

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 122 883**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **21 04988**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **C 12 N 5/07** (2020.12), C 12 N 5/073, A 61 K 35/545,  
A 61 P 43/00

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 11.05.21.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 18.11.22 Bulletin 22/46.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

Demande(s) d'extension : Polynésie-Fr

⑦① Demandeur(s) : **TREEFROG THERAPEUTICS**  
*Société par actions simplifiée — FR.*

⑦② Inventeur(s) : FEYEUX Maxime et COHEN Philippe,  
Joseph, Regis.

⑦③ Titulaire(s) : **TREEFROG THERAPEUTICS** Société  
par actions simplifiée.

⑦④ Mandataire(s) : **AQUINOV.**

⑤④ **Microcompartiments cellulaires comprenant des cellules dont l'intégrité génomique est maintenue après  
amplification et procédé de préparation.**

⑤⑦ L'invention concerne un microcompartiment cellulaire  
en trois dimensions ou un ensemble de microcomparti-  
ments cellulaires en trois dimensions comprenant au moins  
une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite  
couche externe au moins une couche de cellules et/ou au  
moins une assise de cellules, dont moins de 20% de la po-  
pulation totale de cellules présentes dans le microcomparti-  
ment ou dans l'ensemble de microcompartiments sont des  
cellules présentant au moins une mutation.

L'invention a également pour objet un procédé de prépa-  
ration d'un tel microcompartiment ou ensemble de micro-  
compartiment.

FR 3 122 883 - A1



## Description

### **Titre de l'invention : Microcompartiments cellulaires comprenant des cellules dont l'intégrité génomique est maintenue après amplification et procédé de préparation**

#### **Domaine technique**

[0001] L'invention concerne le maintien de l'intégrité génomique des cellules lors de leur division ex vivo sur plusieurs cycles de divisions cellulaires, en particulier dans le cadre d'une culture cellulaire en trois dimensions.

#### **Art antérieur**

[0002] La culture de cellules ex vivo est un domaine qui suscite un intérêt croissant. Les cellules cultivées peuvent être de tout type. Il peut s'agir aussi bien de cellules différenciées avec différents phénotypes, de cellules progénitrices que de cellules souches. Une avancée importante dans les techniques de culture cellulaire est l'introduction de systèmes de culture tridimensionnels. Les cultures en trois dimensions sont en effet plus proches des systèmes naturels in vivo, et peuvent être utilisées pour de nombreuses applications en particulier dans le développement de thérapies.

[0003] Toutefois, la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire sont conditionnées par la disponibilité de quantités industrielles de cellules qui nécessite d'avoir recours à une multiplication importante du nombre de cellules et donc un nombre élevé de divisions sur un temps court. Dans la plupart des systèmes de culture cellulaire actuels, cette multiplication entraîne l'apparition et la sélection de mutations, en particulier de mutations fonctionnelles délétères, génomiques et/ou épigénétiques à chaque division sur de nombreuses cellules pendant l'expansion de la culture, compromettant ainsi leur utilisation notamment en thérapie.

[0004] Les mutations peuvent être des mutations ponctuelles de la séquence génétique (codantes ou non codantes, silencieuses ou non en termes de séquence peptidique), des variants structuraux, des modifications épigénétiques, voir des modifications de l'ADN mitochondrial. Seules les cellules mutantes porteuses d'une ou plusieurs mutations fonctionnelles ou potentiellement fonctionnelles sont problématiques pour l'utilisation des cellules en thérapie, c'est-à-dire toute modification génétique ou épigénétique transmissible qui confère un gain ou perte de fonction ou perte de fonction potentielle aux cellules cultivées. Il peut s'agir notamment d'un avantage de croissance, d'une diminution de la susceptibilité à la mort cellulaire, d'une modification des gènes impliqués dans la tumorigenèse ou la répression de la tumorigenèse. Les mutations les plus impactantes sont celles permettant une expansion clonale des cellules qui devient dominante en culture.

- [0005] Des exemples de mutations génétiques particulièrement récurrentes sont décrites notamment dans Y. Avior, K. Eggen, N. Benvenisty, Cancer-Related Mutations Identified in Primed and Naive Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 25, 456–461 (2019). Parmi les plus connues on peut citer en particulier les mutations du gène P53 (F. T. Merkle, S. Ghosh, N. Kamitaki, J. Mitchell, Y. Avior, C. Mello, S. Kashin, S. Mekhoubad, D. Ilic, M. Charlton, G. Saphier, R. E. Handsaker, G. Genovese, S. Bar, N. Benvenisty, S. A. McCarroll, K. Eggen, Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature*. 545, 229–233 (2017)), et les mutations par amplification de la région chromosomique 20q11 (N. Lefort, M. Feyeux, C. Bas, O. Féraud, A. Bennaceur-Griscelli, G. Tachdjian, M. Peschanski, A. L. Perrier, Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nature Biotechnology*. 26, 1364–1366 (2008)).
- [0006] Le problème de la stabilité et l'intégrité génétique des cellules en culture est connu et il a en particulier été largement étudié pour les cellules souches pluripotentes, comme par exemple : S. Attwood, M. Edel, iPS-Cell Technology and the Problem of Genetic Instability—Can It Ever Be Safe for Clinical Use? *Journal of Clinical Medicine*. 8, 288 (2019); ou encore P. Andrews, Human pluripotent stem cells: genetic instability or stability? *Regenerative medicine*, vol. 16, No 2, 2 mar 2021. On sait aussi que la mutagenèse est un problème très présent pour la culture des cellules souches dès leur reprogrammation tel que décrit dans Ji, S. Ng, V. Sharma, D. Neculai, S. Hussein, M. Sam, Q. Trinh, G. M. Church, J. D. McPherson, A. Nagy, N. N. Batada, Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 30, 435–440 (2012), ou encore dans V. Turinetto, L. Orlando, C. Giachino, Induced pluripotent stem cells: Advances in the quest for genetic stability during reprogramming process. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (2017), doi:10.3390/ijms18091952.
- [0007] Cette instabilité génétique nuit fortement au développement des thérapies cellulaires, et en particulier aux applications cliniques des cellules souches (Yamanaka, Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell stem cell*. 27, 523–531 (2020); S. E. Peterson, J. F. Loring, Genomic instability in pluripotent stem cells: Implications for clinical applications. *Journal of Biological Chemistry*. 289, 4578–4584 (2014); K. Garber, RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*. 33, 890–891 (2015)).
- [0008] Il existe donc un besoin important pour une solution permettant le maintien de l'intégrité génétique des cellules en culture, en particulier pour la production à grande échelle de thérapies cellulaire.
- [0009] L'objectif de l'invention est par conséquent de répondre à l'ensemble de ces besoins et de pallier les inconvénients et limites de l'art antérieur.

## Résumé de l'invention

- [0010] En travaillant sur le développement de microcompartiments cellulaires pour la culture de cellules en 3D, les inventeurs ont mis au point un système permettant une culture de masse de cellules tout en conservant leur intégrité génomique.
- [0011] A cet effet l'invention a pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment sont des cellules présentant au moins une mutation, préférentiellement entre 0 et 10%, encore plus préférentiellement entre 0 et 5%, même après plusieurs divisions cellulaires.
- [0012] Selon un autre objet, l'invention concerne un ensemble d'au moins deux microcompartiments cellulaires en trois dimensions, préférentiellement en suspension liquide, chaque compartiment comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, dans lesquels moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments sont des cellules présentant au moins une mutation, préférentiellement entre 0 et 10%, encore plus préférentiellement entre 0 et 5%.
- [0013] Avantagement, ce taux de cellules mutantes est inférieur à celui des systèmes de cultures cellulaires existants. Par exemple, certaines études suggèrent qu'une mutation inactivatrice du gène P53 confère, dans un système de culture de cellules souches conventionnel 2D, un avantage de sélection jusqu'à x1,9 par passage (iPS-Cell Technology and the Problem of Genetic Instability—Can It Ever Be Safe for Clinical Use ? Attwood & Edel) + Merkle, F.T. ; Ghosh, S.; Kamitaki, N.; Mitchell, J.; Avior, Y.; Mello, C.; Kashin, S.; Mekhoubad, S.; Ilic, D.; Charlton, M.; et al. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature* 2017, 545, 229–233.). Ceci implique une probabilité de fixation de 97% après émergence de cette mutation (Haldane, J.B.S. A Mathematical Theory of Natural and Artificial Selection, Part V: Selection and Mutation. *Math. Proc. Camb. Philos. Soc.* 1927, 23, 838–844.)
- [0014] Le maintien de l'intégrité génomique des cellules permet d'utiliser les microcompartiments avec les cultures cellulaires selon l'invention pour différentes applications et notamment dans la prévention et/ou le traitement de pathologies.
- [0015] Les microcompartiments cellulaires selon l'invention peuvent être obtenus en particulier par la mise en œuvre d'un procédé de préparation spécifique comprenant les étapes suivantes :

- (a) préparer une suspension de cellules comprenant des cellules uniques et/ou au moins un amas (« cluster ») de cellules dans un milieu isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,
  - (b) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;
  - (c) cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose ;
  - (d) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;
  - (e) cultiver les microcompartiments pendant au moins deux cycles de division cellulaire (amplification), et
  - (f) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus,
- le procédé étant caractérisé en ce que la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b) (au moment de l'encapsulation) représentent un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

[0016] Ce procédé permet d'obtenir des microcompartiments selon l'invention avec une population de cellules dont l'intégrité génomique est maintenue et stabilisée.

[0017] L'invention vise aussi l'utilisation d'un tel procédé pour maintenir l'intégrité génomique de cellules lors de leur amplification.

[0018] D'autres caractéristiques et avantages ressortiront de la description détaillée de l'invention et des exemples qui vont suivre.

### **Brève description des figures**

[0019] [Fig.1] est une vue d'ensemble des trois bras expérimentaux « culture 2D » « bioréacteur agrégats » et « Invention » ainsi que la numérotation et chronologie des passages effectués (indiqués dans les rectangles J4 = jour 4, J8 = jour 8, etc...). Toutes les cultures sont arrêtées au jour final J28 pour comparaison génétique détaillée.

[0020] [Fig.2a] est une image de microscopie a contraste de phase montrant les résultats du bras expérimental « culture 2D » au jour final 28 avant échantillonnage finale. Barre d'échelle 500µm.

[0021] [Fig.2b] est une image de microscopie a contraste de phase montrant les résultats du bras expérimental « bioréacteur agrégats » au jour final 28 avant échantillonnage finale. Les agrégats représentés ont été prélevés de leur culture en suspension et déposés temporairement dans une boîte de pétri pour réaliser l'observation microscopique. Barre d'échelle 500µm.

[0022] [Fig.2c] est une image de microscopie a contraste de phase montrant les résultats du bras expérimental « Invention » au jour final 28 avant échantillonnage finale. Les microcompartiments représentés ont été prélevés de leur culture en suspension et déposés temporairement dans une boîte de pétri pour réaliser l'observation microscopique.

Barre d'échelle 500 $\mu$ m.

- [0023] [Fig.3] est une représentation de la croissance apparentes des cellules au cours du temps en culture calculé par comptage des cellules avant et après chaque passage. Le facteur d'amplification théorique cumulée est représenté en fonction du temps ; l'axe des ordonnées (amplification) est représentée en échelle logarithmique. Les points de données représentés correspondent à l'ensemble des comptages qui ont été réalisés au moment des passages.
- [0024] [Fig.4] est une représentation des résultats de l'évaluation phénotypique des cellules souches par cytométrie en flux. Les cellules dissociées sont fixées et marquées pour les marqueurs de pluripotences OCT4 et NANOG. Le pourcentage de cellules doublement positives pour ces 2 marqueurs lors passages successifs pendant 28 jours est représenté ici (Moyenne et écart type).
- [0025] [Fig.5] est un caryotype haute résolution par puce SNP CytoScan HD array pour analyse comparative de l'analyse de l'échantillon initial jour 0 et des 3 bras expérimentaux « culture 2D », « Bioréacteur agrégats » et « Invention » à 28jours. CytoScan® HD Array Affymetrix, vendu par la société thermo fisher, quantifie le nombre de copie moyen par cellules pour 2.67 millions de sondes réparties sur l'ensemble du génome. Les zones entourées sont centrées sur les chromosomes 20.
- [0026] [Fig.6] représente les résultats de l'évaluation par PCR digitale du nombre de copie moyen de la région chromosomique 20q11 au cours des 28 jours de culture pour les 3 bras expérimentaux (Analyse réalisé avec le test 24 sondes ddPCR iPS de la société Stemgenomics). A gauche : nombre de copie 20q11 en fonction du nombre de jours en culture. A droite : nombre de copie 20q11 rapport à l'amplification théorique cumulée au cours du temps. Les points de données correspondent aux échantillonnages réalisés lors des différents passages : Carrés = « bioréacteur agrégats », Ronds = « culture 2D » et Triangles = « Invention ». Les courbes associées correspondent aux régressions correspondantes. A noter que les écart types pour ces mesures sont en moyenne de 0.12 (nombre de copie 20q11), les étoiles pointent les mesures qui sont significativement augmentées.
- [0027] [Fig.7] Représente la synthèse des pourcentages de cellules mutées au cours de 28 jours de culture pour les bras « culture 2D » « bioréacteur agrégats » et « Invention ».

### **Description détaillée de l'invention**

- [0028] Définitions
- [0029] Par « alginate » au sens de l'invention, on entend des polysaccharides linéaires formés à partir de  $\beta$ -D-mannuronate et  $\alpha$ -L-gulonate, des sels et des dérivés de ceux-ci.
- [0030] Par « capsule en hydrogel » au sens de l'invention, on entend une structure tridimen-

sionnelle formée à partir d'une matrice de chaînes polymères, gonflée par un liquide et préférentiellement de l'eau.

- [0031] Par cellule « exprimant un gène » au sens de l'invention, on entend une cellule qui contient au moins 5 fois plus de copies de l'ARN transcrit à partir de la séquence d'ADN du gène concerné en comparaison d'une cellule pluripotente, préférentiellement 10 fois plus de copies, préférentiellement 20 fois plus de copies, préférentiellement 100 fois plus de copies.
- [0032] 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.
- [0033] 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.
- [0034] Par « cellule mutante » au sens de l'invention, on entend une cellule porteuse d'au moins une mutation.
- [0035] Par « cellule progénitrice » au sens de l'invention, on entend une cellule souche déjà engagée dans la différenciation cellulaire mais pas encore différenciée.
- [0036] Par « cellule souche embryonnaire » au sens de l'invention on entend une cellule souche pluripotente de cellule dérivée de la masse cellulaire interne du blastocyste. La pluripotence des cellules souches embryonnaires peut être évaluée par la présence de marqueurs tels que les facteurs de transcription OCT4, NANOG et SOX2 et des marqueurs de surface comme SSEA3/4, Tra-1-60 et Tra-1-81. Les cellules souches embryonnaires utilisées dans le cadre de l'invention sont obtenues sans destruction de l'embryon dont elles sont issues, par exemple à l'aide de la technique décrite dans Chang et al. (*Cell Stem Cell*, 2008, 2(2)) : 113-117). Eventuellement les cellules souches embryonnaires d'êtres humains peuvent être exclues.
- [0037] Par « cellule souche pluripotente » ou « cellule pluripotente » au sens de l'invention, on entend une cellule qui a la capacité de former tous les tissus présents dans l'organisme d'origine entier, sans pour autant pouvoir former un organisme entier en tant que tel. Les cellules souches pluripotentes humaines peuvent être appelées hPSC dans la présente demaine. Il peut s'agir en particulier de cellules souches pluripotentes induites (iPSC ou hiPSC pour les cellules souches pluripotentes induites humaines), de cellules souches embryonnaires ou de cellules MUSE (pour « Multilineage-differentiating Stress Enduring »).

- [0038] Par « cellule souche pluripotente induite » au sens de l'invention on entend une cellule souche pluripotente induite à la pluripotence par reprogrammation génétique de cellules somatiques différenciées. Ces cellules sont notamment positives pour les marqueurs de pluripotence, comme la coloration à la phosphatase alcaline et l'expression des protéines NANOG, SOX2, OCT4 et SSEA3/4. Des exemples de procédés permettant l'obtention de cellules souches pluripotentes induites sont décrits dans les articles Yu et al. (Science 2007, 318 (5858) : 1917-1920), Takahashi et al (Cell, 2007, 131(5) : 861-872) et Nakagawa et al (Nat Biotechnol, 2008, 26(1) : 101-106).
- [0039] Par « diamètre de Feret » d'un microcompartiment selon l'invention, on entend la distance « d » comprise entre deux tangentes audit microcompartiment, ces deux tangentes étant parallèles, de telle sorte que l'ensemble de la projection dudit microcompartiment soit compris entre ces deux tangentes parallèles.
- [0040] Par « épaisseur variable » de la couche interne de cellules humaines en cours de différenciation cellulaire, on entend au sens de l'invention le fait que la couche interne dans un même microcompartiment, n'a pas la même épaisseur partout.
- [0041] Par « microcompartiment » ou « capsule » au sens de l'invention, on entend une structure tridimensionnelle partiellement ou totalement close, contenant plusieurs cellules.
- [0042] Par « milieu de culture convectif » au sens de l'invention on entend un milieu de culture animé par des mouvements internes.
- [0043] Par « mutation » au sens de l'invention, on entend une mutation génétique ou épigénétique, préférentiellement une mutation fonctionnelle. Il peut s'agir en particulier d'une modification ponctuelle de la séquence génétique, d'un variant structurel, d'une modification épigénétique, ou d'une modification de l'ADN mitochondrial.
- [0044] Par « mutation fonctionnelle » au sens de l'invention, on entend une modification génétique ou épigénétique transmissible qui confère un gain ou perte de fonction ou perte de fonction potentielle à cellule mutante concernée. Il s'agit préférentiellement d'une mutation entraînant une modification du phénotype de la cellule mutante concernée. Très préférentiellement il s'agit d'un changement de la séquence du génome et/ou de l'épigénome qui altère le potentiel thérapeutique d'une population de cellules, soit en augmentant le risque associé à la thérapie produite soit en diminuant le bénéfice apporté par la thérapie produite.
- [0045] Par « plus grande dimension » d'un microcompartiment ou d'un amas de cellule ou d'une couche de cellules ou d'une assise de cellules au sens de l'invention, on entend la valeur du plus grand diamètre de Feret dudit microcompartiment.
- [0046] Par « plus petite dimension » d'un microcompartiment d'un microcompartiment ou d'un amas de cellule ou d'une couche de cellules ou d'une assise de cellules au sens de

l'invention, on entend la valeur du plus petit diamètre de Feret dudit microcompartiment.

[0047] 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.

[0048] Par « lumière » ou « lumen » au sens de l'invention, on entend un volume de solution aqueuse topologiquement entouré de cellules. Préférentiellement son contenu n'est pas en équilibre diffusif avec le volume de liquide convectif présent à l'extérieur du microcompartiment.

[0049] Microcompartiments cellulaires

[0050] L'invention a donc pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation.

[0051] Le microcompartiment comprend une couche externe en hydrogel. Préférentiellement l'hydrogel utilisé est biocompatible, c'est-à-dire qu'il n'est pas toxique pour les cellules. La couche d'hydrogel doit permettre la diffusion d'oxygène et de nutriment pour alimenter les cellules contenues dans le microcompartiment et permettre leur survie. Selon un mode de réalisation, la couche externe d'hydrogel comprend au moins de l'alginate. Elle peut être constituée exclusivement d'alginate. L'alginate peut être en particulier un alginate de sodium, composé à 80% d' $\alpha$ -L-gulonate et 20% de  $\beta$ -D-mannuronate, avec une masse moléculaire moyenne de 100 à 400 kDa et une concentration totale comprise entre 0,5 et 5% en masse. La couche en hydrogel est dépourvue de cellules.

[0052] La couche d'hydrogel permet notamment de protéger les cellules du milieu extérieur, de limiter la prolifération incontrôlée des cellules, et leur différenciation en cas de différenciation.

[0053] Le microcompartiment selon l'invention comprend au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules. Cette ou ces couche(s) et/ou assise(s) de cellules est (sont) organisée(s) en trois dimensions dans le microcompartiment.

[0054] Le microcompartiment peut comprendre notamment :

- une ou plusieurs couches de cellules et/ou une ou plusieurs assises de cellules,

organisée(s) en trois dimensions, ou

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

- [0055] Les cellules présentes dans le microcompartiment peuvent être tout type de cellules. Préférentiellement les cellules sont des cellules humaines ou animales.
- [0056] Dans un mode de réalisation particulier, le microcompartiment comprend des cellules souches pluripotentes. Une cellule souche pluripotente, ou cellule pluripotente, s'entend d'une cellule qui a la capacité de former tous les tissus présents dans l'organisme d'origine entier, sans pour autant pouvoir former un organisme entier en tant que tel. Les cellules souches pluripotentes peuvent être en particulier des cellules souches pluripotentes induites (IPS), des cellules MUSE (« Multilineage-differentiating Stress Enduring ») que l'on trouve dans la peau et la moelle osseuse des mammifères adultes, ou des cellules souches embryonnaires (ES).
- [0057] Selon une variante particulièrement adaptée de l'invention, le microcompartiment selon l'invention comprend des cellules souches pluripotentes induites humaines ou animales.
- [0058] Dans un autre mode de réalisation particulier, le microcompartiment selon l'invention comprend des cellules multipotentes humaines ou animales et/ou des cellules progénitrices humaines ou animales issues de ces cellules multipotentes. Les cellules multipotentes et/ou progénitrices ont préférentiellement été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes, en particulier de cellules souches pluripotentes humaines, ou éventuellement à partir de cellules humaines non pluripotentes dont le profil transcriptionnel a été modifié artificiellement pour rejoindre celui de cellules multipotentes et/ou de progéniteurs particuliers, typiquement par expression forcée de facteurs de transcriptions spécifiques du phénotype cellulaire cible. Préférentiellement, les cellules multipotentes et/ou progénitrices ont été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes après mise en contact avec une solution capable d'initier la différenciation desdites cellules souches.
- [0059] Selon une autre variante, le microcompartiment selon l'invention comprend des cellules différenciées humaines ou animales. Les cellules différenciées ont préférentiellement été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes ou de cellules progénitrices, en particulier de cellules souches pluripotentes humaines ou de cellules progénitrices humaines, ou éventuellement à partir de cellules humaines non pluripotentes dont le profil transcriptionnel a été modifié artificiellement pour rejoindre celui de cellules différenciées particulières, typiquement par expression forcée de facteurs de transcriptions spécifiques du phénotype cellulaire cible. Préférentiellement, les cellules différenciées ont été obtenues à partir de cellules souches pluripotentes ou multi-

potentes ou progénitrices après mise en contact avec une solution capable d'initier la différenciation desdites cellules souches. Selon une variante, le contenu cellulaire du microcompartiment comprend des identités cellulaires homogènes ou mixtes.

- [0060] Les cellules différenciées peuvent en particulier se présenter sous forme d'un tissu ou micro-tissu en trois dimensions ou sous forme de plusieurs tissus ou micro-tissus dans le microcompartiment. Il peut s'agir d'un tissu ou micro-tissu compacté.
- [0061] Le microcompartiment selon l'invention peut comprend plusieurs types de cellules. En particulier un microcompartiment selon l'invention peut comprendre par exemple des cellules souches induites à la pluripotence et/ou des cellules multipotentes et/ou des cellules progénitrices et/ou des cellules différenciées.
- [0062] Si les cellules encapsulées dans le microcompartiment sont destinées à être utilisées en thérapie cellulaire chez l'être humain, les cellules peuvent être immuno-compatibles avec la personne destinée à les recevoir pour éviter tout risque de rejet.
- [0063] Les cellules présentes dans le microcompartiment sont porteuses de peu, voire d'aucune mutation fonctionnelle. Selon l'invention moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation, en particulier au moins une mutation fonctionnelle, génétique ou épigénétique.
- [0064] L'invention vise en particulier les microcompartiments dans lesquels moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation fonctionnelle, préférentiellement les microcompartiments dans lesquels moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation entraînant une modification du phénotype de la cellule mutante concernée.
- [0065] L'invention vise également les microcompartiments dans lesquels moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation permettant une expansion clonale des cellules qui devient dominante en culture.
- [0066] Selon une variante particulièrement adaptée, l'invention a pour objet un microcompartiment dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes sont des cellules présentant au moins une mutation choisie parmi les mutations oncogènes. Au moins une mutation est une mutation oncogène.
- [0067] Dans un mode de réalisation de l'invention, moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment sont des cellules présentant au moins une mutation du gène P53 et/ou une amplification de la région chromosomique 20q11.
- [0068] Préférentiellement, les cellules présentant au moins une mutation selon l'un quelconque des modes de réalisation de l'invention, représentent entre 0 et 15% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment, notamment entre 0 et 14%, entre 0 et 12%, en particulier entre 0 et 10%, encore plus préférentiellement

entre 0 et 8%, entre 0 et 5%, entre 0 et 2%.

- [0069] Le pourcentage de cellules mutantes parmi une population de cellules, peut être mesurée par différentes méthodes connues de l'homme du métier. Pour la détection de mutations ponctuelles des méthodes de séquençage à forte profondeur de lecture sont préférées ( Whole Genome sequencing, Exome sequencing, Amplicon, ...). Pour la détection des variants structuraux des méthodes à haute résolutions sont préférées (High resolution SNP array, optical genome mapping bionano, ...). Pour la détection des variants épigénétiques plusieurs outils peuvent être envisagés (RRBS methylation arrays, bisulfite sequencing/pyrosequencing, ...).
- [0070] Avantagement, les microcompartiments selon l'invention présentent un taux très faible de cellules mutantes, et ce après plusieurs cycles de division cellulaire. Les cellules selon l'invention sont en effet des cellules obtenues par amplification, à partir d'au moins une cellule.
- [0071] En effet, les cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention ont été obtenues après au moins deux cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins une cellule.
- [0072] De façon préférée, les cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention ont été obtenues après au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 28, 30 cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins 1 cellule, préférentiellement entre 1 et 5, entre 1 et 10, entre 1 et 15, entre 1 et 20, entre 1 et 30, entre 1 et 40, entre 1 et 50, entre 1 et 60, entre 1 et 100 cellules. Par exemple, les cellules présentes dans le microcompartiment ont été obtenues après au moins six cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins 1 cellule, préférentiellement entre 1 et 50 cellules.
- [0073] Préférentiellement le microcompartiment est obtenu après au moins 2 passages après l'encapsulation, plus préférentiellement au moins 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 passages. Chaque passage peut durer par exemple entre 2 et 15 jours, notamment entre 3 et 10 jours.
- [0074] De façon préférée le microcompartiment est obtenu après au moins une ré-encapsulation, plus préférentiellement entre 1 et 14 ré-encapsulations, notamment entre 2 et 7 ré-encapsulations. Très préférentiellement une ré-encapsulation correspond à un nouveau passage et chaque cycle d'encapsulation correspond à un passage.
- [0075] Préférentiellement la totalité des cellules encapsulées initialement dans le microcompartiment avant le premier cycle de division cellulaire représente un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées, plus préférentiellement inférieur à 40%, 30%, 20%, 10% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

- [0076] Ainsi, selon l'un mode de réalisation, les cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention ont été obtenues après au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 28, 30 cycles de division cellulaire, après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel de cellule(s) représentant un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées, plus préférentiellement inférieur à 40%, 30%, 20%, 10% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.
- [0077] Préférentiellement, dans le microcompartiment selon l'invention, les cellules représentent plus de 50% en volume par rapport au volume du microcompartiment, encore plus préférentiellement plus de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% en volume par rapport au volume du microcompartiment.
- [0078] Le microcompartiment selon l'invention comprend plusieurs cellules, préférentiellement au moins 20 cellules, encore plus préférentiellement au moins 100, au moins 500, au moins 1000, au moins 10000.
- [0079] En plus de la couche externe et des cellules, le microcompartiment selon l'invention peut comprendre d'autres éléments, en particulier :
- un milieu de culture, et/ou
  - au moins une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique.
- [0080] Le milieu de culture est un milieu adapté aux cellules présentes dans le microcompartiment selon les connaissances de l'homme du métier.
- [0081] La couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique contient préférentiellement des séquences peptidiques ou peptidomimétiques capables de se lier aux intégrines. Par solution aqueuse isotonique on entend une solution aqueuse présentant une osmolarité comprise entre 200 et 400 mOsm/L. Cette couche est préférentiellement située entre (a) la ou les couche(s) de cellules et/ou d'assise(s) de cellules, et (b) la couche externe en hydrogel.
- [0082] La couche intermédiaire peut être constituée d'éléments qui ont été ajoutés lors de la fabrication du microcompartiment et/ou d'éléments ajoutés dans le microcompartiment et/ou d'éléments sécrétés ou induits par les autres constituants du microcompartiment.
- [0083] La couche intermédiaire peut notamment comprendre ou être constituée par une matrice extracellulaire et/ou un milieu de culture. Si elle comprend de la matrice extracellulaire, il peut s'agir de matrice extracellulaire sécrétée par des cellules de la couche interne et/ou par de la matrice extracellulaire ajoutée au moment de la préparation/fabrication du microcompartiment.
- [0084] La couche intermédiaire comprend préférentiellement un mélange de protéines et de composés extracellulaires nécessaires à la culture des cellules en cours de différenciation. Préférentiellement, la couche intermédiaire comprend des protéines structurales, telles que du collagène, des laminines, de l'entactine, de la vitronectine, ainsi

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

- [0085] Selon une variante, la couche intermédiaire peut former un gel.
- [0086] Au niveau de la surface de la couche intermédiaire en contact avec la couche interne de cellules humaines en cours de différenciation, la couche intermédiaire peut éventuellement contenir une ou plusieurs cellules.
- [0087] Préférentiellement la couche intermédiaire présente un module d'Young compris entre 0,05 et 3 kDa. Le module d'Young peut être mesuré par toute méthode connue de l'homme du métier, en particulier par mesure de la rhéologie de gels de même composition que la couche intermédiaire ou bien par AFM (microscopie à force atomique).
- [0088] Une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique, préférentiellement de matrice extracellulaire, avec de telles valeurs de module d'Young permettent d'améliorer le maintien du phénotype cellulaire et l'intégrité génomique des cellules contenues dans cette couche intermédiaire pendant les divisions cellulaires.
- [0089] Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le microcompartiment comprend également au moins une lumière ou lumen. De façon préférée, le microcompartiment comprend une lumière interne. Le microcompartiment selon l'invention peut aussi éventuellement comprendre plusieurs lumières. La ou les lumières peuvent contenir un liquide, notamment du milieu de culture et/ou un liquide sécrété par les cellules. Avantageusement la présence de cette partie creuse permet aux cellules de disposer d'un petit volume diffusif dont elles peuvent contrôler la composition, favorisant une communication cellulaire.
- [0090] Dans une variante de l'invention, le microcompartiment comprend successivement, organisées autour d'une lumière :
- au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, préférentiellement des cellules épithéliales, en particulier des cellules souches et notamment des souches pluripotentes induites humaines ou animales.
  - une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique, préférentiellement une couche de matrice extracellulaire ;
  - une couche externe en hydrogel.
- [0091] Dans cette variante, la couche interne de cellules au sein du microcompartiment selon l'invention est creuse. Cet agencement tridimensionnel en monocouche ou assise épithélial sphérique entourant un lumen central peut être également appelé un cyste. La ou les lumières est (sont) préférentiellement générée(s), au moment de la formation du cyste, par les cellules qui se multiplient et se développent sur la couche de matrice ex-

tracellulaire.

- [0092] La conformation sous forme de cyste permet de réduire les pressions subies par les cellules souches par rapport aux cultures 2D ou en agrégats. Cette configuration permet de diminuer la mortalité cellulaire, d'augmenté le facteur d'amplification de la culture. Par conséquence cela permet de réduire le nombre de passages et dissociation nécessaire ; de réduire le temps en culture nécessaire pour atteindre le nombre de cellules final nécessaire. Collectivement ces améliorations participent aussi au maintien de l'intégrité génétique des cellules souches dans les microcompartiments.
- [0093] Le microcompartiment cellulaire selon l'invention est clos ou partiellement clos, c'est à dire que la couche externe est close ou partiellement close. Préférentiellement le microcompartiment est clos.
- [0094] Le microcompartiment selon l'invention peut se présenter sous toute forme en trois dimensions, c'est-à-dire qu'il peut avoir la forme de tout objet de l'espace. Le microcompartiment peut avoir n'importe quelle forme compatible avec l'encapsulation de cellules. Préférentiellement le microcompartiment selon l'invention se présente sous une forme sphérique ou allongée. Il peut avoir la forme d'un ovoïde, d'un cylindre, d'un sphéroïde ou d'une sphère. Il peut en particulier se présenter sous la forme d'un sphéroïde creux, d'un ovoïde creux, d'un cylindre creux ou d'une sphère creuse.
- [0095] C'est la couche externe du microcompartiment, c'est-à-dire la couche d'hydrogel, qui confère sa taille et sa forme au microcompartiment selon l'invention. Préférentiellement la plus petite dimension du microcompartiment selon l'invention est comprise entre 10  $\mu\text{m}$  et 1 mm, préférentiellement entre 100  $\mu\text{m}$  et 700  $\mu\text{m}$ . Elle peut être comprise entre 10  $\mu\text{m}$  et 600  $\mu\text{m}$ , notamment entre 10 $\mu\text{m}$  et 500  $\mu\text{m}$ .
- [0096] Sa plus grande dimension est préférentiellement supérieure à 10 $\mu\text{m}$ , plus préférentiellement comprise entre 10 $\mu\text{m}$  et 1m, encore plus préférentiellement entre 10 $\mu\text{m}$  et 50cm.
- [0097] Le microcompartiment selon l'invention contient des cellules dont l'intégrité génomique a été préservée et/ ou maintenu, un très faible pourcentage de cellules présentes dans le microcompartiment étant porteuses de mutantes. Il peut être utilisé pour toute application, en particulier comme médicament en thérapie cellulaire chez l'homme ou l'animal.
- [0098] Le microcompartiment selon l'invention peut être éventuellement congelé pour être stocké. Il devra ensuite être décongelé avant son utilisation.
- [0099] L'invention a également pour objet plusieurs microcompartiments ensemble.
- [0100] Aussi, l'invention vise aussi un ensemble ou une série de microcompartiments cellulaires tels que décrits précédemment comprenant au moins deux microcompartiments cellulaires selon l'invention.
- [0101] L'invention vise aussi un ensemble ou une série de microcompartiments d'au moins

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

- [0102] Un autre objet particulier de l'invention est un ensemble ou série d'au moins deux microcompartiments cellulaires en trois dimensions, chaque microcompartiment comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, dans lequel moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments de l'ensemble sont des cellules présentant au moins une mutation. Préférentiellement, les cellules présentant au moins une mutation représentent entre 0 et 15% de la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments, notamment entre 0 et 14%, entre 0 et 12%, en particulier entre 0 et 10%, encore plus préférentiellement entre 0 et 8%, entre 0 et 5%, entre 0 et 2%. De façon préférée, au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'invention.
- [0103] Ainsi un ou plusieurs microcompartiments de la série peut comprendre plus de 20% de cellules mutantes en nombre par rapport au nombre de cellules présentes dans le ou lesdits microcompartiments, mais pour la totalité des microcompartiments formant l'ensemble de microcompartiments selon l'invention, moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments de l'ensemble sont des cellules présentant au moins une mutation. Préférentiellement, au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'invention.
- [0104] De façon préférée, les cellules présentes dans les microcompartiments de l'ensemble de microcompartiments selon l'invention ont été obtenues après au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 28, 30 cycles de division cellulaire après l'encapsulation dans une couche externe d'hydrogel d'au moins 1 cellule par microcompartiment. Le ou les microcompartiments présents dans cet ensemble de microcompartiments peuvent présenter une ou plusieurs caractéristiques d'un microcompartiment selon l'invention (taille, forme, nombre de cellules, volume de cellules, couche intermédiaire, lumière, etc.).
- [0105] L'ensemble de microcompartiments selon l'invention comprend préférentiellement entre 2 et  $10^{16}$  microcompartiments.
- [0106] De façon préférée la série de microcompartiments selon l'invention est dans un milieu de culture, en particulier dans un milieu de culture au moins partiellement convectif.
- [0107] Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, l'invention a pour objet une série de microcompartiments cellulaires dans une enceinte close, telle qu'un bioréacteur, préférentiellement dans un milieu de culture dans une enceinte close, telle

qu'un bioréacteur.

[0108] La présence d'une couche externe d'hydrogel et éventuellement d'une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique permet une distribution uniforme des cellules entre les microcompartiments. Par ailleurs cette couche d'hydrogel permet d'éviter les fusions de microcompartiments qui sont une source majeure de variabilité défavorable pour l'homogénéité phénotypique des cellules.

[0109] Procédé d'obtention de microcompartiments selon l'invention

[0110] L'invention vise également un procédé de préparation de microcompartiments selon l'invention.

[0111] Le procédé de préparation d'un microcompartiment ou d'un ensemble de microcompartiments selon l'invention, peut comprendre au moins la mise en œuvre des étapes qui consistent à :

- (a) préparer une suspension de cellules comprenant des cellules uniques et/ou au moins un ensemble de cellules dans un milieu isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,

- (b) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;

- (c) préférentiellement cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique (préférentiellement un milieu de culture) contenant un inhibiteur de l'apoptose ;

- (d) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;

- (e) cultiver les microcompartiments dans une solution isotonique, préférentiellement un milieu de culture, pendant au moins deux cycles de division cellulaire, et

- (f) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

[0112] L'invention vise aussi l'utilisation de ce procédé pour maintenir l'intégrité génomique des cellules encapsulées.

[0113] Dans le procédé selon l'invention la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b) représentent un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées, plus préférentiellement inférieur à 40%, 30%, 20%, 10% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.

[0114] L'inhibiteur de l'apoptose peut par exemple être un ou plusieurs inhibiteur(s) des voies RHO/ROCK (« Rho-associated protein kinase »), ou tout autre inhibiteur de l'apoptose connu de l'homme du métier. L'inhibiteur de l'apoptose doit permettre de promouvoir la survie des cellules, et dans le cas de la présence d'une matrice extracellulaire, leur adhérence des cellules à la matrice extracellulaire au moment de la formation de la couche externe d'hydrogel autour de ladite matrice extracellulaire.

[0115] Le procédé selon l'invention peut comprendre une préalablement ou simultanément à l'étape (a), une étape de dissociation des cellules par une dissociation chimique, en-

zymatique ou mécanique. Cette étape est particulièrement importante dans le cas de cellules adhérentes.

- [0116] Les cellules encapsulées sont en suspension sous forme de cellules uniques et/ou d'amas ou ensemble(s) de cellule(s) (« cluster(s) »). De façon préférée, les cellules uniques représentent moins de 50% en nombre de la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b). En effet il est préférable d'encapsuler des amas de cellules car cela diminue la déségrégation chromosomique et par conséquent diminue l'apparition de nouvelles mutagenèses et participe au maintien l'intégrité génomique des cellules.
- [0117] Préférentiellement chaque amas de cellules encapsulé initialement à l'étape (b) a une plus grande dimension inférieure à 20% de la plus grande dimension d'un microcompartiment dans lequel il est encapsulé, encore plus préférentiellement inférieure à 10%. En effet les amas de cellules ne doivent pas avoir une trop grande taille par rapport à la taille du microcompartiment car un dimension trop grande de ces amas cellulaires initiaux, pourrait entraîner, lors des divisions cellulaires, une confluence cellulaire plus précoce dans la capsule ; cette confluence trop précoce de toute ou partie des capsules, pourrait entraîner une augmentation des pressions intracellulaires et entraîner un stress cellulaire, impactant notamment la ségrégation chromosomique.
- [0118] Selon une variante, le procédé selon l'invention peut comprendre une étape de mélange des cellules à une matrice extracellulaire, soit entre l'étape (a) et l'étape (b), soit simultanément à l'encapsulation à l'étape (b).
- [0119] Très préférentiellement, les étapes (c), (d) et (e) sont mises en œuvre sous agitation permanente ou séquentielle. Cette agitation est importante car elle maintient l'homogénéité de l'environnement de culture et évite la formation de tout gradient diffusif. Par exemple, elle permet un contrôle homogène de niveau d'oxygénation cellulaire ; évitant ainsi les phénomènes de nécrose lié à l'hypoxie, ou de stress oxydatif lié à l'hyperoxie. En évitant une augmentation de la mortalité cellulaire et/ou du stress oxydatif, l'agitation participe au maintien de l'intégrité génétique.
- [0120] Le procédé selon l'invention est préférentiellement mis en œuvre d'une enceinte close tel qu'un bioréacteur clos.
- [0121] Le nombre cycles de divisions cellulaires à l'étape (e) est d'au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 cycles de division cellulaire.
- [0122] Préférentiellement le microcompartiment est obtenu après au moins 2 passages ( un passage correspondant ici à un cycle complet des étapes (a), (b), et (e), optionnellement (c) et (d)), plus préférentiellement au moins 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 passages. Chaque passage peut durer par exemple entre 2 et 15 jours, notamment entre 3 et 8 jours.
- [0123] Dans une variante préférée, le procédé selon l'invention comprend au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (e), c'est-à-dire au moins deux cycles

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

[0124] Dans un procédé selon l'invention il peut y avoir plusieurs ré-encapsulation, préférentiellement entre 1 et 100, notamment entre 1 et 10 ré-encapsulation.

[0125] Chaque ré-encapsulation peut comprendre :

- une étape qui consiste à dissocier le microcompartiment ou la série de microcompartiments pour obtenir une suspension de cellules ou une suspension d'amas de cellules ; l'élimination de la couche externe en hydrogel peut être réalisée notamment par hydrolyse, dissolution, perçage et/ou rupture par tout moyen biocompatible, c'est-à-dire non toxique pour les cellules. Par exemple, l'élimination peut être réalisée en utilisant un tampon phosphate salin, un chélateur d'ions divalents, une enzyme comme l'alginate lyase si l'hydrogel comprend de l'alginate et/ou la microdissection laser, et
- une étape de ré-encapsulation de tout ou partie des cellules ou amas de cellules dans une capsule d'hydrogel.

[0126] La ré-encapsulation est un moyen adapté pour une augmentation de l'amplification cellulaire obtenue depuis l'étape pluripotente, et diminuer les risques de mutation.

[0127] Selon un mode de réalisation la ré-encapsulation comprend les étapes suivantes :

- (i)  liminer la couche externe en hydrogel,
- (ii) remettre en suspension les cellules qui étaient contenues dans le microcompartiment de façon à obtenir des cellules uniques et/ou au moins un ensemble ou amas de cellules dans un milieu isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,
- (iii) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;
- (iv) préférentiellement cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique contenant un inhibiteur de l'apoptose , préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose ;
- (v) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;
- (vi) cultiver les microcompartiments dans une solution isotonique, préférentiellement un milieu de culture, pendant au moins un cycle de division cellulaire, et
- (vii) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

[0128] La compartimentalisation dans des microcompartiments permet d'éliminer les microcompartiments contenant d'avantage de cellules mutées que les autres capsules. Même si les cellules mutées ont une croissance rapide elles vont atteindre la confluence

capsulaire qui va contenir leur multiplication. La compartimentalisation permet aussi de ne pas contaminer l'intégralité de la population cellulaire, et également d'éliminer les capsules contenant des cellules mutantes, à tout moment, en particulier avant une étape de ré-encapsulation. Ce tri peut être fait soit par analyse en ligne, soit par élimination des capsules remplies plus rapidement que les autres par exemple. Ainsi, le procédé selon l'invention peut comprendre une ou plusieurs étapes d'élimination des microcompartiments comportant des cellules mutantes, en particulier des microcompartiments comprenant plus de 20% de cellules mutantes.

- [0129] Selon une variante de l'invention, les cellules sont des cellules souches pluripotentes organisées en cystes directement à partir de cellules souches pluripotentes, ou à partir de cellules différenciées qui seront reprogrammées en cellules pluripotentes à l'intérieur de la capsule d'hydrogel lors de la formation des microcompartiments.
- [0130] L'incubation de l'étape (a) et/ou (ii) est conduite préférentiellement pendant un temps compris entre quelques minutes et quelques heures, préférentiellement entre 2 minutes et 2 heures, plus préférentiellement entre 10 minutes et 1 heure.
- [0131] L'étape (c) et/ou (iv) de culture avec un inhibiteur de l'apoptose est conduite pendant un temps compris entre 2 et 48 heures, préférentiellement pendant un temps compris entre 6 et 24 heures, plus préférentiellement pendant un temps compris entre 12 et 18 heures.
- [0132] L'étape de rinçage peut être réalisée par un ou plusieurs rinçages, dans des milieux de culture successifs exempts d'inhibiteurs des voies RHO/ROCK, moins de 48h, préférentiellement moins de 24 heures, plus préférentiellement entre 12 et 18 heures après le début de l'étape (c) et/ou (iv).
- [0133] Dans un mode de mise en œuvre, au moins une des étapes (préférentiellement toutes les étapes) est réalisée à une température adaptée à la survie des cellules, comprise entre 4 et 42°C. La température lors de la prolifération cellulaire doit être préférentiellement entre 32 et 37°C pour éviter de déclencher des mutations en baissant la performance des enzymes de réparation. De même, de façon préférée, la température doit être basse (idéalement environ 4°C) pour gérer le stress des cellules à l'étape (b).
- [0134] Selon une variante, les agents de reprogrammation cellulaire peuvent être ajoutés à l'étape (a) et/ou (b) et/ou (c) et/ou (ii) et/ou (iii) et/ou (iv). Préférentiellement il s'agit d'agents de reprogrammation cellulaire non perméants vis-à-vis de la couche d'hydrogel. L'ajout d'agents de reprogrammation est particulièrement pertinent lorsque les cellules encapsulées initialement sont des cellules différenciées que l'on veut dédifférencier notamment jusqu'au stade pluripotent. L'homme du métier sait procéder à la reprogrammation d'une cellule différenciée en une cellule souche en réactivant l'expression des gènes associés au stade embryonnaire au moyen de facteurs spécifiques, désignés dans la présente invention comme « agents de repro-

grammation ». A titre d'exemples, on peut citer les méthodes décrites dans Takahashi *et al.*, 2006 (« Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors » *Cell*, 2006 Vol 126, pages 663-676), Ban *et al.*, 2009 (« Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome » *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009; 85(8):348-62) et dans la demande internationale WO2010/105311 ayant pour titre « Production of reprogrammed pluripotent cells ». Les agents de reprogrammation sont avantageusement co-encapsulés avec les cellules différenciées, de manière à concentrer le produit et à favoriser le contact avec l'ensemble des cellules. Dans le cas d'agents de reprogrammation perméants à la couche d'hydrogel, il est possible d'ajouter lesdits agents dans le milieu de culture après l'étape d'encapsulation. Les agents de reprogrammation permettent d'imposer aux cellules une succession de changements phénotypiques jusqu'au stade pluripotent. Avantageusement, l'étape de reprogrammation est réalisée en utilisant des milieux de culture spécifiques, favorisant ces changements phénotypiques. Par exemple, les cellules sont mis en culture dans un premier milieu comprenant 10% de sérum humain, ou bovin, dans un milieu minimum essentiel de Eagle (DMEM) supplémenté avec un inhibiteur des récepteurs sérine/thréonine protéine kinase (tel que le produit SB-431542 (C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>)), un ou plusieurs inhibiteurs des voies RHO/ROCK (« Rho-associated protein kinase »), tels que du thiazovivin et/ou Y-27632, des facteurs de croissance des fibroblastes, tel que du FGF-2, de l'acide ascorbique et des antibiotiques, tels que la Trichostatin A (C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Puis le milieu de culture est remplacé par du milieu favorisant la multiplication des cellules pluripotentes, tel que le milieu mTeSR®1.

[0135] À tout moment, le procédé selon l'invention peut comprendre une étape consistant à vérifier le phénotype des cellules contenues dans le microcompartiment. Cette vérification peut être réalisée en identifiant l'expression par au moins une partie des cellules contenues dans le microcompartiment, d'au moins un gène spécifique du phénotype recherché.

[0136] Les microcompartiments cellulaires obtenus selon les procédés de l'invention peuvent ensuite être congelés avant toute utilisation. La congélation est préférentiellement réalisée à une température comprise entre -190°C et -80°C. La décongélation peut être réalisée dans un bain d'eau tiède (37 degrés préférentiellement) pour que les cellules décongèlent assez rapidement. Les microcompartiments selon l'invention avant leur utilisation peuvent être maintenus à plus de 4°C pendant une durée limitée avant leur utilisation, préférentiellement entre 4°C et 38°C.

[0137] Le procédé selon l'invention, avec ses caractéristiques particulières permet de maintenir l'intégrité génomique des cellules pendant la culture, les microcom-

partiments finaux présentant des cellules porteuses de peu ou pas de mutation.

- [0138] En particulier La structure en 3 dimensions des cellules dans le microcompartiment et le pourcentage faible voir nul de cellules isolées lors de l'encapsulation (la majorité des cellules étant encapsulées sous forme d'amas de cellules), diminue la déségrégation chromosomique et par conséquent diminue l'apparition de nouvelles mutagenèses.
- [0139] L'invention favorise aussi l'amplification avec un facteur d'amplification élevé, ce qui par conséquent diminue le temps de culture et le nombre de divisions pour obtenir un nombre de cellules très important, et limite donc de nouvelles mutagenèses.
- [0140] La protection des cellules grâce à la couche externe et la présence de matrice extracellulaire lorsqu'elle est présente diminue déségrégation chromosomique et limite le stress mécanique des cellules, et par conséquent diminue l'apparition de nouvelles mutagenèses.
- [0141] Le contrôle des paramètres de culture en bioréacteur diminue aussi le stress oxydatif ce qui participe à la diminution de nouvelles mutagenèses.
- [0142] Aussi, l'invention a également pour objet l'utilisation d'un procédé selon l'invention pour maintenir l'intégrité génomique de cellules lors de leur amplification.
- [0143] L'invention est à présent illustrée par un exemple et des résultats comparatifs
- [0144] Cet exemple concerne la culture de cellules souches pluripotentes humaines, et plus particulièrement de cellules souches pluripotentes humaines induites (iPS).
- [0145] PROTOCOLE :
- [0146] La lignée cellulaire utilisée ici, nommé iPS-IMAGINE005 a été générée et préalablement décrite lors de cet article : E. *Quelennec*, C. *Banal*, M. *Hamlin*, D. *Clémantine*, M. *Michael*, N. *Lefort*, E. *Quelennec*, C. *Banal*, M. *Hamlin*, D. *Clémantine*, M. *Michael*, N. *Lefort*, *Generation of two induced pluripotent stem cell lines IMAGINi004-A and IMAGINi005-A from healthy donors. Stem Cell Research, 101959 (2020)*. Les PBMC ont été transduites à l'aide du kit de reprogrammation CytoTune-iPS 2.0 Sendai (ThermoFisher Scientific) en suivant les instructions du fabricant. Après 2 à 3 semaines, les colonies ont été prélevées manuellement et développées au moins 10 fois.
- [0147] La lignée id'iPS a été générée selon les standards habituels de la culture iPS en 2 dimensions. Afin de monitorer l'émergence quasi inévitable de mutation lors de la culture prolongée de cette lignée, une surveillance du caryotype est effectuée régulièrement (tous les 5 à 10 passages). Afin de pouvoir reprendre une culture sans mutation de cette lignée, des échantillons cellulaires sont congelés tous les 5 passages.
- [0148] L'expérience menée ici, a pour point de départ un échantillon cellulaire congelé d'iPS, passage 2D numéro 23 post reprogrammation. A ce stade de culture et pour cet échantillon, les tests caryotypiques hautes résolutions n'ont pas été capables de détecter

une amplification de la région chromosomique 20q11, mais il a été constaté que la culture brève (moins de 10 passages 2D) de cet échantillon entraîne l'émergence d'une mutation par amplification de la région chromosomique 20q11.

- [0149] Ce point de départ cellulaire est particulièrement pertinent pour tester la sélection positive au cours du temps d'un clone mutant dans une population de cellules en culture.
- [0150] En effet, la mutation par amplification de la région chromosomique 20q11 confère un avantage de croissance au clone muté ; plus la pression de sélection du système de culture sera élevée, plus ce clone aura de risque d'être sélectionné rapidement et de devenir majoritaire.
- [0151] Nous avons comparé notre système de culture encapsulée en suspension agitée (ci-après désignée par le terme « Invention ») à deux systèmes de culture standards dans le domaine de la production de cellules souches pluripotentes : la culture en 2 dimensions (ci-après désignée par le terme « culture 2D ») et la culture en suspension agitée non protégée sous forme d'agrégats (ci-après désignée par le terme « Bioréacteur agrégats »).
- [0152] Le même échantillon initial (décrit précédemment plus haut et cultivé en 2D), a été utilisé pour initier une culture de 28 jours, en parallèle de 3 bras expérimentaux associés aux 3 systèmes de cultures comparées. A chaque passage, de chaque bras expérimental des cellules sont échantillonnées pour permettre la réalisation de tests génétiques (cf. partie analytique). En particulier, la fréquence de la mutation par amplification de la région chromosomique 20q11 est évaluée à l'initiation et à la fin de cette culture prolongée de 28 jours.
- [0153] Le rythme des passages pour chaque système de culture suit scrupuleusement les recommandations optimales pour chaque condition. Ainsi les cultures 2D sont passées tous les 4 à 5 jours lorsque la confluence est comprise entre 70 et 90% ; les cultures en agrégats sont passées tous les 5 jours selon les recommandations du fournisseur (Minibio, ABLE® Bioreactor Systems) ; les cultures encapsulées sont passées tous les 7 jours lorsque la confluence capsulaire moyenne est comprise entre 50 et 100%
- [0154] Toutes les cultures décrites ci-après sont menées avec le milieu de culture mTeSR 1 (« stem cell technologies »), Un traitement par inhibiteur Rock à 10µM est initié pendant les 24 premières heures après passage.
- [0155] Toutes les cultures (2D, Bioréacteur agrégats et Invention) sont maintenues dans un incubateur de culture cellulaire à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.
- [0156] Les 2 bras expérimentaux cultivant des cellules souches en suspension « Bioréacteur agrégats » et « Invention » utilisent des mini bioréacteur de 30ml de marque Minibio, ABLE® Bioreactor Systems ; la vitesse d'agitation étant constante a été fixée à 35 rotations par minute depuis l'ensemencement jusqu'à la collecte des cellules.

- [0157] Les 2 bras expérimentaux cultivant des cellules souches sous forme de regroupements de cellules tridimensionnels en suspension « bioréacteur agrégats » et « Invention » utilisent une dissociation enzymatique pour les passages successifs : les agrégats d'une part et les cystes encapsulés d'autre part sont dissociés par utilisation d'un bain de TrypLE pendant 20 minutes à 37°. Les cellules et petits regroupements (amas) de cellules résultant de cette dissociation servent ensuite à ensemercer une nouvelle culture.
- [0158] Le passage d'une culture en agrégats à la suivante, est réalisée par dissociation enzymatiques des agrégats.
- [0159] Pour les cultures utilisant une matrice extracellulaire du matrigel (Corning) est utilisé. Ainsi pour les cultures 2D, les flasques standard (T-Flask T75) sont préalablement cotées avec du matrigel ; pour les encapsulations ou ré-encapsulations les cellules sont mélangées au matrigel avant injection dans la voie microfluidique centrale ; la culture en agrégats ne requiert pas quant à elle l'utilisation de matrice extracellulaire.
- [0160] La « culture 2D » est établie dans des flasques standard (T-Flask T75) préalablement coatés/tapissée avec du matrigel, la concentration cellulaire d'ensemencement est comprise entre 10000 et 30000 cellules par cm<sup>2</sup>. Les passages sont réalisés par la méthode des petits agrégats, par utilisation brève (inférieure à 5 minutes) d'un chélateur du calcium, RelesR (Stem cell technologies). Le milieu de culture est changé complètement à jour 1 pour enlever le traitement rock inhibiteur (volume constant).
- [0161] La culture « bioréacteur agrégats » est initiée avec la même suspension cellulaire servant à ensemercer la « culture 2D » et la culture « Invention » mais avec une concentration initiale de 175000 cellules par ml de milieux, pour un total de 20 ml de milieux. Le milieu de culture est changé complètement à jour 1 pour enlever le traitement rock inhibiteur (volume constant), puis 75% du milieux est renouvelé quotidiennement (volume constant de 20ml).
- [0162] Culture des hiPSC selon l'invention (encapsulation selon l'invention) :
- [0163] Avant l'encapsulation, les colonies de cellules souches 2D ont été détachées à l'aide de ReLeSR pendant 1 minute puis dissociées à l'aide d'Accutase (Stem Cell Technologies 07920). Les HiPSCs ont ensuite été mélangées dans un rapport de volume de 50/50 avec du Matrigel à 4°C pour maintenir la suspension à l'état liquide. La concentration finale de cellules dans la solution cellule/matrice était donc comprise entre 0,4 et 1,0×10<sup>6</sup> cellules viables/mL, appelée densité d'encapsulation. Des tubes d'éthylène tétrafluoroéthylène (ETFE,) sont connectés aux trois entrées d'un dispositif microfluidique à flux co-laminaire imprimé en 3D (à l'aide de l'imprimante DLP Micro Plus Hi-Res d'EnvisionTEC). Une pointe microcapillaire en verre extrudé et poli (d'un diamètre de de buse d'environ 100 µm pour la plupart des expériences ou un diamètre

de buse de 150  $\mu\text{m}$ ) est collée à la sortie de la buse pour un meilleur contrôle de l'écoulement. La suspension de cellules/matrice est chargée dans le canal interne du dispositif à 3 voies, qui est maintenu réfrigéré grâce à un système de refroidissement en ligne afin d'éviter une gélification prématurée du Matrigel. Une solution d'alginate de sodium (Novamatrix Pronova SLG100, 0,25 g à 2% dans de l'eau distillée) est injectée dans le canal extérieur. Pour éviter la gélification de l'alginate dans le dispositif microfluidique due à la libération de calcium par les cellules en suspension, une solution sans calcium (Sorbitol 300mM, Sigma-Aldrich 85529) est utilisée dans le canal intermédiaire de la puce de co-extrusion et sert de barrière contre la diffusion du calcium. Les débits pour les 3 solutions étaient de l'ordre de 120 ml/h pour les trois canaux : (solution d'alginate, la solution de sorbitol et la suspension cellule+matrice). À ces débits, la solution composite forme un jet liquide qui se fragmente en gouttelettes (d'environ deux fois la taille de la buse) en raison de l'instabilité spontanée de Rayleigh-Plateau. Pour éviter la coalescence ultérieure du train de gouttelettes, une pièce de charge en alginate et un anneau de cuivre sont connectés à un générateur de haute tension (2000V) sont introduits. Lorsque les gouttelettes composites entrent en contact avec le bain collecteur de calcium (à 100mM), la couche externe d'alginate se gélifie facilement. Par conséquent, la solution interne de cellules/matrice reste piégée à l'intérieur d'un microcompartiment fermé, sphérique et perméable. Dans la minute qui suit l'encapsulation, les capsules sont rincées avec du milieu (DMEM) pour réduire la concentration basale de calcium. Enfin, elles sont transférées dans un milieu de culture en suspension.

- [0164] Les passages du bras expérimentale « Invention » correspondent à des ré-encapsulation. Ces ré-encapsulations sont effectuées par dissolution des capsules d'alginate à l'aide d'un court rinçage rReleSR, suivie d'une dissociation cellulaire à l'aide de TrypLE (enzyme de dissociation à base de trypsine, ThermoFischer) pendant 20 minutes à 37°C. Ensuite, les cellules obtenues ont été traitées selon un protocole d'encapsulation selon l'invention.
- [0165] RESULTATS :
- [0166] 4 encapsulations successives, d'une durée de 7 jour chacune, ont été réalisés ([Fig.1]). 6 passages successifs ont été réalisés pour le bras « bioréacteur agrégats » et 7 passages successifs ont été réalisés pour le bras « culture 2D ». L'échantillonnage de cellules à chaque passage et à 28 jours a permis une évaluation comparative des 3 bras de culture au cours du temps ([Fig.1]).
- [0167] L'évaluation par microscopie a contraste de phase confirme la formation avec succès de colonies bi-dimensionnelles, d'agrégats et des cystes encapsulés de cellules souches comme il était attendu pour les bras « culture 2D » « bioréacteur agrégats » et « Invention » ([Fig.2a], 2b, 2c).

- [0168] A chaque passage, les cellules sont comptées par compteur cellulaire (Nucleo Counter NC 3000) ce qui permet d'établir les facteurs d'amplifications cellulaires au cours de la culture ([Fig.3]). Les amplifications théoriques cumulées sont de 151 millions, 71 millions et 13 330 respectivement pour les bras expérimentaux « Invention », « culture 2D » et « bioréacteur agrégats ». Ces facteurs d'amplifications cumulées correspondent à un nombre de divisions cellulaires apparents moyen en 28 jours de 27,2, 26,2 et 13,7 respectivement pour les bras de cultures « Invention », « culture 2D » et « bioréacteur agrégats ». On observe que l'amplification cellulaire finale est plus élevée dans le bras expérimental « Invention » comparée aux 2 autres bras expérimentaux.
- [0169] Les 3 systèmes de culture ont été menés avec succès selon les meilleurs standards, comme suggéré par les marqueurs de pluripotences OCT4 et NANOG similairement exprimés dans les 3 systèmes de cultures comparés ([Fig.4]).
- [0170] L'évaluation génétique a tout d'abord été réalisée par puce SNP très haute définition (CytoScan® HD Array Affymetrix, thermo fisher) ([Fig.5]) On observe l'apparition d'une mutation structurale (duplication chromosomique englobant la zone 20q11 et une délétion) au niveau du chromosome 20 clairement visualisable pour les échantillons finaux J28 des bras expérimentaux « culture 2D » (environ 50% de cellules mutantes) et « bioréacteur agrégats » (environ 50% de cellules mutantes). Les profils similaires des remaniements visibles pour ces 2 échantillons, indiquent qu'il ne s'agit pas d'événement indépendants et que cette mutation est héritée d'une antériorité commune. Ainsi, même si cette mutation est indétectable lors de l'échantillonnage initial, ceci suggère fortement sa présence à un pourcentage probablement inférieur à 1% à ce moment initial de l'expérience. Pour l'échantillon J28 du bras « Invention » on note une amplitude plus faible du nombre de copie, qui correspond à un pourcentage de cellules mutées en population inférieur à 10%.
- [0171] Des analyses par PCR digitale ont également été réalisées à chaque passage pour tous les bras expérimentaux pour détecter l'éventuelle apparition de mutations génétiques récurrentes pour les cellules souches pluripotentes (Test StemcellGenomics, iCS-digital PSC, 24 probes). Notamment, une sonde PCR de ce test nous a permis de quantifier au cours du temps le nombre de copie de la région chromosomique 20q11 ([Fig.6]). Le nombre moyen de copies de la région 20q11 augmente au cours du temps en culture pour les cellules des 3 bras expérimentaux. Cette augmentation est plus importante et plus rapide pour les bras « culture 2D » et « bioréacteur agrégats » comparée au bras « Invention ». Considérant que le nombre de copie de la région 20q11 pour chaque cellule mutante est de 3 (gain de 1 copie cf. [Fig.5]), un nombre moyen de copie inférieur à 2.2 correspond à un pourcentage de cellules mutantes dans la population de cellules inférieur à 20 %.

[0172] Au total, les résultats de PCR digitale et de puce SNP sont concordants et suggèrent que la sélection des cellules mutantes au cours des 28 jours de culture a été au moins 5 fois plus faible dans le bras « Invention » par rapport aux bras « culture 2D » et « bioréacteur agrégats » ([Fig.7]). Notamment, le système de culture encapsulé (invention), a permis de réaliser en moyenne 6,8 divisions cellulaires par passage, tout en maintenant le pourcentage de cellules mutantes inférieur à 20% pour chaque encapsulation, ou en mettant bout à bout les 4 encapsulations réalisées.

## Revendications

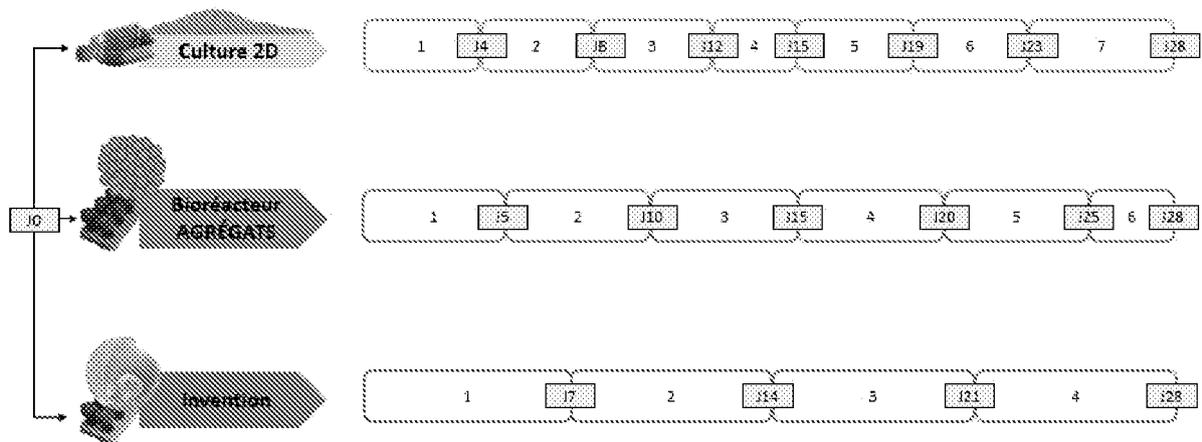
- [Revendication 1] Microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, à l'exclusion de cellules souches embryonnaires d'êtres humains, caractérisé en ce que moins de 20% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment sont des cellules présentant au moins une mutation.
- [Revendication 2] Microcompartiment selon la revendication 1, caractérisé en ce que les cellules représentent plus de 50% en volume par rapport au volume du microcompartiment, préférentiellement plus de 70% en volume par rapport au volume du microcompartiment.
- [Revendication 3] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la ou les mutation(s) sont choisies parmi les mutations génétiques et les mutations épigénétiques.
- [Revendication 4] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la ou les mutation(s) sont des mutations fonctionnelles.
- [Revendication 5] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'au moins une mutation est une mutation oncogène.
- [Revendication 6] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que moins de 20% des cellules sont des cellules présentant au moins une mutation du gène P53 et/ou au moins une mutation du gène 20q11.
- [Revendication 7] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules présentant au moins une mutation représentent entre 0 et 10% de la population totale de cellules présentes dans le microcompartiment, préférentiellement entre 0 et 5%.
- [Revendication 8] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules sont organisées sous forme d'un tissu ou d'un micro-tissu.
- [Revendication 9] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend une lumière interne.
- [Revendication 10] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend également au moins une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique entre (a) la ou les couche(s) de cellules et/ou la ou les assises de cellule(s) et (b) la couche d'hydrogel.

- [Revendication 11] Microcompartiment selon la précédente revendication, caractérisé en ce que la couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique est une couche de matrice extracellulaire.
- [Revendication 12] Microcompartiment selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce que la couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique présente un module d'Young compris entre 0,05 et 3 kDa.
- [Revendication 13] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules sont des cellules humaines ou animales.
- [Revendication 14] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend successivement organisées autour d'une lumière :
- au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules,
  - une couche intermédiaire de solution aqueuse isotonique,
  - une couche externe en hydrogel.
- [Revendication 15] Microcompartiment cellulaire selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que les cellules sont des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) humaines ou animales, et/ou des cellules multipotentes humaines ou animales, et/ou des cellules progénitrices humaines ou animales et/ou des cellules différenciées humaines ou animales.
- [Revendication 16] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il est clos.
- [Revendication 17] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la couche externe comprend de l'alginate.
- [Revendication 18] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il a la forme d'un ovoïde, d'un cylindre, d'un sphéroïde ou d'une sphère.
- [Revendication 19] Microcompartiment cellulaire selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 20 cellules, préférentiellement au moins 1000 cellules.
- [Revendication 20] Ensemble d'au moins deux microcompartiments cellulaires en trois dimensions, chaque microcompartiment comprenant au moins une couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe au moins une couche de cellules et/ou au moins une assise de cellules, à l'exclusion de cellules souches embryonnaires d'êtres humains, caractérisée en ce que moins de 20% des cellules constituant la population totale de cellules présentes dans tous les microcompartiments sont des cellules présentant au moins une mutation.

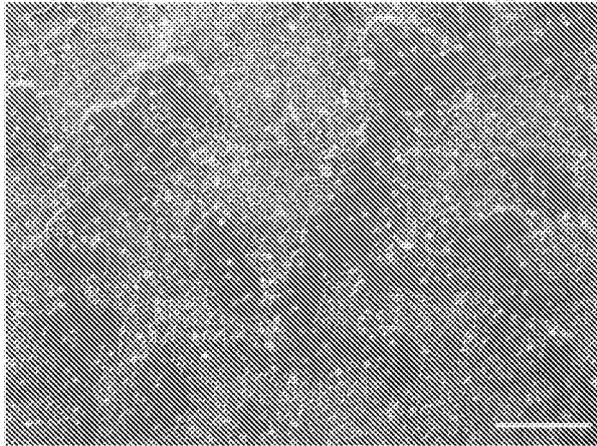
- [Revendication 21] Ensemble de microcompartiments selon la précédente revendication, caractérisé en ce qu'au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'une des revendications 1 à 21.
- [Revendication 22] Procédé de préparation d'un microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 1 à 19 ou d'un ensemble de microcompartiments cellulaires selon l'une des revendications 20 à 21, comprenant les étapes suivantes :
- (a) préparer une suspension de cellules comprenant des cellules uniques et/ou au moins un amas de cellules dans un milieu isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,
  - (b) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;
  - (c) préférentiellement cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique contenant un inhibiteur de l'apoptose ;
  - (d) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;
  - (e) cultiver les microcompartiments dans une solution isotonique pendant au moins deux cycles de division cellulaire, et
  - (f) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.
- ledit procédé étant caractérisé en ce que la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b) représentent un volume inférieur à 50% du volume du microcompartiment dans lequel elles sont encapsulées.
- [Revendication 23] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que chaque amas de cellules encapsulé initialement à l'étape (b) a une plus grande dimension inférieure à 20% de la plus grande dimension d'un microcompartiment dans lequel il est encapsulé.
- [Revendication 24] Procédé selon l'une des revendications 22 ou 23, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mélange des cellules à une matrice extracellulaire, soit entre l'étape (a) et l'étape (b), soit simultanément à l'encapsulation à l'étape (b).
- [Revendication 25] Procédé selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que les étapes (c), (d) et (e) sont mises en œuvre sous agitation permanente ou séquentielle.
- [Revendication 26] Procédé selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre dans un bioréacteur clos.
- [Revendication 27] Procédé selon l'une des revendications 22 à 26, caractérisé en ce que le

- procédé comprend au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (e).
- [Revendication 28] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que le procédé comprend entre 1 et 100 ré-encapsulations des cellules.
- [Revendication 29] Procédé selon l'une des revendications 27 ou 28, caractérisé en ce que chaque ré-encapsulation correspond à un passage.
- [Revendication 30] Procédé selon l'une des revendications 27 à 29, caractérisé en ce que la ré-encapsulation comprend les étapes suivantes :
- (i) éliminer la couche externe en hydrogel,
  - (ii) remettre en suspension les cellules qui étaient contenues dans le microcompartiment de façon à obtenir des cellules uniques et/ou au moins un amas de cellules dans un milieu isotonique, préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose,
  - (iii) encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;
  - (iv) préférentiellement cultiver les microcompartiments obtenus dans une solution isotonique contenant un inhibiteur de l'apoptose ;
  - (v) préférentiellement rincer les microcompartiments, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;
  - (vi) cultiver les microcompartiments dans une solution isotonique pendant au moins un cycle de division cellulaire, et
  - (vii) optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.
- [Revendication 31] Procédé selon l'une des revendications 22 à 30, caractérisé en ce que pour chaque microcompartiment, les cellules uniques représentent moins de 50% en nombre de la totalité des cellules encapsulées initialement à l'étape (b).
- [Revendication 32] Procédé selon l'une des revendications 22 à 31, caractérisé en ce que préalablement ou simultanément à l'étape (a), le procédé comprend une étape de dissociation des cellules par une dissociation chimique, enzymatique ou mécanique.
- [Revendication 33] Procédé selon l'une des revendications 22 à 32, caractérisé en ce qu'il comprend une ou plusieurs étapes d'élimination des microcompartiments comportant des cellules mutantes.

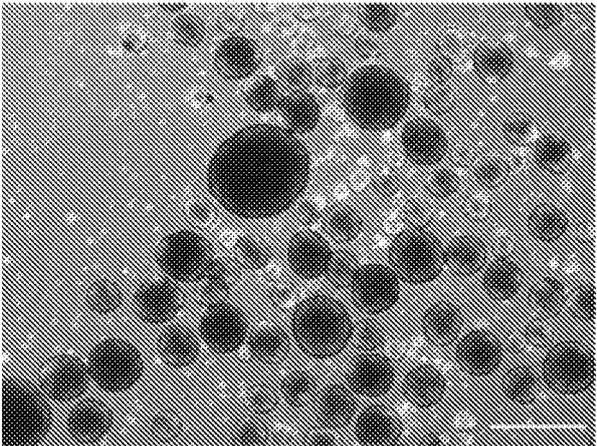
[Fig. 1]



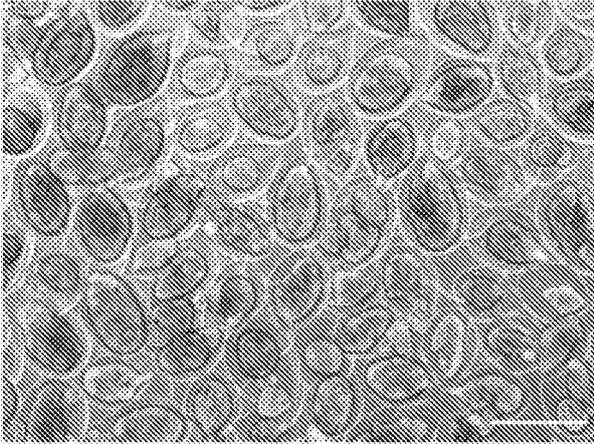
[Fig. 2a]



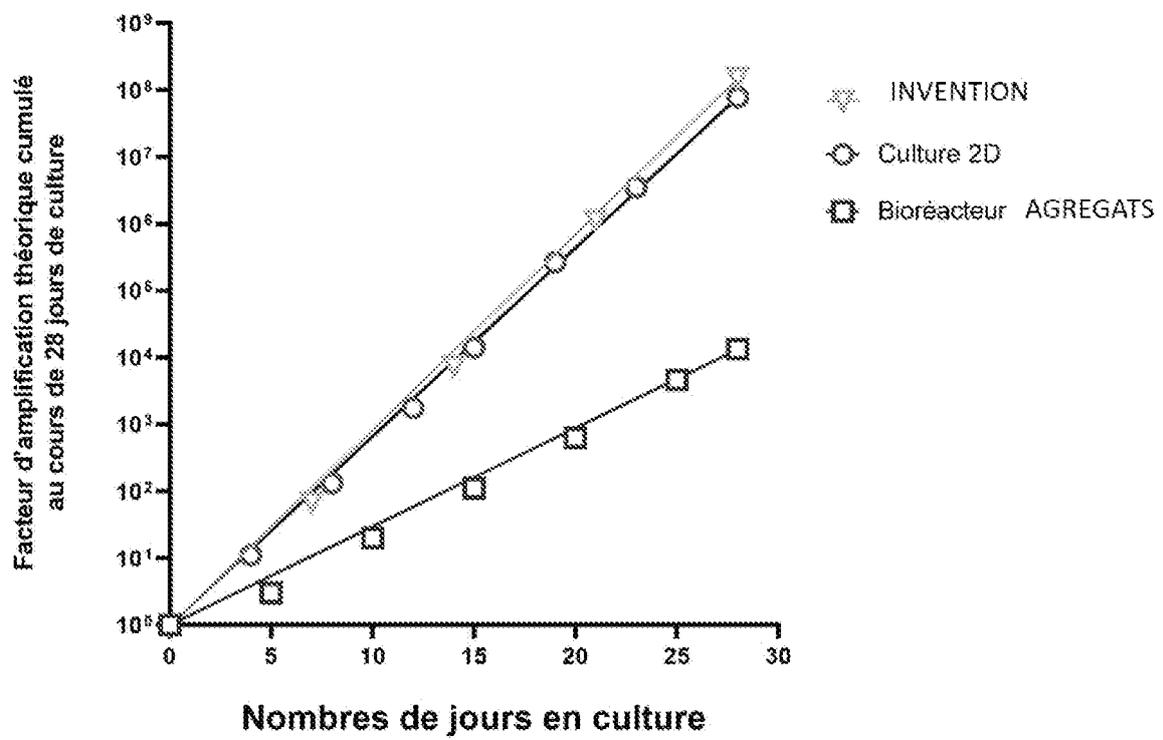
[Fig. 2b]



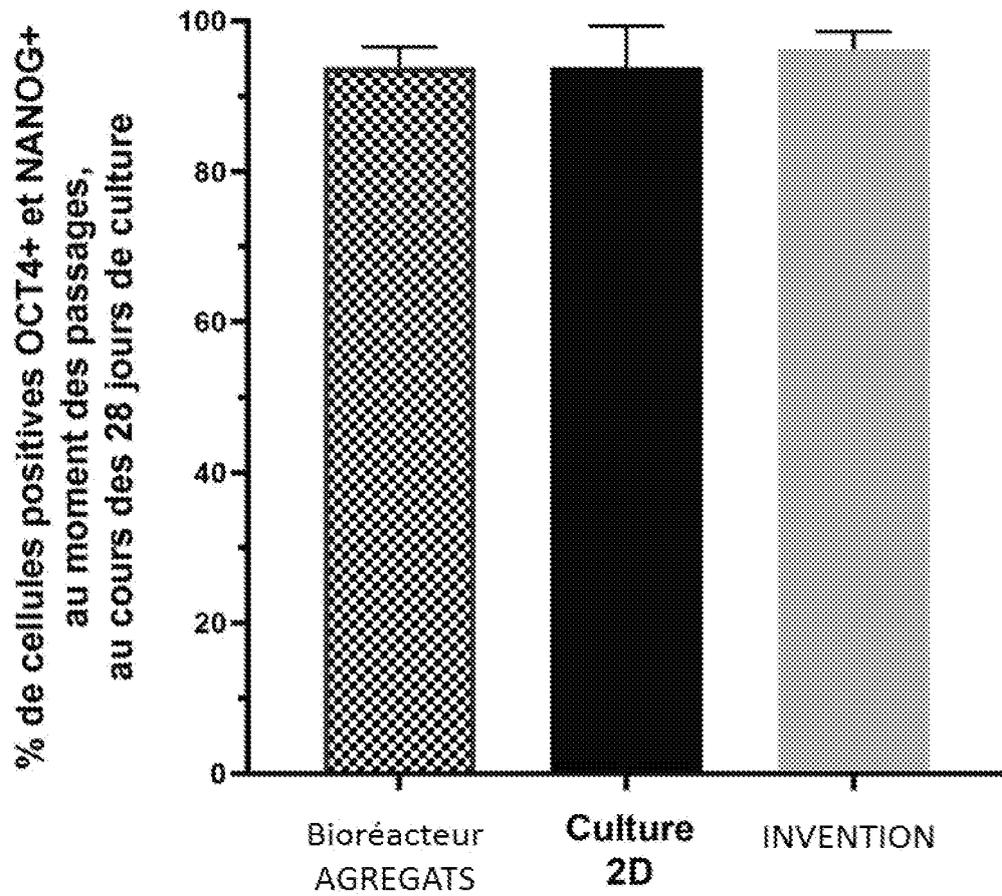
[Fig. 2c]



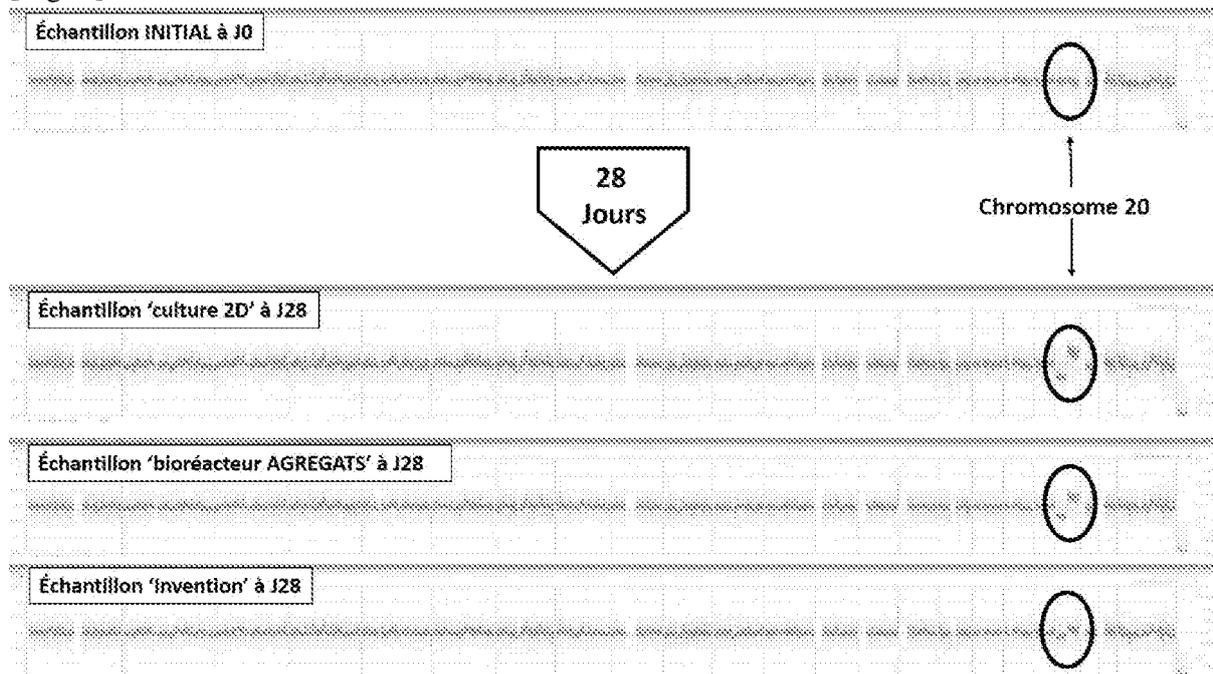
[Fig. 3]



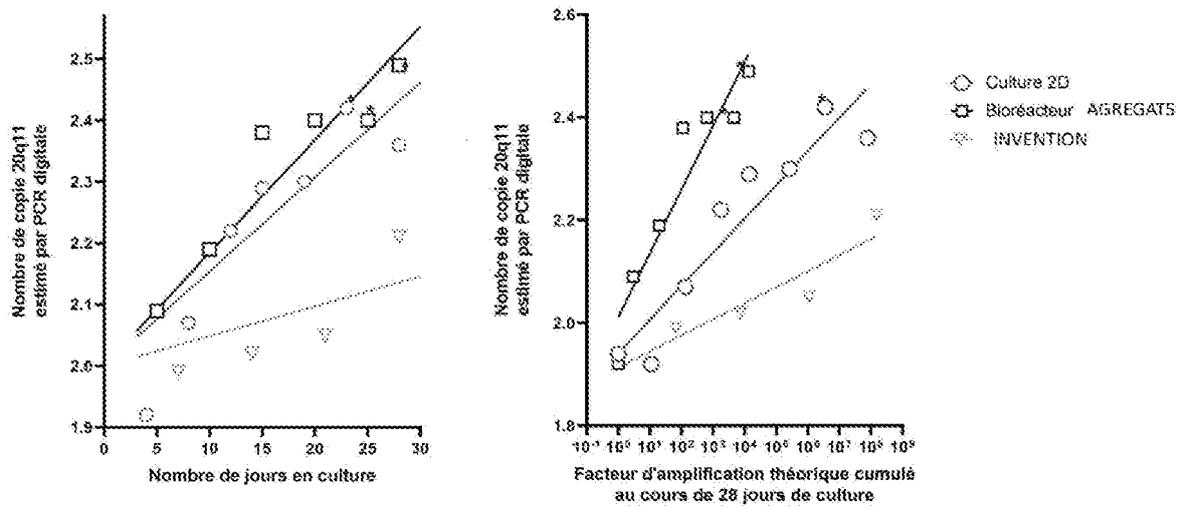
[Fig. 4]



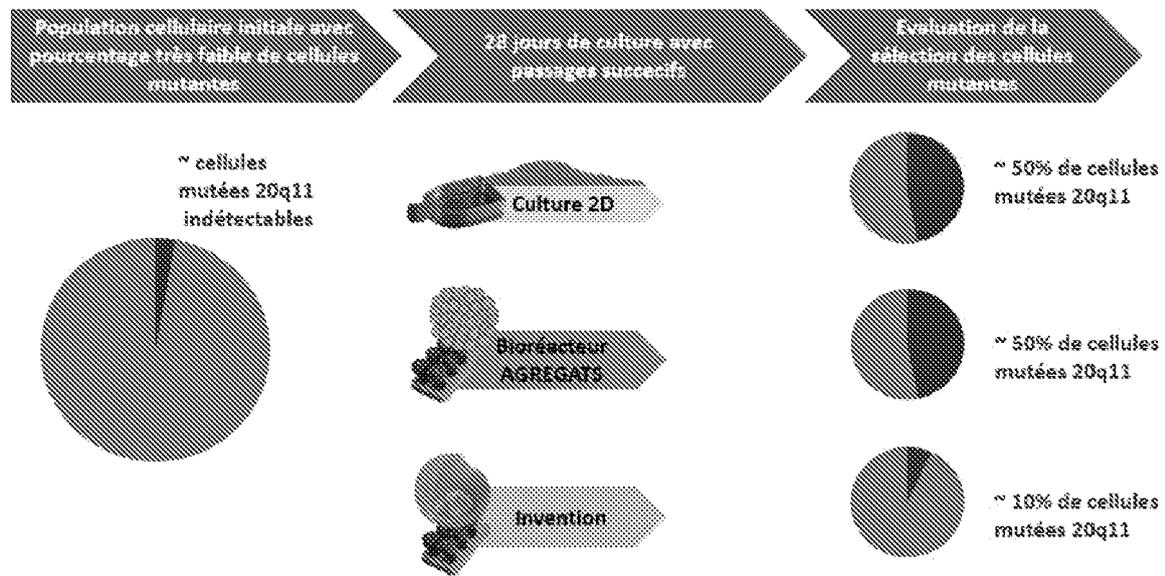
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

**FA 897297**  
**FR 2104988**

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2019/101734 A1 (UNIV BORDEAUX [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR] ET AL.) 31 mai 2019 (2019-05-31) * exemple 1 *	1-33	C12N5/07 C12N5/0735 A61K35/545 A61P43/00
X	SERRA MARGARIDA ET AL: "Microencapsulation Technology: A Powerful Tool for Integrating Expansion and Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells", PLOS ONE, vol. 6, no. 8, 5 août 2011 (2011-08-05), page e23212, XP055870675, DOI: 10.1371/journal.pone.0023212 * materiel et méthodes; figure 1; tableau 1 *	1-33	
X	JENNA L WILSON ET AL: "Stem cell microencapsulation for phenotypic control, bioprocessing, and transplantation", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, JOHN WILEY, HOBOKEN, USA, vol. 110, no. 3, 17 janvier 2013 (2013-01-17), pages 667-682, XP071052671, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.24802 * figure 2 *	1-33	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			C12N
		Date d'achèvement de la recherche <b>9 décembre 2021</b>	Examineur <b>Trommsdorff, Marion</b>
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

**FA 897297**  
**FR 2104988**

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
<b>T</b>	<p><b>Cohen Philippe J.R ET AL: "C-STEM: ENGINEERING NICHE-LIKE MICRO-COMPARTMENTS FOR OPTIMAL AND SCALE-INDEPENDENT EXPANSION OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS IN BIOREACTORS",</b>                       ,                      5 juillet 2021 (2021-07-05), XP055870386,                      DOI: 10.1101/2021.07.05.451086                      Extrait de l'Internet:                      URL:https://www.biorxiv.org/content/10.110                      1/2021.07.05.451086v1.full.pdf                      [extrait le 2021-12-08]                      * le document en entier *</p>		
<b>A</b>	<p><b>MARIANNE P. HENRY ET AL: "The Genomic Health of Human Pluripotent Stem Cells: Genomic Instability and the Consequences on Nuclear Organization", FRONTIERS IN GENETICS, vol. 9, 21 janvier 2019 (2019-01-21), XP055707603, DOI: 10.3389/fgene.2018.00623 * le document en entier *</b></p>	1-33	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
<b>A</b>	<p><b>LEFORT NATHALIE ET AL: "Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 26, no. 12, 23 novembre 2008 (2008-11-23), pages 1364-1366, XP055870711, New York ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1509 Extrait de l'Internet: URL:http://www.nature.com/articles/nbt.150 9&gt; * le document en entier *</b></p>	1-33	
Date d'achèvement de la recherche <b>9 décembre 2021</b>		Examineur <b>Trommsdorff, Marion</b>	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul                      Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un                      autre document de la même catégorie                      A : arrière-plan technologique                      O : divulgation non-écrite                      P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention                      E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure                      à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date                      de dépôt ou qu'à une date postérieure.                      D : cité dans la demande                      L : cité pour d'autres raisons                      .....                      &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2104988 FA 897297**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **09-12-2021**  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
<b>WO 2019101734 A1</b>	<b>31-05-2019</b>	<b>BR 112020010141 A2</b>	<b>10-11-2020</b>
		<b>CN 111801156 A</b>	<b>20-10-2020</b>
		<b>DK 3713665 T3</b>	<b>01-11-2021</b>
		<b>EP 3713665 A1</b>	<b>30-09-2020</b>
		<b>FR 3073751 A1</b>	<b>24-05-2019</b>
		<b>JP 2021504132 A</b>	<b>15-02-2021</b>
		<b>KR 20200090200 A</b>	<b>28-07-2020</b>
		<b>SG 11202004780T A</b>	<b>29-06-2020</b>
		<b>US 2020360888 A1</b>	<b>19-11-2020</b>
		<b>WO 2019101734 A1</b>	<b>31-05-2019</b>
-----			