

Microcompartiments cellulaires de grande taille comprenant plusieurs cystes

Domaine technique

L'invention concerne la culture de cellules de type épithéliales, telles que des cellules souches pluripotentes en trois dimensions.

Art antérieur

- 5 La culture de cellules ex vivo est un domaine qui suscite un intérêt croissant. Les cellules cultivées peuvent être de tout type. Il peut s'agir aussi bien de cellules différenciées avec différents phénotypes, de cellules progénitrices que de cellules souches. Une avancée importante dans les techniques de culture cellulaire est l'introduction de systèmes de culture tridimensionnels.
- 10 Les cultures en trois dimensions sont en effet avantageusement plus proches des systèmes naturels in vivo, et peuvent être utilisées pour de nombreuses applications en particulier dans le développement de thérapies. Une technologie particulièrement adaptée est celle décrite dans la demande WO2018 /096277 qui consiste en des microcompartiments cellulaires en trois dimensions pour la culture de cellules souches.
- 15 Toutefois, malgré leur efficacité, les systèmes de culture 3D existants présentent encore des limites en termes de rendement et de taux de croissance des cellules pour se rapprocher encore plus des taux d'expansion in vivo et de la durée des cycles tout en assurant le maintien d'un phénotype épithélial stable.

L'objectif de l'invention est de proposer une solution de culture cellulaire en trois dimensions

- 20 répondant à l'ensemble de ces besoins et palliant les inconvénients et limites de l'art antérieur pour une culture encore plus quantitative et toujours au moins aussi qualitative.

Résumé de l'invention

En travaillant sur le développement de microcompartiments cellulaires pour la culture en 3D de cellules épithéliales ou ayant une morphologie de type épithéliale et aptes à former des

- 25 cystes, telles que des cellules souches pluripotentes, les inventeurs ont mis au point un système permettant d'augmenter le nombre maximal de cellules contenues dans un microcompartiment organisées autour d'une lumière (cyste) tout en conservant un

phénotype épithélial

Selon l'invention, le maintien d'un ensemencement faible de cellules permet d'augmenter le facteur d'amplification entre l'ensemencement des cellules dans le microcompartiment et la récolte du microcompartiment contenant les cellules amplifiées. Or, dans les systèmes
5 existants, des microcompartiments comprenant quelques cellules à l'ensemencement (1 à 3 en particulier) meurent ou relancent leur croissance avec un taux de latence ce qui nuit au rendement de la culture et augmente la durée nécessaire de culture encapsulée.

Selon l'invention, ces problématiques sont liées en particulier à des microcompartiments de trop petites tailles, et notamment à des microcompartiments dont le volume de la partie
10 interne est trop faible.

Aussi l'invention a pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions avec une couche externe et une partie interne, dont la partie interne a des dimensions suffisamment importantes pour permettre un taux de croissance important et une grande quantité de cellules au moment de la récolte du microcompartiment, en partant d'un faible
15 ensemencement de cellules au départ.

En particulier, l'invention vise un microcompartiment en trois dimensions de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant au moins :

- 20 - des éléments de matrice extracellulaire, et
- au moins deux cystes, chaque cyste étant formé par au moins une couche de cellules organisée en trois dimensions autour d'une lumière,

le plus petit rayon de la partie interne du microcompartiment étant d'au moins 100 μm , préférentiellement au moins 200 μm .

25 Les cellules de chaque couche de cellules organisées en trois dimensions autour d'une lumière sont des cellules capables de former un cyste c'est-à-dire des cellules polarisées avec une face basale capables de former des jonctions serrées et d'exprimer la podocalyxin sur la face apicale (faisant face à la lumière du cyste). Il s'agit en particulier de cellules épithéliales ou ayant une morphologie de type épithéliale, humaines ou animales. Les cellules de chaque

couche de cellules organisées en trois dimensions autour d'une lumière sont préférentiellement choisies parmi les souches pluripotentes induites (iPSC) et les cellules suivantes : cellules d'épithéliums glandulaires (par ex. mammaires ou salivaires), cellules d'épithélium rénal, cellules de l'épithélium intestinal (entérocytes), cellules de l'épithélium de la peau (kératinocytes), cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, cellules de l'épicarde, cellules de l'endocarde.

Avantageusement un tel agencement, en particulier la présence d'au moins deux cystes, permet d'augmenter le nombre maximal de cellules contenues dans un microcompartiment tout en conservant un phénotype épithélial autour d'une lumière (cyste). La taille du microcompartiment selon l'invention est choisi pour permettre la croissance de plusieurs cystes tout en préservant une distance de diffusion compatible avec la physiologie des cellules.

L'invention a également pour objet un ensemble de microcompartiments cellulaires en trois dimensions comprenant au moins un microcompartiment cellulaire selon l'invention, préférentiellement en suspension liquide dans un bioréacteur.

Les microcompartiments selon l'invention peuvent être utiles pour différentes applications et notamment dans la prévention et/ou le traitement de pathologies.

Les microcompartiments cellulaires selon l'invention peuvent être obtenus en particulier par la mise en œuvre d'un procédé de préparation spécifique comprenant les étapes suivantes :

- (a) incuber des cellules dans un milieu de culture, préférentiellement dans un milieu de culture contenant au moins un facteur cytoprotecteur, notamment un inhibiteur de l'apoptose et/ou des Rho/A kinases,

- (b) mélanger les cellules issues de l'étape (a) avec des éléments de matrice extracellulaire, notamment une matrice extracellulaire biologique ou de synthèse,

- (c) encapsuler la suspension de cellules 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 de ladite partie interne étant d'au moins 100 μm ;

(d) cultiver les microcompartiments obtenus dans un tampon de rinçage isotonique, préférentiellement moins de 30 minutes, puis dans un milieu de culture, préférentiellement

dans un milieu de culture contenant au moins un facteur cytoprotecteur, notamment un inhibiteur de l'apoptose et/ou des Rho/A kinases ;

- (e) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer le facteur cytoprotecteur (inhibiteur de l'apoptose et/ou des Rho/A kinases), préférentiellement dans
5 un délai de 48h après encapsulation, encore plus préférentiellement dans un délai de 24h;
- (f) cultiver les microcompartiments pendant au moins deux cycles de division cellulaire (amplification), préférentiellement entre 1 et 60 jours, entre 1 et 30 jours, entre 1 et 20 jours, encore plus préférentiellement entre 2 et 30 jours, entre 2 et 20 jours, entre 3 et 30 jours, entre 3 et 20 jours, notamment entre 4 et 7 jours, en particulier entre 5 et 7 jours, dans un
10 milieu de culture dépourvu de facteur cytoprotecteur, et
- (g) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir des microcompartiments selon l'invention avec au moins deux cystes.

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

Brève description des figures

[Fig. 1a] est un schéma d'un microcompartiment selon l'invention comprenant plusieurs cystes de cellules souches pluripotentes induites. Ce schéma est une représentation du microcompartiment présenté sur la photographie de la figure 1b.

- 20 [Fig. 1b] est une image de microscopie a contraste de phase d'un microcompartiment selon l'invention.

[[Fig. 2a] est un schéma d'une série de microcompartiments selon l'invention.

[Fig. 2b] est une image de microscopie a contraste de phase d'une série de microcompartiments selon l'invention.

- 25 [Fig. 3a] est un schéma d'un bioréacteur contenant une série de microcompartiments selon l'invention.

[Fig. 3b] est une image d'un bioréacteur contenant une série de microcompartiments selon l'invention.

[Fig. 4a] est un schéma de la fusion de deux cystes dans un microcompartiment selon l'invention.

[Fig. 4b] est une image de la fusion de deux cystes dans un microcompartiment selon l'invention.

- 5 [Fig. 5] est une représentation des résultats d'essais sur l'amplification de cellules souches pluripotentes induites dans des microcompartiments selon l'invention.

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-gulonate, des sels et des dérivés de ceux-ci.

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

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

Par « cellules épithéliales » ou « cellules de type épithéliales » au sens de l'invention on entend des cellules humaines ou animales associées les unes aux autres grâce à des jonctions intercellulaires structurant un épithélium simple (cuboïde, prismatique, squameux, ou pseudostratifié c'est-à-dire une assise de cellules étroitement juxtaposées ou jointive dont la majorité des cellules contactent la face apicale et la face basolatérale de l'assise).

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 « cellule progénitrice » au sens de l'invention, on entend une cellule souche déjà engagée

dans la différenciation cellulaire 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 hPS 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, 2007, 131(5) : 861-872) et Nakagawa et al (Nat Biotechnol, 2008, 26(1) : 101-106).

Par « couche de cellules » au sens de l'invention on entend une monocouche de cellules ou assise épithéliale.

Par « cyste » au sens de l'invention on entend un agencement tridimensionnel en monocouche de cellules ou en assise épithéliale, sphérique, entourant un lumen central.

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
5 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.

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

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
15 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
20 potentielle à cellule mutante concernée. Il s'agit préférentiellement d'une mutation entraînant une modification du phénotype de la cellule mutante concernée. Très préférentiellement il s'agit d'un changement de la séquence du génome et/ou de l'épigénome 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
25 produite.

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

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

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

Par « 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.

Microcompartiments cellulaires

L'invention a donc pour objet un microcompartiment en trois dimensions de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, comprenant une couche externe en hydrogel définissant une partie interne, ladite partie interne comprenant au moins :

- des éléments de matrice extracellulaire, et
- au moins deux cystes, chaque ciste étant formé par au moins une couche de cellules organisée en trois dimensions autour d'une lumière.

Préférentiellement le microcompartiment est caractérisé en ce que le plus petit rayon de la partie interne est d'au moins 100 μm , préférentiellement d'au moins 200 μm , en particulier entre 200 et 400 μm .

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-gulonate et 20% de β -D-mannuronate, avec une masse moléculaire moyenne de 100 à 400 kDa et une concentration totale comprise entre 0,5 et 5% en masse. La couche externe en hydrogel est dépourvue de cellules.

La couche externe d'hydrogel permet notamment de protéger les cellules du milieu extérieur, de limiter la prolifération incontrôlée des cellules, et leur différenciation en cas de différenciation.

L'épaisseur moyenne de couche externe 12 peut être variable. Elle est préférentiellement comprise entre 5 et 100 μ m, plus préférentiellement entre 20 et 60 μ m. Le ratio entre le plus petit rayon de la partie interne 14 et cette épaisseur est préférentiellement comprise entre 2 et 10.

La présence d'une couche externe d'hydrogel et d'éléments de matrice extracellulaire (préférentiellement une matrice extracellulaire) permet une distribution uniforme des cellules entre les microcompartiments. Par ailleurs cette couche externe d'hydrogel permet d'éviter les fusions de microcompartiments qui sont une source majeure de variabilité défavorable pour l'homogénéité phénotypique des cellules.

La partie interne 14, à l'intérieur de la couche externe en hydrogel, comprend donc au moins :

- des éléments de matrice extracellulaire 16, préférentiellement sous forme d'une solution isotonique comprenant des éléments de matrice extracellulaire, en particulier une matrice extracellulaire biologique ou de synthèse, comme par exemple du Matrigel®, et
- au moins deux cystes, chaque cyste étant formé par au moins une couche de cellules 18 organisée en trois dimensions autour d'une lumière 20.

Les éléments de matrice extracellulaire comprennent préférentiellement des séquences peptidiques ou peptidomimétiques capables de se lier aux intégrines. Ils sont préférentiellement situés dans une couche entre les cystes de cellules et la couche externe 12 en hydrogel. Ces éléments de matrice extracellulaire ont préférentiellement été ajoutés lors

de la fabrication du microcompartiment et/ou ils ont été ajoutés dans le microcompartiment a posteriori et/ou ils ont été sécrétés ou induits par les autres constituants du microcompartiment.

Les éléments de matrice extracellulaire comprennent préférentiellement un mélange de
5 protéines et de composés extracellulaires nécessaires à la culture et à l'amplification des cellules. Préférentiellement, les éléments de matrice extracellulaire comprennent des protéines structurelles, telles que du collagène, des laminines, de l'entactine, de la vitronectine, ainsi que des facteurs de croissance, tels que du TGF-béta et/ou de l'EGF. Selon une variante, la partie interne 14 peut consister en ou comprendre du Matrigel® et/ou de la
10 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®. La présence d'éléments de matrice extracellulaire favorise l'adhérence des cellules encapsulées initialement et participe à l'obtention et au maintien dans la microcompartiment d'au moins deux sources de cellules séparées qui ne se
15 rencontrent pas pour former chacune un cyste.

Selon un mode de réalisation préféré, la partie interne 14 comprend une matrice extracellulaire.

Si le microcompartiment comprend dans la partie interne 14, de la matrice extracellulaire, il peut s'agir de matrice extracellulaire sécrétée par les cellules présentes dans le
20 microcompartiment et/ou de la matrice extracellulaire ajoutée au moment de la préparation/fabrication du microcompartiment.

Selon une variante, la solution contenant des éléments de matrice extracellulaire, en particulier s'il s'agit d'une matrice extracellulaire naturelle (biologique) ou de synthèse, peut former un gel.

25 Au niveau de la surface de la solution contenant les éléments de matrice extracellulaire (préférentiellement une matrice extracellulaire naturelle ou de synthèse) en contact avec une couche de cellules, la solution contenant les éléments de matrice extracellulaire (préférentiellement une matrice extracellulaire naturelle ou de synthèse) peut éventuellement contenir une ou plusieurs cellules.

30 Préférentiellement la solution contenant les éléments de matrice extracellulaire

(préférentiellement une matrice extracellulaire naturelle ou de synthèse) présente un module d'Young compris entre 0,05 et 3 kDa. Le module d'Young peut être mesuré par toute méthode connue de l'homme du métier, en particulier par mesure de la rhéologie de gels de même composition que la couche intermédiaire ou bien par AFM (microscopie à force atomique).

- 5 Une solution contenant les éléments de matrice extracellulaire (préférentiellement une matrice extracellulaire naturelle ou de synthèse) avec de telles valeurs de module d'Young permet d'améliorer le maintien du phénotype cellulaire et l'intégrité génomique des cellules contenues dans cette couche intermédiaire pendant les divisions cellulaires.

De plus, de telles valeurs de module d'Young (élasticité) favorisent l'adhérence des cellules
10 encapsulées initialement et participe à l'obtention et au maintien dans le microcompartiment d'au moins deux sources de cellules séparées qui ne se rencontrent pas pour former chacune un cyste. La viscosité de la solution contenant les éléments de matrice extracellulaire (préférentiellement une matrice extracellulaire de synthèse ou naturelle) favorise également l'adhérence des cellules encapsulées initialement et participe à l'obtention et au maintien
15 dans le microcompartiment d'au moins deux sources de cellules séparées qui ne se rencontrent pas pour former chacune un cyste.

La partie interne 14 peut comprendre également des zones liquides sans éléments de matrice extracellulaire. Ces zones liquides résultent de l'équilibration par diffusion des liquides présents lors de la culture (ensemencement initial et changement/renouvellement de milieux
20 éventuels). Cette zone liquide est préférentiellement majoritairement composée de milieux de culture. Avantageusement, la couche externe du microcompartiment retient (au moins partiellement) à proximité des cellules, les facteurs et éléments sécrétés par celles-ci ce qui renforce les effets paracrines et autocrine au sein du microcompartiment.

La partie interne 14 du microcompartiment selon l'invention comprend au moins deux cystes,
25 chaque cyste étant formé par au moins une couche de cellules 18 organisée en trois dimensions autour d'une lumière 20.

Chaque cyste est formé par au moins une couche de cellules organisées en trois dimensions autour d'une lumière, ces cellules humaines ou animales préférentiellement à l'exclusion de cellules souches embryonnaires d'êtres humains. Ces cellules sont des cellules capables de
30 former un cyste c'est-à-dire des cellules polarisées avec une face basale capables de former

des jonctions serrées et d'exprimer la podocalyxin sur la face apicale (faisant face à la lumière du cyste). Dans un mode de réalisation préféré, chaque cyste est formé par au moins une couche de cellules épithéliales ou ayant une morphologie de type épithéliale. Dans un mode de réalisation préféré, les cellules de chaque couche 18 sont des cellules épithéliales ou ayant

5 une morphologie de type épithéliale et capables de former un cyste.

Préférentiellement, chaque cyste est formé par au moins une couche de cellules humains ou animales, organisées en trois dimensions autour d'une lumière, choisies parmi les souches pluripotentes induites (iPSC) et les cellules suivantes : cellules d'épithéliums glandulaires (par ex. mammaires ou salivaires), cellules d'épithélium rénal, cellules de l'épithélium intestinal

10 (entérocytes), cellules de l'épithélium de la peau (kératinocytes), cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, cellules de l'épicarde, cellules de l'endocarde.

Une cellule souche pluripotente, ou cellule pluripotente, s'entend d'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

15 peuvent être en particulier des cellules souches pluripotentes induites (IPS), des cellules MUSE (« Multilineage-differentiating Stress Enduring ») que l'on trouve dans la peau et la moelle osseuse des mammifères adultes, ou des cellules souches embryonnaires (ES).

Préférentiellement, les cellules constituant chaque cyste sont polarisées. La polarité de ces cellules à l'intérieur de chaque cyste peut être mise en évidence par les protéines TJP-1 ou ZO-

20 1, toutes deux localisées sur la face interne/apicale de la couche de cellules pluripotentes, qui jouxte la lumière.

Si les cellules encapsulées dans le microcompartiment sont destinées à être utilisées en thérapie cellulaire chez l'être humain, les cellules peuvent être immuno-compatibles avec la personne destinée à les recevoir pour éviter tout risque de rejet.

25 Les cellules présentes dans le microcompartiment sont porteuses de peu, voire d'aucune mutation fonctionnelle.

Le microcompartiment selon l'invention peut contenir au moins 80, préférentiellement au moins 800, au moins 1000, au moins 5000, notamment au moins 8 000 cellules, ces cellules étant organisées sous forme d'au moins deux cystes.

30 Chaque cyste formé par au moins une couche de cellules au sein du microcompartiment est

creux, c'est-à-dire qu'il comporte une lumière ou lumen. La lumière est préférentiellement générée, au moment de la formation du cyste, par la sécrétion de podocalyxin par les cellules.

La lumière de chaque cyste peut contenir un liquide, notamment du milieu de culture et/ou un liquide sécrété par les cellules. Avantageusement la présence de cette partie creuse permet
5 aux cellules de disposer d'un petit volume diffusif dont elles peuvent contrôler la composition, favorisant une communication cellulaire. Par ailleurs la partie interne 14 est en équilibre avec le milieu externe au microcompartiment mais peut avantageusement s'enrichir par l'action des cellules d'éléments métaboliques et/ou sécrétés.

La conformation sous forme de cyste permet de réduire les pressions subies par les cellules
10 par rapport aux cultures 2D ou en agrégats. Cette configuration permet de diminuer la mortalité cellulaire, d'augmenter le facteur d'amplification de la culture. Par conséquence cela permet de réduire le nombre de passages et dissociations nécessaires ; de réduire le temps en culture nécessaire pour atteindre le nombre de cellules final nécessaire. Collectivement ces améliorations participent aussi au maintien de l'intégrité génétique des cellules dans les
15 microcompartiments.

Avantageusement, la présence de plusieurs cystes dans un même microcompartiment permet d'améliorer la reproductibilité du processus d'encapsulation et par la même la reproductibilité des lots cellulaires, améliore la survie à l'encapsulation et améliore l'amplification par unité de temps.

20 Le microcompartiment peut comprendre également, en plus des cystes, des cellules en suspension dans le microcompartiment.

Selon un mode de réalisation chaque cyste présent dans le microcompartiment a été obtenu par l'encapsulation dans la partie interne 14 des microcompartiments : de 1 à 30 cellules, préférentiellement de 1 à 10, en particulier de 2 à 30 ou de 3 à 30, notamment de 2 à 10 ou
25 de 3 à 10, plus préférentiellement de 1 à 5, encore plus préférentiellement de 2 à 5 ou de 3 à 5, préférentiellement au moins 4 cellules, et le plus petit rayon de la partie interne 14 étant d'au moins 100 μm , préférentiellement d'au moins 200 μm . L'encapsulation d'une concentration contrôlée de cellules dans une capsule de grande taille (plus petit rayon de la partie interne du microcompartiment d'au moins 100 μm) participe à l'obtention d'au moins
30 deux cystes dans le microcompartiment. Il est difficile d'obtenir deux cystes avec une seule

cellule, et il est préférable d'encapsuler dans la partie interne 14 des microcompartiments au moins 2 cellules, préférentiellement au moins 3, encore plus préférentiellement au moins 4. L'encapsulation d'un nombre de cellules au départ supérieur à 30 est possible mais moins avantageuse car il est difficile voire impossible (la probabilité baisse) d'obtenir deux cystes
5 avec plus de 20/25% en volumes de cellules dans la partie interne au moment de l'encapsulation, notamment car cela limite la capacité d'amplification à X4 ce qui est désavantageux pour la production de lots cellulaires. Selon l'invention il est préférable qu'il y ait au moins deux sources de cellules séparées qui ne se rencontrent pas pour former chacune un cyste.

- 10 Les cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention ont été préférentiellement obtenues après au moins deux cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins une cellule.

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

- 20 Préférentiellement le nombre de divisions cellulaires pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention est inférieur à 300, encore plus préférentiellement inférieur à 200.

Préférentiellement le microcompartiment est obtenu après au moins 2 passages après l'encapsulation, plus préférentiellement au moins 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 passages. Chaque passage peut durer par exemple entre 2 et 15 jours, notamment entre 3 et 10 jours.

- 25 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 la totalité des cellules encapsulées initialement dans le
30 microcompartiment avant le premier cycle de division cellulaire représente un volume

inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées, plus préférentiellement inférieur à 40%, 30%, 20%, 10% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

5 Ainsi, selon l'un mode de réalisation, les cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention ont été obtenues 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 de cellule(s) représentant un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées, plus préférentiellement inférieur à 40%, 30%, 20%, 10% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

10 Préférentiellement, dans le microcompartiment selon l'invention, les cellules représentent plus de 50% en volume par rapport au volume du microcompartiment, encore plus préférentiellement plus de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% en volume par rapport au volume du microcompartiment.

15 Dans le microcompartiment selon l'invention, le volume de la partie interne 14 représente préférentiellement au moins 20% du volume total du microcompartiment, préférentiellement au moins 40%. Ceci permet d'accueillir plus de cellules après amplification, donc plus de cystes et/ou des cystes de plus grandes tailles.

L'épaisseur la couche de cellules formant chaque cyste est préférentiellement comprise entre 6 et 200 μm , plus préférentiellement entre 6 et 60 μm .

20 Selon une variante représentée sur la figure 4a et sur la figure 4b, au moins deux cystes peuvent fusionner entre eux. Dans ce cas le microcompartiment selon l'invention comprend au moins un cyste est issu de la fusion de deux cystes.

25 Le microcompartiment cellulaire selon l'invention est clos ou partiellement clos, c'est à dire que la couche externe est close ou partiellement close. Préférentiellement le microcompartiment est clos.

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
30 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 202 μm et 1 mm, 5
préférentiellement entre 202 μm et 700 μm , encore plus préférentiellement 202 μm et 600 μm , notamment entre 202 μm et 500 μm .

Sa plus grande dimension est préférentiellement supérieure à 202 μm , plus préférentiellement comprise entre 202 μm et 1m, encore plus préférentiellement entre 202 μm et 50cm.

L'invention a également pour objet plusieurs microcompartiments ensemble.

10 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 15
de culture adapté à la culture de cellules peut être utilisé, et notamment du tampon phosphate salin tel que par exemple le milieu « dulbecco's modified eagle medium » ou « Roswell Park Memorial Institute medium » 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 20
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 25
entre 2 et 10^{16} microcompartiments.

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

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

Procédé d'obtention de microcompartiments selon l'invention

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

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

- (a) incuber des cellules humaines ou animales dans un milieu de culture contenant au moins un facteur cytoprotecteur, notamment un inhibiteur de l'apoptose et/ou des Rho/A kinases,
- (b) mélanger les cellules issues de l'étape (a) avec des éléments de matrice extracellulaire, notamment une matrice extracellulaire biologique ou de synthèse,
- 10 - (c) encapsuler la suspension de cellules 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 ;
- 15 - (d) cultiver les microcompartiments obtenus dans un tampon de rinçage isotonique, préférentiellement moins de 30 minutes, puis dans un milieu de culture, préférentiellement dans un milieu de culture contenant au moins un facteur cytoprotecteur, notamment un inhibiteur de l'apoptose et/ou des Rho/A kinases;
- (e) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer le facteur
20 cytoprotecteur (inhibiteur de l'apoptose et/ou des Rho/A kinases), préférentiellement dans un délai de 48h après encapsulation, encore plus préférentiellement dans un délai de 24h;
- (f) cultiver les microcompartiments pendant au moins deux cycles de division cellulaire (amplification), préférentiellement entre 1 et 20 jours, encore plus préférentiellement entre 2 et 10 jours, notamment entre 5 et 7 jours, dans un milieu de culture dépourvu de facteur
25 cytoprotecteur (inhibiteur d'apoptose et/ou des Rho/A kinases), et
- (g) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

Le nombre de cellules encapsulées dans chaque microcompartiment à l'étape c) est préférentiellement de 1 à 30 cellules, en particulier de 2 à 30 ou de 3 à 30, préférentiellement de 1 à 10, notamment de 2 à 10 ou de 3 à 10, plus préférentiellement de 1 à 5, encore plus

préférentiellement de 2 à 5 ou de 3 à 5, préférentiellement au moins 4 cellules. L'encapsulation d'une concentration contrôlée de cellules dans une capsule de grande taille (plus petit rayon de la partie interne du microcompartiment d'au moins 100 μm) participe à l'obtention d'au moins deux cystes dans le microcompartiment. Il est difficile d'obtenir deux

5 cystes avec une seule cellule, et il est préférable d'encapsuler dans la partie interne 14 des microcompartiments au moins 2 cellules, préférentiellement au moins 3, encore plus préférentiellement au moins 4. L'encapsulation d'un nombre de cellules au départ supérieur à 30 est possible mais moins avantageuse car il est difficile voire impossible (la probabilité

10 baisse) d'obtenir deux cystes avec plus de 20/25% en volumes de cellules dans la partie interne au moment de l'encapsulation, notamment car cela limite la capacité d'amplification à X4 ce qui est désavantageux pour la production de lots cellulaires. Selon l'invention il est préférable qu'il y ait au moins deux sources de cellules séparées qui ne se rencontrent pas pour former chacune un cyste.

Tout milieu de culture adapté à la culture de cellules, notamment de cellules souches

15 pluripotentes peut être utilisé, et notamment du tampon phosphate salin tel que le milieu « Roswell Park Memorial Institute medium » ou Mtesr1 ou E8 Essential par exemple.

Le facteur cytoprotecteur peut par exemple être un ou plusieurs inhibiteur(s) des voies RHO/ROCK (« Rho-associated protein kinase ») et/ou un inhibiteur de l'apoptose connu de l'homme du métier ou tout autre facteur cytoprotecteur connu de l'homme du métier. Le

20 facteur cytoprotecteur doit permettre de promouvoir la survie des cellules, et dans le cas de la présence d'une matrice extracellulaire, leur adhérence des cellules à la matrice extracellulaire au moment de la formation de la couche externe d'hydrogel autour de ladite matrice extracellulaire.

Dans le procédé selon l'invention la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (c)

25 représentent préférentiellement un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées, plus préférentiellement inférieur à 40%, 30%, 20%, 10% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

Le procédé selon l'invention peut comprendre une étape préalable à l'étape a) ou b) de dissociation des cellules par une dissociation chimique, enzymatique ou mécanique. Cette

30 étape est très préférentiellement nécessaire du fait que les cellules de types épithéliales, notamment les cellules souches, sont des cellules adhérentes.

Les cellules encapsulées sont en suspension sous forme de cellules uniques et/ou d'amas ou ensemble(s) d'au moins deux cellules (« cluster(s) »). De façon préférée, lorsqu'il y a au moins 3 cellules la ou les cellules uniques représentent moins de 50% en nombre de la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b). En effet il est préférable d'encapsuler des amas
5 de cellules car cela diminue les distorsions de ségrégation chromosomique et mauvaises ségrégations chromosomiques et par conséquent diminue l'apparition de nouvelles mutagenèses et participe au maintien l'intégrité génomique des cellules, car les cellules isolées risquent de mourir par manque d'interaction cellules-cellules et que la dissociation complète de cellules entraîne des anomalies génétiques majorées.

10 Préférentiellement chaque amas de cellules encapsulé initialement à l'étape (c) 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 amas de cellules ne doivent pas avoir une trop grande taille par rapport à la taille du microcompartiment car un dimension trop grande de ces amas cellulaires initiaux, pourrait
15 entraîner, lors des divisions cellulaires, une confluence cellulaire plus précoce dans la capsule ; cette confluence trop précoce de toute ou partie des capsules, pourrait entraîner une augmentation des pressions intracellulaires et entraîner un stress cellulaire, impactant la croissance cellulaire mais également la ségrégation chromosomique.

Le procédé selon l'invention comprend une étape b) de mélange des cellules à une matrice
20 extracellulaire entre l'étape a) et l'étape c). Selon une variante, cette étape b) peut éventuellement être mise en œuvre avant l'étape (a) ou bien simultanément à l'encapsulation à l'étape (c).

L'étape c) 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
25 à l'intérieur d'une capsule d'hydrogel de la matrice extracellulaire et des cellules peut être utilisée pour la mise en œuvre du procédé de préparation selon l'invention. Notamment, il est possible de préparer des microcompartiments en adaptant la méthode et le dispositif microfluidique décrits dans Alessandri *et al.*, 2016 (« A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human
30 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 c) 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 sont 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 b) comprenant des cellules, du milieu de culture et la matrice extracellulaire.

Les trois solutions sont co-injectées (injectées simultanément) de manière concentrique grâce à un injecteur microfluidique ou puce microfluidique qui permet de former un jet qui se fractionne en gouttes dont la couche extérieure est la solution d'hydrogel et le cœur la solution de l'étape b) comprenant des cellules ; 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.

Préférentiellement la solution est maintenue à une température inférieure à 4°C avant d'être injectée, pour éviter que la solution ne gélifie du fait de la présence d'éléments de matrice extracellulaire.

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.

- 5 - 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)
- 10 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 (c) d'encapsulation est réalisée à l'aide d'un injecteur microfluidique dont le diamètre d'ouverture finale est compris entre 150 et 300

15 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, cette encapsulation est réalisée par co-injection de trois solutions :

- une solution d'hydrogel,
- une solution intermédiaire isotonique telle que par exemple une solution de sorbitol,
- 20 - la solution issue de l'étape b) comprenant des cellules, du milieu de culture et la matrice extracellulaire,

de manière concentrique via un injecteur microfluidique qui permet de former un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange des trois solutions, ledit jet se fractionnant en gouttes, lesdites gouttes étant collectées dans un bain de calcium qui rigidifie la solution d'hydrogel

25 pour former la couche externe de chaque microcompartiment, la partie interne de chaque goutte étant constituée par la solution issue de l'étape (b) comprenant des cellules, du milieu de culture et la matrice extracellulaire.

Très préférentiellement, les étapes (d), (e) et (f) 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. En évitant une augmentation de la mortalité cellulaire et/ou du stress oxydatif, l'agitation participe au
5 maintien de l'intégrité génétique des cellules.

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

Le nombre cycles de divisions cellulaires à l'étape (f) est d'au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 cycles de division cellulaire.

- 10 Préférentiellement le microcompartiment est obtenu après au moins 2 passages (un passage correspondant ici à un cycle complet des étapes (a), (b), et (e), optionnellement (c) et (d)), plus préférentiellement au moins 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 passages. Chaque passage peut durer par exemple entre 2 et 15 jours, notamment entre 3 et 8 jours.

- 15 Dans une variante préférée, le procédé selon l'invention comprend au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (f), 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 (e)) 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.

- 20 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).

Chaque ré-encapsulation peut comprendre :

- une étape qui consiste à dissocier le microcompartiment ou la série de microcompartiments pour obtenir une suspension de cellules ou une suspension d'amas de cellules ; l'élimination
25 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 de ré-encapsulation de tout ou partie des cellules ou amas de cellules 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.

- 5 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 :

- 10 - (i) éliminer la couche externe en hydrogel,
- (ii) remettre en suspension les cellules qui étaient contenues dans le microcompartiment de façon à obtenir des cellules uniques et/ou au moins un ensemble ou amas de cellules dans un milieu de culture contenant au moins un facteur cytoprotecteur,
- (iii) mélanger les cellules issues de l'étape (a) avec des éléments de matrice extracellulaire,
- 15 - (iv) encapsuler la solution de cellules 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 ;
- 20 - (v) cultiver les microcompartiments obtenus dans un milieu de culture contenant au moins un facteur cytoprotecteur, notamment un inhibiteur de l'apoptose et/ou des Rho/A kinases,
- (vi) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à le facteur cytoprotecteur ;
- (vii) cultiver les microcompartiments dans un milieu de culture dépourvu de facteur
- 25 cytoprotecteur, pendant au moins un cycle de division cellulaire, et
- (viii) 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
5 remplies plus rapidement que les autres par exemple.

Selon une variante de l'invention, les cellules encapsulées sont des cellules différenciées qui sont reprogrammées en cellules pluripotentes à l'intérieur de la capsule d'hydrogel lors de la formation des microcompartiments. Selon une variante, les agents de reprogrammation cellulaire peuvent être ajoutés à l'étape (a) et/ou (b) et/ou (c) et/ou (d) et/ou (ii) et/ou (iii)
10 et/ou (iv) et/ou (v). Préférentiellement il s'agit d'agents de reprogrammation cellulaire non perméants vis-à-vis de la couche d'hydrogel. L'ajout d'agents de reprogrammation est particulièrement pertinent lorsque les cellules encapsulées initialement sont des cellules différenciées que l'on veut dédifférencier notamment jusqu'au stade pluripotent. L'homme du métier sait procéder à la reprogrammation d'une cellule différenciée en une cellule souche en
15 réactivant l'expression des gènes associés au stade embryonnaire au moyen de facteurs spécifiques, désignés dans la présente invention comme « agents de reprogrammation ». A titre d'exemples, on peut citer les méthodes décrites dans Takahashi *et al.*, 2006 (« Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors » Cell, 2006 Vol 126, pages 663-676), Ban *et al.*, 2009 (« Efficient induction of
20 transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome » Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2009 ; 85(8):348-62) et dans la demande internationale WO2010/105311 ayant pour titre « Production of reprogrammed pluripotent cells ». Les agents de reprogrammation sont avantageusement co-encapsulés avec les cellules différenciées, de manière à concentrer le
25 produit et à favoriser le contact avec l'ensemble des cellules. Dans le cas d'agents de reprogrammation perméants à la couche d'hydrogel, il est possible d'ajouter lesdits agents dans le milieu de culture après l'étape d'encapsulation. Les agents de reprogrammation permettent d'imposer aux cellules une succession de changements phénotypiques jusqu'au stade pluripotent. Avantageusement, l'étape de reprogrammation est réalisée en utilisant des
30 milieux de culture spécifiques, favorisant ces changements phénotypiques. Par exemple, les cellules sont mis en culture dans un premier milieu comprenant 10% de sérum humain, ou

bovin, dans un milieu minimum essentiel de Eagle (DMEM) supplémenté avec un inhibiteur des récepteurs sérine/thréonine protéine kinase (tel que le produit SB-431542 ($C_{22}H_{16}N_4O_3$)), un ou plusieurs inhibiteurs des voies RHO/ROCK (« Rho-associated protein kinase »), tels que du thiazovivin et/ou Y-27632, des facteurs de croissance des fibroblastes, tel que du FGF-2, de l'acide ascorbique et des antibiotiques, tels que la Trichostatin A ($C_{17}H_{22}N_2O_3$). Puis le milieu de culture est remplacé par du milieu favorisant la multiplication des cellules pluripotentes, tel que le milieu mTeSR®1.

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

L'étape (d) et/ou (v) de culture avec un facteur cytoprotecteur est conduite pendant un temps compris entre 2 et 48 heures, préférentiellement pendant un temps compris entre 6 et 24 heures, plus préférentiellement pendant un temps compris entre 12 et 18 heures.

L'étape de rinçage peut être réalisée par un ou plusieurs rinçages, dans des milieux de culture successifs exempts d'inhibiteurs des voies RHO/ROCK, moins de 48h, préférentiellement moins de 24 heures, plus préférentiellement entre 12 et 18 heures après le début de l'étape (d) et/ou (v).

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 un gène spécifique du phénotype recherché.

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 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.

- 5 La mise en œuvre du procédé selon l'invention, permet d'obtenir des microcompartiments comprenant au moins 80, préférentiellement au moins 800, au moins 1000, au moins 5000, notamment au moins 8 000 cellules, ces cellules étant organisées sous forme d'au moins deux cystes.

Avantageusement, la structure en 3 dimensions des cellules dans le microcompartiment et le
10 pourcentage faible voir nul de cellules isolées lors de l'encapsulation (la majorité des cellules étant encapsulées sous forme d'amas de cellules), diminue la déségrégation chromosomique et par conséquent diminue l'apparition de nouvelles mutagenèses.

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

La protection des cellules grâce à la couche externe et la présence d'éléments de matrice extracellulaire diminue la déségrégation chromosomique et limite le stress mécanique des cellules, et par conséquent diminue l'apparition de nouvelles mutagenèses.

Avantageusement la présence de plusieurs cystes dans chaque microcompartiment permet
20 également de favoriser la survie cellulaire initiale et lisse les asynchronies de croissance.

L'invention est à présent illustrée par un exemple et des résultats

Les figures 1a et 1b montrent des capsules d'hydrogel creuses permettant la croissance de plusieurs cystes de cellules souches pluripotentes humaines dans le microcompartiment central.

- 25 Les figures 2a et 2b montrent une image de microscopie, à J6,5 post encapsulation montrant une pluralité de capsules d'alginate creuses contenant des cellules souches pluripotentes humaines. La barre d'échelle est de 500um. Les microcompartiments selon l'invention comprennent plusieurs colonies de cellules souches 3D. Ces colonies présentent toutes une configuration cystique homogène avec un diamètre moyen de 170um. En moyenne, on

observe 2,6 colonies (cystes) par capsule à ce stade de la culture.

Les figures 3a et 3 b montrent une pluralité de capsules multi cystes cultivées en suspension en bioréacteur.

- Les paramètres clés et résultats d'un exemple d'encapsulation selon l'invention dans un
5 bioréacteur de 10 litres sont donnés dans le tableau 1 ci-après.

[Tableau 1]

	Bioréacteur 10L - essai1	Bioréacteur 10L – essai 2
Seuil oxygène cible	20% DO	20% DO
Volume maximal	10,2L	9,7L
Min % volume capsule	4,5-15%	3,9 à 14%
Max cells/ml Capsule	33,92m/ml	33,80m/ml
hPSCensemencées	56 millions	51 millions
hPSC produites	15,2 billions	14,52 billions
Facteur d'amplification (AF)	X271/6,59 jours	X282/6,69 jours
Temps de doublement (PDT)	19,4 heures	19,73 heures
Nombre de cycles (PDL)	8,14	8,08
Viabilité finale	99,5%	99,7%
OCT4+ final	92,0%	96,7%
SOX2+ final	99,6%	99,7%
NANOG+ final	97,0%	98,4%

- L'encapsulation des hiPSCs et la culture en suspension ont été réalisées pendant 2 cycles
séparés. Le niveau d'oxygène cible de 20% d'oxygène dissous est décrit comme une condition
10 hypoxique (à l'inverse des bioréacteurs avec un niveau d'oxygène dissous de 100% qui sont

décrits comme normoxiques). Une stratégie d'alimentation par lots (« fed batch »), c'est-à-dire un renouvellement du milieu de culture par soustraction/ajout de milieu à intervalles réguliers, a été appliquée, entraînant une augmentation du volume de travail et une diminution de la concentration des capsules rapporté au volume total. La densité cellulaire peut être exprimée en millions de cellules par millilitre de capsules. Le volume de la capsule 5 récoltée est mesuré dans un cylindre de verre gradué. Le nombre de cellules mesuré peut être rapporté à ce volume de capsule précédemment mesuré pour en déduire une concentration de cellule par volume de capsule. Le facteur d'amplification (AF) est défini tel que $AF = N(t_0 + Dt) / N(t_0)$, où $N(t_0)$ et $N(t_0 + Dt)$ sont le nombre de cellules initiales à t_0 et $t_0 + Dt$ 10 respectivement. Le niveau de doublement de la population (PDL) est défini comme $PDL(t) = \ln(AF) / \ln(2)$. Le temps de doublement de la population (PDT) est défini tel que $PDT(t) = Dt / PDL$ où Dt est le temps en culture.

La viabilité a été évaluée par le nucleocounter NC-3000 (Chemometech). Les cellules décapsulées et dissociées ont été fixées et colorées pour OCT4, SOX2 et NANOG et analysées 15 par cytométrie de flux, BD Accuri C6 plus. Les résultats concernant le facteur d'amplification sont également présentés sur la figure 5.

Sur la figure 4b est représentée une série de photos issues d'une vidéo-microscopie d'une capsule comprenant plusieurs cystes selon l'invention.

L'observation est réalisée en transmission avec une bio-station IM Nikon avec un objectif 10x. 20 Le diamètre externe moyen de la capsule quasi-sphérique est de 288µm comme indiqué par la barre d'échelle de 100µm. Le cliché initial a été réalisé 4 jours après l'encapsulation. La séquence illustre la croissance de plusieurs colonies de cellules souches pluripotentes dans une capsule d'hydrogel creuse. Ces colonies sont cultivées dans un microcompartiment 3D clos, défini extérieurement par une couche d'alginate réticulé. Le compartiment interne est 25 décrit comme étant creux, dans le sens où il ne contient pas d'alginate réticulé. Le compartiment interne contenant les cellules contient également de la matrice extracellulaire (ici Matrigel®) qui est visible en microscopie par une granulosité différente de celle de l'alginate.

Lors de l'encapsulation le volume injecté dans les microcompartiments internes est issu à 50% 30 du mix cellules/matrice et à 50% d'une solution isomolaire de sorbitol (cf. méthode). Ainsi l'espace interne est à minima 50% liquide.

Initialement les 3 colonies ont une configuration cystique homogène avec des diamètres respectifs de 76µm, 100µm et 78µm (cyste en bas à droite de l'image). A ce stade initial l'épaisseur épithéliale de ces cystes est respectivement de 10µm 13µm et 12µm. On observe que les 2 cystes en haut à gauche de la capsule, rentrent progressivement en contact et fusionnent leurs lumières interne ainsi que leurs épithéliums. Il en résulte une colonie de cellules souches de plus grande dimension qui a également une structure cystique circulaire et symétrique.

54h après le début de l'observation (images de droites avant dernière ligne de la figure 4b), les 2 colonies cystiques présentes dans la capsule entrent en contact. A ce stade les diamètres de ces cystes sont de 232 et 175µm. Les épaisseurs respectives de la couche cellulaire de ces cystes sont respectivement de 36 et 24µm. On observe que le contact entre ces colonies n'est pas suivi d'une fusion des lumières ou des épithéliums. La limite entre ces 2 structures reste clairement identifiable sur le dernier et 12eme cliché (75ème heure).

On observe un décalage de 20µm vers la gauche de la plus grande des colonies qui semble repoussée par la petite colonie. Malgré un léger aplatissement de la zone de contacts entre les 2 colonies, leurs structures cystiques symétriques restent cependant maintenues pour chacune des 2 colonies, avec des épaisseurs de couche cellulaire homogène de 50 et 40µm respectivement. Cette croissance des colonies encapsulées et leur habilité vraisemblable à se repoussées dans l'espace capsulaire interne est facilité par le caractère au moins partiellement liquide de cet espace creux interne. De plus, l'utilisation de matrices extracellulaires progressivement dégradable comme le Matrigel, permet encore d'avantage aux cellules de croître dans un environnement 3D plus permissif que lors d'une encapsulation en bille pleine d'hydrogel ; et permet ainsi de maintenir une structure cystique épithélial malgré les forces générées par la multiplication cellulaire.

Au total, l'espace intra-capsulaire creux partiellement liquide de cette capsule de grande taille permet aux colonies de cellules souches 3D de croître tout en préservant un phénotype épithélial cystique stable. La stabilité de ce phénotype, permet une bonne homogénéité phénotypique des cellules produites et un procédé de bioproduction robuste/fiable, illustrant la persistance du phénotype épithélial lors de la croissance de plusieurs cystes

La figure 4a illustre une séquence « multi-cyste » fusion en capsules :

- A : Auto-organisation et luminogenèse de colonies 3D de cellules souches à l'intérieur du microcompartiment. Formation des cystes de cellules souches encapsulés
- B : Croissance des Cystes de cellules souches : augmentation progressive du diamètre du cyste, diamètre de la lumière et épaisseur du cyste.
- 5 - C : Les cystes rentrent en contact
- D : Les cystes fusionnent leurs couches cellulaires
- E : Les cystes fusionnent également leurs lumières internes et il en résulte un unique cyste de taille plus importante.

Revendications

- [Revendication 1] Microcompartiment (10) en trois dimensions de forme ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique ou sensiblement ovoïde, cylindrique, sphéroïde ou sphérique, comprenant une couche externe (12) en hydrogel définissant une partie interne (14), ladite partie interne (14) comprenant au moins :
- des éléments de matrice extracellulaire (16), et
 - au moins deux cystes, chaque ciste étant formé par au moins une couche de cellules humaines ou animales (18), à l'exclusion de cellules souches embryonnaires d'êtres humains, organisée en trois dimensions autour d'une lumière (20),
- le plus petit rayon de la partie interne (14) étant d'au moins 100 µm.
- [Revendication 2] Microcompartiment (10) selon la précédente revendication, caractérisé en ce que les cellules de chaque couche (18) sont des cellules épithéliales ou ayant une morphologie de type épithéliale et capables de former un ciste.
- [Revendication 3] Microcompartiment (10) selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules de chaque couche (18) sont choisies parmi les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et les cellules suivantes : cellules d'épithéliums glandulaires, cellules d'épithélium rénal, cellules de l'épithélium intestinal, cellules de l'épithélium de la peau, cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, cellules de l'épicarde, cellules de l'endocarde.
- [Revendication 4] Microcompartiment (10) selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la partie interne (14) comprend également des zones liquides sans éléments de matrice extracellulaire.
- [Revendication 5] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que le plus petit rayon de la partie interne (14) est d'au moins 200 µm.
- [Revendication 6] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que le volume de la partie interne (14) représente au moins 20% du volume total du microcompartiment, préférentiellement au moins 40%.
- [Revendication 7] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il est clos.
- [Revendication 8] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la couche externe comprend de l'alginate.

[Revendication 9] Microcompartiment cellulaire selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'au moins un cyste est issu de la fusion de deux cystes.

[Revendication 10] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules présentes dans le microcompartiment ont été obtenues par l'encapsulation dans la partie interne d'une couche externe d'hydrogel, de 2 à 30 cellules.

[Revendication 11] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, pour son utilisation comme médicament.

[Revendication 12] 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 10.

[Revendication 13] Ensemble de microcompartiments selon la précédente revendication, caractérisé en ce que les microcompartiments sont disposés dans un milieu de culture dans un bioréacteur.

[Revendication 14] Procédé de préparation d'un microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 1 à 10 ou d'un ensemble de microcompartiments cellulaires selon l'une des revendications 12 à 13, comprenant les étapes suivantes :

- (a) incuber des cellules humaines ou animales dans un milieu de culture contenant au moins un facteur cytoprotecteur,

- (b) mélanger les cellules issues de l'étape (a) avec des éléments de matrice extracellulaire, préférentiellement une matrice extracellulaire biologique ou de synthèse,

- (c) encapsuler la suspension de cellules 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 ;

- (d) cultiver les microcompartiments obtenus dans un tampon de rinçage isotonique, puis dans un milieu de culture, préférentiellement dans un milieu de culture contenant au moins un facteur cytoprotecteur,

- (e) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer le facteur cytoprotecteur ;

- (f) cultiver les microcompartiments pendant au moins deux cycles de division cellulaire (amplification), préférentiellement entre 1 et 20 jours, encore plus préférentiellement entre

2 et 10 jours, notamment entre 5 et 7 jours, dans un milieu de culture dépourvu de facteur cytoprotecteur, et

- (g) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

[Revendication 15] Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape c) est

5 réalisée par co-injection de deux ou trois solutions :

- une solution d'hydrogel,

- éventuellement une solution intermédiaire isotonique,

- la solution issue de l'étape b) comprenant des cellules, du milieu de culture et la matrice extracellulaire,

10 de manière concentrique via un injecteur microfluidique qui permet de former un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange des 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 (b) comprenant des cellules, du milieu de
15 culture et la matrice extracellulaire.

[Revendication 16] Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le diamètre d'ouverture finale de l'injecteur microfluidique est compris entre 150 et 300 μm , préférentiellement entre 180 et 240 μm , et le débit de chacune des solutions est compris entre 45 et 150 mL/h, préférentiellement entre 45 et 110 mL/h.

20 [Revendication 17] Procédé selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisé en ce que la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (c) représente un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

[Revendication 18] Procédé selon l'une des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que l'étape b) de mélange des cellules à une matrice extracellulaire, est réalisée soit entre l'étape
25 (a) et l'étape (c), soit simultanément à l'encapsulation à l'étape (c).

[Revendication 19] Procédé selon l'une des revendications 14 à 18, caractérisé en ce que les étapes (d), (e) et (f) sont mises en œuvre sous agitation permanente ou séquentielle.

[Revendication 20] Procédé selon l'une des revendications 14 à 19, caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre dans un bioréacteur.

[Revendication 21] Procédé selon l'une des revendications 14 à 20, caractérisé en ce que préalablement ou simultanément à l'étape (a), le procédé comprend une étape de dissociation des cellules par une dissociation chimique, enzymatique ou mécanique.

[Revendication 22] Procédé selon l'une des revendications 14 à 21, caractérisé en ce que
5 le procédé comprend au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (f).

[Revendication 23] Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que chaque ré-encapsulation correspond à un passage.

[Revendication 24] Procédé selon l'une des revendications 22 ou 23, caractérisé en ce que
chaque ré-encapsulation consiste à éliminer la couche externe d'hydrogel, préférentiellement
10 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.