

Microcompartiments cellulaires comprenant des cellules dont l'intégrité génomique est maintenue après amplification et procédé de préparation

Domaine technique

L'invention concerne le maintien de l'intégrité génomique des cellules lors de leur division ex vivo sur plusieurs cycles de divisions cellulaires, en particulier dans le cadre d'une culture cellulaire en trois dimensions.

5 **Art antérieur**

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
10 tridimensionnels. Les cultures en trois dimensions sont en effet plus proches des systèmes naturels in vivo, et peuvent être utilisées pour de nombreuses applications en particulier dans le développement de thérapies.

Toutefois, la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire sont conditionnées par la disponibilité de quantités industrielles de cellules qui nécessite d'avoir recours à une multiplication
15 importante du nombre de cellules et donc un nombre élevé de divisions sur un temps court. Dans la plupart des systèmes de culture cellulaire actuels, cette multiplication entraîne l'apparition et la sélection de mutations, en particulier de mutations fonctionnelles délétères, génomiques et/ou épigénétiques à chaque division sur de nombreuses cellules pendant l'expansion de la culture, compromettant ainsi leur utilisation notamment en thérapie.

20 Les mutations peuvent être des mutations ponctuelles de la séquence génétique (codantes ou non codantes, silencieuses ou non en termes de séquence peptidique), des variants structuraux, des modifications épigénétiques, voir des modifications de l'ADN mitochondrial. Seules les cellules mutantes porteuses d'une ou plusieurs mutations fonctionnelles ou potentiellement fonctionnelles sont problématiques pour l'utilisation des cellules en thérapie,
25 c'est-à-dire toute modification génétique ou épigénétique transmissible qui confère un gain ou perte de fonction ou perte de fonction potentielle aux cellules cultivées. Il peut s'agir notamment d'un avantage de croissance, d'une diminution de la susceptibilité à la mort cellulaire, d'une modification des gènes impliqués dans la tumorigenèse ou la répression de la tumorigenèse. Les mutations les plus impactantes sont celles permettant une expansion

clonale des cellules qui deviennent dominantes en culture.

Des exemples de mutations génétiques particulièrement récurrentes sont décrites notamment dans Y. Avior, K. Eggen, N. Benvenisty, Cancer-Related Mutations Identified in Primed and Naive Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 25, 456–461 (2019). Parmi les plus connues on peut citer en particulier les mutations du gène P53 (F. T. Merkle, S. Ghosh, N. Kamitaki, J. Mitchell, Y. Avior, C. Mello, S. Kashin, S. Mekhoubad, D. Ilic, M. Charlton, G. Saphier, R. E. Handsaker, G. Genovese, S. Bar, N. Benvenisty, S. A. McCarroll, K. Eggen, Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature*. 545, 229–233 (2017)), et les mutations par amplification de la région chromosomique 20q11 (N. Lefort, M. Feyeux, C. Bas, O. Féraud, A. Bennaceur-Griscelli, G. Tachdjian, M. Peschanski, A. L. Perrier, Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nature Biotechnology*. 26, 1364–1366 (2008)).

Le problème de la stabilité et l'intégrité génétique des cellules en culture est connu et il a en particulier été largement étudié pour les cellules souches pluripotentes, comme par exemple : S. Attwood, M. Edel, iPS-Cell Technology and the Problem of Genetic Instability—Can It Ever Be Safe for Clinical Use? *Journal of Clinical Medicine*. 8, 288 (2019); ou encore P. Andrews, Human pluripotent stem cells: genetic instability or stability? *Regenerative medicine*, vol. 16, No 2, 2 mar 2021. On sait aussi que la mutagenèse est un problème très présent pour la culture des cellules souches dès leur reprogrammation tel que décrit dans Ji, S. Ng, V. Sharma, D. Neculai, S. Hussein, M. Sam, Q. Trinh, G. M. Church, J. D. McPherson, A. Nagy, N. N. Batada, Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 30, 435–440 (2012), ou encore dans V. Turinetto, L. Orlando, C. Giachino, Induced pluripotent stem cells: Advances in the quest for genetic stability during reprogramming process. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (2017), doi:10.3390/ijms18091952.

Cette instabilité génétique nuit fortement au développement des thérapies cellulaires, et en particulier aux applications cliniques des cellules souches (Yamanaka, Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell stem cell*. 27, 523–531 (2020); S. E. Peterson, J. F. Loring, Genomic instability in pluripotent stem cells: Implications for clinical applications. *Journal of Biological Chemistry*. 289, 4578–4584 (2014); K. Garber, RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*. 33, 890–891 (2015)).

Il existe donc un besoin important pour une solution permettant le maintien de l'intégrité

génétique des cellules en culture, en particulier pour la production à grande échelle de thérapies cellulaires.

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.

5

Résumé de l'invention

En travaillant sur le développement de microcompartiments cellulaires pour la culture de cellules en 3D, les inventeurs ont mis au point un système permettant une culture de masse de cellules tout en conservant leur intégrité génomique.

- 10 A cet effet l'invention a pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment sont des cellules présentant au moins une mutation, préférentiellement entre 0 et 10%, encore plus
- 15 préférentiellement entre 0 et 5%, préférentiellement entre 0 et 3%, même après plusieurs divisions cellulaires.

- Selon un autre objet, l'invention concerne un ensemble d'au moins deux microcompartiments cellulaires en trois dimensions, préférentiellement en suspension liquide, chaque compartiment comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite
- 20 couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, dans lesquels moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments sont des cellules présentant au moins une mutation, préférentiellement entre 0 et 10%, encore plus préférentiellement entre 0 et 5%, notamment entre 0 et 2%.

- Avantageusement, ce taux de cellules mutantes est inférieur à celui des systèmes de cultures cellulaires existants. Par exemple, certaines études suggèrent qu'une mutation inactivatrice
- 25 du gène P53 confère, dans un système de culture de cellules souches conventionnel 2D, un avantage de sélection jusqu'à $\times 1,9$ par passage (iPS-Cell Technology and the Problem of Genetic Instability—Can It Ever Be Safe for Clinical Use ? Attwood & Edel) + Merkle, F.T. ; Ghosh, S.; Kamitaki, N.; Mitchell, J.; Avior, Y.; Mello, C.; Kashin, S.; Mekhoubad, S.; Ilic, D.; Charlton, M.; et al. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. Nature 2017, 545, 229–233.). Ceci implique une probabilité de fixation de 97% après émergence de cette mutation (Haldane, J.B.S. A Mathematical Theory of Natural and
- 30

Artificial Selection, Part V: Selection and Mutation. Math. Proc. Camb. Philos. Soc. 1927, 23, 838–844.)

Le maintien de l'intégrité génomique des cellules permet d'utiliser les microcompartiments avec les cultures cellulaires selon l'invention pour différentes applications et notamment dans
5 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) préparer une suspension de cellules comprenant des cellules uniques et/ou au moins un amas (« cluster ») de cellules dans un milieu isotonique, préférentiellement un milieu de
10 culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,
- (b) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;
- (c) cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose ;
- (d) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de
15 l'apoptose ;
- (e) cultiver les microcompartiments pendant au moins deux cycles de division cellulaire (amplification), et
- (f) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus,

le procédé étant caractérisé en ce que la totalité des cellules encapsulées initialement à
20 l'étape (b) (au moment de l'encapsulation) représentent un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

Ce procédé permet d'obtenir des microcompartiments selon l'invention avec une population de cellules dont l'intégrité génomique est maintenue et stabilisée.

L'invention vise aussi l'utilisation d'un microcompartiment cellulaire et/ou d'un tel procédé
25 pour maintenir l'intégrité génomique de cellules lors de leur amplification.

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

Brève description des figures

- 30 - Figure 1 : la figure 1 est une vue d'ensemble des trois bras expérimentaux « culture 2D » « bioréacteur agrégats » et « Invention » ainsi que la numérotation et chronologie des passages effectués (indiqués dans les rectangles J4 = jour 4, J8 = jour 8, etc....). Toutes les

cultures sont arrêtées au jour final J28 pour comparaison génétique détaillée.

- Figure 2a : la figure 2a est une image de microscopie a contraste de phase montrant les résultats du bras expérimental « culture 2D » au jour final 28 avant échantillonnage finale. Barre d'échelle 500µm.

5 - Figure 2b : la figure 2b est une image de microscopie a contraste de phase montrant les résultats du bras expérimental « bioréacteur agrégats » au jour final 28 avant échantillonnage finale. Les agrégats représentés ont été prélevés de leur culture en suspension et déposés temporairement dans une boîte de pétri pour réaliser l'observation microscopique. Barre d'échelle 500µm.

10 - Figure 2c : la figure 2c est une image de microscopie a contraste de phase montrant les résultats du bras expérimental « Invention » au jour final 28 avant échantillonnage finale. Les microcompartiments représentés ont été prélevés de leur culture en suspension et déposés temporairement dans une boîte de pétri pour réaliser l'observation microscopique. Barre d'échelle 500µm.

15 - Figure 3 : la figure 3 est une représentation de la croissance apparentes des cellules au cours du temps en culture calculé par comptage des cellules avant et après chaque passage. Le facteur d'amplification théorique cumulée est représenté en fonction du temps ; l'axe des ordonnée (amplification) est représentée en échelle logarithmique. Les points de données représentés correspondent à l'ensemble des comptages qui ont été réalisés au moment des passages.

20 - Figure 4 : la figure 4 est une représentation des résultats de l'évaluation phénotypique des cellules souches par cytométrie en flux. Les cellules dissociées sont fixées et marquées pour les marqueurs de pluripotences OCT4 et NANOG. Le pourcentage de cellules doublement positives pour ces 2 marqueurs lors des passages successifs pendant 28 jours est représenté ici (Moyenne et écart type).

25 - Figure 5 : la figure 5 est un caryotype haute résolution par puce SNP Cytoscan HD array pour analyse comparative de l'analyse de l'échantillon initial jour 0 et des 3 bras expérimentaux « culture 2D », « Bioréacteur agrégats » et « Invention » à 28 jours. CytoScan® HD Array Affymetrix, vendu par la société thermo fisher, quantifie le nombre de copie moyen par cellules pour 2.67 millions de sondes réparties sur l'ensemble du génome. Les zones entourées sont centrées sur le chromosome 20.

30 - Figure 6 : la figure 6 représente les résultats de l'évaluation par PCR digitale du nombre de

copie moyen de la région chromosomique 20q11 au cours des 28 jours de culture pour les 3 bras expérimentaux (Analyse réalisé avec le test 24 sondes ddPCR iPS de la société Stemgenomics). A gauche : nombre de copie 20q11 en fonction du nombre de jours en culture. A droite : nombre de copie 20q11 rapport à l'amplification théorique cumulée au cours du temps. Les points de données correspondent aux échantillonnages réalisés lors des différents passages : Carrés = « bioréacteur agrégats », Ronds = « culture 2D » et Triangles = « Invention ». Les courbes associées correspondent aux régressions correspondantes. A noter que les écarts types pour ces mesures sont en moyenne de 0.12 (nombre de copie 20q11), les étoiles pointent les mesures qui sont significativement augmentées.

10 - Figure 7 : la figure 7 représente la synthèse des pourcentages de cellules mutées au cours de 28 jours de culture pour les bras « culture 2D » « bioréacteur agrégats » et « Invention » pour l'exemple 1.

- Figure 8 : la figure 8 représente le caryotype, obtenu par PCR digitale, des deux lignées cellulaires (GHE et AAVS1_GFP) utilisées à l'exemple 2.

15 - Figure 9 : la figure 9 est une vue d'ensemble des deux bras expérimentaux « bioréacteur agrégats » et « Invention » ainsi que la numérotation et chronologie des passages effectués (indiqués dans les rectangles d4 = jour 4, d8 = jour 8, etc....).

- Figure 10 : les figures 10A et 10B sont des images de microscopie à contraste de phase montrant les résultats des bras expérimentaux A : « bioréacteur agrégats » et B : « Invention »

20 au jour 19 pour « bioréacteur agrégats » et au jour 21 pour « Invention ». Les agrégats ainsi que les microcompartiments représentés ont été prélevés de leur culture en suspension et déposés temporairement dans une boîte de pétri pour réaliser l'observation microscopique. Barre d'échelle 500µm.

- Figure 11 : la figure 11 est une représentation de la croissance apparente des cellules au cours du temps en culture calculée par comptage des cellules avant et après chaque passage. Le facteur d'amplification théorique cumulée est représenté en fonction du temps ; l'axe des ordonnée (amplification) est représentée en échelle logarithmique. Les points de données représentés correspondent à l'ensemble des comptages qui ont été réalisés au moment des passages.

30 - Figure 12 : la figure 12 est une représentation des résultats de l'évaluation phénotypique des cellules souches par cytométrie en flux. Les cellules dissociées sont fixées et marquées pour les marqueurs de pluripotences OCT4 et NANOG. Le pourcentage de cellules doublement

positives pour ces 2 marqueurs lors des passages successifs pendant 28 jours est représenté ici (Moyenne et écart type).

- Figure 13 : la figure 13 représente les résultats de l'évaluation par PCR digitale du pourcentage de cellules GFP- (iPSC-GHE) et GFP+ (iPSC-AAVS1) au cours des 21 jours de culture pour les 2 bras expérimentaux. A gauche : pourcentage de cellules GFP- et GFP+ en fonction du nombre de jours en culture. A droite : pourcentage de cellules GFP- et GFP+ rapport à l'amplification théorique cumulée au cours du temps. Les points de données correspondent aux échantillonnages réalisés lors des différents passages : Carrés = « bioréacteur agrégats » et Triangles = « Invention ».

10 - Figure 14 : la figure 14 représente les résultats de l'évaluation par PCR digitale du nombre de copies moyen des régions chromosomiques 7q et 20q au cours des 28 jours de culture pour les 2 bras expérimentaux (Analyse réalisé avec le test 24 sondes ddPCR iPS de la société Stemgenomics). A gauche : nombre de copie 7q et 20q en fonction du nombre de jours en culture. A droite : nombre de copie 7q et 20q rapport à l'amplification théorique cumulée au cours du temps. Les points de données correspondent aux échantillonnages réalisés lors des différents passages : Carrés = « bioréacteur agrégats » et Triangles = « Invention ».

- Figure 15 : la figure 15 représente la synthèse des pourcentages de cellules mutées au cours de 28 jours de culture pour les bras « bioréacteur agrégats » et « Invention » pour l'exemple 2.

20

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.

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

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

Par cellules « 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 humaines » au sens de l'invention on entend des cellules humaines ou des cellules de mammifères non humains immunologiquement humanisées. Même lorsque cela
5 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.

10 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
15 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 de
20 l'invention et dans ce cas l'objet de l'invention exclue les cellules souches embryonnaires d'êtres humains.

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
25 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
30 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).

- 5 Par « diamètre de Feret » d'un microcompartiment selon l'invention, on entend la distance « d » comprise entre deux tangentes dudit microcompartiment, ces deux tangentes étant parallèles, de telle sorte que l'ensemble de la projection dudit microcompartiment soit compris entre ces deux tangentes parallèles.

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

Par « 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
15 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. Il peut s'agir d'une mutation par amplification
20 d'une région chromosomique, telle que par exemple une mutation par amplification de la région chromosomique 20q, notamment 20q11, ou encore 7q.

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
25 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 produite.

30 Par « plus grande dimension » d'un microcompartiment ou d'un amas de cellule ou d'une couche de cellules ou d'une assise 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'un amas de cellule ou d'une couche de cellules ou d'une assise de cellules au sens 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.

15 Microcompartiments cellulaires

L'invention a donc pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation.

Le microcompartiment comprend une couche externe en hydrogel. Préférentiellement l'hydrogel utilisé est biocompatible, c'est-à-dire qu'il n'est pas toxique pour les cellules. La couche d'hydrogel doit permettre la diffusion d'oxygène et de nutriment pour alimenter les cellules contenues dans le microcompartiment et permettre leur survie. Selon un mode de réalisation, la couche externe d'hydrogel comprend au moins de l'alginate. Elle peut être constituée exclusivement d'alginate. L'alginate peut être en particulier un alginate de sodium, composé à 80% d' α -L-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 en hydrogel est dépourvue de cellules.

La couche d'hydrogel permet notamment de protéger les cellules du milieu extérieur et de limiter la prolifération incontrôlée des cellules.

Le microcompartiment selon l'invention comprend au moins une couche de cellules et/ou au

moins une assise de cellules. Cette ou ces couche(s) et/ou assise(s) de cellules est (sont) organisée(s) en trois dimensions dans le microcompartiment.

Le microcompartiment peut comprendre notamment :

- une ou plusieurs couches de cellules et/ou une ou plusieurs assises de cellules, organisée(s) en trois dimensions, ou
- une ou plusieurs couches de cellules et/ou une ou plusieurs assises de cellules organisée(s) en trois dimensions, et des cellules en suspension dans le microcompartiment.

Les cellules présentes dans le microcompartiment peuvent être tout type de cellules. Préférentiellement les cellules sont des cellules humaines ou animales.

- 10 Dans un mode de réalisation particulier, le microcompartiment comprend des cellules souches pluripotentes. 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 peuvent être en particulier des cellules souches pluripotentes induites (IPS), des cellules
- 15 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).

Selon une variante particulièrement adaptée de l'invention, le microcompartiment selon l'invention comprend des cellules souches pluripotentes induites humaines ou animales.

- Dans un autre mode de réalisation particulier, le microcompartiment selon l'invention
- 20 comprend des cellules multipotentes humaines ou animales et/ou des cellules progénitrices humaines ou animales issues de ces cellules multipotentes. Les cellules multipotentes et/ou progénitrices ont préférentiellement été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes, en particulier de cellules souches pluripotentes humaines, ou éventuellement à partir de cellules humaines non pluripotentes dont le profil transcriptionnel a été modifié
- 25 artificiellement pour rejoindre celui de cellules multipotentes et/ou de progéniteurs particuliers, typiquement par expression forcée de facteurs de transcriptions spécifiques du phénotype cellulaire cible. Préférentiellement, les cellules multipotentes et/ou progénitrices ont été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes après mise en contact avec une solution capable d'initier la différenciation desdites cellules souches.

- 30 Selon une autre variante, le microcompartiment selon l'invention comprend des cellules différenciées humaines ou animales. Les cellules différenciées ont préférentiellement été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes ou de cellules progénitrices, en particulier

- de cellules souches pluripotentes humaines ou de cellules progénitrices humaines, ou éventuellement à partir de cellules humaines non pluripotentes dont le profil transcriptionnel a été modifié artificiellement pour rejoindre celui de cellules différenciées particulières, typiquement par expression forcée de facteurs de transcriptions spécifiques du phénotype cellulaire cible. Préférentiellement, les cellules différenciées ont été obtenues à partir de
- 5 cellules souches pluripotentes ou multipotentes ou progénitrices après mise en contact avec une solution capable d'initier la différenciation desdites cellules souches. Selon une variante, le contenu cellulaire du microcompartiment comprend des identités cellulaires homogènes ou mixtes.
- 10 Les cellules différenciées peuvent en particulier se présenter sous forme d'un tissu ou micro-tissu en trois dimensions ou sous forme de plusieurs tissus ou micro-tissus dans le microcompartiment. Il peut s'agir d'un tissu ou micro-tissu compacté.
- Le microcompartiment selon l'invention peut comprendre plusieurs types de cellules. En particulier un microcompartiment selon l'invention peut comprendre par exemple des cellules
- 15 souches induites à la pluripotence et/ou des cellules multipotentes et/ou des cellules progénitrices et/ou des cellules différenciées.
- 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.
- 20 Les cellules présentes dans le microcompartiment sont porteuses de peu, voire d'aucune mutation fonctionnelle. Selon l'invention moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation, en particulier au moins une mutation fonctionnelle, génétique ou épigénétique.
- L'invention vise en particulier les microcompartiments dans lesquels moins de 20% de la
- 25 population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation fonctionnelle, préférentiellement les microcompartiments dans lesquels moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation entraînant une modification du phénotype de la cellule mutante concernée.
- L'invention vise également les microcompartiments dans lesquels moins de 20% de la
- 30 population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation permettant une expansion clonale des cellules qui devient dominante en culture.
- Selon une variante particulièrement adaptée, l'invention a pour objet un microcompartiment

dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation choisie parmi les mutations oncogènes. Au moins une mutation est une mutation oncogène.

Selon un mode de réalisation, l'invention a pour objet un microcompartiment dans lequel
5 moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation d'un gène et/ou une mutation par amplification d'une région chromosomique.

Dans un mode de réalisation de l'invention, moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment sont des cellules présentant au moins une mutation du
10 gène P53 et/ou une amplification de la région chromosomique 20q et/ou 7q (mutation par amplification de la région chromosomique 20q et/ou 7q)., en particulier une amplification de la région chromosomique 20q11 (mutation par amplification de la région chromosomique 20q11).

Préférentiellement, les cellules présentant au moins une mutation selon l'un des modes de
15 réalisation de l'invention, représentent entre 0 et 15% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment, notamment entre 0 et 14%, entre 0 et 12%, en particulier entre 0 et 10%, encore plus préférentiellement entre 0 et 8%, entre 0 et 5%, entre 0 et 2%.

Le pourcentage de cellules mutantes parmi une population de cellules, peut être mesurée par
20 différentes méthodes connues de l'homme du métier. Pour la détection de mutations ponctuelles des méthodes de séquençage à forte profondeur de lecture sont préférées (Whole Genome sequencing, Exome sequencing, Amplicon, ...). Pour la détection des variants structuraux des méthodes à haute résolutions sont préférées (High resolution SNP array, optical genome mapping bionano, PCR digitale...). Pour la détection des variants
25 épigénétiques plusieurs outils peuvent être envisagés (RRBS methylation arrays, bisulfite sequencing/pyrosequencing, ...).

Avantageusement, les microcompartiments selon l'invention présentent un taux très faible de cellules mutantes, et ce après plusieurs cycles de division cellulaire. Les cellules selon l'invention sont en effet des cellules obtenues par amplification, à partir d'au moins une cellule.
30 En effet, les cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention ont été 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 division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins 1 cellule, préférentiellement entre 1 et 5, entre 1 et 10, entre 1 et 15, entre 1 et 20, entre 1 et 30, entre 1 et 40, entre 1 et 50, entre 1 et 60, entre 1 et 100 cellules. Par exemple, les cellules présentes dans le microcompartiment ont été obtenues après au moins six cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins 1 cellule, préférentiellement entre 1 et 50 cellules.

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.

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 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.

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.

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.

Le microcompartiment selon l'invention comprend plusieurs cellules, préférentiellement au moins 20 cellules, encore plus préférentiellement au moins 100, au moins 500, au moins 1000,

au moins 10000.

En plus de la couche externe et des cellules, le microcompartiment selon l'invention peut comprendre d'autres éléments, en particulier :

- un milieu de culture, et/ou

- 5 - au moins une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique et/ou des éléments de matrice extracellulaire.

Le milieu de culture est un milieu adapté aux cellules présentes dans le microcompartiment selon les connaissances de l'homme du métier.

La couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique contient préférentiellement des
10 éléments de matrice extracellulaire, telles que en particulier des séquences peptidiques ou peptidomimétiques capables de se lier aux intégrines. Par solution aqueuse isotonique on entend une solution aqueuse présentant une osmolarité comprise entre 200 et 400 mOsm/L. Cette couche est préférentiellement située entre (a) la ou les couche(s) de cellules et/ou d'assise(s) de cellules, et (b) la couche externe en hydrogel.

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

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

La couche intermédiaire comprend préférentiellement un mélange de protéines et de composés extracellulaires nécessaires à la culture des cellules en cours de différenciation.

- 25 Préférentiellement, la couche intermédiaire comprend des protéines structurales, telles que du collagène, des laminines, de l'entactine, de la vitronectine, ainsi que des facteurs de croissance, tels que du TGF-béta et/ou de l'EGF. Selon une variante, la couche intermédiaire peut consister en ou comprendre du Matrigel® et/ou de la Geltrex® et/ou une matrice type hydrogel d'origine végétale comme des alginates modifiés ou d'origine synthétique ou de
30 copolymère de poly(N-isopropylacrylamide) et de poly(éthylène glycol) (PNIPAAm-PEG) type Mebiol®.

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

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

Préférentiellement la couche intermédiaire 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).

Une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique et/ou comprenant des éléments de matrice extracellulaire, préférentiellement une couche intermédiaire de matrice extracellulaire, avec de telles valeurs de module d'Young permettent d'améliorer le maintien du phénotype cellulaire et l'intégrité génomique des cellules contenues dans cette couche intermédiaire pendant les divisions cellulaires.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le microcompartiment comprend également au moins une lumière ou lumen. De façon préférée, le microcompartiment comprend une lumière interne. Le microcompartiment selon l'invention peut aussi éventuellement comprendre plusieurs lumières. La ou les lumières peuvent contenir un liquide, notamment du milieu de culture et/ou un liquide sécrété par les cellules. Avantageusement la présence de cette partie creuse permet aux cellules de disposer d'un petit volume diffusif dont elles peuvent contrôler la composition, favorisant une communication cellulaire.

Dans une variante de l'invention, le microcompartiment comprend successivement, organisées autour d'une lumière :

- au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, préférentiellement des cellules épithéliales, en particulier des cellules souches et notamment des souches pluripotentes induites humaines ou animales.
- une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique et/ou des éléments de matrice extracellulaire, préférentiellement une couche de matrice extracellulaire ;
- une couche externe en hydrogel.

Dans cette variante, la couche interne de cellules au sein du microcompartiment selon l'invention est creuse. Cet agencement tridimensionnel en monocouche ou assise épithéliale sphérique entourant un lumen central peut être également appelé un cyste. La ou les lumières est (sont) préférentiellement générée(s), au moment de la formation du cyste, par les cellules

qui se multiplient et se développent sur la couche de matrice extracellulaire.

La conformation sous forme de cyste permet de réduire les pressions subies par les cellules souches 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 conséquent
5 cela permet de réduire le nombre de passages et dissociation nécessaire ; 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 souches dans les microcompartiments.

Le microcompartiment cellulaire selon l'invention est clos ou partiellement clos, c'est à dire
10 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
15 cellules. Préférentiellement le microcompartiment selon l'invention se présente sous une forme sphérique ou allongée. Il peut avoir la forme d'un ovoïde, d'un cylindre, d'un sphéroïde ou d'une sphère. Il peut en particulier se présenter sous la forme d'un sphéroïde creux, d'un ovoïde creux, d'un cylindre creux ou d'une sphère creuse.

C'est la couche externe du microcompartiment, c'est-à-dire la couche d'hydrogel, qui confère
20 sa taille et sa forme au microcompartiment selon l'invention. Préférentiellement la plus petite dimension du microcompartiment selon l'invention est comprise entre 10 μm et 1 mm, préférentiellement entre 100 μm et 700 μm . Elle peut être comprise entre 10 μm et 600 μm , notamment entre 10 μm et 500 μm .

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

Le microcompartiment selon l'invention contient des cellules dont l'intégrité génomique a été préservée et/ ou maintenu, un très faible pourcentage de cellules présentes dans le microcompartiment étant porteuses de mutations. Il peut être utilisé pour toute application, en particulier comme médicament en thérapie cellulaire chez l'Homme ou l'animal.

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

L'invention a également pour objet plusieurs microcompartiments ensemble.

Aussi, l'invention vise aussi un ensemble ou une série de microcompartiments cellulaires tels que décrits précédemment comprenant au moins deux microcompartiments cellulaires selon l'invention.

L'invention vise aussi un ensemble ou une série de microcompartiments d'au moins deux
5 microcompartiments cellulaires en trois dimensions, chaque microcompartiment comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, dans lequel au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'invention.

Un autre objet particulier de l'invention est un ensemble ou série d'au moins deux
10 microcompartiments cellulaires en trois dimensions, chaque microcompartiment comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments de l'ensemble sont des cellules présentant au moins une mutation. Préférentiellement, les cellules présentant au
15 moins une mutation représentent entre 0 et 15% de la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments, notamment entre 0 et 14%, entre 0 et 12%, en particulier entre 0 et 10%, encore plus préférentiellement entre 0 et 8%, entre 0 et 5%, entre 0 et 2%. De façon préférée, au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'invention.

Ainsi un ou plusieurs microcompartiments de la série peut comprendre plus de 20% de
20 cellules mutantes en nombre par rapport au nombre de cellules présentes dans le ou lesdits microcompartiments, mais pour la totalité des microcompartiments formant l'ensemble de microcompartiments selon l'invention, moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments de l'ensemble sont des cellules présentant au moins une mutation, en particulier au moins une mutation fonctionnelle, génétique ou
25 épigénétique. Préférentiellement, au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'invention.

L'invention vise en particulier un ensemble de microcompartiments dans lesquels moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans l'ensemble sont des cellules présentant au moins une mutation fonctionnelle, préférentiellement un ensemble de
30 microcompartiments dans lesquels moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans l'ensemble sont des cellules présentant au moins une mutation entraînant une modification du phénotype de la cellule mutante concernée.

L'invention vise également un ensemble de microcompartiments dans lesquels moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans l'ensemble sont des cellules présentant au moins une mutation permettant une expansion clonale des cellules qui devient dominante en culture.

- 5 Selon une variante particulièrement adaptée, l'invention a pour objet un ensemble de microcompartiments dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans l'ensemble sont des cellules présentant au moins une mutation choisie parmi les mutations oncogènes. Au moins une mutation est une mutation oncogène.

- Selon un mode de réalisation, l'invention a pour objet un ensemble de microcompartiments
10 dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans l'ensemble sont des cellules présentant au moins une mutation d'un gène et/ou une mutation par amplification d'une région chromosomique.

- Dans un mode de réalisation de l'invention, moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans l'ensemble de microcompartiments sont des cellules présentant au moins une
15 mutation du gène P53 et/ou une amplification de la région chromosomique 20q et/ou 7q (mutation par amplification de la région chromosomique 20q et/ou 7q), en particulier une amplification de la région chromosomique 20q11 (mutation par amplification de la région chromosomique 20q11).

- Préférentiellement, les cellules présentant au moins une mutation selon l'un des modes de
20 réalisation de l'invention, représentent entre 0 et 15% de la population totale de cellules présentes dans l'ensemble de microcompartiments, notamment entre 0 et 14%, entre 0 et 12%, en particulier entre 0 et 10%, encore plus préférentiellement entre 0 et 8%, entre 0 et 5%, entre 0 et 2%.

- De façon préférée, les cellules présentes dans les microcompartiments de l'ensemble de
25 microcompartiments 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 d'au moins 1 cellule par microcompartiment. Le ou les microcompartiments présents dans cet ensemble de microcompartiments peuvent présenter une ou plusieurs caractéristiques d'un microcompartiment selon l'invention (taille, forme,
30 nombre de cellules, volume de cellules, couche intermédiaire, lumière, etc.).

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

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.

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, 5 préférentiellement dans un milieu de culture dans une enceinte close, telle qu'un bioréacteur. La présence d'une couche externe d'hydrogel et éventuellement d'une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique permet une distribution uniforme des cellules entre les microcompartiments. Par ailleurs cette couche d'hydrogel permet d'éviter les fusions de microcompartiments qui sont une source majeure de variabilité défavorable pour 10 l'homogénéité phénotypique des cellules.

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 15 microcompartiments selon l'invention, peut comprendre au moins la mise en œuvre des étapes qui consistent à :

- (a) préparer une suspension de cellules comprenant des cellules uniques et/ou au moins un ensemble de cellules dans un milieu isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,
- 20 - (b) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;
- (c) préférentiellement cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique (préférentiellement un milieu de culture) contenant un inhibiteur de l'apoptose ;
- (d) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;
- 25 - (e) cultiver les microcompartiments dans une solution isotonique, préférentiellement un milieu de culture, pendant au moins deux cycles de division cellulaire, et
- (f) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

L'invention vise aussi l'utilisation de ce procédé pour maintenir l'intégrité génomique des cellules encapsulées.

30 Dans le procédé selon l'invention la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b) représentent 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.

L'inhibiteur de l'apoptose peut par exemple être un ou plusieurs inhibiteur(s) des voies RHO/ROCK (« Rho-associated protein kinase »), ou tout autre inhibiteur de l'apoptose connu de l'homme du métier. L'inhibiteur de l'apoptose doit permettre de promouvoir la survie des
5 cellules, et dans le cas de la présence d'une matrice extracellulaire, l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire au moment de la formation de la couche externe d'hydrogel autour de ladite matrice extracellulaire.

Le procédé selon l'invention peut comprendre préalablement ou simultanément à l'étape (a), une étape de dissociation des cellules par une dissociation chimique, enzymatique ou
10 mécanique. Cette étape est particulièrement importante dans le cas de cellules adhérentes. Les cellules encapsulées sont en suspension sous forme de cellules uniques et/ou d'amas ou ensemble(s) de cellule(s) (« cluster(s) »). De façon préférée, 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 de cellules car cela diminue la déségrégation
15 chromosomique et par conséquent diminue l'apparition de nouvelles mutations et participe au maintien l'intégrité génomique des cellules.

Préférentiellement chaque amas de cellules 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 amas de
20 cellules 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 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
25 notamment la ségrégation chromosomique.

Selon une variante, le procédé selon l'invention peut comprendre une étape de mélange des cellules à une matrice extracellulaire, soit entre l'étape (a) et l'étape (b), soit simultanément à l'encapsulation à l'étape (b).

Très préférentiellement, les étapes (c), (d) et (e) sont mises en œuvre sous agitation
30 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 liés à l'hypoxie, ou de stress oxydatif liés à l'hyperoxie. En évitant une augmentation de la mortalité cellulaire et/ou du stress oxydatif, l'agitation participe au maintien de l'intégrité génétique.

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

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

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.

Dans une variante préférée, le procédé selon l'invention comprend au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (e), c'est-à-dire au moins deux cycles d'encapsulations. 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.

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

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 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.

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

- (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 isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,
 - (iii) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;
 - (iv) préférentiellement cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique contenant un inhibiteur de l'apoptose, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose ;
 - (v) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;
 - (vi) cultiver les microcompartiments dans une solution isotonique, préférentiellement un milieu de culture, 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. Ainsi, le procédé selon l'invention peut comprendre une ou plusieurs étapes d'élimination des microcompartiments comportant des cellules mutantes, en particulier des microcompartiments comprenant plus de 20% de cellules mutantes.
- Selon une variante de l'invention, les cellules sont des cellules souches pluripotentes organisées en cystes directement à partir de cellules souches pluripotentes, ou à partir de cellules différenciées qui seront reprogrammées en cellules pluripotentes à l'intérieur de la capsule d'hydrogel lors de la formation des microcompartiments.
- 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 (c) et/ou (iv) de culture avec un inhibiteur de l'apoptose est conduite pendant un temps compris entre 2 et 72 heures, préférentiellement pendant un temps compris entre 6 et 48 heures, plus préférentiellement pendant un temps compris entre 24 et 48 heures.

L'étape de rinçage peut être réalisée par un ou plusieurs rinçages, dans des milieux de culture
5 successifs exempts d'inhibiteurs des voies RHO/ROCK, moins de 96h, préférentiellement moins de 72 heures, plus préférentiellement entre 24 et 48 heures après le début de l'étape (c) et/ou (iv).

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
10 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 (b).

Selon une variante, les agents de reprogrammation cellulaire peuvent être ajoutés à l'étape
15 (a) et/ou (b) et/ou (c) et/ou (ii) et/ou (iii) et/ou (iv). 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
20 différenciée en une cellule souche en 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
25 (« Efficient induction of 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
30 le 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 milieux de culture spécifiques, favorisant ces changements phénotypiques. Par exemple, les cellules sont mises 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.

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.

Le procédé selon l'invention, avec ses caractéristiques particulières, permet de maintenir l'intégrité génomique des cellules pendant la culture, les microcompartiments finaux présentant des cellules porteuses de peu ou pas de mutation.

En particulier la structure en 3 dimensions des cellules dans le microcompartiment et le pourcentage faible, voire 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 mutations.

L'invention favorise aussi 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 de cellules très important, et limite donc la mutagenèse.

La protection des cellules grâce à la couche externe et la présence de matrice extracellulaire lorsqu'elle est présente diminue la déségrégation chromosomique et limite le stress mécanique des cellules, et par conséquent diminue l'apparition de nouvelles mutations.

Le contrôle des paramètres de culture en bioréacteur diminue aussi le stress oxydatif ce qui
5 participe à la diminution de nouvelles mutations.

Aussi, l'invention a également pour objet l'utilisation d'un procédé selon l'invention pour maintenir l'intégrité génomique de cellules lors de leur amplification.

L'invention a également pour objet l'utilisation, pour maintenir l'intégrité génomique de cellules lors de leur amplification, d'un microcompartiment en trois dimensions,
10 préférentiellement clos, préférentiellement de forme sphérique ou allongée, comprenant au moins une couche externe en hydrogel définissant une partie interne. De façon préférée il s'agit de l'utilisation d'un microcompartiment cellulaire selon l'invention dans ses différentes variantes telles que décrites dans la présente demande. L'invention vise également l'utilisation, pour maintenir l'intégrité génomique de cellules lors de leur amplification, d'un ensemble de
15 ces microcompartiments, préférentiellement dans un bioréacteur clos, encore plus préférentiellement un ensemble de microcompartiments selon toutes les variantes selon l'invention et telles que décrites dans la présente demande.

L'invention est à présent illustrée par deux exemples et des résultats comparatifs.

Ces exemples concernent la culture de cellules souches pluripotentes humaines, et plus
20 particulièrement de cellules souches pluripotentes humaines induites (iPS).

EXEMPLE 1 :

Protocole :

La lignée cellulaire utilisée ici, nommée iPS-IMAGINE005, a préalablement été décrite dans cette publication : *E. Quelennec, C. Banal, M. Hamlin, D. Clémantine, M. Michael, N. Lefort,*
25 *Generation of two induced pluripotent stem cell lines IMAGINi004-A and IMAGINi005-A from healthy donors. Stem Cell Research, 101959 (2020).*

La lignée d'iPS a été générée selon les standards habituels de la culture iPS en 2 dimensions. Afin de monitorer l'émergence quasi inévitable de mutations lors de la culture prolongée de cette lignée, une surveillance du caryotype est effectuée régulièrement (tous les 5 à 10
30 passages).

L'expérience menée ici, a pour point de départ un échantillon cellulaire congelé d'iPS, passage 2D numéro 23 post reprogrammation. A ce stade de culture et pour cet échantillon, les tests

caryotipiques hautes résolutions n'ont pas été capables de détecter une amplification de la région chromosomique 20q11, mais il a été constaté qu'une culture brève (moins de 10 passages 2D) de cet échantillon entraîne l'émergence d'une mutation par amplification de la région chromosomique 20q11.

- 5 Ce point de départ cellulaire est particulièrement pertinent pour tester la sélection positive au cours du temps d'un clone mutant dans une population de cellules en culture.

En effet, la mutation par amplification de la région chromosomique 20q11 confère un avantage de croissance au clone muté ; plus la pression de sélection du système de culture sera élevée, plus ce clone aura de risque d'être sélectionné rapidement et de devenir

- 10 majoritaire.

Un système de culture encapsulée en suspension agitée (ci-après désignée par le terme « Invention ») a été comparé à deux systèmes de culture standards dans le domaine de la production de cellules souches pluripotentes : la culture en 2 dimensions (ci-après désignée par le terme « culture 2D ») et la culture en suspension agitée non protégée sous forme

15 d'agrégats (ci-après désignée par le terme « Bioréacteur agrégats »).

L'échantillon initial (décrit précédemment et cultivé en 2D), a été utilisé pour initier en parallèle 3 bras expérimentaux associés aux 3 systèmes de cultures, et ce, sur une durée de 28 jours. A chaque passage, et pour chaque bras expérimental, des cellules sont échantillonnées pour permettre la réalisation de tests génétiques (cf. partie résultats). En

20 particulier, la fréquence de la mutation par amplification de la région chromosomique 20q11 est évaluée à l'initiation et à la fin de cette culture prolongée de 28 jours.

- Le rythme des passages pour chaque système de culture suit scrupuleusement les recommandations optimales pour chaque condition. Ainsi les cultures 2D sont passées tous les 4 à 5 jours lorsque la confluence est comprise entre 70 et 90% ; les cultures en agrégats
- 25 sont passées tous les 5 jours selon les recommandations du fournisseur (Minibio, ABLE® Bioreactor Systems) ; les cultures encapsulées sont passées tous les 7 jours lorsque la confluence capsulaire moyenne est comprise entre 50 et 100%.

- Toutes les cultures décrites ci-après sont menées avec le milieu de culture mTeSR 1 (« Stemcell Technologies »). Un traitement par inhibiteur Rock à 10µM est initié pendant les 24 premières
- 30 heures après passage.

Toutes les cultures (2D, Bioréacteur agrégats et Invention) sont maintenues dans un incubateur de culture cellulaire à 37°C et 5% de CO₂.

Les 2 bras expérimentaux cultivant des cellules souches en suspension « Bioréacteur agrégats » et « Invention » utilisent des mini bioréacteurs de 30ml de marque Minibio, ABLE® Bioreactor Systems ; la vitesse d'agitation étant constante a été fixée à 35 rotations par minute depuis l'ensemencement jusqu'à la collecte des cellules.

- 5 Les 2 bras expérimentaux cultivant des cellules souches sous forme de regroupements de cellules tridimensionnels en suspension « bioréacteur agrégats » et « Invention » utilisent une dissociation enzymatique pour les passages successifs : les agrégats d'une part et les cystes encapsulés d'autre part, sont dissociés par utilisation d'un bain de TrypLE pendant 20 minutes à 37°C. Les cellules et petits regroupements (amas) de cellules résultant de cette dissociation
10 servent ensuite à ensemercer une nouvelle culture.

Pour les cultures utilisant une matrice extracellulaire, du Matrigel (Corning) est utilisé. Ainsi pour les cultures 2D, les flasques (T-Flask T75) sont préalablement cotées avec du matrigel ; pour les encapsulations ou ré-encapsulations les cellules sont mélangées au matrigel avant injection dans la voie microfluidique centrale ; la culture en agrégats ne requiert pas quant à
15 elle l'utilisation de matrice extracellulaire.

- La « culture 2D » est établie dans des flasques (T-Flask T75) préalablement coatées/tapissées avec du matrigel®, la concentration cellulaire d'ensemencement est comprise entre 10000 et 30000 cellules par cm². Les passages sont réalisés par la méthode des petits agrégats, par utilisation brève (inférieure à 5 minutes) d'un chélateur du calcium, RelesR (Stem cell
20 technologies). Le milieu de culture est changé complètement à jour 1 pour enlever le traitement rock inhibiteur (volume constant) puis quotidiennement.

- La culture « bioréacteur agrégats » est initiée avec la même suspension cellulaire servant à ensemencer la « culture 2D » et la culture « Invention » mais avec une concentration initiale de 175000 cellules par ml de milieu, pour un total de 20 ml de milieu. Le milieu de culture est
25 changé complètement à jour 1 pour enlever le traitement rock inhibiteur (volume constant), puis 75% du milieux est renouvelé quotidiennement (volume constant de 20ml).

Culture des hiPSC selon l'invention (encapsulation selon l'invention) :

- Avant l'encapsulation, les colonies de cellules souches 2D ont été détachées à l'aide de ReLeSR pendant 1 minute puis dissociées à l'aide d'Accutase (StemCell Technologies). Les HiPSCs ont
30 ensuite été mélangées dans un rapport de volume de 50/50 avec du Matrigel à 4°C pour maintenir la suspension à l'état liquide. La concentration finale de cellules dans la solution cellule/matrice était donc comprise entre 0,4 et 1,0×10⁶ cellules viables/mL, appelée densité

d'encapsulation. Des tubes d'éthylène tétrafluoroéthylène (ETFE,) sont connectés aux trois entrées d'un dispositif microfluidique à flux co-laminaire imprimé en 3D. Une pointe microcapillaire en verre extrudé et poli (d'un diamètre de de buse d'environ 100 µm pour la plupart des expériences ou un diamètre de buse de 150 µm) est collée à la sortie de la buse pour un meilleur contrôle de l'écoulement. La suspension de cellules/matrice est chargée dans le canal interne du dispositif à 3 voies, qui est maintenu réfrigéré grâce à un système de refroidissement en ligne afin d'éviter une gélification prématurée du Matrigel. Une solution d'alginate de sodium (Novamatrix Pronova SLG100, 0,25 g à 2% dans de l'eau distillée) est injectée dans le canal extérieur. Pour éviter la gélification de l'alginate dans le dispositif microfluidique due à la libération de calcium par les cellules en suspension, une solution sans calcium (Sorbitol 300mM, Sigma-Aldrich) est utilisée dans le canal intermédiaire de la puce de co-extrusion et sert de barrière contre la diffusion du calcium. Les débits pour les 3 solutions étaient de l'ordre de 120 ml/h pour les trois canaux (solution d'alginate, la solution de sorbitol et la suspension cellule+matrice). À ces débits, la solution composite forme un jet liquide qui se fragmente en gouttelettes (d'environ deux fois la taille de la buse) en raison de l'instabilité spontanée de Rayleigh-Plateau. Pour éviter la coalescence ultérieure du train de gouttelettes, une pièce de charge en alginate et un anneau de cuivre sont connectés à un générateur de haute tension (2000V). Lorsque les gouttelettes composites entrent en contact avec le bain collecteur de calcium (à 100mM), la couche externe d'alginate se gélifie. Par conséquent, la solution interne de cellules/matrice reste piégée à l'intérieur d'un microcompartiment fermé, sphérique et perméable. Dans les minutes qui suivent l'encapsulation, les capsules sont rincées avec du milieu (DMEM) pour réduire la concentration basale de calcium. Enfin, elles sont transférées dans un milieu de culture en suspension.

Les passages du bras expérimental « Invention » correspondent à des ré-encapsulations. Ces ré-encapsulations sont effectuées par dissolution des capsules d'alginate à l'aide d'un court rinçage au ReleSR, suivie d'une dissociation cellulaire à l'aide de TrypLE (enzyme de dissociation à base de trypsine, ThermoFischer) pendant 20 minutes à 37°C. Ensuite, les cellules obtenues ont été traitées selon un protocole d'encapsulation selon l'invention.

Résultats :

4 encapsulations successives, d'une durée de 7 jours chacune, ont été réalisées. 6 passages successifs ont été réalisés pour le bras « bioréacteur agrégats » et 7 passages successifs ont été réalisés pour le bras « culture 2D ». L'échantillonnage de cellules à chaque passage et à 28

jours a permis une évaluation comparative des 3 bras de culture au cours du temps (Figure 1). L'évaluation par microscopie a contraste de phase confirme la formation avec succès de colonies bi-dimensionnelles, d'agrégats et des cystes encapsulés de cellules souches comme il était attendu pour les bras « culture 2D » « bioréacteur agrégats » et « Invention » (Figures 2a, 2b, 2c).

A chaque passage, les cellules sont comptées à l'aide du compteur cellulaire (Nucleo Counter NC 3000) ce qui permet d'établir les facteurs d'amplifications cellulaires au cours de la culture (Figure 3). Les amplifications théoriques cumulées sont de 151 millions, 71 millions et 13 330 respectivement pour les bras expérimentaux « Invention », « culture 2D » et « bioréacteur agrégats ». Ces facteurs d'amplifications cumulées correspondent à un nombre de divisions cellulaires apparents moyen en 28 jours de 27,2 ; 26,2 et 13,7 respectivement pour les bras de cultures « Invention », « culture 2D » et « bioréacteur agrégats ». On observe que l'amplification cellulaire finale est plus élevée dans le bras expérimental « Invention » comparée aux 2 autres bras expérimentaux.

Les 3 systèmes de culture ont été menés avec succès selon les meilleurs standards, comme suggéré par les marqueurs de pluripotences OCT4 et NANOG similairement exprimés dans les 3 systèmes de cultures comparés (Figure 4).

L'évaluation génétique a tout d'abord été réalisée par puce SNP très haute définition (CytoScan® HD Array Affymetrix, thermo fisher) (Figure 5). On observe l'apparition d'une mutation structurelle (duplication chromosomique englobant la zone 20q11 et une délétion) au niveau du chromosome 20 clairement visualisable pour les échantillons finaux (J28) des bras expérimentaux « culture 2D » (environ 50% de cellules mutantes) et « bioréacteur agrégats » (environ 50% de cellules mutantes). Les profils similaires de remaniement du chromosome 20 pour ces 2 échantillons indiquent qu'il ne s'agit pas d'événements indépendants et que cette mutation est héritée d'une antériorité commune. Ainsi, même si cette mutation est indétectable lors de l'échantillonnage initial, ceci suggère fortement sa présence à un faible pourcentage au moment initial de l'expérience. Pour l'échantillon J28 du bras « Invention » on note une amplitude plus faible du nombre de copie, qui correspond à un pourcentage de cellules mutées en population inférieur à 10%.

Des analyses par PCR digitale ont également été réalisées à chaque passage pour tous les bras expérimentaux pour détecter l'éventuelle apparition de mutations génétiques récurrentes pour les cellules souches pluripotentes (iCS-digital PSC 24 probes, StemGenomics).

Notamment, une sonde PCR de ce test a permis de quantifier au cours du temps le nombre de copie de la région chromosomique 20q11 (Figure 6). Le nombre moyen de copies de la région 20q11 augmente au cours du temps en culture pour les cellules des 3 bras expérimentaux. Cette augmentation est plus importante et plus rapide pour les bras « culture 2D » et « bioréacteur agrégats » comparée au bras « Invention ». Considérant que le nombre de copie de la région 20q11 pour chaque cellule mutante est de 3 (gain de 1 copie cf. figure 5), un nombre moyen de copie inférieur à 2.2 correspond à un pourcentage de cellules mutantes dans la population de cellules inférieur à 20 %.

Au total, les résultats de PCR digitale et de puce SNP sont concordants et suggèrent que la sélection des cellules mutantes au cours des 28 jours de culture a été au moins 5 fois plus faible dans le bras « Invention » par rapport aux bras « culture 2D » et « bioréacteur agrégats » (Figure 7). Notamment, le système de culture encapsulé (Invention), a permis de réaliser en moyenne 6,8 divisions cellulaires par passage, tout en maintenant le pourcentage de cellules mutantes inférieur à 20% pour chaque encapsulation, ou en mettant bout à bout les 4 encapsulations réalisées.

EXEMPLE 2 :

Protocole :

Dans cet exemple deux lignées cellulaires sont utilisées : une lignée commerciale nommée iPSC-GHE (Gibco) et une lignée transgénique exprimant de manière constitutive la protéine fluorescente GFP, nommée iPSC-AAVS1-GFP (Coriell, Allen Institute for Cell Science).

Au départ de l'expérience, les deux lignées sont cultivées de manière indépendante en 2D. Une analyse caryotipique par PCR digitale (iCS-digital PSC 24 probes, StemGenomics) révèle que la lignée iPSC-GHE possède deux anomalies caryotipiques avec des amplifications des régions chromosomiques 7q et 20q, tandis que la lignée iPSC-AAVS1-GFP ne présente aucune anomalie sur les 24 zones étudiées (Figure 8).

L'utilisation de la lignée iPSC-GHE présentant les amplifications des régions chromosomiques 7q et 20q est particulièrement pertinente pour tester la sélection positive au cours du temps d'un clone mutant dans une population de cellules en culture. En effet, les mutations par amplification des régions chromosomiques 7q et 20q confèrent un avantage de croissance au clone muté ; plus la pression de sélection du système de culture sera élevée, plus ce clone aura de risque d'être sélectionné rapidement et de devenir majoritaire.

Le système de culture encapsulée en suspension agitée « Invention » a été comparé au système de culture standard dans le domaine de la production de cellules souches pluripotentes : la culture en suspension agitée non protégée sous forme d'agrégats « Bioréacteur agrégats », sur une durée de 21 jours.

- 5 L'échantillon utilisé pour initier en parallèle les 2 bras expérimentaux associés aux 2 systèmes de cultures, correspond à un mélange des lignées iPSC-AAVS1-GFP et iPSC-GHE. Le mélange correspond à 80% d'iPSC-AAVS1-GFP avec 20% d'iPSC-GHE.

A chaque passage, et pour chaque bras expérimental, des cellules sont échantillonnées pour permettre la réalisation de tests cytométriques et génétiques (cf ; partie résultats). En

- 10 particulier, les analyses visent à suivre l'évolution de la fréquence de la population iPSC-GHE contenant les anomalies caryotypiques au sein de la culture.

Le rythme des passages pour chaque système de culture suit scrupuleusement les recommandations optimales pour chaque condition. Ainsi les cultures en agrégats sont passées tous les 5 jours selon les recommandations du fournisseur (Minibio, ABLE® Bioreactor

- 15 Systems) et les cultures encapsulées sont passées tous les 7 jours lorsque la confluence capsulaire moyenne est comprise entre 50 et 100%.

Toutes les cultures décrites ci-après sont menées avec le milieu de culture mTeSR1 plus (Stemcell Technologies). Un traitement par inhibiteur Rock à 10µM est initié pendant les 24 premières heures après passage.

- 20 Toutes les cultures (Bioréacteur agrégats et Invention) sont maintenues dans un incubateur de culture cellulaire à 37°C et 5% de CO₂.

Les 2 bras expérimentaux « Bioréacteur agrégats » et « Invention » utilisent des mini bioréacteur de 30ml de marque Minibio, ABLE® Bioreactor Systems ; la vitesse d'agitation étant constante a été fixée à 55 rotations par minute pour la condition « Bioréacteur

- 25 agrégats » et 100 rotations par minutes pour la condition « Invention ».

Les 2 bras expérimentaux « bioréacteur agrégats » et « Invention » utilisent une dissociation enzymatique pour les passages successifs : les agrégats d'une part et les cystes encapsulés d'autre part, sont dissociés par utilisation d'un bain de TrypLE à 37°C. Les cellules et petits regroupements (amas) de cellules résultant de cette dissociation servent ensuite à

- 30 ensemercer une nouvelle culture.

Pour les encapsulations ou ré-encapsulations les cellules sont mélangées au matrigel® avant injection dans la voie microfluidique centrale ; la culture en agrégats ne requiert pas quant à

elle l'utilisation de matrice extracellulaire.

La culture « bioréacteur agrégats » est initiée avec la même suspension cellulaire servant à ensemencer la culture « Invention » mais avec une concentration initiale de 175000 cellules par ml de milieu, pour un total de 10 ml de milieu. Le milieu de culture est changé
5 complètement à jour 1 pour enlever le traitement rock inhibiteur.

Culture des hiPSC selon l'invention (encapsulation selon l'invention) :

Avant l'encapsulation, les colonies de cellules souches 2D des lignées iPSC-GHE et iPSC-AAVS1-GFP ont été dissociées à l'aide d'Accutase (StemCell Technologies). Les deux lignées iPSCs ont ensuite été mélangées selon les ratios précédemment indiqués (80%-20%) et cette suspension
10 cellulaire à elle-même été mélangée dans un rapport de volume de 50/50 avec du Matrigel à 4°C pour maintenir la suspension à l'état liquide. La concentration finale de cellules dans la solution cellule/matrice était donc comprise entre 0,4 et $1,0 \times 10^6$ cellules viables/mL, appelée densité d'encapsulation. Des tubes d'éthylène tétrafluoroéthylène (ETFE,) sont connectés aux trois entrées d'un dispositif microfluidique à flux co-laminaire imprimé en 3D. Une pointe
15 microcapillaire en verre extrudé et poli (d'un diamètre de de buse d'environ 100 μ m pour la plupart des expériences ou un diamètre de buse de 150 μ m) est collée à la sortie de la buse pour un meilleur contrôle de l'écoulement. La suspension de cellules/matrice est chargée dans le canal interne du dispositif à 3 voies, qui est maintenu réfrigéré grâce à un système de refroidissement en ligne afin d'éviter une gélification prématurée du Matrigel. Une solution
20 d'alginate de sodium (Novamatrix Pronova SLG100, 0,25 g à 2% dans de l'eau distillée) est injectée dans le canal extérieur. Pour éviter la gélification de l'alginate dans le dispositif microfluidique due à la libération de calcium par les cellules en suspension, une solution sans calcium (Sorbitol 300mM, Sigma-Aldrich) est utilisée dans le canal intermédiaire de la puce de co-extrusion et sert de barrière contre la diffusion du calcium. Les débits pour les 3 solutions
25 étaient de l'ordre de 120 ml/h pour les trois canaux (solution d'alginate, la solution de sorbitol et la suspension cellule+matrice). À ces débits, la solution composite forme un jet liquide qui se fragmente en gouttelettes (d'environ deux fois la taille de la buse) en raison de l'instabilité spontanée de Rayleigh-Plateau. Pour éviter la coalescence ultérieure du train de gouttelettes, une pièce de charge en alginate et un anneau de cuivre sont connectés à un générateur de
30 haute tension (2000V). Lorsque les gouttelettes composites entrent en contact avec le bain collecteur de calcium (à 100mM), la couche externe d'alginate se gélifie. Par conséquent, la solution interne de cellules/matrice reste piégée à l'intérieur d'un microcompartiment fermé,

sphérique et perméable. Dans les minutes qui suivent l'encapsulation, les capsules sont rincées avec du milieu (DMEM) pour réduire la concentration basale de calcium. Enfin, elles sont transférées dans un milieu de culture en suspension.

Les passages du bras expérimentale « Invention » correspondent à des ré-encapsulations. Ces ré-encapsulations sont effectuées par dissolution des capsules d'alginate à l'aide d'un court rinçage au ReleSR, suivie d'une dissociation cellulaire à l'aide de d'Accutase. Ensuite, les cellules obtenues ont été traitées selon un protocole d'encapsulation selon l'invention.

Résultats :

3 encapsulations successives, d'une durée de 7 jour chacune, ont été réalisées et 4 passages successifs ont été réalisés pour le bras « bioréacteur agrégats ». L'échantillonnage de cellules à chaque passage et à 21 jours a permis une évaluation comparative des 2 bras de culture au cours du temps (Figure 9).

L'évaluation par microscopie a contraste de phase confirme la formation avec succès d'agrégats et des cystes encapsulés de cellules souches comme il était attendu pour les bras « bioréacteur agrégats » et « Invention » (Figure 10).

A chaque passage, les cellules sont comptées à l'aide du compteur cellulaire (Nucleo Counter NC 3000) ce qui permet d'établir les facteurs d'amplifications cellulaires au cours de la culture (Figure 11). Les amplifications théoriques cumulées sont de 55 776 699 millions et 40 481 respectivement pour les bras expérimentaux « Invention » et « bioréacteur agrégats ». Ces facteurs d'amplifications cumulées correspondent à un nombre de divisions cellulaires apparents moyen en 21 jours de 25,73 et 15,30 respectivement pour les bras de cultures « Invention » et « bioréacteur agrégats ». On observe que l'amplification cellulaire finale est plus élevée dans le bras expérimental « Invention » comparée au bras expérimental « bioréacteur agrégats ».

Les 2 systèmes de culture ont été menés avec succès selon les meilleurs standards, comme suggéré par les marqueurs de pluripotences OCT4 et NANOG similairement exprimés dans les 2 systèmes de cultures comparés (Figure 12).

Une première analyse par cytométrie en flux a été réalisée pour suivre l'évolution de la population de la lignée iPSC-GHE au sein de la culture cellulaire. Les cellules iPSC-GHE (GFP négatives) contiennent des amplifications des régions chromosomiques 7q et 20q qui confèrent un avantage sélectif lors de la culture des hiPSC. Les cellules iPSC-AAVS1-GFP (GFP positives) ne contiennent pas d'anomalie chromosomique.

L'analyse par cytométrie en flux à chaque passage pour tous les bras expérimentaux a permis de quantifier au cours du temps la fréquence de cellules iPSC-GHE et iPSC-AAVS1-GFP (Figure 13) et donc par extrapolation du nombre de copie des régions chromosomiques 7q et 20q. La fréquence de la population iPSC-GHE (GFP négative) au sein de la culture cellulaire augmentent au cours du temps pour le bras « bioréacteur agrégat » mais diminue dans le temps pour le bras « invention ».

L'analyse par cytométrie en flux à ensuite était confirmée par une analyse par PCR digitale pour détecter l'évolution du taux de mutations génétiques dans la population de cellules souches pluripotentes (iCS-digital PSC 24 probes, StemGenomics). Notamment, deux sondes PCR de ce test ont permis de quantifier au cours du temps le nombre de copies des régions chromosomiques 7q et 20q (Figure 14). Le nombre moyen de copies des régions 7q et 20q augmente au cours du temps en culture pour le bras « bioréacteur agrégat ». Pour le bras « invention » le nombre moyen de copies de la région 7q diminue au cours du temps, et le nombre moyen de copie de la région 20q diminue puis augmente très légèrement au cours du temps mais de façon beaucoup moins importante et moins rapide que pour le bras « bioréacteur agrégat ». Considérant que le nombre de copies des régions 7q et 20q pour chaque cellule mutante iPSC-GHE est de 3 (gain de 1 copie cf. Figure 8), un nombre moyen de copies équivalent à 2.3 correspond à un pourcentage de cellules mutantes dans la population de cellules de 30 %.

Au total, les résultats de cytométrie en flux et de PCR digitale sont concordants et suggèrent que la sélection des cellules mutantes au cours des 21 jours de culture a été au moins 14,7 fois plus faible dans le bras « Invention » par rapport au bras « bioréacteur agrégats » (Figure 15). Notamment, le système de culture encapsulé (Invention), a permis de réaliser en moyenne 8,6 divisions cellulaires par passage, tout en maintenant le pourcentage de cellules mutantes inférieur à 20% (inférieure à 3%) pour chaque encapsulation, ou en mettant bout à bout les 4 encapsulations réalisées.

Revendications

- [Revendication 1] Microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, caractérisé en ce que moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment sont des cellules
- 5 présentant au moins une mutation.
- [Revendication 2] Microcompartiment selon la revendication 1, caractérisé en ce que les cellules représentent plus de 50% en volume par rapport au volume du microcompartiment, préférentiellement plus de 70% en volume par rapport au volume du microcompartiment.
- [Revendication 3] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications,
- 10 caractérisé en ce que la ou les mutation(s) sont choisies parmi les mutations génétiques et les mutations épigénétiques.
- [Revendication 4] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la ou les mutation(s) sont des mutations fonctionnelles.
- [Revendication 5] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications,
- 15 caractérisé en ce qu'au moins une mutation est une mutation oncogène.
- [Revendication 6] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que moins de 20% des cellules sont des cellules présentant au moins une mutation du gène P53 et/ou au moins une mutation par amplification de la région chromosomique 20q et/ou au moins une mutation par amplification de la région
- 20 chromosomique 7q.
- [Revendication 7] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que moins de 20% des cellules sont des cellules présentant au moins une mutation par amplification de la région chromosomique 20q11.
- [Revendication 8] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications,
- 25 caractérisé en ce que les cellules présentant au moins une mutation représentent entre 0 et 10% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment, préférentiellement entre 0 et 5%.
- [Revendication 9] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules sont organisées sous forme d'un tissu ou d'un micro-tissu.

[Revendication 10] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend une lumière interne.

[Revendication 11] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend également, entre (a) la ou les couche(s) de cellules et/ou la
5 ou les assises de cellule(s) et (b) la couche d'hydrogel, au moins une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique et/ou comprenant des éléments de matrice extracellulaire.

[Revendication 12] Microcompartiment selon la précédente revendication, caractérisé en ce que la couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique est une couche de matrice extracellulaire.

10 [Revendication 13] Microcompartiment selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique présente un module d'Young compris entre 0,05 et 3 kDa.

[Revendication 14] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules sont des cellules humaines ou animales.

15 [Revendication 15] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend successivement organisées autour d'une lumière :
- au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules,
- une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique,
- une couche externe en hydrogel.

20 [Revendication 16] Microcompartiment cellulaire selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules sont des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) humaines ou animales, et/ou des cellules multipotentes humaines ou animales, et/ou des cellules progénitrices humaines ou animales et/ou des cellules différenciées humaines ou animales.

25 [Revendication 17] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il est clos.

[Revendication 18] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la couche externe comprend de l'alginate.

[Revendication 19] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications,
30 caractérisé en ce qu'il a la forme d'un ovoïde, d'un cylindre, d'un sphéroïde ou d'une sphère.

[Revendication 20] Microcompartiment cellulaire selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 20 cellules, préférentiellement au moins 1000 cellules.

5 [Revendication 21] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules présentes dans le microcompartiment ont été obtenues après au moins deux cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins une cellule, préférentiellement entre 1 et 50 cellules.

10 [Revendication 22] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules présentes dans le microcompartiment ont été obtenues après au moins 5 cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins une cellule, préférentiellement entre une et cinquante cellules.

15 [Revendication 23] Ensemble d'au moins deux microcompartiments cellulaires en trois dimensions, chaque microcompartiment comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, caractérisée en ce que moins de 20% des cellules constituant la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments sont des cellules présentant au moins une mutation.

20 [Revendication 24] Ensemble de microcompartiments selon la précédente revendication, caractérisé en ce qu'au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'une des revendications 1 à 21.

[Revendication 25] Ensemble de microcompartiments selon la précédente revendication, caractérisé en ce que les microcompartiments sont disposés dans un milieu de culture dans un bioréacteur clos.

25 [Revendication 26] Procédé de préparation d'un microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 1 à 22 ou d'un ensemble de microcompartiments cellulaires selon l'une des revendications 23 à 25, comprenant les étapes suivantes :

- (a) préparer une suspension de cellules comprenant des cellules uniques et/ou au moins un amas de cellules dans un milieu isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,
- 30 - (b) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;
- (c) préférentiellement cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique contenant un inhibiteur de l'apoptose ;

- (d) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;
- (e) cultiver les microcompartiments dans une solution isotonique pendant au moins deux cycles de division cellulaire, et

- 5 - (f) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus, ledit procédé étant caractérisé en ce que la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b) représentent un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

- [Revendication 27] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que
10 chaque amas de cellules 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.

- [Revendication 28] Procédé selon l'une des revendications 26 ou 27, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mélange des cellules à une matrice extracellulaire, soit entre l'étape
15 (a) et l'étape (b), soit simultanément à l'encapsulation à l'étape (b).

- [Revendication 29] Procédé selon l'une des revendications 26 à 28, caractérisé en ce que les étapes (c), (d) et (e) sont mises en œuvre sous agitation permanente ou séquentielle.

- [Revendication 30] Procédé selon l'une des revendications 26 à 29, caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre dans un bioréacteur clos.

- 20 [Revendication 31] Procédé selon l'une des revendications 26 à 30, caractérisé en ce que le procédé comprend au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (e).

- [Revendication 32] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que le procédé comprend entre 2 et 15 ré-encapsulations des cellules.

- [Revendication 33] Procédé selon l'une des revendications 31 ou 32, caractérisé en ce que
25 chaque ré-encapsulation correspond à un passage.

- [Revendication 34] Procédé selon l'une des revendications 31 à 33, caractérisé en ce que la ré-encapsulation comprend les étapes suivantes :

- (i) éliminer la couche externe en hydrogel,
- (ii) remettre en suspension les cellules qui étaient contenues dans le microcompartiment de
30 façon à obtenir des cellules uniques et/ou au moins un amas de cellules dans un milieu isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,
- (iii) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;

- (iv) préférentiellement cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique contenant un inhibiteur de l'apoptose ;
- (v) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;
- 5 - (vi) cultiver les microcompartiments dans une solution isotonique pendant au moins un cycle de division cellulaire, et
- (vii) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

[Revendication 35] Procédé selon l'une des revendications 26 à 34, caractérisé en ce que pour chaque microcompartiment, les cellules uniques représentent moins de 50% en nombre
10 de la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b).

[Revendication 36] Procédé selon l'une des revendications 26 à 35, 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 37] Procédé selon l'une des revendications 26 à 36, caractérisé en ce qu'il
15 comprend une ou plusieurs étapes d'élimination des microcompartiments comportant des cellules mutantes.

[Revendication 38] Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications 26 à 37, pour maintenir l'intégrité génomique de cellules lors de leur amplification.

[Revendication 39] Utilisation d'un microcompartiment selon l'une des revendications 1 à
20 22 ou d'un ensemble de microcompartiments selon l'une des revendications 23 à 25, pour maintenir l'intégrité génomique de cellules lors de leur amplification.

.