

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

11 N° de publication : 3 141 945
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
21 N° d'enregistrement national : 22 11873

51 Int Cl⁸ : C 12 N 5/071 (2023.01), C 12 N 5/074, 5/073, 5/02,
11/04, A 61 K 35/12

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

22 Date de dépôt : 15.11.22.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 17.05.24 Bulletin 24/20.

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

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

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

72 Inventeur(s) : ROYER Caroline, Christine, Marie,
MIANNE Joffrey, Quentin et FEYEUX Maxime.

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

74 Mandataire(s) : AQUINOV.

54 Substitut de matrice extracellulaire dans un microcompartiment cellulaire.

57 La présente invention se rapporte au domaine de la
culture cellulaire en trois dimensions et concerne, en parti-
culier des microcompartiments cellulaires, dépourvus de
matrice extracellulaire d'origine animale et/ou issues de li-
gnées cellulaires cancéreuses, pour la production de cel-
lules et de tissus en grade « GMP ».

FR 3 141 945 - A1



Description

Titre de l'invention : Substitut de matrice extracellulaire dans un microcompartiment cellulaire

Domaine technique

- [0001] L'invention se rapporte au domaine de la culture cellulaire en trois dimensions et concerne, en particulier des microcompartiments cellulaires, dépourvus de matrice extracellulaire d'origine animale et/ou issues de lignées cellulaires cancéreuses, pour la production de cellules et de tissus en grade « GMP ».
- [0002] **Etat de l'art**
- [0003] La découverte des cellules souches pluripotentes induites (iPS ou iPSCs) par le Pr. Yamanaka, a permis de donner une nouvelle impulsion dans le domaine de la culture cellulaire. Très rapidement des essais cliniques ont vu le jour, avec pour objectif de traiter des maladies souvent rares et incurables avec la médecine traditionnelle.
- [0004] Historiquement, les cellules, y compris les cellules souches pluripotentes induites, sont cultivées en deux dimensions (2D). Du fait des limitations de la culture cellulaire en 2D, des systèmes de culture tridimensionnels (3D) ont été développés ces dernières années, permettant de surmonter en partie les inconvénients de la culture en 2D.
- [0005] De tels systèmes sont avantageusement plus proches des systèmes naturels *in vivo*, et ont de nombreuses applications, notamment la thérapie cellulaire. Les cellules cultivées dans ces systèmes peuvent être de tout type. Il peut s'agir, aussi bien de cellules différenciées avec différents phénotypes, de cellules progénitrices que de cellules souches.
- [0006] Une technologie particulièrement adaptée est celle décrite dans la demande de brevet WO 2018/096277 qui décrit des microcompartiments en trois dimensions pour la culture de cellules souches, comprenant notamment des cellules, une couche de matrice extracellulaire de type Matrigel® et une couche externe en hydrogel.
- [0007] Bien qu'étant une technologie très prometteuse, elle souffre de certains inconvénients afin de pouvoir être utilisée en clinique. Pour ce faire, les cellules et les systèmes de culture tridimensionnels d'où sont issus les cellules, doivent respecter la réglementation relative aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) ou « Good Manufacturing Practices » en anglais (GMP). Or, la plupart des systèmes de culture tridimensionnels, tels que les microcompartiments cellulaires, comprennent une matrice extracellulaire, d'origine animale et/ou issue de lignées cellulaires cancéreuses, telle que le Matrigel®, également connu sous le nom de matrice d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), incompatible avec cette réglementation.
- [0008] Ainsi, son usage intensif en culture cellulaire, notamment celle des cellules IPS, est

remis en question car le Matrigel® est issu de sarcomes de souris, susceptible d'introduire des contaminants xénogéniques dans les cellules obtenues à partir d'une culture comprenant du Matrigel®. En outre, la complexité de son mélange, la variabilité des propriétés biochimiques et mécaniques entre les lots et au sein d'un même lot entraînent un manque de reproductibilité des expériences de culture cellulaire.

- [0009] Pour envisager l'avènement de thérapies cellulaires ou la production de cellules animales ou végétales pour la consommation alimentaire humaine ou animale, basées sur cette technologie, il existe un besoin pour développer une alternative, un substitut permettant de s'affranchir de la présence d'une telle matrice extracellulaire, tout en conservant la possibilité aux cellules d'adhérer et de croître, de façon satisfaisante.
- [0010] Dans le cadre de leurs travaux, les inventeurs ont découvert de façon surprenante l'utilisation d'un hydrogel ayant un module de Young élevé, destinée à former l'enveloppe externe ou la couche externe d'un microcompartiment cellulaire associé à un deuxième hydrogel ayant un module de Young inférieur à celui de la couche externe, destiné à former une couche ou un maillage dans la partie interne du microcompartiment, sur lequel au moins une cellule pourra se loger et croître. Avantageusement, la présente invention permet d'obtenir des cellules en grande quantité ainsi qu'une croissance rapide et un faible taux de mutation. De tels résultats permettent ainsi d'envisager son utilisation dans la production de microcompartiments cellulaires en trois dimensions à usage humain et vétérinaire.
- [0011] Des études ont, certes, décrit l'utilisation de matrice synthétique, y compris en trois dimensions. Toutefois, il n'est pas décrit des microcompartiments cellulaires comprenant deux hydrogels présentant chacun un module de Young différent, en particulier lorsque le module de Young de l'hydrogel de la couche externe est strictement supérieur à celui de l'hydrogel constituant la couche ou le maillage de la partie interne. Or, une telle structure est complexe à mettre en œuvre, afin que la couche externe soit suffisamment rigide pour former l'enveloppe externe du microcompartiment cellulaire et ainsi protéger le contenu des cellules ; alors que, la partie interne du microcompartiment cellulaire, délimitée par l'enveloppe externe dudit microcompartiment, comprenant au moins ladite couche ou maillage en hydrogel, présente des propriétés rhéologiques particulières, ainsi qu'une résistance mécanique lui permettant de fournir aux cellules un environnement propice à leur dispersion, prolifération, et migration.
- [0012] Aussi, pour répondre à ce besoin de microcompartiment cellulaire dépourvu de matrice extracellulaire non GMP tel que le Matrigel®, présentant des propriétés rhéologiques adaptées à la protection des cellules et leur croissance au sein du microcompartiment, l'invention propose un système de culture tridimensionnel reposant sur un microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant au moins deux hydrogels ayant un module de Young distinct, en particulier le module de Young de

l'hydrogel de la couche externe est strictement supérieur à celui de l'hydrogel compris dans la partie interne et composant la couche ou le maillage dans le microcompartiment.

Résumé de l'invention

[0013] Ainsi, l'invention concerne un nouveau microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant :

- une couche externe en hydrogel, et
- une partie interne comprenant au moins une cellule et au moins une couche ou un maillage en hydrogel d'origine végétale ou synthétique,

dans lequel le module de Young de l'hydrogel dans la partie interne est strictement inférieur au module de Young de l'hydrogel de la couche externe.

[0014] L'invention se rapporte ainsi à l'utilisation de deux hydrogels spécifiques, l'un destiné à former la couche externe et le second destiné à former la couche ou le maillage dans la partie interne, étant entendu que ladite partie interne est délimitée par la couche externe en hydrogel et le module de Young de l'hydrogel de la partie interne est strictement inférieur au module de Young de l'hydrogel de la couche externe.

[0015] La couche externe en hydrogel permet, d'une part de former l'enveloppe externe protectrice, et donc de constituer la capsule, d'autre part, la couche ou le maillage de la partie interne moins rigide, plus lâche, permet la croissance cellulaire, étant donné les propriétés rhéologiques particulièrement adapté de l'hydrogel de ladite couche ou maillage de la partie interne.

[0016] Le microcompartiment selon l'invention est ainsi composé de deux hydrogels distincts. L'hydrogel constituant la couche externe ayant un module de Young strictement supérieur au module de Young de l'hydrogel constituant la couche ou le maillage de la partie interne, ce qui améliore la protection des cellules et des agrégats cellulaires présents dans le microcompartiment cellulaire.

[0017] En effet, la couche externe apporte, avantageusement, une première enveloppe protectrice. Cet effet est renforcé par l'au moins couche ou maillage en hydrogel dans la partie interne, qui fournit un maillage protecteur supplémentaire aux cellules et agrégats présents dans le microcompartiment tout en étant suffisamment lâche pour permettre la migration et l'amplification des cellules et maintenant leur caractère pluripotent. A l'inverse, l'art antérieur connu, composé d'une unique couche d'hydrogel, est soit trop rigide, ne permettant pas la migration et l'amplification des cellules et induisant leur apoptose, soit au contraire, trop lâche et donc incompatible avec une culture en bioréacteur. En effet, les contraintes mécaniques d'une culture en bioréacteur, notamment du fait des forces de cisaillement importantes générées lors de la culture nécessite un microcompartiment cellulaire adapté.

- [0018] La couche externe en hydrogel ayant un module de Young élevé permet donc de former l'enveloppe externe du microcompartiment ou de la capsule selon l'invention, celle-ci permettant de protéger le contenu de la capsule de l'environnement extérieur, notamment lorsque les capsules sont cultivées dans un bioréacteur. Ceci est encore amélioré par la présence de la couche ou du maillage en hydrogel de la partie interne dudit microcompartiment. Avantageusement, la couche ou le maillage en hydrogel de la partie interne est juxtaposée au moins partiellement à la face interne de la couche externe.
- [0019] Selon un objet préféré de l'invention, le module de Young de l'hydrogel du maillage ou de la couche dans la partie interne est compris entre 0,01 et 200kPa, plus préférentiellement de 0,1 et 60 kPa, encore plus préférentiellement compris entre 0,1 et 5kPa.
- [0020] Préférentiellement, le module de Young de l'hydrogel de la couche externe est supérieur à 10kPa, plus préférentiellement supérieur à 60kPa, encore plus préférentiellement supérieur à 100kPa.
- [0021] A titre d'exemple, lorsque le module de Young de l'hydrogel présent dans la partie interne est de 10kPa, préférentiellement 60 kPa, plus préférentiellement 100kPa, le module de Young de l'hydrogel de la couche externe est nécessairement strictement supérieur à 10kPa, préférentiellement supérieur à 60 kPa, plus préférentiellement supérieur à 100kPa.
- [0022] Selon un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention, l'hydrogel de la couche externe et/ou de la partie interne constituant le microcompartiment est composé ou exclusivement constitué d'alginate.
- [0023] Les alginates sont des monomères d'acide b-D-mannuronique (unités M) et d'acide a-L-gulonique (unités G) liés en (1-4) qui varient en quantité et en distribution séquentielle le long de la chaîne polymère. Des cations divalents comme le Ca^{2+} se lient de manière coopérative entre les blocs G des chaînes d'alginate adjacentes, créant des ponts ioniques inter-chaînes qui provoquent la gélification des solutions aqueuses d'alginate.
- [0024] Lorsque l'hydrogel compris dans la partie interne est de l'alginate, la concentration de la solution d'alginate destinée à former la couche ou le maillage d'alginate dans la partie interne du microcompartiment, est préférentiellement comprise entre 0,25 et 2%, plus préférentiellement entre 0,25 et 1%, encore plus préférentiellement 0,5% (plus ou moins 0,1%). Lorsque la concentration de la solution d'alginate destinée à former la couche ou le maillage d'alginate dans la partie interne du microcompartiment est de 0,5%, la viscosité de l'alginate est préférentiellement de 3mPa/s.
- [0025] Avantageusement, la partie interne comprend également au moins un milieu de culture.
- [0026] Selon un objet préféré de l'invention, la couche ou le maillage en hydrogel de la

partie interne est agencée entre la couche externe en hydrogel et ladite au moins une couche de cellules. Plus préférentiellement, la partie interne comprend au moins une couche de cellules.

[0027] Selon un autre objet préféré, le poids moléculaire de l'hydrogel de la partie interne est strictement inférieur au poids moléculaire de l'hydrogel de la couche externe. Plus préférentiellement, l'alginate de la partie interne présente un poids moléculaire inférieur ou égal à 75kDa et/ou l'alginate de la couche externe présente un poids moléculaire compris entre 150 et 250kDa, ce qui permet notamment d'avoir une enveloppe suffisamment rigidifiée pour protéger le contenu de la capsule, et une couche ou un maillage de la partie interne plus lâche, apte à servir de substitut de matrice extracellulaire pour les cellules présentes dans la capsule et renforçant l'effet protecteur. L'alginate de plus faible poids moléculaire ayant des chaînes plus courtes permet d'obtenir une polymérisation et une viscosité du gel plus faible, et par conséquent, un hydrogel plus lâche permettant aux cellules de migrer, de croître, et de former un agrégat cellulaire, voire un ou plusieurs cystes.

[0028] Selon un autre objet, la couche ou le maillage en hydrogel de la partie interne peut comprendre d'autres constituants. Ainsi, ladite couche ou maillage en hydrogel comprend préférentiellement au moins une séquence peptidique, plus préférentiellement une séquence peptidique d'intérêt apte à interagir avec les cellules constituant notamment la couche de cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention, ceci permettant d'améliorer l'adhésion et la survie des cellules au sein du microcompartiment. A titre d'exemple, la séquence peptidique peut être un peptide ou une protéine, préférentiellement la séquence peptidique est issue d'une protéine de la matrice extracellulaire choisie parmi le collagène, la fibronectine, la laminine etc. Plus préférentiellement, la séquence peptidique est un motif RGD ou un motif YIGSR.

[0029] Le motif RGD permet l'adhésion des cellules grâce à l'interaction du RGD avec les intégrines des cellules. Par motif RGD, on entend un peptide de séquence RGD pouvant comprendre un ou deux autres résidus avant et après le motif RGD pour améliorer la détection par les cellules du motif RGD.

[0030] Le motif YIGSR permet l'adhésion des cellules grâce à l'interaction du YIGSR avec les récepteurs laminine des cellules. Par motif YIGSR, on entend un peptide de séquence YIGSR pouvant comprendre un ou deux autres résidus avant et après le motif YIGSR pour améliorer la détection par les cellules du motif YIGSR.

[0031] Avantagusement, la couche ou le maillage en hydrogel de la partie interne comprend également au moins un deuxième hydrogel distinct du premier hydrogel de la partie interne, plus préférentiellement celui-ci est choisi parmi la fibrine, la laminine, le collagène, la fibronectine, l'entactine, et l'acide hyaluronique.

- [0032] Selon un autre objet de l'invention, le microcompartiment est préférentiellement clos. Le microcompartiment selon l'invention peut également se présenter sous différentes formes, préférentiellement sous la forme d'un ovoïde, d'un cylindre, d'un sphéroïde, d'une sphère ou d'une larme.
- [0033] Aussi, le microcompartiment selon l'invention est composé de trois constituants majoritaires, une couche externe en hydrogel formant l'enveloppe dudit microcompartiment d'un module de Young élevé, une couche ou un maillage en hydrogel d'un module de Young faible dans la partie interne du microcompartiment cellulaire, ladite couche ou maillage ayant un module de Young strictement inférieur à celui de l'hydrogel destiné à former la couche externe, ladite couche ou maillage étant destinée à servir de substitut à la matrice extracellulaire, notamment pour remplacer le Matrigel®. Enfin, ladite partie interne comprend au moins une cellule.
- [0034] Les cellules présentes dans la partie interne, constituent avantageusement une couche de cellules, les cellules peuvent alors être de tous types cellulaires, préférentiellement lesdites cellules ne sont pas des cellules issues de l'embryon humain ou nécessitant la destruction d'un embryon humain, plus préférentiellement, les cellules sont choisies parmi les cellules eucaryotes humaines, animales et végétales, encore plus préférentiellement les cellules pluripotentes, les progéniteurs les cellules en cours de différenciation et les cellules différenciées.
- [0035] Lorsque le microcompartiment comprend les trois constituants précédemment décrits, ledit microcompartiment comprend préférentiellement au moins une couche de cellules et au moins une lumière. Lorsque le microcompartiment comprend au moins une lumière, la couche de cellule, la couche ou le maillage en hydrogel de la partie interne et la couche externe sont préférentiellement, successivement organisées autour de ladite lumière.
- [0036] Préférentiellement, la partie interne du microcompartiment comprend au moins un agrégat de cellules et/ou un micro tissu cellulaire en trois dimensions.
- [0037] Selon un autre aspect, l'invention se rapporte également à un ensemble de microcompartiments, dans lequel ledit ensemble comprend au moins un microcompartiment selon l'un des quelconques modes de réalisation précédents.
- [0038] Le microcompartiment selon l'invention ou l'ensemble de microcompartiment selon l'invention, est également particulièrement adapté pour être utilisé en culture cellulaire, en particulier en culture cellulaire en trois dimensions, permettant la production de cellules d'intérêt en grande quantité, des micro tissus, voire d'organoïde d'intérêt, susceptible d'être utilisé, par exemple dans le cadre de thérapie cellulaire. Aussi, l'invention se rapporte également à un microcompartiment selon l'invention ou un ensemble de microcompartiment selon l'invention, pour son utilisation comme médicament.

- [0039] Selon une variante, l'invention se rapporte également à une utilisation du microcompartiment selon l'invention ou d'un ensemble de microcompartiment selon l'invention pour fabriquer des micro tissus. Etant entendu que dans ce mode de réalisation particulier, les micro tissus ne sont pas implantés chez un être humain ou un animal. A titre d'exemple, ils peuvent être utilisés comme modèle ex-vivo.
- [0040] D'autre part, le microcompartiment selon l'invention peut être produit de différentes manières, toutefois selon un aspect particulier, l'invention se rapporte à un procédé de préparation du microcompartiment cellulaire selon l'invention, comprenant les étapes suivantes :
- a. mélanger des cellules, éventuellement préalablement incubées dans un milieu de culture,
 - b. encapsuler le mélange de l'étape (a) dans un hydrogel destinée à former la couche externe ;
 - c. cultiver les capsules obtenues à l'étape (b) dans un milieu de culture, préférentiellement dans un bioréacteur, préférentiellement pendant au moins 1 jour, encore plus préférentiellement de 3 à 50 jours, et
 - d. optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus, caractérisé en ce que, lors de l'étape (a) et/ou lors de l'étape (b), est ajoutée une solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieur au module de Young de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe d'hydrogel.
- [0041] Selon un objet particulier de l'invention, l'étape (b) comprend les sous-étapes suivantes :
- mettre en contact le mélange de l'étape (a) et une solution d'hydrogel destinée à former la couche externe (i) pour former au moins une goutte, et
 - collecter la goutte obtenue dans un bain de calcium apte à rigidifier ladite solution d'hydrogel pour former la couche externe de chaque microcompartiment.
- [0042] De façon particulièrement préféré, l'étape b) est réalisée par co-injection simultanée de la solution d'hydrogel destinée à former la couche externe (i), du mélange de l'étape a) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieur à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe (ii), et optionnellement d'une solution intermédiaire (iii) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieure à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe ; ladite co-injection est réalisée de manière concentrique via un injecteur microfluidique ou millifluidique formant un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange desdites solutions, ledit jet se fractionnant en gouttes.

- [0043] Avantageusement, le diamètre d'ouverture finale de l'injecteur microfluidique est compris entre 50 et 800 μm , préférentiellement entre 80 et 240 μm , et le débit de chacune des solutions est compris entre 0,1 et 2000 mL/h, préférentiellement entre 10 et 2000 mL/h, plus préférentiellement entre 10 et 150 mL/h, encore plus préférentiellement entre 11 et 100 mL/h.
- [0044] Selon une variante du procédé selon l'invention, l'étape b) est réalisée par co-injection simultanée de la solution d'hydrogel destinée à former la couche externe (i), du mélange de l'étape a) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieur à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe (ii), et optionnellement d'une solution intermédiaire (iii) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieur à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe ; ladite co-injection est réalisée de manière concentrique via un injecteur microfluidique ou millifluidique, ledit injecteur comprenant une pointe, ladite pointe étant en contact avec une solution de calcium, formant un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange desdites solutions, ledit jet formant un tube.
- [0045] Lorsque ledit injecteur comprenant une pointe, ladite pointe étant en contact avec la solution de calcium, le diamètre d'ouverture finale de l'injecteur microfluidique est préférentiellement compris entre 50 et 1000 μm , plus préférentiellement entre 80 et 300 μm , et le débit de chacune des solutions est compris entre 1 et 100 mL/h.
- [0046] Selon un dernier aspect, l'invention se rapporte à un kit, ledit kit comprenant une solution d'hydrogel destinée à former la couche externe du microcompartiment (i) et une solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module d'Young est strictement inférieur à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe (ii), préférentiellement un alginate, optionnellement une solution intermédiaire (iii), préférentiellement une solution de sorbitol.
- [0047] Enfin, l'invention se rapporte également à l'utilisation du kit destiné à la préparation d'un microcompartiment selon l'invention.
- [0048] D'autres caractéristiques et avantages ressortiront de la description détaillée de l'invention, des exemples et des figures qui vont suivre.

Brève description des Figures

- [0049] [Fig.1] représente un microcompartiment cellulaire 1 selon un mode de réalisation particulier de l'invention comprenant une couche externe en hydrogel 2, et une partie interne 3 délimitée par ladite couche externe 2. Ladite partie interne 3 comprenant une couche ou un maillage en hydrogel 30 dont le module de Young est strictement inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe 2, une couche de cellules 31, et une

lumière 32. Ladite couche ou maillage 30 étant agencé entre la face interne 20 de la couche externe en hydrogel 2 et la couche de cellule 31.

- [0050] [Fig.2] représente un mode de réalisation de l'invention, lors duquel la solution d'alginate à 0,5% est mélangée avec le sorbitol et présente dans une première ligne d'injection « IS ». Les deux autres solutions comprenant soit l'alginate à 2% « A » destiné à former la couche externe, soit les cellules en suspension dans le milieu de culture « CS », sont présentes dans les deux autres lignes d'injection. Les trois lignes sont par la suite co-injectées, à l'aide d'un injecteur micro fluidique, avec les différentes solutions formant un jet, se fractionnant en goutte dans le bain de CaCl₂, ledit bain rigidifiant la couche externe à partir de la solution d'alginate à 2% et formant ainsi la capsule.
- [0051] [Fig.3] représente sur le panel A un second mode de réalisation de l'invention, lors duquel la solution d'alginate à 0,5% est mélangée avec le sorbitol et présente dans une première ligne d'injection « IS ». Les deux autres solutions comprenant soit l'alginate à 2% « A », soit les cellules en suspension dans le milieu de culture « CS », sont présentes dans les deux autres lignes d'injection. Les trois lignes sont par la suite co-injectées, à l'aide d'un injecteur micro fluidique, dont la pointe est mise en contact avec le bain de CaCl₂, formant un jet, prenant la forme d'un tube dans le bain de CaCl₂, ledit bain rigidifiant la couche externe à partir de la solution d'alginate à 2% et formant ainsi le tube. Le panel B est une image prise à l'aide d'un microscope EVOS et grossit 4 fois, de cellules dans des tubes comprenant de l'alginate à 0,5% à J4 et J5.
- [0052] [Fig.4] représente le pourcentage de capsules vides, c'est-à-dire sans cellules ou cystes, dans des capsules dépourvues de matrice extracellulaire exogènes (Hors Invention), des capsules à base de Matrigel® (Hors Invention), et des capsules à base d'alginate à 0,5% comme substitut de matrice (Invention)
- [0053] [Fig.5a] est une image prise à l'aide d'un microscope à lumière transmise et grossit 4 fois, de cellules dans des capsules dépourvues de matrice extracellulaire exogènes (Hors Invention) à J0.
- [0054] [Fig.5b] est une image prise à l'aide d'un microscope à lumière transmise et grossit 4 fois, de cellules dans des capsules à base de Matrigel® (Hors Invention) à J0.
- [0055] [Fig.5c] est une image prise à l'aide d'un microscope à lumière transmise et grossit 4 fois, de cellules dans des capsules à base d'alginate à 0,5% (Invention) à J0.
- [0056] [Fig.6a] est une image prise à l'aide d'un microscope à lumière transmise et grossit 4 fois, de cellules dans des capsules dépourvues de matrice extracellulaire exogènes (Hors Invention) à J5.
- [0057] [Fig.6b] est une image prise à l'aide d'un microscope à lumière transmise et grossit 4 fois, de cellules dans des capsules à base de Matrigel® (Hors Invention) à J5.
- [0058] [Fig.6c] est une image prise à l'aide d'un microscope à lumière transmise et grossit 4

fois, de cellules dans des capsules à base d'alginate à 0,5% (Invention) à J5.

- [0059] [Fig.7] représente l'amplification et la pluripotence à J5 des cellules présentes dans les capsules dépourvues de matrice extracellulaire exogènes (Hors Invention), les capsules à base de Matrigel® (Hors Invention), et les capsules à base d'alginate à 0,5% (Invention).

Description détaillée de l'invention

- [0060] Définition

- [0061] Par « hydrogel d'origine végétale ou synthétique » on entend un hydrogel qui n'est pas d'origine animale et/ou issues de lignées cellulaires cancéreuses, tel que le Matrigel®.
- [0062] Par « hydrogel ayant un module de Young élevé » au sens de l'invention, on entend un hydrogel ayant un module de Young strictement supérieur au module de Young de l'hydrogel constituant la couche ou le maillage dans la partie interne du microcompartiment cellulaire selon l'invention. Aussi, le module de Young de l'hydrogel de la couche externe est strictement supérieur au module de Young de l'hydrogel présent dans la partie interne constituant la couche ou le maillage destiné à se substituer à une matrice extracellulaire d'origine animale telle que le Matrigel®.
- [0063] A l'inverse par « faible module de Young » on entend un hydrogel présentant un module de Young strictement inférieur au module de Young de l'hydrogel destiné à former la couche externe du microcompartiment selon l'invention.
- [0064] Par « hydrogel de haut poids moléculaire » au sens de l'invention, on entend un hydrogel de plus haut poids moléculaire constituant la couche externe du microcompartiment cellulaire selon l'invention par rapport à l'hydrogel constituant la couche ou le maillage de la partie interne du microcompartiment cellulaire qui est de plus faible poids moléculaire. Aussi, le poids moléculaire de l'hydrogel de la couche externe est supérieur à celui présent dans la partie interne.
- [0065] A l'inverse, par « hydrogel de faible poids moléculaire » au sens de l'invention, on entend un hydrogel de plus faible poids moléculaire, c'est-à-dire de poids moléculaire inférieur à l'hydrogel constituant la couche externe du microcompartiment cellulaire, ledit hydrogel de faible poids moléculaire constituant la couche ou le maillage de la partie interne du microcompartiment cellulaire selon l'invention. Aussi, le poids moléculaire de l'hydrogel présent dans la partie interne est inférieur à celui de la couche externe.
- [0066] Par « microcompartiment » ou « capsule » au sens de l'invention, on entend également une structure tridimensionnelle partiellement ou totalement close, contenant plusieurs cellules. Celle-ci est formée à partir d'une matrice de chaînes polymères, par exemple l'alginate, gonflée par un liquide et préférentiellement de l'eau. La structure

est ainsi constituée d'une couche externe en hydrogel rigidifiée et d'une partie interne comprenant au moins une cellule et une couche ou un maillage en hydrogel adaptée à la culture cellulaire et la croissance desdites cellules.

- [0067] Par « goutte » au sens de l'invention, on entend également une structure tridimensionnelle formée à partir d'au moins une solution liquide comprenant les constituants d'un hydrogel non rigidifié (précurseurs de polymérisation, chaînes de polymères non ou partiellement réticulées...), d'éléments précurseurs d'hydrogel. Aussi, la goutte constitue un état transitoire entre la co-injection des différents constituants et le microcompartiment selon l'invention.
- [0068] 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.
- [0069] 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.
- [0070] Par « cellule mutante » au sens de l'invention, on entend une cellule porteuse d'au moins une mutation.
- [0071] Par « cellule progénitrice » au sens de l'invention, on entend une cellule souche déjà engagée dans la différenciation cellulaire mais pas encore différenciée.
- [0072] Par « cellule souche embryonnaire » au sens de l'invention on entend une cellule souche pluripotente de cellule dérivée de la masse cellulaire interne du blastocyste. La pluripotence des cellules souches embryonnaires peut être évaluée par la présence de marqueurs tels que les facteurs de transcription OCT4, NANOG et SOX2 et des marqueurs de surface comme SSEA4/5, Tra-1-60 et Tra-1-81. Les cellules souches embryonnaires utilisées dans le cadre de l'invention sont obtenues sans destruction de l'embryon dont elles sont issues, par exemple à l'aide de la technique décrite dans Chang et al. (Cell Stem Cell, 2008, 2(2)) : 113-117). Eventuellement les cellules souches embryonnaires d'êtres humains peuvent être exclues.
- [0073] Par « cellule souche pluripotente » ou « cellule pluripotente » au sens de l'invention, on entend une cellule qui a la capacité de former tous les tissus présents dans l'organisme d'origine entier, sans pour autant pouvoir former un organisme entier en tant que tel. Les cellules souches pluripotentes humaines peuvent être appelées hPSC dans le contexte de la présente invention. Il peut s'agir en particulier de cellules souches pluripotentes induites (iPSC ou hiPSC pour les cellules souches pluripotentes

induites humaines), de cellules souches embryonnaires ou de cellules MUSE (pour « Multilineage-differentiating Stress Enduring »).

- [0074] 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 SSEA4/5. Des exemples de procédés permettant l'obtention de cellules souches pluripotentes induites sont décrits dans les articles Yu et al. (Science 2007, 318 (5858) : 1917-1920), Takahashi et al (Cell, 2007, 131(5) : 861-872) et Nakagawa et al (Nat Biotechnol, 2008, 26(1) : 101-106).
- [0075] Par « couche de cellules » ou « assise de cellules » au sens de l'invention, on entend plusieurs cellules formant une couche ou une assise pouvant être structurée autour d'une lumière, il peut s'agir par exemple d'un tissu ou d'un micro-tissu cellulaire ou d'une culture groupée en trois dimensions. L'épaisseur de la couche de cellules pouvant être variable. Cette couche est organisée en trois dimensions dans le micro-compartiment.
- [0076] 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.
- [0077] 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 micro-compartiment.
- [0078] Microcompartiment selon l'invention
- [0079] La présente invention a pour objet un microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant :
- une couche externe en hydrogel, et
 - une partie interne comprenant au moins une cellule et au moins une couche ou un maillage en hydrogel d'origine végétale ou synthétique,
- dans lequel le module de Young de l'hydrogel de la couche ou du maillage de la partie interne est strictement inférieur au module de Young de l'hydrogel de la couche externe.

- [0080] Dans le contexte de l'invention, la partie interne est délimitée par la couche externe en hydrogel, ledit hydrogel ayant un module de Young strictement supérieur au module de Young de l'hydrogel formant la couche ou le maillage de la partie interne, se substituant à la matrice extracellulaire d'origine animale, telle que le Matrigel®. La présente invention se rapporte ainsi à un microcompartiment cellulaire en trois dimension comprenant deux hydrogels distincts, l'un formant la couche externe et le second la couche ou le maillage présent dans la partie interne.
- [0081] La couche externe en hydrogel permet, d'une part, de former l'enveloppe externe protectrice, et donc de constituer la capsule, et d'autre part, la couche ou le maillage de la partie interne moins rigide, plus lâche, permet de faciliter la croissance cellulaire, étant donné ses propriétés rhéologiques particulièrement adaptées pour la croissance et la survie cellulaire. Aussi, dans le contexte de l'invention, le module de Young de l'hydrogel de la partie interne est strictement inférieur au module de Young de l'hydrogel de la couche externe.
- [0082] Un tel microcompartiment selon l'invention composé de deux hydrogels distincts, dans lequel l'hydrogel constituant la couche externe d'un module de Young est strictement supérieur au module de Young de l'hydrogel constituant la couche ou le maillage de la partie interne améliore la protection des cellules et/ou des agrégats cellulaires présents dans le microcompartiment, en particulier dans le contexte d'une culture en bioréacteur, ayant pour conséquence des forces de cisaillement élevées.
- [0083] Avantageusement, la couche externe apporte une première enveloppe protectrice, renforcée par l'ajout d'au moins une couche ou d'un maillage en hydrogel, ce qui fournit un maillage protecteur supplémentaire aux cellules et agrégats présents dans le microcompartiment tout en étant suffisamment lâche pour permettre la migration et l'amplification des cellules et en maintenant leur caractère pluripotent. A l'inverse, l'art antérieur connu, composé d'une unique couche d'hydrogel, est soit trop rigide, ne permettant pas la migration et l'amplification des cellules et induisant leur apoptose, soit au contraire, pas assez rigide et donc incompatible avec une culture en bioréacteur.
- [0084] La couche externe en hydrogel permet donc de former l'enveloppe externe du microcompartiment ou de la capsule selon l'invention, protégeant son contenu de l'environnement extérieur, notamment lorsque les capsules sont cultivées dans un bioréacteur. Ceci est encore amélioré par l'ajout de la couche ou du maillage en hydrogel de la partie interne dudit microcompartiment.
- [0085] Avantageusement, la couche ou le maillage en hydrogel de la partie interne est juxtaposé au moins partiellement à la face interne de la couche externe.
- [0086] Selon un objet préféré de l'invention, les avantages cités précédemment sont encore améliorés lorsque le module de Young de l'hydrogel de la partie interne est compris entre 0,01 et 200kPa, plus préférentiellement entre 0,1 et 60 kPa, encore plus préféren-

tiellement compris entre 0,1 et 5kPa. Préférentiellement, le module de Young de l'hydrogel de la couche externe est supérieur à 10kPa, plus préférentiellement supérieur à 60kPa, encore plus préférentiellement supérieur à 100kPa.

- [0087] Préférentiellement, l'hydrogel de la couche ou du maillage de la partie interne est enchevêtré avec l'hydrogel de la couche externe, notamment sur la face interne de la couche externe. Aussi, la délimitation entre les deux hydrogels malgré un module de Young différent peut ne pas être parfaitement nette. Par conséquent, au moins une partie de l'hydrogel de la couche ou du maillage de la partie interne peut être enchevêtrée avec la face interne de la couche externe.
- [0088] Etant donné que le module de Young de l'hydrogel de la partie interne est strictement inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe, la couche externe sera plus rigide, que la couche ou le maillage de la partie interne dont l'hydrogel est plus lâche, plus desserré, notamment dû à la présence de chaîne plus courte, facilitant la croissance des cellules.
- [0089] Préférentiellement, l'hydrogel utilisé est biocompatible, c'est-à-dire qu'il n'est pas toxique pour les cellules. L'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 particulièrement préféré, la couche externe d'hydrogel comprend au moins de l'alginate. Elle peut être constituée exclusivement d'alginate.
- [0090] L'alginate peut être en particulier un alginate de sodium, composé à 80% d' α -L-gulonate et 20% de β -D-mannuronate, ayant un module de Young supérieur à 10kPa, préférentiellement supérieur à 60 kPa, plus préférentiellement supérieur à 100 kPa.
- [0091] Selon un autre objet, l'alginate présente avantageusement un poids moléculaire moyen de 100 à 400 kDa, plus préférentiellement la couche externe présente un poids moléculaire compris entre 150 et 250kDa. Lorsque l'hydrogel de la couche externe est de l'alginate, la concentration de la solution d'alginate destinée à former ladite couche externe du microcompartiment, est préférentiellement comprise entre 0,5 et 5% en masse, plus préférentiellement la concentration est égale à 2% (plus ou moins 0,5%) en masse.
- [0092] Lorsque la concentration de la solution d'alginate destinée à former la couche externe du microcompartiment est égale à 2%, la viscosité de l'alginate est préférentiellement égale à 144mPa/s.
- [0093] Avantageusement, la couche externe en hydrogel est dépourvue de cellules.
- [0094] La couche d'hydrogel externe permet ainsi de protéger les cellules du milieu extérieur, de limiter la prolifération incontrôlée des cellules, et leur différenciation en cas de différenciation.

- [0095] Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, la couche ou le maillage de la partie interne d'hydrogel comprend également au moins de l'alginate. Elle peut être constituée exclusivement d'alginate. L'alginate peut être en particulier un alginate de sodium, composé à 80% d' α -L-gulonate et 20% de β -D-mannuronate, ayant un module de Young compris entre 0,01kPa et 200kPa, préférentiellement entre 0,1kPa et 60 kPa, plus préférentiellement entre 0,1kPa et 5 kPa.
- [0096] Selon un autre objet, l'alginate présente un poids moléculaire moyen d'au plus 75kDa. Lorsque l'hydrogel de la couche externe est de l'alginate, la concentration de la solution d'alginate destinée à former la couche externe du microcompartiment, est préférentiellement comprise entre 0,25 et 2%, plus préférentiellement entre 0,25 et 1%, encore plus préférentiellement 0,5%. Lorsque la concentration de la solution d'alginate destinée à former la couche externe du microcompartiment est de 0,5%, la viscosité de l'alginate est préférentiellement de 3mPa/s.
- [0097] La couche ou le maillage de la partie interne ayant un faible module de Young présente alors des propriétés viscoélastiques et viscoplastiques particulièrement avantageuses pour obtenir un substitut de matrice extracellulaire, dans laquelle les cellules vont pouvoir se loger et croître de manière satisfaisante. En outre, l'hydrogel d'alginate est rhéofluidifiant, c'est-à-dire que sa viscosité diminue quand la vitesse de cisaillement augmente, ceci est particulièrement avantageux lors du passage dans l'injecteur microfluidique. Enfin, l'alginate ayant un faible module de Young va également présenter des propriétés de relaxation plus rapide, également connu sur le terme "fast-relaxing", ce qui permet aux cellules de se déplacer, de changer de forme, de s'étendre, de proliférer et de remodeler de façon mécanique la matrice à base d'alginate.
- [0098] Aussi, l'hydrogel de la couche externe et/ou de la couche ou du maillage de la partie interne est très préférentiellement de l'alginate.
- [0099] Malgré que les cellules mammaliennes soient incapables d'interagir avec l'alginate, notamment, car celui-ci permet une adsorption minimale des protéines, l'alginate peut être utilisé comme substitut de matrice extracellulaire, tel que le Matrigel®. L'alginate présente les avantages suivants : l'alginate est bien caractérisé, facile à stériliser et à stocker, il peut éventuellement être modifié chimiquement, et offre des propriétés mécaniques intéressantes. Aussi, l'alginate est particulièrement adapté dans le contexte de l'invention et permet d'obtenir une bonne croissance, peu de mort cellulaire et une bonne amplification.
- [0100] Selon un autre objet préféré de l'invention, le microcompartiment cellulaire comprend des cellules, une couche externe en hydrogel et une couche ou un maillage dans la partie interne en hydrogel de poids moléculaire inférieur à l'hydrogel de la couche externe.

- [0101] Avantageusement, le microcompartiment selon l'un des quelconques modes de réalisation précédent comprend également au moins une couche de cellules et/ou au moins un milieu de culture. Lorsque le microcompartiment selon l'invention comprend une couche ou un maillage dans la partie interne en hydrogel, celle-ci est agencée entre la couche externe en hydrogel et ladite couche de cellule. Etant entendu que le microcompartiment peut également comprendre des cellules en suspension dans le milieu de culture ou éventuellement logées dans l'hydrogel.
- [0102] Selon une variante, l'invention se rapporte également à un microcompartiment cellulaire comprenant :
- au moins une couche de cellules,
 - une couche externe en hydrogel, et
 - une couche ou un maillage dans la partie interne en hydrogel agencé entre la couche externe en hydrogel et ladite couche de cellule,
- caractérisé en ce que la partie interne comprend un hydrogel d'un poids moléculaire strictement inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe.
- [0103] Avantageusement, les inventeurs ont observé une meilleure amplification, ainsi que la présence de cystes, majoritairement, de forme rondes à une concentration de 0,5%. A 2%, les cystes sont de forme sensiblement allongées et le microcompartiment présente une quantité de cystes inférieure par rapport à une concentration d'alginate plus faible. Plus la concentration de l'alginate est élevée, plus les contraintes physiques sont élevées dans la capsule, le gel est alors plus resserré, par conséquent, les cellules ont moins d'espace pour se multiplier et se déplacer. Les cystes présentent alors une forme sensiblement allongée.
- [0104] Ainsi, en fonction de l'objectif recherché, ou du type cellulaire, l'alginate constituant la couche ou le maillage de la partie interne du microcompartiment peut être présent à hauteur d'une concentration totale comprise entre 0,25 et 2% en masse, ce qui permet d'obtenir une bonne amplification et une bonne pluripotence, permettant ainsi son utilisation en culture cellulaire en trois dimensions.
- [0105] La couche ou le maillage de la partie interne en hydrogel, préférentiellement en alginate, peut comprendre d'autres constituants, ainsi ladite couche ou le maillage de la partie interne en hydrogel comprend préférentiellement au moins une séquence peptidique, plus préférentiellement une séquence peptidique d'intérêt apte à interagir avec les cellules constituant notamment la couche de cellules présentes dans le microcompartiment selon l'invention. A titre d'exemple la séquence peptidique peut être un peptide, ou une protéine. Selon un objet particulièrement préféré, la séquence peptidique est un motif YIGSR et/ou un motif RGD. Le motif YIGSR est un peptide issu de la chaîne β 1 de la laminine de séquence Tyrosine-Isoleucine-Glycine-Serine-Arginine facilitant l'adhésion cellulaire à la matrice. Le

motif RGD est un peptide de séquence Arginine-Glycine-Asparagine facilitant également l'adhésion cellulaire à la matrice.

- [0106] Selon un autre objet préféré de l'invention, la couche ou le maillage de la partie interne en hydrogel comprend au moins un deuxième hydrogel distinct du premier hydrogel de la couche ou du maillage de la partie interne, plus préférentiellement celui-ci est choisi parmi la fibrine, la laminine, la fibronectine, l'entactine, l'acide hyaluronique, et le collagène.
- [0107] Lorsque la couche ou le maillage de la partie interne en hydrogel comprend la fibrine, la fibrine est préférentiellement obtenue à partir de la polymérisation du fibrinogène par un agent de polymérisation du fibrinogène, avantageusement ledit agent est la thrombine, ledit agent peut être ajouté pendant l'encapsulation et/ou après l'encapsulation. Aussi, la polymérisation de la solution de fibrinogène par la solution de thrombine a lieu au cours de l'encapsulation et/ou après celle-ci. Lorsqu'elle a lieu après l'encapsulation, la polymérisation a lieu au sein de la goutte ou de la capsule nouvellement formée, c'est-à-dire une fois la rigidification de la couche externe.
- [0108] Le microcompartiment est alors un microcompartiment en trois dimensions, délimité par la couche externe en hydrogel et à l'intérieur de ladite couche externe, une partie interne comprend les cellules et la couche ou le maillage en hydrogel. Celui-ci se présente avantageusement sous différentes formes sphériques. Avantageusement, le microcompartiment en trois dimensions est creux, plus préférentiellement, le microcompartiment creux se présente sous la forme d'un ovoïde, d'un cylindre, d'un sphéroïde, d'une sphère ou d'une larme.
- [0109] D'une part, la couche externe d'hydrogel permet de protéger les cellules du milieu extérieur, de limiter la prolifération incontrôlée des cellules, ainsi que leur différenciation en cas de différenciation ; d'autre part, la couche ou maillage dans la partie interne d'hydrogel permet de fournir un environnement adapté pour la croissance des cellules et leur multiplication. La prolifération cellulaire peut éventuellement être contrôlée en fonction de la concentration de l'hydrogel tel que décrit précédemment.
- [0110] Dans le contexte de l'invention, les cellules présentes dans le microcompartiment peuvent être tout type de cellules, en particulier les cellules sont des cellules eucaryotes. Plus préférentiellement, les cellules sont des cellules humaines ou végétale ou animales.
- [0111] 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). Selon un mode de réalisation, le microcompartiment selon l'invention ne comprend pas de cellules souche embryonnaires (ES).

- [0112] Selon une variante particulièrement adaptée de l'invention, le microcompartiment selon l'invention comprend des cellules souches pluripotentes induites humaines ou animales.
- [0113] 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 et/ou des cellules en cours de différenciation. 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.
- [0114] 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 multipotentes ou progénitrices après mise en contact avec une solution capable d'initier la différenciation desdites cellules souches. Selon une variante, le contenu cellulaire du microcompartiment comprend des identités cellulaires homogènes ou mixtes.
- [0115] Les cellules différenciées peuvent en particulier se présenter sous forme d'au moins une couche de cellules ou sous forme d'un tissu, d'un agrégat cellulaire ou d'un 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 ou non, avec ou sans lumière.
- [0116] Le microcompartiment selon l'invention peut donc comprendre plusieurs types de cellules. En particulier, le 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 en cours de différenciation et/ou des cellules différenciées.

- [0117] Selon un objet particulier de l'invention, le microcompartiment selon l'invention est obtenu après plusieurs cycles de division cellulaire. En effet, les cellules comprises dans le microcompartiment selon l'invention sont des cellules obtenues par amplification, à partir d'au moins une cellule.
- [0118] Aussi, 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.
- [0119] 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.
- [0120] 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 au moins 1 jour, ou entre 2 et 50 jours, notamment entre 3 et 10 jours.
- [0121] 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.
- [0122] 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.
- [0123] 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.

- [0124] 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.
- [0125] Selon un autre objet préféré de l'invention, la capsule est obtenue par l'encapsulation est réalisée au moyen d'une co-injection réalisée de manière concentrique via un injecteur microfluidique formant un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange des différentes solutions utiles, ledit jet se fractionnant en gouttes. Les gouttes sont alors collectées dans un bain de calcium apte à rigidifier la solution d'hydrogel pour former la couche externe de chaque microcompartiment.
- [0126] Selon une variante permettant la formation d'un tube, la co-injection est également réalisée de manière concentrique via un injecteur microfluidique, ledit injecteur comprenant une pointe, ladite pointe étant en contact avec une solution de calcium, formant un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange desdites solutions, ledit jet formant le tube dans la solution de calcium.
- [0127] Le microcompartiment selon l'invention peut également comprendre d'autres éléments, en particulier un milieu de culture. Le milieu de culture est un milieu adapté aux cellules présentes dans le microcompartiment selon les connaissances de l'homme du métier.
- [0128] Selon un autre objet préféré de l'invention, le microcompartiment comprend au moins une lumière ou un lumen. Ladite lumière peut contenir un liquide, notamment du milieu de culture et/ou un liquide sécrété par les cellules. Avantageusement la présence de cette partie creuse permet aux cellules de disposer d'un petit volume diffusif dont elles peuvent contrôler la composition, favorisant une communication cellulaire. L'agencement tridimensionnel en monocouche ou assise cellulaire sphérique entourant la lumière ou le lumen central peut être également appelé un cyste.
- [0129] La lumière est préférentiellement générée, au moment de la formation du cyste, par les cellules qui se multiplient et se développent au sein de l'hydrogel constituant la couche ou le maillage dans la partie interne du microcompartiment cellulaire.
- [0130] Selon un autre objet préféré, la couche de cellule, la couche ou le maillage de la partie interne en hydrogel et la couche externe sont organisées autour de la lumière, plus préférentiellement ils sont organisés successivement autour de la lumière.
- [0131] 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 également de diminuer la mortalité cellulaire et d'augmenter le facteur d'amplification de la culture. Par conséquent 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.

- [0132] Selon un mode de réalisation, le microcompartiment peut comprendre plusieurs cystes ou tissus ou micro tissus.
- [0133] Le microcompartiment cellulaire selon l'invention est préférentiellement, clos ou partiellement clos, c'est à dire que la couche externe est close ou partiellement close. Plus préférentiellement le microcompartiment est clos.
- [0134] 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.
- [0135] 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 μm et 1 mm, préférentiellement entre 100 μm et 700 μm . Elle peut être comprise entre 200 μm et 600 μm , notamment entre 300 μm et 500 μm .
- [0136] Sa plus grande dimension est préférentiellement supérieure à 10 μm , plus préférentiellement comprise entre 10 μm et 1 m, encore plus préférentiellement entre 10 μm et 50 cm.
- [0137] Le microcompartiment selon l'invention peut être éventuellement congelé pour être stocké. Il devra ensuite être décongelé avant son utilisation.
- [0138] L'invention a également pour objet plusieurs microcompartiments ensemble. Aussi, l'invention vise aussi un ensemble ou une série de microcompartiments cellulaires tels que décrits précédemment comprenant au moins un microcompartiment cellulaire selon l'invention.
- [0139] 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 ou maillage en hydrogel et au moins une cellule, dans lequel au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'invention.
- [0140] L'ensemble de microcompartiments selon l'invention comprend préférentiellement entre 2 et 10^{16} microcompartiments.
- [0141] 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.
- [0142] Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, l'invention a pour objet un ensemble de microcompartiments cellulaires dans une enceinte close, telle qu'un bio-

réacteur, préférentiellement dans un milieu de culture dans une enceinte close, telle qu'un bioréacteur.

- [0143] 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.
- [0144] Ainsi, le microcompartiment selon l'un des quelconques modes de réalisation précédemment décrits ou l'ensemble de microcompartiment selon l'un des quelconques modes de réalisation précédemment décrits, est également particulièrement adapté pour être utilisé en culture cellulaire, en particulier en culture cellulaire en trois dimensions. Ceux-ci permettant la production de cellules d'intérêt en grande quantité, voire d'organoïde d'intérêt, susceptible d'être utilisé, par exemple dans le cadre de thérapie cellulaire. Aussi, l'invention se rapporte également à un microcompartiment selon l'invention ou un ensemble de microcompartiment selon l'invention, pour son utilisation comme médicament.
- [0145] Ainsi, le microcompartiment est particulièrement adapté à une utilisation en clinique.
- [0146] Selon un autre objet, l'invention se rapporte à l'utilisation du microcompartiment selon l'un des quelconques précédents objets, pour la production de cellules, micro tissus, tissus, préférentiellement pour la production de telles cellules et/ou tissus à grande échelle.
- [0147] Le microcompartiment selon l'invention peut être utilisé également pour la production de cellules animales ou végétales pour la consommation alimentaire humaine ou animale. Cette utilisation est particulièrement utile pour créer des substituts aux produits carnés tels que la viande, dans un objectif de limiter la consommation de produits carnés.
- [0148] Procédé de préparation
- [0149] Le microcompartiment peut être obtenu par différents moyens connus de l'Homme du métier pour préparer des microcompartiments ou capsules.
- [0150] Selon un autre aspect de l'invention, un procédé de préparation de microcompartiments selon l'invention a également été développé par les inventeurs.
- [0151] Ainsi, un procédé de préparation d'un microcompartiment selon l'invention, particulièrement adapté, comprend les étapes suivantes :
 - a. mélanger des cellules, éventuellement préalablement incubées dans un milieu de culture,
 - b. encapsuler le mélange de l'étape (a) dans une couche externe d'hydrogel ;
 - c. cultiver les capsules obtenues à l'étape (b) dans un milieu de culture, préférentiellement dans un bioréacteur, préférentiellement pendant au moins 1 jour,

préférentiellement de 3 à 50 jours, et

d. optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus, caractérisé en ce que, lors de l'étape (a) et/ou lors de l'étape (b), est ajoutée une solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module d'Young est strictement inférieur au module d'Young de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe d'hydrogel.

[0152] De façon avantageuse, le procédé selon l'invention peut comprendre des étapes supplémentaires. Ainsi, préférentiellement, les cellules sont incubées préalablement à l'étape de mélange des cellules avec une solution d'hydrogel de module de Young inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe (ii) dans un milieu de culture adapté. Ledit milieu de culture comprend préférentiellement au moins un facteur cytoprotecteur, plus préférentiellement au moins un inhibiteur de l'apoptose.

[0153] 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, l'adhérence des cellules à la fibrine au moment de la formation de la couche externe d'hydrogel.

[0154] Le procédé selon l'invention peut comprendre une étape de dissociation des cellules par une dissociation chimique, enzymatique ou mécanique, préalablement ou simultanément mise en œuvre à l'étape d'incubation des cellules, elle-même effectuée préalablement à l'étape a) de mélange. Cette étape est particulièrement importante dans le cas de cellules adhérentes.

[0155] Les cellules encapsulées sont en suspension sous forme de cellules uniques et/ou d'amas de cellules. De façon préférée, les cellules uniques représentent moins de 50% en nombre de la totalité des cellules encapsulées, plus préférentiellement les cellules uniques sont des cellules hPSC. En effet il est préférable d'encapsuler des amas de cellules car cela diminue l'apparition de phénomène de mutagénèse.

[0156] Préférentiellement, l'étape b) d'encapsulation comprend les sous étapes suivantes :

- mettre en contact le mélange de l'étape (a) et une solution d'hydrogel destinée à former la couche externe (i) pour former au moins une goutte, et
- collecter la goutte obtenue dans un bain de calcium apte à rigidifier ladite solution d'hydrogel pour former la couche externe de chaque microcompartiment.

[0157] Une fois la couche externe en hydrogel rigidifiée par le bain de calcium, le microcompartiment est formé. Celui-ci peut alors être rincé. Avantageusement, le module de Young de l'hydrogel dans la partie interne, qui est inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe, permet d'éviter/de limiter la rigidification de l'hydrogel dans la partie interne par le bain de calcium. En particulier, étant donné, le module de Young de

l'hydrogel dans la partie interne strictement inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe, le processus de rigidification par le bain de calcium ne permet pas de rigidifier l'hydrogel dans la partie interne pendant la durée d'utilisation des capsules et donc de faciliter la multiplication cellulaire.

- [0158] Préférentiellement, l'étape b) est réalisée par une co-injection simultanée de la solution d'hydrogel destinée à former la couche externe (i), du mélange de l'étape a) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'un module de Young strictement inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe (ii), et optionnellement d'une solution intermédiaire (iii) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'un module de Young strictement inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe (ii) ; ladite co-injection est réalisée de manière concentrique via un injecteur microfluidique ou millifluidique formant un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange desdites solutions, ledit jet se fractionnant en gouttes.
- [0159] Lorsque la solution intermédiaire (iii) comprend la solution d'hydrogel d'un module de Young inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe (ii), ladite solution d'hydrogel (ii) n'est pas présente dans le mélange de l'étape a).
- [0160] Selon un objet préféré de l'invention, la solution intermédiaire isotonique est une solution de sorbitol.
- [0161] Selon un objet de l'invention, le diamètre d'ouverture finale de l'injecteur microfluidique est compris entre 50 et 800 μm , préférentiellement entre 80 et 240 μm , et le débit de chacune des solutions est compris entre 0,1 et 2000 mL/h, préférentiellement entre 10 et 2000 mL/h, plus préférentiellement entre 11 et 100 mL/h.
- [0162] Selon une variante, l'étape b) est réalisée par co-injection simultanée de la solution d'hydrogel destinée à former la couche externe (i), du mélange de l'étape a) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'un module de Young strictement inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe (ii), et optionnellement d'une solution intermédiaire (iii) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'un module de Young strictement inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe (ii) ; ladite co-injection est réalisée de manière concentrique via un injecteur microfluidique ou millifluidique, ledit injecteur comprenant une pointe, ladite pointe étant en contact avec une solution de calcium, formant un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange desdites solutions, ledit jet formant un tube.
- [0163] Lorsque la pointe de l'injecteur est en contact avec la solution de calcium, le diamètre d'ouverture finale de l'injecteur microfluidique est préférentiellement compris entre 50 et 1000 μm , plus préférentiellement entre 80 et 300 μm , et le débit de chacune des solutions est compris entre 1 et 100 mL/h.
- [0164] Selon une autre variante de l'invention, la partie interne comprenant la couche ou le maillage en hydrogel comprend également au moins un deuxième hydrogel distinct du

premier hydrogel constituant la couche ou le maillage de la partie interne, plus préférentiellement la fibrine. La fibrine est préférentiellement obtenue à partir de la polymérisation du fibrinogène par un agent de polymérisation du fibrinogène, avantageusement ledit agent est la thrombine, ledit agent peut être ajouté pendant l'encapsulation et/ou après l'encapsulation.

- [0165] Aussi, la solution de thrombine est co-injectée avec les autres solutions, celle-ci est préférentiellement mélangée avec la solution intermédiaire isotonique et la solution de fibrinogène est mélangée avec le mélange de l'étape a).
- [0166] Préférentiellement, la concentration du fibrinogène est comprise entre 10 et 25 mg/mL, préférentiellement 14-20 mg/mL, plus préférentiellement 20 mg/mL.
- [0167] Selon un autre objet de l'invention, la concentration de la thrombine est préférentiellement comprise entre 0.001U/mL et 2U/ml, plus préférentiellement entre 0.01U/mL et 1U/ml, entre 0.01U/mL et 0,05U/ml, encore plus préférentiellement 0,04U/ml. Par « U » on entend une unité d'activité enzymatique (soit la concentration pour une enzyme) qui représente la quantité d'enzyme nécessaire pour traiter une micromole de substrat en 1 minute. Etant entendu que la concentration indiquée est celle dans le mélange. En effet, avantageusement la thrombine est mélangée avec les autres constituants selon un ratio 1 :1. Aussi, au sein de la capsule, lorsque que la concentration de la thrombine, avant le mélange, est de 0.01U/ml, la concentration dans la capsule est de l'ordre de 0.01U/ml.
- [0168] Les étapes postérieures à l'encapsulation peuvent être mises en œuvre en l'absence d'agitation ou sous agitation. Préférentiellement, les étapes postérieures à l'encapsulation 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. Par conséquent, elle évite une augmentation de la mortalité cellulaire et/ou du stress oxydatif.
- [0169] Préférentiellement, après l'étape de culture des capsules obtenues, le procédé comprend une étape qui consiste à rincer les capsules issues de l'étape (d), avantageusement de manière à éliminer le facteur cytoprotecteur, tel que l'inhibiteur de l'apoptose.
- [0170] Lorsque, le procédé selon l'invention, comprend une étape de rinçage des capsules obtenues, la solution constituant le bain de calcium est éliminée et remplacée par un milieu adapté pour la culture des microcompartiments selon l'invention, préférentiellement une solution isotonique, plus préférentiellement un milieu de culture contenant un inhibiteur de l'apoptose. L'étape de rinçage des capsules obtenues est réalisée après l'étape d).

- [0171] Dans une variante préférée, le procédé selon l'invention comprend au moins une ré-encapsulation des cellules après l'étape (d), préférentiellement après l'étape de rinçage si une telle étape est présente après l'étape d). Par « au moins une ré-encapsulation des cellules », on entend 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 (d) 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.
- [0172] 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.
- [0173] Chaque ré-encapsulation peut comprendre :
- a. 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
 - b. une étape de ré-encapsulation de tout ou partie des cellules ou amas de cellules dans une capsule d'hydrogel.
- [0174] 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.
- [0175] Selon un mode de réalisation particulier la ré-encapsulation comprend les étapes suivantes :
- a. éliminer la couche externe en hydrogel,
 - b. 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,
 - c. encapsuler la suspension de cellules dans une couche d'hydrogel ;
 - d. 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 ;
 - e. préférentiellement, rincer les microcompartiments, avantageusement, de manière à éliminer l'inhibiteur de l'apoptose ;
 - f. cultiver les microcompartiments dans une solution isotonique, préférentiellement un milieu de culture, pendant au moins un cycle de division

cellulaire, et

g. optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus.

[0176] Kit selon l'invention

[0177] L'invention se rapporte également à un kit, ledit kit comprenant une solution d'hydrogel d'un module de Young strictement inférieur à celui de l'hydrogel de la couche externe (i) et une solution d'hydrogel d'un module de Young supérieur à celui de l'hydrogel de la couche ou du maillage de la partie interne destinée à former la couche externe (ii), éventuellement une solution intermédiaire (iii).

[0178] Selon un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation dudit kit destiné à la préparation d'un microcompartiment selon l'invention, ledit kit comprenant au moins une solution d'hydrogel destinée à former la couche externe du microcompartiment (ii) et une solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module d'Young est strictement inférieure à celui utilisé pour former la couche externe (i), et éventuellement une solution intermédiaire (iii). Préférentiellement, ledit kit comprend une solution d'hydrogel de faible poids moléculaire (i) et une solution d'hydrogel de haut poids moléculaire (ii), et éventuellement une solution intermédiaire (iii), en particulier l'hydrogel de faible poids moléculaire est inférieur à celui de l'hydrogel de haut poids moléculaire.

[0179] Selon un autre objet, l'invention concerne également un kit comprenant au moins une solution de d'alginate d'au plus 75kDa, une solution d'alginate compris entre 150 et 250 kDa, une solution isotonique, préférentiellement une solution de sorbitol, une solution de calcium, un milieu de culture adapté. Selon une variante, ledit kit est un kit of part.

[0180] L'invention est à présent illustrée par des exemples non limitatifs de compositions selon l'invention et par des résultats.

Exemples

[0181] Exemple 1 - Capsule selon un mode de réalisation de l'invention.

[0182] Cet exemple décrit un mode de réalisation particulier de l'invention, également représenté en [Fig.2], dans lequel la solution d'alginate à 0,5%, destinée à former la couche interne en alginate comme substitut de matrice, est ajouté dans la solution de sorbitol et co-injecté via l'injecteur microfluidique avec le mélange de cellules dans le milieu de culture, et avec la solution d'alginate à 2%, destinée à former la couche externe en alginate.

[0183] L'injecteur microfluidique permettant la co-injection des différentes solutions comprend trois lignes en amont de la buse. La solution comprenant le sorbitol et l'alginate à 0,5% est injectée dans une ligne « IS ». La solution d'alginate à 2%, et la suspension de cellules dans le milieu de culture, sont injectées respectivement une

ligne « A » et une ligne « CS », puis l'encapsulation est réalisée.

[0184] Une fois l'encapsulation réalisée, les gouttes sont recueillies dans le bain de CaCl_2 permettant la rigidification de l'alginate à 2% et la formation de la coque d'alginate formant le microcompartiment ou capsule. Cette solution de CaCl_2 comprenant les capsules est ensuite rincée avec un milieu de culture cellulaire dépourvu de sérum. La capsule présente alors les caractéristiques suivantes : une couche externe en alginate ayant un module de Young de l'ordre de 120kPa et une couche interne d'alginate (substitut de matrice) ayant un module de Young de l'ordre de 1kPa.

[0185] Exemple 2 - Capsule selon un mode de réalisation de l'invention.

[0186] Cet exemple décrit un mode de réalisation particulier de l'invention, également représenté en [Fig.3], dans lequel la solution d'alginate à 0,5% destinée à former la couche interne en alginate comme substitut de matrice est ajouté dans la solution de sorbitol et co-injecté via l'injecteur microfluidique avec le mélange de cellules dans le milieu de culture, et avec la solution d'alginate à 2% destinée à former la couche externe en alginate.

[0187] L'injecteur microfluidique permettant la co-injection des différentes solutions comprend trois lignes en amont de la buse. La solution comprenant le sorbitol et l'alginate à 0,5% est injectée dans une ligne « IS ». La solution d'alginate à 2%, et la suspension de cellules dans le milieu de culture, sont injectées respectivement une ligne « A » et une ligne « CS ». Dans ce mode de réalisation, la pointe de L'injecteur microfluidique est mise en contact dans la solution de calcium permettant l'encapsulation sous forme de tube.

[0188] Une fois l'encapsulation réalisée, les tubes sont recueillis dans le bain de CaCl_2 permettant la rigidification de l'alginate à 2% et la formation de la paroi d'alginate formant le tube. Cette solution de CaCl_2 comprenant les tubes est ensuite rincée avec un milieu de culture cellulaire dépourvu de sérum. Le tube présente alors les caractéristiques suivantes : une paroi externe en alginate ayant un module de Young de l'ordre de 120kPa et une couche interne d'alginate (substitut de matrice) ayant un module de Young de l'ordre de 1kPa.

[0189] Exemple 3 – Mesure de la viscosité de capsules selon l'invention et hors invention.

[0190] Dans le cadre de cet essai, les inventeurs ont utilisé une lignée cellulaire iPS qui a été générée selon les standards habituels de la culture iPS en deux dimensions, puis les cellules ont été décollées des flasques via l'action d'une enzyme, selon les connaissances de l'Homme du métier, et reprises dans du milieu de culture adapté à la culture d'iPS.

[0191] Les cellules iPS ont été mélangées dans un milieu de culture adapté, de façon à obtenir une densité de cellules de l'ordre de 1,5M/ml. La solution d'alginate à 0,5% destinée à former la couche interne en alginate comme substitut de matrice a été

mélangée avec une solution de sorbitol. Une solution d'alginate à 2% destinée à former la couche externe en alginate a également été préparée. Les différentes solutions ont ensuite été chargées via les lignes dédiées et co-injectées simultanément au moyen d'un injecteur microfluidique. La quantité de cellules encapsulées est de l'ordre de $0,6 \cdot 10^6$.

[0192] Le même protocole a été mis en œuvre afin d'obtenir des capsules dépourvues de matrice extracellulaire exogène et des capsules avec du Matrigel® à la différence que la solution de sorbitol est injectée seul et la solution d'alginate à 0,5% est remplacée par une solution de Matrigel®.

[0193] De J1 à J5 après l'encapsulation, les capsules sont vérifiées visuellement. A J5, l'aspect des cellules, la quantité de cellules, leur viabilité et la pluripotence est également observé.

[0194] La viscosité des constituants de chaque microcompartiment, a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre à bille roulante, mesurant la durée de roulement d'une bille à travers des liquides opaques et transparents selon le principe de la chute de bille de Höppler. Les résultats présentent la viscosité de chaque constituant présent dans chaque type de microcompartiment comprenant respectivement :

- une matrice extracellulaire de type Matrigel® (Hors Invention),
- une absence de matrice extracellulaire exogène ou de substitut de matrice extracellulaire, c'est-à-dire uniquement le milieu de culture (Hors Invention),
- une matrice extracellulaire de type alginate (Invention).

[0195] Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-après.

[0196] [Tableaux1]

Capsules/Matrices	Viscosité {à un taux de cisaillement = 60 s^{-1} }
Milieu de culture cellulaire	1.31 Po
Matrigel® à 4°C	22 Po
Alginate 0.5%	3.0961 Po

[0197] Les capsules comprenant uniquement du milieu de culture cellulaire, c'est-à-dire dépourvues de matrice extracellulaire exogène présentent la viscosité la plus faible, tandis que les capsules à base d'alginate à 0,5% ont une viscosité 2,3 fois plus élevée. Les capsules à base de Matrigel® présentent, quant à elle, la viscosité la plus élevée. Toutefois, le Matrigel® est un milieu très complexe, avec de forte variation de viscosité au sein de la matrice. Localement la viscosité peut être très élevée ou très faible, ce qui implique une viscosité très hétérogène au sein du Matrigel® et donc une forte hétérogénéité dans la formation des agrégats cellulaires au sein du Matrigel®. A

l'inverse, l'alginate présente une viscosité assez proche de celle du milieu de culture, favorisant la croissance des cellules. De plus, la viscosité est très homogène entraînant une bonne distribution des cellules au sein des capsules à base d'alginate.

[0198] Exemple 4 – Mesure du pourcentage de capsules vides.

[0199] Cet essai vise à comparer le taux d'ensemencement des capsules comprenant uniquement du milieu de culture, du Matrigel® ou de l'alginate à 0,5% (Invention). Les capsules sont préparées selon le procédé décrit dans l'exemple 3 et le pourcentage de capsule vide est mesuré à J0 selon la méthode suivante. 10 photos pour chaque condition sont réalisées. A l'aide d'un traitement logiciel, par exemple ImageJ, chaque photo est analysée afin de compter les capsules vides et pleines (au moins une cellule dans la capsule), puis le logiciel détermine le rapport entre les deux et multiplie celui-ci par 100 pour obtenir un pourcentage.

[0200] Les résultats sont présentés en [Fig.4]. Les inventeurs ont observé un meilleur ensemencement des cellules dans les capsules avec l'alginate à 0,5% par rapport au capsule de Matrigel® et capsule comprenant uniquement du milieu de culture cellulaire. Cette matrice à base d'alginate étant plus visqueuse, et la viscosité plus homogène, elle permet aux cellules de rester en suspension et donc de se répartir uniformément à l'intérieur de la capsule pendant le processus. A la différence, notamment des capsules comprenant le Matrigel®, matrice présentant une viscosité très hétérogène. Ainsi, peu de capsules selon l'invention sont dépourvues de cellules, ce qui démontre une meilleure capacité d'ensemencement des cellules dans les capsules selon l'invention et donc une plus grande proportion de capsules comprenant des cellules et donc par la suite des cystes, permettant leur utilisation par la suite, notamment en thérapie cellulaire.

[0201] Exemple 5 – Mesure de la taille des capsules et du nombre de cystes par capsule.

[0202] Cet essai vise à comparer des capsules comprenant uniquement du milieu de culture, du Matrigel® ou de l'alginate à 0,5% (Invention). Les capsules sont préparées selon le procédé décrit dans l'exemple 3. La taille des capsules est mesurée à J0, par exemple à l'aide du logiciel ImageJ comprenant un outil de sélection d'aire, et la quantité de cystes par capsule est mesurée à J0 selon la méthode décrite à l'exemple 4.

[0203] Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-après et en [Fig.5a], [Fig.5b], [Fig.5c], [Fig.6a], [Fig.6b], [Fig.6c].

[0204] [Tableaux2]

Capsules/matrice	Taille moyenne des capsules en μm^2	Nombre moyen de cystes détecté/Capsules
Milieu de culture cellulaire	359	2.43
Matrigel à 4°C	440	7.27
Alginate à 0.5%	429	5.25

[0205] Après 5 jours de culture, on observe des cellules mortes à l'intérieur de certaines capsules lorsqu'elles sont cultivées sans matrice, rendant la couche externe du cyste un peu irrégulière. Dans les capsules à base de Matrigel®, les cellules se développent rapidement et plus ou moins chaque capsule est remplie d'un agrégat, plusieurs agrégats peuvent également être observés dans les mêmes capsules et ils ont tendance à fusionner pour former un agrégat plus grand. La couche externe du cyste est lisse et sans cellules mortes. Dans les capsules à base d'alginate à 0,5%, les inventeurs ont également observé plusieurs agrégats dans les mêmes capsules, moins de cellules mortes par rapport à la condition sans matrice. mais une structure plus petite par rapport au Matrigel®. Le lumen est toujours visible après 5 jours de culture. La taille moyenne des capsules à base de Matrigel® et à base d'alginate à 0,5% est similaire permettant aux cellules de se multiplier correctement. Enfin, les inventeurs ont observé un plus grand nombre de cystes dans les capsules à base d'alginate que les capsules à base de milieu de cellulaire.

[0206] Exemple 6 – Mesure de l'amplification et de la pluripotence après 5 jours de culture.

[0207] Cet essai vise à comparer des capsules comprenant uniquement du milieu de culture, des capsules à base de Matrigel® ou des capsules à base d'alginate à 0,5% (Invention). Les capsules sont préparées selon le procédé décrit dans l'exemple 3. L'amplification et la pluripotence des cellules présentent dans chaque type de capsule est mesurée à J5 selon la méthode suivante. Le rapport du nombre de cellules encapsulées à J0 avec le nombre de cellules obtenues (et vivantes) à J5 est déterminé. A J5, les capsules sont dissoutes et les agrégats dissociés, puis les cellules sont comptées.

[0208] Les résultats sont présentés en [Fig.7].

[0209] A J7, les inventeurs ont observé une meilleure amplification des cellules cultivées dans les capsules à base d'alginate 0.5% comparé aux cellules cultivées dans les capsules sans matrice. Dans les capsules à base de Matrigel®, le facteur d'amplification est plus élevé que dans les deux autres conditions mais la variabilité entre les expériences est également beaucoup plus élevée, ce qui est incompatible avec l'utilisation de cette technologie en clinique.

- [0210] En ce qui concerne la pluripotence, à J7, les inventeurs ont également observé un pourcentage moyen de cellules positives pour Oct4/Nanog dans l'alginate 0.5% plus faible par rapport à la condition Matrigel®, mais plus élevé par rapport à la condition sans matrice. La variabilité d'une expérience à l'autre est également réduite avec l'alginate 0.5%.
- [0211] Par conséquent, les capsules selon l'invention protègent les cellules et agrégats des contraintes mécaniques d'une culture en bioréacteur, avec l'apport de la coque protectrice d'une part mais aussi avec l'hydrogel comme substitut de matrice dans la capsule qui fournit un maillage protecteur supplémentaires aux cellules et agrégats. Ce maillage est suffisamment lâche pour permettre également la migration et l'amplification des cellules tout en maintenant leur caractère pluripotent.

Revendications

- [Revendication 1] Microcompartiment cellulaire en trois dimensions comprenant :
- une couche externe en hydrogel, et
 - une partie interne comprenant au moins une cellule et au moins une couche ou un maillage en hydrogel d'origine végétale ou synthétique, ledit microcompartiment ne comprenant pas de cellules souches embryonnaires d'êtres humains,
- caractérisé en ce que le module de Young de l'hydrogel dans la partie interne est strictement inférieur au module de Young de l'hydrogel de la couche externe.
- [Revendication 2] Microcompartiment cellulaire selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la couche ou le maillage en hydrogel de la partie interne est juxtaposé au moins partiellement à la face interne de la couche externe.
- [Revendication 3] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le module de Young de l'hydrogel dans la partie interne est compris entre 0,01 et 200kPa, préférentiellement de 0,1 et 60 kPa.
- [Revendication 4] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le module de Young de l'hydrogel dans la partie interne est compris entre 0,1 et 5kPa.
- [Revendication 5] Microcompartiment cellulaire selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le module de Young de l'hydrogel de la couche externe est supérieur à 10kPa, préférentiellement supérieur à 60kPa.
- [Revendication 6] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'hydrogel de la couche externe et/ou dans la partie interne est de l'alginate ou comprend au moins de l'alginate.
- [Revendication 7] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la partie interne comprend également au moins un milieu de culture.
- [Revendication 8] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la partie interne comprend au moins une couche de cellules.
- [Revendication 9] Microcompartiment cellulaire selon la revendication précédente caractérisé en ce que la couche ou le maillage en hydrogel de la partie interne est agencée entre la couche externe en hydrogel et ladite au

- moins une couche de cellules.
- [Revendication 10] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la couche ou maillage en hydrogel de la partie interne comprend au moins une séquence peptidique.
- [Revendication 11] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la couche ou maillage en hydrogel de la partie interne, en plus de l'hydrogel d'origine végétale ou synthétique comprend au moins un autre hydrogel choisi parmi la fibrine, le collagène, la fibronectine, l'entactine, l'acide hyaluronique, et la laminine.
- [Revendication 12] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le microcompartiment est clos.
- [Revendication 13] Microcompartiment selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que le microcompartiment à la forme d'un ovoïde, d'un cylindre, d'un sphéroïde, d'une sphère ou d'une larme.
- [Revendication 14] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la ou les cellules présentes dans la partie interne sont choisies parmi les cellules eucaryotes humaines, animales et végétales.
- [Revendication 15] Microcompartiment cellulaire selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que la ou les cellules présentes dans la parties interne sont des cellules pluripotentes et/ou des progéniteurs et/ou des cellules en cours de différenciation et/ou des cellules différenciées.
- [Revendication 16] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la partie interne du microcompartiment comprend au moins une couche de cellules et au moins une lumière, et en ce que la couche de cellules, la couche ou maillage en hydrogel de la partie interne et la couche externe sont successivement organisées autour de ladite lumière.
- [Revendication 17] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la partie interne du microcompartiment comprend au moins un agrégat de cellules et/ou un micro tissu cellulaire en trois dimensions.
- [Revendication 18] Ensemble de microcompartiments cellulaires en trois dimensions, caractérisé en ce qu'au moins un microcompartiment est un microcompartiment selon l'une des revendications précédentes.
- [Revendication 19] Microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 1 à 17 ou

ensemble de microcompartiments cellulaires selon la revendication 18 pour son utilisation comme médicament.

[Revendication 20] Utilisation d'un microcompartiment selon l'une des revendications 1 à 17 ou ensemble de microcompartiments cellulaires selon la revendication 18 pour fabriquer des micro tissus

[Revendication 21] Procédé de préparation d'un microcompartiment cellulaire selon l'une des revendications 1 à 17, comprenant les étapes suivantes :

- a. mélanger des cellules, éventuellement préalablement incubées dans un milieu de culture,
- b. encapsuler le mélange de l'étape (a) dans un hydrogel destiné à former la couche externe d'hydrogel
- c. cultiver les capsules obtenues à l'étape (b) dans un milieu de culture, préférentiellement dans un bioréacteur, préférentiellement pendant au moins 1 jour, encore plus préférentiellement de 3 à 50 jours, et
- d. optionnellement récupérer les microcompartiments cellulaires obtenus,

caractérisé en ce que, lors de l'étape (a) et/ou lors de l'étape (b), est ajoutée une solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieur au module de Young de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe d'hydrogel.

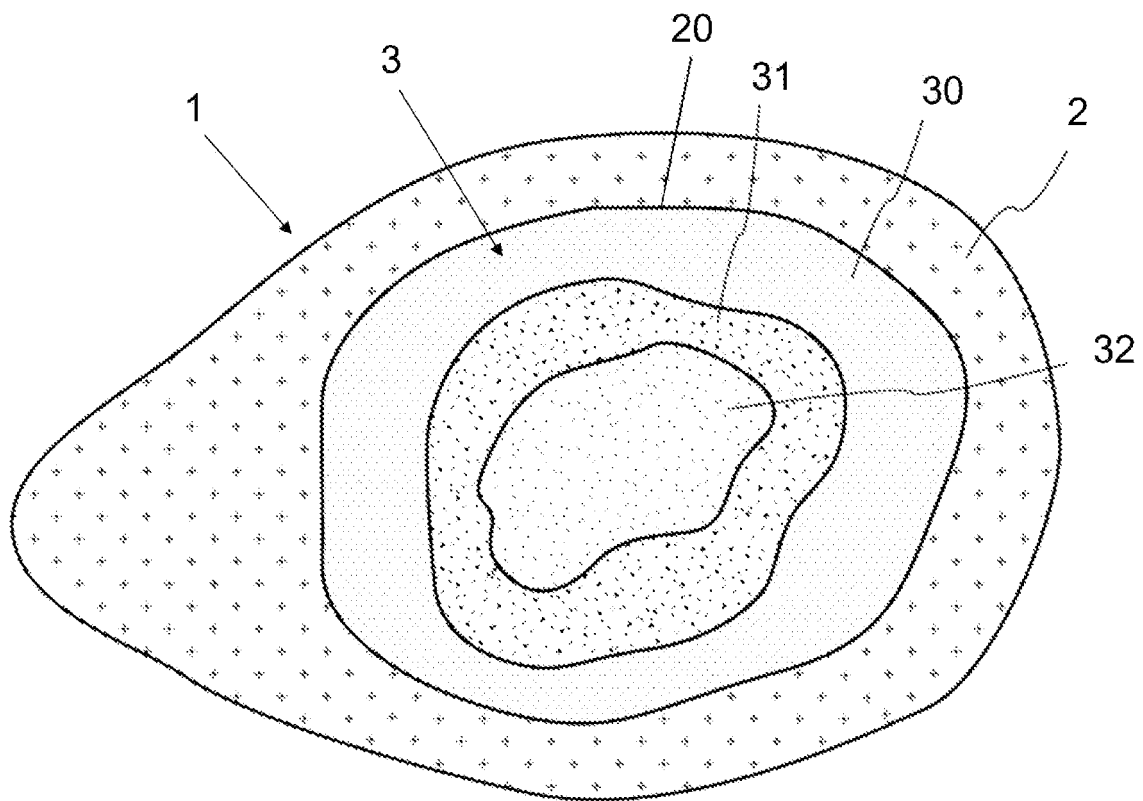
[Revendication 22] Procédé selon la revendications précédente, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée par co-injection simultanée d'une solution d'hydrogel destinée à former la couche externe (i), du mélange de l'étape a) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieure à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe (ii), et optionnellement d'une solution intermédiaire (iii) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieur à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe ; ladite co-injection est réalisée de manière concentrique via un injecteur microfluidique ou millifluidique formant un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange desdites solutions, ledit jet se fractionnant en gouttes.

[Revendication 23] Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le diamètre d'ouverture finale de l'injecteur microfluidique est compris

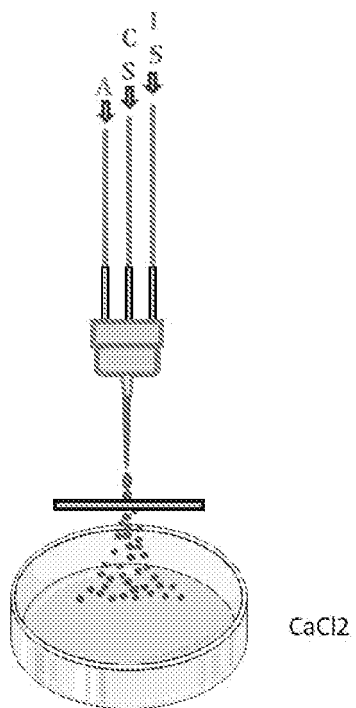
entre 50 et 800 μm , préférentiellement entre 80 et 240 μm , et le débit de chacune des solutions est compris entre 10 et 2000 mL/h, préférentiellement entre 11 et 100 mL/h.

- [Revendication 24] Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée par co-injection simultanée de la solution d'hydrogel destinée à former la couche externe (i), du mélange de l'étape a) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieur à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe (ii), et optionnellement d'une solution intermédiaire (iii) comprenant éventuellement la solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieur à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe ; ladite co-injection est réalisée de manière concentrique via un injecteur microfluidique ou millifluidique, ledit injecteur comprenant une pointe, ladite pointe étant en contact avec une solution de calcium, formant un jet en sortie d'injecteur constitué du mélange desdites solutions, ledit jet formant un tube.
- [Revendication 25] Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le diamètre d'ouverture finale de l'injecteur microfluidique est compris entre 50 et 1000 μm , préférentiellement entre 80 et 300 μm , et le débit de chacune des solutions est compris entre 1 et 100 mL/h.
- [Revendication 26] Utilisation d'un kit destiné à la préparation d'un microcompartiment selon l'une des revendications 1 à 17, ledit kit comprenant au moins une solution d'hydrogel destinée à former la couche externe du microcompartiment (i) et une solution d'hydrogel d'origine végétale ou synthétique dont le module de Young est strictement inférieur à celui de l'hydrogel utilisé pour former la couche externe (ii).

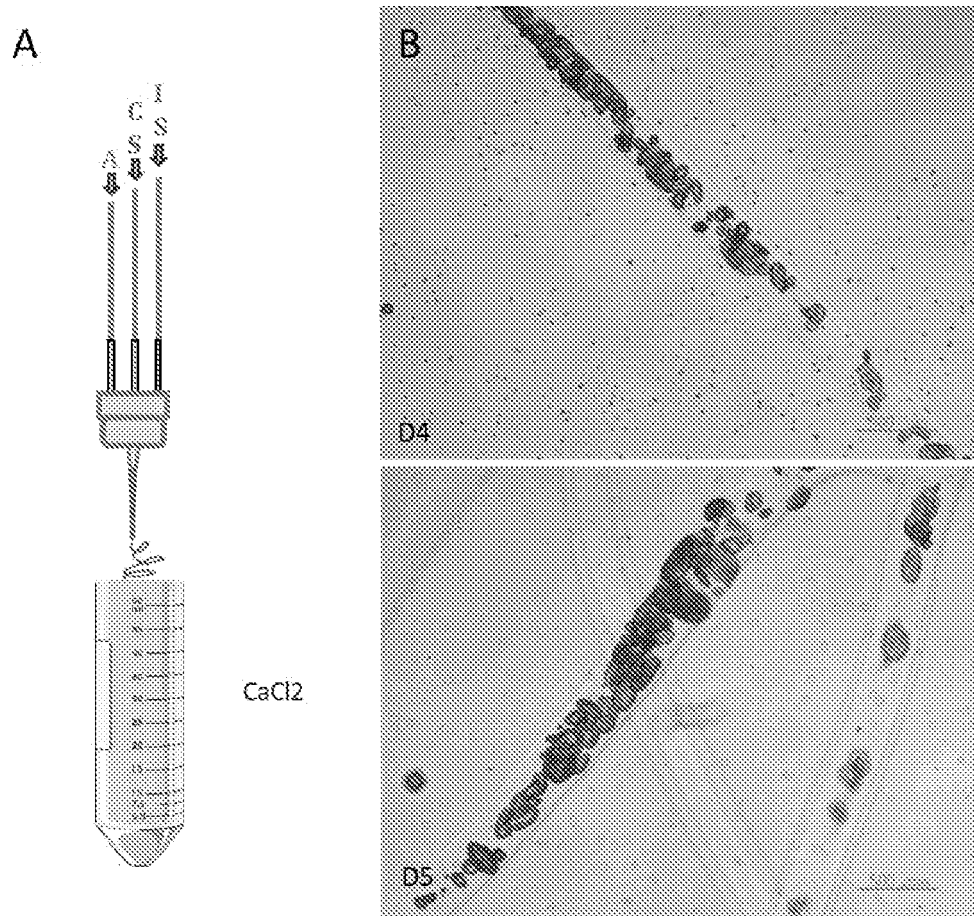
[Fig. 1]



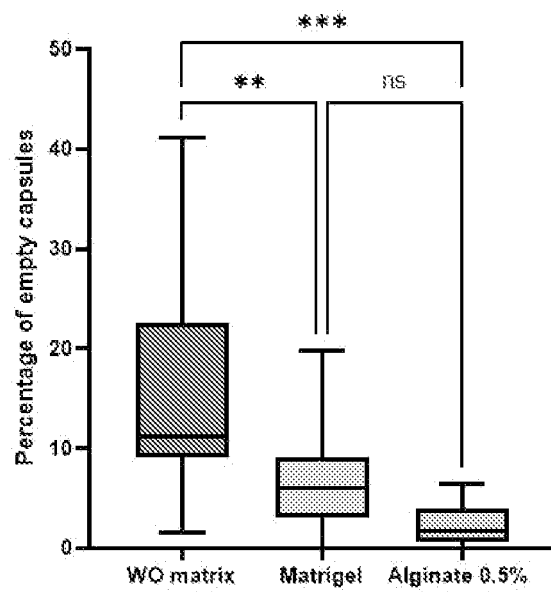
[Fig. 2]



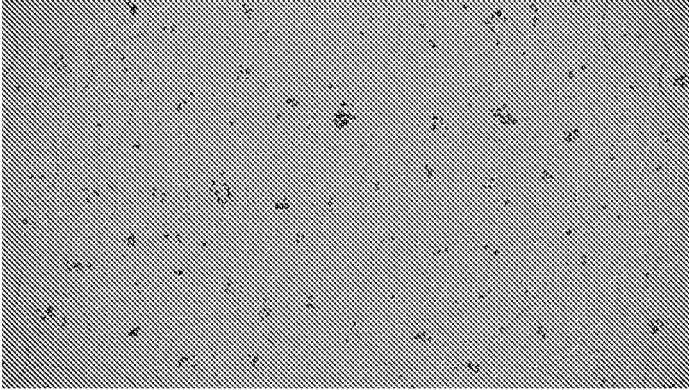
[Fig. 3]



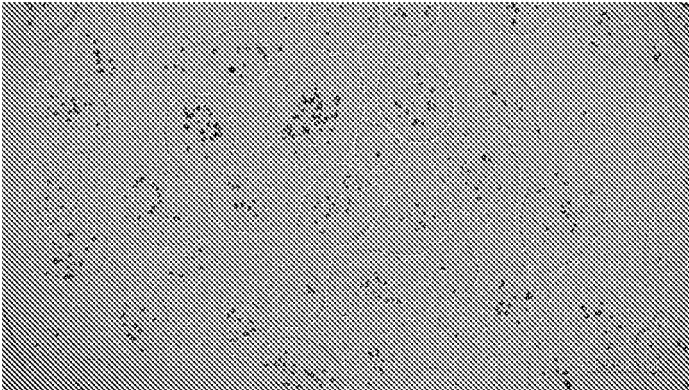
[Fig. 4]



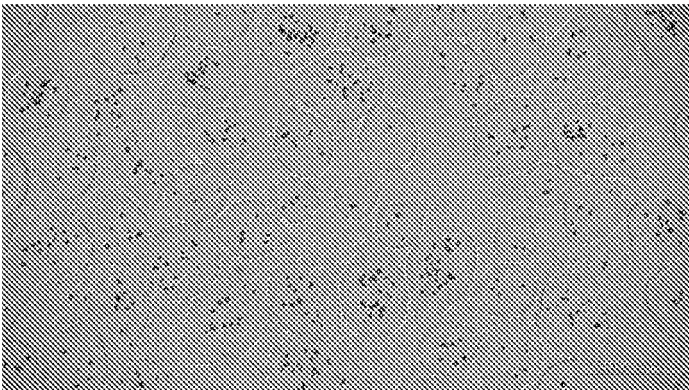
[Fig. 5a]



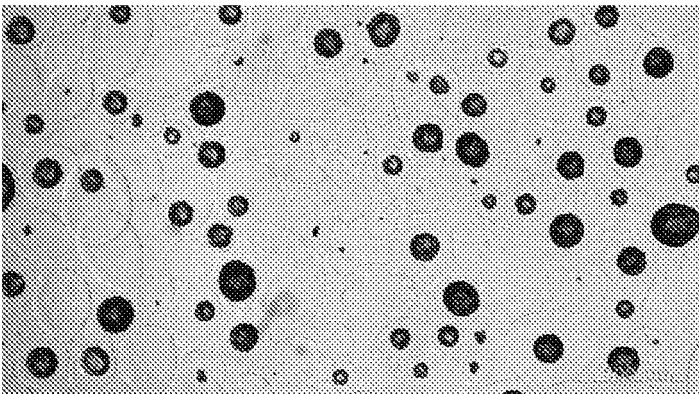
[Fig. 5b]



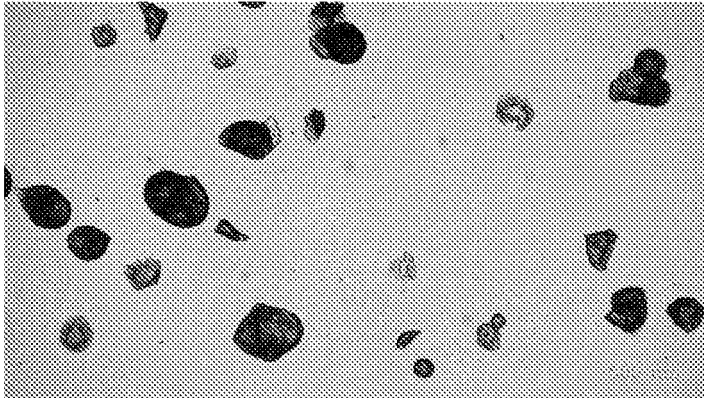
[Fig. 5c]



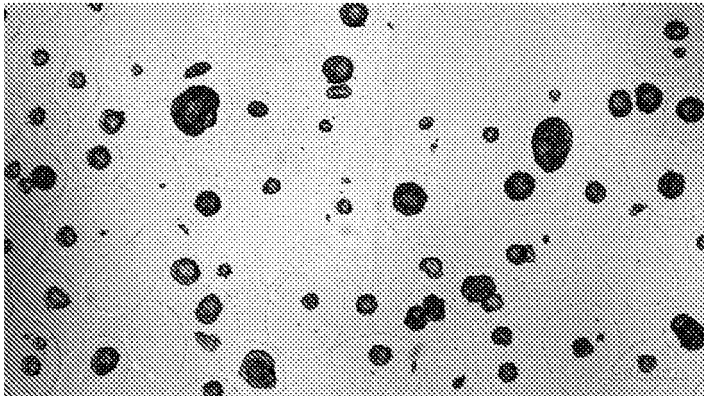
[Fig. 6a]



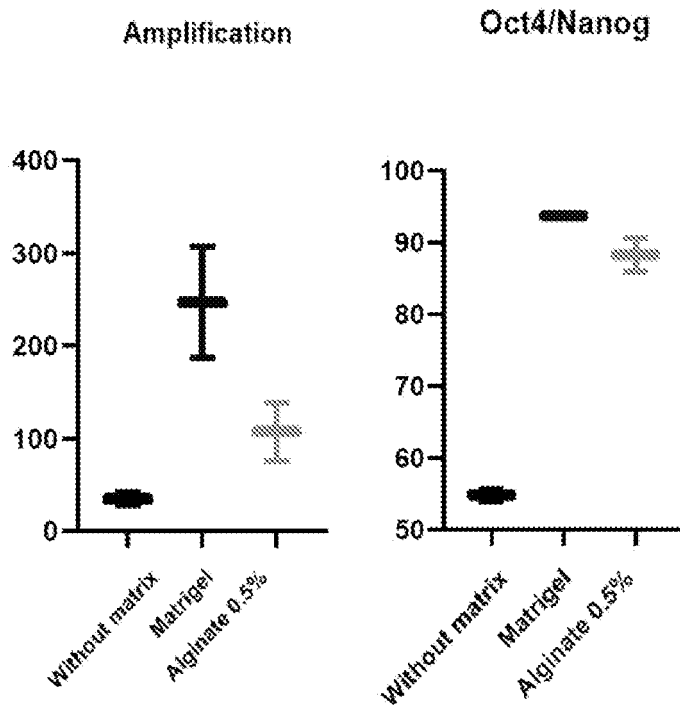
[Fig. 6b]



[Fig. 6c]



[Fig. 7]



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 913461
FR 2211873

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 2021/048250 A1 (FUNDACIO INST DE BIOENGINEYERIA DE CATALUNYA [ES]) 18 mars 2021 (2021-03-18) * exemple 1 * -----	1-26	C12N5/071 C12N5/074 C12N5/0735 C12N5/02 C12N11/04 A61K35/12
X	WO 2021/216789 A1 (UNIV MARYLAND [US]) 28 octobre 2021 (2021-10-28) * exemple 1 * -----	1-26	
X	KHANNA OMADITYA ET AL: "Synthesis of multilayered alginate microcapsules for the sustained release of fibroblast growth factor-1", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A, vol. 95A, no. 2, 1 novembre 2010 (2010-11-01), pages 632-640, XP093048544, US ISSN: 1549-3296, DOI: 10.1002/jbm.a.32883 Extrait de l'Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/artic les/PMC2944012/pdf/nihms214745.pdf> * matériel et méthodes * -----	1-26	
X	SOMO SAMI I. ET AL: "Dual Crosslinking of Alginate Outer Layer Increases Stability of Encapsulation System", FRONTIERS IN CHEMISTRY, vol. 8, 12 novembre 2020 (2020-11-12), XP093048709, DOI: 10.3389/fchem.2020.575278 * matériel et méthodes; figure 2 * ----- -/--	1-26	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 mai 2023		Trommsdorff, Marion	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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			

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 913461
FR 2211873

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	KHANNA O ET AL: "Multilayered microcapsules for the sustained-release of angiogenic proteins from encapsulated cells", AMERICAN JOURNAL OF SURGERY, PAUL HOEBER, NEW YORK, NY, US, vol. 200, no. 5, 1 novembre 2010 (2010-11-01), pages 655-658, XP027472747, ISSN: 0002-9610, DOI: 10.1016/J.AMJSURG.2010.08.001 [extrait le 2010-11-04] * matériel et méthodes; figure 1 *	1-26	
X,D	WO 2018/096277 A1 (UNIV BORDEAUX [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR] ET AL.) 31 mai 2018 (2018-05-31) * exemples 1, 2 *	1-26	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 mai 2023		Trommsdorff, Marion	
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)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE **RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2211873 FA 913461**

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 **23-05-2023**
 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
WO 2021048250 A1	18-03-2021	CN	116075326 A	05-05-2023
		EP	3993843 A1	11-05-2022
		US	2022151942 A1	19-05-2022
		WO	2021048250 A1	18-03-2021

WO 2021216789 A1	28-10-2021	AUCUN		

WO 2018096277 A1	31-05-2018	AU	2017365846 A1	16-05-2019
		BR	112019010512 A2	17-09-2019
		CA	3040781 A1	31-05-2018
		CL	2019001378 A1	10-01-2020
		CN	110603319 A	20-12-2019
		EP	3545080 A1	02-10-2019
		FR	3059009 A1	25-05-2018
		IL	266777 A	31-07-2019
		JP	7154525 B2	18-10-2022
		JP	2019535326 A	12-12-2019
		JP	2022166041 A	01-11-2022
		KR	20190111013 A	01-10-2019
		US	2019330589 A1	31-10-2019
		US	2023117999 A1	20-04-2023
		WO	2018096277 A1	31-05-2018
