

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

**N° 82 03159**

---

⑤④ Support pour cultures cellulaires, ensemble de culture comportant un tel support et procédé pour cultiver des cellules en présence de ce support.

⑤① Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 N 5/02; C 12 M 3/00.

②② Date de dépôt..... 25 février 1982.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 34 du 26-8-1983.

---

⑦① Déposant : INSTITUT PASTEUR, établissement déclaré d'utilité publique et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. — FR.

⑦② Invention de : Gilles Marchal et Jean-Claude Benichou.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Harlé et Phélip,  
21, rue de la Rochefoucauld, 75009 Paris.

La présente invention concerne le domaine des cultures cellulaires; elle a trait plus précisément à un nouveau support pour cultures cellulaires, à un ensemble comprenant un milieu de culture et un tel support ainsi qu'à un procédé  
5 pour cultiver des cellules en présence dudit support.

Il est bien connu d'utiliser pour la croissance cellulaire, des supports, qui sont habituellement en verre ou en matière plastique.

A titre d'exemple on peut mentionner les plaques  
10 pour culture connues sous la désignation commerciale "FALCON" et qui ont fait par exemple l'objet du brevet US 3.472.369.

On peut également citer les plaques dites "Greiner-Terasaki", les boîtes de Pétri, les boîtes de Roux en verre  
15 borosilicate, et autres moyens connus de l'homme de l'art pour cultiver des cellules.

Tous ces supports sont des supports autonomes rigides. On connaît également des micros supports constitués de billes de dextrane.

20 Par ailleurs, la demande de brevet FR 77 24 421 (publication n° 2.400.063) au nom de l'Institut Pasteur décrit l'application sur des supports de base d'une solution d'un plastique thermodurcissable pour obtenir un revêtement rigide.

Tous les supports selon l'art antérieur nécessitent  
25 un traitement particulier pour les rendre non toxiques et par conséquent aptes à la croissance cellulaire. Il s'agit soit d'un traitement de surface soit d'un traitement en profondeur, par exemple, dans le cas de supports en matière plastique.

30 Ces traitements sont aléatoires, la qualité d'un lot à un autre varie et de nombreuses incertitudes subsistent au cours d'une manipulation, incertitudes qui ne sont pas tolérables car les manipulations sont longues et coûteuses.

En outre tous les supports connus tant en raison de  
35 leur matière constitutive que du coût du traitement pour les rendre non toxiques sont d'un prix de revient très élevé.

La présente invention propose un nouveau support pour cultures cellulaires qui n'est pas toxique et qui supprime donc le besoin d'effectuer soit un traitement de surface, soit un traitement en profondeur.

5 Le support selon la présente invention est d'un prix de revient extrêmement bas et permet une grande souplesse d'utilisation car sa forme et sa configuration peuvent varier à volonté.

10 Conformément à la présente invention, le support pour cultures cellulaires comprend un élastomère silicone transparent et souple.

En général, et selon un mode préféré de réalisation, l'élastomère silicone est du type bicomposant. Il est alors formé après mise en présence des deux composants.

15 Le rapport en parties en poids entre les deux composants de l'élastomère silicone transparent et souple se situe alors dans la gamme de 85 à 95 parties pour 5 à 15 parties du premier composant par rapport au second.

20 Le produit préféré selon la présente invention est un produit du commerce connu sous la dénomination Rhodorsil RTV 141 (Rhône Poulenc Industries France) constitué de deux composants savoir:

Rhodorsil RTV 141 A et Rhodorsil RTV 141 B.

Les caractéristiques de ce produit sont les suivantes:

25	<u>-1- AVANT CATALYSE</u>	<u>RHODORSIL</u>	
		<u>RTV 141 A</u>	<u>RTV 141 B</u>
	Aspect	Liquide visqueux	
	Couleur	transparent	
	Densité à 25°C, environ	1,0	1,020
30	(norme ASTM D 792)		
	Viscosité à 25°C,		
	mPa.s, environ	3000	500
	<u>-2-CATALYSE</u>		
	RHODORSIL RTV 141 A		100 parties
35	RHODORSIL RTV 141 B		10 parties
	Durée d'utilisation du mélange catalysé à 25°C, environ		4 heures
	Temps après lequel l'élastomère (ou l'objet) est manipulable, environ		24 heures

-3-APRES RETICULATION

Mesures effectuées sur film de 2 mm d'épaisseur après réticulation de 24 heures à 25°C.

3.1 Propriétés mécaniques

5	Dureté Shore A, points, environ (Norme AFNOR T 46 003)	45
	Résistance à la rupture, MPa, environ (Norme AFNOR T 46 002)	6,0
10	Allongement à la rupture, %, environ (Norme AFNOR T 46 002)	130

3.2 Propriétés physiques

	Retrait linéaire, %, environ	de l'ordre de 0,1
	Coefficient de dilatation cubique, environ	$9.10^{-4}$
15	Conductibilité thermique, W/m.K, environ	0,16
	Température de fragilité, °C, environ (Norme ASTM D 746)	-100
	Tenue thermique en pointe, °C, environ	+200

20 Il va sans dire que l'exemple ci-dessus n'est nullement limitatif et qu'on peut utiliser, aux fins de l'invention des élastomères de silicone multi-composants, autres que les systèmes à deux composants précités.

25 Le support de la présente invention, constitué dudit élastomère silicone peut être moulé à volonté dans tous moules appropriés.

Dans un mode de réalisation, il se présente sous la forme d'une plaque ou d'un film.

30 Selon un autre mode de réalisation il se présente sous forme de billes.

Lorsque le support est sous la forme d'une plaque ou d'un film dont la configuration peut varier à volonté, la surface supérieure peut être lisse.

35 Toutefois selon un mode préféré de réalisation la surface supérieure de la plaque est munie d'une pluralité de microcupules.

Chaque microcupule présente, de préférence, une forme en tronc de pyramide évasé.

La dimension des côtés de chaque microcupule varie sensiblement dans la gamme de 10 microns à 1,5 mm d'une façon  
5 préférée.

Le support est appliqué soit comme revêtement amovible non toxique dans un support de base constitué d'un substrat de verre, d'une quelconque matière plastique ou analogue soit en tant que support de base non toxique.

10 La présente invention est également relative à un ensemble pour cultures cellulaires comprenant a) un milieu de culture connu en soi et adapté aux cellules à cultiver et b) un support tel que ci-dessus défini.

Enfin la présente invention se rapporte aussi à un  
15 procédé de culture cellulaire en présence d'un tel support pour les cellules et d'un milieu de culture.

Divers avantages et caractéristiques de la présente invention ressortiront de la description détaillée ci-après faite en regard des dessins annexés sur lesquels:

20 Fig.1 est une vue en perspective d'une première forme de réalisation d'un support selon la présente invention dont la surface supérieure est munie d'une pluralité de microcupules;

Fig.2 est une vue analogue à celle de la figure 1  
25 illustrant un support dont la surface supérieure présente des microcupules de plus grandes dimensions que celles de la figure 1;

Fig.3 illustre un support selon la présente invention dont la surface supérieure est lisse;

30 Fig.4 représente très schématiquement un support selon la présente invention sous forme de billes;

Fig.5 montre à échelle agrandie et en coupe la structure de microcupules préférées ayant une forme en tronc de pyramide.

35 Aux dessins annexés, on a représenté, à titre d'exemples non limitatifs quelques modes de réalisation du support selon la présente invention qui est constitué d'un élastomère

silicone transparent et souple.

Le support 1 de la figure 1 est un microsupport dont la surface supérieure 2 présente une pluralité de microcupules 3. Dans l'exemple considéré il est prévu 400 microcupules  
5 contenus dans un carré sensiblement de 3 cm de côté. Les microcupules 3 ont la forme illustrée sur la figure 5 c'est-à-dire une forme en tronc de pyramide.

Le support 1 selon la figure 2 est un support de plus grande dimension schématisé sous forme d'un rectangle et  
10 dont la surface supérieure 2 renferme, par exemple, 240 microcupules 3 de plus grandes dimensions que celles de figure 1 mais qui ont également une forme en tronc de pyramide.

La figure 3 illustre un support 1 dont la surface  
15 supérieure 2 est lisse. Un tel support se présente sous forme d'un film souple qui sera utilisé tel quel ou qui sera appliqué dans un support de base connu tel que, par exemple, une boîte de Pétri.

La figure 4 illustre un support 1 sous forme de billes  
20 4.

L'invention est encore illustrée par les exemples non limitatifs suivants:

#### EXEMPLE 1

Obtention d'un support à surface lisse.  
25 On mélange à la main 90 parties de Rhodorsil RTV 141 A avec 10 parties de Rhodorsil RTV 141 B. Ces deux produits sont commercialisés par la Société Rhône Poulenc Industries France. Ils sont d'un aspect sirupeux. Le mélange terminé, on le dégaze sous vide d'une manière classique.  
30 On coule ensuite ledit mélange à température ambiante dans n'importe quel substrat approprié de forme quelconque. Dans le présent exemple on a utilisé une boîte de Pétri. On accélère la polymérisation en plaçant ledit mélange dans une étuve portée à 60°C environ, on retire le produit de  
35 l'étuve et on l'introduit pendant 2 heures dans une autre étuve dont la température est de 160°C. Le produit obtenu se présente sous forme d'un film ayant une épaisseur de



EXEMPLE 2-

Obtention d'un support muni d'une pluralité de microcupules.

5 On prépare un moule mère soit métallique soit en matière plastique rigide à partir duquel on obtient à volonté différentes matrices secondaires comme cela est bien connu dans la technique.

10 On mélange à la main comme dans l'exemple 1 ci-dessus 90 parties en poids de Rhodorsil RTV 141 A avec 10 parties en poids de Rhodorsil RTV 141 B.

20 On coule le produit dans le moule constitué par une matrice secondaire. On dégaze sous vide de façon habituelle dans une enceinte à vide pendant 5 à 10 minutes. On repasse ensuite le produit à l'étuve à 60°C pendant 2 à 3 heures afin qu'il polymérise. On démoule. Pour bien terminer la polymérisation on le repasse encore au four à 160°C. Le produit est exempt de résidu libre et est stérilisé en même temps. Il se présente sous forme d'une plaque souple de dimensions variables et fonction du moule utilisé. La surface supérieure de la plaque est pourvue d'une pluralité de microcupules dont le nombre et la dimension peuvent varier à volonté selon le moule de base utilisé. Comme on l'a déjà mentionné on préfère, selon la présente invention, que les microcupules présentent une forme en tronc de pyramide. 25 Toutefois, il est possible que lesdits microcupules présentent d'autres formes géométriques par exemple cylindriques, en forme de troncs de cône et analogues. De préférence encore la densité des microcupules sur la surface supérieure de la plaque est très importante et couvre toute ladite surface supérieure. Il n'est cependant pas exclu de réaliser une 30 plaque pourvue de microcupules à emplacements déterminés et choisis au préalable.

La dimension des microcupules est fonction du moule mère utilisé. Dans le cas d'un moule métallique la dimension 35 limite susceptible d'être obtenue est de l'ordre d'une dizaine de microns, tandis que dans le cas d'un moule mère en matière plastique la dimension limite des microcupules obte-

nues est de l'ordre du millimètre. Ainsi la dimension d'un côté varie de 0,5 à 1,5 mm.

Le support ainsi obtenu qui dans le cas d'une très petite dimension de la plaque est un micro-support peut être  
5 utilisé directement comme support non toxique pour cultures cellulaires.

A cet effet, on introduit dans ledit support, comme cela est habituel, le milieu à l'aide d'une microseringue.

### EXEMPLE 3

10 Obtention d'un support sous forme de billes.

1) On reprend le mode opératoire selon l'exemple 2 si ce n'est que l'élastomère silicone souple final est moulé dans deux cavités hémisphériques pourvues d'un évent de libération des gaz. Les billes obtenues ont une dimension  
15 variant à volonté fonction des dimensions des cavités de moulage.

2) Des billes de petites dimensions (diamètre compris entre 0,1 micron et quelques millimètres) sont obtenues par suspension du composé élastomère silicone préparé selon  
20 l'exemple 2, dans une solution aqueuse sous agitation. Le contrôle de la vitesse d'agitation et d'injection du composé permet d'obtenir des billes dans une gamme de taille choisie. La polymérisation s'effectue directement dans la solution aqueuse chauffée.

### 25 EXEMPLE 4

Application directe du support selon l'exemple 2 sans l'utilisation de microseringues.

Le support selon l'exemple 2 est autoclavé à l'envers dans de l'eau distillée c'est-à-dire que sa surface  
30 supérieure est tournée vers le bas. On fait le vide dans l'autoclave, on admet de la vapeur pendant 20 minutes, on fait le vide pendant 20 minutes en produisant une évaporation de liquide, les microcupules sont chargées d'eau, on fait un rinçage du support avec le milieu de culture de façon à faire  
35 un échange avec l'eau et éviter les problèmes de bulles d'air, directement sur le support lavé avec le milieu de culture. On place les cellules qui sont dans le milieu de culture, elles se répartissent au hasard. Après trois ou quatre

jours de culture, on observe des colonies dans chaque micro-cupule.

#### EXEMPLE 5

Application du support selon la figure 3 pour cultiver des macrophages péritonéaux.

On recouvre le fond de boîtes de Pétri en verre au borosilicate d'un film circulaire de 3 mm d'épaisseur selon la figure 3 et on stérilise en chauffant 2 heures à 160°C.

On prépare des cellules péritonéales à partir de souris souche C<sub>57</sub>B1/6 ♀ (femelles).

On rince avec du liquide Hanks (5 ml).

On effectue un lavage à 1000 t/minute/4°C/10 minutes.

On effectue ensuite une reprise du culot de cellules avec du milieu Eagle contenant 5% de sérum de veau foetal. On a 5 x 10<sup>6</sup> cellules/boîtes dans 20 ml de milieu.

On constate un étalement très convenable des macrophages.

#### EXEMPLE 6

Application du support selon la figure 3 pour A-étalement des macrophages B-transformation des lymphocytes péritonéaux avec la concanavaline A

A- On prépare comme dans l'exemple 5 des boîtes de Pétri dans lesquelles on place le film support en élastomère silicone transparent et souple.

On prélève des cellules péritonéales de souris souche C<sub>57</sub> B1/6 ♀, on rince avec du liquide de Hanks à raison de 5 ml, on effectue un lavage et on reprend le culot avec du milieu Eagle renfermant 5% de sérum de veau.

La mise en culture est effectuée sur la base de 8 x 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> avec une densité analogue en surface -en boîte "Falcon"

-en boîte Pétri avec le revêtement de film support selon l'invention.

On constate après 6 heures un étalement identique des macrophages.

B- transformation des lymphocytes péritonéaux en présence de concanavoline A (3 µg/ml final)

application : 12,5 ml sur boîte de Pétri + film support de l'invention

5 5 ml sur boîte Falcon au taux de  $5 \cdot 10^5$  cellules/ml.

Les résultats obtenus sont les suivants:

	Boîte Falcon	Support de l'invention
Quantité	$2,5 \times 10^6$ cellules	$6,25 \times 10^6$ cellules
Cellules surnageantes à 48 h	$4,5 \times 10^5$ cellules (18%)	$1,43 \times 10^6$ cellules (23%)
Tapis adhérent 48 h	$6,6 \times 10^5$ cellules (26%)	$1,12 \times 10^6$ cellules (18%)
(après 0,01% EDTA : 60 min à 4°C)		
Nigrosine +	3%	67%
Pourcentage de cellules blastiques après coloration	80 à 85%	85% avec mitoses

20 EXEMPLE 7-

Numération des cellules précurseurs (colonie) avec le support selon la figure 2 renfermant 240 microcupules par rapport à une plaque Greiner-Terasaki.

25 On prélève des cellules de moelle  $C_{57}B_{1/6}^0$  avec suspension à  $1,03 \times 10^8$  cellules/ml.

On effectue une mise en culture en milieu:

RPMI 1640	8 ml
BSA sérum albumine bovine 10%	1 ml
Sérum de veau foetal inactivé	1 ml
$\beta$ mercapto-éthanol ( $5 \times 10^{-3}M$ )	100 µl

35 La suspension des cellules est de  $3,2 \times 10^4$  cellules/ml on distribue 10 µl dans chaque microcupule du support de l'invention et 10 µl dans chaque godet de la plaque Greiner-Terasaki.

On effectue une lecture au 7ème jour concernant le nombre de microcupules et de godets positifs en présence de CSF (Facteur stimulant les colonies, en l'espèce il s'agit de sérum de souris qui a été prélevé 3 heures après que  
 5 les souris aient reçu 5  $\mu$  g d'endotoxine ou LPS par voie sous-cutanée).

On note la présence de colonies de cellules comptant plus de 50 cellules en moyenne 500 à 2000 .

Les résultats obtenus sont les suivants:

10 plaque Greiner-Terasaki :14<sup>+</sup> / 40

support selon la figure 2 :74<sup>+</sup> / 200

14<sup>+</sup>/40 signifie 14 positifs sur 40 godets ensemencés;

il s'agit d'une technique de numération simple qui consiste à compter les godets ou les microcupules positifs.

#### 15 EXEMPLE 8

Numération des colonies avec le support selon la figure 1 et une plaque Greiner-Terasaki.

On prélève des cellules de moelle de souris C<sub>57</sub> Bl/6 ♀ . On ajuste en milieu RPMI 1640 ,BSA, SVF  
 20 (sérum foetal de veau) et  $\beta$ -mercaptoéthanol en présence de CSF (voir exemple 7).

Le support selon la figure 1 renfermant 400 microcupules est autoclavé dans l'eau distillée, sous une boîte de Pétri en verre de façon à obtenir un bon mouillage dudit  
 25 support et on le rince avec le milieu de culture comme indiqué dans l'exemple 4. A cet effet on réalise un ajustement des cellules à 1,32 x 10<sup>5</sup> cellules /ml et à 4,8 x 10<sup>4</sup> cellules/ml.

On place 1 ml de suspension cellulaire sur ledit  
 30 support et on répartit les cellules dans le fond des microcupules.

La culture est mise en oeuvre durant 7 jours. Dans le même temps on réalise une dilution des cellules de façon à faire une culture sur une plaque de Greiner-Terasaki à  
 35 480 cellules/godet.

Résultats obtenus

	Support de l'invention à $4,8 \times 10^4$ cellules/ml :	
	(130 cellules/microcupules)	308 <sup>-</sup> /366
5	Support de l'invention à $1,32 \times 10^5$ cellules/ml	
	(330 cellules/microcupule)	254 <sup>-</sup> /391
	Plaque Terasaki-Greiner	20 <sup>-</sup> /49
	$4,8 \times 10^4$ cellules/ml	27 <sup>-</sup> /50
	(480 cellules/godet)	

Conclusion

10 On constate une excellente efficacité de clonage avec le support de l'invention sensiblement identique à celle d'une plaque Greiner-Terasaki alors que la concentration des cellules est plus faible.

15 La présente invention fournit donc un support pour cultures cellulaires d'un prix de revient extrêmement faible et exempt de contamination.

Selon un mode tel que celui de la figure 3, il suffit de placer ce support dans une boîte de verre.

20 Il importe aussi d'observer que la forme en tronc de pyramide conduisant à une arête vive permet aux cellules de tomber dans le fond avec un mouvement limité, sans brassage, ce qui pourrait expliquer que de telles microcupules soient des sièges de développement privilégié des cultures.

25 Au sens de la présente invention, le mot film signifie une pellicule autonome d'épaisseur variable et de toute configuration qui n'adhère pas sur le substrat sur lequel elle repose et qui est par conséquent amovible.

30 L'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation représentés et décrits en détails et elle englobe les équivalents techniques.

-REVENDICATIONS -

1.Support pour cultures cellulaires, caractérisé en ce qu'il comprend un élastomère silicone transparent et souple.

2.Support selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un élastomère silicone à deux composants.

5 3.Support selon la revendication 2, caractérisé en ce que le rapport en parties en poids entre les deux composants de l'élastomère silicone transparent et souple se situe dans la gamme de 85 à 95 parties pour 5 à 15 parties du premier composant par rapport au second.

10 4.Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'élastomère présente les caractéristiques ci-après:

(a) avant catalyseRHODORSIL à deux composants

	RTV 141 A	RTV 141 B
Aspect	Liquide visqueux	
Couleur	Transparent	
Densité à 25°C environ (norme ASTM D 792)	1,0	1,020
Viscosité à 25°C, mPa.s, environ	3000	500

(b) catalyse

"Rhodorsil" RTV 141 A 100 parties

25 "Rhodorsil" RTV 141 B 10 parties

Durée d'utilisation du mélange catalysé à 25°C, environ 4 heures

Temps après lequel l'élastomère (ou l'objet) est manipulable, environ 24 heures

30 (c) après réticulation

Mesures effectuées sur film de 2 mm d'épaisseur après réticulation de 24 heures à 25°C.

(c)-1- propriétés mécaniques

Dureté Shore A, points, environ

35 (Norme AFNOR T 46 003) 45  
Résistance à la rupture, MPa, environ,  
(Norme AFNOR T 46 002) 6,0

	Allongement à la rupture,%, environ (Norme AFNOR T 46 002)	130
	<u>(c)-2 propriétés physiques</u>	
	Retrait linéaire,%,environ	de l'ordre de 0,1
5	Coefficient de dilatation cubique environ	$9.10^{-4}$
	Conductibilité thermique,W/m.K, environ	0,16
10	Température de fragilité,°C,environ (Norme ASTM D 746)	- 100
	Tenue thermique en pointe, °C,environ	+ 200
15	5.Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 4,caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'une plaque ou d'un film dont la configuration peut varier à volonté.	
	6.Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la surface supérieure de la plaque ou du film est lisse.	
20	7. Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 6,caractérisé en ce que la surface supérieure de la plaque est munie d'une pluralité de microcupules.	
	8. Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que chaque microcupule présente une forme en tronc de pyramide évasé.	
25	9. Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que la dimension des côtés de chaque microcupule est compris dans la gamme de 10 microns à 1,5mm.	
30	10. Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 4,caractérisé en ce qu'il se présente sous forme de billes.	
	11. Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 10,caractérisé en ce qu'il comprend,en outre,un support de base constitué d'un quelconque substrat en verre,en matière plastique ou analogue.	

12. Support selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est traité avec un agent chimique pour rendre sa surface hydrophile.

13. Support selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'agent chimique est de l'acide chlorhydrique;

14. Ensemble pour cultures cellulaires comprenant:  
a) un milieu de culture connu en soi et adapté aux cellules à cultiver et b) un support selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15. Procédé pour cultiver des cellules en présence d'un support et d'un milieu de culture, caractérisé en ce que le support est tel que selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

1/1

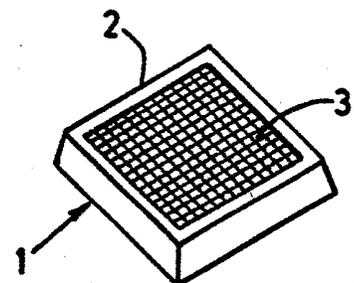


FIG. 1

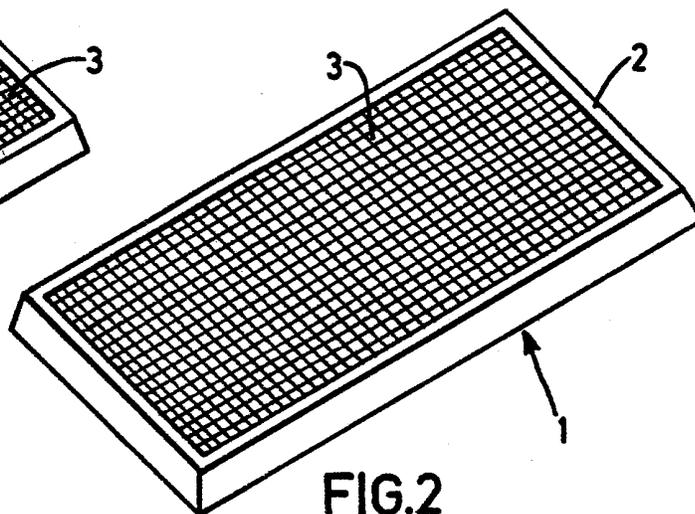


FIG. 2

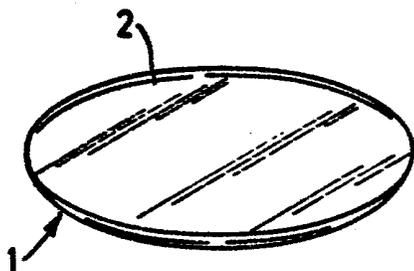


FIG. 3

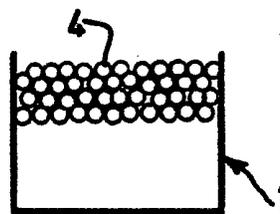


FIG. 4

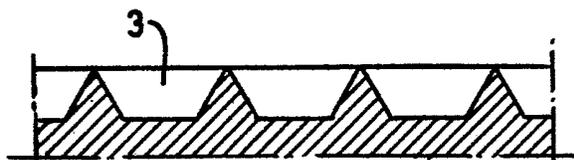


FIG. 5