

COMPOSITION BIOCOMPATIBLE COMPRENANT DES ELEMENTS CELLULAIRES HETEROGENES

Domaine technique

La présente invention se rapporte au domaine des compositions biocompatibles, notamment injectables. L'invention a en particulier pour objet une composition biocompatible particulière comprenant une solution et des éléments cellulaires hétérogènes en suspension dans ladite solution.

Art antérieur

5 Depuis plus de 20 ans, la médecine régénérative et plus particulièrement la thérapie cellulaire, suscite un intérêt grandissant chez les professionnels de santé et le grand public. La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules pour restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe, et ce, au moyen d'une injection de cellules thérapeutiques.

Aujourd'hui, la thérapie cellulaire fait face à de nombreux défis inhérents à l'administration
10 de cellules dans l'organisme.

Outre les difficultés de mise en culture à grande échelle de cellules thérapeutiques adaptés à l'organe ciblé, la composition du milieu d'injection comprenant les cellules à inoculer est un défi fondamental pour toute thérapie injectable.

En général, les médicaments peuvent se dissoudre dans un liquide et peuvent se distribuer
15 sous forme de solution, notamment dans une perfusion. Les suspensions liquides comprenant de très petites particules se comporte également comme des solutions et peuvent également être administrées également par perfusion.

En revanche, dès lors que la composition est cellularisée, c'est-à-dire qu'elle comprend des cellules, elle est injectée en suspension.

20 Contrairement aux solutions qui forment un liquide homogène et fluide, les cellules en suspension sédimentent naturellement en fonction du temps.

A titre d'exemple, les érythrocytes « normaux » sédimentent dans le sang à une vitesse relative pouvant atteindre 20 mm par heure, et lorsque certaines cellules sont agrégées en amas ou microtissu, cette vitesse relative peut dépasser 100 mm par heure, voire 300mm par
25 heure dans certains cas.

La sédimentation des particules dans les suspensions solides-liquides est un sujet largement abordé dans de nombreux domaines telles que la chimie, la géologie et la biologie notamment via des applications pharmaceutiques ou en bio-impression.

La vitesse de sédimentation de particules solides telles que des cellules dans un liquide fait référence à la vitesse à laquelle les particules se déplacent vers le bas ou se déposent au fond d'un récipient par gravité. Ce phénomène de sédimentation se produit lorsque les particules, en raison de leur masse et de leur densité, sont plus lourdes que le milieu dans lequel elles sont suspendues.

Lors de l'utilisation d'une suspension de cellules, les cellules peuvent être hétérogènes. En effet, les cellules peuvent se trouver sous des formes très variées, on parle alors d'éléments cellulaires. A titre d'exemple, les éléments cellulaires peuvent être sous forme de cellules isolées, de microtissus cellulaires ou d'amas de cellules présentant une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s). Par conséquent, lors de l'utilisation de suspensions comprenant des éléments cellulaires hétérogènes, les cellules sont réparties de façon hétérogène dans leur milieu, et ce, en fonction de plusieurs paramètres, tels que la taille, la forme et la densité des cellules, ainsi que des propriétés physicochimiques du milieu.

Sans contrôle de ces paramètres, la plus grande concentration de cellules se retrouve, par gravité, vers la partie basse du dispositif comprenant la suspension d'éléments cellulaires.

A titre d'exemple, en thérapie cellulaire, lors de l'injection d'une suspension comprenant des éléments cellulaires hétérogènes, le premier volume d'injection peut contenir beaucoup plus de cellules que celles distribuées ultérieurement. Ce gradient de densité crée une hétérogénéité dans les différents volumes d'injection pouvant nuire à l'efficacité de la thérapie cellulaire.

Par ailleurs, au-delà du maintien de l'homogénéité de la répartition des cellules dans leur milieu, le maintien de la stabilité biologique est fondamental pour garantir la conservation de cellules vivantes dans son milieu, en particulier lors de l'injection de cellules viables pour son utilisation en thérapie cellulaire. En effet, l'osmolalité, la concentration et la diversité des espèces ioniques est essentielle pour maintenir l'homéostasie des cellules en suspension.

Il existe donc un besoin important pour une composition biocompatible, comprenant des éléments cellulaires hétérogènes, capable de maintenir :

- l'homogénéité de répartition des éléments cellulaires au sein de la composition de façon à pouvoir contrôler précisément la quantité de cellules contenue dans un volume donné ; et
- la stabilité biologique des éléments cellulaires en suspension.

Résumé de l'invention

Pour répondre à ce besoin, l'invention propose une nouvelle composition biocompatible, comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, lesdits éléments cellulaires étant choisis parmi des cellules isolées, des microtissus cellulaires,

des amas de cellules et leurs mélanges, au moins deux desdits éléments cellulaires présentant une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), ladite composition étant caractérisée en ce que la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité suivante :

5 [Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

- 10 où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,
 où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;
 où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;
 et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹.

- 15 Avantageusement, le respect de l'inégalité précitée garantit que la vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution est inférieure à $5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹, soit 20mm.h⁻¹.

La vitesse de sédimentation maximale inférieure à 20mm.h⁻¹ des éléments cellulaires par rapport à la solution permet d'apporter de nombreux avantages à la composition selon

- 20 l'invention, à savoir :
- une augmentation de la viabilité cellulaire : Une vitesse de sédimentation maximale inférieure à 20 mm.h⁻¹ réduit le stress mécanique exercé sur les éléments cellulaires, minimisant ainsi les risques d'altération de leur structure ou de leur métabolisme, ce qui peut améliorer leur viabilité ;
 - 25 - une précision analytique accrue : Dans le cadre d'analyses et de mesures spécifiques, une vitesse de sédimentation maximale inférieure à 20 mm.h⁻¹ permet une meilleure précision et une plus grande sensibilité des résultats ;
 - une meilleure homogénéité : Une vitesse de sédimentation maximale inférieure à 20 mm.h⁻¹ permet aux cellules de rester réparties de manière homogène dans la solution, évitant ainsi
 - 30 la formation de gradients de concentration ;
 - une meilleure reproductibilité expérimentale : En maintenant une vitesse de sédimentation maximale inférieure à 20 mm.h⁻¹, les variations dues à la sédimentation différentielle des éléments cellulaires hétérogènes sont réduites.

La composition selon l'invention présente une densité et/ou une viscosité particulièrement adaptée aux éléments cellulaires hétérogènes favorisant une distribution uniforme desdits éléments cellulaires en suspension dans la solution.

Selon un objet préféré, la composition selon l'invention comprend une solution et des
5 éléments cellulaires, dans laquelle l'osmolalité des éléments cellulaires dans la solution est comprise entre 180 et 360 mOsmol.kg⁻¹, préférentiellement entre 220 et 360 mOsmol.kg⁻¹. En d'autres termes, la composition comprenant des éléments cellulaires et une solution présente une osmolalité comprise entre 180 et 360 mOsmol.kg⁻¹, préférentiellement entre 220 et 360 mOsmol.kg⁻¹.

10 Avantageusement, l'osmolalité des éléments cellulaires permet de former un environnement favorable à la survie des éléments cellulaires tel qu'un environnement isotonique.

De manière surprenante, les inventeurs ont mis au point une composition biocompatible, adaptée à de nombreuses utilisations, contrôlant la vitesse de sédimentation des éléments cellulaires hétérogènes en suspension dans la solution tout en présentant une stabilité
15 biologique adaptée aux cellules, notamment aux cellules humaines ou animales.

De façon préférée, la composition selon l'invention présente une densité comprise entre 800 et 2000 kg/m³, préférentiellement entre 997 et 1600 kg/m³, préférentiellement entre 1025 et 1100 kg/m³, notamment entre 1047 et 1090 kg.m³.

Avantageusement, la densité de la composition selon l'invention est homogène, par
20 conséquent, chaque éléments cellulaires est soumis à la même densité sur l'ensemble du volume de la composition.

Selon un mode de réalisation préféré, la composition selon l'invention présente une viscosité au repos mesurée à 25°C comprise entre 0,01 et 1,5 Pa.s, préférentiellement comprise entre 0,01 et 1 Pa.s, notamment entre 400 et 1200mPa.s, plus préférentiellement 400 et 1000mPa,
25 encore plus préférentiellement entre 500 et 1100mPa.s, notamment entre 500 et 900mPa.

Avantageusement, les caractéristiques rhéologiques de la composition selon l'invention permettent de pouvoir utiliser la composition selon l'invention dans des dispositifs d'injection sans que les forces de frottement fluides ou de cisaillements rencontrées lors de l'injection détériorent la précision de l'injection et n'impactent la viabilité et l'intégrité des cellules. En
30 effet, une viscosité et/ou une densité trop élevée peut entraîner une résistance accrue lors de l'écoulement de la composition à travers le moyen d'injection, associée à des forces de friction visqueuses susceptibles d'endommager les éléments cellulaires.

Les inventeurs, sont parvenus à une composition biocompatible présentant des caractéristiques rhéologiques adaptées aux éléments cellulaires hétérogène en se basant sur
35 le couple densité/viscosité de la solution comprenant lesdits éléments cellulaires.

Selon un mode de réalisation, la composition biocompatible comprend au moins un élément cellulaire contenu dans un microcompartiment en trois dimensions comprenant une couche externe en hydrogel.

Préférentiellement, la composition biocompatible selon l'invention comprend une solution et
5 des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle les cellules constituant les éléments cellulaires sont choisies parmi les cellules neurales, les cellules neuronales, les cellules gliales, les cellules cardiaques, les cellules de la rétine, les lymphocytes, les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules souches
10 mésenchymateuses, les kératinocytes, les fibroblastes, les pré-adipocytes, les adipocytes, les cellules des îlots pancréatiques et leurs mélanges.

Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend au moins deux types cellulaires distincts.

Avantageusement, la composition selon l'invention est particulièrement adaptée à tous types cellulaires.

15 Selon un autre objet, l'invention porte sur la composition biocompatible selon l'invention pour son utilisation dans le traitement de maladies en thérapie cellulaire.

Préférentiellement, la composition biocompatible selon l'invention est utilisée en tant que composition injectable chez l'Homme ou l'Animal.

Avantageusement, en garantissant une distribution uniforme des éléments cellulaires au sein
20 de la solution, la composition selon l'invention permet d'obtenir un dosage précis des éléments cellulaires injectés permettant ainsi d'améliorer :

- l'efficacité thérapeutique : Lors de l'injection d'éléments cellulaires à des fins thérapeutiques, le dosage précis est essentiel pour obtenir le résultat désiré. Une quantité
25 insuffisante d'éléments cellulaires peut ne pas être efficace, tandis qu'une surdose d'élément cellulaires peut entraîner des effets indésirables. En ajustant avec précision le dosage, il est possible de maximiser l'efficacité thérapeutique tout en minimisant les risques pour le patient ;

- la précision expérimentale : La maîtrise du dosage lors de l'injection d'éléments cellulaires permet de minimiser les variations entre les échantillons et d'obtenir des données fiables et
30 reproductibles. Cela est particulièrement important lors d'expériences comparatives ou de tests de l'efficacité de nouvelles thérapies cellulaires.

- l'optimisation des ressources : Les ressources utilisées pour la production de d'éléments cellulaires, telles que les cultures cellulaires et les produits de culture, peuvent être coûteuses. Un dosage précis permet de minimiser le gaspillage de ces ressources en évitant les surdoses
35 inutiles.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'une composition biocompatible selon l'invention comprenant la mise en œuvre des étapes suivantes :

(a) Préparation ou récupération d'une composition comprenant une solution (A) et un ensemble d'éléments cellulaires dont au moins deux éléments cellulaires présentent une
5 densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s);

(b) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition de l'étape a), une solution (B) et optionnellement la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution de la composition issue de l'étape (b) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b)
10 vérifie l'inégalité suivante :

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique
15 de gradient de densité exprimée en kg/m³,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;

où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;

20 et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹ ;

(c) Optionnellement récupération de la composition issue de l'étape (b), comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), dans laquelle ladite composition étant caractérisée en ce que la différence de
25 densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité précitée à l'étape (b).

Avantageusement, le procédé selon l'invention permet de préparer une composition biocompatible présentant l'association d'une densité et d'une viscosité optimale pour maintenir les éléments cellulaires hétérogènes en suspension à une vitesse de sédimentation
30 maximale par rapport à la solution inférieure à $5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹ soit 20 mm.h⁻¹.

Préférentiellement, la composition de l'étape (a) présente une vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution (A) supérieure à 20 mm.h⁻¹.

Un tel procédé permet avantageusement d'adapter les caractéristiques rhéologiques, notamment la densité et la viscosité, d'une composition de façon à rendre homogène la répartition des éléments cellulaires hétérogènes au sein de la composition. De cette façon, la composition de l'étape (c) peut être utilisée dans de nombreuses applications, notamment

Enfin, selon un dernier objet, l'invention concerne un kit comprenant :

- une composition biocompatible, comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, lesdits éléments cellulaires étant choisis parmi des cellules isolées, des microtissus cellulaires, des amas de cellules et leurs mélanges, dont au moins deux desdits éléments cellulaires présentant une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), ladite composition étant caractérisée en ce que la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité suivante :

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;

où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;

et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹; et

- un moyen d'injection, préférentiellement une canule.

Avantageusement, les caractéristiques rhéologiques de la composition permettent de maintenir l'homogénéité de répartition des éléments cellulaires dans la composition tout en prévenant l'obstruction du moyen d'injection.

Selon une variante, l'invention concerne un kit comprenant :

- une préparation (1) biocompatible comprenant au moins un agent de viscosité biocompatible choisi parmi le PVA, le carboxyméthyl cellulose (CMC), le méthylcellulose, l'hydroxyethylcellulose, l'éthylhydrocyethylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'alginate, le pullulane, le chitosan, la gomme de xanthan, la gomme de gellane, le polyacrilamide, le polyvinylpyrrolidone, le polyethylene oxide, la caséine, le collagène, le

hyaluronate de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules ; et au moins un agent de densité biocompatible choisi parmi le dextran, le mannitol, le NaCl, le glycérol, le sorbitol et leurs mélanges ; et

- 5 - une préparation (2) biocompatible comprenant des éléments cellulaires, lesdits éléments cellulaires étant choisis parmi des cellules isolées, des microtissus cellulaires, des amas de cellules et leurs mélanges, au moins deux desdits éléments cellulaires présentant une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s)

de façon à ce que le mélange de la préparation (1) et la préparation (2) forme une composition dont la différence de densité entre la densité de la préparation (1) et la densité moyenne des
10 éléments cellulaires de la préparation (2) vérifie l'inégalité suivante :

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique
15 de gradient de densité exprimée en kg/m³,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;

où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;

20 et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹.

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

Brève description des Figures :

[Figure 1] La figure 1 représente une séquence d'images montrant la stabilité en suspension d'éléments cellulaires dans le temps dans une composition selon l'invention, et une
25 composition hors invention.

[Figure 2] La figure 2 représente l'étude comparative de l'impact de l'immersion prolongée (6h) d'éléments cellulaires dans une solution, sur un panel de lots de production de microtissu d'intérêt.

[Figure 3] La figure 3 est une représentation schématique d'une étude comparative évaluant
30 l'impact d'une procédure d'injection sur la viabilité des éléments cellulaires au sein de la composition selon l'invention.

[Figure 4] La figure 4 est une représentation graphique d'une étude évaluant les différentes déformations de cisaillement de la composition selon l'invention.

Description détaillée de l'invention

Définitions :

Par « agent de densité » au sens de l'invention, on entend une espèce chimique biocompatible, soluble en solution aqueuse et utilisée pour augmenter la densité de celle-ci tout en n'altérant pas sensiblement la biocompatibilité de la solution avec les éléments cellulaires en suspension. Plus particulièrement, lorsqu'un agent de densité au sens de l'invention est introduit à une concentration supérieure à 10% en masse dans une solution aqueuse, cela n'entraîne pas de modification du comportement rhéologique de la solution.

De manière complémentaire, l'ajout d'un tel agent n'augmente pas l'osmolalité de la solution au-delà de 360mOsm. En d'autres termes, l'ajout d'un agent de densité au sens de l'invention à une concentration supérieure à 10% en masse dans une solution n'entraîne pas de transition de phase tel que la gélification.

Par « amas de cellules » au sens de l'invention, on entend un regroupement tri-dimensionnel de cellules maintenues solidaires les unes des autres par des interactions adhésives ou par la présence de tissu interstitiel.

Par « biocompatible » au sens de l'invention, on entend la capacité de d'une substance ou composition à interagir de manière favorable avec les systèmes biologiques, tels que les tissus, les organes ou les organismes vivants, sans causer de réactions nocives, d'irritation excessive ou de dommages indésirables. Lorsqu'une substance ou composition est qualifiée de biocompatible, cela signifie qu'elle est conçue et formulée de manière à minimiser les risques de toxicité, d'inflammation, de rejet ou d'autres réponses indésirables de la part de l'organisme et/ou des éléments cellulaires.

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

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

Par « cellule souche embryonnaire » au sens de l'invention on entend une cellule souche pluripotente de cellule dérivée de la masse cellulaire interne du blastocyste. La pluripotence des cellules souches embryonnaires peut être évaluée par la présence de marqueurs tels que les facteurs de transcription OCT4, NANOG et SOX2 et des marqueurs de surface comme

SSEA4/5, 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.

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

Par « cellule souche pluripotente induite » au sens de l'invention on entend une cellule souche pluripotente induite à la pluripotence par reprogrammation génétique de cellules somatiques différenciées. Ces cellules sont notamment positives pour les marqueurs de pluripotence,
15 comme la coloration à la phosphatase alcaline et l'expression des protéines NANOG, SOX2, OCT4 et SSEA4/5. 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).

- 20 Par « comportement rhéologique » au sens de l'invention, on entend la réaction d'un matériau aux contraintes et aux déformations qui lui sont appliquées. Il décrit comment la matière s'écoule ou se déforme sous l'effet de force externe. Il existe plusieurs types de comportements rhéologiques tels que l'élasticité, la plasticité, la viscosité et la visco-élasticité.

Par « couche de cellules » ou « assise de cellules » au sens de l'invention, on entend plusieurs
25 cellules formant une couche ou une assise pouvant être structurée autour d'une lumière, il peut s'agir par exemple d'un tissu ou d'un micro-tissu cellulaire ou d'une culture groupée en trois dimensions. L'épaisseur de la couche de cellules pouvant être variable. Cette couche est organisée en trois dimensions dans le microcompartiment.

Par « densité » au sens de l'invention, on entend la masse volumique des entités concernées
30 (éléments cellulaires ou solutions) exprimée en mg/mL. Dans le contexte de l'invention, la densité des solutions est mesurée à la température de 20°C à l'aide de d'un densimètre. Dans le cas des éléments cellulaires, la densité est mesurée par la méthode de gradient de densité. Celle-ci consiste à préparer des solutions étalonnées en densité et isotoniques. Ces solutions à densité connues sont ensuite introduites en couches successives dans un tube de façon à
35 former un gradient de densité de bas en haut, chaque couche étant plus dense que la couche directement supérieure. Typiquement, les gradients de densité sont préparés par incréments

de densité de 5 kg/m³. La densité des éléments cellulaires est donc donnée à une résolution de +/- 5 kg/m³. Une fois le gradient de densité formé, les éléments cellulaires sont injectés sur la partie supérieure du tube. Ces-derniers sédimentent et se stabilisent dans ou entre la ou les couches dont la densité leur est la plus proche. La lecture s'effectue une fois que tous les éléments cellulaires sont stabilisés, typiquement après 1h. Avantageusement, des billes synthétiques colorées de densités calibrées peuvent être introduites simultanément, leur position d'équilibre fournissant un contrôle positif de la mesure de position des éléments cellulaires. Toutes ces mesures sont réalisées à la température ou au sein de l'intervalle de température d'utilisation projetée car la température peut différentiellement affecter la densité de l'eau, des solutions et des éléments cellulaires.

Par « densité moyenne des éléments cellulaires », au sens de l'invention, on entend la masse volumique moyenne des éléments cellulaires tels que des microcompartiment. Dans le contexte de l'invention, la densité moyenne des éléments cellulaire est mesurée par la méthode de gradient de densité. Cette méthode, bien connu de l'Homme du métier, consiste à préparer des solutions étalonnées à densité connues. Ces solutions sont ensuite introduites dans un tube de façon à former un gradient de densité de bas en haut, chaque couche étant plus dense que la couche directement supérieure. Une fois que le gradient de densité est formé dans le tube, les éléments cellulaires sont introduits dans ledit tube et sédimentent en se stabilisant dans ou entre les couches dont la densité leur est la plus proche. La lecture est réalisée une fois que tous les éléments cellulaires sont stabilisés, typiquement après 1 heure. Parallèlement à l'injection des éléments cellulaires, des billes synthétiques colorées de densité connues sont également introduites dans ledit tube de façon à former un contrôle positif. La densité moyenne est ensuite calculée en fonction de la répartition des éléments cellulaires au sein dudit tube.

Par « diamètre de Feret » d'un élément cellulaire au sens de l'invention, on entend la distance comprise entre deux tangentes, ces deux tangentes étant parallèles, de telle sorte que l'ensemble de l'élément cellulaire soit compris entre ces deux tangentes parallèles.

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 « élément cellulaire » au sens de l'invention, on entend un composant qui comprend au moins une cellule humaine, animale ou végétale et se présentant sous différentes formes telles que des cellules isolées, des microtissus cellulaires, des amas de cellules, des cellules encapsulées, des microtissus encapsulés, des amas de cellules ou non et leurs mélanges. Les microtissus et/ou amas, encapsulés ou non, peuvent contenir une ou plusieurs lumières.

Par « formes modifiées de ces molécules » au sens de l'invention, on entend que les molécules ont été modifiées par ajout d'un ou plusieurs groupes moléculaires sur un ou plusieurs groupes fonctionnels présents sur les molécules. A titre d'exemple, l'acide hyaluronique est constitué d'un assemblage de monomère, chacun des monomères comprend des groupes fonctionnels hydroxyl, carboxyl, et N-acetyl susceptible de servir de base pour fixer des groupes moléculaires. Les groupes hydroxyl et carboxyl sont des sites privilégiés pour la fixation de lipides, polymères ou d'autres molécules actives sur le monomère d'acide hyaluronique. De manière complémentaire, des groupes amines peuvent également être ajouté sur le groupe fonctionnel N-acetyl. On peut ainsi créer des acides hyaluronique-esters, acides hyaluronique -dialdehydes, acides hyaluronique -N-deacétylés ou Cys- acides hyaluronique. De façon similaire, le Dextran, constitué également de monomère possède des groupes fonctionnels hydroxyl accessibles à une grande variété de réactions d'addition (chimie des groupements hydroxyl).

Par « la plus grande dimension » au sens de l'invention, on entend la valeur du plus grand diamètre de Feret. La dimension des éléments cellulaires peut être obtenue par différentes techniques. Notamment, elle peut être caractérisée au moyen d'un appareil de mesure à effet Coulter. Alternativement, elle peut être déterminée optiquement par microscopie.

Par « maintenir les éléments cellulaires en suspension » au sens de l'invention, on entend ralentir la vitesse de sédimentation des éléments cellulaire sans impacter leur survie.

Par « microcompartiment » ou « capsule » au sens de l'invention, on entend également une structure tridimensionnelle partiellement ou totalement close, contenant un ou plusieurs éléments cellulaires. La structure est préférentiellement constituée d'une couche externe en hydrogel rigidifiée et d'une partie interne creuse comprenant au moins un élément cellulaire et éventuellement d'autres éléments tels qu'une matrice extracellulaire ou un substitut de matrice extracellulaire.

Par « microtissu » au sens de l'invention, on entend une communauté de cellules présentant des interactions cellulaires, optionnellement une cohésion mécanique et récapitulant au moins partiellement une composition cellulaire présente dans un tissu humain en situation physiologique ou pathologique. De façon typique un microtissus présente une topologie spécifique de répartition des cellules qui le compose. Au sens de l'invention, un microtissu présente une plus grande dimension d'au moins 50µm, plus préférentiellement comprise entre 50µm et 1,3 mm, notamment entre 100µm et 800µm.

Par « osmolalité des éléments cellulaires » au sens de l'invention, on entend une mesure de la concentration totale des particules dissoutes au sein des éléments cellulaires, exprimée en osmoles par kilogramme d'eau (osmol/kg H₂O).

Elle englobe les solutés actifs, tels que les électrolytes et les molécules non ioniques. Dans le contexte de l'invention, l'osmolalité peut être mesurée au moyen d'un osmomètre à point de congélation de type « Osmotech XT ». Il est à noter que l'utilisation de modèles différents d'osmomètres à point de congélation pourra rendre la mesure impossible. En effet la composition des solutions et leur viscosité rendent la mesure d'osmolalité complexe et nécessitent des appareils de forte puissance. Alternativement, la mesure d'osmolalité pourra se calculer par extrapolation sur la base d'une mesure d'une dilution de la solution, ce qui permet l'utilisation d'appareils standards.

Par « principe actif » au sens de l'invention, on entend une ou plusieurs substance(s) responsable(nt) d'une activité pharmacologique ou thérapeutique.

Par « stabilité biologique » au sens de l'invention, on entend le maintien de l'intégrité des éléments cellulaires.

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 « seuil de vitesse de sédimentation » ou « vitesse de sédimentation maximale » au sens de l'invention, on entend la vitesse relative maximale mesurée de déplacement vertical au sein de la solution relativement au référentiel du système, récipient ou élément fluide dans lequel la suspension est contenue. La vitesse relative maximale s'exprime en mm/h. Par convention, on définit la vitesse relative comme positive dans le cas où les éléments cellulaires sédimentent dans la solution, et négative si ces-derniers remontent dans la solution. Le terme « maximale » qualifie la valeur absolue de la vitesse indifféremment de son signe, au sens qu'il importe dans le contexte de l'invention que les éléments cellulaires se maintiennent en suspension, ce qui implique que leur vitesse relative soit, en valeur absolue, la plus faible possible.

Par « viscosité » au sens de l'invention, on entend la viscosité dynamique qui caractérise la résistance d'un fluide à un écoulement laminaire. Elle est exprimée en Pa.s. Dans le cas des fluides non-Newtoniens, cette viscosité peut dépendre des contraintes de cisaillement appliquées au fluide. Notamment, par « fluide rhéofluidifiant » on entend un fluide dont la viscosité diminue avec le taux de cisaillement. Similairement, on appelle « fluide à seuil » un fluide dont la viscosité est très significative à faible taux de cisaillement, puis chute

- brutalement au-delà d'une valeur seuil de taux de cisaillement. Ces deux catégories de fluides sont avantageuses dans le cadre de l'invention puisque la viscosité haute au repos permet d'empêcher la sédimentation, tandis que la fluidification aux forts taux de cisaillement facilite l'écoulement de la solution et limite les forces de frictions visqueuses sur les éléments biologiques, par exemple au cours de l'injection. Dans le contexte de l'invention, la viscosité peut être mesurée à 25°C à l'aide d'un rhéomètre par la méthode de la courbe de viscosité en cisaillement mesurée en confinant le fluide dans une géométrie Cone-Plan de 25mm de diamètre, un angle de 1°, de surface sablée et sur une gamme de taux de cisaillement allant de $\dot{\gamma} = 0.1 \text{ s}^{-1}$ à $\dot{\gamma} = 1000 \text{ s}^{-1}$.
- 10 Par « viscosité au repos », on entend la viscosité dynamique mesurée au repos, c'est-à-dire à un très faible taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ sur le fluide, typiquement $\dot{\gamma} = 0.1 \text{ s}^{-1}$.

- Par « viabilité » au sens de l'invention, on entend la proportion de cellules saines dans un échantillon d'éléments cellulaires. Dans le contexte de l'invention, la proportion de cellules saines est évaluée au regard de l'activité métabolique d'un échantillon de cellules. L'activité métabolique est quantifiée par la concentration d'ATP dosée dans une suspension d'éléments cellulaires lysés. La technique utilisée est commercialisée sous le nom de test « CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay ». Il est spécifiquement conçu pour déterminer la viabilité des cellules dans les sphéroïdes de microtissus en 3D. Le réactif du test pénètre dans les sphéroïdes de grande taille et possède une capacité lytique accrue, ce qui permet une détermination plus précise de la viabilité par rapport à d'autres méthodes de test. Préférentiellement, la viabilité est exprimée en pourcentage par rapport à une condition de contrôle. Dans ce cas, la viabilité est dite « relative ». Par exemple, si la condition A est prise comme référence, une viabilité de 85% pour la condition B traduit une baisse de 15% de viabilité par rapport à la condition A.

Composition biocompatible selon l'invention

- 25 La présente invention a pour objet une composition biocompatible, comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, lesdits éléments cellulaires étant choisis parmi des cellules isolées, des microtissus cellulaires, des amas de cellules et leurs mélanges, au moins deux desdits éléments cellulaires présentant une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), et la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité suivante :

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

- où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s-1;

où $F = 18.\mu_c/g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s-2;

5 et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s-1.

De façon surprenante, les inventeurs ont mis au point une composition biocompatible permettant de maintenir des éléments cellulaires hétérogènes en suspension tout en maintenant leur stabilité biologique, et ce, sur de longue période. Ainsi, les caractéristiques rhéologiques de la solution permettent avantageusement de maintenir l'homogénéité de
10 répartition des éléments cellulaires au sein de la composition.

Selon un mode de réalisation, le seuil de vitesse de sédimentation est inférieur à $2,78 \cdot 10^{-6}$ m.s-1, soit 10 mm.h-1.

Selon un autre mode de réalisation, le seuil de vitesse de sédimentation acceptable est inférieur à $1,39 \cdot 10^{-6}$ m.s-1, soit 5 mm.h-1.

15 Selon un autre mode de réalisation, le seuil de vitesse de sédimentation acceptable est inférieur à $2,78 \cdot 10^{-7}$ m.s-1, soit 1 mm.h-1.

Préférentiellement, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution est comprise entre $2,78 \cdot 10^{-9}$ et
20 $5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s-1 soit entre 0,01 et 20 mm.h-1.

Ainsi, plus la vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires est faible, plus l'homogénéité de répartition des éléments cellulaires en suspension dans la solution est conservée dans le temps.

Préférentiellement, l'osmolalité des éléments cellulaires dans la solution est comprise entre
25 180 et 360 mOsm.l.kg-1, encore plus préférentiellement entre 220 et 360 mOsm.l.kg-1. De cette façon, les éléments cellulaires et la solution sont proches de l'équilibre osmotique, ce qui signifie que les gradients de concentrations d'ions de la composition sont équilibrés et ne provoquent pas de choc osmotique.

Préférentiellement, la composition selon l'invention comprend une solution comprenant au
30 moins un ion choisis parmi des ions sodium, le calcium, le magnésium, le chlore et le potassium et leurs mélanges.

Selon un mode de réalisation préféré, la composition selon l'invention comprend une solution comprenant des ions sodium, calcium, chlore et potassium.

Préférentiellement, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution est une solution aqueuse.

5 Selon un mode de réalisation, la composition comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution présente un pH compris entre 7,0 et 7,6.

Avantageusement, le pH de la solution est particulièrement adapté à la survie des éléments cellulaires.

10 Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution comprend un tampon de pH biocompatible, préférentiellement choisi parmi le tampon phosphate salin (PBS), l'acide citrique ou l'Hepes, et de façon préférée le tampon PBS référencé au numéro 4004200 de la pharmacopée européenne.

15 Selon une variante, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution comprend également au moins un principe actif et/ou un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la solution aqueuse est le milieu de culture des éléments cellulaires.

20 Selon un autre mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution comprenant au moins un élément choisi parmi du chlorure de sodium (NaCl), du chlorure de calcium (CaCl₂), du chlorure de potassium (KCl), du chlorure de magnésium (MgCl₂) et leurs mélanges.

25 Avantageusement, la diversité d'ions contenus dans la solution permet d'assurer un environnement équilibré et propice au bon fonctionnement des processus cellulaires des éléments cellulaires au sein de la composition selon l'invention.

Préférentiellement, la composition selon l'invention comprend :

- entre 0,01 et 0,9% en masse de NaCl par rapport à la masse totale de la solution ; et/ou
- entre 0,01 et 0,04%% en masse de CaCl₂ par rapport à la masse totale de la solution ; et/ou
- entre 0,01 et 0,05% en masse de KCl par rapport à la masse totale de la solution.

30 Avantageusement, la solution et les éléments cellulaires en suspension dans ladite solution sont proches de l'équilibre osmotique garantissant un environnement stable pour les éléments cellulaires, sans risque de choc osmotique.

Préférentiellement, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution est isotonique par rapport aux éléments cellulaires.

5 Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention présente une densité comprise entre 800 et 2000 kg/m³, préférentiellement entre 997 et 1600 kg/m³, encore plus préférentiellement entre 1025 et 1100 kg/m³, notamment entre 1047 et 1090 kg/m³.

Avantageusement, la densité de la composition selon l'invention contribue à diminution de la vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution.

10 Selon une variante, la composition selon l'invention comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension, présente une densité de la solution comprise entre la densité de l'élément cellulaire ayant la plus faible densité et la densité de l'élément cellulaire ayant la plus grande densité.

15 Selon une autre variante, la composition selon l'invention comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension, présente une densité de la solution inférieure à la densité de l'élément cellulaire ayant la plus faible densité.

Enfin, selon une autre variante, la composition selon l'invention comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, présente une densité de la solution supérieure à la densité de l'élément cellulaire ayant la plus grande densité.

20 Avantageusement, dans tous les modes de réalisation selon l'invention, la vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution est inférieure à $5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹ soit 20mm.h⁻¹.

25 Selon une autre variante, la composition selon l'invention présente une densité égale à la moyenne des densités de tous les éléments cellulaires présents dans la composition, avec une variation tolérée de 20 kg/m³, préférentiellement de 10 kg/m³. De cette façon, la densité de la composition est centrée sur la densité de la moyenne des densités de tous les éléments cellulaires.

30 Selon un mode de réalisation préféré, la composition selon l'invention présente une viscosité au repos mesurée à 25°C comprise entre 0,01 et 1,5 Pa.s, préférentiellement comprise entre 0,01 et 1 Pa.s, notamment entre 400 et 1200mPa.s, plus préférentiellement 400 et 1000mPa, encore plus préférentiellement entre 500 et 1100mPa.s, notamment entre 500 et 900mPa.

35 La viscosité de la composition permet de prévenir la sédimentation des éléments cellulaires en suspension dans la solution tout en permettant l'utilisation de la composition selon l'invention, notamment l'injection de ladite composition. Par conséquent, la composition selon l'invention dispose d'une viscosité suffisamment élevée pour maintenir les éléments cellulaires en suspension tout en ayant une viscosité suffisamment faible pour minimiser les

contraintes de friction lorsque la composition est injectée, notamment l'aide d'un moyen d'injection tel qu'une seringue ou une canule.

Selon une variante particulière de l'invention, la composition biocompatible présente :

- une densité comprise entre 997 et 1600 kg/m³ ;

5 - une viscosité au repos, mesurée à l'aide d'un rhéomètre à 25°C, comprise entre 0,01 et 1,5 Pa.s; et

- une vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution inférieure à $5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹ soit 20mm.h⁻¹.

10 Selon un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention présentant une vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution inférieure à $2,78 \cdot 10^{-7}$ m.s⁻¹ soit 1mm.h⁻¹ peut être conservée jusqu'à 6 heures avant utilisation. Ainsi, dans ce mode de réalisation, la composition selon l'invention conserve la distribution uniforme des éléments cellulaires hétérogènes pendant 6 heures.

15 Avantageusement, la composition selon l'invention peut être conservée pendant une longue période sans affecter la distribution uniforme des éléments cellulaires hétérogènes permettant ainsi d'assurer un dosage précis, notamment lors de son injection.

La composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires hétérogènes en suspension dans ladite solution. Lesdits éléments cellulaires étant choisis parmi des cellules isolées, des microtissus cellulaires, des amas de cellules et leurs mélanges, 20 dont au moins deux, préférentiellement une majorité, encore plus préférentiellement tous lesdits éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s).

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition comprend au moins un élément cellulaire encapsulé, préférentiellement contenu dans un microcompartiment en 25 trois dimensions comprenant une couche externe en hydrogel. Le microcompartiment peut être une boule pleine d'hydrogel. Préférentiellement la composition comprend au moins un élément cellulaire encapsulé, préférentiellement contenu dans un microcompartiment en trois dimensions creux comprenant une couche externe en hydrogel et une partie interne creuse contenant le ou les élément(s) cellulaire(s) encapsulés. La partie interne creuse peut 30 contenir également de la matrice extracellulaire et/ou un ou plusieurs substituts de matrice extracellulaire et/ou une solution et/ou d'autres éléments. Selon un mode de réalisation particulier, la couche externe en hydrogel du microcompartiment peut comprendre ou 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, ayant un module de Young 35 supérieur à 10kPa, préférentiellement supérieur à 60 kPa, plus préférentiellement supérieur

à 100 kPa. Selon un mode de réalisation, la couche externe en hydrogel comprend de l'alginate, ledit alginate présentant un poids moléculaire moyen de 100 à 400 kDa, plus préférentiellement un poids moléculaire compris entre 150 et 250kDa. Lorsque l'hydrogel de la couche externe du microcompartiment est de l'alginate, la concentration de la solution d'alginate destinée à former ladite couche externe du microcompartiment, est
5 d'alginate destinée à former ladite couche externe du microcompartiment, est préférentiellement comprise entre 0,5 et 5% en masse, plus préférentiellement la concentration est égale à 2% (plus ou moins 0,5%) en masse.

De façon préférée, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires, encapsulés ou non, en suspension dans ladite solution, dans laquelle les cellules
10 constituant les éléments cellulaires sont des cellules matures et/ou des progéniteurs et/ou des cellules souches. Préférentiellement, les cellules constituant tout ou partie des éléments cellulaires sont choisis parmi les cellules neurales, les cellules neuronales, les cellules gliales, les cellules cardiaques, les cellules de la rétine, les lymphocytes, les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules souches mésenchymateuses, les kératinocytes, les fibroblastes, les
15 pré-adipocytes, les adipocytes, les cellules des îlots pancréatiques et leurs mélanges.

Avantageusement, la composition selon l'invention est adaptée à maintenir en suspension tous types cellulaires, les éléments cellulaires étant encapsulés ou non.

Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle les éléments cellulaires
20 sont constitués d'au moins 2 types cellulaires différents.

Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle au moins 20%, préférentiellement au moins 30%, notamment au moins 40% des éléments cellulaires sont sous la forme d'un microtissu.

25 Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend entre 10 et 55% des éléments cellulaires sous la forme d'un microtissu.

Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant préférentiellement une plus grande dimension d'au
30 moins 50µm, plus préférentiellement comprise entre 50µm et 1,3 mm, notamment entre 100µm et 800µm.

Ainsi, dans ce mode de réalisation, la composition biocompatible selon l'invention comprend au moins un microtissu dont la plus grande dimension est d'au moins 50µm. De manière inattendue, les inventeurs ont réussi à maintenir les éléments cellulaires, dans ce mode de

réalisation incluant au moins un microtissu, en suspension dans une composition sous forme liquide. Cette caractéristique permet de rendre la composition facilement injectable.

Dans le contexte de l'invention, la composition selon l'invention est sous forme liquide. Plus particulièrement, la composition selon l'invention est sous forme liquide et comprend une
5 solution sous forme liquide et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution.

En outre, il est avantageux que la composition biocompatible ne soit pas sous forme de gel.

Selon un autre mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle moins de 15%,
10 préférentiellement moins de 10% notamment moins de 5%, moins de 4%, moins de 3%, moins de 2%, moins de 1% des éléments cellulaires sont sous la forme de cellules isolées.

Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution dans laquelle aucun élément cellulaire est sous la forme de cellule isolée.

Dans le contexte de l'invention, le pourcentage des éléments cellulaires sous la forme de
15 microtissu ou de cellules isolées est exprimé en volume cumulé des éléments cellulaires.

Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la fraction volumique des éléments cellulaires est comprise entre 0,01 et 80% en volume, préférentiellement comprise entre 0,01 et 60%, notamment entre 0,01 et 50%, plus préférentiellement entre
20 0,01 et 45%, encore plus préférentiellement entre 15 et 30%.

Selon un autre mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle les éléments cellulaires présentent une plus grande dimension inférieure à 1,3 mm, préférentiellement inférieure à 1 mm, notamment inférieure à 700 μm , encore plus préférentiellement inférieure
25 à 500 μm .

Préférentiellement, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle les éléments cellulaires présentent une plus grande dimension comprise entre 50 μm et 1,3 mm, préférentiellement entre 100 μm et 800 μm .

30 En d'autres termes, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle l'élément cellulaire présentant la plus grande dimension présente une plus grande dimension inférieure à 1,3 mm, préférentiellement inférieure à 700 μm , de manière préférée inférieure à 500 μm .

Selon un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la composition comprend entre 1 million et 500 millions cellules par mL de solution, préférentiellement au moins 5 millions de cellules, notamment 50 millions de cellules.

- 5 Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la composition comprend entre 1 et 100 millions de cellules par mL de solution, préférentiellement entre 1 et 50 millions de cellules, notamment entre 1 et 10 millions de cellules, plus préférentiellement entre 2 et 6 millions de cellules, encore plus préférentiellement entre 3 et 10 millions de cellules par mL de solution.

Selon un autre mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution comprend :

- de l'eau ;

- 15 - au moins un agent de densité biocompatible ; et
- au moins un agent de viscosité biocompatible, préférentiellement au moins un agent de viscosité biocompatible présentant un poids moléculaire compris entre 0,05 MDa et 5MDa.

Avantageusement, les agents de densité et de viscosité permettent de moduler les caractéristiques rhéologiques de la solution de façon à ce que la densité de la composition vérifie l'inégalité [math 1].

- 20

De façon préférée, la composition selon l'invention comprend également au moins un agent d'ajustement de l'osmolalité biocompatible. Ledit au moins un agent d'ajustement de l'osmolalité permet d'adapter l'osmolalité de la solution afin de rendre la solution compatible avec la survie des éléments cellulaires.

- 25 Préférentiellement, au moins un agent d'ajustement de l'osmolalité de la solution est choisi parmi le mannitol, le sorbitol, le chlorure de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

Selon un autre mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution comprend au moins un agent de densité biocompatible choisi parmi le dextran, le mannitol, le chlorure de sodium, le glycérol ou le sorbitol, et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

- 30

Les agents de densité adaptés à la composition selon l'invention sont sélectionnés en fonction de plusieurs paramètres, à savoir :

- leur biocompatibilité, c'est-à-dire qu'ils ne doivent pas impacter la survie des éléments cellulaires ;
- leur forte solubilité dans la solution ;
- leur faible impact sur la viscosité de la solution.

- 5 De façon préférée, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution comprend au moins un agent de densité, préférentiellement du dextran. Lorsque la solution comprend du dextran, celui-ci présente préférentiellement un poids moléculaire compris entre 20 et 80kDa, notamment 30, 35 ou 40kDa.
- 10 Selon un autre mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution comprend au moins un agent de viscosité biocompatible choisi parmi le PVA, le carboxyméthyl cellulose (CMC), le méthylcellulose, l'hydroxyethylcellulose, l'éthylhydroxyethylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'alginate, le pullulane,
- 15 le chitosan, la gomme de xanthan, la gomme de gellane, le polyacrilamide, le polyvinylpyrrolidone, le polyéthylène oxide, la caséine, le collagène, le hyaluronate de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

Les agents de viscosité adaptés à la composition selon l'invention sont sélectionnés en fonction de plusieurs paramètres, à savoir :

- 20 - leur biocompatibilité, c'est-à-dire qu'ils ne doivent pas impacter la survie des éléments cellulaires ;
- leur stabilité à 37°C, température d'injection chez l'Homme.

- Préférentiellement, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution comprend au moins
- 25 un agent de viscosité choisi parmi le hyaluronate de sodium et/ou la CMC. Lorsque la solution comprend du hyaluronate de sodium, celui-ci présente préférentiellement un poids moléculaire inférieur à 1MDa, encore plus préférentiellement compris entre 80 et 1MDa, notamment entre 80 et 600kDa.

- Lorsque la solution comprend de la CMC, celle-ci présente préférentiellement un poids
- 30 moléculaire compris entre 40kDa et 1MDa, encore plus préférentiellement comprise entre 50 et 400kda.

Avantageusement, les composants de la solution sont tous biocompatibles, permettant ainsi de garantir que la composition selon l'invention sera bien tolérée par l'organisme, notamment en cas d'injection.

Selon un autre mode de réalisation, la composition selon l'invention comprend :

- entre 0,01 et 30% en masse d'agent (s) de densité par rapport à la masse totale de la solution
- entre 0,01 et 8% en masse d'agent (s) de viscosité par rapport à la masse totale de la solution.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, la composition selon l'invention
5 comprend une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution comprend :

- du hyaluronate de sodium et/ou du CMC ; et
- du dextran.

Préférentiellement, la composition selon l'invention comprend une solution et des éléments
10 cellulaire en suspension dans ladite solution, dans laquelle la solution comprend :

- entre 10 et 25% en masse de dextran présentant un poids moléculaire de 20kDa et 80kDa par rapport à la masse totale de la solution ;
- entre 0,01 et 7% en masse de CMC présentant un poids moléculaire compris entre 40 kDa et 1MDa par rapport à la masse totale de la solution et/ou entre 0,0, et 7% en poids de
15 hyaluronate de sodium de poids molécules compris entre 80kDa et 1MDa par rapport à la masse totale de la solution

La composition selon l'invention peut être obtenue par tout procédé adapté connu de l'homme du métier. Toutefois, selon un mode de réalisation particulièrement préféré, la composition selon l'invention est une composition biocompatible obtenue selon un procédé
20 de préparation comprenant les étapes suivantes :

(a) Préparation ou récupération d'une composition comprenant une solution (A) et un ensemble d'éléments cellulaires dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins
25 50µm;

(b) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition de l'étape (a), une solution (B) et optionnellement la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution de la composition issue de l'étape (b) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b)
30 vérifie l'inégalité suivante :

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

5 où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;

où $F = 18.\mu_c/g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;

et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹ ;

(c) Optionnellement récupération de la composition issue de l'étape (b), comprenant une
10 solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm, dans laquelle ladite composition étant caractérisée en ce que la différence de densité entre la densité de la solution et la densité
15 moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité précitée à l'étape (b).

Préférentiellement, lorsque l'étape (a) concerne la préparation d'une composition, elle comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

1) Mise en culture d'au moins un élément cellulaire ;

2) Rinçage de la culture d'éléments cellulaires issues de l'étape 1) ;

20 3) Centrifugation de la culture d'éléments cellulaires issues de l'étape 2) ;

4) Récupération d'une composition comprenant des éléments cellulaires issues de la centrifugation de l'étape 3), dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm.

25 Selon un mode de réalisation préféré, l'étape (b) comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

(b1) Caractérisation d'au moins un paramètre rhéologique choisi parmi ;

*la densité de l'élément cellulaire ayant la plus faible densité et la densité de l'élément cellulaire ayant la plus grande densité desdits éléments cellulaires présent dans la
30 composition issue de l'étape (a);

*la densité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la viscosité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la plus grande dimension des éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a)

(b2) Préparation d'une solution (B) comprenant au moins un agent de densité et/ou au moins un agent de viscosité et de l'eau ;

5 (b3) Stérilisation de la solution (B) issue de l'étape (b2) de façon à obtenir une solution (B) stérilisée ;

(b4) Optionnellement, ajustement du pH de la solution (B) stérilisée de l'étape (b3) ;

(b5) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (a) avec la solution (B) stérilisée issue de l'étape (b3) ou (b4) et
10 optionnellement avec la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution issue de l'étape (b5) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b5) vérifie l'inégalité précitée à l'étape (b).

De façon préférée, l'étape (b2) de préparation de la solution (B) est réalisée en ajoutant un agent de viscosité biocompatible choisi parmi le PVA, le carboxyméthyl cellulose (CMC), la
15 méthylcellulose, l'hydroxyethylcellulose, l'éthylhydroxyethylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'alginate, le pullulane, le chitosan, la gomme de xanthan, la gomme de gellane, le polyacrilamide, le polyvinylpyrrolidone, le polyéthylène oxide, la caséine, le collagène, le hyaluronate de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

20 Préférentiellement, l'étape (b2) de préparation de la solution (B) est réalisée en ajoutant au moins un agent de densité biocompatible choisi parmi le dextran, le mannitol, le NaCl, le glycérol, le sorbitol et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

Préférentiellement, l'étape (b2) de préparation de la solution (B) comprend également l'ajout d'au moins un élément choisi parmi du chlorure de sodium (NaCl), du chlorure de calcium
25 (CaCl₂), du chlorure de potassium (KCl), du chlorure de magnésium (MgCl₂) et leurs mélanges.

Selon un mode de réalisation, l'étape (b) comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

(b1) Caractérisation d'au moins un paramètre rhéologique choisi parmi ;

*la densité de l'élément cellulaire ayant la plus faible densité et la densité de l'élément cellulaire ayant la plus grande densité desdits éléments cellulaires présent dans la
30 composition issue de l'étape (a);

*la densité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la viscosité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la plus grande dimension des éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a)

(b2) Préparation d'une solution (B) comprenant au moins un agent de densité et/ou au moins un agent de viscosité et de l'eau ;

(b4) Optionnellement, ajustement du pH de la solution (B) issue de l'étape (b2) ;

(b3) Stérilisation de la solution (B) issue de l'étape (b4) de façon à obtenir une solution (B) stérilisée ;

(b5) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (a) avec la solution (B) stérilisée issue de l'étape (b3) ou (b4) et optionnellement avec la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution issue de l'étape (b5) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b5) vérifie l'inégalité précitée à l'étape (b).

Dans ce mode de réalisation, l'étape (b4) d'ajustement du pH de la solution (B) est réalisée en amont de l'étape (b3) de stérilisation de la solution (B). Procédé de préparation d'une composition biocompatible selon l'invention

Selon un autre aspect, l'invention a également pour objet un procédé de préparation d'une composition selon l'invention comprenant la mise en œuvre des étapes suivantes :

(a) Préparation ou récupération d'une composition comprenant une solution (A) et un ensemble d'éléments cellulaires dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s) préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm;

(b) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition de l'étape a), une solution (B) et optionnellement la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution de la composition issue de l'étape (b) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b) vérifie l'inégalité suivante :

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;

où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;

et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹ ;

- (c) Optionnellement récupération de la composition issue de l'étape (b), comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s) préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm, dans laquelle ladite composition étant caractérisée en ce que la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité précitée à l'étape (b).

Avantageusement, le procédé selon l'invention permet de parvenir à un équilibre entre densité et la viscosité en fonction des éléments cellulaires hétérogènes de façon à ce que la vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution soit inférieure à $5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹, soit 20mm.h⁻¹.

- 15 Selon un mode de réalisation, la composition de l'étape (a) comprend une solution dans laquelle lesdits éléments cellulaires sont en suspension.

Selon un mode de réalisation préféré, la composition de l'étape (a) présente une vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution supérieure à $5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹, soit 20mm.h⁻¹.

- 20 Préférentiellement, lorsque l'étape (a) concerne la préparation d'une composition, elle comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

1) Mise en culture d'au moins un élément cellulaire ;

2) Rinçage de la culture d'éléments cellulaires issues de l'étape 1) ;

3) Centrifugation de la culture d'éléments cellulaires issues de l'étape 2) ;

- 25 4) Récupération d'une composition comprenant des éléments cellulaires issues de la centrifugation de l'étape 3), dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s) préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm.

- 30 Selon un mode de réalisation, la mise en culture de cellules de l'étape 1) est réalisée au sein d'un bioréacteur.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, au moins un élément cellulaire de l'étape 1) comprend au moins une cellule encapsulée, préférentiellement dans de l'alginate.

De façon préférée, au moins un élément cellulaire de l'étape 1) est contenu dans un microcompartiment en trois dimensions comprenant une couche externe en hydrogel.

Lorsque l'étape 1) comprend la mise en culture d'au moins un élément cellulaire encapsulé, l'étape (a) peut comprendre également une étape 2') visant à éliminer la capsule de façon à
5 récupérer l'élément cellulaire avant l'étape 3) de centrifugation.

L'étape 2') consiste à éliminer la capsule, préférentiellement éliminer la couche externe en hydrogel. Préférentiellement l'étape 2') 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
10 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.

Selon un mode de réalisation, la composition de l'étape (a) comprend au moins deux types cellulaires distincts.

De façon préférée, l'étape (b) comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

15 (b1) Caractérisation d'au moins un paramètre rhéologique choisi parmi ;

*la densité de l'élément cellulaire ayant la plus faible densité et la densité de l'élément cellulaire ayant la plus grande densité desdits éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a);

*la densité de la composition issue de l'étape (a) ;

20 *la viscosité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la plus grande dimension des éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a)

(b2) Préparation d'une solution (B) comprenant au moins un agent de densité et/ou au moins un agent de viscosité et de l'eau ;

25 (b3) Stérilisation de la solution (B) issue de l'étape (b2) de façon à obtenir une solution (B) stérilisée ;

(b4) Optionnellement, ajustement du pH de la solution (B) stérilisée de l'étape (b3) ;

(b5) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (a) avec la solution (B) stérilisée issue de l'étape (b3) ou (b4) et
30 optionnellement avec la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution issue de l'étape (b5) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b5) vérifie l'inégalité suivante :

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

- 5 où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,
 où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s-1;
 où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s-2;
 et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s-1.

- 10 De façon préférée, l'étape (b2) de préparation de la solution (B) est réalisée en ajoutant un agent de viscosité biocompatible choisi parmi le PVA, le carboxyméthyl cellulose (CMC), le méthylcellulose, l'hydroxyethylcellulose, l'éthylhydroxyethylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'alginate, le pullulane, le chitosan, la gomme de xanthan, la gomme de gellane, le polyacrilamide, le polyvinylpyrrolidone, le polyéthylène
 15 oxide, la caséine, le collagène, le hyaluronate de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

Préférentiellement, l'étape (b2) de préparation de la solution (B) est réalisée en ajoutant au moins un agent de densité biocompatible choisi parmi le dextran, le mannitol, le NaCl, le glycérol, le sorbitol et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

- 20 Préférentiellement, l'étape (b2) de préparation de la solution (B) comprend également l'ajout d'au moins un élément choisi parmi du chlorure de sodium (NaCl), du chlorure de calcium (CaCl₂), du chlorure de potassium (KCl), du chlorure de magnésium (MgCl₂) et leurs mélanges.

Avantageusement, l'Homme du métier pourra adapter à façon la densité et la viscosité en variant les concentrations d'au moins un agent de densité et/ou d'au moins un agent de
 25 viscosité.

Selon un mode de réalisation particulier, la solution (B) de l'étape (b2) comprend :

- entre 10 et 20% en masse par rapport à la masse totale de la solution de dextran présentant préférentiellement un poids moléculaire de 20kDa et 80KDa;
- entre 3 et 6% en masse de CMC présentant préférentiellement un poids moléculaire compris
 30 entre 40 et 1MDa par rapport à la masse totale de la solution et/ou entre 0,3 et 10% en poids de hyaluronate de sodium de poids molécules compris entre 80 et 800kDa.

Selon un mode de réalisation préféré, la solution (B) de l'étape (b2) est réalisé sous agitation, préférentiellement à l'aide d'un mélangeur à pale ou barreau aimanté.

Préférentiellement, la stérilisation de l'étape (b3) est réalisée par filtration au travers de mailles de taille comprise entre 0,01 et 0,22µm.

Selon un mode de réalisation, l'étape (b4) consiste à ajouter un tampon de pH biocompatible, préférentiellement choisi parmi le tampon phosphate, l'acide citrique ou l'Hepes, et de façon
5 préférée le tampon phosphate salin référencé au numéro 4004200 de la pharmacopée européenne avec la solution (B) stérilisé de l'étape (b3) de façon à ce que la solution (B) stérilisé présente un pH compris entre 7 et 7,6.

Selon un mode de réalisation, l'étape (b5) de préparation d'une composition comprenant les éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (a) avec la solution (B) stérilisée issue
10 de l'étape (b3) ou (b4) comprenant une étape d'extraction des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (A). En d'autres termes, selon ce mode de réalisation, l'étape (b5) comprend une étape d'extraction visant à isoler les éléments cellulaires de la solution (A) présent dans la composition issue de l'étape (a).

Ainsi, selon un mode de réalisation, le procédé de préparation d'une composition selon
15 l'invention comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

(a) Préparation ou récupération d'une composition comprenant une solution (A) et un ensemble d'éléments cellulaires dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s) préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins
20 50µm;

(b1) Caractérisation d'au moins un paramètre rhéologique choisi parmi ;

*la densité de l'élément cellulaire ayant la plus faible densité et la densité de l'élément cellulaire ayant la plus grande densité desdits éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a);

25 *la densité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la viscosité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la plus grande dimension des éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a)

(b2) Préparation d'une solution (B) comprenant au moins un agent de densité et/ou au moins
30 un agent de viscosité et de l'eau ;

(b3) Stérilisation de la solution (B) issue de l'étape (b2) de façon à obtenir une solution (B) stérilisée ;

(b4) Optionnellement, ajustement du pH de la solution (B) stérilisée de l'étape (b3) ;

(b5) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (a) avec la solution (B) stérilisée issue de l'étape (b3) ou (b4) et optionnellement avec la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution issue de l'étape (b5) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b5) vérifie l'inégalité suivante :

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;

où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;

et où $v_c := 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹

(c) Optionnellement récupération de la composition biocompatible issue de l'étape (b), comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), dans laquelle ladite composition étant caractérisée en ce que la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité précitée à l'étape (b5).

Selon un autre mode de réalisation, le procédé de préparation d'une composition selon l'invention comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

(a) Préparation ou récupération d'une composition comprenant une solution (A) et un ensemble d'éléments cellulaires dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s) préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm comprenant les étapes suivantes :

- 1) Mise en culture d'au moins un élément cellulaire ;
- 2) Rinçage de la culture d'éléments cellulaires issues de l'étape 1) ;
- 3) Centrifugation de la culture d'éléments cellulaires issues de l'étape 2) ;
- 4) Récupération d'une composition comprenant des éléments cellulaires issues de la centrifugation de l'étape 3), dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité

et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s) préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm ;

(b1) Caractérisation d'au moins un paramètre rhéologique choisi parmi ;

5 *la densité de l'élément cellulaire ayant la plus faible densité et la densité de l'élément cellulaire ayant la plus grande densité desdits éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a);

*la densité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la viscosité de la composition issue de l'étape (a) ;

10 *la plus grande dimension des éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a)

(b2) Préparation d'une solution (B) comprenant au moins un agent de densité et/ou au moins un agent de viscosité et de l'eau ;

(b3) Stérilisation de la solution (B) issue de l'étape (b2) de façon à obtenir une solution (B) stérilisée ;

15 (b4) Optionnellement, ajustement du pH de la solution (B) stérilisée de l'étape (b3) ;

(b5) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (a) avec la solution (B) stérilisée issue de l'étape (b3) ou (b4) et optionnellement avec la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution issue de l'étape (b5) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b5) vérifie l'inégalité suivante :

20

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

25 où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;

où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;

30 et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹

(c) Optionnellement récupération de la composition biocompatible issue de l'étape (b), comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dont

au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), dans laquelle ladite composition étant caractérisée en ce que la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité précitée à l'étape (b5).

- 5 Selon un mode de réalisation, la vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires de l'étape (a) dans la solution (A) est supérieure à $5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹, soit 20 mm.h⁻¹.

Selon un mode de réalisation, le procédé selon l'invention comprend une étape de cryopréservation de la composition issue de l'étape (a). Lorsque le procédé selon l'invention, comprend une étape de cryoconservation de la composition issue de l'étape (a), ledit procédé
10 comprend également une étape de décongélation de la composition cryoconservée.

Selon un mode de réalisation, l'étape (b) comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

(b1) Caractérisation d'au moins un paramètre rhéologique choisi parmi ;

- *la densité de l'élément cellulaire ayant la plus faible densité et la densité de l'élément cellulaire ayant la plus grande densité desdits éléments cellulaires présent dans la
15 composition issue de l'étape (a);

*la densité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la viscosité de la composition issue de l'étape (a) ;

*la plus grande dimension des éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a)

- 20 (b2) Préparation d'une solution (B) comprenant au moins un agent de densité et/ou au moins un agent de viscosité et de l'eau ;

(b4) Optionnellement, ajustement du pH de la solution (B) issue de l'étape (b2) ;

(b3) Stérilisation de la solution (B) issue de l'étape (b4) de façon à obtenir une solution (B) stérilisée ;

- 25 (b5) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (a) avec la solution (B) stérilisée issue de l'étape (b3) ou (b4) et optionnellement avec la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution issue de l'étape (b5) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b5) vérifie l'inégalité précitée à l'étape (b).

- 30 Dans ce mode de réalisation, l'étape (b4) d'ajustement du pH de la solution (B) est réalisée en amont de l'étape (b3) de stérilisation de la solution (B).

composition selon l'invention pour son utilisation :

Selon un autre aspect, l'invention concerne la composition selon l'invention pour son utilisation en tant que médicament.

Avantageusement, la composition biocompatible selon l'invention présente des caractéristiques rhéologiques et une vitesse de sédimentation maximale des éléments
5 cellulaires particulièrement adapté pour son utilisation en thérapie cellulaire.

De façon préférée, la composition selon l'invention peut être utilisée dans le traitement de maladies en thérapie cellulaire.

La vitesse relative des éléments cellulaires permet avantageusement de maîtriser la quantité d'éléments cellulaires dans un volume de composition donné.

10 Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention peut être utilisée en usage multiple. En d'autres termes, la composition peut être utilisée pour réaliser plusieurs injections tout en conservant la viabilité des éléments cellulaires, et ce, même si les injections sont espacées d'une période de plusieurs heures.

Avantageusement, la vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires permet
15 d'injecter pour un volume constant une quantité d'éléments cellulaires présentant un faible écart type, préférentiellement un écart type inférieur à 20%.

Préférentiellement, la composition selon l'invention peut être utilisée en tant que composition injectable.

Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention peut être utilisée en injection
20 à l'aide d'un moyen d'injection au niveau du site d'injection.

Préférentiellement, ledit moyen d'injection est une canule.

Avantageusement, la maîtrise des caractéristiques rhéologiques de la composition selon l'invention permet d'optimiser l'administration des éléments cellulaires et, par conséquent, des cellules thérapeutiques de manière précise et efficace. La maîtrise de ces paramètres
25 permet d'ajuster à façon le débit d'injection, le volume d'injection et ainsi d'assurer une répartition homogène des éléments cellulaires dans la zone d'intérêt.

Kit 1 :

Selon un autre aspect, l'invention concerne un kit comprenant :

- une composition biocompatible selon l'un des quelconques modes de réalisation
30 préalablement décrit ; et

- un moyen d'injection, préférentiellement une canule.

Avantageusement, le kit selon l'invention permet, pour le praticien, d'avoir tous les éléments nécessaires pour optimiser l'efficacité de l'injection des éléments cellulaires.

Selon un mode de réalisation, le kit selon l'invention comprend :

- une canule

- une composition biocompatible selon l'un des quelconques modes de réalisation préalablement décrit dans laquelle les éléments cellulaires présentent une plus grande dimension inférieure à 0,8 fois le plus petit diamètre interne de la canule, préférentiellement inférieure à 0,75, notamment comprise entre 0,2 et 0,7.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le kit selon l'invention comprend une composition biocompatible selon l'un des quelconques modes de réalisation préalablement décrit sous forme solide.

- 10 Préférentiellement, le kit selon l'invention comprend également de l'eau.

Selon un mode de réalisation, le kit selon l'invention comprend également un élément choisi parmi du chlorure de sodium (NaCl), du chlorure de calcium (CaCl₂), du chlorure de potassium (KCl), du chlorure de magnésium (MgCl₂) et leurs mélanges.

Kit 2 :

- 15 Enfin, selon un dernier aspect, l'invention concerne un kit comprenant :

- une préparation (1) biocompatible comprenant au moins un agent de viscosité biocompatible choisi parmi le PVA, le carboxyméthyl cellulose (CMC), le méthylcellulose, l'hydroxyethylcellulose, l'éthylhydroxyethylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'alginate, le pullulane, le chitosan, la gomme de xanthan, la gomme de gellane, le polyacrilamide, le polyvinylpyrrolidone, le polyéthylène oxide, la caséine, le collagène, le hyaluronate de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules, et au moins un agent de densité biocompatible choisi parmi le dextran, le mannitol, le NaCl, le glycérol, le sorbitol et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

- une préparation (2) biocompatible comprenant des éléments cellulaires, lesdits éléments cellulaires étant choisis parmi des cellules isolées, des microtissus cellulaires, des amas de cellules et leurs mélanges, au moins deux desdits éléments cellulaires présentant une densité/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s) préférentiellement au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm

- 30 de façon à ce que le mélange de la préparation (1) et la préparation (2) forme une composition dont la différence de densité entre la densité de la préparation (1) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la préparation (2) vérifie l'inégalité suivante :

[Math 1]

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

- 5 où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,
 où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;
 où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;
 et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹.

- 10 Selon un mode de réalisation préféré, la préparation (2) biocompatible comprend une solution.

Préférentiellement, le kit selon l'invention comprend également de l'eau.

Selon un mode de réalisation, le kit selon l'invention comprend une préparation (1) biocompatible sous forme solide.

- 15 Selon un mode de réalisation, la préparation (1), sous forme solide, comprenant au moins un agent de viscosité biocompatible choisi parmi le PVA, le carboxyméthyl cellulose (CMC), le méthylcellulose, l'hydroxyethylcellulose, l'éthylhydroxyethylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'alginate, le pullulane, le chitosan, la gomme de xanthan, la gomme de gellane, le polyacrilamide, le polyvinylpyrrolidone, le polyéthylène
 20 oxide, la caséine, le collagène, le hyaluronate de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules, et au moins un agent de densité biocompatible choisi parmi le dextran, le mannitol, le NaCl, le glycérol, le sorbitol et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

- 25 Selon un mode de réalisation, le kit selon l'invention comprend également un élément choisi parmi du chlorure de sodium (NaCl), du chlorure de calcium (CaCl₂), du chlorure de potassium (KCl), du chlorure de magnésium (MgCl₂) et leurs mélanges.

Exemples :

Exemple 1 :

- 30 L'objectif de cet exemple est d'évaluer la vitesse de sédimentation des éléments cellulaires dans différentes compositions, à savoir une composition comprenant des éléments cellulaires et une solution (A) saline équilibrée de Hank (HBSS) (hors invention), et la composition selon l'invention comprenant une solution (B) développée pour maintenir l'homogénéité de répartition des éléments cellulaires et prévenir l'obstruction du système d'injection.

Après obtention des éléments cellulaires, ceux-ci ont été cryoconservés dans des flacons et conservés dans du liquide azoté. Les flacons comprenant les éléments ont ensuite été décongelés avec une estimation de 10 millions de cellules.

- 5 Dans le cadre de cet exemple, les éléments cellulaires sont un mélange de microtissus présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm, de cellules isolées et d'agrégats de cellules de neurones.

Les résultats de la caractérisation des éléments cellulaires ont permis de mesurer la densité et la plus grande dimension des éléments cellulaires, à savoir :

Densité des éléments cellulaires : 1056 kg/m³ ;

- 10 Plus grande dimension des éléments cellulaires : 200µm soit 0,0002 m.

La solution (B) décrite dans le tableau 1 ci-dessous a été préparée en conditions stériles et caractérisée dans le tableau 2.

[Tableau 1]

Réactif	Référence	Concentration du test
HA100	PHI4468P02E (V.I. : 0,22%)	48 mg/mL
Dextran40	CAS 9004-54-0	130 mg/mL
KCl	CAS 7447-40-7	0,30 mg/mL
CaCl ₂ .2H O ₂	CAS 10035-04-8	0,15 mg/mL
C H O687	CAS 77-92-9	0,25 mg/mL
Na ₂ HPO ₄	CAS 7558-79-4	2,50 mg/mL

[Tableau 2]

Paramètre physico-chimique de la solution (B)	Valeur
Viscosité au repos	0,454 Pa.s
Densité	1049 kg/m ³
pH	7.37
Osmolarité	216 mOsmol

- 15 La solution (A) a également été préparée en conditions stériles et caractérisée dans le tableau 3.

[Tableau 3]

Paramètre physico-chimique de la solution (B)	Valeur
Viscosité au repos	0,0012 Pa.s
Densité	1002 kg/m ³

5 Préparation des compositions :

Phase 1 : préparation des éléments cellulaires

Les flacons ont été retirés de l'azote liquide et placés dans un CryoPod à -180°C. Les flacons comprenant les éléments cellulaires ont été placés dans une enceinte thermostatée à 37°C et retirés lorsqu'il ne restait plus qu'un petit morceau de glace (≈2min).

10 Après une légère remise en suspension des cellules, le contenu a été transféré dans un tube de 25 ml contenant 9 ml de HBSS (calcium, magnésium, glucose), à température ambiante.

Les flacons ont été rincés avec 1 ml de HBSS (calcium, magnésium, glucose) pour recueillir le maximum de d'éléments cellulaires

15 Le tube de 25 ml a été centrifugé à 300 G, 5 minutes, et le maximum du surnageant a été éliminé avec P1000 puis P20.

Les éléments cellulaires ont été remis en suspension dans 1 ml de HBSS (calcium, magnésium, glucose).

Phase 2 : Aliquoter les échantillons

20 Un volume et une concentration indéterminés de la suspension cellulaire ont été aliquotés dans deux tubes Eppendorf de 1,5 ml.

Les tubes de 1,5mL ont été centrifugés à 300G, 5min. et le maximum du surnageant a été éliminé avec P1000 puis P20.

Dans un échantillon, les éléments cellulaires ont été remis en suspension dans 1 ml de HBSS (solution (A)) et dans l'autre dans 1 ml de solution (B).

25 Phase 3 : Évaluation de la vitesse de sédimentation

Les tubes ont été installés sur l'appareil assemblé pour prendre des photos.

Des photos ont été prises à chaque minute pendant 12 heures, voir Figure 1.

Avec le logiciel Image J, un suivi manuel des trajectoires des éléments cellulaires, sur un film en time lapse enregistré avec la caméra, a été effectué afin d'évaluer la vitesse de sédimentation.

- 5 Une moyenne de 5 vitesses de sédimentation d'éléments cellulaires dans la solution (B), au cours de 10/12 trajectoires, a été prise pour évaluer la valeur de la vitesse de sédimentation maximale. Dans la solution (A), seules 3 vitesses de d'éléments cellulaires, au cours de 4 trajectoires, ont été prises pour déterminer la valeur en raison de la sédimentation rapide et de la difficulté à suivre exactement le même élément cellulaire.

- 10 La vitesse de sédimentation maximale calculée (moyenne de 5 vitesses maximales pour la solution (B) et moyenne des 3 vitesses maximales pour la solution (A) de microtissus) est :

* d'environ 363mm/h dans la solution (A) hors invention ;

* d'environ 1,66mm/h dans la solution (B) selon l'invention, dans laquelle la différence de densité entre la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b5) vérifie l'inégalité [Math 1].

- 15 Le tableau 4 ci-dessous vérifie l'inégalité [Math 1] pour la solution (A) et la solution (B) avec $V_c = 5,56 \cdot 10^{-6} \text{ m.s}^{-1}$.

[Tableau 4]

	$ \Delta\rho = \rho_{MT} - \rho_s$	$F \cdot v_c / D^2$	$ \Delta\rho < F \cdot v_c / D^2$
Solution (A) Hors invention	54	0,03	NON
Solution (B) Invention	7	11,6	OUI

Conclusions :

- 20 La composition selon l'invention comprenant les éléments cellulaires et la solution (B) permet de maintenir en suspension lesdits éléments cellulaires en suspension dans ladite solution (B) pendant plusieurs heures. Au sein de la composition selon l'invention, certains éléments cellulaires sont encore en suspension après 12 heures de sédimentation.

- 25 En revanche, la composition hors invention, comprend les éléments cellulaires et la solution (A) ne permet pas de maintenir durablement les éléments cellulaires en suspension dans ladite solution (A). Les éléments cellulaires sédimentent très rapidement dans les solutions à faible viscosité et sans correspondance de densité, comme le HBSS (calcium, magnésium,

glucose) avec une valeur de viscosité au repos d'environ 1 mPa.s et une densité d'environ 1,0038g/cm.³

Exemple 2 :

L'objectif de cet exemple est d'évaluer la viabilité des éléments cellulaires après 12h de
5 sédimentation au sein de la composition selon l'invention.

Pour la réalisation de cet exemple, la composition selon l'invention comprend les éléments suivants :

[Tableau 5]

Réactif	Référence	Concentration du test
HA100	PHI4468P02E (V.I. : 0,22%)	5,4%
Dextran40	CAS 9004-54-0	12%
KCl	CAS 7447-40-7	0,03%
CaCl ₂ .2H O ₂	CAS 10035-04-8	0,015%
C ₆ H ₈ O ₇	CAS 77-92-9	0,025%
Na ₂ HPO ₄	CAS 7558-79-4	0,25%

La composition a également été préparée en conditions stériles et caractérisée dans le
10 tableau 6.

[Tableau 6]

Paramètre physico-chimique	Valeur
Viscosité au repos	0,62 Pa.s
Densité	1073,5 kg/m ³
pH	7.34
Osmolarité	211 mOsmol

Les résultats de la caractérisation des éléments cellulaires ont permis de mesurer la densité et la plus grande dimension des éléments cellulaires, à savoir :

Densité des éléments cellulaires : 1065 kg/m³ ;

15 Plus grande dimension des éléments cellulaires : 200µm soit 0,0002 m;

Dans le contexte de cet exemple, la durée de sédimentation est de 12 heures, ce qui correspond à une borne maximale de stabilité dans le cadre de l'utilisation de la composition selon l'invention en thérapie cellulaire.

Protocole expérimental

5 Conditions

Les lots de production sont référencés par le préfixe « PAR », suivi d'un indicatif incrémental allant de 19 à 22. Ils correspondent à des lots de production d'éléments cellulaires successifs.

1) Pour chaque lot, on prépare deux types d'échantillons :

10 Contrôle : Une suspension d'éléments cellulaires resuspendus dans un milieu de culture cellulaire de référence, à un ratio de 20% de volume d'éléments cellulaires et 80% de milieu de culture de référence.

Composition selon l'invention : Une suspension d'éléments cellulaires resuspendus dans une solution, à un ratio de 20% de volume d'éléments cellulaires et 80% de solution.

15 2) Une fois les échantillons préparés, ces-derniers sont conservés en tubes fermés à température ambiante pendant 12h.

3) Les éléments cellulaires sont ensuite rincés dans un excès de milieu de culture de référence.

4) Les éléments cellulaires sont ensuite remis en culture pendant 24h dans un milieu de culture de référence.

20 5) La viabilité est mesurée. Le résultat est exprimé en normalisant la valeur de viabilité de la condition d'immersion dans la solution par la viabilité obtenue dans la condition de contrôle.

Résultats

25 Les résultats de cet exemple sont décrits à la figure 2. Cette expérience montre une baisse de viabilité moyenne autour de 25% après une immersion de 12h dans la solution considérée, par rapport à un contrôle de 12h dans un milieu de culture de référence. Dans le cadre de l'exemple, cette baisse de viabilité est acceptable compte-tenu du critère d'acceptation de 70% de viabilité relative.

Exemple 3 : Evaluation de l'impact de la procédure d'injection de la composition selon l'invention sur la viabilité des éléments cellulaires.

30 L'objectif de cet exemple est d'évaluer l'impact de la procédure d'injection de la composition selon l'invention sur la viabilité des éléments cellulaires.

Dans le contexte de l'invention, il est important de vérifier que la viscosité de la solution, nécessaire au maintien de l'homogénéité de répartition des éléments cellulaires, n'induit pas

des efforts de cisaillement trop importants pendant l'injection, qui pourraient dégrader la viabilité des cellules.

L'expérience consiste à comparer la viabilité d'un volume connu de composition selon l'invention ayant subi une procédure d'injection dans les conditions de l'invention, à la
5 viabilité d'un volume connu de composition selon l'invention n'ayant pas subi de procédure d'injection.

Les effets de cisaillements subis au cours de l'injection pouvant avoir un effet différé sur la viabilité des cellules, la viabilité des éléments cellulaires ayant subi une procédure d'injection est mesurée immédiatement après l'injection, puis après 24h de remise en culture dans un
10 milieu de culture de référence.

La composition selon l'invention utilisée au cours de cet exemple présente la même composition (tableau 5) et les mêmes caractéristiques rhéologiques (tableau 6) que la composition selon l'invention décrite dans l'exemple 2.

Le protocole d'injection comprend les étapes suivantes :

- 15 a) Préparation de la composition selon l'invention selon le procédé selon l'invention ;
 - b) Remplir une seringue de la composition selon l'invention ;
 - c) Injecter la composition selon l'invention à l'aide de la seringue de l'étape b) dans une canule avec un débit d'injection de 50 μ L.min ;
 - d) Injecter la composition selon l'invention à l'aide de la canule sur une matrice à un débit
20 compris entre 18 μ L à 2 μ L par minute ;
 - e) Rincer la composition selon l'invention et resuspendre les éléments cellulaires dans un milieu de culture ;
 - f) Mettre le milieu de culture comprenant les éléments cellulaires dans un incubateur pendant 24h.
- 25 La viabilité des éléments cellulaires est mesurée à l'issue de l'étape e) et à l'issue de l'étape f). L'expérience a été réalisée 3 fois.

Résultats :

Les mesures de viabilité décrit à la figure 3 ne montrent pas d'impact significatif de la procédure d'injection sur la viabilité dans les conditions de l'exemple. La légère baisse
30 observée directement après l'injection pourrait traduire une baisse transitoire de l'activité métabolique des cellules, qui n'est cependant pas retrouvée après 24h de culture.

Par conséquent, la composition selon l'invention peut être utilisée en tant que composition injectable.

Réactif	% w/w	Concentration
HA500	1.00	10,7 mg/mL
Dextran D40	15.00	160.50 mg/mL
KCl	0.003	1,61 mg/mL
Sodium Chloride	0.15	0,32 mg/mL
Calcium Chloride Dihydrated	0.013	0,14 mg/mL
Disodium Phosphate	0.30	3,21 mg/mL
Citric Acid	0.025	0,27 mg/mL

Exemple 3 : Caractérisation des propriétés viscoélastiques d'une composition selon l'invention via une mesure rhéologique en balayage en oscillation

Pour la réalisation de cet exemple, la composition selon l'invention comprend une solution caractérisée dans le tableau 7 ainsi que des éléments cellulaires.

5 [Tableau 7]

Les éléments cellulaires de la composition utilisée dans le cadre de cet exemple sont un mélange de microtissus présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm, de cellules isolées et d'agrégats de cellules de neurones.

10 Enfin, certains paramètres physicochimiques de la composition selon l'invention ont été caractérisé dans le tableau 8 ci-dessous.

[Tableau 8]

Paramètre physicochimique de la composition	Valeur
Viscosité au repos	900 mPa.s
Densité	1071 kg/m ³
pH	7,2

15 Le comportement de la composition selon l'invention a été vérifiée par des mesures rhéologiques classiques en balayage en oscillation avec un rhéomètre anton Paar MCR 302. La fréquence angulaire est constante et fixée à 10 rad/s. La déformation de cisaillement γ varie de 0.001 à 10 % et la température est constante et régulée à 20°C.

Deux paramètres ont été mesurés pour caractériser les propriétés viscoélastiques de la composition: le module de stockage (G') et le module de Perte (G'') :

-Le module de stockage (G') représente la partie élastique de la déformation. Il est lié à la capacité du matériau à emmagasiner de l'énergie pendant la déformation et est proportionnel à la rigidité du matériau. Il détermine donc l'importance de sa réponse élastique et par conséquent associé à un comportement de solide élastique, donc de gel.

- 5 -Le module de Perte (G'') représente la partie visqueuse de la déformation. Il est lié à la dissipation d'énergie sous forme de chaleur et est proportionnel au comportement amortissant du matériau. Il détermine l'importance de sa réponse visqueuse et par conséquent associé à un comportement de fluide.

Dans le cadre d'un matériau rigide ou structuré, le module de stockage (G') sera supérieur au module de Perte (G''). A l'inverse dans le cadre d'un matériau liquide, le module de Perte (G'') sera supérieur au module de stockage (G').

Les résultats présentés à la figure 4 ont montré que G' était constant selon les différentes déformations de cisaillement à température constante et toujours inférieur à G'' traduisant un comportement liquide de la composition.

- 15 Exemple 4 : Etude de la viabilité des éléments cellulaires dans une solution comprenant du CMC.

L'objectif de cet exemple est d'évaluer la viabilité des éléments cellulaires après 12h d'immersion au sein d'une solution comprenant du CMC.

- Les différentes solutions utilisées au sein de cet exemple sont décrites dans le tableau 9 ci-dessous.

[Tableau 9]

	Dextran 40	CMC90	Chlorure de Sodium
M4	12.30%	4.60%	0.52%
CM	Eléments cellulaires cultivés dans un milieu de culture de référence		
CS	Eléments cellulaires cultivés dans une solution de chlorure de sodium		

- Pour la réalisation de cet exemple, la solution M4 a été mélangée avec des éléments cellulaires avec un rapport de volume éléments cellulaire / solution contrôlé de façon à former une composition selon l'invention.

Dans le cadre de cet exemple, les éléments cellulaires sont un mélange de microtissus présentant une plus grande dimension d'au moins 50 μ m, de cellules isolées et d'agrégats de cellules de neurones.

La composition selon l'invention a été conservées à température ambiante pendant 12 heures. Les éléments cellulaires sont ensuite rincés dans un excès de milieu de culture de référence. Les microtissus sont ensuite récupérés et la viabilité est mesurée par un bioluminométrique de viabilité cellulaire. Le résultat est exprimé en signaux de luminescence renormalisés par le signal contrôle CM. Pour évaluer la viabilité cellulaire, 7 répliques analytiques ont été effectués pour chaque condition.

- Les résultats de cet exemple montrent un maintien de la viabilité de la composition selon l'invention comprenant la solution M4 et les éléments cellulaire (96% par rapport à un contrôle de 12h dans un milieu de culture de référence).
- 10 En conclusion, l'exemple 4 démontre que la composition selon l'invention, comprenant la solution M4 et des éléments cellulaires, permet de maintenir une viabilité cellulaire élevée après 12 heures d'immersion à température ambiante.

REVENDICATIONS

- [Revendication 1] Composition biocompatible , comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, lesdits éléments cellulaires étant choisis parmi des cellules isolées, des microtissus cellulaires, des amas de cellules et leurs mélanges, au moins deux desdits éléments cellulaires présentant une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), ladite composition étant caractérisée en ce que la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité suivante :
- $$|\Delta\rho| < F \cdot v_c / D^2$$
- où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,
- où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,
- où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;
- où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représentant la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;
- et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹.
- [Revendication 2] Composition selon la précédente revendication, caractérisée en ce que au moins un élément cellulaire est un microtissu présentant une plus grande dimension d'au moins 50µm.
- [Revendication 3] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que l'osmolalité des éléments cellulaires dans la solution est comprise entre 180 et 360 mOsm.l .kg⁻¹.
- [Revendication 4] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée par une densité comprise entre 800 et 2000 kg/m³.
- [Revendication 5] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée par une viscosité au repos mesurée à 25°C, comprise entre 0,01 et 1,5 Pa.s.
- [Revendication 6] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que la solution comprend au moins un ion choisi parmi l'ion sodium, l'ion calcium, l'ion chlore, l'ion potassium et leurs mélanges.

- [Revendication 7] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que la solution comprend au moins un élément choisi parmi du chlorure de sodium (NaCl), du chlorure de calcium (CaCl₂), du chlorure de potassium (KCl), du chlorure de magnésium (MgCl₂) et leurs mélanges.
- 5 [Revendication 8] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- Entre 0,01 et 0,9% en masse de NaCl par rapport à la masse totale de la solution ; et/ou
 - 10 - Entre 0,01 et 0,04% en masse de CaCl₂ par rapport à la masse totale de la solution ; et/ou
 - Entre 0,01 et 0,05% en masse de KCl par rapport à la masse totale de la solution.
- [Revendication 9] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un élément cellulaire contenu dans un microcompartiment en trois dimensions comprenant une couche externe en hydrogel.
- 15 [Revendication 10] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que les cellules constituant les éléments cellulaires sont des cellules matures et/ou des progéniteurs et/ou des cellules souches.
- 20 [Revendication 11] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que les cellules constituant les éléments cellulaires sont choisis parmi cellules neurales, les cellules neuronales, les cellules gliales, les cellules cardiaques, les cellules de la rétine, les lymphocytes, les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules souches mésenchymateuses, les
- 25 kératinocytes, les fibroblastes, les pré-adipocytes, les adipocytes, les cellules des îlots pancréatiques et leurs mélanges.
- [Revendication 12] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que la fraction volumique des éléments cellulaires est comprise entre 0,01% et 60% en volume.
- 30 [Revendication 13] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que la solution comprend :
- de l'eau,
 - au moins un agent de densité biocompatible
 - au moins un agent de viscosité biocompatible, préférentiellement de
 - 35 poids moléculaire compris entre 0,05 MDa – 5MDa.
- [Revendication 14] Composition selon la précédente revendication, caractérisée en ce que la solution comprend également au moins un agent d'ajustement de l'osmolalité biocompatible.

- [Revendication 15] Composition selon la précédente revendication, caractérisée en ce que le au moins un agent de densité est choisi parmi le dextran, le mannitol, le NaCl, le glycérol ou le sorbitol et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.
- 5 [Revendication 16] Composition selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisée en ce que l'agent de viscosité biocompatible est choisi parmi le PVA, le carboxyméthyl cellulose (CMC), le méthylcellulose, l'hydroxyethylcellulose, l'éthylhydroxyethylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'alginate, le pullulane, le chitosan, la gomme de xanthan, la gomme de gellane, le polyacrilamide, le polyvinylpyrrolidone, le polyethylene oxide, la caséine, le collagène, le hyaluronate de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.
- 10 [Revendication 17] Composition selon l'une des revendications 13 à 16, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- 15 - entre 0,01 et 30% en masse d'agent (s) de densité par rapport à la masse totale de la solution
- entre 0,01 et 8% en masse d'agent de viscosité par rapport à la masse totale de la solution.
- [Revendication 18] Composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que la composition est obtenue par la mise en œuvre des étapes suivantes :
- 20 (a) Préparation ou récupération d'une composition biocompatible comprenant une solution (A) et un ensemble d'éléments cellulaires dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s);
- 25 (b) Préparation d'une composition biocompatiblebiocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition de l'étape a) et une solution (B) et optionnellement la solution (A) de façon à ce que ce que la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b) vérifie l'inégalité suivante :
- 30
$$|\Delta\rho| < F \cdot v_c / D^2$$
- où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,
- 35 où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s^{-1} ;

où $F = 18.\mu_c/g \sim 9,81$ avec μ_c représentant la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s , g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s^{-2} ;

et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6} \text{ m.s}^{-1}$.

(c) Optionnellement récupération de la composition biocompatible issue de l'étape (b), comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), dans laquelle la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité précitée à l'étape (b).

[Revendication 19] Composition selon l'une des précédentes revendications pour son utilisation dans le traitement de maladies en thérapie cellulaire.

[Revendication 20] Composition pour son utilisation selon la précédente revendication, en injection à l'aide d'une canule au niveau du site d'injection.

[Revendication 21] Procédé de préparation d'une composition selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

(a) Préparation ou récupération d'une composition comprenant une solution (A) et un ensemble d'éléments cellulaires dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s);

(b) Préparation d'une composition biocompatible comprenant les éléments cellulaires de la composition de l'étape a) et une solution (B) et optionnellement la solution (A) de façon à ce que la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b) vérifie l'inégalité suivante :

$$|\Delta\rho| < F.v_c/D^2$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m^3 , et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m^3 ,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s^{-1} ;

où $F = 18.\mu_c/g \sim 9,81$ avec μ_c représentant la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en $m.s^{-2}$;

et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6} m.s^{-1}$.

- 5 (c) Optionnellement, récupération de la composition biocompatible issue de l'étape (b), comprenant une solution et des éléments cellulaires en suspension dans ladite solution, dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de cellules différent(s), dans laquelle la différence de densité entre la densité de la solution et la densité moyenne des éléments cellulaires vérifie l'inégalité
- 10 précitée à l'étape (b).

[Revendication 22] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que l'étape (a) comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 15 1) Mise en culture d'au moins un élément cellulaire ;
2) Rinçage de la culture d'éléments cellulaires issues de l'étape 1) ;
3) Centrifugation de la culture d'éléments cellulaires issues de l'étape 2) ;
4) Récupération d'une composition comprenant des éléments cellulaires issues de la centrifugation de l'étape 3), dont au moins deux éléments cellulaires présentent une densité et/ou une taille et/ou un nombre de
- 20 cellules différent(s).

[Revendication 23] Procédé selon la précédente revendication, caractérisée en ce que au moins un élément cellulaire comprend au moins une cellule encapsulée, préférentiellement dans de l'alginate.

- [Revendication 24] Procédé selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la composition de l'étape (a) présente une vitesse de sédimentation maximale des éléments cellulaires par rapport à la solution (A) supérieure à $5,56 \cdot 10^{-6} m/s$, soit 20mm/h.
- 25

[Revendication 25] Procédé selon l'une des revendications 21 à 24, caractérisé en ce que l'étape (b) comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 30 (b1) Caractérisation d'au moins un paramètre rhéologique choisi parmi ;
*la densité de l'élément cellulaire ayant la plus faible densité et la densité de l'élément cellulaire ayant la plus grande densité desdits éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a);
*la densité de la composition issue de l'étape (a) ;
*la viscosité de la composition issue de l'étape (a) ;
35 * la plus grande dimension des éléments cellulaires présent dans la composition issue de l'étape (a)

(b2) Préparation d'une solution (B) comprenant au moins un agent de densité et/ou au moins un agent de viscosité et de l'eau ;

(b3) Stérilisation de la solution (B) issue de l'étape (b2) de façon à obtenir une solution (B) stérilisée ;

5 (b4) Optionnellement, ajustement du pH de la solution (B) stérilisée de l'étape (b3) ;

(b5) Préparation d'une composition comprenant les éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (a) avec la solution (B) stérilisée issue de l'étape (b3) ou (b4) et optionnellement avec la solution (A) de façon à ce
10 que la différence de densité entre la densité de la solution issue de l'étape (b5) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la composition issue de l'étape (b5) vérifie l'inégalité suivante :

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments
15 cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m³,

où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,

20 où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s⁻¹;

où $F = 18 \cdot \mu_c / g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s, g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s⁻²;

25 et où $v_c = 5,56 \cdot 10^{-6}$ m.s⁻¹.

[Revendication 26] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que l'étape (b2) de préparation d'une solution (B) est réalisée en ajoutant au moins un agent de densité biocompatible choisi parmi le dextran, le mannitol, le NaCl, le glycérol, le sorbitol et leurs mélanges, ou des formes
30 modifiées de ces molécules.

[Revendication 27] Procédé selon l'une des revendications 25 ou 26, caractérisé en ce que l'étape (b2) de préparation d'une solution (B) est réalisée en ajoutant un agent de viscosité biocompatible choisi parmi le PVA, le carboxyméthyl cellulose (CMC), le méthylcellulose, l'hydroxyethylcellulose,
35 l'éthylhydroxyethylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'alginate, le pullulane, le chitosan, la gomme de xanthan, la gomme de gellane, le polyacrilamide, le polyvinylpyrrolidone, le polyéthylène oxide, la

caséine, le collagène, le hyaluronate de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules.

5 [Revendication 28] Procédé de préparation selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisé en ce que l'étape (b2) de préparation d'une solution (B) comprend également l'ajout d'au moins un élément choisi parmi du chlorure de sodium (NaCl), du chlorure de calcium (CaCl₂), du chlorure de potassium (KCl), du chlorure de magnésium (MgCl₂) et leurs mélanges.

[Revendication 29] Procédé de préparation selon l'une des revendications 25 à 28, caractérisé en ce que l'étape (b2) est réalisée sous agitation.

10 [Revendication 30] Kit comprenant :
- une composition biocompatible selon l'une des revendication 1 à 20 ; et
- un moyen d'injection, préférentiellement une canule.

[Revendication 31] Kit selon la précédente revendication, caractérisé en ce que la composition biocompatible est sous forme solide.

15 [Revendication 32] Kit comprenant :
- Une préparation (1) biocompatible comprenant au moins un agent de viscosité biocompatible choisi parmi le PVA, le carboxyméthyl cellulose (CMC), le méthylcellulose, l'hydroxyethylcellulose, l'éthylhydroxyethylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC),
20 l'alginate, le pullulane, le chitosan, la gomme de xanthan, la gomme de gellane, le polyacrilamide, le polyvinylpyrrolidone, le polyéthylène oxide, la caséine, le collagène, le hyaluronate de sodium et leurs mélanges, ou des formes modifiées de ces molécules et au moins un agent de densité biocompatible choisi parmi le dextran, le mannitol, le NaCl, le glycérol, le sorbitol et leurs mélanges ou des formes modifiées de ces molécules ;
- Une préparation (2) biocompatible comprenant des éléments cellulaires, lesdits éléments cellulaires étant choisis parmi des cellules isolées, des microtissus cellulaires, des amas de cellules et leurs mélanges, au moins deux desdits éléments cellulaires présentant une densité et/ou une taille
25 et/ou un nombre de cellules différent(s) ;
caractérisé en ce que le mélange de la préparation (1) et la préparation (2) forme une composition dont la différence de densité entre la densité de la préparation (1) et la densité moyenne des éléments cellulaires de la préparation (2) vérifie l'inégalité suivante :

$$|\Delta\rho| < F \cdot \frac{v_c}{D^2}$$

35 où $|\Delta\rho| = \rho_s - \rho_o$ avec ρ_s représentant la densité de la composition exprimée en kg/m³, et ρ_o représentant la densité moyenne des éléments

- cellulaires, mesurée à l'aide de la technique de gradient de densité exprimée en kg/m^3 ,
où D représente la plus grande dimension des éléments cellulaires exprimée en mètre,
5 où v_c représente le seuil de vitesse de sédimentation acceptable exprimée en m.s^{-1} ;
où $F = 18.\mu_c/g \sim 9,81$ avec μ_c représente la viscosité maximale au repos de la solution exprimée en Pa.s , g représentant la constante de pesanteur exprimée en m.s^{-2} ;
10 et où $v_{c.} = 5,56 \cdot 10^{-6} \text{ m.s}^{-1}$.
- [Revendication 33] Kit selon la précédente revendication, caractérisé en ce que la préparation (2) comprend une solution.
- [Revendication 34] Kit selon l'une des revendications 30 à 33, caractérisé en ce qu'il comprend de l'eau.
- 15 [Revendication 35] Kit selon l'une des revendications 30 à 34, caractérisé en qu'il comprend au moins un élément choisi parmi du chlorure de sodium (NaCl), du chlorure de calcium (CaCl_2), du chlorure de potassium (KCl), du chlorure de magnésium (MgCl_2) et leurs mélanges.