



(51) Classification internationale des brevets :
C12N 5/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2010/059478

(22) Date de dépôt international :
2 juillet 2010 (02.07.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0955216 24 juillet 2009 (24.07.2009) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
ONCOBIOTEK [FR/FR]; 138 Allée des lucioles,
F-06390 Chateaufort-Villevieille (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ROUYER,**
Nicolas, Jacques [FR/FR]; 1010 Chemin du Camouyer,
Cedex 408, F-06330 Roquefort Les Pins (FR).
BARTHEL, Robert [FR/FR]; 138 Allée des lucioles,
F-06390 Chateaufort-Villevieille (FR).

(74) Mandataire : **NOVAGRAAF TECHNOLOGIES;**
Groupement 239, 122 rue Edouard Vaillant, F-92593
Levallois Perret Cedex (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

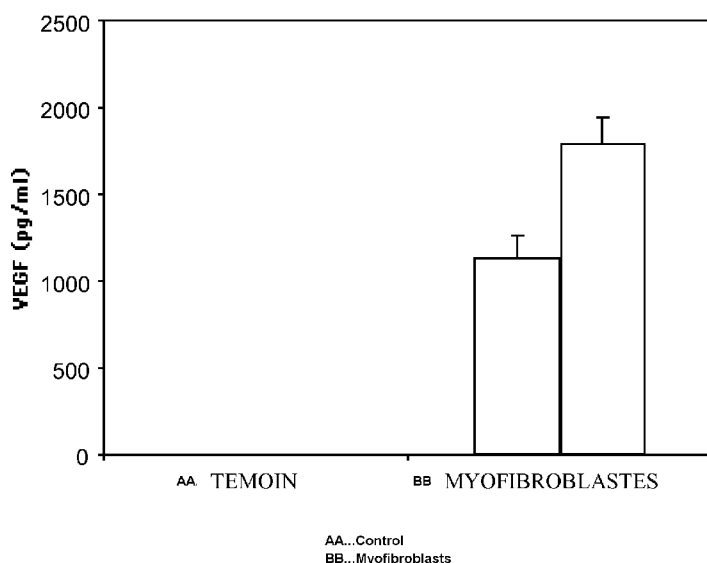
Publiée :

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

(54) Title : METHOD FOR OBTAINING MYOFIBROBLASTS

(54) Titre : PROCEDE D'OBTENTION DE MYOFIBROBLASTES

FIG. 1



(57) Abstract : The invention relates to a method for obtaining myofibroblasts. According to said method: (a) a sample of cells including essentially fibroblasts is prepared; and (b) said sample of cells is cultivated in a serum-free culture medium. The main purpose of the invention is to obtain a population of myofibroblasts with characteristics that enable said cells to be studied and, in particular, a population with the highest possible myofibroblast purity. The invention can be implemented for the following uses, among others: identification of myofibroblast biomarkers, identification of therapeutic targets, identification and validation of antineoplastic compounds, *in vitro* model for screening pharmaceutical or cosmetic compounds.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé d'obtention de myofibroblastes. Selon ce procédé : (a) on prépare un échantillon de cellules incluant essentiellement des fibroblastes; et (b) on met en culture cet échantillon de cellules dans un milieu de culture sans sérum. Le but principal visé par l'invention est d'obtenir une population de myofibroblastes, dont les caractéristiques facilitent toute étude de ces cellules, et en

particulier une population la plus pure possible en myofibroblastes. Quelques exemples d'application de l'invention sont: identification de biomarqueurs de myofibroblastes, identification de cibles thérapeutiques, identification et validation de composés anticancéreux, modèle *in vitro* pour le criblage de composés pharmaceutiques ou cosmétiques.

PROCÉDE D'OBTENTION DE MYOFIBROBLASTES

La présente invention concerne un procédé d'obtention de myofibroblastes.

5

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([]) renvoient à la liste des références présentée à la fin du texte.

10 Les myofibroblastes représentent un type particulier de fibroblastes appelés CAFs, pour l'anglais « *carcinoma-associated fibroblasts* », autrement dit fibroblastes associés à un carcinome. Ils sont impliqués également dans une variété de processus biologiques tels que par exemple le remodelage
15 tissulaire.

Ils expriment le marqueur alpha-actine de muscle lisse ou SMA.

Dans ce qui suit, le terme fibroblaste est utilisé au sens large. Il regroupe non seulement les fibroblastes, appelés ici fibroblastes « au sens strict », mais aussi les
20 dérivés de fibroblastes tels que les fibroblastes activés, les CAFs, les myofibroblastes. Ainsi, on inclut les fibroblastes impliqués dans les processus tumoraux mais aussi ceux impliqués dans tout autre processus biologique dans
25 lequel interviennent des myofibroblastes.

Il est connu notamment d'obtenir des fibroblastes à partir d'une tumeur, par digestion enzymatique de la tumeur suivie ou non d'une ou plusieurs étapes de purification (Orimo et al., Cell 2005, 121: 335-348 [1] ou Allinen et al.,
30 Cancer Cell 2004, 6:17-32 [2]).

Jusqu'à présent, les cultures de fibroblastes sont réalisées dans un milieu qui contient du sérum, classiquement

de 5 à 20% de sérum, et contiennent un pourcentage variable de myofibroblastes.

Par exemple, dans le commerce, on trouve des CAFs dans un milieu à 5% de sérum (Asterand), qui sont déterminés comme
5 tels par simple inspection visuelle.

Des laboratoires académiques produisent des populations de CAFs en milieu de culture à 10% de sérum. Le phénotype de ces cellules est déterminé à l'aide de la mesure du marqueur alpha-actine de muscle lisse. Ainsi, ces populations
10 contiennent un pourcentage variable de CAFs, en moyenne au plus 30%.

On trouve aussi dans le commerce des myofibroblastes hépatiques humains (Dominion Pharmakine) dans un milieu à 20% de sérum, dont seulement 50% à 60% expriment le marqueur
15 alpha-actine de muscle lisse (SMA). Dans le foie ainsi que dans le pancréas, la cellule à l'origine du myofibroblaste est la cellule étoilée, « *stellate cell* » en anglais, qui a pour particularité de présenter une activation spontanée avec expression du marqueur SMA lorsqu'elle est mise en culture
20 (Kinnman et al., Lab Invest 2001, 81:1709-1716 [3]; Omary et al., JCI 2007, 117:50-59 [4]).

L'utilisation de sérum, par exemple de veau fœtal ou de nouveau-né, présente pourtant les inconvénients suivants :

- problème éthique lié à la collecte du sérum,
- 25 - le sérum est un liquide biologique dont la composition est variable,
- la composition exacte du sérum n'est pas connue et il n'est pas possible de définir précisément les besoins de la cellule,
- 30 - le sérum contient des facteurs (facteurs de croissance, antagonistes...) qui peuvent interférer avec un test utilisé dans l'industrie pharmaceutique sur les cellules en culture,

- les cellules qui ont l'habitude de pousser en sérum changent de phénotype ou meurent lorsqu'on supprime le sérum dans le milieu de culture.

En résumé, les populations de fibroblastes, isolées à
5 partir de tissus pathologiques, telles que connues et étudiées in vitro à ce jour:

- sont hétérogènes,
- contiennent un pourcentage variable de myofibroblastes, et
- 10 - poussent dans un milieu qui contient du sérum, dont la présence a les inconvénients mentionnés ci-dessus.

Dans ce contexte, le but principal visé par l'invention est d'obtenir une population de myofibroblastes, dont les caractéristiques facilitent toute étude de ces cellules, et
15 en particulier une population la plus pure possible en myofibroblastes.

A cette fin, l'invention concerne un procédé d'obtention de myofibroblastes, caractérisé en ce que :

20 (a) on prépare un échantillon de cellules incluant essentiellement des fibroblastes; et

(b) on met en culture cet échantillon de cellules dans un milieu de culture sans sérum.

L'échantillon de cellules incluant essentiellement des
25 fibroblastes signifie qu'au moins 50% des cellules qu'il contient sont des fibroblastes, de préférence au moins 70%. Toutefois, l'homme du métier saura évaluer, par des expériences de routine, le pourcentage de fibroblastes que doit contenir l'échantillon de cellules pour la réalisation
30 de l'invention.

L'invention présente l'avantage de produire une population de myofibroblastes, plus pure que celles de l'art

antérieur, et qui poussent dans un milieu qui ne contient pas de sérum.

Ainsi, les myofibroblastes obtenus par le procédé selon l'invention permettent par exemple d'étudier avec précision et de manière reproductible la biologie de ces cellules, et
5 d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

Du fait de l'absence de sérum, ils permettent aussi d'étudier les besoins des cellules et de définir les facteurs qui, par exemple, induisent leur différenciation, leur
10 permettent de maintenir leur phénotype, soutiennent leur multiplication et/ou sont impliqués dans la sénescence prématurée de ces cellules.

Au bout de un ou deux passages en milieu sans sérum, la population de myofibroblastes obtenus avec le procédé selon
15 l'invention peut aller jusqu'à plus de 95% de myofibroblastes.

Le milieu de culture sans sérum comprend de préférence un milieu de base sans sérum qui est un milieu de culture de cellules épithéliales. En effet, le milieu de culture obtenu
20 à partir d'un tel milieu de base permet d'obtenir une très bonne pousse des myofibroblastes.

Ce milieu de base sans sérum peut notamment être un milieu de culture de cellules épithéliales mammaires humaines. A titre d'exemple, ce peut être autrement un milieu
25 de culture sans sérum connu pour la culture de cellules épithéliales bronchiques, placentaires ou rénales.

Ce milieu de base sans sérum peut être supplémenté à l'aide d'un ou plusieurs suppléments classiquement utilisés en culture cellulaire. A titre d'exemple de suppléments, on
30 peut citer les hormones, les facteurs de croissance, les mitogènes, les antibiotiques.

Il peut ainsi comprendre par exemple au moins un supplément choisi parmi l'insuline, l'hydrocortisone, le

facteur de croissance épidermique ou EGF, un extrait hypophysaire bovin ou BPE, et un antibiotique.

L'antibiotique n'est pas essentiel pour la bonne pousse des cellules; mais sa présence prévient la contamination
5 microbienne.

L'antibiotique peut être par exemple le GA-1000 incluant la gentamicine et l'amphotéricine-B, ou la normocine. Tout antibiotique utilisé en routine en culture cellulaire peut être utilisé dans l'invention, et, à titre d'exemple, on peut
10 citer la penicilline, la streptomycine, l'ampicilline, la kanamycine, la tylosine.

Par exemple, le milieu de culture sans sérum selon l'invention peut être un milieu de culture de cellules épithéliales mammaires humaines tel que le milieu trouvé dans
15 le commerce sous le nom de MEGM, pour l'anglais « *Mammary Epithelial Growth Medium* » (Cambrex).

A titre d'exemple, ce peut être autrement un milieu de culture sans sérum connu pour la culture de cellules épithéliales bronchiques, placentaires ou rénales.

20 La formulation initiale du MEGM est celle du milieu MCDB 170 (Hammond et al., PNAS 1984, 81: 5435-5439 [5]). Ce milieu MCDB 170, puis MEGM, a été développé et utilisé jusqu'ici spécifiquement pour la culture de cellules épithéliales mammaires humaines normales.

25 Dans la présente invention, l'utilisation de ce milieu est particulièrement avantageuse pour la culture de myofibroblastes.

Il se compose d'un milieu de base, dont la formulation exacte est connue sous le nom de milieu MEBM, pour l'anglais
30 « *Mammary Epithelial Basal Medium* », et de cinq suppléments: insuline, hydrocortisone, EGF, extrait hypophysaire bovin et un antibiotique, le GA-1000.

L'éthanolamine et la phosphoéthanolamine sont des précurseurs lipidiques inclus dans la formulation de base du MCDB 170 et dans le MEGM.

Un autre exemple de milieu de base sans sérum qui peut être utilisé dans l'invention est présenté dans le tableau 1. La colonne de gauche liste les produits entrant dans la composition de ce milieu. La colonne de droite indique, pour chaque produit, sa concentration molaire dans le milieu, en moles par litre de milieu.

Ce milieu de base sans sérum comprend en fait un mélange des milieux de culture DMEM et HamF12 (Invitrogen) en proportions 1:1.

Ce milieu de base, mélangé à de l'EGF (Peprotech), de l'hydrocortisone (SIGMA), du BPE (Invitrogen), de l'ITS-X (Invitrogen) qui inclut insuline, transferrine et sélénium, et un antibiotique tel que la normocine (Invivogen), donne un milieu de culture sans sérum qui peut être utilisé dans l'invention. On appelle le milieu de culture obtenu « milieu de culture sans sérum DMEM/HamF12 ».

Les compositions du DMEM et du HamF12 sont celles indiquées par exemple dans R. Ian Freshney, « *Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique* », 2005 [6].

Tableau 1

Composante	Concentration molaire
L-alanine	5×10^{-5}
L-arginine	7×10^{-4}
L-asparagine	5×10^{-5}
L-acide aspartique	5×10^{-5}
L-cystéine	10^{-4}
L-cystine	10^{-4}
L-acide glutamique	5×10^{-5}
L-glutamine	$2,5 \times 10^{-3}$
Glycine	$2,5 \times 10^{-4}$
L-histidine	$1,5 \times 10^{-4}$

L-isoleucine	$4,2 \times 10^{-4}$
L-leucine	$4,5 \times 10^{-4}$
L-lysine HCl	5×10^{-4}
L-méthionine	$1,2 \times 10^{-4}$
L-phénylalanine	$2,2 \times 10^{-4}$
L-proline	$1,5 \times 10^{-4}$
L-sérine	$2,5 \times 10^{-4}$
L-thréonine	$4,5 \times 10^{-4}$
L-tryptophane	$4,4 \times 10^{-5}$
L-tyrosine	$2,1 \times 10^{-4}$
L-valine	$4,5 \times 10^{-4}$
Biotine	$1,5 \times 10^{-8}$
Chlorure de choline	$6,4 \times 10^{-5}$
Acide folique	6×10^{-6}
Myo-inositol	7×10^{-5}
Nicotinamide	$1,7 \times 10^{-5}$
Pantothénate D-Ca	$9,4 \times 10^{-6}$
Pyridoxal HCl	10^{-5}
Pyridoxine HCl	$1,5 \times 10^{-7}$
Riboflavine	$5,8 \times 10^{-7}$
Thiamine	$6,4 \times 10^{-6}$
Vitamine B12	5×10^{-7}
CaCl ₂	$1,1 \times 10^{-3}$
KCl	$4,2 \times 10^{-3}$
MgSO ₄	4×10^{-4}
NaCl	$1,2 \times 10^{-1}$
NaHCO ₃	$2,9 \times 10^{-2}$
NaH ₂ PO ₄	$4,5 \times 10^{-4}$
Na ₂ HPO ₄	5×10^{-4}
CuSO ₄ 5H ₂ O	$7,8 \times 10^{-9}$
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	$1,2 \times 10^{-7}$
FeSO ₄ 7H ₂ O	$1,5 \times 10^{-6}$
ZnSO ₄ 7H ₂ O	$1,5 \times 10^{-6}$
Hypoxanthine	$1,5 \times 10^{-5}$
Thymidine	$1,5 \times 10^{-6}$
D-glucose	$1,8 \times 10^{-2}$
Pyruvate de sodium	10^{-3}
Acide linoléique	$1,5 \times 10^{-7}$
Acide lipoïque	$5,1 \times 10^{-7}$
Rouge phénol	$3,6 \times 10^{-5}$
Putrescine	5×10^{-7}

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'étape (a) comprend une obtention d'une suspension cellulaire à partir d'un échantillon biologique tel qu'un tissu biologique; puis

une culture initiale des cellules obtenues dans un milieu de culture favorisant la pousse de fibroblastes, par exemple dans un milieu de culture contenant du sérum.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention,
5 l'étape (a) comprend une obtention d'une suspension cellulaire à partir d'un échantillon biologique tel qu'un tissu biologique; puis une purification de sous-populations cellulaires pour obtenir l'échantillon de cellules incluant essentiellement des fibroblastes.

10 L'obtention d'une suspension cellulaire à partir d'un échantillon biologique peut se faire par digestion enzymatique ou par toute autre méthode telle que la dissociation mécanique ou les tamis cellulaires.

On préfère la digestion enzymatique parce que cette
15 méthode est simple et efficace.

L'échantillon biologique peut être de toute origine lui permettant d'inclure essentiellement des fibroblastes.

Ainsi, il peut venir de toute espèce de mammifère.

Notamment, l'échantillon biologique peut être une
20 tumeur, de préférence un carcinome. Ce peut être autrement tout autre tissu pathologique tel que tout tissu en remodelage.

Pour l'invention, l'essentiel est que l'échantillon biologique contienne des fibroblastes et en particulier des
25 myofibroblastes.

Le pourcentage de myofibroblastes dans l'échantillon biologique est évalué sur une coupe histologique avec un marquage immunohistochimique pour l'alpha-actine de muscle lisse.

30 A titre d'exemple, il est préférable de partir d'un échantillon biologique dont au moins 30%, ou plus préférentiellement au moins 50%, des fibroblastes ont le phénotype myofibroblaste.

Ainsi, le matériel de départ pour la culture peut être n'importe quel tissu de mammifère qui contient des myofibroblastes, que ce soit une tumeur, par exemple un carcinome, ou un tissu faisant l'objet de remodelage ou de
5 réparation tissulaire, tel qu'en cas de fibrose, cirrhose, cicatrice ou plaie. Les myofibroblastes jouent en effet un rôle clé dans tous ces processus.

Le milieu de culture favorisant la pousse de fibroblastes est plus classiquement un milieu contenant du
10 sérum. Il peut s'agir par exemple d'un milieu de culture à base de RPMI, de DMEM ou de HAMF12.

Pour purifier des sous-populations cellulaires afin d'obtenir l'échantillon de cellules incluant essentiellement des fibroblastes, on peut par exemple mettre en œuvre le
15 protocole décrit par Allinen et al [2] ou celui décrit par Orimo et al [1].

Dans l'invention, il est possible de partir d'un mélange complexe de cellules épithéliales et stromales, sans purification préalable. Toutefois, une culture initiale dans
20 un milieu contenant du sérum permet d'enrichir la culture en cellules fibroblastiques.

L'invention concerne également une culture cellulaire de myofibroblastes obtenue par le procédé selon l'invention, caractérisée en ce qu'au moins 80%, ou préférentiellement au
25 moins 95%, des cellules qu'elle contient sont des myofibroblastes.

Cette culture cellulaire selon l'invention est de manière avantageuse dépourvue de sérum.

Une telle culture cellulaire permet d'étudier les effets
30 d'une stimulation de l'activité des cellules, comme par exemple en cas de plaies qui ne guérissent pas, ou de déficit d'angiogenèse, ou au contraire les effets d'une inhibition de

l'activité des cellules, comme notamment en cas de cancer, fibrose, ou cirrhose.

L'invention concerne aussi l'utilisation du procédé selon l'invention, pour obtenir une culture de cellules dans laquelle les cellules incluent au moins 80%, ou
5 préférentiellement au moins 95%, de myofibroblastes.

Cette culture de cellules est de manière avantageuse dans un milieu sans sérum.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un milieu de culture sans sérum, développé pour la culture de cellules
10 épithéliales mammaires humaines, pour l'obtention de myofibroblastes à partir d'un échantillon de cellules incluant essentiellement des fibroblastes.

Ce milieu de culture sans sérum peut comprendre au moins un supplément choisi par exemple parmi l'insuline,
15 l'hydrocortisone, l'EGF, un extrait hypophysaire bovin et un antibiotique.

Dans l'invention, les cultures de cellules peuvent se faire à l'aide de tout moyen approprié, en suspension ou sur
20 un support, en boîte ou en flasque, etc. L'homme du métier est en mesure de choisir ces moyens en faisant appel à ses connaissances générales.

Ainsi, quelques exemples d'application de l'invention sont: identification de biomarqueurs de myofibroblastes,
25 identification de cibles thérapeutiques, identification et validation de composés anticancéreux, modèle in vitro pour le criblage de composés pharmaceutiques ou cosmétiques, toxicologie in vitro.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront clairement de la description détaillée qui en
30 est faite ci-après, à titre indicatif et nullement limitatif, en référence à la figure 1, qui représente un diagramme en colonnes de la quantité de VEGF produit par les

myofibroblastes obtenus selon l'invention, en picogrammes par millilitre de milieu.

5 Exemple de procédé d'obtention de myofibroblastes selon l'invention :

On part d'une tumeur prélevée chez un mammifère, dans le cas présent un carcinome prélevé sur un chien.

10 A titre d'exemple, une variante serait de partir d'un foie cirrhotique pour obtenir une population de myofibroblastes impliqués dans ce processus pathologique.

On peut réaliser un examen microscopique de la tumeur pour évaluer le pourcentage de myofibroblastes dans la tumeur, par exemple à l'aide d'un marquage immunohistochimique du tissu préalablement fixé en formol.

15 Idéalement, on part d'une tumeur qui contient un pourcentage élevé de myofibroblastes, c'est-à-dire de préférence au moins 30% des fibroblastes sont des myofibroblastes.

20 On réalise une digestion enzymatique de la tumeur suivie ou non d'une purification de sous-populations cellulaires.

Pour la digestion enzymatique, qui peut être remplacée par tout autre procédé permettant d'obtenir une suspension cellulaire, on peut procéder de trois façons différentes :

25 1) on conserve d'abord le tissu à 4°C pendant l'examen microscopique de la tumeur, en attendant les résultats de cet examen ; un inconvénient est que le tissu est susceptible de se dégrader.

30 2) on procède à la digestion enzymatique du tissu, avec ou sans purification de sous-populations cellulaires, puis on congèle les cellules en attendant le résultat de l'examen microscopique.

3) on procède à la digestion enzymatique du tissu et on initie la culture le jour même.

Après la digestion enzymatique, on peut ne pas conduire de purification de sous-populations cellulaires. Dans ce cas, on démarre la culture dans un milieu pour favoriser la pousse des fibroblastes. Au premier passage, on transfère les
5 cellules dans le milieu sans sérum MEGM.

Après la digestion enzymatique, on peut autrement réaliser une purification de sous-populations cellulaires. Dans ce cas, après cette purification, on fait pousser directement la fraction contenant les fibroblastes et dérivés
10 dans le milieu sans sérum MEGM.

A chaque passage, on peut réaliser une immunocytochimie pour déterminer le pourcentage de cellules positives au marqueur SMA.

Le milieu MEGM a été développé spécifiquement pour la
15 culture de cellules épithéliales mammaires humaines normales.

Au bout de un ou deux passages, on obtient une culture de myofibroblastes qui sont, à plus de 95% et jusqu'à 100%, positifs au marqueur SMA.

Les cellules ainsi obtenues présentent notamment les
20 avantages de maintenir leur phénotype en culture et de pousser de manière active sur environ 4 passages. Au cinquième passage seulement, elles montrent des signes de mort cellulaire ou sénescence.

25 En suivant le même procédé que dans l'exemple ci-dessus, à la seule différence que le milieu de culture MEGM est remplacé par le milieu de culture sans sérum DMEM/HamF12 décrit plus haut, on obtient des résultats similaires à ceux obtenus avec le milieu de culture MEGM : au bout de un ou
30 deux passages, on obtient une culture de myofibroblastes qui sont, à plus de 95% et jusqu'à 100%, positifs au marqueur SMA. Toutefois, avec ce milieu de culture sans sérum

DMEM/HamF12, les cellules poussent moins bien dès le quatrième passage.

5 Exemple de protocole expérimental à suivre pour la mise en œuvre du procédé d'obtention de myofibroblastes selon l'invention :

On part d'une tumeur mammaire, conservée par exemple dans un milieu de transport adapté.

10 On rince le prélèvement dans un tampon phosphate salin ou PBS.

On transfère des morceaux de tissu dans une boîte de culture contenant un cocktail enzymatique : collagénase et hyaluronidase dans un milieu de culture DMEM.

15 On dilacère le tissu en petits fragments à l'aide de deux scalpels, et on mélange intimement avec une pipette.

On place les fragments obtenus dans un incubateur à 37 °C pendant au minimum 2 heures.

On ajoute du DMEM au mélange tissu-cocktail enzymatique, et on mélange intimement.

20 On fait passer le mélange tissu-cocktail enzymatique-DMEM sur un filtre nylon de 40 microns.

On centrifuge pour obtenir un culot de cellules.

On lave les cellules obtenues avec du PBS, et on centrifuge à nouveau.

25 On élimine les globules rouges, si nécessaire, avec une solution de lyse des globules rouges, on lave au PBS et on centrifuge à nouveau pour obtenir un culot de cellules.

On reprend les cellules du culot dans un petit volume de PBS.

30 A ce stade, on peut estimer la viabilité des cellules, par coloration au bleu trypan par exemple, et compter les cellules.

On initie ensuite la culture de ces cellules dans des flasques de culture classiques, à 10^5 cellules par millilitre, dans un milieu qui contient du sérum: milieu de culture RPMI + 10% de sérum de veau fœtal (FBS) inactivé à la
5 chaleur;

Le lendemain, on change le milieu de culture pour enlever les cellules non-adhérentes.

Un transfert en milieu sans sérum peut être effectué dès le premier passage, lorsque les cellules sont à 80% de
10 confluence.

L'antibiotique contenu classiquement dans le milieu MEGM est le GA-1000 incluant les antibiotiques gentamicine et amphotéricine-B. Ces antibiotiques peuvent être remplacés notamment par la normocine (Invivogen).

15 On remplace ensuite le milieu sans sérum environ tous les 3 à 4 jours.

Comme mentionné précédemment, l'invention permet d'obtenir une population cellulaire incluant un pourcentage
20 élevé (jusqu'à plus de 95%) de myofibroblastes et qui poussent dans un milieu qui ne contient pas de sérum.

Les cellules ainsi obtenues présentent notamment les avantages de maintenir leur phénotype en culture et de pousser de manière active sur environ 4 passages.

25 En outre, ces cellules produisent en abondance du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF, le VEGF étant la principale molécule pro-angiogénique.

La figure 1 illustre la production importante de VEGF par les myofibroblastes obtenus avec l'invention.

30 Elle montre la concentration de VEGF canin dans le surnageant de myofibroblastes au cinquième passage dans le milieu MEGM, au premier jour (colonne de gauche ; partie droite « MYOFIBROBLASTE ») et au deuxième jour (colonne de

droite ; partie droite « MYOFIBROBLASTE »). La partie gauche de la figure (« TEMOIN ») sert de témoin : des mesures ont été effectuées dans le milieu de culture seul.

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un kit ELISA
5 VEGF canin (R&D Systems).

Cette figure confirme d'abord que les myofibroblastes sont une source importante de VEGF, la principale molécule pro-angiogénique. Une tumeur a en effet besoin de recruter des vaisseaux sanguins pour s'établir et pousser au-delà
10 d'une certaine taille. Il a été montré que des cellules du stroma sont détournées par la tumeur à cette fin. Par ailleurs, le recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins est une étape clé de la réparation tissulaire.

La figure 1 montre en outre que les cellules obtenues
15 par l'invention peuvent être utilisées pour cribler des composés pharmaceutiques à activité anti-angiogénique.

Liste des références

- [1] Orimo et al., Cell 2005, 121: 335-348
- 5 [2] Allinen et al., Cancer Cell 2004, 6:17-32
- [3] Kinnman et al., Lab Invest 2001, 81:1709-1716
- [4] Omary et al., JCI 2007, 117:50-59
- [5] Hammond et al., PNAS 1984, 81: 5435-5439
- [6] R. Ian Freshney, « *Culture of Animal Cells A Manual*
- 10 *of Basic Technique* », 2005

REVENDICATIONS

1/ Procédé d'obtention de myofibroblastes, caractérisé en ce que:

5 (a) on prépare un échantillon de cellules incluant essentiellement des fibroblastes; et

(b) on met en culture cet échantillon de cellules dans un milieu de culture sans sérum, ledit milieu étant un milieu de culture de cellules épithéliales mammaires.

10

2/ Procédé selon la revendication 1, dans lequel le milieu de culture sans sérum comprend en outre au moins un supplément choisi parmi l'insuline, l'hydrocortisone, l'EGF, un extrait hypophysaire bovin et un antibiotique.

15

3/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, dans lequel l'étape (a) comprend:

- une obtention d'une suspension cellulaire à partir d'un échantillon biologique tel qu'un tissu biologique; puis

20 - une culture initiale des cellules obtenues dans un milieu de culture favorisant la pousse de fibroblastes, par exemple dans un milieu de culture contenant du sérum.

4/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 25 2, dans lequel l'étape (a) comprend:

- une obtention d'une suspension cellulaire à partir d'un échantillon biologique tel qu'un tissu biologique; puis

30 - une purification de sous-populations cellulaires pour obtenir l'échantillon de cellules incluant essentiellement des fibroblastes.

5/ Procédé selon la revendication 3 ou 4, dans lequel l'échantillon biologique est une tumeur, de préférence un carcinome.

5 6/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, dans lequel l'échantillon biologique contient des myofibroblastes.

10 7/ Culture cellulaire de myofibroblastes obtenue par le procédé tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'au moins 80% des cellules qu'elle contient sont des myofibroblastes.

15 8/ Culture cellulaire selon la revendication 7, qui est dépourvue de sérum.

20 9/ Culture cellulaire selon la revendication 7 ou 8, dans laquelle au moins 95% des cellules qu'elle contient sont des myofibroblastes.

25 10/ Utilisation du procédé tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour obtenir une culture de cellules dans laquelle les cellules incluent au moins 80% de myofibroblastes.

11/ Utilisation selon la revendication 10, dans laquelle les cellules sont dans un milieu sans sérum.

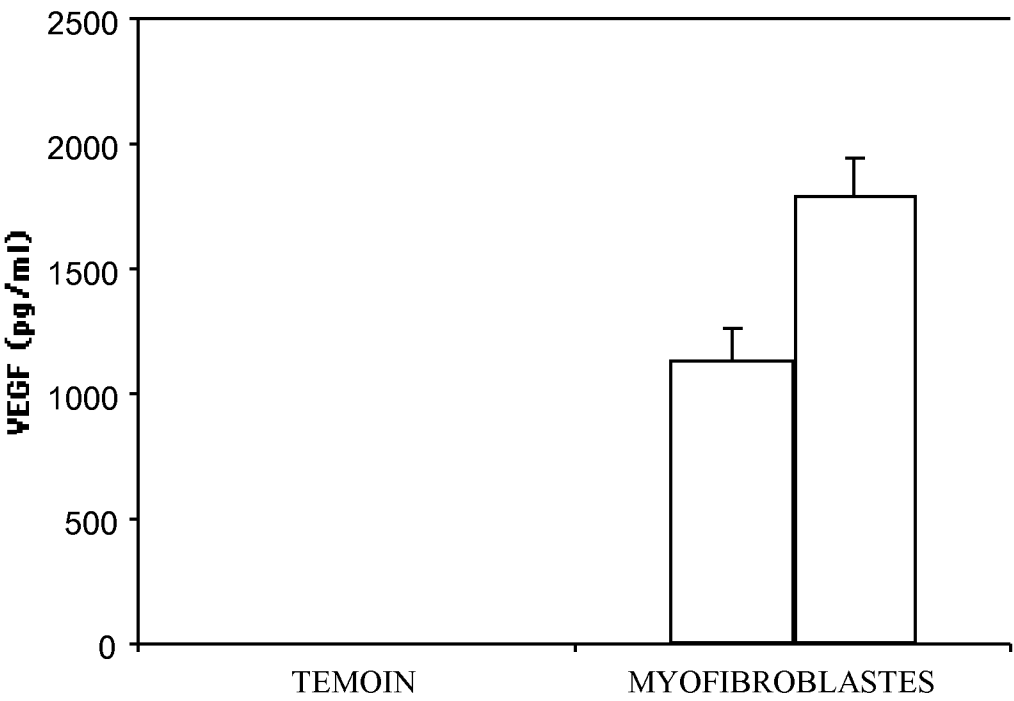
30 12/ Utilisation selon la revendication 11, dans laquelle les cellules incluent au moins 95% de myofibroblastes.

13/ Utilisation d'un milieu de culture sans sérum, développé pour la culture de cellules épithéliales mammaires

humaines, pour l'obtention de myofibroblastes à partir d'un échantillon de cellules incluant essentiellement des fibroblastes.

- 5 14/ Utilisation selon la revendication 13, dans lequel le milieu de culture sans sérum comprend au moins un supplément choisi parmi l'insuline, l'hydrocortisone, l'EGF, un extrait hypophysaire bovin et un antibiotique.

FIG. 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N5/00

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

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, 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.
Y	<p>WEBBER MUKTA M ET AL: "A human prostatic stromal myofibroblast cell line WPMY-1: A model for stromal-epithelial interactions in prostatic neoplasia" CARCINOGENESIS (OXFORD), vol. 20, no. 7, July 1999 (1999-07), pages 1185-1192, XP002562726 ISSN: 0143-3334 page 1188, right-hand column; figure 5</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	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 document 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

21 October 2010

Date of mailing of the international search report

27/10/2010

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

Trommsdorff, Marion

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059478

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>JESTER J V ET AL: "Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes." CORNEA SEP 1996, vol. 15, no. 5, September 1996 (1996-09), pages 505-516, XP009127731 ISSN: 0277-3740 page 509, right-hand column; figure 1d page 510, left-hand column; figures 1, 3</p>	1-14
Y	<p>MICERA A ET AL: "Nerve Growth Factor (NGF) Activates Conjunctival Myofibroblasts: a Role for NGF in Healing Processes and Tissue Remodeling." ARVO ANNUAL MEETING ABSTRACT SEARCH AND PROGRAM PLANNER, vol. 2002, 2002, XP002562727 & ANNUAL MEETING OF THE ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY; FORT LAUDERDALE, FLORIDA, USA; MAY 05-10, 2002 * abstract</p>	1-14
Y	<p>KHOUE ILSE M S L ET AL: "TGF-beta and bFGF affect the differentiation of proliferating porcine fibroblasts into myofibroblasts in vitro" BIOMATERIALS, vol. 20, no. 19, October 1999 (1999-10), pages 1815-1822, XP002562728 ISSN: 0142-9612 the whole document</p>	1-14
Y	<p>GRUPP CLEMENS ET AL: "A novel model to study renal myofibroblast formation in vitro" KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 59, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 543-553, XP002562729 ISSN: 0085-2538 the whole document</p>	1-14
Y	<p>EP 1 715 033 A1 (REPROCELL INC [JP]; ASAHI TECHNO GLASS COSPORATION [JP]; TANABE SEIYAK) 25 October 2006 (2006-10-25) example 1</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/059478

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1715033	A1	25-10-2006	
		AU 2005212041 A1	25-08-2005
		CA 2555021 A1	25-08-2005
		CN 1914313 A	14-02-2007
		WO 2005078070 A1	25-08-2005
		KR 20060114381 A	06-11-2006
		US 2008085554 A1	10-04-2008
<hr/>			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2010/059478

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C12N5/00

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

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, 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
Y	<p>WEBBER MUKTA M ET AL: "A human prostatic stromal myofibroblast cell line WPMY-1: A model for stromal-epithelial interactions in prostatic neoplasia" CARCINOGENESIS (OXFORD), vol. 20, no. 7, juillet 1999 (1999-07), pages 1185-1192, XP002562726 ISSN: 0143-3334 page 1188, colonne de droite; figure 5</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	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

21 octobre 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/10/2010

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

Trommsdorff, Marion

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2010/059478

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	<p>JESTER J V ET AL: "Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes." CORNEA SEP 1996, vol. 15, no. 5, septembre 1996 (1996-09), pages 505-516, XP009127731 ISSN: 0277-3740 page 509, colonne de droite; figure 1d page 510, colonne de gauche; figures 1, 3</p>	1-14
Y	<p>MICERA A ET AL: "Nerve Growth Factor (NGF) Activates Conjunctival Myofibroblasts: a Role for NGF in Healing Processes and Tissue Remodeling." ARVO ANNUAL MEETING ABSTRACT SEARCH AND PROGRAM PLANNER, vol. 2002, 2002, XP002562727 & ANNUAL MEETING OF THE ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY; FORT LAUDERDALE, FLORIDA, USA; MAY 05-10, 2002 * abrégé</p>	1-14
Y	<p>KHOUE ILSE M S L ET AL: "TGF-beta and bFGF affect the differentiation of proliferating porcine fibroblasts into myofibroblasts in vitro" BIOMATERIALS, vol. 20, no. 19, octobre 1999 (1999-10), pages 1815-1822, XP002562728 ISSN: 0142-9612 le document en entier</p>	1-14
Y	<p>GRUPP CLEMENS ET AL: "A novel model to study renal myofibroblast formation in vitro" KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 59, no. 2, février 2001 (2001-02), pages 543-553, XP002562729 ISSN: 0085-2538 le document en entier</p>	1-14
Y	<p>EP 1 715 033 A1 (REPROCELL INC [JP]; ASAHI TECHNO GLASS COSPORATION [JP]; TANABE SEIYAK) 25 octobre 2006 (2006-10-25) exemple 1</p>	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2010/059478

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1715033	A1	25-10-2006	
		AU 2005212041 A1	25-08-2005
		CA 2555021 A1	25-08-2005
		CN 1914313 A	14-02-2007
		WO 2005078070 A1	25-08-2005
		KR 20060114381 A	06-11-2006
		US 2008085554 A1	10-04-2008
<hr/>			