DESCRIPTION

TISSU CARDIAQUE PARTICULIER ET UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES CARDIAQUE

Domaine technique

L'invention concerne le traitement des maladies cardiaques, notamment de cardiopathies ischémiques, par l'utilisation de tissus cardiaques spécifiques obtenus à partir de microcompartiments cellulaires particuliers comprenant des cellules humaines exprimant des gènes exprimés au cours de la différenciation cardiaque

Art antérieur

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires, et en particulier les cardiopathies ischémiques (qui conduisent généralement à des infarctus du myocarde), sont la principale cause de décès dans le monde (Thomas, H. *et al.* Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control. *Glob. Heart* 13, 143–163 (2018)).

Actuellement il n'existe aucune solution satisfaisante pour prévenir ou traiter les conséquences des ischémies cardiaques et en particulier pour traiter les nécroses du muscle cardiaque responsables d'insuffisances cardiaques et de risques d'arrêts du cœur.

Récemment, des recherches ont été menées sur l'utilisation de cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines, les hPSC-CM, qui comprennent à la fois des cellules souches embryonnaires humaines et des cellules souches pluripotentes induites, pour régénérer les tissus cardiaques perdus ou endommagés afin d'éviter ou de traiter l'insuffisance cardiaque associée (Desgres, M. & Menasché, P. Clinical Translation of Pluripotent Stem Cell Therapies: Challenges and Considerations. *Cell Stem Cell* 25, 594–606 (2019) ; Bertero, A. & Murry, C. E. Hallmarks of cardiac regeneration. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 579–580 (2018) ; Jiang, B., Yan, L., Shamul, J. G., Hakun, M. & He, X. Stem Cell Therapy of Myocardial Infarction: A Promising Opportunity in Bioengineering. *Adv. Ther.* 3, 1900182 (2020) ; Liew, L. C., Ho, B. X. & Soh, B. S. Mending a broken heart: Current strategies and limitations of cell-based therapy. *Stem Cell Res. Ther.* 11, 1–15 (2020)).

Ces cardiomyocytes peuvent être utilisés pour d'autres applications notamment comme stimulateurs cardiaques biologiques pour le traitement du dysfonctionnement du nœud

sinusal (Lee, J. H., Protze, S. I., Laksman, Z., Backx, P. H. & Keller, G. M. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial and Ventricular Cardiomyocytes Develop from Distinct Mesoderm Populations. *Cell Stem Cell* 21, 179–194.e4 (2017)), ou pour traiter les cardiopathies congénitales, telles que les anomalies septales (Devalla, H. D. & Passier, R. Cardiac differentiation of pluripotent stem cells and implications for modeling the heart in health and disease. *Sci. Transl. Med.* 10, 1–14 (2018)) ou encore pour la modélisation de maladies pour tester des candidats médicaments (Tzatzalos, E., Abilez, O. J., Shukla, P. & Wu, J. C. Engineered heart tissues and induced pluripotent stem cells: Macro- and microstructures for disease modeling, drug screening, and translational studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 96, 234–244 (2016)).

On estime que la quantité de cellules nécessaire pour régénérer les tissus cardiaques endommagés d'un patient après un infarctus du myocarde est d'environ 1 milliard (Laflamme, M. A. & Murry, C. E. Heart regeneration. *Nature* 473, 326–335 (2011)) ce qui rend l'utilisation de cardiomyocytes dérivés d'hPSC-CM en thérapie cellulaire cardiaque actuellement impossible. En effet, la production à l'échelle industrielle de tissus cardiaques est complexe car il faut réaliser un compromis entre conditions de culture suffisamment douces pour la survie et le bon fonctionnement des tissus et contraintes de cultures à grands volumes qui immanquablement exposent les cellules à des stress non physiologiques (typiquement le stress hydrodynamique dans le cadre de la culture liquide en bioréacteurs). Les procédés de production de cardiomyocytes à partir d'hPSC présentent en particulier les problèmes suivants :

- Une mauvaise formation des agrégats d'hPSC dans les cultures en suspension avant la différenciation en cardiomyocytes : en effet la formation initiale des agrégats d'hPSC et l'homogénéité sont cruciales pour la reproduction cellulaire et donc pour la qualité du tissu cardiaque obtenu après différenciation ;

- Une perte importante de cellules due à la sensibilité des hPSC à la contrainte de cisaillement et aux impacts lors de la culture en bioréacteur (Lam, A. T. L. *et al.* Conjoint propagation and differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes in a defined microcarrier spinner culture. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 1–15 (2014)) ;

- L'impossibilité de combiner une amplification à grande échelle des hPSC et une différenciation cardiaque (Le, M. N. T. & Hasegawa, K. Expansion culture of human pluripotent

stem cells and production of cardiomyocytes. *Bioengineering* 6, (2019)).

Les solutions connues pour limiter ces inconvénients lors de la différenciation cardiaque en suspension dans un bioréacteur nécessitent :

- soit l'utilisation de micro-supports, ainsi que l'arrêt temporaire de l'agitation (Ting, S., Chen, A., Reuveny, S. & Oh, S. An intermittent rocking platform for integrated expansion and differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes in suspended microcarrier cultures. *Stem Cell Res.* 13, 202–213 (2014))

- soit l'utilisation de lignées cellulaires moins sensibles au cisaillement lors de la différenciation cardiaque (Laco, F. *et al.* Selection of human induced pluripotent stem cells lines optimization of cardiomyocytes differentiation in an integrated suspension microcarrier bioreactor. *Stem Cell Res. Ther.* 11, 1–16 (2020)).

Ces solutions ne sont toutefois pas optimales. En particulier :

- les micro-supports laissent encore les cellules exposées à des contraintes mécaniques et qui peuvent être difficiles à retirer,

- l'arrêt de l'agitation ne permettent pas une diffusion uniforme des nutriments et produits nécessaires à la différenciation, et

- la limitation à une unique lignée cellulaire de départ est extrêmement contraignante et limitative.

On sait également que la perte de cellules au cours de la différenciation en cardiomyocytes peut également être réduite en effectuant une culture directement dans de l'hydrogel en vrac (Kerscher, P. *et al.* Direct Production of Human Cardiac Tissues by Pluripotent Stem Cell Encapsulation in Gelatin Methacryloyl. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3, 1499–1509 (2017) ; Li, Q. *et al.* Scalable and physiologically relevant microenvironments for human pluripotent stem cell expansion and differentiation. *Biofabrication* 10, (2018)), mais ces méthodes ne sont pas compatibles avec la culture en bioréacteur classique. Pour rendre la méthode compatible avec des bioréacteurs utilisés dans l'industrie, des essais ont été réalisés en encapsulant les cellules dans l'hydrogel, mais ces essais ont été limités aux cellules souches de souris (Agarwal, P. *et al.* A Biomimetic Core-Shell Platform for Miniaturized 3D Cell and Tissue Engineering. *Part. Part. Syst. Charact.* 32, 809–816 (2015), Chang, S. *et al.* Emulsion-based Encapsulation of

Pluripotent Stem Cells in Hydrogel Microspheres for Cardiac Differentiation. *Biotechnol. Prog.* btpr.2986 (2020) doi:10.1002/btpr.2986 ; Zhao, S. *et al.* Bioengineering of injectable encapsulated aggregates of pluripotent stem cells for therapy of myocardial infarction. *Nat. Commun.* 7, 1–12 (2016)).

Enfin, on sait que la rétention cellulaire après délivrance dans le cœur des cardiomyocytes est très mauvaise (Hou, D. *et al.* Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: Implications for current clinical trials. *Circulation* 112, 150–156 (2005)) ce qui limite l'efficacité de la thérapie cellulaire cardiaque. De plus, lors de la greffe de cardiomyocytes tels qu'obtenus actuellement, pour régénérer des tissus cardiaques, il existe un risque important d'induire une arythmie au patient ce qui limite là encore l'utilisation de la thérapie cellulaire pour le traitement des pathologies cardiaques. En effet, à ce jour, l'un des défis scientifiques les plus cruciaux à surmonter afin d'assurer la sécurité des cellules cardiaques dérivées de cellules souches pour les applications thérapeutiques liées aux maladies cardiaques est l'élimination de l'arythmie induite lors de la greffe (Menasché, P. Cardiac cell therapy: Current status, challenges and perspectives. *Archives of Cardiovascular Diseases* 113, 285–292 (2020) ; Kadota, S., Tanaka, Y. & Shiba, Y. Heart regeneration using pluripotent stem cells. *Journal of Cardiology* (2020) doi:10.1016/j.jjcc.2020.03.013 ; Chen, K., Huang, Y., Singh, R. & Wang, Z. Z. Arrhythmogenic risks of stem cell replacement therapy for cardiovascular diseases. *Journal of Cellular Physiology* (2020) doi:10.1002/jcp.29554). Bien que généralement transitoires, des arythmies ont été observées à la fois chez des porcins (Romagnuolo, R. *et al.* Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports* 12, 967–981 (2019)) et des primates non humains (Ichimura, H. *et al.* Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538, 388–391 (2016) ; Liu, Y.-W. *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nature biotechnology* 36, 597–605 (2018) ; Chong, J. J. H. *et al.* Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510, 273–277 (2014)), grands modèles animaux de régénération après un infarctus du myocarde.

Il existe donc un besoin important pour une solution permettant la production à grande échelle de cardiomyocytes de qualité, pour répondre à une demande indispensable de

thérapie cellulaire cardiaque, mais aussi en recherche et développement de molécules-médicament pour juger de leur efficacité et de leur toxicité en phases précliniques, avant d'exposer des patients à ces traitements.

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, les inventeurs ont mis au point un tissu cardiaque particulier.

L'invention a pour objet spécifique un tissu compacté de cellules humaines cardiaques exprimant la troponine C cardiaque (c'est-à-dire des cellules humaines exprimant le gène de la troponine C cardiaque, l'alias du gène correspondant étant TNNC1), contractile et présentant une fréquence de contraction spontanée inférieure à 4 Hz.

L'invention a aussi pour objet un tissu compacté de cellules humaines cardiaques contractile exprimant la troponine C cardiaque (c'est-à-dire des cellules humaines exprimant le gène de la troponine C cardiaque, l'alias du gène correspondant étant TNNC1).

Préférentiellement le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention présente un taux de cellules exprimant la troponine C cardiaque d'au moins 50% en nombre par rapport au nombre total de cellules constituant le tissu compacté, encore plus préférentiellement d'au moins 60%, d'au moins 70%, d'au moins 75%, d'au moins 80%, et ce taux peut être supérieur à 90%. Préférentiellement, le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention présente un taux de cellules exprimant l'alpha-actinine d'au moins 50% en nombre par rapport au nombre total de cellules constituant le tissu compacté, encore plus préférentiellement d'au moins 60%, d'au moins 70%, d'au moins 75%, d'au moins 80%, et ce taux peut être supérieur à 90%. Préférentiellement, le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention présente un taux de cellules exprimant la troponine C et l'alpha-actinine d'au moins 50% en nombre par rapport au nombre total de cellules constituant le tissu compacté, encore plus préférentiellement d'au moins 60%, d'au moins 70%, d'au moins 75%, d'au moins 80%, et ce taux peut être supérieur à 90%.

Dans l'art antérieur il a été décrit dans *Jing Donghui et al. « Cardiac cell generation from encapsulated embryonic stem cells in static and scalable culture systems », Cell Transplantation, col. 19, no 11, 1 novembre 2010, pages 1397-1492*, des tissus cardiaques

obtenus par l'encapsulation d'ESC de souris ou humaines dans des billes d'alginate enduites de poly-lysine, puis dissolution du noyau par incubation dans une solution de citrate de sodium. Cette solution, démontrée à partir de cellules souches embryonnaires, n'est pas satisfaisante, la pureté du tissu obtenu, et en particulier le taux de cellules exprimant la troponine C cardiaque est inférieur à 20% ce qui n'est pas suffisant pour envisager une utilisation en thérapie. Or avec un trop grand nombre d'impuretés cellulaires dans les tissus, ceux-ci présentent un risque pour le patient en introduisant des cellules non désirées dans le muscle cardiaque, au risque de perturber son bon fonctionnement, notamment en perturbant sa conductivité électrique et/ou sa capacité de contraction. De plus, l'utilisation de poly-lysine aux concentrations décrites dans cet article présente un risque de toxicité pour les cellules.

De même dans Koivisto Janne T. et al. « Mechanically Biomimetic Gelatin-Gellan Gum Hydrogels for 3D Culture of Beating Human Cardiocytes », Applied Materials & Interfaces, vol. 11, n°23, 12 juin 2019, pages 20589-20602, il est décrit l'encapsulation de cellules au sein d'un hydrogel sans espace disponible pour l'organisation des cellules, a fortiori après prolifération cellulaire qui mécaniquement met sous pression l'hydrogel. Il n'y a pas d'encapsulation dans des microcompartiments et cela ne conduit pas à une fréquence contractile adaptée, ni à un taux de cellules exprimant la troponine C cardiaque suffisant pour une utilisation en thérapie.

Les tissus cardiaques selon l'invention, obtenu par un procédé spécifique et différent de ceux de l'art antérieur, permet d'obtenir des tissus cardiaques avec un taux de cellules exprimant la troponine C cardiaque et/ou l'alpha-actinine d'au moins 50%, et préférentiellement d'au moins 75%. En effet, la configuration selon l'invention en cours de différenciation permet la transmission de signaux auto/paracrine au sein d'un lumen protégé ce qui permet aux cellules de s'autoorganiser d'une façon biomimétique de la structuration in vivo. Cette structuration est extrêmement fragile et nécessite à la fois une protection mécanique et de la place disponible contrairement à ce qui est décrit dans *Koivisto Janne T. et al*. Selon l'invention, cette configuration ne peut pas se mettre en place ni en système confiné, ni en système non-protégé. En effet la différenciation cardiaque est notoirement peu reproductible in vitro en systèmes classiques (3D comme 2D, comme démontré notamment dans https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213671118301504) ce qui traduit une maitrise incomplète de l'environnement cellulaire. De façon non évidente et surprenant, l'invention propose une structuration maîtrisée de l'environnement sous forme d'une auto-

organisation protégée, qui permet une moins grande sensibilité aux petites variations du système de culture et donc une plus grande reproductibilité.

Avantageusement ces tissus cardiaques, utilisés en tant que tels ou après dissociation en cellules, sont adaptés à des utilisations en thérapie cellulaire. En particulier ces tissus peuvent être utilisés pour régénérer des tissus cardiaques ischémiés.

Aussi, l'invention vise lesdits tissus, en tant que tels ou après dissociation en cellules, pour leur utilisation dans la prévention et/ou le traitement de pathologies, notamment de pathologies cardiaques.

Pour obtenir ce tissu compacté de cellules cardiaques humaines, selon un mode de réalisation, il est possible de passer par un intermédiaire développemental clé à savoir un microcompartiment cellulaire en trois dimensions (3D) comprenant successivement, organisées autour d'au moins une lumière :

- au moins une couche interne de cellules humaines en cours de différenciation cellulaire en cellules cardiaques, exprimant au moins un gène choisi parmi PDGFRα, MESP-1, NKX2-5, GATA4, MEF2C, TBX20, ISL1 et TBX5, ladite couche interne ayant une épaisseur variable ;

- au moins une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique, et

- au moins une couche externe en hydrogel.

Un tel microcompartiment comprend donc des cellules en cours de différenciation cellulaire, l'expression des gènes PDGFRa / MESP1 / NKX2-5 / GATA4 / MEF2C / TBX20 / ISL1 / TBX5 étant associée à des stades intermédiaires de la différenciation cardiaque. Cette configuration (une ou plusieurs lumières autour desquelles sont organisées successivement une couche de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque avec des caractéristiques d'épaisseurs spécifiques, une couche de solution aqueuse isotonique et au moins une couche en hydrogel) est inédite. En effet, il existe plusieurs protocoles connus pour différencier les hPSC en cardiomyocytes qui reposent partiellement ou totalement sur la modulation de la voie WNT (Wingless et Int-1) (Dunn, K. K. & Palecek, S. P. Engineering scalable manufacturing of high-quality stem cell-derived cardiomyocytes for cardiac tissue repair. *Front. Med.* 5, (2018)). Au cours de la différenciation cardiaque dirigée de hPSC, les cellules subissent des changements morphologiques lors de leur transition vers le mésoderme, le mésoderme cardiaque, les progéniteurs cardiaques et finalement vers les myocytes cardiaques. En culture 2D d'hPSC,

ces changements sont connus pour être associés à des morphologies distinctes (Palpant, N. J. *et al.* Generating high-purity cardiac and endothelial derivatives from patterned mesoderm using human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 12, 15–31 (2017)). Ces changements morphologiques n'ont pas été bien décrits dans un système de culture 3D et la topologie de l'objet de l'invention n'a jamais été obtenue et décrite. Or, de façon avantageuse, elle permet d'obtenir ensuite des tissus compactés en grand nombre et présentant des caractéristiques permettant leur utilisation pour régénérer des tissus cardiaques endommagés.

La présence d'une couche externe d'hydrogel et d'une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique permet une distribution uniforme des cellules entre les microcompartiments. Ainsi, l'homogénéité entre les microcompartiments est grandement améliorée par l'encapsulation préalable des hPSC permettant un rendement et une qualité accrue par rapport aux méthodes existantes. Par ailleurs cette couche d'hydrogel permet d'éviter les fusions de microcompartiments qui sont une source majeure de variabilité défavorable pour l'homogénéité phénotypique et la survie des cellules cardiaques produites en bioréacteur.

De plus, la modulation de la voie WNT utilisée dans la différenciation cardiaque est associée à la dégradation de la β-caténine (Lam, A. T. L. *et al.* Conjoint propagation and differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes in a defined microcarrier spinner culture. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 1–15 (2014)), une molécule qui joue un rôle dans les complexes d'adhérence cellule-cellule (Brembeck, F. H., Rosário, M. & Birchmeier, W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β-catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 51–59 (2006)). Avantageusement, la topologie du microcompartiment permet de protéger les cellules en cours de différenciation cardiaque et ce malgré la fragilité de l'adhérence cellule-cellule induite par la modulation de la voie WNT.

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 schématique d'une vue en coupe d'un tissu compacté cardiaque 22 selon l'invention, correspondant à la photo représentée sur la figure 1b, avec une couche externe d'hydrogel 12, une couche de solution aqueuse isotonique 14, un tissu

compacté de cellules cardiaques différenciées 20.

La Figure 1b est une image de microscopie à contraste de phase d'un tissu compacté selon l'invention dans un microcompartiment, prise à un grossissement 4x qui correspond au diagramme schématique de la Figure 1a.

La Figure 1c sont des images de microscopie à contraste de phase prises à un grossissement 4x de tissus compactés selon l'invention dans des microcompartiments.

La Figure 2a est une représentation schématique d'une vue en coupe d'un microcompartiment cellulaire 10, correspondant à la photo représentée sur la Figure 2b, avec une couche externe d'hydrogel 12, une couche de solution aqueuse isotonique 14, une couche de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque 16 avec une plus grande épaisseur t2 et une plus petite épaisseur t1, et une lumière interne 18.

La Figure 2b est une image de microscopie à contraste de phase d'un microcompartiment prise à un grossissement 4x qui correspond au diagramme schématique de la Figure 2a.

La Figure 3a est une représentation schématique d'une vue en coupe d'un microcompartiment cellulaire 10, correspondant à la photo représentée sur la Figure 3b, avec une couche externe d'hydrogel 12, une couche de solution aqueuse isotonique 14, une couche de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque 16 avec une plus grande épaisseur t2 et une plus petite épaisseur t1, et deux lumières internes 18-1 et 18-2, S1 représentant l'épaisseur de la couche de de solution aqueuse isotonique 14.

La Figure 3b est une image de microscopie à contraste de phase d'un microcompartiment prise à un grossissement 4x qui correspond au diagramme schématique de la Figure 3a.

La Figure 3c est une image de microscopie à contraste de phase de plusieurs microcompartiments, prise à un grossissement 4x, chaque microcompartiment avec différentes morphologies.

La Figure 4a est une représentation schématique d'une vue en coupe d'un microcompartiment cellulaire 10, correspondant à la photographie représentée sur la figure 4b, avec une couche externe d'hydrogel 12, une couche de solution aqueuse isotonique 14, une couche de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque 16 avec une plus grande épaisseur t2 et une plus petite épaisseur t1, et deux lumières internes 18-1 et 18-1, s1

représentant l'épaisseur de la couche de de solution aqueuse isotonique 14.

La Figure 4b est une image de microscopie à contraste de phase d'un microcompartiment prise à un grossissement 4x qui correspond au diagramme schématique de la Figure. 4a.

La Figure 5 comprend :

- un graphique qui représente la fréquence de battement de tissus et/ou cellules obtenue à partir d'une série d'images de microscopie à contraste de phase (à une fréquence d'au moins 30 images par seconde) sur un microscope de table standard avec un grossissement 4x, et

- des images de microscopie à contraste de phase prises à un grossissement 4x montrant les cellules souches encapsulées ou libres au début de la différenciation (les plus externes), et les tissus compactés selon l'invention environ 2 semaines après le début de la différenciation (A1 : Agrégats de cellules souches sans capsule ; A2 : Tissus cardiaques compactés dérivés de ces agrégats ; B1 : Tissus cardiaques compactés dans des capsules ; B2 : microcompartiments contenant des cellules cardiaques en cours de différenciation ; B3 : cellules souches encapsulées).

La Figure 6 est comprend :

- un graphique qui représente la fréquence de battement de tissus et/ou cellules obtenue à partir d'une série d'images de microscopie à contraste de phase (à une fréquence d'au moins 30 images par seconde) sur un microscope de table standard avec un grossissement 4x, et

- des images de microscopie à contraste de phase prises à un grossissement 4x. L'image de gauche montre les tissus cardiaques compactés différenciés dans la capsule à partir d'hiPSC encapsulées. L'image de droite montre les cellules obtenues par dissociation de tissus cardiaques compactés selon l'invention.

- la Figure 7 comprend des images de microscopie à contraste de phase prise grossissement 4x. Les trois images de la ligne du haut (a, b et c) sont des images de cellules encapsulées. Les trois images de la ligne du base (d, e et f) sont des images de cellules non encapsulées. Les images de la colonne de gauche (a et d) représentent des cellules souches induites en début de différenciation en cellules cardiaques. Les images de la colonne du milieu (b et e) représentent des cellules humaines en cours de différenciation cellulaire en cellules cardiaques, 3 à 7 jours après l'initiation de la différenciation. Les images de la colonne de

droite (c et f) représentent des tissus cardiaques différenciés.

- La Figure 8 est un graphique qui représente le pourcentage de cellules dans les tissus (obtenus tels qu'à la Figure 7c et 7f) exprimant la troponine C cardiaque : à gauche tissus selon l'invention encapsulés (image 7c), à droite tissus non encapsulés (image 7f).

- La Figure 9 est un graphique qui représente le taux d'amplification cellulaire entre le début de la différenciation (obtenus tels qu'à la Figure 7a et 7d) dans les tissus : à gauche selon l'invention encapsulés, à droite non encapsulés.

Description détaillée de l'invention

Définitions

Par « alginate » au sens de l'invention, on entend des polysaccharides linéaires formés à partir de β-D-mannuronate et α-L-guluronate, des sels et des dérivés de ceux-ci.

Par « capsule 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.

Par cellule « exprimant un gène » au sens de l'invention, on entend une cellule qui contient au moins 5 fois plus de copies de l'ARN transcrit à partir de la séquence d'ADN du gène concerné en comparaison d'une cellule pluripotente, préférentiellement 10 fois plus de copies, préférentiellement 20 fois plus de copies, préférentiellement 100 fois plus de copies.

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.

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

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 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). Eventuellement les cellules souches embryonnaires d'êtres humains peuvent être exclues.

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 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 demaine. 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 »).

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, 207, 131(5) : 861-872) et Nakagawa et al (Nat Biotechnol, 2008, 26(1) : 101-106).

Par « cellules cardiaques différenciées » au sens de l'invention on entend des cellules qui présentent le phénotype d'un cardiomyocyte, c'est-à-dire exprimant des marqueurs spécifiques tels que TNNC1 (gène de la troponine C cardiaque) et ACTN2 (gène de l'alpha actinine) et capables de se contracter spontanément en réponse à un signal calcique intracellulaire de façon spontanée (dans le cas de cellules cardiaques immatures) ou suite à une stimulation électrique ou chimique capable de déclencher ledit signal calcique.

Par cellules « différenciées » au sens de l'invention on entend des cellules qui présentent un phénotype particulier, par opposition à des cellules souches pluripotentes qui ne sont pas différenciées.

Par « diamètre de Feret » d'un tissu cardiaque compacté selon l'invention ou d'un microcompartiment, on entend la distance « d » comprise entre deux tangentes audit tissu

compacté ou audit microcompartiment, ces deux tangentes étant parallèles, de telle sorte que l'ensemble de la projection dudit tissu compacté ou dudit microcompartiment soit compris entre ces deux tangentes parallèles.

Par « épaisseur variable » de la couche interne de cellules humaines en cours de différenciation cellulaire, on entend au sens de l'invention le fait que la couche interne dans un même microcompartiment, n'a pas la même épaisseur partout.

Par « implantation » ou « greffe » dans le cœur au sens de l'invention, on entend l'action de déposer au niveau du cœur à un endroit particulier au moins un tissu compacté selon l'invention. L'implantation peut être réalisée par tout moyen notamment par injection.

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

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

Par « plus grande dimension » d'un tissu cardiaque compacté selon l'invention ou d'un microcompartiment au sens de l'invention, on entend la valeur du plus grand diamètre de Feret dudit tissu compacté ou dudit microcompartiment.

Par « plus petite dimension » d'un tissu cardiaque compacté selon l'invention ou d'un microcompartiment au sens de l'invention, on entend la valeur du plus petit diamètre de Feret dudit tissu compacté ou dudit microcompartiment.

Par « tissu » ou « tissu biologique »au sens de l'invention, on entend le sens commun de tissu en biologie c'est-à-dire le niveau d'organisation intermédiaire entre la cellule et l'organe. Un tissu est un ensemble de cellules semblables et de même origine (le plus souvent issus d'un lignage cellulaire commun, bien qu'elles puissent trouver leur origine par association de lignages cellulaires distincts)., regroupées en amas, réseau ou faisceau (fibre). Un tissu forme un ensemble fonctionnel, c'est-à-dire que ses cellules concourent à une même fonction. Les tissus biologiques se régénèrent régulièrement et sont assemblés entre eux pour former des organes.

Par « tissu compacté » ou « tissu cardiaque compacté » ou « tissu compacté de cellules cardiaques » au sens de l'invention, on entend une unité de tissu comprenant au moins un

tissu cardiaque constitué au moins par des cellules cardiaques différenciées. Le tissu est au moins partiellement compacté c'est-à-dire qu'il est composé principalement de cellules, en particulier son volume est composé de plus de 50% de cellules, préférentiellement 75% de cellules, préférentiellement 90% de cellules. Le tissu peut être totalement compacté c'est à dire que les lumières ne sont plus détectables et/ou qu'il n'y a aucune lumière. Les tissus compactés selon l'invention peuvent être appelés des microtissus.

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.

Tissu cardiaque compacté en trois dimensions

L'invention a donc pour objet un tissu compacté de cellules humaines cardiaques exprimant la troponine C cardiaque (c'est-à-dire des cellules humaines exprimant le gène de la troponine C cardiaque, l'alias du gène correspondant étant TNNC1), et préférentiellement également l'alpha-actinine.

Le tissu selon l'invention est donc un tissu humain comprenant au moins des cellules cardiaques différenciées exprimant la troponine C cardiaque et préférentiellement l'alpha-actinine. Le tissu compacté selon l'invention peut également contenir d'autres types cellulaires.

Le tissu a préférentiellement été obtenu, à partir d'un tissu de cellules cardiaques et/ou de cellules en cours de différenciation cardiaque comportant au moins une lumière, par un procédé comprenant la compaction (compaction dite secondaire) dudit tissu par disparition totale ou partielle desdites lumières.

Ce tissu compacté est contractile et présente une fréquence de contraction spontanée inférieure à 4 Hz, préférentiellement inférieure à 2 Hz, encore plus préférentiellement inférieure à 1,7Hz, en particulier inférieure à 1 Hz, et notamment inférieure à 0,5Hz. Avantageusement elle peut être inférieure à 0,25 Hz. Cette fréquence de contraction du tissu est basse ce qui présente un grand avantage pour son implantation dans le cœur. En effet une telle fréquence permet d'éviter une arythmie au moment de la greffe du tissu compacté selon l'invention dans le cœur à traiter.

La fréquence cardiaque moyenne d'un adulte humain se situe entre 60 et 100 battements par

minute (1 à 1,7 Hz). La faible fréquence de contraction des tissus compactés cardiaques selon l'invention réduit le risque d'arythmie lors d'une greffe des tissus ou de cellules obtenues à partir de ces tissus. Selon un mode de réalisation, avec une fréquence de battement spontanée du tissu selon l'invention inférieure à la fréquence cardiaque du patient (receveur), ce risque d'arythmie est encore diminué.

La réduction de la fréquence des battements spontanés est associée à la maturité des cardiomyocytes dérivés de cellules souches humaines, l'environnement de culture 3D améliorant la maturation des cardiomyocytes. Selon l'invention l'encapsulation permet encore de réduire la fréquence contractile du tissu cardiaque compacté. La figure 5 montre que pour une population cellulaire de départ donnée, les cardiomyocytes différenciés au sein d'un microcompartiment / capsule (à partir de cellules souches pluripotentes humaines encapsulée) ont un rythme de battement spontané plus lent que les cardiomyocytes différenciés avec le même protocole (et du même lot initial de cellules souches pluripotentes humaines) mais en culture en suspension libre. Ainsi, la différenciation en cardiomyocytes à partir de cellules souches encapsulées diminue la fréquence contractile spontanée.

Les cellules souches pluripotentes humaines sécrètent des molécules de signalisation au cours du processus de différenciation cardiaque, qui génèrent un microenvironnement paracrine spécifique nécessaire au succès de la différenciation (Kempf, H. *et al.* Bulk cell density and Wnt/TGFbeta signalling regulate mesendodermal patterning of human pluripotent stem cells. *Nature Communications* 7, (2016)). La présence de la capsule aide à augmenter et à maintenir une concentration locale de ces facteurs paracrines, ce qui améliore le phénotype de différenciation, entraînant la réduction de la fréquence de battement spontané.

Cette fréquence de contraction du tissu est basse ce qui présente un grand avantage pour son implantation dans le cœur. En effet une telle fréquence permet d'éviter une arythmie au moment de la greffe du tissu compacté selon l'invention dans le cœur à traiter.

Le tissu compacté cardiaque selon l'invention peut rester contractile spontanément pendant plusieurs mois. Ainsi le produit est stable dans le temps.

Avantageusement, le tissu cardiaque selon l'invention présente un taux de cellules exprimant la troponine C cardiaque d'au moins 50% en nombre par rapport au nombre total de cellules constituant le tissu compacté, encore plus préférentiellement d'au moins 60%, d'au moins

70%, d'au moins 75%, d'au moins 80%, d'au moins 90%. Ce taux important de cellules exprimant la troponine C cardiaque est avantageux pour envisager des utilisations des tissus cardiaques selon l'invention en thérapie cellulaire.

Préférentiellement, le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention présente un taux de cellules exprimant l'alpha-actinine d'au moins 50% en nombre par rapport au nombre total de cellules constituant le tissu compacté, encore plus préférentiellement d'au moins 60%, d'au moins 70%, d'au moins 75%, d'au moins 80%, et ce taux peut être supérieur à 90%. Ce taux important de cellules exprimant l'alpha-actinine est avantageux pour envisager des utilisations des tissus cardiaques selon l'invention en thérapie cellulaire.

Préférentiellement, le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention présente un taux de cellules exprimant la troponine C et l'alpha-actinine d'au moins 50% en nombre par rapport au nombre total de cellules constituant le tissu compacté, encore plus préférentiellement d'au moins 60%, d'au moins 70%, d'au moins 75%, d'au moins 80%, et ce taux peut être supérieur à 90%. Ce taux important de cellules exprimant à la fois la troponine C et l'alpha-actinine est avantageux pour envisager des utilisations des tissus cardiaques selon l'invention en thérapie cellulaire.

Les figures 7, 8 et 9 montrent que pour une population cellulaire de départ donnée, les tissus obtenus au sein d'un microcompartiment / capsule en passant par une phase en cours de différenciation avec la présence d'au moins une lumière, puis une compaction secondaire, présente un taux de cellules exprimant la troponine C beaucoup plus important, en comparaison avec des tissus différenciés avec le même protocole (et du même lot initial de cellules souches pluripotentes humaines) mais en culture en suspension libre. Ainsi, la différenciation en cardiomyocytes dans des microcompartiment et/ou par un procédé comprenant une compaction secondaire permet d'augmenter la qualité des tissus cardiaques et donc améliore leur possibilité d'utilisation en thérapie cellulaire.

Le tissu compacté cardiaque selon l'invention peut être obtenu par tout procédé adapté. Selon un mode de réalisation, il peut être obtenu à partir d'au moins un microcompartiment cellulaire de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque, par un procédé comprenant la compaction de la couche de cellules humaines par disparition totale ou partielle de la ou des lumière(s) dudit microcompartiment. Préférentiellement, le tissu

compacté de cellules humaines cardiaques est obtenu par un procédé tel que décrit précédemment.

Le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention peut être encapsulé totalement ou partiellement dans une couche externe d'hydrogel. La capsule d'hydrogel peut être celle d'origine du microcompartiment de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque, ou il peut s'agir d'une nouvelle couche d'hydrogel s'il y a eu élimination de la couche d'hydrogel initiale, puis réencapsulation à tout stade du procédé.

L'encapsulation du tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention permet de protéger le tissu, de maintenir la fréquence de contraction spontanée inférieure à 4Hz, préférentiellement inférieure à 2 Hz, encore plus préférentiellement inférieure à 1 Hz, et notamment inférieure à 0,5 Hz et pouvant être inférieure à 0,25 Hz. Le mécanisme selon lequel la fréquence de contraction est limité peut être lié à la structuration en 3D via i) la mise en continuité électrique des cytoplasmes des cellules cardiaques, ii) et/ou la limitation de la quantité de calcium disponible par cellules dans l'espace intercellulaire des tissus compactés iii) et/ou la résistance mécanique liées à la continuité mécanique des éléments de cytosquelette des cellules cardiaques. L'encapsulation du tissu compacté cardiaque selon l'invention permet également de contrôler la taille du tissu compacté ce qui améliore la rétention, l'intégration et la survie cellulaire lorsqu'il est injecté dans le cœur, notamment en comparaison aux injections de cellules uniques, ce qui augmente l'efficacité de la thérapie cellulaire cardiaque avec les tissus compactés selon l'invention.

Selon un mode de réalisation, le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention n'est pas encapsulé dans une couche externe en hydrogel. En particulier La capsule est préférentiellement éliminée avant utilisation afin de permettre aux cellules du tissu compacté de s'implanter au niveau du cœur après une greffe. Préférentiellement l'hydrogel utilisé est biocompatible, c'est-à-dire qu'il n'est pas toxique pour les cellules. 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-guluronate 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 est close ou partiellement close.

Le tissu compacté de cellules cardiaques humaines selon l'invention est préférentiellement entouré totalement ou partiellement d'une couche de solution aqueuse isotonique. Cette couche de solution aqueuse isotonique est située entre le tissu compacté de cellules cardiaques humaines et la couche d'hydrogel lorsque le tissu compacté cardiaque est encapsulé. La couche de solution aqueuse isotonique contient préférentiellement des séquences peptidiques ou peptidomimétiques capables de se lier aux intégrines. Par solution aqueuse isotonique on entend une solution aqueuse présentant une osmolarité comprise entre 200 et 400 mOsm/L. Cette solution aqueuse isotonique contient préférentiellement des séquences peptidiques ou peptidomimétiques capables de se lier aux intégrines. Il peut s'agir notamment d'une matrice extracellulaire ou d'un milieu de culture. S'il s'agit de matrice extracellulaire, elle peut être constituée par de la matrice extracellulaire sécrétée par des cellules de la couche interne et/ou par de la matrice extracellulaire ajoutée. La couche intermédiaire peut former un gel. Elle comprend préférentiellement un mélange de protéines et de composés extracellulaires nécessaires à la culture des cellules en cours de différenciation cardiaque. Préférentiellement, la solution aqueuse comprend des protéines structurelles, telles que du collagène, des laminines, de l'entactine, de la vitronectine, ainsi que des facteurs de croissance, tels que du TGF-béta et/ou de l'EGF. Selon une variante, la couche intermédiaire peut consister en ou comprendre 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(ethylene glycol) (PNIPAAm-PEG) type Mebiol®.

Au niveau de la surface du tissu compacté en contact avec la solution aqueuse isotonique, la matrice extracellulaire peut éventuellement contenir une ou plusieurs cellules.

L'épaisseur de la couche de solution aqueuse isotonique autour du tissu compacté selon l'invention est préférentiellement comprise entre 30 nm et 300 µm, encore plus préférentiellement entre 30 nm et 50 µm.

Le tissu compacté cardiaque selon l'invention est en trois dimensions. Il a préférentiellement une forme sphérique ou allongée. Selon un mode de réalisation préféré, le tissu compacté de cellules humaines cardiaques a la forme d'un sphéroïde, d'un ovoïde, d'un cylindre ou d'une sphère.

Un exemple de tissu compacté selon l'invention est représenté sur les figures 1. Dans cet exemple le tissu compacté selon l'invention est entouré d'une couche de solution aqueuse isotonique et d'une couche externe d'hydrogel.

De façon préférée, il présente un diamètre ou une plus petite dimension comprise entre 10 µm et 1 mm, préférentiellement comprise entre 100 µm et 700 µm. Cette plus petite dimension est importante pour sa survie, en particulier pour favoriser la survie des cellules cardiaques au sein du tissu cardiaque et optimiser la réorganisation ainsi que la vascularisation du tissu cardiaque après implantation dans le cœur.

Sa plus grande dimension est préférentiellement supérieure à 10µm, plus préférentiellement comprise entre 10µm et 1m, encore plus préférentiellement entre 10µm et 50cm. Selon un mode de réalisation la plus grande dimension est compatible avec la taille de l'organe et est donc inférieure à 30 cm (entre 10µm et 30cm).

L'encapsulation d'un nombre contrôlé de cellules souches et/ou la ré-encapsulation, permet de contrôler la taille et la forme désirée des tissus cardiaques obtenus. Ainsi, la taille des tissus cardiaques selon l'invention peut varier en fonction de l'utilisation thérapeutique envisagée.

Le tissu compacté de cellules cardiaques humaines selon l'invention peut être congelé, pour favoriser son stockage.

Avantageusement, l'invention permet la production d'un nombre important de tissus cardiaques humains de qualité en protégeant les unités tissulaires tout au long de leur production par différenciation de cellules pluripotentes en cellules cardiaques.

Le tissu compacté de cellules cardiaques selon l'invention peut être dissocié en cellules. La dissociation peut être réalisée selon des méthodes classiques connues de l'homme du métier notamment à l'aide d'une solution enzymatique permettant de séparer les cellules. Les enzymes utilisées peuvent par exemple être choisies parmi la trypsine, la collagénase, l'accutase et leurs mélanges. Les cellules dissociées sont préférentiellement utilisées en suspension ou intégrées dans un gel comme par exemple un gel de collagène dans un patch

Procédé d'obtention d'un tissu cardiaque compacté

Le tissu cardiaque selon l'invention peut être obtenu par tout procédé adapté.

Selon un mode de réalisation particulier, le tissu compacté cardiaque selon l'invention est

obtenu à partir d'un microcompartiment de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque.

Il peut s'agir notamment d'un microcompartiment cellulaire comprenant successivement, organisées autour d'au moins une lumière :

- au moins une couche interne de cellules humaines en cours de différenciation cellulaire en cellules cardiaques, exprimant au moins un gène choisi parmi PDGFRα, MESP-1, NKX2-5, GATA4, MEF2C, TBX20, ISL1 et TBX5, (dite « couche interne »),

- au moins une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique (dites « couche intermédiaire »), et

- au moins une couche externe en hydrogel (dite « couche externe »).

Le microcompartiment est une structure tridimensionnelle comprenant donc au moins une couche interne de cellules. Ces cellules sont des cellules humaines, vivantes, en cours de différenciation cellulaire en cellules cardiaques. Cette couche de cellules est organisée en trois dimensions dans le microcompartiment.

Les cellules humaines en cours de différenciation cardiaques présentes dans le microcompartiment sont des cellules exprimant au moins un gène choisi parmi PDGFRα, MESP-1, NKX2-5, GATA4, MEF2C, TBX20, ISL1 et TBX5. Ces gènes sont spécifiques des cellules cardiaques en cours de différenciation. Préférentiellement les cellules humaines en cours de différenciation cardiaques présentes dans le microcompartiment expriment au moins deux de ces gènes. Selon une variante, les cellules humaines en cours de différenciation cardiaques présentes dans le microcompartiment expriment tous ces gènes.

La couche interne de cellules humaines en cours de différenciation cellulaire en cellules cardiaques, a une épaisseur variable. Au sein du microcompartiment, la couche interne de cellules humaines et la ou les lumière(s) forment ensemble un objet cellulaire en trois dimensions. Si on mesure la plus petite et la plus grande épaisseur de la couche interne de cellules le long d'un segment passant par le centre géométrique de cet objet cellulaire, le ratio entre la plus grande épaisseur et la plus petite épaisseur est supérieur ou égale à 2. Les épaisseurs de couche interne sont mesurées le long du segment passant par le centre géométrique de l'objet cellulaire :

- a. entre :

* l'interface de la couche interne et de la couche intermédiaire, et

* l'interface de la couche interne et d'une lumière,

et/ou

- b. entre :

* l'interface de la couche interne et d'une lumière, et

* l'interface de la couche interne et d'une autre lumière.

Les figures 2, 3 et 4 représentent des exemples de tels microcompartiments cellulaires 10, avec une couche externe d'hydrogel 12, une couche de solution aqueuse isotonique 14, une ou plusieurs lumière(s) interne(s) 18, 18-1, 18-2, une couche de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque 16 avec une plus grande épaisseur t2 et une plus petite épaisseur t1 (les épaisseurs étant mesurées le long d'un segment 22 passant par le centre géométrique de cet objet cellulaire formé par la couche 16 et la ou les lumières 18, 18-1, 18-2) , le ratio t2/t1 étant bien supérieur à 2.

Sur la figure 2, il n'y a qu'une lumière 18 et par conséquent les épaisseurs de couche interne sont mesurées le long d'un segment 22 passant par le centre géométrique de l'objet cellulaire formé par la couche 16 et la lumière 18, entre l'interface de la couche interne et de la couche intermédiaire et l'interface de la couche interne et de la lumière 18.

Sur les figures 3 et 4, il y a deux lumières 18-1 et 18-2 et par conséquent les épaisseurs de couche interne sont mesurées le long d'un segment 22 passant par le centre géométrique de l'objet cellulaire formé par la couche 16 et les lumières 181- 18-2 :

- entre l'interface de la couche interne et de la couche intermédiaire et l'interface de la couche interne et de la lumière 18-1, et

- entre l'interface de la couche interne et de la couche intermédiaire et l'interface de la couche interne et de la lumière 18-2, et

- entre l'interface de la couche interne et de la lumière 18-1 et l'interface de la couche interne et de la lumière 18-2.

Le nombre de cellules humaines en cours de différenciation cellulaire en cellules cardiaques

de la couche interne est préférentiellement compris entre 1 et 100 000 cellules, encore plus préférentiellement entre 50 et 50 000 cellules, et notamment entre 500 et 25 000 cellules.

Les cellules humaines en cours de différenciation cellulaire en cellules cardiaques de la couche interne ont préférentiellement été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes, en particulier de cellules souches pluripotentes humaines, ou éventuellement à partir de cellules humaines non pluripotentes dont le profil transcriptionnel a été modifié artificiellement pour rejoindre celui de progéniteurs cardiaques ou de cellules cardiaques, typiquement par expression forcée de facteurs de transcriptions spécifiques du phénotype cellulaire cible. Préférentiellement, les cellules humaines de la couche interne ont été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes humaines après mise en contact avec une solution capable d'initier la différenciation desdites cellules souches.

La couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique contient préférentiellement des séquences peptidiques ou peptidomimétiques capables de se lier aux intégrines. Par solution aqueuse isotonique on entend une solution aqueuse présentant une osmolarité comprise entre 200 et 400 mOsm/L. Cette couche est située entre la couche interne de cellules et la couche externe en hydrogel.

La couche intermédiaire peut être constituée d'éléments qui ont été ajoutés lors de la fabrication du microcompartiment et/ou d'éléments ajoutés dans le microcompartiment et/ou d'éléments sécrétés ou induits par les autres constituants du microcompartiment.

La couche intermédiaire peut notamment comprendre ou être constituée par une matrice extracellulaire et/ou un milieu de culture. Si elle comprend de la matrice extracellulaire, il peut s'agir de matrice extracellulaire sécrétée par des cellules de la couche interne et/ou par de la matrice extracellulaire ajoutée au moment de la préparation/fabrication du microcompartiment.

La couche intermédiaire comprend préférentiellement un mélange de protéines et de composés extracellulaires nécessaires à la culture des cellules en cours de différenciation cardiaque. Préférentiellement, la couche intermédiaire comprend des protéines structurelles, telles que du collagène, des laminines, de l'entactine, de la vitronectine, ainsi que des facteurs de croissance, tels que du TGF-béta et/ou de l'EGF. Selon une variante, la couche intermédiaire peut consister en ou comprendre 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(ethylene glycol) (PNIPAAm-PEG) type Mebiol®.

Selon une variante, la couche intermédiaire peut former un gel.

Au niveau de la surface de la couche intermédiaire en contact avec la couche interne de cellules humaines en cours de différenciation, la matrice extracellulaire peut éventuellement contenir une ou plusieurs cellules.

L'épaisseur de la couche intermédiaire dans les microcompartiments (représentée S1 sur les figures 2 et 3) est préférentiellement comprise entre 30 nm et 300 µm, encore plus préférentiellement entre 30 nm et 50 µm.

La présence de la couche intermédiaire favorise la structuration selon l'invention des éléments dans le microcompartiment.

Le microcompartiment et la couche interne de cellules en cours de différenciation cardiaque au sein du microcompartiment sont creux. Le microcompartiment comprend en effet toujours au moins une lumière interne ou lumen qui constitue la partie creuse du microcompartiment. La lumière contient un liquide, notamment un milieu de culture (tel que par exemple qu'un milieu basal RPMI avec un supplément en B27) et/ou un liquide sécrété par les cellules de la couche interne. Avantageusement la présence de cette partie creuse permet aux cellules de disposer d'un petit volume diffusif dont elles peuvent contrôler la composition, favorisant une communication cellulaire dite autocrine/paracrine qui est à son tour favorable à la différenciation cardiaque.

Selon un mode de réalisation, tel que représenté sur les figures 3 et 4, le microcompartiment peut comprendre plusieurs lumières, au moins deux lumières. Cette situation présente le même avantage vis-à-vis des signaux autocrine et paracrine que la présence d'une seule lumière et augmente la capacité des cellules de contrôler la composition de la solution aqueuse de la lumière car le ratio cellule par volume/cellules est alors géométriquement plus faible. Par ailleurs la stabilisation d'une telle configuration démontre la protection mécanique offerte par le microcompartiment.

La ou les lumière(s) représente(nt) préférentiellement entre 10% et 90% du volume du microcompartiment.

Le microcompartiment 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 d'hydrogel doit permettre la diffusion d'oxygène et de nutriment pour alimenter les cellules contenues dans le microcompartiment et permettre leur 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-guluronate 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 d'hydrogel permet de protéger les cellules du milieu extérieur, de limiter la prolifération incontrôlée des cellules, et leur différenciation contrôlée en cellules en cours de différenciation cardiaques puis en cellules cardiaques, au moins en cardiomyocytes.

La couche externe est close ou partiellement close. Le microcompartiment est donc clos ou partiellement clos. Préférentiellement le microcompartiment est clos.

Le microcompartiment 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. Préférentiellement le microcompartiment se présente sous une forme sphérique ou allongée. Il peut en particulier se présenter sous la forme d'un sphéroïde creux, d'un ovoïde creux, d'un cylindre creux ou d'une sphère creuse.

C'est la couche externe du microcompartiment, c'est-à-dire la couche d'hydrogel, qui confère sa taille et sa forme au microcompartiment. Préférentiellement le diamètre la plus petite dimension du microcompartiment est comprise entre 10 µm et 1 mm, préférentiellement entre 100 µm et 700 µm. Elle peut être comprise entre 10 µm et 600 µm, notamment entre 10µm et 500 µm. Cette plus petite dimension est importante pour la survie du tissu cardiaque en trois dimensions qui sera obtenu à partir du microcompartiment, en particulier pour favoriser la survie des cellules cardiaques au sein du tissu cardiaque et optimiser la réorganisation ainsi que la vascularisation du tissu cardiaque après implantation dans le cœur.

Sa plus grande dimension est préférentiellement supérieure à 10µm, plus préférentiellement comprise entre 10µm et 1m, encore plus préférentiellement entre 10µm et 50cm. Selon un mode de réalisation la plus grande dimension est compatible avec la taille de l'organe et est donc inférieure à 30 cm (entre 10µm et 30cm).

Le microcompartiment est particulièrement utile pour obtenir un tissu cardiaque compacté

en trois dimensions, constitué de cellules cardiaques humaines différenciées.

Le microcompartiment peut être éventuellement congelé pour être stocké. Il devra ensuite être décongelé pour poursuivre la maturation des cellules cardiaques et obtenir un tissu cardiaque compacté selon l'invention.

Les microcompartiments sont préférentiellement utilisés en série (au moins deux microcompartiments) dans un milieu de culture, en particulier dans un milieu de culture au moins partiellement convectif. Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, les tissus compactés cardiaques objets de l'invention sont obtenus à partir d'une série de microcompartiments cellulaires tels que décrits précédemment dans une enceinte close, telle qu'un bioréacteur, préférentiellement dans un milieu de culture dans une enceinte close, telle qu'un bioréacteur.

Les microcompartiments tels que décrits précédemment, pouvant être utilisés pour obtenir des tissus compactés cardiaques peuvent être obtenus notamment par un procédé tel que décrit en suivant. En tel procédé consiste à réaliser des microcompartiments cellulaires comprenant une capsule d'hydrogel entourant :

- des cellules souches ou des cellules progénitrices capables de se différencier en cellules cardiaques, au moins en cardiomyocytes, ou

- des cellules différenciées destinées à subir dans la capsule une reprogrammation dans la capsule de façon à ce qu'elles deviennent des cellules souches pluripotentes induites capables de se différencier en cellules cardiaques, au moins en cardiomyocytes.

Selon un mode de réalisation, le procédé de préparation d'un microcompartiment, peut comprendre au moins la mise en œuvre des étapes qui consistent à :

- produire un microcompartiment cellulaire comprenant, à l'intérieur d'une capsule en hydrogel :

* des éléments de solution aqueuse isotonique, préférentiellement de la matrice extracellulaire, sécrétés par les cellules ou apportés par l'opérateur, préférentiellement au moins une partie de la solution aqueuse isotonique étant apportée en plus de la matrice extracellulaire naturellement sécrétée par les cellules,

* des cellules aptes à se différencier en cellules cardiaques,

- induire la différenciation cellulaire au sein du microcompartiment cellulaire, de manière à obtenir au moins une couche creuse en trois dimensions de cellules humaines en cours de différenciation cellulaire en cellules cardiaques, exprimant au moins un gène choisi parmi PDGFRα, MESP-1, NKX2-5, GATA4, MEF2C, TBX20, ISL1 et TBX5, et éventuellement d'autres cellules.

Avantageusement, l'encapsulation totale ou partielle dans l'hydrogel et l'apport de matrice extracellulaire combinés, est un moyen adapté pour permettre la différenciation de cellules pluripotentes humaines vers le muscle cardiaque en cumulant plusieurs avantages, notamment :

i) favoriser une distribution homogène des cellules du lot au sein des microcompartiments,

ii) protection mécanique face aux stress hydrodynamique infligé par le bioréacteur et limitation des fusions non désirées de microcompartiments,

iii) organisation d'un microenvironnement conservant localement les éléments de matrice extracellulaire favorisant une bonne survie et une bonne organisation cellulaire,

iv) maintien d'un lumen favorisant les voies autocrines et paracrines pendant la différenciation.

Tout procédé de production de microcompartiments cellulaires contenant à l'intérieur d'une capsule d'hydrogel au moins des cellules humaines en cours de différenciation cardiaque et une solution aqueuse isotonique et éventuellement l'ajout d'autres cellules, par exemple de soutien peut être utilisé. Une méthode adaptée est notamment décrite dans la demande WO2018/096277. Préférentiellement l'encapsulation est réalisée par co-injection de trois solutions :

- une solution d'hydrogel,
- une solution intermédiaire isotonique telle que par exemple une solution de sorbitol,
- une solution comprenant les cellules à encapsuler, du milieu de culture et optionnellement mais préférentiellement de la matrice extracellulaire,

de manière concentrique via un injecteur microfluidique qui permet de former un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange des trois solutions, ledit jet se fractionnant en

gouttes, lesdites gouttes étant collectées dans un bain de calcium qui rigidifie la solution d'hydrogel pour former la couche externe de chaque microcompartiment, la partie interne de chaque goutte étant constituée par la solution comprenant les cellules encapsulées, du milieu de culture et la matrice extracellulaire.

Selon un mode de réalisation l'encapsulation est réalisée avec 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, trois solutions sont chargées sur trois pousse-seringues :

- une solution d'hydrogel, par exemple d'alginate,

- une solution intermédiaire isotonique telle que par exemple une solution de sorbitol,

- la solution issue de l'étape b) comprenant des iPSC, du milieu de culture et éventuellement mais préférentiellement de la matrice extracellulaire.

Les trois solutions sont co-injectées (injectées simultanément) de manière concentrique grâce 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 de la solution comprenant les cellules à encapsuler ; Ces gouttes sont collectées dans un bain de calcium qui rigidifie la solution d'alginate pour former la coque.

[0001] Pour améliorer la mono-dispersité des microcompartiments cellulaires, la solution d'hydrogel est chargée avec un courant continu. Un anneau à la masse est disposé après la pointe dans le plan perpendiculaire à l'axe du jet sortant de l'injecteur microfluidique (puce de coextrusion) pour générer le champ électrique.

Dans un mode de réalisation particulier, l'étape de production d'un microcompartiment cellulaire comprend les étapes consistant à :

- incuber des cellules souches pluripotentes dans un milieu de culture, préférentiellement un milieu de culture contenant les facteurs de croissance FGF2 et TGFβ ou des molécules reproduisant son action sur la cellule, un inhibiteur de la voie Rho kinase ou une molécule reproduisant son action sur la cellule, notamment en limitant la mort cellulaire.

- éventuellement mélanger les cellules souches pluripotentes avec une solution aqueuse

isotonique, préférentiellement une matrice extracellulaire,

- encapsuler le mélange dans une couche d'hydrogel.

Les cellules encapsulées pour la préparation de microcompartiments sont préférentiellement choisies parmi :

- des cellules aptes à se différencier au moins en cellules cardiaques, ces cellules étant :

* soit des cellules souches capables de se différencier en cellules cardiaques, au moins en cardiomyocytes, préférentiellement des cellules souches embryonnaires ou des cellules souches pluripotentes induites, très préférentiellement des cellules souches pluripotentes induites, et/ou,

* soit des cellules progénitrices capables, de se différencier en cellules cardiaques, au moins en cardiomyocytes,

- et/ou des cellules différenciées capables de subir une reprogrammation de façon à ce qu'elles deviennent des cellules souches pluripotentes induites capables de se différencier en cellules cardiaques, au moins en cardiomyocytes.

Les cellules encapsulées peuvent être immuno-compatibles avec la personne destinée à recevoir les cellules cardiaques différenciées obtenues à partir du microcompartiment, pour éviter tout risque de rejet. Dans un mode de réalisation, les cellules encapsulées ont été préalablement prélevées chez la personne dans laquelle les tissus cardiaques compactés selon l'invention seront implantés.

La différenciation en cellules en cours de différenciation cardiaque contenues dans le micrococompartiment, peut être réalisée par tout procédé adapté. Il peut notamment s'agir d'une méthode connue comme un des protocoles répertoriés dans (Dunn, KK & Palecek, SP Engineering fabrication évolutive de cardiomyocytes dérivés de cellules souches de haute qualité pour la réparation des tissus cardiaques. Front. Med. 5, (2018)).

Le protocole qui est actuellement l'un des plus courants est décrit en détail dans (Burridge, P. W. et al. Génération chimiquement définie de cardiomyocytes humains. Nat. Methods 11, 855–860 (2014)).

Dans un mode de réalisation particulier, l'étape d'induction de la différenciation cellulaire du procédé, comprend une étape consistant à introduire des capsules contenant des cellules

souches humaines aptes à être différenciées en cellules cardiaques humaines, dans un milieu de culture contenant un activateur de voie WNT (tel que CHIR99021) pendant 12 h à 72 h plus préférentiellement 12 à 48 heures.

En suivant, le procédé peut comprendre une étape qui consiste à incuber les microcompartiments dans un milieu de culture contenant un inhibiteur de la voie WNT. Préférentiellement, cette étape est réalisée entre 0 et trois jours après la fin de l'étape d'induction de la différenciation, préférentiellement entre 12 et 72 heures, notamment entre 24 et 48h. Selon un mode de réalisation préféré, cette étape consiste à incuber les capsules dans un milieu de culture contenant un inhibiteur de la voie WNT, préférentiellement pendant 12 heures à 48 heures, notamment entre 24 à 48h.

Un mode de réalisation particulier est le suivant :

(a) incuber des cellules souches pluripotentes humaines contenant des capsules dans un milieu de culture contenant un activateur de voie WNT pendant 12 h à 72 h;

(b) 0 à 48 heures après l'étape (a) incuber les capsules dans un milieu de culture contenant un inhibiteur de voie WNT pendant 24 heures à 48 heures;

Préférentiellement, le milieu de culture est RPMI avec supplément B27 sans insuline (pendant les 7 premiers jours de différenciation) et avec insuline (à partir du jour de différenciation 7).

Préférentiellement les microcompartiments contenant des cellules en cours de différenciation cardiaques, sont obtenus entre 2 à 7 jours après le début de l'induction de la différenciation, préférentiellement entre 3 et 7 jours après le début de l'induction de la différenciation, encore plus préférentiellement entre 4 et 6 jours après le début de la différenciation. Préférentiellement, le microcompartiment selon l'invention apparaît au moment de l'ajout de l'inhibiteur de la voie WNT ou après.

La lumière est générée au moment de la formation de la couche de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque en 3 dimensions, par les cellules qui se multiplient et se développent. La lumière peut contenir un liquide et en particulier le milieu de culture utilisé pour la mise en œuvre du procédé.

Selon un mode de réalisation, les cellules souches de départ s'organisent en une couche de cellules souches en trois dimensions autour d'une lumière dans le microcompartiment, puis

au cours de la différenciation cette lumière disparaît, et une seconde lumière apparaît pour former le microcompartiment.

Le procédé est préférentiellement mis en œuvre dans une enceinte close, telle qu'un bioréacteur, avec une série de microcompartiments, encore plus préférentiellement dans un milieu de culture adapté et au moins partiellement convectif.

Le procédé peut optionnellement également comprendre :

- une étape qui consiste à dissocier le microcompartiment ou la série de microcompartiments pour obtenir une suspension de cellules ou une suspension d'amas de cellules ; l'élimination de la capsule 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 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 des cellules ou amas de cellules dans une capsule d'hydrogel.

La réencapsulation est un moyen adapté pour :

i) optimiser la standardisation de la taille et l'homogénéité des tissus cardiaques compactés qui seront obtenus ensuite,

ii) permettre une augmentation de l'amplification cellulaire obtenue depuis l'étape pluripotente, et donc un rendement plus élevé.

À tout moment, le procédé 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, d'au moins un des gènes suivants PDGFRα, MESP-1, NKX2-5, GATA4, MEF2C, TBX20, ISL1 et TBX5.

Le procédé peut comprendre une étape de congélation des microcompartiments avant leur utilisation pour poursuivre une différenciation en cellules cardiaques différenciées et obtenir des tissus cardiaques compactés selon l'invention. La congélation est préférentiellement réalisée à une température comprise entre -190°C et -80°C. . La décongélation peut être

réalisée dans un bain d'eau tiède (37 degrés préférentiellement) pour que les cellules décongèlent assez rapidement. Les microcompartiments selon l'invention avant leur utilisation pour poursuivre une différenciation en cellules cardiaques différenciées et obtenir des tissus cardiaques compactés, peuvent être maintenus à plus de 4°C pendant une durée limitée avant leur utilisation, préférentiellement entre 4°C et 38°C.

Les microcompartiments peuvent également être utilisés pour poursuivre une différenciation en cellules cardiaques différenciées et obtenir des tissus cardiaques compactés selon l'invention, directement après mise en œuvre du procédé, sans stockage et sans congélation.

Selon une variante, la différenciation cardiaque au sein du microcompartiment est peut-être mise en œuvre et/ou combinée avec d'autres techniques, telles que la stimulation électrique et les interventions métaboliques ou hormonales. La combinaison avec de telles techniques peuvent permettre de réduire encore la fréquence des battements spontanés du tissu cardiaque compacté selon l'invention avant la greffe.

Après l'obtention d'un microcompartiment contenant des cellules humaines en cours différenciation tel que décrit précédemment, le procédé peut se poursuivre pour obtenir un objet en trois dimensions sous forme d'un tissu compacté cardiaque selon l'invention. Le tissu compacté cardiaque selon l'invention peut notamment être obtenu à partir d'au moins un microcompartiment cellulaire de cellules humaines en cours de différenciation cardiaque tel que précédemment décrit, par un procédé comprenant la compaction de la couche de cellules humaines par disparition totale ou partielle de la ou des lumière(s) dudit microcompartiment. Préférentiellement, le tissu compacté de cellules humaines cardiaques est obtenu par un procédé tel que décrit en suivant.

L'objet compacté apparaît généralement entre 2 et 10 jours après l'ajout de l'inhibiteur de la voie WNT, notamment entre 5 et 7 jours. En effet, l'ajout de l'inhibiteur est préliminaire à la compaction des cellules qui continuent de se différencier en cellules cardiaques.

Ainsi l'objet compacté apparaît généralement entre 7 et 14 jours après l'initiation de la différenciation.

A la fin de la compaction, tout ou partie des lumières ont disparu partiellement ou totalement (ont été éliminées partiellement ou totalement par le phénomène de compaction) et les cellules comprennent au moins en partie des cellules humaines cardiaques différenciées,

préférentiellement au moins des cardiomyocytes.

Le procédé peut comprendre une étape d'amplification des cellules cardiaques dans le microcompartiment, et optionnellement une ou plusieurs ré-encapsulation.

Le tissu cardiaque compacté selon l'invention obtenu peut être maintenu dans la capsule d'hydrogel. Préférentiellement elle est toujours entourée d'une solution aqueuse isotonique, préférentiellement une matrice extracellulaire. Une capsule contenant un tissu cardiaque compacté en trois dimensions selon l'invention et une couche de solution aqueuse isotonique est représenté sur les figures 1.

Le tissu compacté selon l'invention est préférentiellement stocké dans une capsule avant utilisation. Pour son stockage, la capsule contenant le tissu cardiaque compacté selon l'invention peut être congelée avant élimination de la couche d'hydrogel de la capsule. Le procédé peut ainsi comprendre une étape de congélation des capsules contenant les tissus cardiaques compactés selon l'invention avant leur utilisation. La congélation est préférentiellement réalisée à une température comprise entre -190°C et -80°C. Les capsules contenant les tissus cardiaques compactés selon l'invention avant leur utilisation comme greffon dans le cœur, peuvent être décongelées dans un bain d'eau tiède (37 degrés préférentiellement) pour que les cellules du tissu décongèlent assez rapidement. Les tissus cardiaques compactés selon l'invention, peuvent être maintenus à plus de 4°C pendant une durée limitée avant leur utilisation, préférentiellement entre 4°C et 38°C

Après obtention du tissu cardiaque compacté selon l'invention, à tout moment avant l'implantation dans le cœur, le procédé peut comprendre une étape consistant à vérifier le phénotype des cellules contenues dans la capsule. Cette vérification peut être réalisée en identifiant l'expression de la troponine C cardiaque par les cellules cardiaques formant le tissu compacté selon l'invention.

Préférentiellement, avant utilisation, la couche d'hydrogel de la capsule contenant le tissu cardiaque compacté selon l'invention est éliminée. L'élimination de la capsule 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 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'élimination de l'hydrogel est préférentiellement totale, le tissu cardiaque compacté selon l'invention est dépourvu d'hydrogel lorsqu'il est utilisé comme greffon, implanté dans un cœur.

Utilisations du tissu compacté de cellules cardiaques humaines selon l'invention

Le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention peut être utilisé en tant que tel ou bien pour produire une suspension de cellules cardiaques.

En effet, le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention est particulièrement utile pour la production d'une suspension de cellules (cellules greffons) implantables dans le cœur d'un être humain en particulier pour le traitement de pathologies cardiaques. La forme, la taille et la constitution du tissu compacté selon l'invention favorisent une différenciation homogène avec un rendement amélioré des cellules cardiaques au sein du tissu compacté selon l'invention, qui peut être secondairement dissocié avant implantation dans le cœur.

Le tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'invention est également particulièrement utile pour son utilisation en tant que tel comme greffon implantable dans le cœur d'un être humain en particulier pour le traitement de pathologies cardiaques. La forme, la taille et la constitution du tissu compacté selon l'invention permettent la survie des cellules cardiaques au sein du tissu compacté selon l'invention, avant implantation et la réussite de l'implantation, de la réorganisation et de la vascularisation du greffon une fois implanté dans le cœur.

Un autre objet de l'invention est donc le tissu compacté de cellules cardiaques humaines pour son utilisation, en tant que tel ou après dissociation sous forme d'une suspension de cellules, en thérapie, notamment en thérapie cellulaire, comme médicament, en particulier son utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'une pathologie cardiaque, notamment chez un patient en ayant besoin, et préférentiellement dans le traitement et/ou la prévention d'une maladie ischémique cardiaque.

Bien que les cellules dissociées obtenues à partir des tissus selon l'invention puissent être utilisées, elles présentent une fréquence de contraction spontanée plus élevée que les tissus cardiaques compactés. La vitesse de battement spontanée lente des cardiomyocytes différenciés au sein de la capsule n'est pas maintenue lorsque les cellules sont dissociées et

cultivées dans des conditions 2D (figure 6).

Par traitement on entend un traitement préventif, curatif ou symptomatique, c'est-à-dire tout acte destiné à améliorer la vue d'une personne de façon temporaire ou définitive, et préférentiellement également à éradiquer la maladie et/ou arrêter ou retarder la progression de la maladie et/ou favoriser la régression de la maladie.

En effet les tissus compactés de cellules humaines cardiaques selon l'invention peuvent être utilisés pour le traitement de maladies cardiaques chez l'homme, en particulier de maladies ayant entrainer une ischémie d'au moins une partie du cœur, comme un infarctus par exemple, pour remplacer des zones lésées.

Le traitement consiste à implanter, à greffer les tissus compactés selon l'invention ou les cellules obtenues par leur dissociation dans le cœur, au niveau des ventricules du cœurs, en particulier le ventricule gauche, ou de les intégrer à un patch positionné sur lesdits ventricules, idéalement entre le péricarde viscéral et le tissu musculaire du ventricule, ou ce qu'il en reste en situation pathologique. Un dispositif d'implantation chirurgical adapté à une implantation dans le cœur est très préférentiellement utilisé. Il peut s'agir notamment d'aiguilles, de canules ou autre dispositif permettant de déposer les tissus compactés selon l'invention ou les cellules obtenues par dissociation des tissus compactés selon l'invention, dans le cœur comme par exemple ceux utilisés pour l'implantation de stents dans les artères ou de micro implants chirurgicaux.

Selon un exemple de mode de réalisation, l'implantation peut être réalisée par injection myocardique directe, notamment par sternotomie ou avec un dispositif à base de cathéter : les tissus compactés cardiaques selon l'invention ou les cellules obtenues à partir de ces tissus (avec ou sans l'ajout d'autres types de cellules) sont injectés dans la paroi médiane du ventricule gauche du patient à un ou plusieurs endroits.

Selon un autre exemple de mode de réalisation, l'implantation peut être réalisée à l'aide d'un patch épicardique. Les tissus compactés cardiaques selon l'invention ou les cellules obtenues à partir de ces tissus (avec ou sans l'ajout d'autres types de cellules) sont utilisés dans la formation de patchs. Ces patchs peuvent ensuite être placés sur la surface épicardique du ventricule gauche du patient, soit par sternotomie ou par une intervention chirurgicale impliquant une incision et une injection du patch dans la cavité thoracique.

Dans un mode de réalisation, lors d'une même implantation, entre 1 et 1000000 unités de tissu compacté selon l'invention sont implantées.

Dans un mode de réalisation, lors d'une même implantation, entre 10^4 et 10^{10} cellules obtenues par dissociation d'unités de tissu compacté selon l'invention sont implantées.

Si nécessaire, il est possible de réaliser plusieurs implantations simultanées ou successives dans différentes zones du cœur, en particulier dans le cas où plusieurs zones séparées sont touchées ou si la zone sur laquelle il faut réaliser la greffe, est trop étendue pour ne réaliser une greffe qu'à un endroit.

De même, sur une même zone, si une seule greffe ne suffit pas, plusieurs implantations peuvent être de nouveau réalisées sur la même zone, dans un laps de temps plus ou moins important.

L'implantation de tissus cardiaques compactés selon l'invention permet aux patients atteints de maladies cardiaques, et en particulier de maladies ischémiques cardiaques d'améliorer cliniquement la fonction cardiaque, notamment :

- d'augmenter les performances contractiles des cellules du cœur (qui peut être mesurée par exemple par la fraction d'éjection du ventricule gauche) et/ou

- d'augmenter l'épaisseur de la paroi ventriculaire.

Ainsi, avantageusement, l'invention permet d'améliorer la santé globale et la qualité de vie du patient, tout en limitant le risque d'arythmies induites par la greffe.

Selon un autre aspect, les tissus compactés selon l'invention peuvent être utiles comme modèle de tissu cardiaque en particulier :

- pour tester des médicaments et candidats médicaments pour leur efficacité sur des pathologies cardiaques et/ou leur effet sur le cœur, et/ou

- pour tester la toxicité cardiaque de substances, composés, compositions ou médicaments.

Ainsi l'invention a également pour objet ces utilisations.

L'invention est à présent illustrée par des exemples.

Exemples

Plusieurs exemples de tissus compactés selon l'invention sont présentés sur les figures 1a à

1c, et des exemples de microcompartiments susceptibles d'être utilisés pour obtenir lesdits tissus compactés sont présentés sur les figures 2 à 4.

Exemple 1

Les images des figures 2b et 2c sont des images de microscopie à contraste de phase d'un microcompartiment prise à un grossissement 4x. Elles ont été prises 5 jours après le début de la différenciation (8 jours après l'encapsulation initiale des cellules souches). Les étapes utilisées pour obtenir le microcompartiment représenté sur ces figures sont les suivantes :

1. Les cellules souches pluripotentes induites par l'homme ont été encapsulées dans un hydrogel d'alginate (sans ajout de matrice extracellulaire au moment de l'encapsulation).

2. Les cellules souches encapsulées ont été cultivées dans des milieux de culture de cellules souches (mTeSR1) pendant 3 jours.

3. Le 3ème jour, le milieu de culture a été changé du milieu de cellules souches à un milieu de différenciation cardiaque contenant une molécule activant le WNT (CHIR99021). Le milieu est un milieu RPMI avec supplément B27 sans insuline avec CHIR99021 Ceci est considéré comme le jour de différenciation 0.

4. Le 2ème jour de différenciation, le milieu a été changé pour un milieu de différenciation cardiaque sans molécule activant le WNT. Le milieu est un milieu RPMI avec supplément B27 sans insuline

5. Le 3ème jour de différenciation, le milieu a été changé pour un milieu de différenciation cardiaque contenant une molécule qui inhibe la voie WNT (C59 ou IWR1). Le milieu est un milieu RPMI avec supplément B27 sans insuline avec WNT-C59 ou IWR1.

6. Le 5ème jour de différenciation, les photos des figures 2b et 2c ont été prises par microscopie à contraste de phase d'un microcompartiment prise à un grossissement 4x.

Exemple 2

Les images des figures 3b et 3c sont des images de microscopie à contraste de phase d'un microcompartiment prise à un grossissement 4x. Elles ont été prises 5 jours après le début de la différenciation (11 jours après l'encapsulation initiale des cellules souches). Les étapes utilisées pour obtenir le microcompartiment représenté sur ces figures sont les suivantes :

1. Les cellules souches pluripotentes induites par l'homme ont été encapsulées dans un hydrogel d'alginate (avec ajout de matrice extracellulaire au moment de l'encapsulation).

2. Les cellules souches encapsulées ont été cultivées dans des milieux de culture de cellules souches (mTeSR1) pendant 6 jours.

3. Le 6ème jour, le milieu de culture a été changé du milieu de cellules souches à un milieu de différenciation cardiaque contenant une molécule activant le WNT (CHIR99021). Le milieu est un milieu RPMI avec supplément B27 sans insuline avec CHIR99021 Ceci est considéré comme le jour de différenciation 0.

4. Le 2ème jour de différenciation, le milieu a été changé pour un milieu de différenciation cardiaque sans molécule activant le WNT. Le milieu est un milieu RPMI avec supplément B27 sans insuline

5. Le 3ème jour de différenciation, le milieu a été changé pour un milieu de différenciation cardiaque contenant une molécule qui inhibe la voie WNT (C59 ou IWR1). Le milieu est un milieu RPMI avec supplément B27 sans insuline avec WNT-C59 ou IWR1.

6. Le 5ème jour de différenciation, les photos des figures 3b et 3c ont été prises par microscopie à contraste de phase d'un microcompartiment selon l'invention prise à un grossissement 4x.

Exemple 3

L'image de la figure 4a est une image de microscopie à contraste de phase d'un microcompartiment prise à un grossissement 4x. Elle a été prise 5 jours après le début de la différenciation (11 jours après l'encapsulation initiale des cellules souches). Les étapes utilisées pour obtenir le microcompartiment représenté sur ces figures sont les mêmes que cellules pour obtenir les figures 3b et 3c. La différence réside dans un nombre de cellules souches encapsulées plus important.

Exemple 4

La figure 1b et 1c sont des images de microscopie à contraste de phase prises à un grossissement 4x de tissus compactés selon l'invention dans des capsules d'hydrogel. Les tissus compactés selon l'invention ont été obtenus par poursuite de la différenciation au-delà du jour 5 (déjà décrit pour les précédentes figures) :

1. Le 7ème jour de différenciation, le milieu de culture a été remplacé par un milieu RPMI avec supplément B27 avec insuline

2. Le milieu a été changé tous les 2-3 jours jusqu'au moment de l'imagerie.

Les images présentées sur les figures 1 concernent des tissus compactés ≥ 14 jours après le début de la différenciation.

Essais comparatifs : rythme de battement spontané

La figure 5 montre que pour une population cellulaire de départ donnée, les cardiomyocytes différenciés au sein de la capsule (à partir de hiPSC encapsulé) ont un rythme de battement spontané plus lent que les cardiomyocytes différenciés avec le même protocole (et à partir du même lot initial de hiPSC) mais en suspension libre culture. La fréquence de battement (définie comme 1 temps entre les battements spontanés) a été obtenue à partir d'une série d'images de microscopie à contraste de phase (à une fréquence d'au moins 30 images par seconde) sur un microscope de table standard avec un grossissement 4x. Les images sont des images de microscopie à contraste de phase prises à un grossissement 4x montrant les cellules souches encapsulées ou libres au début de la différenciation (les plus externes), et les tissus compactés finaux environ 2 semaines après le début de la différenciation (les plus internes). Dans le cas du processus de différenciation encapsulé, une étape intermédiaire avec un microcompartiment selon l'invention est présentée au jour de différenciation 5.

La figure 6 montre que la vitesse lente de battement spontané des cardiomyocytes différenciés dans la capsule est légèrement augmentée après le retrait de la capsule, et très augmentée après que les cellules aient été dissociées et mises en culture 2D. Ainsi, les tissus cardiaques compactés ont une fréquence de battement plus lente que celle des cellules isolées obtenues par dissociation desdits tissus. La fréquence de battement (définie comme 1 temps entre les battements spontanés) a été obtenue à partir d'une série d'images de microscopie à contraste de phase (à une fréquence d'au moins 30 images par seconde) sur un microscope de table standard avec un grossissement 4x. La fréquence de battement pour les tissus cardiaques compactés selon l'invention encapsulés et puis décapsulés a été prise environ 3 semaines après le début de la différenciation. Environ 3 semaines après la différenciation, une sous-population de tissus compactés selon l'invention a été dissociée et mis dans des conditions de culture 2D pendant 1 semaine avant d'enregistrer la fréquence de

battement. Les images sont des images de microscopie à contraste de phase prises à un grossissement 4x. L'image de gauche montre les tissus cardiaques compactés différenciés dans la capsule à partir d'hiPSC encapsulées. L'image de droite montre les cellules obtenues à partir d'un sous-ensemble des tissus cardiaques compactés encapsulés initiaux après avoir été mis dans des conditions de culture 2D.

Essais comparatifs : topologie, amplification cellulaire et nombre de cellules exprimant la troponine C

Des essais comparatifs avec le même procédé de différenciation dans les mêmes conditions expérimentales ont été réalisés pour comparer la différenciation en cellules cardiaques et les tissus obtenus en 3 dimensions avec ou sans encapsulation et avec ou sans compaction secondaire.

Toutes les cultures ont été réalisées à partir des mêmes cellules initiales prélevées dans une culture 2D. Des agrégats obtenus en 3D sont cultivés (sans ajout de matrice) avec ou sans capsules dans une culture en suspension agitée (sous agitation à 55 rpm). La même densité cellulaire est utilisée au départ (e6 cellules/mL de milieu) au jour 0 de la différenciation (images a) et e)). Le même protocole de différenciation est appliqué dans les deux conditions (avec et sans capsule).

La Figure 7 présente des images de microscopie à contraste de phase prise grossissement 4x. Les trois images de la ligne du haut (a, b et c) sont des images de cellules encapsulées selon l'invention.

Les trois images de la ligne du base (d, e et f) sont des images de cellules non encapsulées.

Les images de la colonne de gauche (a et d) représentent des cellules souches induites en début de différenciation en cellules cardiaques.

Les images de la colonne du milieu (b et e) représentent des cellules humaines en cours de différenciation cellulaire en cellules cardiaques, 3 à 7 jours après l'initiation de la différenciation.

Les images de la colonne de droite (c et f) représentent des tissus cardiaques différenciés.

On constate que la topologie est différente avec et sans encapsulation selon l'invention. Sans encapsulation il n'y a pas de lumen en cours de différenciation, donc pas de compaction

ensuite, et le tissu cardiaque obtenu en fin de différenciation a une forme très différente.

Sur la Figure 8 on constate que le pourcentage de cellules dans les tissus (obtenus tels qu'à la Figure 7c et 7f) exprimant la troponine C cardiaque est supérieur à 90% dans les conditions de l'invention (compaction secondaire) alors qu'il est de 40% pour les tissus cardiaques obtenus dans les mêmes conditions mais sans encapsulation.

Sur la Figure 9 on constate que le taux d'amplification cellulaire entre le début de la différenciation est supérieur à 2 dans les conditions de l'invention alors qu'il est inférieur à 0,5 pour les tissus cardiaques obtenus dans les mêmes conditions mais sans encapsulation.

REVENDICATIONS

[Revendication 1] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques exprimant la troponine C cardiaque, en trois dimensions, caractérisé en ce qu'il est contractile et présente une fréquence de contraction spontanée inférieure à 4 Hz.

[Revendication 2] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente un taux de cellules exprimant la troponine C cardiaque supérieur à 50% en nombre par rapport au nombre total de cellules du tissu.

[Revendication 3] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il présente un taux de cellules exprimant la troponine C cardiaque et l'alpha-actinine supérieur à 50% en nombre par rapport au nombre total de cellules du tissu.

[Revendication 4] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il présente un taux de cellules exprimant la troponine C cardiaque supérieur à 75% en nombre par rapport au nombre total de cellules du tissu.

[Revendication 5] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il présente une fréquence de contraction spontanée inférieure à 0,5 Hz.

[Revendication 6] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il présente une fréquence de contraction spontanée inférieure à 0,25 Hz.

[Revendication 7] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il est entouré au moins partiellement par une couche de solution aqueuse isotonique.

[Revendication 8] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il est encapsulé totalement ou partiellement dans une couche externe en hydrogel.

[Revendication 9] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il a une forme sphérique ou allongée.

[Revendication 10] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon la précédente revendication, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un sphéroïde, d'un ovoïde, d'un cylindre ou d'une sphère.

[Revendication 11] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il présente un diamètre ou une plus petite dimension comprise entre 10 µm et 1 mm.

[Revendication 12] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il présente une plus grande dimension comprise entre 10 µm et 50cm.

[Revendication 13] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, à partir d'un tissu de cellules cardiaques et/ou de cellules en cours de différenciation cardiaque comportant au moins une lumière, par un procédé comprenant la compaction dudit tissu par disparition totale ou partielle desdites lumières.

[Revendication 14] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il est congelé.

[Revendication 15] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des précédentes revendications, pour son utilisation, en tant que tel ou après dissociation sous forme d'une suspension de cellules, dans le traitement et/ou la prévention d'une pathologie cardiaque.

[Revendication 16] Tissu compacté de cellules humaines cardiaques pour son utilisation selon la revendication 15, dans le traitement et/ou la prévention d'une maladie ischémique cardiaque.

[Revendication 17] Utilisation d'un tissu compacté de cellules humaines cardiaques selon l'une des revendications 1 à 14 :

- pour tester des médicaments et candidats médicaments pour leur efficacité sur des pathologies cardiaques et/ou leur effet sur le cœur, et/ou
- pour tester la toxicité cardiaque de substances, composés, compositions ou médicaments.