférentiellement 0.1%. Les cellules vont ensuite se multiplier à l'intérieur des microcompartiments. Les cellules sont alors récupérées par dissolution de la capsule, puis soumise à une seconde étape d'encapsulation suivie de l'étape de différenciation, les cellules vont ensuite s'autoorganiser à l'intérieur des microcompartiments, lors d'une seconde étape de culture qui peut être déclenchée par un changement de la nature du milieu nutritif ou d'un déclencheur physique (température, illumination). Par exemple, la production d'organoïdes de pancréas humain pour la greffe de tissus pancréatiques humains a été réalisée selon le protocole suivant :

- A partir de l'étape f) d'obtention de microcompartiments décrite ci-dessus à 2-3 jours de culture :
- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu STEMdiff™ Pancreatic stage 1 complémenté par le complément 1A et le complément 1B du STEMdiff™ Pancreatic Progenitor Kit commercialisé par STEMCELL technologies pendant 1 jours.
- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu STEMdiff™ Pancreatic stage 1 complémenté par le complément 1B du STEMdiff™ Pancreatic Progenitor Kit commercialisé par STEMCELL technologies pendant 1 jours.

- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu STEMdiff™ Pancreatic stage 2-4 complémenté par le complément 2A et le complément 2B du STEMdiff™ Pancreatic Progenitor Kit commercialisé par STEMCELL technologies pendant 1 jours.
- 5 - Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu STEMdiff™ Pancreatic stage 2-4 complémenté par le complément 2A et le complément 2B du STEMdiff™ Pancreatic Progenitor Kit commercialisé par STEMCELL technologies pendant 2 jours.
- Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu STEMdiff™ Pancreatic stage 2-4 complémenté par le complément 3 du STEMdiff™ Pancreatic Progenitor Kit commercialisé par STEMCELL technologies pendant 3 jours.
- 10 - Mise en culture en bioréacteur clos de 150mL dans un milieu STEMdiff™ Pancreatic stage 2-4 complémenté par le complément 3 du STEMdiff™ Pancreatic Progenitor Kit commercialisé par STEMCELL technologies pendant 5 jours.
- Préparation de la greffe par dissociation de la capsule d'hydrogel à l'aide de deux rinçages de trente secondes dans 1mL de ReLeSR® (Stemcell technologies) puis resuspension dans
15 une solution de 11% en masse de dextran 70KDa dans le milieu précédent, distribution dans une canule en verre fabriquée par nos soins.
- Greffe dans un animal modèle du diabète de type 1.

Avantageusement, les microcompartiments récupérés à l'issue de l'étape de culture dans le bioréacteur ont une densité cellulaire supérieure à 10% d'occupation du volume interne des
20 microcompartiments, préférentiellement supérieure à 50%, et pouvant aller dans le cas des organoïdes jusqu'à 98% d'occupation.

Le système de culture selon l'invention est également particulièrement intéressant pour la production de molécules d'intérêt et/ou d'assemblages moléculaires complexes, lesdits molécules et/ou d'assemblages moléculaires complexes étant excrétés par les cellules des
25 microcompartiments hors desdits microcompartiments jusque dans le milieu de culture, ou inversement accumulées à l'intérieur du microcompartiment pour une récolte ultérieure. Cette méthode de production permet notamment de limiter les étapes de filtration des éléments cellulaires en les concentrant à l'intérieur des microcompartiments. Cette méthode permet grâce à la séparation dans le bioréacteur du volume convectif et du volume diffusif par la capsule une
30 ségrégation facilitée du milieu contenant les éléments dissous des éléments non solubles ou d'une taille supérieure à la maille de l'hydrogel de la capsule (typiquement 150 à 250 KDa pour l'alginate).

Selon l'invention, les microcompartiments sont alors avantageusement utilisés dans un réacteur en mode d'alimentation continu. Comme exposé ci-dessus, la présence de la coque d'hydrogel
35 protectrice permet de perfuser le milieu de culture avec un débit sans risque d'endommager les

cellules. Il est notamment possible de perfuser l'intérieur du réacteur en milieu de culture avec un débit compris entre 0,001 et 100 volumes de cellules contenues dans le bioréacteur par jour.