

MICROTISSEU HEPATIQUE PARTICULIER COMPRENANT AU MOINS TROIS PHENOTYPES DIFFERENTS DE CELLULES HEPATQUES ET UTILISATIONS

Domaine technique

La présente invention se rapporte au traitement de l'insuffisance hépatique par l'utilisation d'un microtissu hépatique obtenu à partir de microcompartiments cellulaires particulier. L'invention a en particulier pour objet un microtissu hépatique particulier comprenant au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatiques obtenu à partir de cellules souches pluripotentes induites encapsulées dans un unique microcompartiment clos en trois dimensions.

Art antérieur

Le foie est un des organes les plus complexes du corps humain. Partie intégrante du système digestif, le foie est constamment approvisionné en substances nutritives ou toxiques issues de la digestion. Le traitement de ces substances par le foie est essentiel pour l'organisme et à comme objectifs :

- le stockage et la répartition des nutriments issus de la digestion
- la dégradation des substances toxiques
- 15 - la synthèse de la plupart des protéines du sang, et
- la production de bile.

Pour assurer ces fonctions, le foie est composé d'une grande variété de cellules, tels que des hépatocytes, des cellules des voies biliaires (cholangiocytes), des cellules étoilées (cellules de Ito), des cellules de Kupffer, des cellules souches mésenchymateuse et des cellules endothéliales.

Les hépatocytes sont les cellules hépatiques les plus représentées et sont responsables de la majorité des fonctions hépatiques, de la synthèse des acides gras à la production de l'urée en passant par la synthèse de protéines plasmatiques.

Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales polarisées formant les parois des voies biliaires. Ils ont un rôle dans la régulation de la sécrétion de la bile et dans la collecte de celle-ci afin de la transporter des hépatocytes vers l'intestin.

Les autres cellules assurent une bonne vascularisation ainsi que des fonctions de signalisation

et d'interactions avec les autres cellules hépatiques et avec les cellules du système immunitaire.

Lorsque le foie ne peut plus assurer ses fonctions, on parle d'insuffisance hépatique. Les principales causes d'insuffisances hépatiques sont les infections virales, les surdoses
5 médicamenteuses, les désordres immunologiques, les maladies héréditaires ou des troubles de la circulation du sang. Lorsque l'atteinte aux fonctions du foie est irréversible, le traitement recommandé est la transplantation de foie.

Ainsi, la transplantation de foie représente le traitement standard pour les personnes atteintes d'une maladie hépatiques en phase terminale.

10 Il existe aujourd'hui de grandes difficultés à trouver des donneurs d'organes pouvant fournir un foie ayant une qualité suffisante pour la réalisation d'une greffe.

Comme toute transplantation d'organe, la transplantation hépatique peut s'effectuer uniquement si le foie présente une bonne qualité afin d'éviter les risques associés à la greffe tels que des infections, des cancers, une immunosuppression trop longue et une chirurgie
15 lourde.

Aujourd'hui, seulement 2/3 des patients peuvent bénéficier d'une greffe et seulement lorsque leur qualité de vie s'est très largement dégradée. Par ailleurs, le coût à prévoir pour une transplantation hépatique est de l'ordre de 1M€ (soit 1M\$) aux Etats-Unis.

Face à ces problématiques, plusieurs solutions innovantes ont pu voir le jour.

20 La transplantation d'hépatocytes isolés est apparue comme une approche séduisante, cependant les essais cliniques sont restés peu nombreux et peu concluant, limités par les faibles survie, intégration et expansion des hépatocytes isolés suite à la greffe in vivo, facteurs par conséquent limitant des effets thérapeutiques à court et à long terme. En effet, les hépatocytes isolés issus de donneurs présentent une capacité de prolifération in vivo et in
25 vitro très limitée. De plus, les hépatocytes isolés mis en culture ont tendance à entrer dans un processus de différenciation diminuant ainsi les chances d'obtenir un nombre suffisant d'hépatocytes matures.

Bien que cette technique permette de traiter un nombre important de patients, la dose administrée est bien souvent insuffisante et présente un risque lors de l'injection
30 d'échappement des cellules dans la circulation générale.

Cela est principalement dû à la difficulté pour des cellules uniques de s'intégrer au sein du

foie, ainsi qu'une mauvaise qualité induite par la préparation des cellules primaires et leur culture in vitro et au rejet d'une partie des hépatocytes malgré l'immunosuppression.

Par conséquent, le faible nombre de donneurs d'hépatocytes, la stabilité et la fonctionnalité limitée de ces hépatocytes constituent un frein à leur utilisation

- 5 Le développement de protocoles de différenciation guidée de cellules souches pluripotentes, c'est-à-dire de cellules souches embryonnaires et de cellules souches pluripotentes induites, a cependant permis d'obtenir une source quasi inépuisable d'hépatocytes.

Bien que prometteurs, les hépatocytes dérivés de cellules pluripotentes sont très difficilement cultivables à grande échelle et engendrent des coûts de production démesurés. A titre
10 d'exemple, le coût prévu pour la production de greffons hépatiques autologue issu de cellules souches pluripotentes induites est de l'ordre de 9,7 millions de dollars.

A ce jour, les protocoles de différenciations guidés ne permettent pas de produire une diversité de phénotypes de cellules fonctionnelles et notamment suffisamment d'hépatocytes matures, les cellules obtenues conservent des caractéristiques d'hépatocytes du foie fœtal
15 avec notamment une expression persistante d'alpha-foetoprotéine ainsi qu'une faible production d'albumine.

Néanmoins, certains protocoles permettent d'obtenir des cellules hépatiques avec de meilleures caractéristiques fonctionnelles. Ces protocoles restent complexes et nécessitent des étapes de dissociations, de réaggrégation ou de co-cultures avec notamment des cellules
20 souches mésenchymateuses et des cellules endothéliales. Ces étapes supplémentaires ajoutent des risques supplémentaires, augmentant le cout total et diminuant la maitrise du produit fini.

Pour une application en thérapie cellulaire, il est nécessaire de pouvoir adapter les procédés existants pour : i) obtenir une production avec un nombre d'étapes limitées pour être efficace
25 à grande échelle, ii) améliorer l'intégration des cellules greffées. Les techniques développées aujourd'hui ne permettent pas de produire de microtissu hépatique obtenu à partir de cellules souches pluripotentes induites adapté à la culture à grande échelle et présentant des hépatocytes fonctionnels.

Les processus de production actuels de microtissu hépatiques sont encore trop complexes,
30 présentent des de multiples étapes et donc un coût très important, et sont difficiles à mettre à grande échelle.

Il existe donc un besoin important pour une solution permettant une production à grande échelle de microtissu hépatique comprenant plusieurs phénotypes de cellules hépatiques, productible à grande échelle et directement transplantable, pour répondre à une demande indispensable de greffons hépatiques.

- 5 L'objectif de l'invention est par conséquent de répondre à l'ensemble de ces besoins et de pallier les inconvénients et limites de l'art antérieur.

Résumé de l'invention

Pour répondre à cet objectif, l'invention propose un microtissu hépatique particulier, adapté à des utilisations en thérapie cellulaire et notamment dans la lutte contre les insuffisances hépatiques.

10 A cet effet, l'invention a pour objet un microtissu hépatique en trois dimensions comprenant au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatiques, lesdites cellules du microtissu ayant toutes été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes induites encapsulées dans un unique microcompartiment clos en trois dimensions.

15 Avantageusement, le microtissu hépatique possède une diversité cellulaire suffisante pour restaurer et/ou améliorer les fonctions du foie de manière durable.

Préférentiellement, le microtissu hépatique comprend au moins des hépatocytes immatures, des hépatocytes matures et des cholangiocytes.

Selon un objet préféré de l'invention, le microtissu hépatique comprend au moins :

- 20 - des cellules hépatiques, dont au moins 40% des cellules hépatiques sont des cellules exprimant la cytokératine 19 (CK19), et
- des cellules exprimant CD73 et CD90.

Préférentiellement, les cellules exprimant CD73 et CD90 sont des cellules souches mésenchymateuse et les cellules exprimant CK19 sont des cholangiocytes.

25 Avantageusement, la composition phénotypique du microtissu hépatique est proche de celle d'un foie humain en bonne santé.

Préférentiellement, le microtissu hépatique selon l'invention comprend :

- au moins un lumen,
- au moins une cellule du microtissu en contact à la fois avec un lumen et avec le milieu
30 extérieur au microtissu, et

- au moins une cellule entourée uniquement de cellules.

Avantageusement, l'organisation du microtissu hépatique est proche de l'organisation du tissu hépatique en cours de développement, ce qui lui permet notamment de favoriser son intégration dans le foie et la bonne exécution des fonctions métaboliques dans le foie traité.

- 5 Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, le microtissu hépatique se présente sous une forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou ellipsoïdale. Préférentiellement, le microtissu hépatique se présente sous une forme ellipsoïdale.

Avantageusement, la forme ellipsoïdale du microtissu permet de favoriser la survie du
10 microtissu hépatique. Ainsi, une plus grande partie des microtissus hépatiques sont intégrés par le foie traité.

Préférentiellement, le microtissu hépatique selon l'invention comprend au moins un canal biliaire et/ou au moins un granule de glycogène.

Selon un objet préféré de l'invention, le microtissu hépatique comprend :

- 15 - entre 50 et 99 % de cellules hépatiques dont entre 20 et 60% de cellules exprimant la cytokeratine 19, et
- entre 1 et 20 % de cellules exprimant CD73 et CD90.

Selon une variante, le microtissu hépatique est un microtissu hépatique en trois dimensions dont la plus grande dimension est comprise entre 500 et 700µm et/ou exprimant la
20 monooxygénase CYP3A4 avec une activité d'au moins 75000 RLU par million de cellules et/ou produisant au moins 18µg d'urée par million de cellules par 24 heures.

Avantageusement, l'activité de la CYP3A4 associée à la production d'urée permet de garantir un microtissu hépatique comprenant au moins des cellules hépatiques fonctionnelles.

Préférentiellement, les cellules hépatiques sécrètent au moins 75µg d'albumine par million de
25 cellules par 24h.

Avantageusement, le microtissu hépatique présente une activité métabolique similaire à un foie en bonne santé.

L'invention a également pour objet un ensemble de plusieurs microtissus hépatiques en trois dimensions dans un milieu, dont au moins un microtissu hépatique est un microtissu
30 hépatique selon l'invention. Préférentiellement, au moins 50% (en nombre) des microtissus hépatiques de l'ensemble de microtissus hépatiques, sont des microtissus hépatiques selon

l'invention.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un microcompartiment cellulaire clos en trois dimensions comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant au moins un microtissu hépatique selon l'invention.

- 5 Le microcompartiment selon l'invention permet de garantir un microenvironnement adapté à la culture de cellules souches pluripotentes et à leur différenciation en cellules constituant le microtissu selon l'invention. En effet, un tel microcompartiment permet de reproduire les conditions in vivo du microenvironnement cellulaire lors de l'organogénèse hépatique.

10 L'invention a également pour objet un ensemble de microcompartiments cellulaires selon l'invention.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé de préparation d'un microcompartiment ou d'un ensemble de microcompartiments comprenant au moins la mise en œuvre des étapes suivantes, la production d'un microcompartiment comprenant des cellules souches pluripotentes induites, l'induction d'une différenciation cellulaire au sein du
15 microcompartiment de manière à obtenir au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatiques.

Enfin, l'invention vise un microtissu hépatique selon l'invention ou un microcompartiment le contenant, ou un ensemble de microtissus hépatiques selon l'invention ou un ensemble de microcompartiments les contenant, pour son utilisation comme médicament,
20 préférentiellement dans la prévention ou le traitement de l'insuffisance hépatique provoquée par des maladies telles que la fibrose et la cirrhose hépatiques, la stéatose, la stéatose non alcoolique, les hépatites, les maladies métaboliques du foie, les maladies liées à une sécrétion des facteurs VIII, alpha 1 antitrypsine, IX et/ou VWF, la maladie de Wilson et l'hémochromatose héréditaire.

25 D'autres caractéristiques et avantages ressortiront de la description détaillée de l'invention et des exemples qui vont suivre.

Brève description des figures

La Figure 1a est une représentation comparative de l'expression des gènes d'intérêts (EOMES, CXCR4, HHEX, PROX1, AFP, ASGR1) au cours de la différenciation en fonction du protocole de
30 différenciation.

La Figure 1b est une représentation comparative de l'expression des gènes d'intérêts (SOX17, FOXA2, TBX, HNF4A, ALB, KT18) au cours de la différenciation en fonction du protocole de différenciation.

La Figure 1c est une représentation comparative de l'expression des gènes d'intérêts (GATA4,
5 HNF1B, SOX9, KT19, TAT) au cours de la différenciation en fonction du protocole de différenciation.

La Figure 2 est une représentation comparative de l'expression des gènes d'intérêts (EOMES, CXCR4, FOXA2, SOX17) en fonction des conditions de culture.

La Figure 3 est une représentation comparative de l'expression de protéines d'intérêts (SOX17,
10 FOXA2) en fonction des conditions de culture, 5 jours après le début de la différenciation.

La Figure 4a est une représentation comparative de l'expression des gènes d'intérêts (PROX1, TBX, AFP, KT18, KT19, HNF4A) en fonction des conditions de culture.

La Figure 4b est une représentation comparative de l'expression des gènes d'intérêts (HNF1B, SOX9, ASGR1, ALB, TAT)) en fonction des conditions de culture.

15 La Figure 5 est une représentation comparative du facteur d'expansion pendant 30 jours en fonction des conditions de culture.

La Figure 6 est une représentation graphique de la sécrétion d'albumine au cours de la différenciation en fonction des conditions de culture.

La Figure 7 est une représentation graphique de la production d'urée au cours de la
20 différenciation en fonction des conditions de culture.

La Figure 8 est une représentation graphique de l'activité de la CYP3A4 en fonction des conditions de culture.

La Figure 9 est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale d'un microcompartiment présentant des hépatocytes.

25 La Figure 10a est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale d'un microcompartiment de J-0 à J-9 après le début de la différenciation.

La Figure 10b est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale d'un microcompartiment de J-12 à J-30 après le début de la différenciation.

La Figure 10c est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale d'un
30 microcompartiment de J-15 après le début de la différenciation.

La Figure 10d est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale d'un

microcompartiment de J-20 après le début de la différenciation.

La Figure 10e est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale d'un microcompartiment de J-30 après le début de la différenciation.

La Figure 11 est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale d'un
5 microcompartiment identifiant certains phénotypes de cellules hépatiques.

La Figure 12a est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale :

- de greffons unicellulaires au jour 2 (receveurs 1 et 2, ligne du haut) après la transplantation chez des souris Balb/c,

- de greffons de micro-tissus au jour 2 (receveurs 4 et 5, ligne du bas) après la transplantation
10 chez des souris Balb/c.

La Figure 12b est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale :

- de greffons unicellulaires au jour 6 (receveur3, ligne du haut) après la transplantation chez des souris Balb/c,

- de greffons de micro-tissus au jour 6 (receveur 6, ligne du bas) après la transplantation chez
15 des souris Balb/c.

La Figure 12c est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale du tissu au site d'injection avec le véhicule seul (milieu basal contenant 50% de matrigel) sans greffon chez les souris Balb/c.

La Figure 12d est un ensemble d'images obtenu par microscopie confocale de microtissus
20 selon l'invention avant la transplantation.

La Figure 13a est une représentation graphique de la sécrétion d'A1AT (alpha-1 antitrypsine) avant transplantation de cellules uniques différenciées en 2D (2D) et de microtissus selon l'invention (Invention).

La Figure 13b est une représentation graphique de la détection d'A1T (alpha-1 antitrypsine)
25 dans le sérum de souris Balb/c avant (jour 0), au jour 2 et au jour 6 après la transplantation avec des cellules uniques différenciées en 2D (SC), avec des microtissus l'invention (MT) et avec le véhicule seul (contrôle).

Description détaillée de l'invention

Définitions

30 Par « alginate » au sens de l'invention, on entend des polysaccharides linéaires formés à partir

de β -D-mannuronate et α -L-gulonate, des sels et des dérivés de ceux-ci.

Par « capsule en hydrogel » ou « microcompartiment en hydrogel » au sens de l'invention, on entend une structure tridimensionnelle formée à partir d'une matrice de chaînes polymères, gonflée par un liquide et préférentiellement de l'eau.

5 Par « cellules humaines » au sens de l'invention on entend des cellules humaines ou des cellules de mammifères non humains immunologiquement humanisées. Même lorsque cela n'est pas précisé, les cellules, les cellules souches, les cellules progénitrices et les tissus selon l'invention sont constitués ou sont obtenus à partir de cellules humaines ou à partir de cellules de mammifères non humains immunologiquement humanisées.

10 Par « cellule souche embryonnaire » au sens de l'invention on entend une cellule souche pluripotente de cellule dérivée de la masse cellulaire interne du blastocyste. La pluripotence des cellules souches embryonnaires peut être évaluée par la présence de marqueurs tels que les facteurs de transcription OCT4, NANOG et SOX2 et des marqueurs de surface comme SSEA3/4, Tra-1-60 et Tra-1-81. Les cellules souches embryonnaires utilisées dans le cadre de
15 l'invention sont obtenues sans destruction de l'embryon dont elles sont issues, par exemple à l'aide de la technique décrite dans Chang et al. (Cell Stem Cell, 2008, 2(2)) : 113-117). Selon une variante les cellules souches embryonnaires d'êtres humains peuvent être exclues.

Par « une cellule entourée uniquement de cellules » dans un microtissu au sens de l'invention, on entend une cellule qui n'est ni en contact avec un lumen ni en contact l'extérieur du
20 microtissu.

Par « cellule mutante » au sens de l'invention, on entend une cellule porteuse d'au moins une mutation.

Par « cellule souche pluripotente » ou « cellule pluripotente » au sens de l'invention, on entend une cellule qui a la capacité de former tous les tissus présents dans l'organisme
25 d'origine entier, sans pour autant pouvoir former un organisme entier en tant que tel. Les cellules souches pluripotentes humaines peuvent être appelées hPSC dans la présente demande. Il peut s'agir en particulier de cellules souches pluripotentes induites (iPSC ou hiPSC pour les cellules souches pluripotentes induites humaines), de cellules souches embryonnaires ou de cellules MUSE (pour « Multilineage-differentiating Stress Enduring »).

30 Par « cellule souche pluripotente induite » au sens de l'invention on entend une cellule souche pluripotente induite à la pluripotence par reprogrammation génétique de cellules somatiques

différenciées. Ces cellules sont notamment positives pour les marqueurs de pluripotence, comme la coloration à la phosphatase alcaline et l'expression des protéines NANOG, SOX2, OCT4 et SSEA3/4. Des exemples de procédés permettant l'obtention de cellules souches pluripotentes induites sont décrits dans les articles Yu et al. (Science 2007, 318 (5858) : 1917-1920), Takahashi et al (Cell, 2007, 131(5) : 861-872) et Nakagawa et al (Nat Biotechnol, 2008, 26(1) : 101-106).

Par « cellule progénitrice » au sens de l'invention, on entend une cellule souche déjà engagée dans la différenciation en cellules hépatiques mais pas encore différenciée.

Par « diamètre de Féret » d'un microcompartiment (ou d'une partie d'un microcompartiment) ou d'un microtissu selon l'invention, on entend la distance « d » comprise entre deux tangentes audit microcompartiment (ou à ladite partie) ou du microtissu, ces deux tangentes étant parallèles, de telle sorte que l'ensemble de la projection dudit microcompartiment (ou de ladite partie) ou du microtissu soit compris entre ces deux tangentes parallèles. Un diamètre de Féret de la partie interne du microcompartiment est mesuré entre deux interfaces de la partie interne et de la couche externe du microcompartiment, c'est-à-dire la distance « d » comprise entre deux tangentes à ladite partie interne, ces deux tangentes étant parallèles, de telle sorte que l'ensemble de la projection de ladite partie interne soit compris entre ces deux tangentes parallèles.

Par « épaisseur variable » d'une couche, on entend au sens de l'invention le fait que la couche pour un même microcompartiment ou un même microtissu, n'a pas la même épaisseur partout.

Par « microcompartiment » ou « capsule » au sens de l'invention, on entend une structure tridimensionnelle partiellement ou totalement close, contenant plusieurs cellules.

Par « microtissu » ou « microtissu hépatique » au sens de l'invention on entend un tissu humain en trois dimensions comprenant au moins des cellules hépatiques et dont la plus grande dimension est inférieure à 1mm.

Par « milieu » au sens de l'invention on entend une solution aqueuse englobant des cellules ou des microtissus, compatible avec la survie, le développement et/ou le métabolisme des cellules. Il peut s'agir d'un milieu de culture.

Par « milieu de culture convectif » au sens de l'invention on entend un milieu de culture animé par des mouvements internes.

Par « mutation » au sens de l'invention, on entend une mutation génétique ou épigénétique, préférentiellement une mutation fonctionnelle. Il peut s'agir en particulier d'une modification ponctuelle de la séquence génétique, d'un variant structurel, d'une modification épigénétique, ou d'une modification de l'ADN mitochondrial.

- 5 Par « mutation fonctionnelle » au sens de l'invention, on entend une modification génétique ou épigénétique transmissible qui confère un gain ou perte de fonction ou perte de fonction potentielle à cellule mutante concernée. Il s'agit préférentiellement d'une mutation entraînant une modification du phénotype de la cellule mutante concernée. Très préférentiellement il s'agit d'un changement de la séquence du génome et/ou de l'épigénome
- 10 qui altère le potentiel thérapeutique d'une population de cellules, soit en augmentant le risque associé à la thérapie produite soit en diminuant le bénéfice apporté par la thérapie produite.

Par « plus petite dimension » d'un microcompartiment ou d'une couche de cellules au sens de l'invention, on entend la valeur du plus petit diamètre de Féret dudit microcompartiment.

- 15 Par « lumière » ou « lumen » au sens de l'invention, on entend un volume de solution aqueuse topologiquement entouré de cellules. Préférentiellement son contenu n'est pas en équilibre diffusif avec le volume de liquide convectif présent à l'extérieur du microcompartiment.

- Par « plus petit rayon » de la partie interne d'un microcompartiment selon l'invention, on entend la moitié de la valeur du plus petit diamètre de Féret de la partie interne du
- 20 microcompartiment.

Par « rayon moyen » de la partie interne d'un microcompartiment selon l'invention, on entend la moyenne des rayons du plus petit compartiment, chaque rayon correspondant la moitié de la valeur d'un diamètre de Féret de la partie interne du microcompartiment.

- Par « taux d'expansion à X jours » selon l'invention, on entend une mesure de la prolifération
- 25 cellulaire au temps $t=X$. Le taux d'expansion est mesuré en faisant le ratio du nombre de cellule comptées au jour X de la culture divisé par le nombre de cellule au départ de la culture (jour de l'encapsulation ou jour de mise en culture).

- Par « culture à grande échelle » selon l'invention, on entend une méthode de culture cellulaire adaptée pour un lot de production de microtissu hépatique permettant de traiter au moins 1
- 30 patient, préférentiellement 10 patients, plus préférentiellement 100 patients, encore plus préférentiellement plus de 1000 patients.

Par « phénotype fonctionnel » d'un microtissu selon l'invention, on entend la présence d'hépatocytes matures caractérisés par l'expression d'albumine et l'absence d'expression d'alphafoetoprotéine et de cytokératine 19.

5 Par « bourgeon hépatique » selon l'invention, on entend une organisation cellulaire caractérisé par une extension cellulaire de l'endoderme de l'intestin antérieur embryonnaire qui donne naissance au parenchyme du foie et de la voie biliaire. Il s'agit d'une conformation particulière donnant naissance aux hépatocytes et aux cholangiocytes.

Microtissu hépatique

10 L'invention a donc pour objet un microtissu hépatique en trois dimensions comprenant au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatiques, toutes les cellules du microtissu ayant toutes été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes induites encapsulées dans un unique microcompartiment clos en trois dimensions.

Préférentiellement, le microtissu hépatique comprend au moins 4 phénotypes différents de cellules hépatiques, encore plus préférentiellement au moins 5.

15 Avantageusement, le microtissu hépatique selon l'invention présente une diversité cellulaires importante permettant de reproduire le microenvironnement hépatique. La diversité et leur proximité des cellules présentes dans le microtissu hépatique permet un nombre important d'interactions cellulaires coopérant ainsi à la réalisation de nombreuses fonctions métaboliques et de transport.

20 La diversité cellulaire retrouvée dans le microtissu hépatique selon l'invention est obtenue à partir de cellules souches pluripotentes induites dans un unique microcompartiment clos en trois dimensions. De cette façon, les différents types cellulaires peuvent s'organiser au sein du microcompartiment reproduisant le microenvironnement hépatique.

25 Selon un mode de réalisation préféré, toutes les cellules du microtissu ont toutes été obtenues par différenciation de cellules souches pluripotentes induites encapsulées dans un unique microcompartiment clos en trois dimensions, préférentiellement lesdites cellules souches pluripotentes induites étant toutes de la même lignée.

Très préférentiellement toutes les cellules du microtissu ont toutes été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes induites encapsulées dans un unique microcompartiment clos
30 en trois dimensions, par un unique procédé de différenciation mis en œuvre dans ledit

microcompartiment.

Préférentiellement, les cellules souches pluripotentes induites avant différenciation en microtissu selon l'invention forment un cyste dans le microcompartiment. Aussi, de façon préférée, toutes les cellules du microtissu ont toutes été obtenues à partir d'au moins un cyste de cellules souches pluripotentes induites encapsulées dans un unique microcompartiment clos en trois dimensions, préférentiellement par différenciation, en particulier par un unique procédé de différenciation mis en œuvre dans ledit microcompartiment.

Selon une variante, le microtissu hépatique selon l'invention peut être obtenu à partir de cellules souches, de cellules progénitrices et/ou de cellules capables de se différencier en cellules hépatiques.

Avantageusement, le microenvironnement du microcompartiment à partir duquel est obtenu le microtissu selon l'invention, reproduit les conditions de l'organogénèse hépatique. En effet, le microcompartiment selon l'invention permet de limiter les différentes contraintes physiques et/ou stress et favorise les interactions entre les différents types cellulaires au sein du microcompartiment.

Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, le microtissu hépatique selon l'invention comprend au moins des hépatocytes immatures, des hépatocytes matures et des cholangiocytes. Préférentiellement, il comprend au moins :

- des hépatocytes immatures, caractérisés par l'expression d'alphafoetoprotéine (AFP) et d'albumine (ALB) et l'absence d'expression de cytokératine 19 (CK19)
- des hépatocytes matures caractérisés par l'expression d'albumine et l'absence d'expression d'alphafoetoprotéine et de cytokératine 19
- des cholangiocytes caractérisés par l'expression de cytokératine 19 et l'absence d'expression d'albumine et d'alphafoetoprotéine.

Selon une variante, le microtissu hépatique selon l'invention comprend des hépatoblastes. Les hépatoblastes peuvent être caractérisés par l'expression de l'alphafoetoprotéine, d'albumine et de la cytokératine 19.

La présence de ces phénotypes de cellules hépatiques garantit un effet multifactoriel sur les fonctions hépatiques. Cet effet pouvant permettre de rétablir ou optimiser certaines fonctions hépatiques.

Dans un mode de réalisation particulier, le microtissu hépatique comprends au moins 50%

d'hépatocytes matures et/ou immatures.

Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, le microtissu hépatique comprend au sein des cellules hépatiques entre 20 et 60% (en nombre) de cellules exprimant la cytokératine 19.

- 5 Les cellules exprimant la cytokératine 19 sont préférentiellement des cholangiocytes.

Dans le contexte de l'invention, les cellules hépatiques sont préférentiellement choisies parmi les hépatocytes matures, les hépatocytes immatures, les hépatoblastes, les cholangiocytes et leurs mélanges.

Le microtissu hépatique peut comprendre également des cellules exprimant CD73 et CD90.

- 10 Les cellules exprimant CD73 et CD90 sont préférentiellement des cellules souches mésenchymateuses.

Les cellules souches mésenchymateuses sont une population cellulaire bien connue pour ses propriétés sur la réparation et la régénération tissulaires notamment du foie. Avantageusement, la présence de cellules souches mésenchymateuses issus de cellules

- 15 souches pluripotentes induites du patient à traiter permet de garantir une efficacité de la réparation tissulaire du foie présentant une insuffisance hépatique.

Ainsi dans un mode de réalisation particulier, le microtissu selon l'invention comprend au moins :

- 20 - des cellules hépatiques, préférentiellement au moins des hépatocytes immatures, des hépatocytes matures, des cholangiocytes, et
- des cellules exprimant CD73 et CD90, préférentiellement au moins des cellules souches mésenchymateuses.

De façon préférée, le microtissu hépatique comprends au moins :

- 25 - des cellules hépatiques dont entre 20 et 60% (en nombre) des cellules sont des cellules exprimant la cytokératine 19, et
- des cellules exprimant CD73 et CD90.

Le microtissu hépatique comprend préférentiellement (pourcentages en nombre) :

- 30 - entre 50 et 99 % de cellules hépatiques, dont préférentiellement entre 20 et 60% (en nombre) des cellules sont des cellules exprimant la cytokératine 19, et
- entre 1 et 20% de cellules exprimant CD73 et CD90.

Le microtissu hépatique selon l'invention peut également comprendre d'autres cellules, telles

que notamment des cellules de Ito (cellules étoilées), des cellules de Kupffer, des cellules endothéliales, des hépatoblastes. Ainsi, dans un autre mode de réalisation particulier, le microtissu hépatique comprend :

- 5 - des hépatocytes matures, des hépatocytes immatures, des hépatoblastes, des cholangiocytes,
- des cellules de Ito et/ou des cellules de Kupffer et/ou des cellules endothéliales,
- et éventuellement des cellules souches mésenchymateuses.

Selon une variante, le microtissu hépatique selon l'invention peut comprendre également des cellules musculaires lisses et/ou des fibroblastes.

- 10 Les phénotypes de cellules compris dans le microtissu hépatique sont préférentiellement compatible avec le microenvironnement hépatique.

La diversité cellulaire proposée par le microtissu hépatique selon l'invention permet de réparer et régénérer le foie malade de façon à rétablir les fonctions atteintes.

- 15 La concentration en hépatocytes matures, cholangiocytes et en cellules souches mésenchymateuses permet de garantir un effet durable lors de la thérapie cellulaire. Il est particulièrement important lors de la culture d'obtenir une teneur en hépatocytes matures et/ou immatures supérieure à 50% afin d'obtenir un effet suffisant dans les plus brefs délais après la greffe de microtissus.

- 20 Une concentration en hépatocytes matures et/ou immatures inférieure à 50% limiterait l'efficacité du greffon et imposerait un volume de greffe d'autant plus important que la concentration (en nombre) en hépatocytes est faible. En effet il est estimé qu'au moins 5% de la masse du foie en hépatocytes fonctionnels est nécessaire pour le traitement de l'insuffisance hépatique aigüe par exemple et les insuffisances métaboliques du foie telles que les maladies liées à une sécrétion de facteur VIII et facteur IX et VWF, la maladie de Wilson et
- 25 l'hémochromatose héréditaire nécessitent le même ordre de grandeur. Les hépatocytes matures expriment l'albumine mais n'expriment pas l'alphafoetoprotéine. Ces marqueurs sont facilement identifiables et quantifiables par des méthodes de détection bien connues de l'homme du métier telle que la cytométrie en flux.

- 30 De façon particulièrement préférée, le microtissu hépatique comprend au moins un lumen, au moins une cellule en contact à la fois avec un lumen et avec le milieu extérieur au microtissu et au moins une cellule entourée uniquement de cellules.

Dans le contexte de l'invention, une telle organisation est caractéristique d'un microtissu fonctionnel prêt à être utilisé en thérapie cellulaire.

L'organisation particulière du microtissu est possible notamment grâce à la présence de cellules hépatiques polarisées permettant de structurer et d'organiser le microtissu.

- 5 Ainsi, le microtissu peut contenir des cellules hépatiques polarisées. La polarisation des cellules hépatiques dans le microcompartiment peut être un indicateur de la formation d'un microtissu fonctionnel.

Le microtissu hépatique selon l'invention ne comprend pas de cellules souches embryonnaires d'êtres humains.

- 10 Le microtissu hépatique selon l'invention peut se présenter sous forme ellipsoïdale.

Avantageusement, la forme ellipsoïdale du microtissu permet une de favoriser la survie et l'intégration du microtissu hépatique. Lorsque le microtissu hépatique est injecté dans la circulation générale, sa forme ellipsoïdale lui permet de faciliter son écoulement dans les vaisseaux sanguins dans le cas d'une administration par injection par voie vasculaire (dans une
15 réalisation via la veine porte) mais aussi leur écoulement au sein d'une canule si l'administration se fait par greffe intratissulaire. L'amélioration de l'injection du microtissu hépatique engendre une amélioration de l'intégration du microtissu hépatique par le foie du patient traité.

- Le microtissu hépatique selon l'invention présente préférentiellement un diamètre ou une
20 plus petite dimension comprise entre 100 et 300 μm , préférentiellement entre 150 et 280 μm . La plus grande dimension du microtissu hépatique est préférentiellement quant à elle inférieure à 1mm, et est très préférentiellement comprise entre 500 et 700 μm .

Avantageusement, la taille du microtissu hépatique est adaptée pour une administration par la veine porte.

- 25 Le microtissu hépatique selon l'invention peut comprendre entre 300 et 14000 cellules, préférentiellement entre 500 et 8000, encore plus préférentiellement entre 900 et 5000, notamment 4500 cellules.

- De façon préférée, le microtissu hépatique comprend au moins un canal biliaire. Les canaux biliaires recueillent la bile produite par les cellules hépatiques pour l'acheminer vers la
30 vésicule biliaire. La présence d'au moins un canal biliaire au sein du microtissu hépatique favorise le bon fonctionnement du microtissu au sein du foie et la reconstruction des canaux

biliaires défectueux.

Selon un autre mode de réalisation, le microtissu hépatique comprend au moins un granule de glycogène. Le glycogène sert de stockage des glucides dans l'organisme, il est principalement stocké dans le foie. Sous l'action de l'insuline, les cellules hépatiques stockent le glucose sous forme de glycogène. Sous l'action du glucagon, les cellules hépatiques vont hydrolyser le glycogène et libèrent le glucose dans le sang. La présence de granules de glycogène dans la cellule hépatiques est un élément physiologique du fonctionnement de son métabolisme et donc de sa fonction. Ainsi, la présence d'au moins un granule de glycogène dans le microtissu hépatique garantit des conditions favorables au fonctionnement des microtissus hépatiques pour un effet thérapeutique optimal. Préférentiellement, le microtissu hépatique comprend au moins un canal biliaire et au moins un granule de glycogène.

Selon un mode de réalisation, le microtissu hépatique selon l'invention est un microtissu hépatique en trois dimensions dont la plus grande dimension est comprise entre 500 et 700 µm. Préférentiellement, le microtissu hépatique selon l'invention exprime la monooxygénase CYP3A4 avec une activité d'au moins 75000 URL par million de cellules et/ou produit au moins 18µg d'urée par million de cellules par 24 heures.

Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines participant au métabolisme oxydatif de nombreuses molécules. Les cytochrome P450 sont des enzymes impliqués dans la biotransformation de composés exogènes, aussi bien dans les phénomènes de détoxification que d'intoxication par formation d'entités réactives. La forme hépatique humaine la plus abondante (CYP3A4) est responsable du métabolisme de plus de 60% des médicaments. Sa présence au sein du microcompartiment est une garantie fonctionnelle. L'urée est un produit azoté issu du catabolisme des protéine. Elle est exclusivement synthétisée au niveau du foie via le cycle de l'urée et la quantité d'urée formée dépend de la quantité de protéines ingérées, du catabolisme protéique et de l'état de la fonction hépatique. Une activité de la CYP3A4 d'au moins 75000 RLU par million de cellules associé à une production d'urée d'au moins 18µg par million de cellules par 24 heures garantit la présence d'hépatocytes matures ainsi qu'une activité métabolique suffisante pour garantir un effet significatif sur les fonctions du foie atteintes.

Préférentiellement, l'activité de la CYP3A4 est d'au moins 80000 URL, encore plus préférentiellement d'au moins 100000 URL.

Selon un mode de réalisation préféré, le microtissu hépatique produit au moins 40µg d'urée par million de cellules par 24 heures, encore plus préférentiellement au moins 60µg, notamment au moins 80µg

Avantageusement, le microtissu hépatique selon l'invention présente une activité
5 métabolique proche d'un foie en bonne santé. Ainsi, le microtissu hépatique est particulièrement efficace pour rétablir les fonctions du foie traité.

De façon préférée, le microtissu hépatique selon l'invention comprend entre 50 et 99% de cellules hépatiques. Le microtissu hépatique comprend préférentiellement des cellules hépatiques sécrétant au moins 75µg d'albumine par million de cellules par 24h, encore plus
10 préférentiellement au moins 150µg, notamment au moins 250µg.

Selon un mode de réalisation particulier, le microtissu hépatique est obtenu à partir de cellules souches pluripotentes induites et comprend des cellules hépatiques sécrétant au moins 75µg d'albumine par million de cellules par 24h au moins 20 jours après le début de la différenciation.

15 L'albumine est une protéine la plus abondante dans le sang. Produite par le foie, l'albumine est responsable notamment de la stabilisation de la pression sanguine et du transport de nombreuses substances.

Avantageusement, une production d'albumine d'au moins 75µg par million de cellules par 24h est un indicateur du bon fonctionnement du microtissu hépatique.

20 Le microtissu hépatique selon l'invention peut être obtenu par différenciation de cellules souches pluripotentes induites au moins 20 jours, préférentiellement au moins 30 jours après l'encapsulation dans un microcompartiment clos en trois dimensions de 1 à 200 cellules souches pluripotentes induites, préférentiellement entre 5 et 150, notamment entre 15 et 80. De façon préférée, le microtissu hépatique peut être obtenu à partir de l'encapsulation dans
25 un microcompartiment clos en trois dimensions de 1 à 200 cellules souches pluripotentes induites, préférentiellement entre 5 et 150, notamment entre 15 et 80.

Préférentiellement les souches pluripotentes induites forment un cyste dans le microcompartiment avant différenciation en cellules du microtissu hépatique selon l'invention.

30 L'invention a également pour objet un ensemble de microtissus hépatiques comprenant au moins un microtissu hépatique selon l'invention. Préférentiellement il s'agit d'un ensemble de

plusieurs microtissus hépatiques en trois dimensions dans un milieu, dont au moins un microtissu hépatique est un microtissu hépatique selon l'invention. Selon une variante préférée, au moins 50% (en nombre) des microtissus hépatiques de l'ensemble de microtissus hépatiques, sont des microtissus hépatiques selon l'invention.

- 5 L'ensemble de microtissus hépatiques selon l'invention est adapté pour être administré aux patients présentant une insuffisance hépatique. L'administration peut être effectuée par injection dans une solution biocompatible. L'injection peut s'effectuer dans la veine porte de façon à atteindre le foie sans dispersion dans la circulation générale, directement dans le foie ou de façon ectopique. Lorsque l'injection est ectopique elle peut se réaliser dans l'abdomen
10 ou sous la capsule rénale.

De façon préférée, la quantité efficace de l'ensemble de microtissu injecté au patient correspond à une masse entre 1 et 20% de la masse du foie du patient traité, préférentiellement entre 2 et 10%, notamment 5%.

- Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un microcompartiment comprenant au moins
15 un microtissu hépatique selon l'invention.

- Le microcompartiment selon l'invention comprend une couche externe en hydrogel. Préférentiellement l'hydrogel utilisé est biocompatible, c'est-à-dire qu'il n'est pas toxique pour les cellules. La couche externe d'hydrogel doit permettre la diffusion d'oxygène et de nutriment pour alimenter les cellules contenues dans le microcompartiment et permettre leur
20 survie. Selon un mode de réalisation, la couche externe d'hydrogel comprend au moins de l'alginate. Elle peut être constituée exclusivement d'alginate. L'alginate peut être en particulier un alginate de sodium, composé à 80% d' α -L-gulonate et 20% de β -D-mannuronate, avec une masse moléculaire moyenne de 100 à 400 kDa et une concentration totale comprise entre 0,5 et 5% en masse. La couche externe en hydrogel est dépourvue de cellules.

- 25 La couche externe d'hydrogel permet notamment de protéger les cellules du stress mécanique des bioréacteurs, de limiter les molécules potentiellement toxiques quand accumulées dans le milieu.

- L'épaisseur moyenne de couche externe peut être variable. Elle est préférentiellement comprise entre 20 et 60 μ m, plus préférentiellement entre 30 et 40 μ m. Le ratio entre le plus
30 petit rayon de la partie interne et cette épaisseur est préférentiellement comprise entre 2 et 10 μ m.

Le microcompartiment selon l'invention présente avantageusement un taux d'expansion des cellules souches pluripotentes induites d'au moins fois 15, 20 jours après le début de la différenciation.

L'invention favorise ainsi l'amplification avec un taux d'expansion élevé, ce qui par conséquent
5 diminue le temps de cultures pour obtenir un microtissu fonctionnel.

Le microcompartiment selon l'invention peut être obtenu après encapsulation de cellules souches pluripotentes induites avec ou sans ajout de matrice extracellulaire, naturelle ou de synthèse.

Selon une variante, le microcompartiment selon l'invention comprend dans sa partie interne
10 de la matrice extracellulaire telle que du Matrigel® et/ou de la Geltrex® et/ou une matrice type hydrogel d'origine végétale comme des alginates modifiés ou d'origine synthétique ou de copolymère de poly(N-isopropylacrylamide) et de poly(éthylène glycol) (PNIPAAm-PEG) type Mebiol®.

Selon une variante, le microcompartiment selon l'invention peut être obtenu après
15 encapsulation de cellules souches pluripotentes induites sans ajout d'aucun élément de matrice extracellulaire. Les éléments de matrice extracellulaire peuvent être les séquences peptidiques ou peptidomimétiques, les mélanges de protéines, les composés extracellulaires ou les protéines structurales, telles que collagène, des laminines, de l'entactine, de la vitronectine, ainsi que des facteurs de croissance ou des cytokines.

20 Au sein du microcompartiment, les cellules souches pluripotentes induites se différencie en tissu hépatique pendant une période d'au moins 20 jours, préférentiellement au moins 30 jours.

De manière inattendue, le microcompartiment propose un microenvironnement favorable au développement d'un microtissu hépatique. En effet, durant la différenciation au sein du
25 microcompartiment, les cellules s'organisent pour former une structure similaire à un bourgeon hépatique. Ce bourgeon hépatique est retrouvé au cours de l'organogénèse hépatique in vivo, c'est cette structure particulière qui donne naissance aux hépatocytes et aux cholangiocytes. La présence d'une structure similaire d'un bourgeon hépatique lors de la formation du microtissu hépatique est un indicateur de la bonne qualité du tissu.

30 Ainsi, le microtissu hépatique selon l'invention est préférentiellement obtenu après la formation d'une structure similaire à un bourgeon hépatique dans un unique

microcompartiment clos en trois dimensions.

Le microcompartiment selon l'invention permet d'isoler les cellules souches pluripotentes induites des contraintes mécaniques présentes au sein du bioréacteur. Cette isolation mécanique permet au microtissu de mettre en place et de maintenir une topologie qui se
5 rapproche de l'organisation spatiale et structurelle de l'organogénèse hépatique existant in vivo.

De façon inattendue, après au moins 20 jours, préférentiellement 30 jours, de différenciation au sein du microcompartiment les cellules conservent leur conformation permettant ainsi d'avoir une meilleure prolifération tout en maintenant un phénotype fonctionnel. Par
10 conséquent cela permet de réduire le nombre de passages et de réduire le temps en culture nécessaire pour atteindre le nombre de cellules hépatiques final nécessaire.

Les cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention ont été préférentiellement obtenues après au moins deux cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel de 1 à 200 cellules souches pluripotentes induites,
15 préférentiellement entre 5 et 150, notamment entre 15 et 80.

De façon préférée, les cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention ont été obtenus après au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 28, 30 cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel, préférentiellement au moins 5, encore plus préférentiellement au moins 6, pour obtenir
20 jusqu'à 8000 hépatocytes matures par microcompartiment. Par exemple, les hépatocytes matures présents dans le microcompartiment ont été obtenus après au moins six cycles de division cellulaire après l'encapsulation des cellules dans la couche externe en hydrogel.

Préférentiellement le nombre de divisions cellulaires pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention est inférieur à 100, encore plus préférentiellement inférieur à 30.

25 Préférentiellement le microcompartiment est obtenu après au moins 2 passages après l'encapsulation, plus préférentiellement au moins 3, 4 ou 5 passages. Chaque passage peut durer par exemple entre 2 et 10 jours, notamment entre 2 et 4 jours.

De façon préférée, le microcompartiment est obtenu après au moins une ré-encapsulation, plus préférentiellement entre 1 et 14 ré-encapsulations, notamment entre 2 et 7 ré-
30 encapsulations. Très préférentiellement une ré-encapsulation correspond à un nouveau passage et chaque cycle d'encapsulation correspond à un passage.

Préférentiellement, le microcompartiment selon l'invention a été obtenu en moins de 30 jours après l'encapsulation, encore plus préférentiellement en moins de 20 jours après encapsulation d'au moins 1 cellule souche pluripotente induite dans la partie interne définie par la couche externe en hydrogel préférentiellement 5, 20 et jusqu'à 100.

- 5 Le microcompartiment selon l'invention peut contenir entre 100 et 14000 cellules, préférentiellement entre 300 et 10000 cellules, encore plus préférentiellement entre 300 et 5000, plus particulièrement au moins 50 hépatocytes matures et au moins 20 cholangiocytes. Avantageusement, le microcompartiment selon l'invention protège les cellules souches pluripotentes induites du stress mécanique permettant ainsi d'obtenir un taux d'expansion
- 10 particulièrement adapté à la culture à grande échelle.

Le microcompartiment selon l'invention peut se présenter sous toute forme en trois dimensions, c'est-à-dire qu'il peut avoir la forme de tout objet de l'espace. Le microcompartiment peut avoir n'importe quelle forme compatible avec l'encapsulation de cellules. Préférentiellement le microcompartiment selon l'invention se présente sous une

15 forme sphérique ou allongée ou ellipsoïdale ou sensiblement sphérique ou allongée. Il peut avoir la forme d'un ovoïde, d'un cylindre, d'un sphéroïde ou d'une sphère ou sensiblement cette forme.

C'est la couche externe du microcompartiment, c'est-à-dire la couche d'hydrogel, qui confère sa taille et sa forme au microcompartiment selon l'invention. Préférentiellement la plus petite

20 dimension du microcompartiment selon l'invention est comprise entre 150 μm et 500 μm , préférentiellement entre 200 μm et 450 μm .

Sa plus grande dimension est préférentiellement supérieure à 350 μm , plus préférentiellement comprise entre 350 μm et 600 μm .

Le microcompartiment selon l'invention peut être éventuellement congelé pour être stocké.

- 25 Il devra ensuite être préférentiellement décongelé avant son utilisation.

L'invention a également pour objet plusieurs microcompartiments selon l'invention utilisés ensemble.

L'invention a également pour objet un ensemble ou série de microcompartiments comprenant au moins deux microcompartiments cellulaires en trois dimensions, caractérisé

30 en ce qu'au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'invention.

De façon préférée, la série de microcompartiments selon l'invention est dans un milieu de

culture, en particulier dans un milieu de culture au moins partiellement convectif. Tout milieu de culture adapté à la culture de cellules souches pluripotentes induites peut être utilisé, tel que par exemple le milieu « HCM Hepatocyte Culture Medium BulletKit (Lonza) » ou « Milieu E de William (Thermofisher Scientific) » dès lors que la concentration en sels dissouts est compatible avec le maintien de la réticulation de l'alginate par les cations divalents.

Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, l'invention a pour objet une série de microcompartiments cellulaires dans une enceinte close, telle qu'un bioréacteur, préférentiellement dans un milieu de culture dans une enceinte close, telle qu'un bioréacteur. Ainsi, préférentiellement, les microcompartiments sont disposés dans un milieu de culture dans un bioréacteur clos.

L'ensemble ou série de microcompartiments selon l'invention comprend préférentiellement entre 2 et 10^{16} microcompartiments.

Ainsi, le microcompartiment selon l'invention est adapté à la culture à grande échelle en fournissant des microtissus hépatiques présentant un phénotype fonctionnel notamment vis-à-vis de leur capacités détoxificatrices (particulièrement l'activité de CYP3A) et sécrétrices (particulièrement la sécrétion d'albumine) garantissant une efficacité optimale *in vivo*.

Utilisation du microtissu hépatique selon l'invention

Le microtissu hépatique ou le microcompartiment selon l'invention peut être utilisé pour toutes applications, en particulier comme médicament, en particulier en thérapie cellulaire chez l'Homme.

Ainsi, l'invention a pour objet un microtissu hépatique selon l'invention ou un ensemble de microtissus hépatiques comprenant au moins un microtissu hépatique selon l'invention, ou un microcompartiment selon l'invention ou un ensemble de microcompartiments comprenant au moins un microcompartiment selon l'invention, pour son utilisation comme médicament, en particulier en thérapie cellulaire.

L'invention vise également une méthode de traitement thérapeutique qui consiste à greffer et/ou injecter des microtissus selon l'invention chez l'Homme, notamment comme traitement en thérapie cellulaire.

Préférentiellement, le microtissu hépatique ou le microcompartiment selon l'invention peut être utilisé dans la prévention ou le traitement des symptômes associées à une insuffisance

hépatique notamment une insuffisance hépatique aiguë, chronique ou aiguë-sur-chronique. De façon préférée, le microtissu hépatique ou le microcompartiment selon l'invention peut être utilisé dans la prévention ou le traitement de maladie telle que la fibrose, la cirrhose, la stéatose, la stéatose non alcoolique, les hépatites, les maladies métaboliques du foie telles que les maladies liées à une sécrétion de facteur VIII et facteur IX et VWF, la maladie de Wilson et l'hémochromatose héréditaire. En effet toutes ces indications sont traitables par greffe de foie et c'est précisément ce que la greffe d'un ensemble de microtissus selon l'invention récapitulant les fonctions hépatiques est appelé à solutionner.

Ainsi, l'invention a pour objet un microtissu hépatique selon l'invention ou un ensemble de microtissus hépatiques comprenant au moins un microtissu hépatique selon l'invention, ou un microcompartiment selon l'invention ou un ensemble de microcompartiments comprenant au moins un microcompartiment selon l'invention, pour son utilisation, dans la prévention ou le traitement des symptômes associées à une insuffisance hépatique notamment une insuffisance hépatique aiguë, chronique ou aiguë-sur-chronique, en particulier dans la prévention ou le traitement de maladie hépatiques telle que la fibrose, la cirrhose, la stéatose, la stéatose non alcoolique, les hépatites, les maladies métaboliques du foie telles que les maladies liées à une sécrétion de facteur VIII et facteur IX et VWF.

L'invention concerne également un microtissu hépatique selon l'invention ou un ensemble de microtissus hépatiques comprenant au moins un microtissu hépatique selon l'invention, ou un microcompartiment selon l'invention ou un ensemble de microcompartiments comprenant au moins un microcompartiment selon l'invention, pour son utilisation dans l'évaluation de molécules ou dans la modélisation des maladies hépatiques.

Procédé de préparation de microcompartiments et de microtissus selon l'invention

L'invention vise également un procédé de préparation de microcompartiments selon l'invention.

Le procédé de préparation d'un microcompartiment ou d'un ensemble de microcompartiments selon l'invention, peut comprendre les étapes suivantes :

- (a) préparation d'un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos comprenant, à l'intérieur d'une couche externe en hydrogel, des cellules souches pluripotentes induites, et éventuellement des éléments de matrices extracellulaires ou une matrice

extracellulaire naturelle ou de synthèse,

-(b) induire une différenciation cellulaire au sein du microcompartiment cellulaire, de manière à obtenir au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatiques.

La préparation du microcompartiment de l'étape (a) peut être réalisée dans tout milieu de culture adapté à la culture de cellules souches pluripotentes induites tel que les milieux mTeSR™1 ou mTeSRplus de Stemcell technologies, StemMACS™ iPS-Brew XF (Miltenyi Biotec ou StemFlex de thermofisher Scientific).

Le microcompartiment de l'étape (a) peut être obtenu par encapsulation de 1 à 150 cellules souches pluripotente induites, préférentiellement au moins 50, notamment au moins 100.

Préférentiellement l'encapsulation est mise en œuvre selon les techniques connues de l'homme du métier. En effet, toute méthode de production de microcompartiments cellulaires contenant à l'intérieur d'une couche externe d'hydrogel 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), conformément aux étapes décrites ci-dessous.

Préférentiellement l'étape (a) est mise en œuvre en ajoutant des éléments de matrices extracellulaires ou une matrice extracellulaire naturelle ou de synthèse. Selon une variante, l'étape (a) est mise en œuvre sans ajouter d'éléments de matrice extracellulaire ni de matrices extracellulaires ou une matrice extracellulaire naturelle ou de synthèse.

Dans le contexte de l'invention, l'étape (a) est préférentiellement mise en œuvre dans un dispositif capable de générer des capsules d'hydrogel à l'aide d'une puce microfluidique. Par exemple le dispositif peut comprendre des pousses seringues pour plusieurs solutions injectées de manière concentrique grâce à un injecteur microfluidique qui permet de former un jet qui se fractionne en gouttes collectées ensuite dans un bain de calcium. Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, deux ou trois solutions chargées sur deux ou trois pousse-seringues :

- une solution d'hydrogel, par exemple d'alginate,
- optionnellement une solution intermédiaire isotonique préférentiellement une solution

isotonique ne contenant pas de cation divalent tel que Ca^{2+} Mg^{2+} pour éviter une réticulation de l'hydrogel trop précoce dans l'injecteur, telle que par exemple une solution de sorbitol,

- une solution comprenant des cellules souches pluripotentes induites et du milieu de culture.

Les trois solutions sont co-injectées (injectées simultanément) de manière concentrique grâce

5 à un injecteur microfluidique ou puce microfluidique qui permet de former un jet qui se fractionne en gouttes dont la couche extérieure est la solution d'hydrogel et le cœur la solution de l'étape (a) comprenant les cellules souches pluripotentes induites ; Ces gouttes sont collectées dans un bain de calcium qui réticule et/ou gélifie la solution d'alginate pour former la coque.

10 Pour améliorer la mono-dispersité des microcompartiments cellulaires, la solution d'hydrogel est préférentiellement chargée avec un courant continu à (entre 1 et 10kV). Un anneau à la masse peut éventuellement être disposé à une distance de la pointe comprise entre 1mm et 20 cm, préférentiellement 3mm à 10 cm, encore plus préférentiellement 1cm à 5cm, de la pointe dans le plan perpendiculaire à l'axe du jet sortant de l'injecteur microfluidique (puce
15 de coextrusion) pour générer le champ électrique.

Selon l'invention, il est nécessaire de générer des capsules dont la partie interne a un rayon moyen ou plus petit rayon d'au moins 100 μm . Pour générer des capsules avec de telles dimensions avec une puce de coextrusion (injecteur microfluidique ou puce microfluidique) l'invention propose notamment de modifier le débit des solutions coextrudées et l'ouverture

20 finale de la puce de co-extrusion. Par débit on entend le débit de de chaque solution qui arrive à l'injecteur. Par ouverture finale de la puce de co-extrusion, on entend l'ouverture interne du canal de sortie de la puce.

- pour le débit : on passe préférentiellement d'une valeur comprise entre 20 et 40 ml/h pour chaque solution coextrudée pour les tailles standards de capsules connues de l'art
25 antérieur, à une valeur comprise entre 45 et 150 mL/h, préférentiellement entre 45 et 110 mL par heure pour une variante de l'invention,

- pour le diamètre de l'ouverture finale de la puce de coextrusion (injecteur microfluidique) qui passe d'une valeur préférentiellement comprise entre 50 et 120 μm pour les tailles standards de capsules connues de l'art antérieur, à une valeur de diamètre
30 comprise entre 150 et 300 μm , préférentiellement entre 180 et 240 μm .

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier l'encapsulation de l'étape (a) est réalisée à l'aide

d'un injecteur microfluidique dont le diamètre d'ouverture finale est compris entre 150 et 300 μm , préférentiellement entre 180 et 240 μm , et avec le débit de chacune des 3 solutions compris entre 45 et 150 mL/h, préférentiellement entre 45 et 110 mL/h.

Selon une variante, l'étape (a) de préparation d'un microcompartiment peut être réalisée avec
5 des cellules souches, des cellules souches progénitrices ou des cellules capables de se différencier en cellules hépatiques.

L'étape (b) de différenciation cellulaire s'effectue préférentiellement pendant au moins 20 jours, encore plus préférentiellement au moins 30 jours.

Au cours de la différenciation de l'étape (b) les cellules s'organisent dans une organisation
10 similaire à un bourgeon hépatique. Cette organisation est typiquement marquée par la structuration sous forme de deux sous populations cellulaires présentant deux organisations différentes, l'une de type épithéliale (c'est-à-dire sous forme d'assise cellulaire polarisée apico-basalement et présentant des jonctions serrées et l'autre de type mésenchymateux c'est-à-dire sans organisation apicobasale et présentant des jonctions focales.

15 La différenciation des cellules souches pluripotentes induites de l'étape (b) en microtissu hépatique peut s'effectuer par tout procédé de différenciation connus tels que décrit dans Raggi, et al, Stem cell Report 2022 ou Mallanna et Duncan, Curr Protoc Cell Biol, 2014.

Selon un mode de réalisation, les étapes (a) et/ou (b) sont mises en œuvre sous agitation permanente ou séquentielle. Cette agitation est importante car elle maintient l'homogénéité
20 de l'environnement de culture et évite la formation de tout gradient diffusif.

Préférentiellement, l'étape (b) est réalisée en condition d'hypoxie, plus préférentiellement les 5 premiers jours de différenciations sont réalisés en condition d'hypoxie.

De façon inattendue, la différenciation en condition d'hypoxie permet d'obtenir un meilleur taux d'expansion.

25 La mise en œuvre du procédé selon l'invention, permet d'obtenir des microcompartiments comprenant au moins 100, préférentiellement au moins 500, au moins 800, au moins 1000, notamment au moins 3000 cellules.

Le procédé selon l'invention est préférentiellement mis en œuvre d'une enceinte close tel qu'un bioréacteur clos.

30 L'invention concerne également un procédé de préparation d'un microtissu hépatique comprenant la mise en œuvre des étapes :

-(a) préparation d'un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos comprenant, à l'intérieur d'une couche externe en hydrogel, des cellules souches pluripotentes induites, et éventuellement des éléments de matrices extracellulaires ou une matrice extracellulaire naturelle ou de synthèse,

5 -(b) induire une différenciation cellulaire au sein du microcompartiment cellulaire, de manière à obtenir au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatiques.

 -(c) éliminer la couche externe d'hydrogel pour récupérer le microtissu hépatique de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou ellipsoïdale comprenant au moins 300 cellules correspondant à au moins 3
10 phénotypes différents de cellules hépatiques.

 L'étape (c) consiste à dissocier le microcompartiment pour obtenir un microtissu hépatique ; l'élimination de la couche externe en hydrogel peut être réalisée notamment par hydrolyse, dissolution, perçage et/ou rupture par tout moyen biocompatible, c'est-à-dire non toxique pour les cellules. Par exemple, l'élimination peut être réalisée en utilisant un tampon
15 phosphate salin, un chélateur d'ions divalents, une enzyme comme l'alginate lyase si l'hydrogel comprend de l'alginate et/ou la microdissection laser.

 L'étape (c) d'élimination de la couche externe d'hydrogel permet de récupérer le microtissu hépatique de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou ellipsoïdale comprenant au moins 300 cellules
20 correspondant à au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatiques.

 Préférentiellement, le microtissu hépatique récupéré à l'étape (c) se présente de forme ellipsoïdale.

 Le microtissu hépatique issu de l'étape (c) peut comprendre au moins 300, préférentiellement au moins 500, notamment entre 300 et 14000, encore plus préférentiellement entre 900 et
25 5000 cellules.

 Le microtissu hépatique issu de l'étape (c) comprend au moins un lumen, au moins une cellule en contact à la fois avec un lumen et avec le milieu extérieur au microtissu, et au moins une cellule entourée uniquement de cellules.

 Avantageusement, le procédé selon l'invention permet de produire à grande échelle le
30 microtissu hépatique selon l'invention de façon à former un ensemble de microtissus hépatiques pouvant former jusqu'à 20% de la masse du foie du patient à traiter en moins de

50 jours, préférentiellement en moins de 40 jours, notamment en moins de 35 jours.

Dans une variante préférée, le procédé selon l'invention comprend au moins une ré-encapsulation du microtissu hépatique après l'étape (c), c'est-à-dire au moins deux cycles d'encapsulation. Préférentiellement chaque cycle d'encapsulation correspond à un passage.

- 5 Dans cette variante du procédé (au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (c)) le nombre de divisions cellulaires de l'ensemble du procédé (pour l'ensemble des passages) est d'au moins 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 cycles de division cellulaire. Dans un procédé selon l'invention il peut y avoir plusieurs ré-encapsulations, préférentiellement entre 1 et 100, notamment entre 1 et 10 ré-encapsulation(s).

- 10 Chaque ré-encapsulation peut comprendre :

- une étape qui consiste à dissocier le microcompartiment ou la série de microcompartiments pour obtenir un microtissu hépatique ; l'élimination de la couche externe en hydrogel peut être réalisée notamment par hydrolyse, dissolution, perçage et/ou rupture par tout moyen biocompatible, c'est-à-dire non toxique pour les cellules. Par exemple, l'élimination peut être

- 15 réalisée en utilisant un tampon phosphate salin, un chélateur d'ions divalents, une enzyme comme l'alginate lyase si l'hydrogel comprend de l'alginate et/ou la microdissection laser, et
- une étape de ré-encapsulation de tout ou partie du microtissu hépatique dans une capsule d'hydrogel. La ré-encapsulation est un moyen adapté pour une augmentation de l'amplification cellulaire obtenue depuis l'étape pluripotente, et diminuer les risques de
20 mutation.

La ré-encapsulation consiste à éliminer la couche externe d'hydrogel, préférentiellement à remettre en suspension de manière partiellement ou totalement dissociées les cellules qui étaient sous forme de cystes dans les microcompartiments et à remettre en œuvre les étapes du procédé.

- 25 Selon un mode de réalisation la ré-encapsulation comprend les étapes suivantes :

- en hydrogel définissant une partie interne, le plus petit rayon ou le rayon moyen de ladite partie interne étant d'au moins 300 μm ;
- (iv) cultiver les microcompartiments obtenus dans un milieu de culture
- (vii) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

- 30 La compartimentalisation dans des microcompartiments permet d'éliminer les microcompartiments contenant d'avantage de cellules mutées que les autres capsules. Même

si les cellules mutées ont une croissance rapide elles vont atteindre la confluence capsulaire qui va contenir leur multiplication. La compartimentalisation permet aussi de ne pas contaminer l'intégralité de la population cellulaire, et également d'éliminer les capsules contenant des cellules mutantes, à tout moment, en particulier avant une étape de ré-encapsulation. Ce tri peut être fait soit par analyse en ligne, soit par élimination des capsules remplies plus rapidement que les autres par exemple.

Dans un mode de mise en œuvre, au moins une des étapes (préférentiellement toutes les étapes) est réalisée à une température adaptée à la survie des cellules, comprise entre 4 et 42°C. La température lors de la prolifération cellulaire doit être préférentiellement entre 32 et 37°C pour éviter de déclencher des mutations en baissant la performance des enzymes de réparation. De même, de façon préférée, la température doit être basse (idéalement environ 4°C) pour gérer le stress des cellules à l'étape (c).

À tout moment, le procédé selon l'invention peut comprendre une étape consistant à vérifier le phénotype des cellules contenues dans le microcompartiment. Cette vérification peut être réalisée en identifiant l'expression par au moins une partie des cellules contenues dans le microcompartiment, de marqueurs spécifiques du phénotype recherché choisis parmi :

- l'expression d'alphafoetoprotéine, albumine et de cytokératine 19 pour caractériser les hépatoblastes
- l'expression d'alpha-foetoprotéine et d'albumine et l'absence d'expression de cytokératine 19 pour caractériser les hépatocytes immatures
- l'expression d'albumine et l'absence d'expression d'alphafoetoprotéine ni de cytokératine 19 pour caractériser les hépatocytes matures
- l'expression de cytokératine et l'absence d'expression d'albumine et d'alphafoetoprotéine pour caractériser les cholangiocytes
- l'expression de CD31 pour caractériser les cellules endothéliales
- l'expression de CD90 et CD73 pour caractériser les cellules souches mésenchymateuses.

Les microcompartiments cellulaires obtenus selon les procédés de l'invention peuvent ensuite être congelés avant toute utilisation. La congélation est préférentiellement réalisée à une température comprise entre -190°C et -80°C. La décongélation peut être réalisée par immersion du véhicule de congélation étanche (ampoule vissable ou poche plastique) dans un bain d'eau tiède (37 degrés préférentiellement) pour que les cellules décongelent assez

rapidement. Les microcompartiments selon l'invention avant leur utilisation peuvent être maintenus à plus de 4°C pendant une durée limitée avant leur utilisation, préférentiellement entre 4°C et 38°C.

L'invention favorise surtout l'amplification avec un taux d'expansion élevé, ce qui par conséquent diminue le temps de culture pour obtenir un nombre de lymphocytes fonctionnels très important.

Exemple :

Exemple 1 : protocole de différenciation

Le microtissu hépatique selon l'invention peut s'obtenir à partir de tout procédé de différenciation connus.

Pour démontrer cela, les inventeurs ont adapté 2 protocoles connus de l'art antérieur. Le protocole A décrit dans Raggi, et al, Stem cell Report 2022 et le protocole B adapté à partir de Mallanna et Duncan, Curr Protoc Cell Biol, 2014 et Raggi et al, Stem Cell Reports, 2022.

Matériel et méthode

Les iPSCs ont été cultivées sur des flacons T75 recouverts de vitronectine et ont été régulièrement passées en utilisant le réactif de dissociation ReLeSR (Stem Cell Technologies). Toutes les expériences ont été réalisées avec des iPSCs entre les passages 20 et 26.

L'encapsulation des iPSCs a été effectuée dans des microcapsules d'alginate de taille similaire entre les deux protocoles A et B et en présence de matrice extracellulaire.

Pour le protocole A :

Diamètre minimal sur l'axe long=220µm

Diamètre maximal sur l'axe long= 550µm

Diamètre moyen sur l'axe long=415µm

Pour le protocole B :

Diamètre minimal sur l'axe court=200µm

Diamètre maximal sur l'axe court= 385µm

Diamètre moyen sur l'axe court=295µm

Les iPSCs ont d'abord été détachées avec de l'acutase en petits groupes de 3 à 5 cellules et remises en suspension à une concentration de 0,8E6 cellules/ml dans un mix composé à 50% de Matrigel et 50% de milieu mTESR1 contenant 10µM d'inhibiteur de RhoG (Y-27632) et

- encapsulées 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). Les cellules encapsulées ont été remises en
- 5 suspension dans un milieu mTESR1 contenant 10µM d'inhibiteur Rhock dans une proportion de 0.2 ml de capsule pour 1 ml de milieu total. On a laissé les cellules former des cystes dans les capsules pendant 96h dans des conditions d'agitation, en utilisant un bioréacteur ABLE de 30ml (Reprocell), à 37°C et 5% de CO2 avec un changement de milieu toutes les 24h dans du milieu mTESR1.
- 10 La différenciation a été initiée 96h après l'encapsulation en passant au milieu RPMI, contenant 1mM Ca2+, 1% de sérum de remplacement KnockOut (KOSR), B27 sans insuline, 100ng/ml Activin A et 3µM CHIR-99021 pendant 2 jours.
- Pendant les 3 jours suivants, le milieu a été remplacé par un milieu RPMI, contenant 1mM Ca2+, 1% KOSR, B27 sans insuline et 100ng/ml Activin A.
- 15 Ensuite, pendant les 5 jours suivants, le milieu a été remplacé par un milieu RPMI, contenant pour le protocole A : 1mM Ca2+, 1% KOSR, B27 sans insuline, supplémenté avec 20ng/ml de BMP-4, 5ng/ml de bFGF, 1µM de A83-01 (inhibiteur de la voie TGF beta) et 4µM de IWP-2 (inhibiteur de la voie Wnt).
- Pour le protocole B : 1mM Ca2+, 1% KOSR, B27 sans insuline, supplémenté avec 20ng/ml de
- 20 BMP-4 et 5ng/ml de bFGF. Du jour 11 au jour 15, le milieu était composé de milieu RPMI, contenant 1mM Ca2+, 2% KOSR, B27 avec insuline, supplémenté avec 20ng/ml HGF, 3µM CHIR-99021, 5ng/ml bFGF et 20ng/ml BMP-4.
- Au jour 16, le milieu a été changé en milieu HCM sans EGF (Lonza), supplémenté avec 20ng/ml HGF, 3µM CHIR-99021, 5ng/ml bFGF, 20ng/ml BMP-4, 20ng/ml Oncostatine M, 10µM
- 25 Dexaméthasone et 1% KOSR.
- A partir du jour 20 et pendant les 5 jours suivants, le milieu était composé du milieu HCM plus EGF, supplémenté avec 20ng/ml Oncostatine M, 10µM Dexaméthasone et 1% KOSR.
- A partir du 25ème jour, le milieu était composé du milieu HCM plus EGF, 10µM Dexaméthasone et 1% KOSR.
- 30 Analyse de l'expression génique
- L'analyse de l'expression génique a été réalisée par RT-Q-PCR.

La qPCR a été réalisée sur un instrument LightCycler® 480 de Roche. L'expression de chaque gène a été normalisée par l'expression des gènes de référence YWHAZ, NONO et VCP. Les données sont exprimées en $2^{\Delta\Delta Ct}$, où $\Delta Ct = Ct \text{ du gène} - Ct \text{ moyen des gènes de référence}$.

- 5 Les résultats sont présentés à la figure 1a, 1b et 1c. Ces résultats montrent que le microtissu hépatique selon l'invention peut être obtenu avec tout procédé de différenciation adapté.

Exemple 2 : Différenciation en hépatocytes au sein du microcompartiment selon l'invention versus en deux dimensions.

- 10 L'encapsulation des iPSCs a été effectuée dans des microcapsules d'alginate présentant les caractéristiques ci-dessous :

Diamètre minimal sur l'axe long = 450µm

Diamètre maximal sur l'axe long = 685µm

Diamètre moyen sur l'axe long = 575µm

- 15 Diamètre minimal sur l'axe court = 313µm

Diamètre maximal sur l'axe court = 546µm

Diamètre moyen sur l'axe court = 423µm

- Pour l'encapsulation des iPSCs dans des microcapsules d'alginate d'environ 575µm de diamètre moyen et en absence de matrice, les iPSCs ont d'abord été détachées avec de l'acutase en petits groupes de 3 à 5 cellules et remises en suspension à une concentration de 20 10E6 cellules/ml dans un milieu mTESR1 contenant 10µM d'inhibiteur de Rhock (Y-27632) et encapsulées 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). Les cellules encapsulées ont été remises en 25 suspension dans un milieu mTESR1 contenant 10µM d'inhibiteur Rhock à 0,5E6 cellules/ml, la proportion de capsules par rapport au milieu ne dépassant pas 20%. On a laissé les cellules former des agglutinats dans les capsules pendant 24h dans des conditions d'agitation, en utilisant un bioréacteur ABLE de 30ml (Reprocell), à 37°C et 5% de CO₂.
- 30 La différenciation a été initiée 24h après l'encapsulation en passant au milieu RPMI, contenant 1mM Ca²⁺, 1% de sérum de remplacement KnockOut (KOSR), B27 sans insuline, 100ng/ml

Activin A et 3 μ M CHIR-99021 pendant 2 jours.

Pendant les 3 jours suivants, le milieu a été remplacé par un milieu RPMI, contenant 1mM Ca²⁺, 1% KOSR, B27 sans insuline et 100ng/ml Activin A.

Ensuite, pendant les 5 jours suivants, le milieu a été remplacé par un milieu RPMI, contenant
5 1mM Ca²⁺, 1% KOSR, B27 sans insuline, supplémenté avec 20ng/ml de BMP-4 et 5ng/ml de bFGF. Du jour 11 au jour 15, le milieu était composé de milieu RPMI, contenant 1mM Ca²⁺, 2% KOSR, B27 avec insuline, supplémenté avec 20ng/ml HGF, 3 μ M CHIR-99021, 5ng/ml bFGF et 20ng/ml BMP-4.

Au jour 16, le milieu a été changé en milieu HCM sans EGF (Lonza), supplémenté avec 20ng/ml
10 HGF, 3 μ M CHIR-99021, 5ng/ml bFGF, 20ng/ml BMP-4, 20ng/ml Oncostatine M, 10 μ M Dexaméthasone et 1% KOSR.

A partir du jour 20 et pendant les 5 jours suivants, le milieu était composé du milieu HCM plus EGF, supplémenté avec 20ng/ml Oncostatine M, 10 μ M Dexaméthasone et 1% KOSR.

A partir du 25ème jour, le milieu était composé du milieu HCM plus EGF, 10 μ M
15 Dexaméthasone et 1% KOSR.

Le milieu a été changé quotidiennement du jour 1 au jour 25, et tous les deux jours à partir du jour 25.

Différenciation des hépatocytes en 2D

Les iPSCs ont été dissociées en cellules individuelles en utilisant l'accutase et placées sur des
20 plaques à 6 puits recouvertes de Matrigel dans un milieu mTESR1 contenant 10 μ M d'inhibiteur de Rho à une densité de 1x10⁵ cellules/cm². La différenciation a été initiée 24h après le placage en utilisant le même protocole de différenciation et la même composition de milieu que pour les capsules 3D.

Analyse de l'expression génique

25 L'analyse de l'expression génique a été réalisée par RT-Q-PCR.

La qPCR a été réalisée sur un instrument LightCycler® 480 de Roche. L'expression de chaque gène a été normalisée par l'expression des gènes de référence YWHAZ, NONO et VCP. Les données sont exprimées en 2^{delta} Ct, où delta Ct = Ct du gène - Ct moyen des gènes de référence.

30 La comparaison de l'expression génique entre les hépatocytes obtenus en deux dimensions versus trois dimensions sont illustrés dans la figure 2 afin de vérifier l'induction de

l'endoderme pendant la différenciation. L'expression des gènes EOMES, CXCR4, FOXA2 et SOX17 montre que la différenciation passe bien par une étape transitoire de différenciation endodermique vers l'endoderme définitif, passage attendu pour générer des cellules hépatiques à partir de cellules pluripotentes.

- 5 L'analyse de l'expression protéique des marqueurs de l'endoderme a été réalisée au jours 5 et est représentée à la figure 3. Ces résultats montrent que la différenciation progresse selon une séquence conforme aux attentes de l'homme de l'art c'est-à-dire via l'endoderme définitif et vers le bourgeon hépatique.

- Une analyse de l'expression des gènes au cours des protocoles de différenciation est
10 représentée aux figures 4a et 4b. Ces résultats montrent que la différenciation progresse vers une composition cohérente avec la cible de la composition cellulaire du foie, notamment des hépatocytes.

Mesure du taux d'expansion :

- Le taux d'expansion est mesuré en faisant le ratio du nombre de cellule comptées au jour X de
15 la culture divisé par le nombre de cellule au départ de la culture (jour de l'encapsulation ou jour de mise en culture). Le taux d'expansion ou facteur d'amplification a été mesuré au cours de la différenciation. Le suivi du taux d'expansion pendant le processus de différenciation est représenté à la figure 5. On retrouve un taux d'expansion d'au moins fois 15, 20 jours après le début de la différenciation.

- 20 Évaluation de la production d'albumine et d'urée

- Pour évaluer la production d'albumine et d'urée, le milieu conditionné a été échantillonné périodiquement 24 heures ($\pm 2h$) après le changement de milieu et stocké à $-80^{\circ}C$. Les niveaux d'albumine et d'urée sécrétés dans le milieu ont été mesurés à l'aide du kit ELISA pour l'albumine humaine (Invitrogen) et du kit de dosage de l'urée Quantichrom (Gentaure),
25 respectivement, conformément aux instructions du fabricant. La quantité de molécules sécrétées en 24h a ensuite été normalisée par le nombre de cellules selon le comptage effectué après dissociation pour chaque point temporel.

Les résultats sont présentés aux figures 6 et 7. On constate que la sécrétion d'albumine et la production d'urée sont plus importantes dans les microcompartiment selon l'invention.

- 30 Mesure de l'activité de la CYP3A4 :

L'activité de Cyp3A4 a été réalisée à l'aide du test P450-Glo™ CYP3A4 avec Luciferin-IPA

(Promega) selon les instructions du fabricant. En bref, un échantillon des capsules 3D contenant les microtissus a été décapsulé et le nombre de cellules dans un volume donné de capsules contenant les microtissus a été déterminé. Les microtissus décapsulés correspondant aux cellules 1E5, ou aux cellules 1E5 qui ont été différenciées en 2D, ont été mélangés avec 50 µl du substrat proluciférine P450-Glo 3 µM dans une plaque à 96 puits à fond rond et incubés pendant 3h à 37°C, 5%CO₂. Pour chaque condition, 5 répétitions ont été effectuées, le milieu de culture cellulaire seul et les iPSCs ont été utilisés comme contrôles négatifs. Par la suite, 25 µl du milieu de culture de chaque puits ont été transférés dans une plaque de luminomètre blanche opaque à 96 puits et mélangés avec 25 µl de réactif de détection de la luciférine. La plaque a été incubée pendant 20 minutes à température ambiante et la luminescence a été lue à l'aide du lecteur de microplaques Spectramax i3x (Molecular devices) avec un temps d'intégration de 1 seconde par puits. Le signal net a été calculé en soustrayant les valeurs de luminescence de fond des puits de contrôle sans cellules.

Les résultats sont présentés à la figure 8. On constate une activité de la CYP3A4 significativement plus importante des cellules encapsulées dans le microcompartiment selon l'invention.

Exemple 3 : Etude morphologique du microcompartiment selon l'invention

L'objectif de cet exemple est de caractériser la morphologie des cellules au sein du microcompartiment durant la différenciation.

Histologie

Les échantillons de microtissus hépatiques ont été fixés avec une solution de fixation AFA pendant 24h à température ambiante, lavés avec du PBS et pré-emboîtés en histogel. Après déshydratation dans des bains successifs d'éthanol, d'acétone et de xylène, les échantillons ont été inclus dans de la paraffine et sectionnés au microtome à l'épaisseur de 5 µm.

Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)

Après élimination de la paraffine, les sections ont été colorées avec de l'hématoxyline de Harris et de l'éosine G. Après déshydratation, les sections ont été colorées avec du Safran et montées avec de l'Entellan. Le cytoplasme cellulaire est coloré en rose, les noyaux en bleu-violet et la matrice extracellulaire en jaune-rosé.

Coloration PAS (Periodic-Acid-Schiff)

Après élimination de la paraffine, les sections ont été prétraitées avec de l'acide périodique à 1%, suivi d'une coloration successive avec le réactif de Schiff et l'hématoxyline de Mayer. Le glycogène est coloré en rose et les noyaux en bleu-violet.

Les images issues de la coloration sont représentées sur la figure 9. On distingue bien la forme cubique caractéristique des hépatocytes ainsi que la présence des granules de glycogène au sein du microcompartiment.

Immunofluorescence sur les microtissus 3D

Les microtissus ont été fixés à l'intérieur des capsules dans une solution de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS avec calcium pendant 1 heure à température ambiante. Après avoir été rincés avec du PBS sans Ca²⁺ afin d'enlever les capsules, ils ont été perméabilisés dans du Triton X-100 à 1% pendant 30-60 minutes à température ambiante. Les microtissus ont été incubés avec la solution d'anticorps primaire pendant 72h à 4°C sous agitation. Après lavage avec du PBS, ils ont été incubés avec une solution d'anticorps secondaires marqués (Alexa Fluor, Life Technologies) et du DAPI pendant une nuit à 4°C sous agitation et à l'abri de la lumière.

Pour l'imagerie structurale par phalloïdine-DAPI, la coloration a été faite en conservant les capsules (l'étape de décapsulation avant perméabilisation a été sautée, les lavages ont été faits avec du PBS contenant du calcium). Les microtissus ont été incubés avec le DAPI et la Phalloïdine pendant 72h à 4°C sous agitation.

Après lavage avec du PBS, les cellules ont été montées sur une lame avec un espacement de 0,5mm. L'acquisition des images a été réalisée sur un microscope confocal (SP5, Leica).

Tableau 1 :

Antibody	Company	Ig Species	Dilution
AFP	DAKO	Rabbit	1:2000
ALB	Bethyl	Goat	1:400
CK19	DAKO	Mouse	1:100

L'évolution de la morphologie du microcompartiment a été réalisée pendant 30 jours au cours de la différenciation. Ces résultats sont représentés aux figure 10a à 10e. On peut observer la présence de structures particulières, telles que la formation d'une structure proche d'un bourgeon hépatique au jours 7 et une organisation cellulaire caractéristique du microtissu hépatique selon l'invention. En effet, on distingue au moins un lumen, au moins une cellule

en contact à la fois avec un lumen et avec le milieu extérieur au microtissu, et au moins une cellule entourée uniquement de cellules. En plus de l'étude de la morphologie, les inventeurs ont pu caractériser la présence d'au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatique au sein du microcompartiment, 30 jours après le début de la différenciation (Figure 11).

5

Greffe de microtissus selon l'invention et évaluation de la survie cellulaire après transplantation chez la souris comparée à la transplantation d'hépatocytes sous forme de cellules uniques obtenus en 2D

L'objectif de cette étude est d'inoculer à des souris immunocompétentes des hépatocytes
10 dérivés de cellules souches, préparés sous forme de suspension cellulaire ou de microtissus selon l'invention, en vue d'une évaluation de leur survie et fonction in vivo.

Les conditions de l'étude sont décrites ci-dessous :

Animaux :

L'étude a été réalisée sur des souris femelles Balb/cByJ (Mus musculus) âgées de 10
15 semaines.

Sept (7) animaux ont été hébergés dans l'animalerie La ventilation et le traitement de l'air ont été réalisés par des renouvellements fréquents et la température a été contrôlée autour de 21-22°C. L'humidité a été maintenue autour de 50 %. L'éclairage artificiel a été maintenu 12 heures par jour. La quantité et l'accès à la nourriture
20 (granulés) et à la boisson (eau du robinet) ont été contrôlés quotidiennement. Les cages ont été renouvelées une fois par semaine et l'enrichissement de l'environnement a été fait pour minimiser l'anxiété.

Procédé d'injection :

- Au jour 42 de la différenciation hépatique, les cellules générées en 2D (selon l'exemple
25 2 « *Différenciation des hépatocytes en 2D* », ont été dissociées en cellules uniques et les microtissus hépatiques générés selon l'invention (selon l'exemple 1) ont été décapsulés.
- Suspension de microtissus : des microtissus selon l'invention obtenus selon l'exemple 1, suspendus dans un milieu de culture, ont été utilisés : environ 3×10^6 cellules par tube dilué dans 170 μ L de milieu basal. Avant l'inoculation, 170 μ L de Matrigel® ont été
30 ajoutés à chaque tube.

Pour pouvoir effectuer l'inoculation sous-cutanée d'un tel volume, c'est-à-dire 340µL, une incision cutanée dans le flanc droit de la souris a été réalisée afin de préparer une poche sous-cutanée. La suspension de microtissus a ensuite été injectée dans cette poche à l'aide d'une pipette avant la fermeture de la plaie avec de la colle chirurgicale pour empêcher la diffusion de la suspension.

5

- Suspension de cellules : des cellules obtenues selon le protocole de l'exemple 2 « *Différenciation des hépatocytes en 2D* », suspendus dans un milieu de culture, ont été utilisées : environ 3x10⁶ cellules par tube dans 120µL de milieu basal. Avant l'inoculation, 120µL de Matrigel® ont été ajoutés à chaque tube.

10

Pour pouvoir réaliser l'inoculation sous-cutanée de ce volume de 240µL, une incision cutanée au niveau du flanc droit de la souris a été réalisée afin de préparer une poche sous-cutanée. La suspension cellulaire a ensuite été injectée dans cette poche à l'aide d'une pipette avant de refermer la plaie avec de la colle chirurgicale pour éviter la diffusion de la suspension.

15

- Solution contrôle : une solution de milieu basal (véhicule) de 100µL a été mélangée à 100µL de Matrigel®. Cette solution a été injectée par voie sous-cutanée en suivant le même procédé que celui utilisé pour les microtissus et la suspension cellulaire.

Prélèvement d'échantillons :

Des échantillons de sang ont été prélevés par saignée rétro-orbitaire pour la préparation du sérum (environ 80µL) sur toutes les souris disponibles :

20

- Avant l'inoculation des cellules, jour 0, n=7
- Deux jours après l'inoculation, jour 2, n=7
- Six jours après l'inoculation, jour 6, n=3

Les greffons, y compris la peau environnante afin de conserver la structure, ont été prélevés

25

comme suit :

- Deux jours après l'inoculation, jour 2, n=4
 - o n=2 pour la suspension cellulaire
 - o n=2 pour les microtissus
- Six jours après l'inoculation, jour 6, n=3
 - o n=1 pour la suspension cellulaire
 - o n=1 pour les microtissus

30

o n=1 pour le véhicule

Les greffons ont été prélevés, fixés, inclus en paraffine, sectionnés et colorés au HES (hématoxyline éosine safran) et avec des anticorps spécifiques pour le marqueur cellulaire humain Stem121 (détecte les protéines cytoplasmiques humaines), les marqueurs cellulaires hépatiques albumine et CytK19 (cytokératine 19).

Avant la transplantation, les microtissus ont également été colorés avec HES, albumine et CytK19.

Prélèvement d'échantillons :

Les images obtenues par microscopie optique (microscope Leica DM2000) sont présentées sur les figures 12a à 12d :

- 12a :

* greffons unicellulaires au jour 2 (receveurs 1 et 2, ligne du haut) après la transplantation chez des souris Balb/c,

* greffons de micro-tissus au jour 2 (receveurs 4 et 5, ligne du bas) après la transplantation chez des souris Balb/c.

- 12b :

* greffons unicellulaires au jour 6 (receveur3, ligne du haut) après la transplantation chez des souris Balb/c,

* greffons de micro-tissus au jour 6 (receveur 6, ligne du bas) après la transplantation chez des souris Balb/c.

- 12c : tissu au site d'injection avec le véhicule seul (milieu basal contenant 50% de matrigel) sans greffon chez les souris Balb/c.

- 12d : microtissus selon l'invention avant la transplantation.

L'analyse histologique des greffons au jour 2 après la transplantation a révélé la présence de microtissus de forme arrondie positifs pour le marqueur cellulaire humain Stem121 chez les souris transplantées avec les microtissus hépatiques selon l'invention, confirmant que les microtissus détectés sont d'origine humaine. Certaines des cellules composant les microtissus étaient positives pour le marqueur hépatocyttaire albumine et certaines cellules, principalement celles situées en périphérie des microtissus, étaient positives pour le marqueur collangiocytaire CytK19. L'organisation cellulaire et la compartimentation des cellules exprimant l'albumine et la CytK19 après la transplantation in vivo étaient similaires à

celles observées dans les microtissus avant la transplantation.

Chez les souris transplantées avec des cellules uniques générées en 2D, seules de rares cellules positives pour le marqueur cellulaire humain Stem121, l'albumine et la cytokératine 19 ont été détectées au jour 2 après la transplantation.

5 La présence de cellules exprimant Stem121 et la CytK19 était encore détectable au jour 6 chez les souris transplantées avec les microtissus, aucune cellule positive pour Stem121 ou la CytK19 n'était présente chez les souris transplantées avec les cellules uniques. Enfin, dans la zone d'infiltration des cellules immunitaires chez la souris transplantée avec le véhicule seul (contrôle), aucune cellule positive à Stem121, albumine ou cytokératine 19 n'a été détectée.

10 Par ailleurs la présence d'A1AT humaine a été analysée dans les sérums de souris Balb/c transplantées (analyses avant la transplantation (jour 0), au jour 2 et au jour 6 après la transplantation). La présence d'A1AT (alpha-1 antitrypsine) humaine a été analysée par ELISA. La sécrétion d'A1AT par les cellules et les microtissus avant la transplantation a également été analysée. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 13a et 13 b :

- 15 - 13a : représentation graphique de la sécrétion d'A1AT avant transplantation de cellules uniques différenciées en 2D (2D) et de microtissus selon l'invention (Invention).
- 13b : représentation graphique de la détection d'A1T dans le sérum de souris Balb/c avant (jour 0), au jour 2 et au jour 6 après la transplantation avec des cellules uniques différenciées en 2D (SC), avec des microtissus l'invention (MT) et avec le véhicule seul
- 20 (contrôle).

Ces résultats montrent que les microtissus hépatiques selon l'invention sont capables de sécréter un niveau plus élevé d'A1AT que les cellules différenciées en 2D. Conformément à l'observation histologique, la concentration d'A1AT humaine est plus élevée dans le sérum des souris transplantées avec les microtissus selon l'invention que dans celui des souris

25 transplantées avec des cellules uniques. La concentration d'A1AT humaine est plus faible, voire indétectable, au jour 0. Elle est plus élevée au jour 2 après la transplantation et diminue au jour 6 tout en étant toujours importante et supérieure à celle des cellules uniques différenciées en 2D. Ces données sont cohérentes avec les résultats histologiques et montrent que les microtissus selon l'invention persistent dans le temps et sont plus fonctionnels après

30 la transplantation que les cellules uniques différenciées en 2D, même dans un modèle de souris immunocompétente.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les microtissus hépatiques selon l'invention et greffés en tant qu'objets 3D survivent après la greffe chez des souris immunocompétentes, et ont une survie meilleure et plus longue après la greffe que les cellules hépatiques générées en 2D et greffées en tant que suspension cellulaire unique.

5

REVENDICATIONS

[Revendication 1] Microtissu hépatique en trois dimensions comprenant au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatiques, caractérisé en ce que toutes les cellules du microtissu ont toutes été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes induites encapsulées dans un unique microcompartiment clos en trois dimensions.

- 5 [Revendication 2] Microtissu hépatique selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microtissu hépatique comprend des hépatocytes immatures, des hépatocytes matures et des cholangiocytes.

[Revendication 3] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que le microtissu hépatique comprend au moins :

- 10 - des hépatocytes immatures caractérisés par l'expression d'alpha-foetoprotéine et d'albumine et l'absence d'expression de cytokératine 19
- des hépatocytes matures caractérisés par l'expression d'albumine et l'absence d'expression d'alphafoetoprotéine et de cytokératine 19
- des cholangiocytes caractérisés par l'expression de cytokératine et l'absence
- 15 d'expression d'albumine et d'alphafoetoprotéine.

[Revendication 4] Microtissu selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que le microtissu hépatique comprend des cellules exprimant CD73 et CD90.

[Revendication 5] Microtissu hépatique selon la précédente revendication, caractérisée en ce que les cellules exprimant CD73 et CD90 sont des cellules souches mésenchymateuses.

- 20 [Revendication 6] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce le microtissu hépatique comprend au moins des cellules hépatiques dont entre 20 et 60% des cellules hépatiques sont des cellules exprimant la cytokératine 19.

- [Revendication 7] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que toutes les cellules du microtissu ont toutes été obtenues à partir de la
- 25 différenciation d'au moins un cyste de cellules souches pluripotentes induites encapsulées dans un unique microcompartiment clos en trois dimensions.

[Revendication 8] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications, comprenant :

- au moins un lumen,
- au moins une cellule en contact à la fois avec un lumen et avec le milieu extérieur au
5 microtissu, et
- au moins une cellule entourée uniquement de cellules.

[Revendication 9] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il présente une forme ellipsoïdale.

[Revendication 10] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications,
10 caractérisé en ce que les cellules hépatiques sont polarisées.

[Revendication 11] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend entre 50 % et 99 % de cellules hépatiques dont entre 20 % et 60 % de cholangiocytes, et entre 1 % et 20 % de cellules exprimant CD73 et CD90.

[Revendication 12] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications,
15 caractérisé en ce qu'il présente un diamètre ou une plus petite dimension comprise entre 100 µm et 300 µm.

[Revendication 13] Microtissu hépatique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il présente une plus grande dimension comprise entre 500 µm et 700 µm.

[Revendication 14] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications,
20 caractérisé en ce qu'il comprend entre 300 et 14000 cellules.

[Revendication 15] Microtissu hépatique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un canal biliaire.

[Revendication 16] Microtissu hépatique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un granule de glycogène.

[Revendication 17] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules hépatiques sont choisies parmi les hépatocytes matures, les hépatocytes immatures, les hépatoblastes, les cholangiocytes et leurs mélanges.
25

[Revendication 18] Microtissu hépatique selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il exprime la monooxygénase CYP3A4 avec une activité d'au moins 75000 RLU par million de cellules et/ou produit au moins 18µg d'urée par million de cellules par 24 heures.

- 5 [Revendication 19] Microcompartiment clos en trois dimensions, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant au moins un microtissu hépatique selon l'une des revendications 1 à 18.

[Revendication 20] Microcompartiment cellulaire selon la revendication 19, caractérisé en ce que le microcompartiment est obtenu 20 jours après l'encapsulation de 1 à 200 cellules
10 souches pluripotentes induites dans la partie interne définie par la couche externe en hydrogel.

[Revendication 21] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il présente un taux d'expansion d'au moins fois 15, 20 jours après le début de la différenciation.

[Revendication 22] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 19 à 21,
15 caractérisé en ce que l'épaisseur de la couche externe est variable et comprise entre 20 et 60µm.

[Revendication 23] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisé en ce que la couche externe comprend de l'alginate.

[Revendication 24] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 19 à 23,
20 caractérisé en ce qu'il comprend des éléments de matrice extracellulaire ou une matrice extracellulaire naturelle ou de synthèse dans la partie interne entre la couche externe et le microtissu hépatique.

[Revendication 25] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 19 à 24, caractérisé en ce qu'il présente un diamètre ou une plus petite dimension comprise entre 300
25 µm et 400µm.

[Revendication 26] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 19 à 25, caractérisé en ce qu'il présente une plus grande dimension comprise entre 400 µm et 600µm.

[Revendication 27] Ensemble de microcompartiments comprenant au moins deux microcompartiments cellulaires en trois dimensions, caractérisé en ce qu'au moins un
30 microcompartiment est un microcompartiment selon l'une des revendications 19 à 26.

[Revendication 28] Ensemble de microcompartiments selon la précédente revendication, caractérisé en ce que les microcompartiments sont disposés dans un milieu de culture dans un bioréacteur.

[Revendication 29] Microtissu selon l'une des revendications 1 à 18 ou microcompartiment
5 selon l'une des revendications 19 à 26 pour son utilisation comme médicament.

[Revendication 30] Microtissu selon l'une des revendications 1 à 18 ou microcompartiment selon l'une des revendications 19 à 26, pour son utilisation dans la prévention ou le traitement de symptômes associés à une insuffisance hépatique.

[Revendication 31] Microtissu ou microcompartiment pour une utilisation selon la
10 revendication 30, dans lequel l'insuffisance hépatique est une insuffisance hépatique aiguë, chronique ou aiguë-sur-chronique.

[Revendication 32] Microtissu selon l'une des revendications 1 à 18 ou microcompartiment selon l'une des revendications 19 à 26, pour son utilisation dans le traitement ou la prévention de maladies métaboliques du foie.

[Revendication 33] Microtissu selon l'une des revendications 1 à 18 ou microcompartiment
15 selon l'une des revendications 19 à 26, pour son utilisation dans le traitement ou la prévention de la fibrose et la cirrhose hépatiques, la stéatose, la stéatose non alcoolique, les hépatites les maladies liées à une sécrétion de facteur VIII et facteur IX et VWF, la maladie de Wilson et l'hémochromatose héréditaire.

[Revendication 34] Procédé de préparation d'un microcompartiment selon l'une des
20 revendications 19 à 26, comprenant les étapes consistant à :

- a) produire un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos comprenant, à l'intérieur d'une couche externe en hydrogel, des cellules souches pluripotentes induites, et éventuellement des éléments de matrice extracellulaire ou une matrice
25 extracellulaire naturelle ou de synthèse,
- b) induire une différenciation cellulaire au sein du microcompartiment cellulaire, de manière à obtenir au moins 3 phénotypes différents de cellules hépatiques.

[Revendication 35] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que le procédé de différenciation cellulaire de l'étape b) dure au moins 20 jours

[Revendication 36] Procédé selon l'une des revendications 34 à 35, caractérisé qu'à l'étape a) entre 40 et 150 cellules souches pluripotentes induites sont présentes dans le microcompartiment.

[Revendication 37] Procédé de préparation d'un microtissu hépatique selon l'une des
5 revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'il comprend :

- mettre en œuvre un procédé de préparation d'un microcompartiment selon l'une des revendications 19 à 26,
- éliminer la couche externe d'hydrogel pour récupérer le microtissu hépatique.