MICROCOMPARTIMENTS CELLULAIRES COMPRENANT DES LYMPHOCYTES FORMANT UNE CULTURE GROUPEE EN 3D ET AYANT UNE FAIBLE TENEUR EN TNF ALPHA

Domaine technique

La présente invention se rapporte au domaine de la culture cellulaire de lymphocytes à grande échelle. L'invention a en particulier pour objet un microcompartiment cellulaire particulier, son procédé de préparation et ses utilisations.

Art antérieur

Les progrès réalisés au cours de ces dernières décennies ont permis de mettre en avant l'intérêt de la thérapie cellulaire pour traiter de nombreuses pathologies.

La thérapie cellulaire se définit comme l'administration de cellules vivantes à un patient dans le but de prévenir, traiter ou d'atténuer une pathologie. L'objectif est d'obtenir un effet durable grâce à une injection de cellules thérapeutiques.

De nombreuses approches de thérapie cellulaire peuvent être envisagées telles que :

- l'approche dite autologue dans laquelle le patient est son propre donneur.
- l'approche dite allogénique dans laquelle le donneur est différent du patient.

La thérapie cellulaire recouvre de larges domaines thérapeutiques et s'applique à de nombreux types cellulaires allant des cellules pluripotentes jusqu'aux cellules adultes spécialisées à fonction métabolique (*e.g* hépatocytes) ou à fonction mécanique (*e.g* myoblastes, chondrocytes), en passant par les lignées hématopoïétiques telles que les cellules mononucléées du sang (*e.g* lymphocytes T ou lymphocytes NK).

Une des thérapies les plus prometteuse à ce jour est la thérapie cellulaire CAR (Récepteur antigénique chimérique). Les cellules CAR-T sont des lymphocytes T exprimant des récepteurs antigéniques chimériques qui sont des récepteurs artificiels conçus pour reconnaitre un antigène présent à la surface des cellules tumorales. Les cellules CAR-T guident le système immunitaire pour cibler et éradiquer les cellules cancéreuses. Cette approche est considérée comme une avancée majeure dans l'immunothérapie et de nombreuses cellules CAR-T sont en cours de développement de façon à étendre leurs utilisations. Les cellules CAR-T sont produites en général selon l'approche autologue. Toutefois, il est également possible de créer des cellules CAR-T allogéniques.

Il existe également une alternative utilisant des lymphocytes NK (natural killer). Les lymphocytes NK sont des cellules effectrices cytotoxiques très puissantes ayant démontré un effet antitumoral.

Afin de pouvoir développer le potentiel des thérapies cellulaires utilisant des lymphocytes, notamment les thérapies CAR-T ou CAR-NK, il est nécessaire de pouvoir s'appuyer sur des techniques de culture cellulaire de lymphocytes à grande échelle.

La production *ex vivo* de cellules immunitaires tels que les lymphocytes T ou NK est particulièrement complexe, surtout à grande échelle. En effet, les méthodes de cultures *in vitro* développées à ce jour sont trop stressantes et conduisent rapidement à l'épuisement cellulaire ne permettant pas de produire les lymphocytes à grande échelle. *In vivo*, la prolifération des cellules immunitaires se produit principalement dans des environnements mécaniquement stables tels que des tissus solides. L'environnement d'un bioréacteur étant rempli de contraintes de cisaillement non physiologiques, les taux d'expansion obtenus sont généralement encore insuffisants par rapport aux capacités d'expansion *in vivo*.

Actuellement, il n'existe aucune solution satisfaisante pour produire rapidement à grande échelle des lymphocytes fonctionnels, en particulier des cellules CAR-T ou CAR-NK.

Plusieurs méthodes de cultures sont principalement utilisées pour l'expansion des cellules CAR : la culture statique en flasque, la culture en sac statique perméables aux gaz et la culture en bioréacteur à mouvement de bascule (Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. Curr Opin Biotechnol. 2018), la plateforme G-rex® (Ludwig et al. "Methods and Process Optimization for Large-Scale CAR T Expansion Using the G-Rex Cell Culture Platform" Methods Mol Biol 2020;2086:165-177).

Toutefois, ces méthodes de culture ne sont pas adaptées à la production de lymphocytes à grande échelle en raison d'exposition des cellules à de nombreuses étapes de manipulation augmentant les risques de contaminations, d'exposition des cellules à des stress trop importants et/ou de contraintes de développement et de capacité des plateformes et méthodes utilisées. Par ailleurs, le travail de maintien en culture et de stockage serait trop exigeant pour une production à grande échelle.

Pour remédier à ce problème, l'art antérieur propose d'activer les lymphocytes avant leur mise en culture afin d'obtenir une prolifération rapide des lymphocytes.

Néanmoins, l'activation précoce des lymphocytes engendre un processus physiologique

d'épuisement cellulaire. L'épuisement correspond à une maturation précoce des cellules T naïves vers une sous population de lymphocytes T effecteurs limitant la persistance du greffon *in vivo*.

Une autre solution proposée par l'art antérieur est l'utilisation de microtubes d'hydrogel et d'alginate suspendus dans un milieu de culture cellulaire. Cette méthode rapporte un taux d'expansion des lymphocytes de 320 à 14 jours de culture (Lin et al. Adv. Healthcare Mater. 2018, 1701297)

Toutefois, bien que cette méthode apporte un taux d'expansion satisfaisant, elle n'est pas adaptée pour une culture à grande échelle. Cette méthode nécessiterait de mettre au point un système de culture dédié et serait trop compliquée à adapter à grande échelle.

Par ailleurs cette méthode ne garantit pas le phénotype fonctionnel des lymphocytes et par conséquent que l'action des lymphocytes soit durable.

La complexité de la différentiation et de la fonction de chaque sous population de lymphocyte font que l'analyse du phénotype lors de la prolifération est une donnée essentielle pour mener à bien toute thérapie à base de lymphocytes, en particulier les thérapies utilisant des cellules CAR-T ou CAR-NK.

Les sous populations de lymphocytes T les moins différenciés tels que les lymphocytes T naifs et lymphocytes Tscm (cellule souche mémoire) semblent particulièrement importantes pour garantir un effet durable chez les patients (Vita Golubovskaya and Lijun Wu (Cancers 2016, 8, 36). De plus, les sous-populations NK « memory-like » permettent une persistance de la réponse clinique (Romee et al. « Cytokine activation induces human memory-like NK cells » Blood 2012 Dec 6;120(24):4751-60).

D'autre part, on sait également que la sous population de lymphocyte T effecteur est essentielle pour garantir un effet significatif sur la ou les cellules cibles.

Il apparait donc nécessaire de maitriser les sous populations cellulaires lors de la culture des lymphocytes à grande échelle pour obtenir un ratio optimal entre la persistance et l'efficacité in vivo.

Les processus de production actuels impliquant des lymphocytes ont un coût très important et sont difficiles à mettre à grande échelle et aboutissent à des lymphocytes de qualité mitigée et de persistance réduite.

Il existe donc un besoin important pour une solution permettant une production à grande

échelle de lymphocytes avec un phénotype fonctionnel, pour répondre à une demande indispensable de thérapie cellulaire basée sur les lymphocytes.

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

Résumé de l'invention

Pour répondre à cet objectif, l'invention propose de passer par un microcompartiment particulier pour obtenir une production à grande échelle de lymphocytes, adaptés à des utilisations en thérapie cellulaire.

A cet effet, l'invention a pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant dans un milieu entre 500 et 5000 lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions ayant une teneur en Facteur de nécrose tumorale endogène (TNF alpha) inférieure à 100 ng/mL du milieu.

Préférentiellement, la partie interne du microcompartiment comprend une teneur en perforine inférieure à 0,5 µg/mL du milieu et/ou une teneur en en granzyme B inférieure à 1 µg/mL du milieu et/ou une teneur en IL6 inférieure à 0,5 µg/mL du milieu et/ou une teneur en GM-CSF inférieure à inférieure à 0,5 µg/mL du milieu.

Avantageusement, le microcompartiment selon l'invention permet de produire des lymphocytes présentant un phénotype fonctionnel tout en garantissant une production rapide à grande échelle.

Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, le microcompartiment selon l'invention comprend des lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions sans lumen.

Le microcompartiment selon l'invention peut être obtenu après encapsulation de lymphocytes avec ou sans ajout de matrice extracellulaire, et selon une variante avec ou sans ajout d'élément de matrice extracellulaire.

Avantageusement, l'absence d'ajout de matrice extracellulaire ou d'élément de matrice au moment de l'encapsulation des lymphocytes permet d'améliorer leur taux d'expansion après

3 jours de culture.

Selon un objet préféré de l'invention, le microcompartiment selon l'invention a été obtenu après encapsulation de lymphocytes préalablement activés. L'activation des lymphocytes permet avantageusement de stimuler la prolifération des lymphocytes dans la partie interne du microcompartiment selon l'invention. Selon une variante, l'activation des lymphocytes peut être réalisée dans le microcompartiment après encapsulation.

Selon un autre mode de réalisation particulièrement adapté, le microcompartiment selon l'invention comprend des lymphocytes exprimant un récepteur antigénique chimérique.

Lorsque le microcompartiment selon l'invention comprend des lymphocytes T, il comprend préférentiellement une concentration en lymphocyte naïf et/ou Tscm supérieure à 20%, encore plus préférentiellement supérieure à 40%.

Avantageusement, une telle concentration en lymphocytes naïf et/ou Tscm permet de garantir un effet durable et d'éviter le phénomène d'épuisement précoce des lymphocytes.

Selon un objet préféré de l'invention, l'invention concerne un ensemble de microcompartiments.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé de préparation d'un microcompartiment ou d'un ensemble de microcompartiments comprenant au moins la mise en œuvre des étapes suivantes, une incubation, une encapsulation et une étape de culture.

Enfin, l'invention vise un microcompartiment selon l'invention pour son utilisation comme médicament, préférentiellement dans la prévention ou le traitement de maladies auto-immunes, de syndromes d'immunodéficience, de cancers, de maladies virales ou de malades inflammatoires.

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 image de microscopie à contraste de phase au grossissement x20 d'un ensemble de microcompartiments selon l'invention comprenant des lymphocytes T après 3 jours de cultures en capsules.

La Figure 1b est une image de microscopie à contraste de phase au grossissement x10 d'un ensemble de microcompartiments selon l'invention comprenant des lymphocytes T après 3

jours de cultures en capsules.

La Figure 2 est une représentation des résultats d'essais sur l'amplification de lymphocytes dans des microcompartiments selon l'invention.

La Figure 3 est une représentation du facteur d'expansion des lymphocytes T après 6 jours de culture avec ou sans encapsulation.

La Figure 4 est une représentation comparative du profil d'expression de cytokines lors de la culture de Lymphocytes T après 6 jours de culture avec ou sans encapsulation. Les résultats sont présentés avec des valeurs normalisées par rapport à la sécrétion de GM-CSF et d'IFN-g.

La Figure 5 est une image obtenue par microscopie confocale d'un microcompartiment présentant des lymphocytes polarisés.

La Figure 6 est une représentation du facteur d'expansion des lymphocytes NK après 14 jours de culture avec encapsulation (« Capsules ») ou sans encapsulation (« Contrôle »).

La Figure 7a est une représentation comparative de l'expression de cytokines lors de la culture de Lymphocytes NK après 14 jours de culture avec ou sans encapsulation (pour un donneur A– surnageant dilué au 10ème). Les résultats sont présentés avec des valeurs normalisées par rapport à la sécrétion d'IFN-g.

La Figure 7b est une représentation comparative de l'expression de granzyme B lors de la culture de Lymphocytes NK après 14 jours de culture avec ou sans encapsulation (pour un donneur A– surnageant dilué au 100ème). Les résultats sont présentés avec des valeurs normalisées par rapport à la sécrétion d'IFN-g.

La Figure 8a est une représentation comparative de l'expression de cytokines lors de la culture de Lymphocytes NK après 11 jours de culture avec ou sans encapsulation (pour un donneur B – surnageant dilué au 10ème). Les résultats sont présentés avec des valeurs normalisées par rapport à la sécrétion d'IFN-g.

La Figure 8b est une représentation comparative de l'expression de granzyme B lors de la culture de Lymphocytes NK après 11 jours de culture avec ou sans encapsulation (pour un donneur B– surnageant dilué au 100ème). Les résultats sont présentés avec des valeurs normalisées par rapport à la sécrétion d'IFN-g.

La Figure 9 représente les résultats comparatifs d'un test de toxicité réalisé sur des NK obtenus sans encapsulation et sur des NK obtenus selon l'invention (pour le donneur B).

La Figure 10 représente les résultats comparatifs de l'évolution de la viabilité lors de la culture

de NK sans encapsulation et de NK encapsulés selon l'invention (résultats pour deux donneurs A et B).

La Figure 11a est une image de microscopie à contraste de phase au grossissement x4 d'un ensemble de microcompartiments selon l'invention contenant des NK au jour de l'encapsulation est présentée en figure 11a.

La Figure 11b est une image de microscopie à contraste de phase au grossissement x10 d'un ensemble de microcompartiments selon l'invention contenant des NK après 11 jours de cultures en capsules.

La Figure 12a est une représentation du facteur d'expansion des lymphocytes NK lors de la culture pendant 12 jours de culture avec encapsulation (« Capsules » encapsulation sans bille d'activation) ou sans encapsulation (« Contrôle »).

La Figure 12b représente les résultats comparatifs de l'évolution de la viabilité lors de la culture de NK sans encapsulation (« contrôle ») et de NK encapsulés selon l'invention (« capsules » encapsulation sans bille d'activation) (résultats pour deux donneurs B et C).

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

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

Par « diamètre de Feret » d'un microcompartiment (ou d'une partie d'un microcompartiment) selon l'invention, on entend la distance « d » comprise entre deux tangentes audit

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

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

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

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

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

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

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

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

Par « lumière » ou « lumen » au sens de l'invention, on entend un volume de solution aqueuse

topologiquement entouré de cellules. Préférentiellement son contenu n'est pas en équilibre diffusif avec le volume de liquide convectif présent à l'extérieur du microcompartiment.

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

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

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

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

Par « phénotype fonctionnel » selon l'invention, on entend des lymphocytes présentant un profil d'expression de marqueurs membranaires classique (CD3+, CD4+ ou CD8+ pour les lymphocytes T et CD3-, CD56+ pour les lymphocytes NK), connu de l'homme du métier et une capacité à sécréter des interleukines (IL2, IL6, IL10, IL12) ou d'autres facteurs d'intérêt (granzyme B, INF gamma, GMCSF, et TNF alpha) sous l'induction de la présentation d'un antigène in vitro.

Par « cellule progénitrice » au sens de l'invention, on entend une cellule souche déjà engagée dans la différenciation cellulaire en lymphocytes 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 demande. Il peut s'agir en particulier de cellules souches pluripotentes induites (iPSC ou hiPSC pour les cellules souches pluripotentes induites humaines), de cellules souches embryonnaires ou de cellules MUSE (pour « Multilineage-differentiating Stress Enduring »).

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).

Microcompartiment cellulaire

L'invention a donc pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant dans un milieu entre 500 et 5000 lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions et ayant une teneur en TNF alpha inférieure à 100 ng/mL de milieu.

Préférentiellement, la partie interne du microcompartiment comprend une teneur en TNF alpha inférieure à 50 ng/mL de milieu, notamment inférieure à 30ng/mL, plus préférentiellement inférieure à 10 ng/mL, encore plus préférentiellement inférieure à 3 ng/mL. Le microcompartiment selon l'invention comprend donc au moins des lymphocytes ne sécrétant pas ou peu de TNF alpha.

Dans le contexte de l'invention, la teneur en molécule(s) (notamment cytokines telles que TNF,

telles que granzyme B, perforine, etc.) dans le milieu interne au microcompartiment peut être mesurée directement dans la capsule, ou bien dans le milieu externe au microcompartiment lorsque celui-ci est dans un milieu. En effet, les molécules inférieures à 150KDa sont en équilibre osmotique entre la partie interne du microcompartiment et le milieu dans lequel est compris le microcompartiment.

Selon un mode de réalisation préféré, la partie interne du microcompartiment comprend une teneur en perforine inférieure à 0,5µg/ml de milieu, préférentiellement inférieure à 0,1µg/mL, plus préférentiellement inférieure à 50ng/mL, encore plus préférentiellement inférieure à 10ng/mL.

L'invention a également pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant dans un milieu entre 500 et 5000 lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions et ayant une teneur en perforine inférieure à 0,5µg/ml de milieu, préférentiellement inférieure à 0,1µg/mL, plus préférentiellement inférieure à 50ng/mL, encore plus préférentiellement inférieure à 10ng/mL.

Selon un mode de réalisation préféré, la partie interne du microcompartiment comprend une teneur en granzyme B inférieure à 1µg/mL de milieu, en particulier inférieure à 0,5µg/mL de milieu, plus préférentiellement inférieure à 0,1µg/mL, encore plus préférentiellement inférieure à 50ng/mL. Le microcompartiment selon l'invention comprend donc au moins des lymphocytes ne sécrétant pas ou peu de granzyme B.

L'invention a donc également pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant dans un milieu entre 500 et 5000 lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions et ayant une teneur en granzyme B inférieure à 1µg/mL de milieu .

Selon un mode de réalisation, lorsque les lymphocytes sont des lymphocytes NK, la partie interne du microcompartiment comprend une teneur en IL6 inférieure à 0,5µg/ml de milieu, préférentiellement inférieure à 0,1µg/mL, plus préférentiellement inférieure à 50ng/mL,

encore plus préférentiellement inférieure à 10ng/mL.

L'invention a également pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant dans un milieu entre 500 et 5000 lymphocytes NK formant une culture groupée en trois dimensions et ayant une teneur en IL6 inférieure à 0,5µg/ml de milieu, préférentiellement inférieure à 0,1µg/mL, plus préférentiellement inférieure à 50ng/mL, encore plus préférentiellement inférieure à 10ng/mL.

Selon un mode de réalisation, lorsque les lymphocytes sont des lymphocytes NK, la partie interne du microcompartiment comprend une teneur en GM-CSF inférieure à 0,5µg/ml de milieu, préférentiellement inférieure à 0,1µg/mL, plus préférentiellement inférieure à 50ng/mL, encore plus préférentiellement inférieure à 10ng/mL.

L'invention a également pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant dans un milieu entre 500 et 5000 lymphocytes NK formant une culture groupée en trois dimensions et ayant une teneur en GM-CSF inférieure à 0,5µg/ml de milieu, préférentiellement inférieure à 0,1µg/mL, plus préférentiellement inférieure à 50ng/mL, encore plus préférentiellement inférieure à 10ng/mL.

Selon un mode de réalisation, l'invention a pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant dans un milieu entre 500 et 5000 lymphocytes T formant une culture groupée en trois dimensions et ayant une teneur en inférieure à 100 ng/mL de milieu et :

- une teneur en en perforine inférieure à 0,5µg/ml de milieu, et/ou
- une teneur en granzyme B inférieure à 1µg/mL de milieu.

Selon un mode de réalisation, l'invention a pour objet un microcompartiment cellulaire en

trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant dans un milieu entre 500 et 5000 lymphocytes NK formant une culture groupée en trois dimensions et ayant une teneur en TNF- α inférieure à 100 ng/mL de milieu et :

- une teneur en en perforine inférieure à 0,5µg/ml de milieu, et/ou
- une teneur en granzyme B inférieure à 1 µg/mL de milieu, et/ou
- une teneur en IL6 inférieure à 0,5µg/ml de milieu et/ou
- une teneur en GM-CSF inférieure à 0,5µg/ml de milieu.

Selon l'invention, de façon surprenante, une teneur en TNF alpha inférieure à 100ng/mL de milieu dans la partie interne du microcompartiment, notamment inférieure à 30ng/mL, préférentiellement inférieure à 50ng/mL, plus préférentiellement inférieure à 10µg/mL, encore plus préférentiellement inférieure à 3ng/mL est un critère garantissant le phénotype fonctionnel des lymphocytes au sein de la partie interne du microcompartiment selon l'invention.

Le facteur de nécrose tumorale (TNF alpha) est une cytokine pléiotrope impliquée dans de nombreux processus physiologiques qui contrôlent l'inflammation, la réponse aux tumeurs, et l'homéostasie du système immunitaire. Le TNF alpha peut être sécrété par des lymphocytes ou par d'autres cellules (notamment les macrophages activés) pour agir directement sur des cellules infectées par certains pathogènes ou pour favoriser la prolifération des lymphocytes. Le TNF alpha peut ainsi promouvoir l'activation et la prolifération des cellules T naïves et effectrices, mais peut aussi induire l'apoptose de cellules T effectrice activées. Le TNF alpha est stocké dans des vésicules de sécrétion intracellulaires. Ces vésicules sont classiquement libérées dans l'environnement immédiat des cellules cibles.

Dans les méthodes de culture classique, les lymphocytes sont soumis à différentes contraintes physiques et/ou stress ayant tendance à provoquer un relargage d'interleukines plus particulièrement de TNF alpha. Ce relargage incontrôlé du TNF alpha va modifier l'environnement direct des lymphocytes et peut provoquer une diminution significative de la viabilité des lymphocytes en provoquant l'apoptose d'une partie d'entre eux. D'autre part, les lymphocytes restants ne présentent plus un phénotype fonctionnel. En effet, les lymphocytes

ont perdu leur capacité à sécréter des interleukines sous l'induction de la présentation d'un antigène ce qui affectent ainsi leur capacité d'action sur l'antigène cible.

Avantageusement, le microcompartiment selon l'invention permet d'obtenir des lymphocytes présentant un phénotype fonctionnel.

Contrairement à ce qui est suggéré dans l'art antérieur, une teneur en TNF alpha inférieure à 100ng/mL de milieu, notamment inférieure à 30ng/mL, préférentiellement inférieure à 50ng/mL, plus préférentiellement inférieure à 10µg/mL, encore plus préférentiellement inférieure à 3ng/mL est particulièrement recherchée dans le cadre de la culture de lymphocytes.

Une concentration en TNF alpha supérieure 100ng/mL de milieu et/ou une concentration en perforine supérieure à 0,5µg/ml et/ou une concentration supérieure à 1µg/ml en granzyme B, indiquerait qu'un processus anarchique de relâchement d'interleukines à lieu dans le microcompartiment selon l'invention et le rendrait incompatible avec une culture à grande échelle de lymphocytes présentant un phénotype fonctionnel.

Il en est de même pour une concentration supérieure à 0,5µg/ml IL6 et/ou une concentration supérieure à 0,5µg/ml GM-CSF pour les lymphocytes NK. IL6 en particulier est connue pour diminuer l'activité cytotoxique des NK (Cifadi et al., « Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome » Artritis Rheumatol, 2015 Nov;67(11):3037-46. doi: 10.1002/art.39295.). Ainsi une diminution de la concentration en IL6 permet avantageusement d'augmenter l'efficacité des NK.

Avantageusement, le microcompartiment selon l'invention est adapté à une culture à grande échelle.

Le microcompartiment selon l'invention présente avantageusement un taux d'expansion des lymphocytes T d'au moins fois 20 après 3 jours de mise en culture, et un taux d'expansion des lymphocytes NK d'au moins 40 fois après 14 jours de mise en culture.

Le microcompartiment selon l'invention comprend une couche externe en hydrogel. Préférentiellement l'hydrogel utilisé est biocompatible, c'est-à-dire qu'il n'est pas toxique pour les cellules. La couche externe d'hydrogel doit permettre la diffusion d'oxygène et de nutriment pour alimenter les cellules contenues dans le microcompartiment et permettre leur 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 externe en hydrogel est dépourvue de cellules.

La couche externe d'hydrogel permet notamment de protéger les cellules du stress mécanique des bioréacteurs, de limiter la sécrétion anarchique par les lymphocytes en culture de cytokines potentiellement toxiques quand accumulées dans le milieu.

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

Le microcompartiment selon l'invention peut être obtenu après encapsulation de lymphocytes sans ajout de matrice extracellulaire, naturelle ou de synthèse.

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

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

L'absence d'élément de matrice extracellulaire dans la partie interne du microcompartiment selon l'invention après encapsulation garantie aux lymphocytes une liberté d'organisation structurelle au sein du microcompartiment selon l'invention.

Avantageusement, l'absence d'élément de matrice extracellulaire améliore de taux d'expansion des lymphocytes.

Au sein du microcompartiment, les lymphocytes se regroupent en trois dimensions préférentiellement en amas ou grappes (« clusters »).

De façon préférée, le microcompartiment selon l'invention comprend des lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions sans lumen.

L'absence de lumen permet avantageusement de limiter les signaux autocrines et paracrines des lymphocytes rendant leur phénotype particulièrement stable à partir de leur encapsulation.

Avantageusement, l'absence de lumen permet également de mieux contrôler la taille des regroupements de lymphocytes présents sous forme d'amas ou de grappes dans le microcompartiment.

Le microcompartiment selon l'invention peut être obtenu après encapsulation de lymphocytes préalablement activés permettant ainsi d'augmenter leur taux d'expansion en stimulant leur prolifération. L'activation peut être réalisée en mettant en contact les lymphocytes avec des Artificial antigen presenting cells dites aAPC (cellules présentatrices de l'antigène artificielles) très préférentiellement via des anticorps CD3/CD28 pour des lymphocytes T, via des CD2/NKp46 pour des lymphocytes NK.

Lorsque les lymphocytes ont été préalablement activés et pour maintenir leur activation, la partie interne du microcompartiment selon l'invention peut comprendre une solution comprenant des cytokines, notamment de l'IL2 ou la combinaison d'IL7 et d'IL15 pour des lymphocytes T, notamment IL2, IL12, IL18, IL21 (préférentiellement IL2 ou IL12 ou IL18 ou IL21 ou la combinaison d'au moins deux cytokines choisies parmi IL2, IL12, IL18 et IL21) pour des NK.

Les cytokines pouvant être comprises dans la partie interne du microcompartiment permettent ainsi d'accélérer la prolifération des lymphocytes.

Selon un autre mode de réalisation, le microcompartiment selon l'invention comprend des lymphocytes activés pendant et/ou après encapsulation. Dans ce mode de réalisation, les lymphocytes peuvent être une co-encapsulés avec des cellules présentatrices de l'antigène artificielles, par exemples des billes d'activation cotées avec un ou des anticorps adaptés (par exemple Cloudz Human NK Cell Expansion Kit (R&D Systems) ou NK Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec)).

De façon préférée, dans ce mode de réalisation, l'activation des lymphocytes est effectuée au sein du microcompartiment. Préférentiellement, l'activation des lymphocytes au sein du microcompartiment est réalisé dans un ratio nombre de lymphocytes / quantité d'antigène

supérieur à 8/1, préférentiellement supérieur à 9/1, encore plus préférentiellement supérieur à 10/1.

Avantageusement, l'activation est réalisée dans le microcompartiment en maitrisant le ratio du nombre de lymphocytes / quantité d'antigène nécessaire de façon à activer les lymphocytes tout en limitant l'épuisement cellulaire.

Le microcompartiment selon l'invention permet d'isoler les lymphocytes empêchant un brassage ou une convection des cellules. Cette isolation mécanique permet de se rapprocher de l'organisation spatiale et structurelle des lymphocytes existant in vivo.

Grace à l'isolement mécanique fournie par le microcompartiment, l'activation des lymphocytes ne peut se faire de façon homogène ou continue. De cette manière l'activation se rapproche des conditions d'activation in vivo des lymphocytes, ce qui favorise leur polarisation.

Préférentiellement, les lymphocytes formant les amas ou grappes sont polarisées. La polarité de ces lymphocytes à l'intérieur de chaque amas ou grappes peut être mise en évidence par le positionnement excentré du noyau dans la cellule. Par ailleurs, les lymphocytes polarisés peuvent présenter des anisotropies de distribution des protéines Dlg, Scrib and Lgl.

La polarisation des lymphocytes dans le microcompartiment peut être un indicateur du phénotype fonctionnel. En effet, si un lymphocyte contient une quantité suffisante de granules et vésicules comprenant des interleukines, notamment du TNF alpha, alors les lymphocytes sont polarisés.

De façon inattendue, le microcompartiment selon l'invention conserve la conformation sous forme d'amas ou grappes des lymphocytes permettant ainsi d'avoir une meilleure prolifération tout en maintenant un phénotype fonctionnel. Par conséquent cela permet de réduire le nombre de passages et de réduire le temps en culture nécessaire pour atteindre le nombre de lymphocytes final nécessaire.

Le microcompartiment peut comprendre également, en plus des amas ou grappes, des cellules en suspension dans le microcompartiment.

Le microcompartiment selon l'invention comprend préférentiellement une concentration en lymphocytes naïf et/ou Tscm supérieure à 20%, encore plus préférentiellement supérieure à 40%.

La concentration en lymphocyte naïf et/ou Tscm permet de garantir un effet durable lors de

la thérapie cellulaire. Il est particulièrement important lors de la culture d'obtenir une teneur en lymphocyte naif et/ou Tscm supérieure à 20% afin d'obtenir un ratio optimal entre persistance de l'effet et efficacité in vivo.

Une concentration en lymphocyte naif et/ou Tscm inférieure à 20% serait indicatif d'une durée de vie des lymphocytes trop faible ne garantissant pas un effet persistant.

Les lymphocytes naifs et Tscm sont des lymphocytes immatures présentant les marqueurs CD3+ CD45RO- CD45RA+ CCR7+ facilement identifiables et quantifiables par des méthodes de détection bien connues de l'homme du métier telle que la cytométrie en flux.

Selon un mode de réalisation particulier, l'invention vise un microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne formant dans un milieu une culture groupée en trois dimensions de lymphocytes ayant :

- une teneur en TNF alpha inférieure à 100ng/mL de milieu ; et
- une teneur en granzyme B inférieure à 1µg/mL de milieu ; et/ou
- une teneur en perforine inférieure à 0,5µg/mL de milieu.

Dans ce mode de réalisation, lorsque les lymphocytes sont des lymphocytes T, la proportion de lymphocyte T naif et/ou Tscm reste supérieure à 20%.

Préférentiellement, le microcompartiment est obtenu après encapsulation de lymphocytes sans ajout de matrice extracellulaire et/ou sans ajout d'élément de matrice extracellulaire.

Les lymphocytes présents dans le microcompartiment selon l'invention ont été préférentiellement obtenus après au moins deux cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins un lymphocyte.

De façon préférée, les lymphocytes présents dans le microcompartiment selon l'invention ont été obtenus après au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 28, 30 cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel, préférentiellement au moins 5, encore plus préférentiellement au moins 6, pour obtenir notamment entre 5 et 100 lymphocytes par lymphocyte encapsulé. Par exemple, les lymphocytes présents dans le microcompartiment ont été obtenus après au moins six cycles de division cellulaire après l'encapsulation des cellules dans la couche externe en hydrogel.

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

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

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

Préférentiellement, le microcompartiment selon l'invention a été obtenu en moins de 6 jours après l'encapsulation, encore plus préférentiellement en moins de 4 jours après encapsulation d'au moins 5 lymphocytes dans la partie interne définie par la couche externe en hydrogel.

Le microcompartiment selon l'invention peut contenir entre 500 et 5000 lymphocytes, préférentiellement entre 1000 et 3000 lymphocytes.

Avantageusement, le microcompartiment selon l'invention protège les lymphocytes du stress mécanique permettant ainsi d'obtenir un taux d'expansion particulièrement adapté à la culture à grande échelle.

Le microcompartiment selon l'invention peut se présenter sous toute forme en trois dimensions, c'est-à-dire qu'il peut avoir la forme de tout objet de l'espace. Le microcompartiment peut avoir n'importe quelle forme compatible avec l'encapsulation de cellules. Préférentiellement le microcompartiment selon l'invention se présente sous une forme sphérique ou allongée ou sensiblement sphérique ou allongée. Il peut avoir la forme d'un ovoïde, d'un cylindre, d'un sphéroïde ou d'une sphère ou sensiblement cette forme.

C'est la couche externe du microcompartiment, c'est-à-dire la couche d'hydrogel, qui confère sa taille et sa forme au microcompartiment selon l'invention. Préférentiellement la plus petite dimension du microcompartiment selon l'invention est comprise entre 200 µm et 400 µm, préférentiellement entre 200 µm et 350 µm, encore plus préférentiellement 200 µm et 300 µm, notamment entre 200µm et 250 µm.

Sa plus grande dimension est préférentiellement supérieure à 10 µm, plus préférentiellement comprise entre 10 µm et 1m, encore plus préférentiellement entre 10 µm et 50 cm.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, les lymphocytes encapsulés dans le

microcompartiment selon l'invention sont des lymphocytes T ou des lymphocytes NK.

Préférentiellement, les lymphocytes compris dans le microcompartiment selon l'invention expriment un récepteur antigénique chimérique.

Le microcompartiment selon l'invention est ainsi particulièrement adapté aux cultures à grande échelle de lymphocytes pour des thérapie cellulaires de type CAR-T ou CAR-NK.

Selon un mode de réalisation, le microcompartiment selon l'invention ne comprend pas de cellules souches embryonnaires humaines et/ou n'est pas obtenu à partir de cellules souches embryonnaires humaines.

Le microcompartiment selon l'invention peut être éventuellement congelé pour être stocké. Il devra ensuite être préférentiellement décongelé avant son utilisation.

L'invention a également pour objet plusieurs microcompartiments ensemble.

L'invention a également pour objet un ensemble ou série de microcompartiments comprenant au moins deux microcompartiments cellulaires en trois dimensions, caractérisé en ce qu'au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'invention.

De façon préférée, la série de microcompartiments selon l'invention est dans un milieu de culture, en particulier dans un milieu de culture au moins partiellement convectif. Tout milieu de culture adapté à la culture de lymphocytes peut être utilisé, tel que par exemple le milieu « TexMACS (Miltenyi Biotec) » ou « VIVO 15-20 (Lonza) » ou « CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher) » ou NKMACS (Miltenyi Biotec) ou ExCellerate *Human* NK Cell Expansion Media (R&D Systems), dès lors que la concentration en sels dissouts est compatible avec le maintien de la réticulation de l'alginate par les cations divalents.

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

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

Les microcompartiments selon l'invention peuvent être utilisés pour toutes applications, en particulier comme médicament en thérapie cellulaire chez l'homme ou l'animal.

Préférentiellement, les microcompartiments selon l'invention peuvent être utilisés dans la

prévention ou le traitement de maladies auto-immunes, de syndromes d'immunodéficience, de cancers, de maladies virales ou de malades inflammatoires.

Ainsi, le microcompartiment selon l'invention est adapté à la culture à grande échelle en fournissant des lymphocytes présentant un phénotype fonctionnel garantissant une efficacité et une persistance optimale in vivo.

Procédé de préparation de microcompartiments selon l'invention

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

Le microcompartiment selon l'invention peut être obtenu à partir de lymphocytes ou de cellules aptes à se différencier en lymphocytes (cellules souches, notamment cellules souches pluripotentes induites, cellules souches hématopoïétiques dont des cellules CD34+, etc...).

Selon un premier mode de réalisation, le microcompartiment selon l'invention est obtenu à partir de lymphocytes.

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

-(a) incuber les lymphocytes dans un milieu de culture comprenant des cytokines

-(b) encapsuler les lymphocytes lavés dans un milieu de culture dans une couche d'hydrogel, préférentiellement sans ajouter de matrice extracellulaire ou sans ajouter d'élément de matrice extracellulaire, pour former un microcompartiment en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, de façon à ce que chaque microcompartiment comprennent au moins 5 lymphocytes dans sa partie interne.

-(c) cultiver les microcompartiments obtenus à l'étape (b) dans un milieu de culture comprenant des cytokines, pendant 2 à 6 jours.

L'étape (a) d'incubation du procédé selon l'invention comprend entre 0,5 et 2 millions de lymphocytes par ml de milieu de culture, préférentiellement 1 million de lymphocytes par ml de milieu de culture.

Les lymphocytes de l'étape (a) sont préférentiellement des lymphocytes T et/ou des lymphocytes NK.

Préférentiellement, le procédé de préparation selon l'invention comprend une étape

préalable à l'incubation des lymphocytes, qui consiste à activer lesdits lymphocytes à l'aide d'un système d'activation artificielle (aAPC) pendant 3 jours pré-encapsulation.

Selon un mode de réalisation particulier, l'activation des lymphocytes est effectuée à l'aide d'un système d'activation artificielle (aAPC) au sein du microcompartiment issu de l'étape (b).

Tout milieu de culture adapté à la culture de lymphocytes, notamment de lymphocytes T ou lymphocytes NK peut être utilisé, tel que le milieu « TexMACS (Miltenyi Biotec) » ou «VIVO 15-20 (Lonza) » ou « CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher) » par exemple.Chaque microcompartiment obtenu à l'étape (b) comprend au moins 0,5 million de cellules par mL de volume de la partie interne du microcompartiment, plus préférentiellement au moins 1 million de cellules/mL, notamment au moins 2 millions de cellules/mL, encore plus préférentiellement 5 millions de cellules par mL.

De façon préférée, chaque microcompartiment obtenu à l'étape (b) comprend au moins 5 lymphocytes, préférentiellement au moins 8 lymphocytes dans sa partie interne.

Les cytokines contenues dans le milieu de culture peuvent être par exemple un ou plusieurs cytokines telles qu'IL-2 ou un mélange d'IL-7 et IL-15, ou IL-17 et/ou IL-18 et/ou IL-21 ou d'autres cytokines connues de l'homme du métier pour stimuler la prolifération des lymphocytes.

Préférentiellement, les milieux de culture utilisés dans le procédé de préparation de l'invention pour des lymphocytes T sont supplémentés de 100 à 1000 unités/ml d'IL2 ou la combinaison de 300 à 600 unités/ml d'IL7 et 50 à 100 unités /ml d'IL15.

Dans le procédé selon l'invention la totalité des lymphocytes encapsulés initialement à l'étape (b) représentent préférentiellement un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel ils sont encapsulés, plus préférentiellement inférieur à 40%, 30%, 20%, 10% du volume du microcompartiment dans lequel ils sont encapsulées.

Les lymphocytes encapsulés sont en suspension sous forme de cellules uniques et/ou d'amas ou ensemble(s) d'au moins deux cellules (« cluster(s) » / regroupements). De façon préférée, lorsqu'il y a au moins 15 lymphocytes la ou les cellules uniques représentent moins de 50% en nombre de la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b).

Préférentiellement chaque amas de lymphocytes encapsulé initialement à l'étape (b) a une plus grande dimension inférieure à 20% de la plus grande dimension d'un microcompartiment dans lequel il est encapsulé, encore plus préférentiellement inférieure à 10%. En effet les

regroupements de lymphocytes ne doivent pas avoir une trop grande taille par rapport à la taille du microcompartiment car une dimension trop grande de ces amas cellulaires initiaux, pourrait entrainer, lors des divisions cellulaires, une confluence cellulaire plus précoce dans la capsule ; cette confluence trop précoce de toute ou partie des capsules, pourrait entrainer une augmentation des pressions intracellulaires et entrainer un stress cellulaire, impactant la croissance cellulaire mais également la ségrégation chromosomique.

L'étape (b) d'encapsulation est mise en œuvre selon les techniques connues de l'homme du métier. En effet, toute méthode de production de microcompartiments cellulaires contenant à l'intérieur d'une capsule d'hydrogel et des cellules peut être utilisée pour la mise en œuvre du procédé de préparation selon l'invention. Notamment, il est possible de préparer des microcompartiments en adaptant la méthode et le dispositif microfluidique décrits dans Alessandri *et al.*, 2016 (« A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC) », Lab on a Chip, 2016, vol. 16, no. 9, p. 1593-1604), conformément aux étapes décrites ci-dessous.

Préférentiellement l'étape (b) est mise en œuvre sans ajouter de matrice extracellulaire, naturelle ou de synthèse. Selon une variante, l'étape (b) est mise en œuvre sans ajouter d'élément de matrice extracellulaire.

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

- une solution d'hydrogel, par exemple d'alginate,
- optionnellement une solution intermédiaire isotonique préférentiellement une solution isotonique ne contenant pas de cation divalent tel que Ca^{2+} Mg^{2+} pour éviter une réticulation de l'hydrogel trop précoce dans l'injecteur, telle que par exemple une solution de sorbitol,
- la solution issue de l'étape (a) comprenant des lymphocytes et du milieu de culture.

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 la solution de l'étape (a) comprenant les lymphocytes ; Ces gouttes sont collectées dans un bain de calcium qui réticule et/ou gélifie la solution d'alginate pour former la coque.

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

Selon l'invention, il est nécessaire de générer des capsules dont la partie interne a un rayon moyen ou plus petit rayon d'au moins 100µm. Pour générer des capsules avec de telles dimensions avec une puce de coextrusion (injecteur microfluidique ou puce microfluidique) l'invention propose notamment de modifier le débit des solutions coextrudées et l'ouverture finale de la puce de co-extrusion. Par débit on entend le débit de de chaque solution qui arrive à l'injecteur. Par ouverture finale de la puce de co-extrusion, on entend l'ouverture interne du canal de sortie de la puce.

- pour le débit : on passe préférentiellement d'une valeur comprise entre 20 et 40 ml/h pour chaque solution coextrudée pour les tailles standards de capsules connues de l'art antérieur, à une valeur comprise entre 45 et 150 mL/h, préférentiellement entre 45 et 110 mL par heure pour une variante de l'invention,
- pour le diamètre de l'ouverture finale de la puce de coextrusion (injecteur microfluidique) qui passe d'une valeur préférentiellement comprise entre 50 et 120 µm pour les tailles standards de capsules connues de l'art antérieur, à une valeur de diamètre comprise entre 150 et 300 µm, préférentiellement entre 180 et 240 µm.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier l'étape (b) d'encapsulation est réalisée à l'aide d'un injecteur microfluidique dont le diamètre d'ouverture finale est compris entre 150 et 300 µm, préférentiellement entre 180 et 240 µm, et avec le débit de chacune des 3 solutions compris entre 45 et 150 mL/h, préférentiellement entre 45 et 110 mL/h.

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

permet un contrôle homogène de niveau d'oxygénation cellulaire ; évitant ainsi les phénomènes de nécrose lié à l'hypoxie, ou de stress oxydatif lié à l'hyperoxie.

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

Dans une variante préférée, le procédé selon l'invention comprend au moins une ré-encapsulation des lymphocytes après l'étape (c), c'est-à-dire au moins deux cycles d'encapsulation. Préférentiellement chaque cycle d'encapsulation correspond à un passage. Dans cette variante du procédé (au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (c)) le nombre de divisions cellulaires de l'ensemble du procédé (pour l'ensemble des passages) est d'au moins 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 cycles de division cellulaire.

Dans un procédé selon l'invention il peut y avoir plusieurs ré-encapsulations, préférentiellement entre 1 et 100, notamment entre 1 et 10 ré-encapsulation(s).

Selon un mode de réalisation particulier, une étape d'activation des lymphocytes à l'aide d'un système d'activation artificielle (aAPC) peut être réalisée au sein du microcompartiment après au moins une ré-encapsulation.

Chaque ré-encapsulation peut comprendre :

- une étape qui consiste à dissocier le microcompartiment ou la série de microcompartiments pour obtenir une suspension de lymphocytes ou une suspension d'amas de lymphocytes ; l'élimination de la couche externe en hydrogel peut être réalisée notamment par hydrolyse, dissolution, perçage et/ou rupture par tout moyen biocompatible, c'est-à-dire non toxique pour les cellules. Par exemple, l'élimination peut être réalisée en utilisant un tampon 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 d'activation des lymphocytes à l'aide d'un système d'activation artificielle (aAPC) préférentiellement à l'aide d'anticorps CD3/CD28 ;

-une étape de ré-encapsulation de tout ou partie des lymphocytes ou amas de lymphocytes dans une capsule d'hydrogel. La ré-encapsulation est un moyen adapté pour une augmentation de l'amplification cellulaire obtenue depuis l'étape pluripotente, et diminuer les risques de mutation.

La ré-encapsulation consiste à éliminer la couche externe d'hydrogel, préférentiellement à remettre en suspension de manière partiellement ou totalement dissociées les cellules qui

étaient sous forme de cystes dans les microcompartiments et à remettre en œuvre les étapes du procédé.

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

- (i) éliminer la couche externe en hydrogel,
- (ii) remettre en suspension les lymphocytes qui étaient contenues dans le microcompartiment de façon à obtenir des cellules uniques et/ou au moins un ensemble ou amas de lymphocytes dans un milieu de culture contenant des cytokines
- (iii) encapsuler la solution de lymphocytes dans une couche d'hydrogel de façon à former un microcompartiment de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne , le plus petit rayon ou le rayon moyen de ladite partie interne étant d'au moins 100 µm ;
- (iv) cultiver les microcompartiments obtenus dans un milieu de culture contenant des cytokines,
- (vi) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer les cytokines ;
- (vi) cultiver les microcompartiments dans un milieu de culture dépourvu de cytokines, pendant au moins un cycle de division cellulaire, et
- (vii) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

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

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

4°C) pour gérer le stress des cellules à l'étape (c).

À tout moment, le procédé selon l'invention peut comprendre une étape consistant à vérifier le phénotype des cellules contenues dans le microcompartiment. Cette vérification peut être réalisée en identifiant l'expression par au moins une partie des cellules contenues dans le microcompartiment, d'au moins 4 gènes spécifiques du phénotype recherché choisis parmi CD45 RA RO, CCR7, CD62L, CD3, CD4, CD8, CD56, CD16.

Les microcompartiments cellulaires obtenus selon les procédés de l'invention peuvent ensuite être congelés avant toute utilisation. La congélation est préférentiellement réalisée à une température comprise entre -190°C et -80°C. La décongélation peut être réalisée par immersion du véhicule de congélation étanche (ampoule vissable ou poche plastique) dans un bain d'eau tiède (37 degrés préférentiellement) pour que les cellules décongèlent assez rapidement. Les microcompartiments selon l'invention avant leur utilisation peuvent être maintenus à plus de 4°C pendant une durée limitée avant leur utilisation, préférentiellement entre 4°C et 38°C.

La mise en œuvre du procédé selon l'invention, permet d'obtenir des microcompartiments comprenant au moins 80, préférentiellement au moins 500, au moins 800, au moins 1000, notamment au moins 3000 lymphocytes.

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

Selon un second mode de réalisation, le microcompartiment selon l'invention est obtenu à partir de cellules aptes à se différencier en lymphocytes, et comprend au moins la mise en œuvre d'un procédé de différenciation en lymphocytes de cellules aptes à se différencier en lymphocytes (cellules souches, notamment cellules souches pluripotentes induites, cellules souches hématopoïétiques dont des cellules CD34+, etc…).

Les cellules aptes à se différencier en lymphocytes sont préférentiellement choisies parmi :

* soit des cellules souches capables de se différencier en lymphocytes, au moins en lymphocytes T ou lymphocytes NK, préférentiellement des cellules souches embryonnaires ou des cellules souches pluripotentes induites ou des cellules souches hématopoïétiques dont des cellules CD34+, très préférentiellement des cellules souches pluripotentes induites, et/ou,

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

lymphocytes T ou lymphocytes NK,

*soit 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 lymphocytes, au moins en lymphocytes T ou lymphocytes NK.

Dans cette variante, le procédé peut comprend au moins la mise en œuvre des étapes qui consistent à :

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

* préférentiellement au moins des éléments de matrice extracellulaire ou une matrice extracellulaire, naturelle ou de synthèse,

* des cellules aptes à se différencier en lymphocytes, préférentiellement des cellules souches pluripotentes induites (IPS),

- induire la différenciation cellulaire en lymphocytes au sein du microcompartiment cellulaire, de manière à obtenir au moins des lymphocytes.

Exemples :

Exemple 1 : Procédé selon l'invention (Lymphocytes T)

Réactifs utilisés :

-Solution 1 : Milieu de culture utilisé : TexMACS (Miltenyi Biotec) supplémenté avec 1000 unités/ml d'IL-2 recombinant (Miltenyi Biotec)

-Solution 2 : Réactif d'activation polyantigénique CD3/CD28 (Transact™ Miltenyi Biotec)

-Solution 3 : Milieu de rinçage des capsules : DMEM/F-12 + Glutamax

-Solution 4 : Solution pour dissoudre les capsules d'alginate : tampon de détachement cellulaire non-enzymatique (RelesR™ Stem Cell Technology).

Etape 1 : décongélation des cellules (J0)

Les ampoules de lymphocytes T triés à partir de sang périphérique de donneur sain ont été décongelées selon les recommandations du fournisseur (Hu PB Pan-T, Stem Cell Technologies, #70024).

Etape 2 : Activation des lymphocytes T (J0)

Les lymphocytes T ont été comptés au NucleoCounter NC2000 (protocole Standard 1 cassette) et mise en culture dans la solution 1 à une densité de 1 million de cellules par ml dans une

flasque de culture.

La solution 2 a été ajoutée au 1/100 dans la suspension cellulaire ainsi préparée.

Les cellules ainsi traitées ont été laissées en culture dans un incubateur à 37°C et 5% de CO2 pendant 3 jours.

Etape 3 : Changement de milieu et encapsulation (J3) :

Afin d'éliminer le Transcart™ dans le milieu, les cellules ont été centrifugées à 300g pendant 10 min et le surnageant aspiré.

Les cellules ont été rincées en solution 1 une fois.

Une partie du culot cellulaire a été repris en solution 1 a une densité cellulaire de 5 millions de cellules par ml en vue de l'encapsulation.

L'autre partie du culot cellulaire a été repris en solution 1 a une densité cellulaire de 5 millions de cellules par ml (contrôle).

Etape 4 : Encapsulation (J3)

Le dispositif d'encapsulation est préparé comme décrit dans Alessandri et al., 2016 (« A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC) », Lab on a Chip, 2016, vol. 16, no. 9, p. 1593-1604).

Les trois solutions nécessaires sont chargées sur trois pousse-seringues, i) solution d'alginate (PRONOVA®SLG100 à 2% en masse dans de l'eau distillée), ii) solution intermédiaire (sorbitol à 300mM), iii) solution cellulaire (préparée à l'étape précédente) ; Les trois solutions sont co-injectées de manière concentrique grâce à un injecteur microfluidique qui permet de former un jet qui se fractionne en gouttes dont la couche extérieure est la solution d'alginate et le cœur la solution de cellules ; Ces gouttes sont collectées dans un bain de calcium (à 100mM) qui rigidifie la solution d'alginate pour former la coque.

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

Une image de microscopie à contraste de phase au grossissement x20 d'un ensemble après 3 jours de culture en capsules est présentée en figure 1a. Une image de microscopie à contraste de phase au grossissement x10 après 3 jours de culture en capsules est présentée en figure 1b.

Etape 5 : traitement après encapsulation (J3)

Les capsules sont récupérées avec un tamis cellulaire 40µm puis après rinçage (1x) avec la solution 3 elles sont stockées dans une flasque de 75cm² avec la solution 1 a une densité cellulaire de 100 000 cellules par ml (condition 1) ou 200 000 cellules par ml (condition 2).

La flasque est gardée à l'incubateur à 37°C et 5% de CO2 pendant 3 jours.

Les cellules non encapsulées telles que préparées durant la 3ème étape sont cultivées en parallèle dans les mêmes conditions atmosphériques pendant 3 jours.

Etape 6 : Dissolution des capsules et comptage (J6)

-(a) : Bras 1 : capsule

-La suspension de capsules a été prélevée et laissée à sédimenter pendant 5 minutes dans un tube Falcon de 50ml.

-Le surnageant a été prélevé avec précaution et éliminé.

-Les capsules ont ensuite été traitées avec la solution 4 pendant 5 min à 37°C.

-Les cellules libérées des capsules ont été centrifugées à 300g pendant 10minutes pour éliminer la solution 4.

-Les cellules ont été finalement comptées au NC2000 (protocole standard 1 cassette)

-(b) : Bras 2 : contrôle en suspension

-La suspension cellulaire a été prélevée puis centrifugée à 300g pendant 10min.

-Le surnagent a été aspiré.

-Les cellules ont ensuite été comptées au NC2000 (protocole standard 1 cassette).

Les résultats d'encapsulation de lymphocytes T selon le protocole décrit montre une meilleure amplification cellulaire en capsules par rapport à une culture classique en suspension. Ainsi nous obtenons un facteur d'amplification de fois 20 en 3 jours de culture en capsule contre un facteur de fois 2 pour une culture classique.

Exemple 2 : Mesure de la sécrétion de cytokines de lymphocytes T encapsulés ou non

Le kit de détection utilisé est le MACSPlex Cytotoxic T/NK Cell Kit (Miltenyi Biotec, 130-125-800)

La préparation des différents réactifs et solutions a été faite selon les recommandations du fournisseur dans la plaque MACSPlex Filter Plate

Les surnageants de culture des cellules encapsulées ou non ont été prélevés à jour 6 après,

non dilués, et incubés en duplicat et incubés dans la plaque préparée en étape 2 de l'exemple 1 ;

L'incubation a été réalisée en accord avec les recommandations du fournisseur ;

L'acquisition des données a été réalisée sur un cytomètre MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec) en utilisant un Express Mode dédié (Miltenyi Biotec).

Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence par million de cellules (MFI/e6 cellules) dans le tableau 1 et dans la figure 4 (résultats normalisés par rapport à la sécrétion de GM-CSF et d'IFNg).

[Tableau 1]

Surnageant non dilué	GM-CSF	Granzyme B	IFNg	IL-21	IL-6	MCP-1	Perforine	TNF-α
Lymphocytes T en suspension	499,3	1339,4	28,9	1,1	4,6	18,9	65,4	108,5
Lymphocytes T encapsules (invention)	22,2	0,9	1,2	0,1	0,6	1,6	1,8	0,2
Lymphocytes T en suspension normalisé par rapport à la sécrétion de GMCSF et d'IFNg	1,890571753	5,071563802	0,109428247	0,004165089	0,017417645	0,071563802	0,247633472	0,410829231
Lymphocytes T encapsulés normalisé par rapport à la sécrétion de GMCSF et d'IFNg	1,897435897	0,076923077	0,102564103	0,008547009	0,051282051	0,136752137	0,153846154	0,017094017
Ratio invention/suspension	1,003630724	0,015167526	0,937272647	2,052059052	2,94425864	1,910912133	0,621265585	0,041608571

Ces résultats confirment notamment que les lymphocytes encapsulés dans le microcompartiment selon l'invention présentent une concentration en granzyme B, en perforine et en TNF alpha extracellulaires moins importante par rapport aux lymphocytes en suspension.

Exemple 3 : Polarisation d'un microcompartiment selon l'invention

Les microcompartiment selon l'invention comprenant des lymphocytes T ont été fixés en PFA 4% dilué dans du PBS avec calcium et conservées à 4°C

Protocole de marquage :

Le marquage phalloidin et Lipilight (Membright) ont été fait aux dilutions recommandées par les fournisseurs pendant 72h sous agitation, à température ambiante et protégé de la lumière

L'acquisition des images (Figure 5) a été faite en microscopie confocale.

On peut observer un microcompartiment selon l'invention comprenant des lymphocytes dont le noyau est excentré. Par conséquent, les lymphocytes sont polarisés au sein du microcompartiment et présentent ainsi un phénotype fonctionnel.

Exemple 4 : Procédé selon l'invention (lymphocytes NK)

Réactifs utilisés :

-Solution 1 : Milieu de culture basal pour expansion de NK (ExCellerate Human NK Cell Expansion Media (R&D Systems)) supplémenté avec 27ng/ml d'IL-2 recombinant, 10 ng/mL d'IL-12 recombinant, 10ng/ml d'IL-18 recombinant et 10ng/ml d'IL-21 recombinant.

-Solution 2 : Solution 1 supplémentée avec des billes d'activation polyantigénique CD2/NKp46 (e.g. Cloudz Human NK Cell Expansion Kit (R&D Systems))

-Solution 3 : Milieu de rinçage des capsules : DMEM/F-12 + Glutamax

-Solution 4 : Solution pour dissoudre les capsules d'alginate : solution d'EDTA à 2.5mM

Etape 1 : décongélation des cellules (J0)

Les ampoules de NK triés à partir de sang périphérique de donneurs sains (donneur A et donneur B) ont été décongelées selon les recommandations du fournisseur (Hu PB NK, Stem Cell Technologies, #70036).

Les NK ont été comptés au NucleoCounter NC2000 (protocole Standard 1 cassette).

Les cellules ont été centrifugées à 300g pendant 10 min et le surnageant a été aspiré.

Une partie du culot cellulaire a été repris en solution 2 a une densité cellulaire de 15 millions de cellules par ml en vue de l'encapsulation.

L'autre partie du culot cellulaire a été repris en solution 2 a une densité cellulaire entre 0.2 et 1 millions de cellules par ml (contrôle).

Etape 2 : Encapsulation (J0)

Le dispositif d'encapsulation est préparé comme décrit dans Alessandri et al., 2016 (« A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC) », Lab on a Chip, 2016, vol. 16, no. 9, p. 1593-1604).

Les trois solutions nécessaires sont chargées sur trois pousse-seringues, i) solution d'alginate (PRONOVA®SLG100 à 2% en masse dans de l'eau distillée), ii) solution intermédiaire (sorbitol à 300mM), iii) solution cellulaire (préparée à l'étape précédente) ; Les trois solutions sont co-

injectées de manière concentrique grâce à un injecteur microfluidique qui permet de former un jet qui se fractionne en gouttes dont la couche extérieure est la solution d'alginate et le cœur la solution de cellules ; Ces gouttes sont collectées dans un bain de calcium (à 100mM) qui rigidifie la solution d'alginate pour former la coque.

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

Etape 3 : traitement après encapsulation (J0)

Les capsules sont récupérées avec un tamis cellulaire 40µm puis après rinçage (1x) avec la solution 3 elles sont stockées dans une flasque de 75cm² (Donneur A) ou dans un mini-bioréacteur de 30mL (Donneur B) avec la solution 1 a une densité cellulaire comprise entre 200 000 et 1 000 000 cellules par ml.

La flasque ou le mini-bioréacteur de 30mL sont gardés à l'incubateur à 37°C et 5% de CO2 pendant 11 à 14 jours. Les capsules en mini-bioréacteur sont agitées à 100 RPM. Le renouvellement du milieu de culture est effectué selon les recommandations des fournisseurs.

Les cellules non encapsulées telles que préparées durant la 3ème étape sont cultivées en parallèle dans les mêmes conditions pendant 11 à 14 jours.

Etape 6 : Dissolution des capsules et comptage (J11 ou J14, selon la confluence des capsules)

-(a) : Bras 1 : capsule

-La suspension de capsules a été prélevée et laissée à sédimenter pendant 5 minutes dans un tube Falcon de 50ml.

-Le surnageant a été prélevé avec précaution et éliminé.

-Les capsules ont ensuite été traitées avec la solution 4 pendant 5 min à 37°C.

-Les cellules libérées des capsules ont été centrifugées à 300g pendant 10minutes pour éliminer la solution 4.

-Les billes d'activations sont éliminées selon les recommandations du fournisseur.

-Les cellules ont été finalement comptées au NC2000 (protocole standard 1 cassette)

-(b) : Bras 2 : contrôle en suspension

-La suspension cellulaire a été prélevée puis centrifugée à 300g pendant 10min.

-Le surnagent a été aspiré.

-Les billes d'activations sont éliminées selon les recommandations du fournisseur.

-Les cellules ont ensuite été comptées au NC2000 (protocole standard 1 cassette).

Les résultats d'encapsulation de NK selon le protocole décrit une meilleure amplification cellulaire en capsules par rapport à une culture classique en suspension, comme illustré dans la figure 6. Ainsi, pour le donneur A, nous obtenons un facteur d'amplification de fois 40 en 14 jours de culture en capsule contre un facteur de fois 3 pour une culture classique. Pour le donneur B, nous obtenons un facteur d'amplification de fois 110 en 11 jours de culture en capsule contre un facteur de fois 70 pour une culture classique.

La figure 10 montre que la viabilité lors de la culture des NK obtenus selon l'invention est meilleure que celle des celle des NK cultivés en 2D. Pour le donneur A, la viabilité à J14 est de 74% pour la culture en capsule contre 64% pour la culture en suspension. Pour le donneur B, la viabilité à J11 est de 88% pour la culture en capsule contre 62% en suspension.

Exemple 5 : Mesure de la sécrétion de cytokines de lymphocytes NK encapsulés ou non

Le kit de détection utilisé est le MACSPlex Cytotoxic T/NK Cell Kit (Miltenyi Biotec, 130-125-800)

La préparation des différents réactifs et solutions a été faite selon les recommandations du fournisseur dans la plaque MACSPlex Filter Plate

Les surnageants de culture des cellules encapsulées ou non ont été prélevés 14 jours après, dilués au 10^e ou au 100^e, et incubés en duplicat dans la plaque préparée en étape 2 de l'exemple 4 ;

L'incubation a été réalisée en accord avec les recommandations du fournisseur ;

L'acquisition des données a été réalisée sur un cytomètre MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec) en utilisant un Express Mode dédié (Miltenyi Biotec).

Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence par million de cellules (MFI/e6 cellules) dans les tableaux 2 et 3 et dans les figures 7a, 7b (Donneur A) et 8a, 8b (Donneur B).

[Tableau 2]

Surnageant dilué au 10e	GM-CSF	IL-10	IL-17A	IL-6	MCP-1	Perforine
NK, donneur A en suspension	168,3	1,2	8	635	3,8	94,7
NK, donneur A en capsule (invention)	14,8	5,5	0,8	25	7,7	27
NK, donneur B en suspension	60,9	3,9	2,7	9,6	2,8	110,3
NK, donneur B en capsule (invention)	3,3	0,3	0,9	0,5	0,4	3,5
NK, donneur A en suspension normalisé par rapport à la sécrétion d'IFNg	0,014763158	0,000105263	0,000701754	0,055701754	0,000333333	0,008307018
NK, donneur A en capsule normalisé par rapport à la sécrétion d'IFNg	0,001679337	0,000624078	9,0775E-05	0,002836718	0,000873709	0,003063656
NK, donneur B en suspension normalisé par rapport à la sécrétion d'IFNg	0,022989807	0,001472254	0,001019253	0,003624009	0,001057003	0,041638354
NK, donneur B en capsule normalisé par rapport à la sécrétion d'IFNg	0,013414634	0,001219512	0,003658537	0,00203252	0,001626016	0,014227642
Ratio invention/suspension donneur A	0,113751906	5,928741632	0,129354363	0,050926915	2,621127879	0,368803358
Ratio invention/suspension donneur B	0,583503544	0,828330206	3,589430894	0,560848577	1,538327526	0,341695597

[Tableau 3]

Surnageant dilué au 100e	Granzyme	IFNg
NK, donneur A en suspension	3700	11400
NK, donneur A en capsule (invention)	208	8813
NK, donneur B en suspension	474	2649
NK, donneur B en capsule (invention)	4	246
NK, donneur A en suspension normalisé par rapport à la sécrétion d'IFNg	0,324561404	1
NK, donneur A en capsule normalisé par rapport à la sécrétion d'IFNg	0,023601498	1
NK, donneur B en suspension normalisé par rapport à la sécrétion d'IFNg	0,178935447	1
NK, donneur B en capsule normalisé par rapport à la sécrétion d'IFNg	0,016260163	1
Ratio invention/suspension donneur A	0,072718128	1
Ratio invention/suspension donneur B	0,090871668	1

Ces résultats confirment notamment que les lymphocytes NK encapsulés dans le microcompartiment selon l'invention présentent une concentration en granzyme B, en perforine, en GM-CSF et en IL-6 moins importante par rapport aux lymphocytes NK en suspension.

Exemple 6 : Mesure de la fonctionnalité de lymphocytes NK encapsulés ou non

La mesure a été réalisée par cytométrie en flux sur des K562 selon le protocole le suivant.

Après décapsulation, marquage des NK (NK donneurs B obtenus selon les procédés de l'exemple 4, bras capsule et bras contrôle en suspension) avec la sonde PKH-26, puis incubation pendant 4h à 37°C 5% CO2 des NK avec K562 a différents ratios E :T (« effector to target » effecteur à cible) : 12.5 :1 / 6.25 :1 / 3.125 :1 / 1.5 :1. Marquage Annexin V et 7-AAD. La stratégie d'analyse des data de cytométrie a été réalisée comme suit : séparation des

populations de NK et de K562 en utilisant la sonde PKH-26 (K562 = population négative) :

- les K562 vivants sont négatifs pour 7aad-/AnnexinV-
- Les K562 en apoptose précoce sont 7AAD-/AnnexinV+
- Les K562 en apoptose tardive sont 7AAD+/AnnexinV+
- Les K562 nécrotiques ou mortes sont 7AAD+/AnnexinV-.

Le pourcentage de cytotoxicité a été calculé comme suit :

%Cytotoxicité = (apoptose précoce + apoptose tardive + nécrose) / total K562

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 9. On constate que les NK obtenus selon l'invention ont une cytotoxicité similaire aux NK obtenus en 2D.

Exemple 7 Procédé selon l'invention (lymphocytes NK)

Réactifs utilisés :

-Solution 1 : Milieu de culture basal pour expansion de NK (ExCellerate Human NK Cell Expansion Media (R&D Systems)) supplémenté avec 27ng/ml d'IL-2 recombinant, 10 ng/mL d'IL-12 recombinant, 10ng/ml d'IL-18 recombinant et 10ng/ml d'IL-21 recombinant.

-Solution 2 : Milieu de rinçage des capsules : DMEM/F-12 + Glutamax

-Solution 3 : Solution pour dissoudre les capsules d'alginate : solution d'EDTA à 2.5mM

Etape 1 : décongélation des cellules (J0)

Les ampoules de NK triés à partir de sang périphérique de donneurs sains (donneur B et donneur C) ont été décongelées selon les recommandations du fournisseur (Hu PB NK, Stem Cell Technologies, #70036).

Les NK ont été comptés au NucleoCounter NC2000 (protocole Standard 1 cassette).

Les cellules ont été centrifugées à 300g pendant 10 min et le surnageant a été aspiré.

Une partie du culot cellulaire a été repris en solution 1 a une densité cellulaire entre 5 et 15 millions de cellules par ml en vue de l'encapsulation.

L'autre partie du culot cellulaire a été repris en solution 1 a une densité cellulaire entre 0.2 et 1 millions de cellules par ml (contrôle).

Etape 2 : Encapsulation (J0)

Le dispositif d'encapsulation est préparé comme décrit dans Alessandri et al., 2016 (« A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC) », Lab on a Chip, 2016, vol. 16, no.

9, p. 1593-1604).

Les trois solutions nécessaires sont chargées sur trois pousse-seringues, i) solution d'alginate (PRONOVA®SLG100 à 2% en masse dans de l'eau distillée), ii) solution intermédiaire (sorbitol à 300mM), iii) solution cellulaire (préparée à l'étape précédente) ; Les trois solutions sont co-injectées de manière concentrique grâce à un injecteur microfluidique qui permet de former un jet qui se fractionne en gouttes dont la couche extérieure est la solution d'alginate et le cœur la solution de cellules ; Ces gouttes sont collectées dans un bain de calcium (à 100mM) qui rigidifie la solution d'alginate pour former la coque.

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

Etape 3 : traitement après encapsulation (J0)

Les capsules sont récupérées avec un tamis cellulaire 40µm puis après rinçage (1x) avec la solution 2 elles sont stockées dans un mini-bioréacteur de 30mL avec la solution 1 a une densité cellulaire de 200.000 cellules par ml.

Les mini-bioréacteurs de 30mL sont gardés à l'incubateur à 37°C et 5% de CO2 pendant 11 jours. Les capsules en mini-bioréacteur sont agitées à 100 RPM. Le renouvellement du milieu de culture est effectué selon les recommandations des fournisseurs.

Les cellules non encapsulées telles que préparées durant la 3ème étape sont cultivées en parallèle dans les mêmes conditions pendant 11 jours.

Etape 6 : Dissolution des capsules et comptage (J11)

-(a) : Bras 1 : capsule

-La suspension de capsules a été prélevée et laissée à sédimenter pendant 5 minutes dans un tube Falcon de 50ml.

-Le surnageant a été prélevé avec précaution et éliminé.

-Les capsules ont ensuite été traitées avec la solution 3 pendant 5 min à 37°C.

-Les cellules libérées des capsules ont été centrifugées à 300g pendant 10minutes pour éliminer la solution 3.

-Les cellules ont été finalement comptées au NC200~~0~~ (protocole standard 1 cassette)

-(b) : Bras 2 : contrôle en suspension

-La suspension cellulaire a été prélevée puis centrifugée à 300g pendant 10min.

-Le surnagent a été aspiré.

-Les cellules ont ensuite été comptées au (protocole standard 1 cassette).

Une image de microscopie à contraste de phase au grossissement x4 d'un ensemble au jour de l'encapsulation est présentée en figure 11a. Une image de microscopie à contraste de phase au grossissement x10 après 11 jours de cultures en capsules est présentée en figure 11b.

Les résultats d'encapsulation de NK selon le protocole décrit une meilleure amplification cellulaire en capsules par rapport à une culture classique en suspension, comme illustré dans la figure 12a. Ainsi, pour le donneur B, le facteur d'amplification est de fois 135 en 11 jours de culture en capsule contre un facteur de fois 72 pour une culture classique. Pour le donneur C, le facteur d'amplification est de fois 41 en 11 jours de culture en capsule contre un facteur de fois 28 pour une culture classique.

La figure 12b montre que la viabilité lors de la culture des NK obtenus selon l'invention est meilleure que celle des celle des NK cultivés en 2D. Pour le donneur B, la viabilité à J11 est de 82% pour la culture en capsule contre 69% pour la culture en suspension. Pour le donneur C, la viabilité à J11 est de 73% pour la culture en capsule contre 51% en suspension.

Revendications

[Revendication 1] Microcompartiment cellulaire en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant dans un milieu entre 500 et 5000 lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions et ayant une teneur en TNF alpha inférieure à 100ng/mL de milieu.

[Revendication 2] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la partie interne comprend des lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions sans lumen.

[Revendication 3] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il a été obtenu après encapsulation de lymphocytes sans ajout de matrice extracellulaire ou sans ajout d'élément de matrice extracellulaire.

[Revendication 4] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en en ce qu'il a été obtenu après l'encapsulation de lymphocytes préalablement activés.

[Revendication 5] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que l'épaisseur de la couche externe est variable et comprise entre 20 et 60µm.

[Revendication 6] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les lymphocytes sont polarisés.

[Revendication 7] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que le nombre de lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions est compris entre 500 et 5000.

[Revendication 8] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que le nombre de lymphocytes formant une culture groupée en trois dimensions est compris entre 1000 et 3000.

[Revendication 9] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les lymphocytes sont des lymphocytes T ou des lymphocytes NK.

[Revendication 10] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les lymphocytes sont des lymphocytes exprimant un récepteur antigénique chimérique.

[Revendication 11] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les lymphocytes sont des lymphocytes T et en ce qu'il présente :

- une teneur en en perforine inférieure à 0,5 µg/ml de milieu, et/ou
- une teneur en granzyme B inférieure à 1 µg /mL de milieu.

[Revendication 12] Microcompartiment selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les lymphocytes sont des lymphocytes NK et en ce qu'il présente :

- une teneur en en perforine inférieure à 0,5µg/ml de milieu, et/ou
- une teneur en granzyme B inférieure à 1 µg /mL de milieu, et/ou
- une teneur en IL6 inférieure à 0,5µg/ml de milieu et/ou
- une teneur en GM-CSF inférieure à 0,5µg/ml de milieu.

[Revendication 13] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la couche externe comprend de l'alginate.

[Revendication 14] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la partie interne comprend une solution comprenant de l'IL2 ou la combinaison d'IL7 et d'IL15 ou IL12, IL18, IL21 ou la combinaison d'au moins deux cytokines choisies parmi IL2, IL12, IL18 et IL21.

[Revendication 15] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend des lymphocytes T et en ce que la proportion de lymphocyte T naif et/ou Tscm reste supérieure à 20%.

[Revendication 16] Ensemble de microcompartiments comprenant au moins deux microcompartiments cellulaires en trois dimensions, caractérisé en ce qu'au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'une des revendications 1 à 15.

[Revendication 17] Ensemble de microcompartiments selon la précédente revendication, caractérisé en ce que les microcompartiments sont disposés dans un milieu de culture dans un bioréacteur.

[Revendication 18] Microcompartiment selon l'une des revendications 1 à 15, pour son utilisation comme médicament.

[Revendication 19] Microcompartiment selon l'une revendications 1 à 15, pour son utilisation dans la prévention ou le traitement de maladies auto-immunes, de syndromes d'immunodéficience, de cancers, de maladies virales ou de maladies inflammatoires.

[Revendication 20] Procédé de préparation d'un microcompartiment selon l'une des revendications 1 à 15 ou d'un ensemble de microcompartiments cellulaires selon l'une des revendications 16 ou 17, comprenant les étapes suivantes :

- (a) incuber des lymphocytes dans un milieu de culture comprenant des cytokines,
- (b) encapsuler les lymphocytes dans leur milieu de culture dans une couche d'hydrogel, préférentiellement sans ajouter de matrice extracellulaire, pour former un microcompartiment en trois dimensions clos de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, dont la plus petite dimension est comprise entre 200 et 400µm, de façon à ce que chaque microcompartiment comprennent au moins 5 cellules dans sa partie interne,
- (c) cultiver les microcompartiments obtenus à l'étape (b) dans un milieu de culture comprenant au moins des cytokines, pendant 2 à 6 jours.

[Revendication 21] Procédé de préparation d'un microcompartiment selon la précédente revendication, caractérisé en ce qu'il comprend une étape préalable à l'incubation des lymphocytes, qui consiste à activer lesdits lymphocytes.

[Revendication 22] Procédé de préparation d'un microcompartiment selon l'une des revendications 20 à 21, caractérisé en ce que les milieux de culture comprennent de 100 à 1000 unités/ml d'IL2 ou la combinaison de 300 à 600 unités/ml d'IL7 et 50 à 100 unités /ml d'IL15.

[Revendication 23] Procédé de préparation d'un microcompartiment selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisé en ce qu'à l'étape (a) entre 0,5 et 2 millions de lymphocytes sont incubées par ml de milieu de culture.

[Revendication 24] Procédé selon l'une des revendications 20 à 23, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée par co-injection de deux solutions :

- une solution d'hydrogel,
- la solution issue de l'étape a) comprenant des lymphocytes et du milieu de culture,

de manière concentrique via un injecteur microfluidique qui permet de former un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange des deux 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 issue de l'étape (a) comprenant des lymphocytes et du milieu de culture.

[Revendication 25] Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'injecteur microfluidique a un diamètre d'ouverture finale est compris entre 150 et 300µm.

[Revendication 26] Procédé selon la revendication 20 à 25, caractérisé en ce que le débit de chacune des deux solutions est compris entre 45 et 150 mL/h.

[Revendication 27] Procédé selon l'une des revendications 20 à 26, caractérisé en ce que la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b) représente un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

[Revendication 28] Procédé selon l'une des revendications 20 à 27, caractérisé en ce que les étapes (a) et/ou (c) sont mises en œuvre sous agitation permanente ou séquentielle.

[Revendication 29] Procédé selon l'une des revendications 20 à 28, caractérisé en ce que le procédé comprend au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (c).

[Revendication 30] Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que chaque ré-encapsulation consiste à éliminer la couche externe d'hydrogel, préférentiellement à remettre en suspension les lymphocytes sous forme partiellement ou totalement dissociée dans les microcompartiments et à remettre en œuvre les étapes du procédé.

[Revendication 31] Procédé de préparation d'un microcompartiment selon l'une des revendications 20 à 30, caractérisé en ce qu'il comprend une étape après l'étape (c) qui consiste à congeler les microcompartiments.

[Revendication 32] Procédé de préparation d'un microcompartiment selon l'une des revendications 20 à 31, caractérisé en ce que l'étape (c) est mise en œuvre dans un bioréacteur.