

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 juin 2017 (08.06.2017)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/093531 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
C12N 5/0783 (2010.01) A01K 67/027 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2016/079664
- (22) Date de dépôt international :
2 décembre 2016 (02.12.2016)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1561731 2 décembre 2015 (02.12.2015) FR
- (71) Déposants : UNIVERSITE DE BORDEAUX [FR/FR];
35, place Pey Berland, 33000 Bordeaux (FR). CENTRE
HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE BORDEAUX
[FR/FR]; 12 rue Dubernat, 33404 Talence Cedex (FR).
- (72) Inventeurs : ANDRIQUE, Laetitia; 39 rue Puysegur
apt32, 33800 Bordeaux (FR). CHEVRET, Edith; 14 Ave-
nue du Haut Brion, 33700 Merignac (FR). MERLIO,
Jean-Philippe; 15 rue Levieux, 33000 Bordeaux (FR).
POGLIO, Sandrine; 82 rue de la Porte Dijeaux, 33000
Bordeaux (FR).
- (74) Mandataire : CABINET BECKER ET ASSOCIES; 25,
rue Louis le Grand, 75002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : PRIMARY CUTANEOUS LYMPHOMA MODEL

(54) Titre : MODELE DE LYMPHOME CUTANE PRIMITIF

(57) Abstract : The invention relates to an animal model for primary cutaneous lymphoma as well as to methods using same to evaluate the biological and genetic characteristics of primary cutaneous lymphoma tumor cells, as well as to identify or evaluate the efficacy of treatment of cutaneous lymphoma.

(57) Abrégé : L'invention concerne un modèle animal de lymphome cutané primitif ainsi que des méthodes employant ce modèle pour évaluer les propriétés biologiques et génétiques des cellules tumorales de lymphome cutané primitif, ainsi que pour identifier ou évaluer l'efficacité d'un traitement contre un lymphome cutané.



WO 2017/093531 A1

MODELE DE LYMPHOME CUTANE PRIMITIF

L'invention concerne un modèle animal de lymphome cutané primitif ainsi que des méthodes employant ce modèle pour évaluer les propriétés biologiques et génétiques des cellules tumorales de lymphome cutané primitif, ainsi que pour identifier ou évaluer l'efficacité d'un traitement contre un lymphome cutané primitif.

ARRIERE PLAN TECHNOLOGIQUE

Les lymphomes cutanés primitifs (LCP) sont des pathologies rares, dont il existe très peu de lignées cellulaires dans le monde. Ce manque de modèles cellulaires restreint fortement les études fonctionnelles qui permettraient de mieux comprendre la pathologie et restreint également les modèles murins correspondants qui permettraient de tester de nouvelles molécules efficaces pour traiter ce type de cancer. En effet, seuls quelques modèles de xénogreffes de cellules de LCP ont été décrits, soit par greffe chez des souris adultes immunodéficientes en sous cutané (efficace uniquement avec quelques-unes des lignées les plus agressives), soit dans le foie de la souris immunodéficiente RAG2-/- γ c-/- âgée de 2 à 7 jours (efficace uniquement sur deux lignées cellulaires, et peu reproductible). Aucun de ces modèles, après publication, n'a fait l'objet d'études plus poussées pour tester des molécules thérapeutiques sur les souris greffées et ainsi mettre en évidence de nouvelles thérapies pour traiter les LCP. L'absence de modèle *in vivo* de greffes de cellules de LCP ne permet pas d'évaluer de manière pré-clinique l'efficacité de thérapeutique générale ou ciblée. Il existe donc à l'heure actuelle un besoin urgent d'un modèle robuste, fortement reproductible et accessible techniquement pour faciliter le criblage à grande échelle de molécules thérapeutiques dirigées contre les LCP.

RESUME DE L'INVENTION

Selon un premier aspect, l'invention concerne un modèle animal non humain de lymphome cutané primitif (LCP), dans lequel des cellules de lymphome cutané primitif humain sont greffées dans le foie dudit animal.

Dans un mode particulier de réalisation, ledit animal est un animal adulte. Selon une variante, ledit animal est un rongeur, en particulier une souris.

Selon un autre mode de réalisation, l'animal est un animal immunodéficient, plus particulièrement une souris immunodéficiente telle qu'une souris NOD, une souris NOD/SCID ou plus préférentiellement une souris NSG (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ).

Selon un mode de réalisation, les cellules greffées peuvent correspondre à des cellules primaires d'un patient atteint d'un LCP, notamment une lignée primaire d'un patient atteint d'un LCP de type T ou de type B, ou à une lignée cellulaire de LCP. Parmi les lignées cellulaires susceptibles d'être greffées, on peut citer les lignées My-La, HUT78, HH, SeAx, MAC1, MAC2A et FE-PD.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les cellules sont injectées en intra-hépatique, notamment dans un ou plusieurs lobes du foie, sous la capsule hépatique de l'animal. Selon une variante de réalisation, les cellules sont injectées dans le foie via la veine porte.

Selon un second aspect, l'invention concerne également un procédé de préparation d'un modèle animal de lymphome cutané primitif, comprenant l'injection de cellules de LCP humain dans le foie d'un animal non humain, plus particulièrement dans un ou plusieurs lobes du foie, sous la capsule hépatique dudit animal, ou par injection via la veine porte.

Le procédé de préparation du modèle peut comprendre en outre l'élevage dudit animal pendant au moins 2 jours, en particulier pendant environ 2 à 5 jours, notamment pendant 2 ou 3 jours après injection des cellules, avant utilisation ultérieure du modèle animal produit dans l'une des applications décrites ci-dessous.

Dans un mode particulier de réalisation, de 2 à 10 millions de cellules de LCP, par exemple 5 millions de cellules de LCP, sont injectées dans le foie de l'animal.

Selon un troisième aspect, l'invention concerne un procédé d'évaluation de l'efficacité d'un traitement contre un LCP, comprenant:

- a) l'administration dudit traitement au modèle animal selon l'invention décrit ci-dessus; et
- b) la détermination de l'effet dudit traitement sur les tumeurs induites par la greffe dans le foie et/ou la dissémination ou la migration desdites cellules dans d'autres organes de l'animal.

Selon un mode particulier de réalisation, le traitement est administré de 2 à 5 jours, en particulier 3 jours, après la greffe des cellules de LCP humain dans le foie du modèle animal.

Selon un autre mode de réalisation, l'efficacité du traitement est évaluée de 10 à 15 jours, en particulier 12 jours, après l'administration dudit traitement.

L'invention concerne par ailleurs, selon un quatrième aspect, un procédé d'étude ou d'évaluation d'une propriété de tumorigenèse, de migration ou d'invasion dans les organes de cellules de LCP humain, comprenant l'étude de ladite propriété dans le modèle animal selon l'invention.

5 BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

La figure 1 présente des coupes d'organes de souris ayant reçu une xénogreffe de LCP, marquées par immunohistochimie au moyen d'un anticorps anti-HLA-ABC (HLA) et contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer (HES).

10

La figure 2 présente le modèle de xénogreffe hépatique selon l'invention. (a) schéma représentant un protocole de xénogreffe intrahépatique et de traitement au Méthotrexate selon l'invention; (b) tableau présentant les ratio poids de foie / poids de l'animal à J15 après greffe, montrant que le Méthotrexate réduit fortement la formation de tumeur hépatique; (c) confirmation de la réduction de la formation
15 des tumeurs hépatiques par immunohistochimie anti-HLA-ABC sur des coupes de foie; (d) antigène HLA-ABC détecté par cytométrie en flux dans différents organes des souris: une réduction significative du nombre de cellules portant l'antigène HLA-ABC a été observée dans les poumons et les rates des souris traitées au Méthotrexate (ns: non significatif; METHO: Méthotrexate).

20

La figure 3 présente un exemple de caractérisation et de tri de cellules de LCP humaines de type T issues d'un patient. (a) Les dot plots représentent la caractérisation des cellules d'un patient en cytométrie en flux par marquage avec un anticorps anti-TCRV β spécifique du clone tumoral majoritaire et des anticorps anti-CD4, CD8 et CD3 couplés à différents fluorochromes. (b) Pureté du clone tumoral après tri sur trieur de cellules ARIA II.

25

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un modèle animal non humain de lymphome cutané primitif (LCP), dans lequel des cellules de LCP humain sont greffées dans le foie dudit animal.

30

Selon un mode préféré de réalisation, l'animal servant à la production du modèle est un rongeur, notamment un rat ou une souris, plus particulièrement une souris. L'animal sera avantageusement choisi parmi les animaux immunodéficients, notamment un rongeur immunodéficient tel qu'une souris immunodéficiente. Parmi les souris immunodéficientes connues utilisables dans le cadre de la présente
35 invention, on pourra citer les souris NOD, NOD/SCID, BXN, RAG, RAG2, RAG- γ C, ou encore la souris NSG (ou NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ). La souris NSG fait partie des souris les plus immunodéficientes décrites à ce jour. Elle combine les caractéristiques du fond génétique

NOD/ShiLtJ, la mutation de l'immunodéficience combinée sévère (ou severe combined immunodeficiency en anglais, ou SCID), et une déficience en chaîne gamma du récepteur à l'IL2. Elle est caractérisée par une absence de cellules matures B et T, et par l'absence de cellules NK fonctionnelles.

5

L'animal peut être un animal nouveau-né, un jeune animal ou un animal adulte. De préférence, l'animal sélectionné est un animal adulte, notamment une souris âgée de 8 à 10 semaines.

10

Les cellules de LCP humain utilisées pour établir le modèle de la présente invention peuvent notamment être des cellules de lymphome T cutané de différents sous-types, notamment des trois principaux sous-types que sont le mycosis fongoïde (MF), le syndrome de Sézary (SS) et le lymphome cutané à grandes cellules anaplasiques (cALCL pour primary CD30+ cutaneous anaplastic large-cell lymphoma en anglais).

15

Les cellules de LCP humain utilisées pour établir le modèle peuvent être des cellules primaires de LCP de patient humain atteint d'un LCP. Selon une variante de ce mode de réalisation, les cellules utilisées sont des cellules primaires de LCP de type T. Selon une autre variante de ce mode de réalisation, les cellules utilisées sont des cellules primaires de LCP de type B. Les cellules primaires de LCP humaines dérivées de patients peuvent être préparées selon tout moyen connu de l'homme du métier.

20

Les cellules peuvent notamment être isolées à partir d'une biopsie cutanée provenant du patient, le tissu cutané étant préparé par dissection et homogénéisation, notamment selon les modalités présentées dans les exemples présentés ci-dessous. Les cellules peuvent également être isolées à partir d'un prélèvement sanguin du patient, isolées sur gradient de Ficoll de manière à obtenir la fraction de cellules mononucléées, notamment selon les modalités présentées dans les exemples présentés ci-

25

dessous. L'hétérogénéité des cellules de LCP de type T et la caractérisation du clone majoritaire présent dans l'échantillon peuvent ensuite déterminées selon l'expression du TCRV β et le profil TCR γ . L'identification du profil TCR caractéristique des cellules de LCP de type T permet de sélectionner spécifiquement les cellules cancéreuses et de suivre la prise de greffe dans la souris. Les cellules tumorales majoritaires peuvent alors être sélectionnées avant la greffe selon l'expression du TCRV β à

30

leur surface en fonction des critères suivant : TCRV β _{tumoral} +CD3+CD4+CD8-.

35

Selon un autre mode de réalisation, lesdites cellules de LCP humain correspondent à des lignées cellulaires dérivées de LCP humain telles que les lignées My-La, HUT78, HH, SeAx, MAC1, MAC2A et FE-PD. Les cellules de LCP humain greffées peuvent être des cellules de LCP agressif ou indolent, ou encore correspondre à des cellules représentatives de différents stades de la maladie, par exemple des cellules d'un LCP précoce ou avancé.

Pour générer le modèle animal de l'invention, les cellules de LCP humain sont injectées dans le foie de l'animal choisi. Toute injection permettant la colonisation du foie par les cellules de LCP humain est envisagée dans le cadre de la présente invention. A titre illustratif, les cellules de LCP humain peuvent être injectées dans un ou plusieurs lobes du foie, plus particulièrement sous la capsule hépatique. Alternativement, les cellules peuvent être injectées dans le foie via la veine porte.

Selon un mode particulier de réalisation, de 2 à 10 millions de cellules de LCP humain, notamment de 2 à 5 millions de cellules, sont injectées dans le foie de l'animal. A titre illustratif, dans le cas de l'injection des cellules dans le foie d'une souris adulte (e.g. une souris âgée de 8 à 10 semaines), l'injection de 2 à 10 millions de cellules peut être réalisée, notamment de 2 à 5 millions, avec notamment une injection de 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 ou encore 5 millions de cellules.

Un volume approprié est injecté, selon l'animal employé dans la constitution du modèle animal et le nombre de cellules à injecter. A titre illustratif, pour l'injection intrahépatique sous la capsule hépatique d'une souris adulte, un volume de 50 μ L maximum est injecté.

Un suivi quotidien de l'état clinique des souris selon l'apparition d'une masse visible au niveau de l'abdomen et une série de critères de points limites définis par l'animalerie hébergeant les animaux, peut ensuite être réalisée. Le suivi de prise de greffe (évaluation du pourcentage de cellules humaines) au cours du temps peut être réalisé par prise de sang suivie d'une analyse de la présence de cellules humaines en cytométrie en flux.

La prise de greffe dans le foie de l'animal peut être évaluée selon plusieurs modalités. A titre illustratif, les trois modalités expérimentales suivantes peuvent être employées, après sacrifice de l'animal :

- i) Le poids du foie et le poids de chaque animal est mesuré, notamment à l'aide d'une balance de précision. Le rapport poids du foie / poids de l'animal est alors calculé. Ce rapport sera considéré comme pathologique, et donc indicatif d'une prise de greffe, s'il est supérieur à 5%. Pour les prises de tumeurs les plus agressives, l'invasion tumorale peut être visible à l'œil nu.
- ii) Une biopsie du foie, et éventuellement d'autres organes (notamment rein, rate, poumon, cœur, etc.) peut être réalisée. Chaque morceau peut être ensuite fixé, notamment au formol 4%, en particulier sur la nuit à température ambiante, avant inclusion en bloc de paraffine. Des coupes de chaque bloc de paraffine, notamment de 3 μ m d'épaisseur, sont réalisées avant immunomarquage spécifique grâce à un anticorps qui permet de détecter les cellules humaines (notamment un anticorps anti-HLA).

- iii) Le reste de chaque organe non fixé au formol peut être remis en culture, en cellules isolées (e.g. par dissociation mécanique au scalpel). A titre illustratif, les cellules peuvent être mises en culture dans un milieu de culture adapté (notamment un milieu RPMI) supplémenté d'additifs appropriés, notamment de 20% de sérum de veau fœtal dans des conditions de cultures adaptées (e.g. à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂). Un immunomarquage peut ensuite être réalisé grâce à un anticorps qui permet de détecter les cellules humaines (notamment un anticorps anti-HLA) associé à un anticorps secondaire marqué approprié permettant ensuite de détecter le pourcentage de cellules humaines dans chaque organe par rapport au nombre de cellules total (humaines et souris). La détection peut notamment être réalisée au moyen d'un cytomètre en flux.
- iv) Afin de valider la prise de greffe de cellules tumorales humaines issues de patients, l'expression du variant TCRV β et le profil TCR γ peuvent également être analysés, respectivement en cytométrie en flux et PCR. Ces analyses permettent de déterminer que les cellules qui greffent correspondent bien aux cellules tumorales de départ.

Après injection des cellules de LCP humain dans le foie de l'animal, ce dernier est élevé durant un temps adapté à la prise de la greffe, notamment pendant au moins 2 jours, en particulier pendant environ 2 ou 3 jours après injection des cellules. L'animal est ensuite utilisé dans l'un des procédés décrits ci-dessous.

Le modèle animal selon l'invention peut avantageusement être utilisé dans un procédé d'évaluation de l'efficacité d'un traitement contre un LCP, comprenant:

- a) l'administration dudit traitement au modèle animal selon l'invention décrit ci-dessus; et
- b) la détermination de l'effet dudit traitement sur les tumeurs induites par la greffe dans le foie et/ou la dissémination et/ou la migration desdites cellules dans d'autres organes de l'animal.

Selon la présente invention, le traitement peut correspondre à toute substance susceptible d'avoir un effet curatif ou préventif contre un LCP humain, y compris des prodrogues de telles substances. Le traitement peut correspondre à des molécules dont les propriétés anti-tumorales sont déjà connues.

Alternativement, le traitement testé n'a jamais été rapporté comme possédant des propriétés anti-tumorales, la présente invention pouvant permettre le criblage à grande échelle de nombreuses substances pour leur effet contre les LCP. L'administration du traitement est réalisée par toute voie appropriée, notamment par voie orale, intramusculaire, intraveineuse, intra artérielle, intra-péritonéale, cutanée, sous-cutanée ou intranasale. Par ailleurs, plusieurs substances peuvent être administrées en combinaison, simultanément ou de manière séparée dans le temps, afin de déterminer l'effet de ladite combinaison, qu'il s'agisse d'une synergie, d'un antagonisme ou d'une redondance d'action.

Le traitement est administré au modèle animal après greffe, notamment après au moins 2 jours, en particulier après environ 2 à 5 jours, notamment après 2 ou 3 jours après injection des cellules de LCP dans le foie de l'animal. Par ailleurs, l'homme du métier adaptera le régime et/ou la posologie à la substance administrée. Par exemple, la substance à tester pourra être administrée une seule fois le premier jour du traitement, sans autre administration avant l'évaluation de l'effet dudit traitement. Alternativement, la substance pourra être administrée à plusieurs reprises tout au long du protocole de traitement. Par exemple, ladite substance peut être administrée quotidiennement sur toute la durée du protocole, une ou plusieurs fois par jour.

L'efficacité du traitement est évaluée après une durée appropriée permettant d'observer un effet thérapeutique. A titre illustratif, l'efficacité peut être évaluée de 10 à 15 jours après administration de la substance à l'animal. Par exemple, l'efficacité du traitement peut être évaluée, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 jours après administration de la substance. Selon un mode particulier de réalisation, l'efficacité du traitement est évaluée 11, 12 ou 13 jours après son administration, notamment 12 jours après.

Avantageusement, les cellules de LCP humain greffées étant à la fois issues d'un animal différent (cellules humaines greffées dans le foie d'un animal non humain) et originaires d'un tissu différent du foie, elles seront facilement détectées et/ou tracées dans l'organisme du modèle animal de l'invention par des moyens bien connus de l'art permettant la discrimination de cette origine animale et/ou tissulaire. Ainsi, la présence ou l'absence de cellules de LCP humain dans le modèle animal de l'invention pourra notamment être déterminée par immunomarquage spécifique grâce à un anticorps anti-HLA (de l'anglais human leukocyte antigen) ou d'un anticorps spécifique des cellules tumorales, qui permettent de détecter des cellules immunitaires humaines présentes dans un échantillon prélevé sur l'animal, notamment dans une biopsie de foie ou de tout autre organe dans lequel une étude de l'invasion des cellules de LCP humain est souhaitée. Alternativement, les cellules issues d'une biopsie pratiquée dans l'un des organes ou tissus de l'animal peuvent être mises en culture, puis marquées au moyen d'un anticorps anti-HLA pour ensuite déterminer le pourcentage de cellules humaines (et donc de cellules de LCP humain, ou dérivées de LCP humain) présent dans ledit organe ou tissu au moyen d'un cytomètre en flux.

Un traitement efficace est identifié lorsque le nombre et/ou la taille des tumeurs induites par la greffe dans le foie et/ou dans d'autres organes de l'animal est diminué. Alternativement, un traitement sera jugé efficace en cas d'observation d'une stabilisation du nombre et/ou de la taille et/ou de la dissémination à d'autres organes de cellules greffées dérivant d'un LCP agressif et/ou avancé. Selon un mode particulier de réalisation de cet aspect, l'effet du traitement est comparé à l'effet de la greffe des mêmes cellules de LCP humain sur un animal (ou sur plusieurs animaux) non traité, ou à l'effet d'un traitement placebo administré à un animal (ou à plusieurs animaux) greffés avec les

mêmes cellules de LCP humain, utilisé comme contrôle. Dans ce mode de réalisation, l'animal non traité avec la drogue (i.e. n'ayant reçu que la greffe de LCP, ou que la greffe de LCP puis l'injection d'un traitement placebo) développe des tumeurs, et la comparaison de la condition contrôle avec le traitement thérapeutique permet l'observation d'une diminution, voire d'une abolition complète, des tumeurs. Selon un mode alternatif de réalisation, l'effet du traitement est comparé à l'effet d'un traitement de référence. Par exemple, le traitement de référence peut correspondre à un traitement au Méthotrexate. Ce mode alternatif de réalisation pourra être avantageusement mis à profit afin de sélectionner les traitements plus efficaces, ou aussi efficaces, que le traitement de référence, ou afin de sélectionner les traitements susceptibles de présenter moins d'effets secondaires que le traitement de référence.

L'invention concerne par ailleurs, un procédé d'étude ou d'évaluation d'une propriété de tumorigénèse, de migration et/ou d'invasion dans les organes de cellules de LCP humain, comprenant l'étude de ladite propriété dans le modèle animal selon l'invention. Ce procédé met en œuvre les propriétés de la greffe décrite ci-dessus, notamment la possibilité de discriminer aisément les cellules qui en sont dérivées au moyen de techniques connues de l'homme du métier.

EXEMPLES

Matériel et méthodes

Lignées cellulaires

Quatre lignées de LCP agressif (My-La, HUT78, HH et MAC2A) et deux lignées de LCP indolent (FE-PD et MAC1) ont été utilisées. Elles ont été cultivées à 37°C en atmosphère régulée à 5% de CO₂ dans du milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), à l'exception des cellules FE-PD cultivées en milieu IMDM supplémenté de 20% de SVF.

Cellules de patients

Les cellules de patients sont issues soit, de biopsies cutanées soit, de sang des différents lymphomes adressés par le service de dermatologie de l'hôpital Saint-André (CHU Bordeaux). Les biopsies cutanées sont maintenues dans du milieu alpha MEM contenant 10% SVF, 10% de sérum AB humain et 1% Streptomycine/Pénicilline et complémenté en cytokines humaines : *stem cell factor* humain (hSCF) (50ng/ml), *Fms-like tyrosine kinase 3* (Flt-3) (20ng/ml), interleukine -7 (IL-7) (10ng/ml), insuline (20nM) (« milieu patient »). Elles sont découpées finement à l'aide d'un ciseau fin et le broyat est cultivé à 37°C en atmosphère régulée à 5% de CO₂ dans le « milieu patient » pendant 24h. Le

lendemain, les cellules sont filtrées sur tamis 70µm (Becton Dickinson) et le filtrat contenant les cellules de lymphome cutané est récupéré pour les greffes.

Le sang est dilué avec le même volume de PBS (Phosphate Buffer Saline) sans calcium et magnésium, puis déposé délicatement dans un tube Pancoll (Falcon). Les échantillons sont centrifugés à 2600 rpm pendant 15 minutes sans frein. L'anneau de cellules mononucléées est récupéré, rincé avec du PBS puis de nouveau centrifugé à 1200 rpm pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite comptées. Ces conditions de préparation permettent d'obtenir entre 10 à 250 millions de cellules/échantillon.

Caractérisation des cellules tumorales issues de patients

Une partie de l'échantillon de cellules de LCP humain issues de patients (1 million de cellules) est marquée avec le kit TCRVβ répertoire (Beckman Coulter) selon les recommandations du fournisseur. Le marquage est réalisé sur une suspension de cellules mononucléées dans 50 µL de PBS. 1 µL de chaque anticorps d'intérêt couplés à différents fluorochromes est ajouté et incubé 30 minutes à 4 °C. Après un lavage au PBS, les cellules sont suspendues dans 350 µL de PBS et l'acquisition est faite grâce à un cytomètre en flux FACSCanto II (BD Biosciences). En parallèle, l'ADN génomique est extrait à partir de 5 millions de cellules grâce au kit DNA mini de QIAGEN selon les recommandations du fournisseur. Une PCR suivi d'une analyse en fluorescence sur instrument d'électrophorèse capillaire est réalisée pour définir le profil TCRγ- Celle-ci est réalisée selon les recommandations du fournisseur du kit IdentiClone™ (*In Vivo* Scribe Technologies)

Isolement des cellules tumorales issues de patients

Les cellules de LCP humain issues de patients sont marquées avec l'anticorps TCRVβ (Beckman Coulter) correspondant au clone tumoral identifié comme décrit précédemment. Le marquage est réalisé sur une suspension de cellules mononucléées dans 50 µL de PBS. 1 µL de chaque anticorps d'intérêt (TCRVβ, CD3, CD4 et CD8) couplés à différents fluorochromes sont ajoutés et incubés 30 minutes à 4 °C. Après un lavage au PBS, les cellules sont suspendues dans 350 µL de PBS. Les cellules TCRVβ_{tumoral} CD3+CD4+CD8- sont triées sur un trieur ARIA II (BD Biosciences). Les anticorps utilisés pour l'isolement sont adaptables selon le type de lymphome.

Essai en agar mou

5x10⁴, 10x10⁴ ou 5x10⁵ cellules / puits (plaques 6 puits) ont été cultivées en agar mou afin de déterminer la capacité clonogénique des lignées cellulaires de LCP, selon un protocole publié précédemment (Chevret *et al.*, 2014, Telomerase functions beyond telomere maintenance in primary cutaneous T-cell lymphoma, Blood 123(12) : 1850-1859).

Xénogreffes intra-hépatiques

La douleur est prise en compte, les animaux recevant 30 minutes avant l'opération une injection de Vetergesic (Buprenorphine) de 3µg (soit 100µL) par voie intrapéritonéale. Les souris sont ensuite rasées sur l'abdomen. 5x10⁶ cellules ont été greffées dans le foie de souris adultes (8 à 10 semaines) NSG immunodéficientes (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) selon les modalités suivantes :

- anesthésie à l'isoflurane 2,5 %, désinfection à l'alcool 70% puis incision d'environ 5 mm sur la ligne blanche de la peau au niveau de l'épigastre (les animaux sont placés en décubitus dorsal) ;
- la même incision est ensuite réalisée au niveau du péritoine situé sous la peau ;
- un lobe du foie est ensuite externalisé par pression des deux côtés de la cage thoracique, afin de procéder à une injection sous la capsule hépatique de 50µL maximum d'une suspension cellulaire contenant les 5 millions de cellules dans un liquide stérile (milieu de culture adapté sans sérum) à l'aide d'une aiguille à insuline (Thermo® seringue de 300µL aiguille 29G x1/2 taille 0,33x12mm) ;
- l'organe est ensuite replacé dans la cavité abdominale après rinçage au sérum physiologique ;
- les plans péritonéaux et cutanés sont recousus à l'aide de fil de suture 5.0 ;
- durant la totalité de l'opération, la température corporelle de l'animal est maintenue à l'aide d'un tapis chauffant.

Le poids des animaux a été mesuré quotidiennement, et leur état de santé a été surveillé durant tout le protocole. Tous les 15 jours, une prise de sang est réalisée par voie veineuse dans le sinus rétro-orbital de manière à évaluer la présence de cellules humaines en cytométrie en flux. 4 à 5 semaines après la greffe de lignées de LCP humaine, les souris ont été sacrifiées, le poids du foie et le poids de chaque animal ont été mesurés et le ratio poids du foie / poids de l'animal a été calculé. Les foies, rates, reins, cœurs et poumons ont été fixés dans 4% de formol pour utilisation ultérieure en immunohistochimie. Les différents tissus sont dissociés finement à l'aide d'un ciseau fin et le broyat est filtrés sur tamis 70µm (Becton Dickinson). Le filtrat obtenu a été utilisé pour l'analyse en cytométrie en flux.

Un total de 60 souris a été greffé en intra-hépatique avec la lignée cellulaire My-La. Dix souris ont été greffées avec chacune des autres lignées cellulaires (HUT78, FE-PD, HH, MAC1, MAC2A)

Immunohistochimie

Un marquage à l'hématoxyline de Mayer et une immunohistochimie HLA-ABC ont été réalisés sur des sections de 3µm d'épaisseur d'organes de souris fixés au formol inclus dans de la paraffine (anticorps Abcam référence Ab70328 utilisé au 1/100^e). Les coupes ont été analysées au moyen du scanner Panoramic Scan (3DHISTECH) et du logiciel Panoramic Viewer 1.15.4 ou en utilisant un microscope LEICA DMR couplé à une caméra NIKON DS-FI2 et le logiciel d'imagerie NIS BR.

Traitement *in vivo* au Méthotrexate

2x10⁶ cellules My-La ont été greffées en intra-hépatique dans le foie de vingt souris NSG. Trois jours après la greffe, dix souris ont été traitées avec 0,5 mg/kg de Méthotrexate (Mylan Pharmaceuticals), ou du DMSO en tant que contrôle. Le traitement a été administré quotidiennement par injection intrapéritonéale pendant 12 jours. Après sacrifice (jour 15 après la greffe), les organes ont été fixés au formol 4% pour procéder à des expériences d'immunohistochimie, ou dissociées mécaniquement pour réaliser des cultures cellulaires avant analyse par cytométrie en flux (FACS).

Détection des cellules humaines par FACS au cours du suivi ou du sacrifice

Pour les lignées de LCP humain, l'antigène HLA-ABC a été détecté sur les cellules en suspension obtenues à partir des organes des souris en utilisant un anticorps primaire (Ab70328, Abcam) et un anticorps secondaire couplé au marqueur Alexa Fluor® 488 (Ab150153). Pour les cellules de LCP issues de patients, un marquage avec 1µl des anticorps anti- TCRVβ, CD3, CD4 et CD8 couplés à différents fluorochromes est réalisé sur une suspension de cellules mononucléées dans 50 µL de PBS et incubés 30 minutes à 4 °C. Après un lavage au PBS, les cellules sont suspendues dans 350 µL de PBS. La présence de cellules TCRVβ_{tumoral} CD3+CD4+CD8- sont vérifiées et permet de valider la prise de greffe des cellules tumorales. La détection est faite à la Plateforme de Cytométrie de l'Université de Bordeaux en utilisant un appareil BD FACS Canto II et le logiciel FlowJo.

Analyse du profil TCRγ après xénogreffe

L'ADN génomique est extrait à partir de 5 millions de des cellules issues de la xénogreffe grâce au kit DNA mini de QIAGEN selon les recommandations du fournisseur. Une PCR suivi d'une analyse en fluorescence sur instrument d'électrophorèse capillaire est réalisée pour définir le profil TCRγ. Celle-ci est réalisée selon les recommandations du fournisseur du kit IdentiClone™ (*In Vivo* Scribe Technologies)

Analyses statistiques

Les données ont été analysées en fonction du nombre de variables dépendantes et de la nature des variables dépendantes et indépendantes. Le test de Wilcoxon-Mann Whitney ou le test de student pour données appariées ont été utilisés pour l'analyse statistique non paramétrique, ces tests étant adaptés pour une taille d'échantillon inférieure à 30. Le seuil de signification a été choisi à $P \leq 0,05$ (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$). L'analyse statistique a été réalisée au moyen du logiciel MedCalc.

Résultats

La possibilité d'établir un modèle de xénogreffe intrahépatique de lymphome cutané primitif LCP a été évaluée dans la souris immunodéficiente NSG.

5

Dans un premier temps, le modèle a été validé au moyen de la lignée My-La, décrite comme la plus agressive des lignées LCP *in vitro*, et *in vivo* dans des modèles de xénogreffe sous-cutanée (Thaler *et al.*, 2004, Establishment of a mouse xenograft model for mycosis fungoides, Exp Dermatol 13 : 406-412), injectée dans 60 souris. Les autres lignées cellulaires ont été greffées dans les foies de 10 souris chacune. Sur 110 souris greffées avec des cellules de LCP, 96 ont développé des tumeurs du foie. Une prise de greffe efficace est observée pour la majorité des lignées cellulaires, avec de manière frappante une efficacité de 100 % pour les lignées My-La, HUT78, HH et MAC1.

15

Les résultats obtenus avec les cellules greffées sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : capacité clonogénique des cellules greffées dans le foie de la souris NSG

Lignée de LCP	Pathologie	Ratio foie/corps (%)	Reproductibilité de la xénogreffe (nombre de souris)	Efficacité de la xénogreffe intrahépatique
LCP agressif				
My-La	T-MF	13,77	60/60	100%
HUT78	SS	16,91	10/10	100%
HH	cATLL	12,56	10/10	100%
MAC2A	CD30+ ALCL	4,60	1/10	10%
LCP d'évolution indolente				
FE-PD	CD30+ HL-ALCL	6,44	5/10	50%
MAC1	CD30+ ALCL	6,01	10/10	100%

Légende : T-MF : transformed mycosis fungoides ; SS Sézary syndrome ; cutaneous adult T-cell leukemia/lymphoma ; HL-ALCL : Hodgkin-like anaplastic large-cell lymphoma

Par ailleurs, Le tableau 2 et la figure 1 montrent que ce modèle de greffe intrahépatique permet de développer des tumeurs de LCP au niveau du site d'injection, mais également au niveau d'autres organes après dissémination / migration des cellules.

Tableau 2 : Invasion des cellules après greffe dans le foie

Lignée de LCP	Cellules HLA-positif dans le foie	Cellules HLA-positif dans les organes de dix souris			
		rate	reins	poumons	cœur
LCP agressif					
My-La	60/60	10/10	5/10	8/10	5/10

HUT78	10/10	8/10	8/10	5/10	4/10
HH	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10
MAC2A	1/10	0/10	0/10	1/10	0/10
LCP d'évolution indolente					
FE-PD	5/10	5/10	4/10	5/10	5/10
MAC1	10/10	8/10	7/10	8/10	8/10

Le modèle développé permet d'étudier et d'évaluer les propriétés de tumorigenèse, de migration et d'invasion dans les organes. A titre illustratif, les caractéristiques des infiltrats observés dans les différents organes après migration des cellules de LCP à partir du site d'injection (foie) sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : différence d'infiltrats dans les organes en fonction des lignées greffées

Lignée de LCP	foie	rate	rein	poumon	cœur
My-La	T/I/E	E	T/E	I/E	/
HUT78	T/E	I	T/E	T/E	E
HH	T/I	I	I/E	I	E
FE-PD	I/E	E	T/E	I	E
MAC1	I/E	I++	I/E	I/E	E
MAC2A	T	/	E	E	/

Légende : T : Tumeur ; I : Infiltrat ; E : Embol

Par ailleurs, la présente invention a été validée dans un modèle de xénogreffe de cellules My-La greffées en intra-hépatique sur souris adultes (8-10 semaines), et traitées au Méthotrexate, une molécule de chimiothérapie, connue pour son efficacité sur le LCP. Les résultats sont présentés dans la figure 2.

Compte tenu de l'agressivité et de la rapidité d'apparition des tumeurs dans le foie, ainsi que de l'apparition de signes de dégradation de santé des souris, le nombre de cellules injectées a avantageusement été réduit à 2,5 millions dans 50 μ L de solution. Les souris ont pu en conséquence être traitées au Méthotrexate à J3 après la greffe et ce pendant 12 jours. A J15, les souris ont été sacrifiées et les organes ont été analysés par marquage HLA sur coupe de paraffine et en cytométrie.

Grâce au modèle présenté ici, il est montré que les tumeurs du foie ainsi que l'invasion des organes des souris diminuent grâce au traitement au Méthotrexate. Ce modèle présente de nombreux avantages. Il peut être mis en place rapidement, avec une étude des effets du traitement seulement 15 jours après la greffe des cellules de LCP. Il peut ainsi être adapté à des tests à grande échelle et à de

nombreuses autres molécules thérapeutiques de manière à évaluer l'efficacité de nouveaux traitements contre les LCP.

REVENDICATIONS

1. Modèle animal non humain de lymphome cutané primitif, dans lequel des cellules de lymphome cutané primitif humain sont greffées dans le foie dudit animal, ledit animal étant un animal adulte.
2. Modèle animal selon la revendication 1, l'animal étant un rongeur immunodéficient.
3. Modèle animal selon la revendication 2, le rongeur immunodéficient étant une souris NSG.
4. Modèle animal selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, les cellules greffées étant des cellules primaires d'un patient atteint d'un lymphome cutané primitif, notamment des cellules de LCP de type T ou de type B.
5. Modèle animal selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, les cellules greffées correspondant à une lignée cellulaire de lymphome cutané primitif.
6. Modèle animal selon la revendication 5, ladite lignée cellulaire étant choisie dans le groupe constitué des lignées My-La, HUT78, HH, SeAx, MAC1, MAC2A et FE-PD.
7. Modèle animal selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, les cellules étant greffées dans le foie sous la capsule hépatique ou par injection via la veine porte.
8. Procédé de préparation d'un modèle animal de lymphome cutané primitif, comprenant l'injection de cellules de lymphome cutané primitif humain dans le foie d'un animal non humain.
9. Procédé selon la revendication 8, comprenant en outre l'élevage dudit animal pendant au moins 3 jours.
10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, comprenant l'injection de 2 à 10 millions de cellules.
11. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un traitement contre un lymphome cutané primitif, comprenant:
 - a) l'administration dudit traitement au modèle animal selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;
 - et
 - b) la détermination de l'effet dudit traitement sur les tumeurs induites par la greffe dans le foie et/ou la dissémination et/ou la migration desdites cellules dans d'autres organes de l'animal.

12. Procédé selon la revendication 11, le traitement étant administré de 2 à 5 jours, en particulier 3 jours, après la greffe des cellules de lymphome cutané primitif humain dans le foie du modèle animal.

5 13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, la détermination de l'effet dudit traitement étant réalisée pendant 10 à 15 jours, en particulier 12 jours.

14. Procédé d'étude ou d'évaluation d'une propriété de tumorigenèse, de migration ou d'invasion dans les organes de cellules de lymphome cutané primitif humain, comprenant l'étude de ladite propriété
10 dans le modèle animal selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

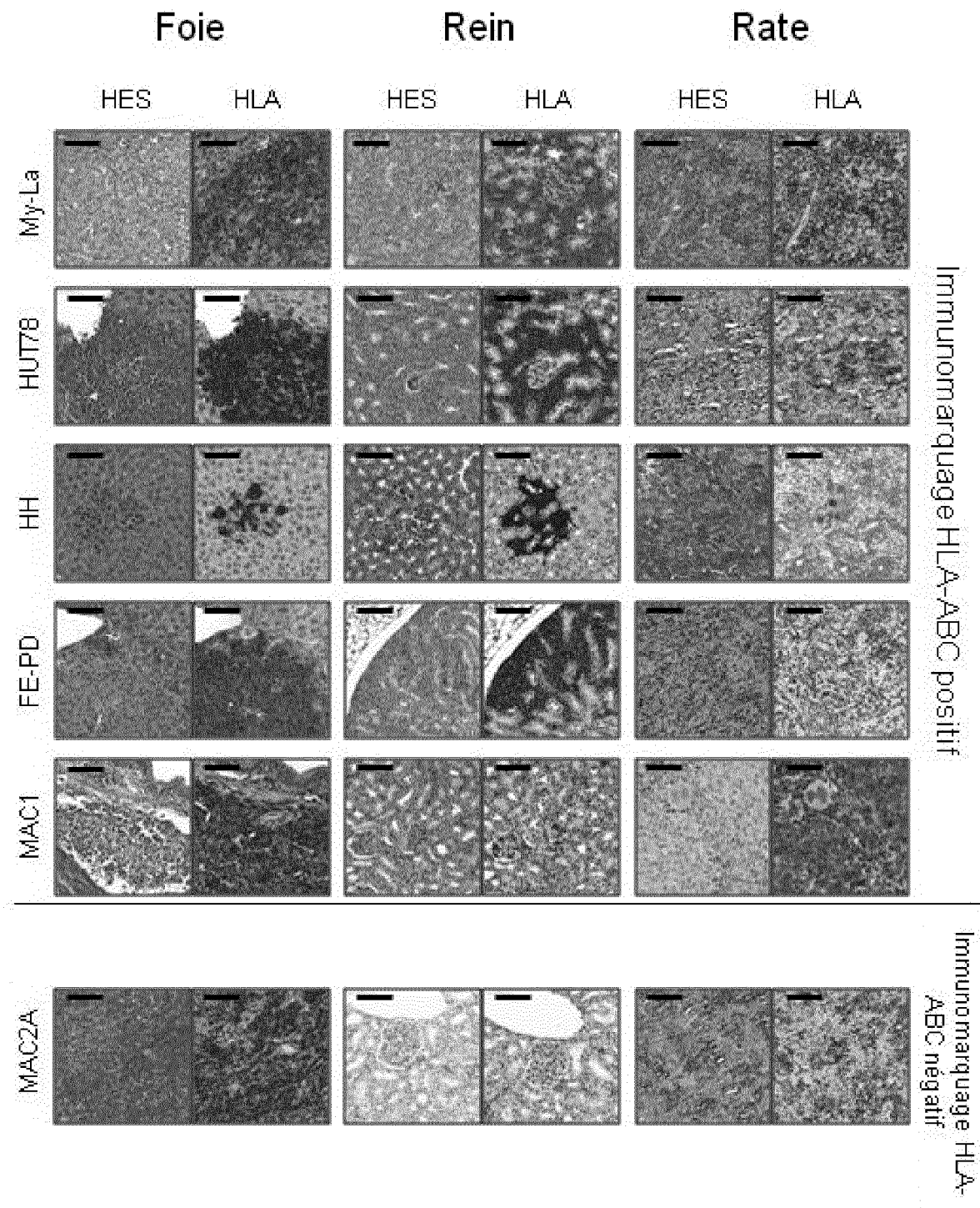


Figure 1

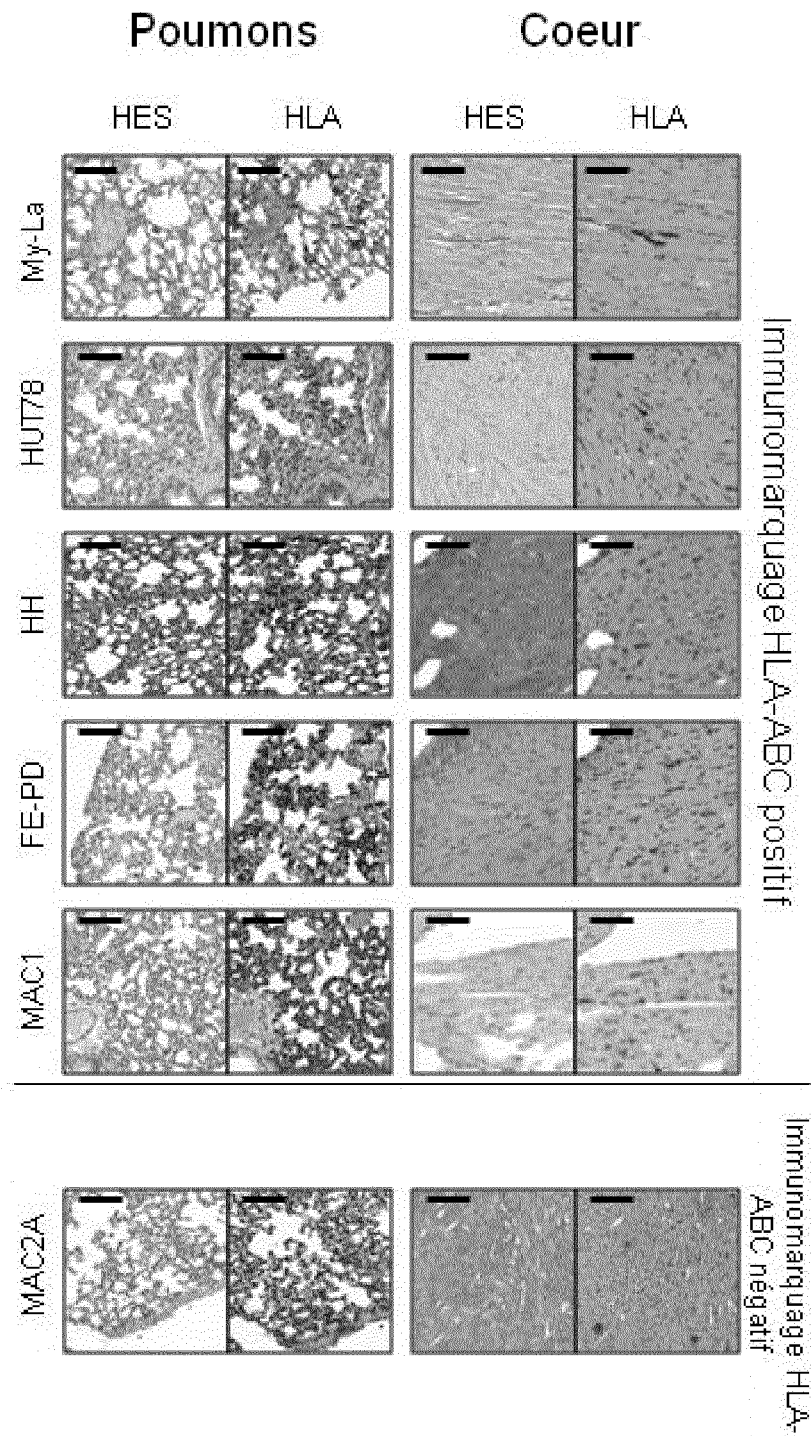


Figure 1 (suite)

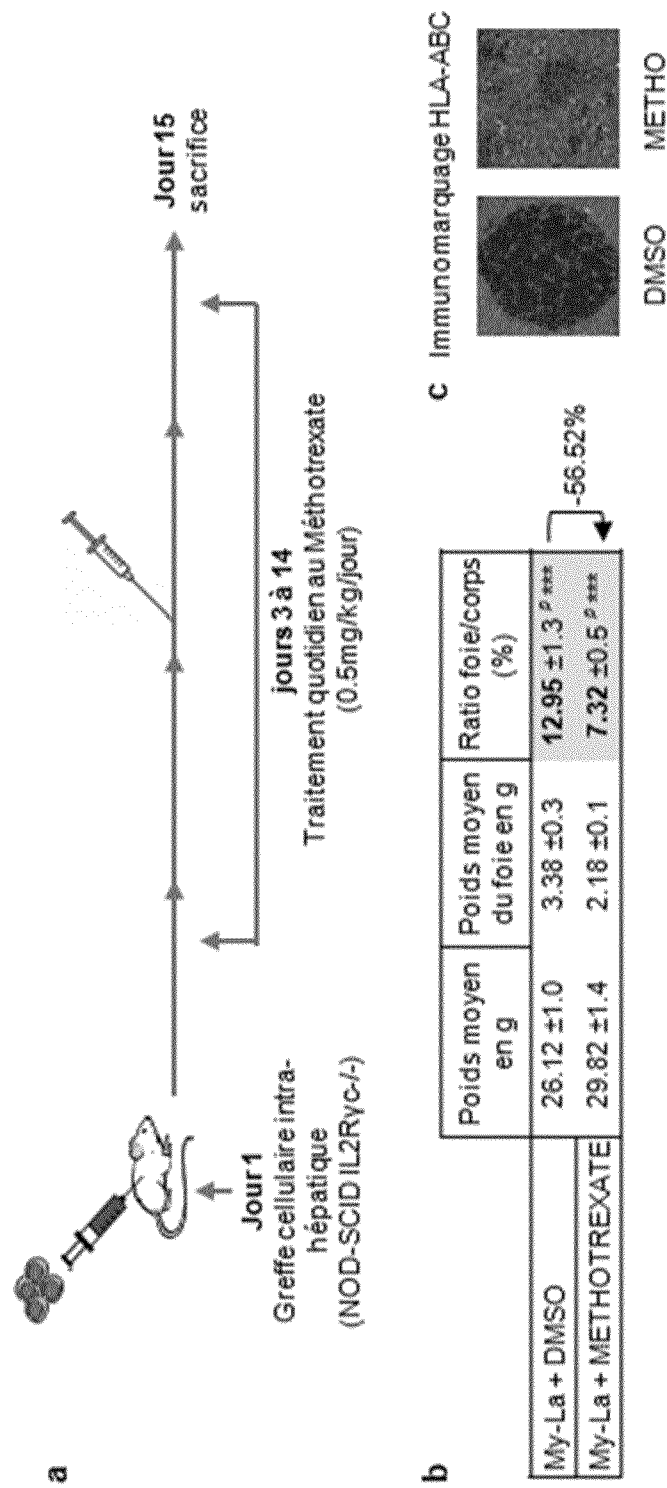


Figure 2

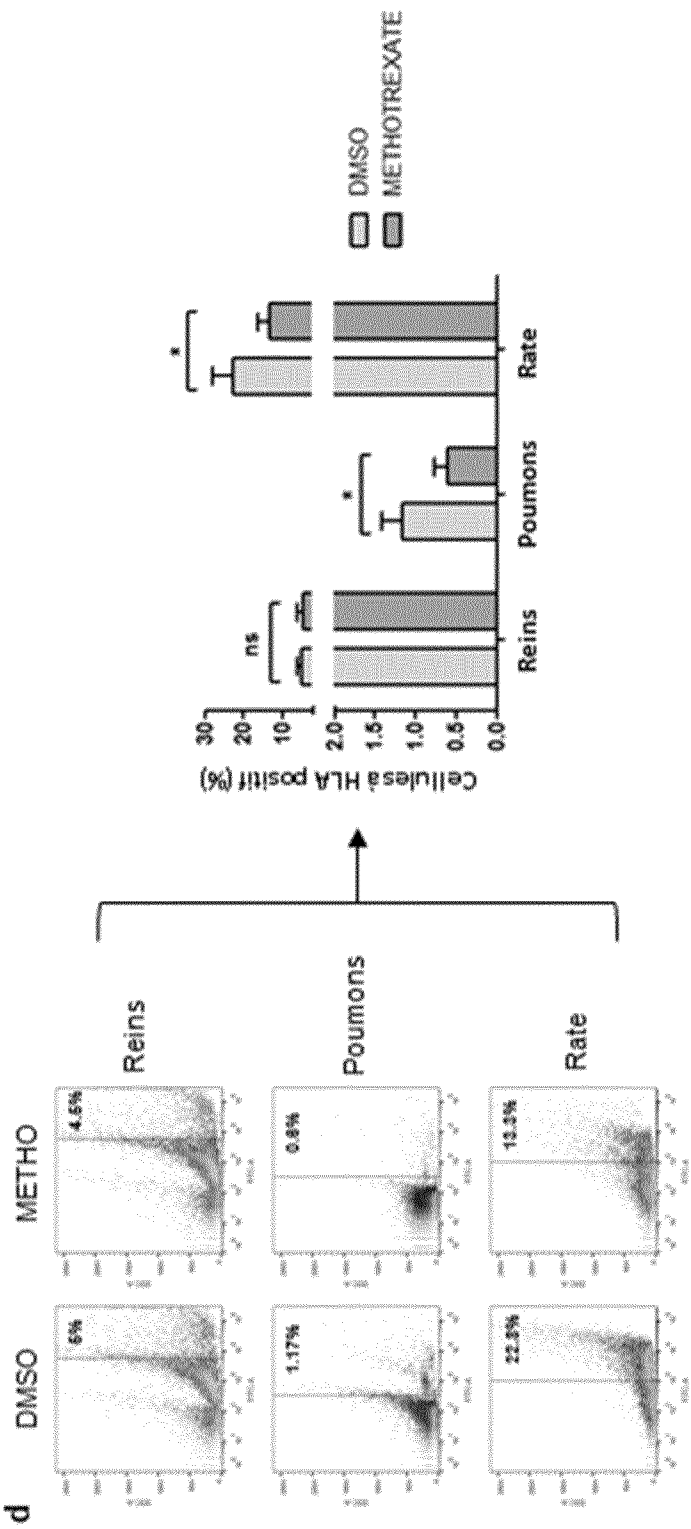


Figure 2 (suite)

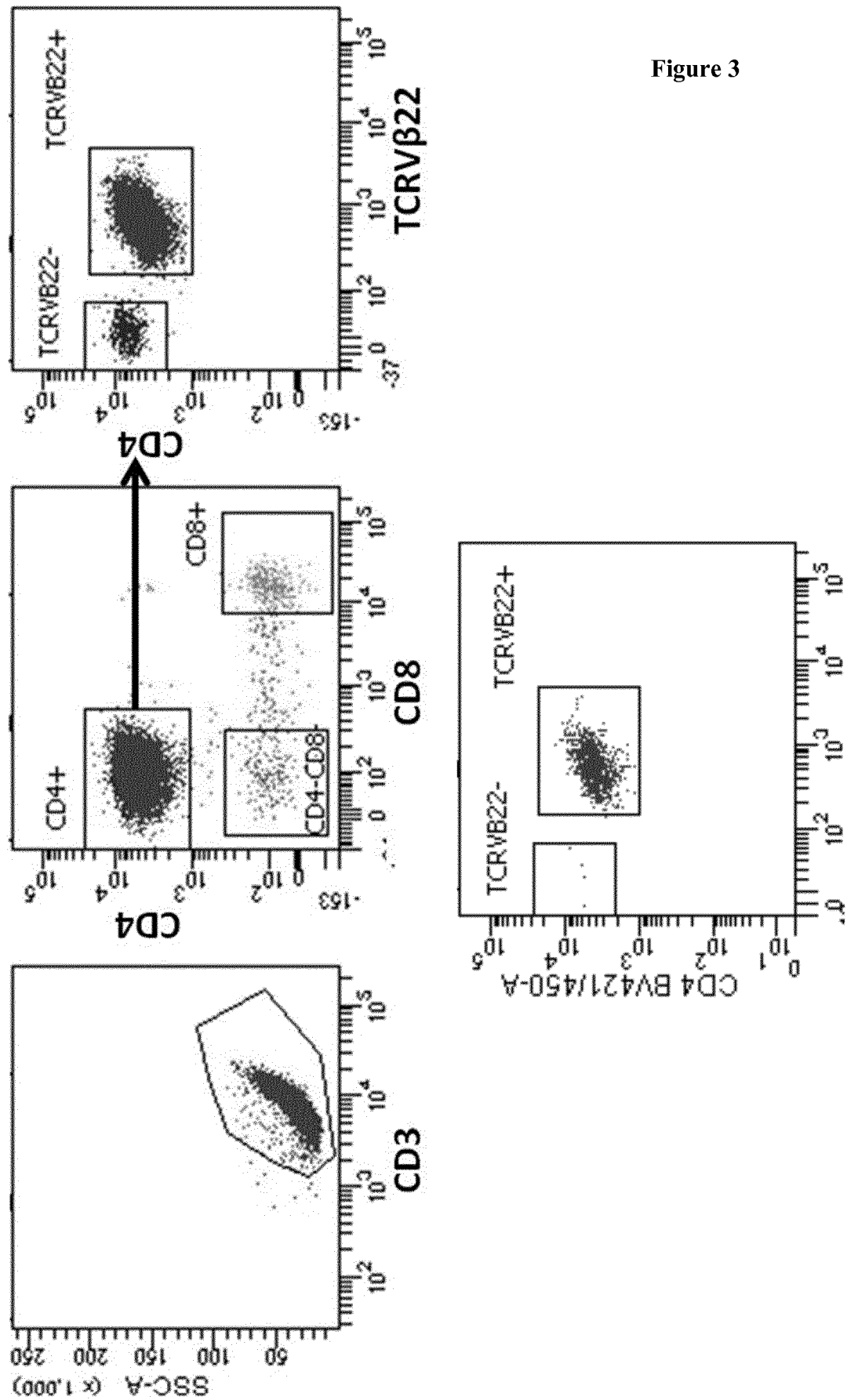


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/079664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783 A01K67/027
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LESLIE VAN DER FITS ET AL: "A novel mouse model for Sézary Syndrome using xenotransplantation of Sézary cells into immunodeficient RAG2 -/- [gamma]c -/- mice", EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, vol. 21, no. 9, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 706-709, XP055276118, COPENHAGEN; DK ISSN: 0906-6705, DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01556.x abstract "Materials and methods" page 707, column 1, paragraph 4 - column 2, paragraph 3 ----- -/--	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 January 2017

Date of mailing of the international search report

31/01/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Keller, Yves

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/079664

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RYOJI ITO ET AL: "Current advances in humanized mouse models", CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 9, no. 3, 13 February 2012 (2012-02-13), pages 208-214, XP055186062, ISSN: 1672-7681, DOI: 10.1038/cmi.2012.2 abstract page 209, column 1 -----	1-14
Y	WO 2012/145535 A2 (H LEE MOFFITT CANCER CT & RES [US]; ALTIOK SONER [US]) 26 October 2012 (2012-10-26) abstract page 3, line 20 - line 27 page 4, line 5 - line 10 page 4, line 15 - line 20 page 6, line 16 - page 8, line 5 page 9, line 10 - line 30 page 11, line 20 - page 26, line 19 page 29, line 32 - line 34 claims 1-53 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/079664

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012145535 A2	26-10-2012	US 2014047570 A1 WO 2012145535 A2	13-02-2014 26-10-2012

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/079664

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N5/0783 A01K67/027
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N A01K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LESLIE VAN DER FITS ET AL: "A novel mouse model for Sézary Syndrome using xenotransplantation of Sézary cells into immunodeficient RAG2 -/- [gamma]c -/- mice", EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, vol. 21, no. 9, 1 septembre 2012 (2012-09-01), pages 706-709, XP055276118, COPENHAGEN; DK ISSN: 0906-6705, DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01556.x abrégé "Materials and methods" page 707, colonne 1, alinéa 4 - colonne 2, alinéa 3 ----- -/-	1-14



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 janvier 2017

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/01/2017

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Keller, Yves

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	RYOJI ITO ET AL: "Current advances in humanized mouse models", CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 9, no. 3, 13 février 2012 (2012-02-13), pages 208-214, XP055186062, ISSN: 1672-7681, DOI: 10.1038/cmi.2012.2 abrégé page 209, colonne 1 -----	1-14
Y	WO 2012/145535 A2 (H LEE MOFFITT CANCER CT & RES [US]; ALTIOK SONER [US]) 26 octobre 2012 (2012-10-26) abrégé page 3, ligne 20 - ligne 27 page 4, ligne 5 - ligne 10 page 4, ligne 15 - ligne 20 page 6, ligne 16 - page 8, ligne 5 page 9, ligne 10 - ligne 30 page 11, ligne 20 - page 26, ligne 19 page 29, ligne 32 - ligne 34 revendications 1-53 -----	1-14

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/EP2016/079664

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)