

(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
5 février 2004 (05.02.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/011596 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002376

(22) Date de dépôt international : 28 juillet 2003 (28.07.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/09525 26 juillet 2002 (26.07.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : IN-
STITUT GUSTAVE-ROUSSY [FR/FR]; 39, rue Camille
Desmoulins, F-94800 Villejuif (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : BENARD,
Jean [FR/FR]; 29, rue de la Bergère, F-94240 L'Hay les
Roses (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, 75847 Paris Cedex 17
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING AN EXTRACELLULAR MATRIX AND ITS USE FOR TUMOR CELL CULTURE

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION D'UNE MATRICE EXTRACELLULAIRE ET SON UTILISATION POUR LA
CULTURE DE CELLULES TUMORALES

(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing an isolated extracellular matrix, secreted by tumor cells, in particular epitheliomatous cells, methods for tumor cell culture using such a matrix, the use of such a matrix for producing a tumor cell line as well as novel tumor cell lines obtained by said method. The invention also concerns a method for selecting a compound capable of inhibiting the growth and/or proliferation of tumor cells, the use of said compounds as medicine for cancer treatment as well as a diagnosis or prognosis method *in vitro* by chromosomal analysis using said matrices. The invention further concerns a reactor or a kit for cell culture comprising such an extracellular matrix.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une matrice extracellulaire (MEC) isolée, sécrétée par des cellules tumorales, notamment des cellules épithéliomateuses, des procédés de culture de cellules tumorales mettant en oeuvre une telle matrice, l'utilisation d'une telle matrice pour l'établissement de lignée cellulaire tumorale ainsi que de nouvelles lignées cellulaires tumorales obtenues par ce procédé. L'invention concerne également une méthode de sélection de composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, l'utilisation de tels composés comme médicament pour le traitement du cancer ainsi qu'une méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique mettant en oeuvre de telles matrices. La présente invention a aussi pour objet un réacteur ou un kit pour la culture cellulaire comprenant de telle MEC.

WO 2004/011596 A2

PROCEDE DE PREPARATION D'UNE MATRICE EXTRACELLULAIRE ET SON UTILISATION POUR LA CULTURE DE CELLULES TUMORALES

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une matrice
5 extracellulaire (MEC) isolée, sécrétée par des cellules tumorales, notamment des
cellules épithéliomateuses, des procédés de culture de cellules tumorales mettant en
œuvre une telle matrice, l'utilisation d'une telle matrice pour l'établissement de lignée
cellulaire tumorale ainsi que de nouvelles lignées cellulaires tumorales obtenues par
ce procédé. L'invention concerne également une méthode de sélection de composés
10 capables d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, l'utilisation
de tels composés comme médicament pour le traitement du cancer ainsi qu'une
méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique mettant en
œuvre de telles matrices. La présente invention a aussi pour objet un réacteur ou un
kit pour la culture cellulaire comprenant de telle MEC.

15 Les tumeurs solides, épithéliomateuses en particulier, sont difficiles à mettre en
culture et, le cas échéant, à être propagées *in vitro* sous forme de lignées. Une tumeur
solide cancéreuse présente, outre son contingent épithélial malin (cellules
cancéreuses *sensu stricto*), un contingent de cellules stromales (fibroblastes, cellules
endothéliales des vaisseaux tumoraux) sans lequel les cellules malignes ne peuvent
20 se développer *in vivo*.

Qu'il s'agisse des épithélia ou des cellules de soutien, tous les tissus
s'organisent et se polarisent à partir d'une lame basale constituée de matrice
extracellulaire (MEC), ensemble d'intégrines, de protéoglycane, de protéines laminines
et de récepteurs de facteurs de croissance. La composition et la structure de cette
25 MEC sont spécifiques d'un tissu donné.

Sous la lame basale, et dans le cas d'un épithélium, le tissu conjonctif de
soutien est formé de fibroblastes, de macrophages, de mastocytes, et de cellules
endothéliales des vaisseaux nourrissant ce tissu de soutien. Un tel tissu conjonctif
synthétise une MEC très abondante lui permettant de répondre aux tensions,
30 essentiellement mécaniques.

Quant à la MEC des épithélia, elle a un triple rôle :

- maintien des gènes dans leur contexte tissulaire,
- induction de la morphogénèse après adhésion cellulaire,
- prévention de l'apoptose et de l'invasion tumorale (pour corollaire, invasion si
35 phénomène de dégradation).

La composition précise de la MEC des cellules épithéliales et des cellules conjonctives n'est pas connue à l'heure actuelle.

Parmi les réactifs utilisés pour améliorer l'adhésion sur un support de cellules cancéreuses, on peut citer par exemple certaines protéines constitutives de matrice extracellulaire sécrétée par la lame basale d'un épithélium, telles que la laminine, le collagène IV, ou encore la gélatine, commercialisés par de nombreux laboratoires commerciaux. Ces réactifs sont applicables en monocouche sur le plastique des flacons de culture.

On peut également citer les complexes multiprotéiques tels que Matrigel® (« membrane basale-like ») proposés par le Société Sigma (USA). Ces complexes sont de composition inconnue sont extraits généralement à partir de tumeurs expérimentales après une étape de lyse cellulaire.

On peut encore citer les matrices extracellulaires issues de cellules de cordon ombilical et commercialisées par certains Laboratoires Académiques Universitaires.

On peut en outre citer le sérum de veau foetal, contenant des facteurs de croissance et d'adhérence, utilisé dans le milieu de culture de cellules qui favorise l'adhésion des cellules carcinomateuses.

En général, si ces réactifs favorisent l'adhésion des cellules cancéreuses, ceux-ci ne permettent pas de stimuler leur prolifération ou de stimuler leur prolifération de manière constante, ceci du notamment aux variations des lots de fabrication et ainsi de leur qualité.

On peut enfin citer la technique de fabrication d'une matrice extracellulaire proposée par Gospodarowicz et al. (Endocrine Reviews, 1 (3):201-227, 1980), à partir de cellules endothéliales de cornée de bœuf utilisé pour la culture de cellules tumorales, cette matrice présentant une faible stabilité.

Ainsi, il reste de pouvoir disposer d'un réactif biologique constant pour la culture de cellules malignes tumorales permettant d'obtenir à la fois leur adhésion, notamment sur un support plastique, et leur prolifération.

En effet, de tels réactifs pourront être avantageusement utilisés non seulement pour la culture de cellules tumorales mais également pour l'établissement de lignées cellulaires tumorales issues de tumeur primaire. De telles cultures ou lignées pourront être un outil de choix pour étudier leurs propriétés biologiques (acide nucléique, protéine, activités enzymatiques), ou encore pour réaliser des tests prédictifs de sensibilité aux traitements de tumeurs (chimiothérapie et radiothérapie).

Il serait également souhaitable de pouvoir disposer de tels réactifs pour un type de cancer donné permettant la prolifération de cellules tumorales issues d'un prélèvement d'une tumeur chez un patient. En effet la prolifération de telles cellules tumorales ou l'établissement d'une lignée cellulaire à partir de telles cellules
5 permettraient l'étude *in vitro* à court terme des cellules malignes de ce patient et la sensibilité de ces cellules malignes au traitement envisagé avant son administration au patient.

Ceci est justement l'objet de la présente invention.

Les inventeurs ont mis en évidence de manière surprenante que des matrices
10 extracellulaires isolées, sécrétées par des cellules tumorales de mammifère, notamment épithéliomateuses, permettaient de faire adhérer et proliférer des cellules tumorales, et permettaient l'établissement de lignée cellulaire tumorale établie à partir de cellules tumorales issues d'un échantillon d'une tumeur primaire et/ou métastatique, ceci en particulier lorsque ces cellules tumorales que l'on cherche à
15 cultiver ou dont on cherche à établir une lignée cellulaire étaient issues d'un tissu de même origine embryonnaire que les cellules tumorales sécrétant ladite matrice.

Ainsi sous un premier aspect, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une matrice extracellulaire isolée, sécrétée par des cellules tumorales d'origine animale, y compris l'Homme, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes
20 suivantes :

a) la mise en culture desdites cellules tumorales d'origine animale sur un support dans des conditions permettant auxdites cellules tumorales d'origine animale de proliférer et de sécréter ladite MEC ; et

b) la récupération de la MEC ainsi formée débarrassée desdites cellules
25 tumorales.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé de préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention est caractérisé en ce qu'il comprend en outre entre ladite étape a) et ladite étape b) l'étape suivante :

- la lyse desdites cellules tumorales.

30 Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, le procédé de préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention est caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales d'origine animale sont des cellules épithéliomateuses.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de préparation
35 d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention est caractérisé en ce

que lesdites cellules tumorales sont des cellules d'une lignée cellulaire tumorale préalablement établie à partir d'une tumeur primaire et/ou d'une prolifération métastatique.

De manière également préférée, l'invention concerne un procédé de
5 préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention, caractérisé en ce que ladite lignée cellulaire tumorale a été établie à partir de cellules tumorales et/ou métastatique issues d'une tumeur mammaire ou ovarienne.

De manière encore plus préférée, l'invention concerne un procédé de
10 préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules issues d'une tumeur d'origine humaine.

Sous un aspect particulièrement préféré, l'invention a pour objet un procédé de
préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules issues de la lignée cellulaire
15 tumorale IGR-OV1 telle que déposée dans les conditions du traité de Budapest à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, (France) sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

La lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 est une lignée de cellules épithéloïdes dérivées d'une tumeur primitive d'un cancer ovarien humain. Ces cellules cancéreuses
20 se développent en monocouche et en « grappes » flottantes dans le milieu. Ces « grappes » cellulaires sont capables d'adhérer au plastique. Réciproquement, les cellules adhérentes peuvent proliférer en « grappes » flottantes et c'est le contingent adhérent qui est propagé (Bénard, J. et al., Cancer Research, 45, 4970-4979, 1985).

Sous un deuxième aspect, l'invention a pour objet une matrice extracellulaire
25 (MEC) isolée susceptible d'être obtenue par un procédé de préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention.

Parmi les MEC isolées selon la présente invention, on préfère tout particulièrement la MEC isolée sécrétée par la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

30 De préférence, la MEC isolée selon la présente invention est conditionnée sous une forme fluide, congelée, séchée ou lyophilisée et, le cas échéant, stérilisée.

Sous un troisième aspect, l'invention a pour objet un réacteur pour culture cellulaire contenant une MEC isolée selon la présente invention.

Sous un quatrième aspect, l'invention a pour objet un procédé de culture de
35 cellules tumorales selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend une

étape dans laquelle lesdites cellules tumorales sont mises en contact avec une MEC isolée selon la présente invention, lesdites cellules tumorales que l'on désire cultiver étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

5 Sous un cinquième aspect, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie à partir de cellules tumorales issues d'un échantillon d'une tumeur primaire et/ou métastatique d'origine animale, y compris l'Homme, caractérisé en ce que ledit procédé met en œuvre une étape dans laquelle les cellules tumorales contenues dans ledit échantillon de la tumeur et dont on cherche à obtenir une lignée établie sont mises en contact avec une MEC isolée selon la présente invention, lesdites cellules tumorales dont on cherche à obtenir une lignée établie étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

10 Dans un mode de réalisation préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que le premier tissu tumoral dont sont issues les cellules tumorales à partir desquelles ladite MEC a été obtenue et le deuxième tissu tumoral contenant les cellules tumorales que l'on cherche à cultiver ou dont on cherche à établir une lignée cellulaire sont de même espèce animale, y compris l'Homme.

15 Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont issus indépendamment l'un de l'autre du groupe de tumeurs malignes ou bénignes, notamment issus de tumeurs de l'ovaire, du sein, de la prostate ou de la thyroïde.

20 De préférence encore, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral est un tissu issu d'une tumeur de sein, notamment de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 et ledit deuxième tissu tumoral est issu de tumeurs malignes ou bénignes de l'ovaire, du sein, de la prostate ou de la thyroïde.

25 Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont de même origine embryonnaire.

30

embryonnaire.

Par « même origine embryonnaire » pour un tissu tumoral, on entend désigner dans la présente description des tissus tumoraux dérivant des mêmes tissus primitifs embryonnaires (endoderme, ectoderme ou mésoderme). Par exemple, des tumeurs épithéliomateuses ovarienne et mammaires seront considérées comme dérivant d'une même origine embryonnaire puisque les tissus épithéliaux ovariens et mammaires dérivent de l'endoderme.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont d'origine embryonnaire différente, de préférence dérivé de l'endoderme et de l'ectoderme, ou inversement.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont indépendamment l'un de l'autre de type mammaire ou ovarien.

Dans un mode de réalisation plus préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral est de type ovarien et ledit deuxième tissu tumoral est de type mammaire ou ovarien.

Sous un aspect particulièrement préféré, l'invention a pour objet un procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont d'origine humaine.

Sous un sixième aspect, l'invention a pour objet l'utilisation d'une MEC isolée selon la présente invention, comme élément d'un milieu de culture pour la culture cellulaire de cellules tumorales ou pour l'établissement d'une lignée cellulaire de cellules tumorales issues d'une tumeur primaire et/ou d'une prolifération métastatique, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

Sous un septième aspect, l'invention a pour objet une lignée cellulaire tumorale établie obtenue par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention.

Parmi les lignées cellulaires tumorales établies pouvant être obtenues par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention, on préfère tout particulièrement la lignée cellulaire tumorale dénommée IGR-OV-22-AS telle que déposée dans les conditions du traité de Budapest à la CNCM sous le
5 numéro I-2894 le 20 juin 2002 ou la lignée cellulaire tumorale dénommée IGR-BR-11-NS telle que déposée dans les conditions du traité de Budapest à la CNCM sous le numéro I-2895 le 20 juin 2002.

La lignée cellulaire tumorale dénommée IGR-OV-22-AS a été établie à partir de cellules épithéliomateuses contenues dans un prélèvement d'ascite péritonéale
10 carcinomateuse d'un adénocarcinome épithélial ovarien humain et sur un contexte génétique de prédisposition au syndrome de cancer du sein et/ou ovaire, le cancer épithélial ovarien s'étant développé chez une patiente constitutionnellement hétérozygote pour le gène BRCA2 (mutation d'un allèle du gène). Ces cellules cancéreuses épithéliomateuses se développent en monocouche.

15 Cancer humain de sein, cellules épithéliomateuses issues d'un nodule.

La lignée cellulaire tumorale dénommée IGR-BR-11-NS a été nouvellement établie sur contexte génétique de prédisposition au syndrome cancer sein/ovaire, chez une patiente hétérozygote BRCA1 (mutée pour un allèle du gène).

Ces cellules cancéreuses épithéliomateuses se développent également en
20 monocouche.

Sous un huitième aspect, l'invention a pour objet une méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la culture desdites cellules tumorales comprenant au moins une étape de
25 culture sur une MEC isolée selon la présente invention, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée ;

b) la mise en contact dudit composé avec les cellules tumorales obtenues à l'étape a) dans des conditions permettant normalement leur croissance et/ou leur prolifération ; et

30 c) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

Dans un mode de réalisation préféré, la méthode de sélection d'un composé selon la présente invention est caractérisée en ce que ladite MEC isolée à l'étape a) est la MEC sécrétée par la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée à la
35 CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

Dans un mode de réalisation plus préféré, l'invention a pour objet une méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, notamment de cellules tumorales d'une tumeur ovarienne, de préférence humaine, ou de cellules tumorales de même origine embryonnaire qu'une cellule ovarienne, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact dudit composé avec une culture de cellules issue de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV-22-AS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2894 le 20 juin 2002 ; et

b) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

Dans un mode de réalisation également plus préféré, l'invention a pour objet une méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, notamment de cellules tumorales d'une tumeur mammaire, de préférence humaine, ou de cellules tumorales de même origine embryonnaire qu'une cellule mammaire, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact dudit composé avec une culture de cellules issue de la lignée cellulaire tumorale d'origine humaine IGR-BR-11-NS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2895 le 20 juin 2002 ; et

b) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

Dans un mode de réalisation également plus préféré, l'invention a pour objet une méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales d'un patient atteint d'une tumeur à partir d'un échantillon de cellules tumorales prélevées préalablement chez ledit patient, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) l'établissement d'une lignée cellulaire tumorale à partir desdites cellules tumorales prélevées chez le patient par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie par un procédé selon la présente invention ;

b) la mise en contact dudit composé avec un échantillon de la lignée cellulaire tumorale obtenue à l'étape a) dans des conditions permettant normalement leur croissance et/ou leur prolifération ; et

c) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération des cellules de la lignée cellulaire tumorale.

Sous un neuvième aspect, l'invention a pour objet l'utilisation d'un composé pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'un cancer caractérisée en ce que ledit composé est sélectionné par un procédé de sélection selon la présente invention.

5 De manière préférée, l'invention concerne l'utilisation d'un composé selon la présente invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer du sein ou des ovaires.

Sous un dixième aspect, l'invention a pour objet une méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique, notamment par cytogénétique et
10 FISH interphasique, de cellules tumorales préalablement prélevées chez un patient, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape dans laquelle lesdites cellules tumorales préalablement prélevées que l'on désire tester sont mises en culture sur une MEC isolée selon la présente invention, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

15 Dans un mode de réalisation préféré, la méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique de cellules tumorales préalablement prélevées chez un patient est caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) l'établissement d'une lignée cellulaire tumorale à partir desdites cellules tumorales par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie par un
20 procédé selon la présente invention ; et

b) l'analyse chromosomique d'un échantillon de cellules de ladite lignée obtenue à l'étape a) dans des conditions permettant leur croissance et/ou leur prolifération ; et

c) la mise en évidence d'une altération génétique d'un ou plusieurs
25 chromosomes par une technique permettant de détecter de telles altérations, notamment par l'analyse karyotypique ou par la technique dite de FISH interphasique.

Le génome des cellules tumorales se caractérise par un ensemble d'altérations génétiques : gain et/ou perte de régions chromosomiques. Le cytogénéticien révèle, en routine, ces altérations à l'aide notamment de deux techniques : l'analyse
30 karyotypique et l'analyse par FISH (« Fluorescent In Situ Hybridization »), techniques bien connues de l'homme de l'art dont nous rappelons ici que certaines étapes afin de noter l'importance de pouvoir disposer de cellules tumorales possédant une capacité proliférative.

- Analyse karyotypique après culture *in vitro* des cellules tumorales

Vingt-quatre heures après ensemencement des cellules tumorales, une solution de colchicine est ajoutée au milieu de culture. Les cellules qui ont adhéré au plastique et qui ont engagé une prolifération, vont se trouver bloquées en mitose révélant ainsi leurs chromosomes. Le rendement des mitoses dans ces conditions est
5 très variable selon le type de tumeur et la capacité proliférative du tissu tumoral.

- Analyse par FISH interphasique sur appositions cellulaires

L'apposition d'un fragment tumoral sur une lame d'observation cytologique permet le dépôt de cellules malignes et, après fixation, une analyse par hybridation fluorescente in situ. Cette analyse ne nécessite pas de cellules en mitose mais
10 s'applique à toutes les cellules, la majorité étant en interphase, une petite minorité étant en mitose permet de visualiser les chromosomes.

Les cellules tumorales épithéliomateuses en présence de matrice extracellulaire selon l'invention, notamment issue de la lignée IGR-OV1 vont adhérer, se différencier et proliférer. Ainsi, selon la technique mise en œuvre par le
15 cytogénéticien pour mettre en évidence les altérations génétiques de cellules tumorales, la matrice extracellulaire de l'invention apporte les améliorations suivantes.

- Pour l'analyse karyotypique

L'analyse karyotypique nécessitant une culture cellulaire préalable pour recruter des cellules en mitoses. Ces cultures sont réalisées habituellement sur un
20 support plastique, ce qui ne favorise pas en particulier l'adhésion et la prolifération des cellules cancéreuses épithéliomateuses. Le rendement de l'analyse est très faible, du fait d'un nombre limité de mitoses. La culture en présence de matrice extracellulaire selon l'invention favorisant l'adhésion spécifique aux cellules tumorales et leur prolifération, le nombre de mitoses de cellules tumorales recrutées par la matrice sera
25 beaucoup plus importante.

- Pour l'analyse FISH

Sur une lame présentant la matrice extracellulaire préalablement préparée, la présence de la matrice extracellulaire selon l'invention apposée sur la lame permet
30 une adhésion accrue des cellules cancéreuses. Les empreintes tumorales réalisées sur la matrice seront plus riche en cellules et réduiront le temps d'analyse.

Sous un dernier aspect, l'invention a pour objet un kit pour la culture de cellules tumorales, notamment issues de tumeur mammaire ou ovarienne, ou pour l'établissement de lignée cellulaire issue desdites cellules tumorales, comprenant une MEC selon l'invention.

La présente invention concerne en outre un support solide, notamment une lame de verre, sur laquelle est apposée une matrice extracellulaire selon la présente invention et son utilisation pour l'analyse chromosomique de cellules tumorales.

Les exemples suivants ont été choisis pour fournir à l'homme de l'art une description complète afin de pouvoir réaliser et utiliser la présente invention. Ces exemples ne sont pas destinés à limiter la portée de ce que les inventeurs considèrent comme leur invention, ni destinées à montrer que seules les expériences ci-après ont été effectuées.

10 Exemples

Exemple 1 : Préparation d'une matrice extracellulaire obtenue à partir de la lignée IGR- OV1

1) Mise en culture des cellules IGR-OV1

Les cellules IGR-OV1 (temps de doublement 25h environ) sont cultivées entre les passages 170 et 210 correspondant à environ 500 générations, nombre de générations garantissant la stabilité de la lignée. Une fois la confluence atteinte, les cellules sont passées au 1/3 dans des flacons de culture de 25 cm², cultivées dans 5 ml de RPMI 1640 supplémenté par 10% de sérum fœtal de veau. Après 3 jours de culture en incubateur, à 37°C en présence de 5 % de CO₂, la confluence des cellules épithéliomateuses est atteinte.

2) Préparation de la matrice

Le milieu de culture surmontant les cellules confluentes est éliminé et remplacé par du tampon PBS (tampon phosphate salin) dépourvue de calcium et de magnésium et préincubé à 37°C. Cette opération est renouvelée 3 fois, elle permet d'éliminer les protéines du milieu de culture dont la présence altérerait la reproductibilité de la lyse cellulaire. Les volumes des 3 tampons successifs sont les suivants :

- 1 ml par puits d'une plaque de 24 puits,
- 2 ml par puits d'une plaque de 6 puits,
- 5 ml pour un flacon de culture de 25 cm²,
- 30 - 10 ml pour un flacon de culture de 75 cm².

Après la troisième décantation du PBS, le même volume de NH₄OH 0,02 M préchauffé à 37°C est versé sur les parois du flacon avant d'être appliqué aux cellules confluentes. L'incubation est faite dans l'incubateur à CO₂ à 37°C pendant 6 minutes.

Si à l'issue de ce temps d'incubation la lyse n'est pas totale, elle est poursuivie par tranches de 30 secondes. Lorsque tous les corps cellulaires ont disparu, l'arrêt se fait alors par décantation de la solution ammoniacuée qui est très visqueuse (ADN génomique libéré par les cellules). Le lavage de la matrice se fait par le cycle addition-décantation à 3 reprises du même volume de PBS que le volume de lyse. Le premier lavage peut encore être visqueux. Les lavages doivent être efficaces mais suffisamment doux pour ne pas endommager la matrice.

3) Conservation de la matrice

Les flacons et les plaques de culture contenant la matrice sont conservés sous sacs thermo-soudés dans le ¼ du volume du culture d'un milieu PBS contenant des antibiotiques, l'ensemble à 4°C. La matrice ainsi préparée peut être utilisée entre le 3^{ème} et le 21^{ème} jour suivant sa préparation sans dégradation.

4) Matériel et milieux nécessaires

Matériel :

- plaques de culture Costar (boîte de 6, 24 et 96 puits) ;
- flacons de culture Nunc de 25 et 75 cm².

Milieux de culture :

- RPMI 1640 Gibco BRL supplémenté en :
 - 2 mM glutamine,
 - en antibiotiques : vancomycine (12 µg/ml), gentamycine (10 µg/ml) et fungizone (2 µg/ml).

Le milieu ainsi reconstitué est tamponné par 10 mM final d'HEPES.

- Sérum foetal de veau d'origine canadienne, Sté Biomédia ;
- PBS (PBS pour « Phosphate Buffer Salts ») sans calcium ni magnésium Gibco ;
- Milieu de conservation de la matrice : PBS sans calcium ni magnésium Gibco en présence des antibiotiques et à la concentration finale indiquée ci-dessus.

Exemple 2 : Obtention de deux lignées épithéliomateuses : IGR-0V-22 et IGR-BR-11

A) Etablissement de la lignée épithéliomateuse IGR-0V-22

30

Le cancer de l'épithélium ovarien se développe sous la forme d'une tumeur solide ovarienne loco-régionale et d'une ascite péritonéale contenant des cellules épithéliomateuses.

La tumeur primitive (TP) et l'ascite (Asc) préalablement prélevés chez une patiente à contexte familial de susceptibilité du cancer du sein et/ou de l'ovaire, patiente constitutionnellement hétérozygote pour le gène BRCA2, ont été réceptionnés par le laboratoire d'anatomo-pathologie.

5 1) Préparation de la tumeur

Il a été pratiqué dans la tumeur des ponctions à l'aide d'une aiguille (22 gauges) et d'une seringue d'1 ml (type insuline) préalablement héparinée. Le contenu de la seringue est repris dans un grand volume de RPMI 1640 – 10 % sérum foetal de veau, puis centrifugé. Les hématies contaminant le culot cellulaire sont éliminées par un choc hypotonique à l'aide d'eau distillée stérile. La suspension cellulaire est de nouveau centrifugée et enfin reprise dans 4 ml de RPMI 1640 – 10 % sérum foetal de veau ce qui a permis d'obtenir une suspension de cellules épithéliomateuses à $7,5 \times 10^5$ cellules/ml. La suspension cellulaire ainsi préparée estensemencée dans les 12 puits d'une plaque de culture présentant la matrice extracellulaire sécrétée par la lignée IGR-OV1 préalablement préparée (matrice préparée depuis 17 jours). La densité d'ensemencement est importante, environ 3×10^5 cellules / $4,5 \text{ cm}^2$.

2) Préparation de l'ascite

Un grand volume d'ascite prélevé a été centrifugé en présence de RPMI 1640 – 10 % sérum foetal de veau. Le culot de population cellulaire obtenu a été ensuite traité dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour la tumeur. Les cellules épithéliomateuses ont été ensemencées dans une plaque de 24 puits présentant la matrice extracellulaire sécrétée par la lignée IGR-OV1 et en utilisant les mêmes concentrations cellulaires indiquées ci dessus.

3) Culture *in vitro* des cellules épithéliomateuses de la tumeur et de l'ascite

25 L'observation tous les quatre jours des cultures a permis d'objectiver des cellules épithéliomateuses adhérant au substrat, se différenciant (au vu de leur morphologie) et proliférant.

Lorsque la confluence a été observée, les cellules ont été trypsinées à l'aide de trypsine-EDTA 0,025 %, reprises par le milieu RPMI 1640 – 10 % sérum foetal de veau et réensemencées sur matrice aux mêmes densités d'ensemencement initial.

30 Après amplification des deux populations cellulaires, TP et Asc, dans des boîtes de culture à 12 puits pendant 5 passages, les 5 passages suivants ont été réalisés dans des flacons de culture de plus grande surface de culture, soit 25 cm^2 , présentant à nouveau la matrice extracellulaire.

A l'issue de ces 10 passages sur matrice extracellulaire, les cellules épithéliomateuses sont capables de se propager directement sur plastique. Les cellules tumorales TP et Asc ayant subi 20 passages, les sous-lignées IGR-OV22-Asc et IGR-OV22-TP sont considérées comme établies présentant un phénotype tumoral
5 similaire et typiquement épithéliomateux.

B) Etablissement de la lignée IGR-BR-11

La tumeur primitive (TP) d'un cancer mammaire préalablement prélevée chez une patiente à contexte familial de susceptibilité du cancer du sein et/ou de l'ovaire, patiente constitutionnellement hétérozygote pour le gène BRCA1, a été réceptionnée
10 par le laboratoire d'anatomo-pathologie.

Le protocole indiqué pour l'établissement de la lignée IGR-OV-22 (TP), en particulier les concentrations initiales d'ensemencement, a été strictement identique pour l'établissement de cette lignée IGR-BR-11. A l'issue de 10 passages en présence de matrice extracellulaire, les cellules épithéliomateuses ont été cultivées à raison de
15 30 passages sur plastique en l'absence de matrice extracellulaire. La lignée IGR-BR-11 a été ainsi établie.

Exemple 3 : Culture de cellules épithéliales tumorales de différents types histologiques et de malignité variable à partir de la MEC issue de la lignée cellulaire
20 tumorale IGR-OV1

Des mises en primoculture (P0) initiées sur la MEC issue de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1, suivies de passages successifs (P1, P2, ...) ont été réalisées avec succès avec des cellules issues de :

A) Tumeurs malignes

25 1) Tumeurs cancéreuses du sein (n=8)

Résultats :

- Deux P0 suivies chacune de P1 ; et
- Une lignée établie (P40).

Soit un score de réussite de 3/8 (35 %).

30 2) Tumeurs cancéreuses de l'ovaire (n=5)

Résultats :

- Trois P0 ; et
- Une P0 suivie de P1, P2, P3 et P4.

Soit un score de réussite de 4/5 (80 %).

35 3) Tumeurs cancéreuses de la prostate (n=2)

- Une P0 suivie de P1 et P2.

Soit un score de réussite de 1/2 (50 %).

4) Cancers papillaires de la thyroïde (n=2)

- Deux PO suivies chacune de P1

5 Soit un score de réussite de 2/2 (100 %).

B) Tumeurs à la limite de la malignité et tumeurs bénignes

1) Tumeur « Border-line » de l'ovaire (n=7)

- Trois P0 suivies de P1 ; et

10 - Deux P0.

Soit un score de réussite de 5/7 (70 %).

2) Goitre thyroïdien (n=1)

-Un P0.

Soit un score de réussite de 1/1 (100 %).

15 Ainsi, des primocultures de cellules épithéliales cancéreuses ont été pratiquées avec succès sur MEC non seulement pour les différentes tumeurs malignes suivantes : sein, 3/8 (35 %), ovaires 4/5 (80 %), prostate 1/2 (50 %), thyroïde 2/2 (100 %) ; mais aussi sur des tumeurs ovariennes à la limite de la malignité 5/7 (70 %) et tumeurs bénigne thyroïdienne, 1/1 (100%).

20 Ces résultats indiquent dont l'intérêt des MEC selon la présente invention la matrice IGR-XC pour la culture de tumeurs épithéliales de différents types histologiques et de malignité variables (16/25 soit 65 %) ainsi que pour l'établissement de nouvelles lignées cellulaires.

REVENDEICATIONS

1/ Procédé de préparation d'une matrice extracellulaire (MEC) isolée, sécrétée par des cellules tumorales d'origine animale, y compris l'Homme, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 a) la mise en culture desdites cellules tumorales d'origine animale sur un support dans des conditions permettant auxdites cellules tumorales d'origine animale de proliférer et de sécréter ladite MEC ; et

10 b) la récupération de la MEC ainsi formée débarrassée desdites cellules tumorales.

2/ Procédé de préparation d'une MEC isolée selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre entre ladite étape a) et ladite étape b) l'étape suivante :

- la lyse desdites cellules tumorales.

15 3/ Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales d'origine animale sont des cellules épithéliomateuses.

4/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules d'une lignée cellulaire tumorale préalablement établie à partir d'une tumeur primaire et/ou d'une prolifération métastatique.

5/ Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite lignée cellulaire tumorale a été établie à partir de cellules tumorales et/ou métastatiques issues d'une tumeur mammaire ou ovarienne.

25 6/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules issues d'une tumeur d'origine humaine.

7/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules issues de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

30 8/ MEC isolée obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 7.

9/ MEC isolée selon la revendication 8, sécrétée par la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

35 10/ MEC isolée selon la revendication 8 ou 9, conditionnée sous une forme fluide, congelée, séchée ou lyophilisée et, le cas échéant, stérilisée.

11/ Procédé de culture de cellules tumorales, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle lesdites cellules tumorales sont mises en contact avec une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, lesdites cellules tumorales que l'on désire cultiver étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été
5 secrétée.

12/ Procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie à partir de cellules tumorales issues d'un échantillon d'une tumeur primaire et/ou métastatique d'origine animale, y compris l'Homme, caractérisé en ce que ledit procédé met en œuvre une étape dans laquelle les cellules tumorales contenues dans ledit échantillon
10 de la tumeur et dont on cherche à obtenir une lignée établie sont mises en contact avec une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, lesdites cellules tumorales dont on cherche à obtenir une lignée établie étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été secrétée.

13/ Procédé selon l'une des revendications 11 et 12, caractérisé en ce que
15 le premier tissu tumoral dont sont issues les cellules tumorales à partir desquelles ladite MEC a été obtenue et le deuxième tissu tumoral contenant les cellules tumorales que l'on cherche à cultiver ou dont on cherche à établir une lignée cellulaire sont de même espèce animale, y compris l'Homme.

14/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que
20 ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont de même origine embryonnaire.

15/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont d'origine embryonnaire
différente.

25 16/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 15, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont indépendamment l'un de l'autre de type mammaire ou ovarien.

17/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 16, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral est de type ovarien et ledit deuxième tissu tumoral est de
30 type mammaire ou ovarien.

18/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 17, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont d'origine humaine.

19/ Utilisation d'une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, comme élément d'un milieu de culture pour la culture cellulaire de cellules tumorales
35 ou pour l'établissement d'une lignée cellulaire de cellules tumorales issues d'une

tumeur primaire, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

20/ Lignée cellulaire tumorale établie obtenue par un procédé selon l'une des revendications 12 à 18.

5 21/ Lignée cellulaire tumorale selon la revendication 20, dénommée IGR-OV-22-AS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2894 le 20 juin 2002.

22/ Lignée cellulaire tumorale selon la revendication 20, dénommée IGR-BR-11-NS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2895 le 20 juin 2002.

23/ Méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance
10 et/ou la prolifération de cellules tumorales, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la culture desdites cellules tumorales comprenant au moins une étape de culture sur une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée ;

15 b) la mise en contact dudit composé avec les cellules tumorales obtenues à l'étape a) dans des conditions permettant normalement leur croissance et/ou leur prolifération ; et

c) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

20 24/ Méthode de sélection d'un composé selon la revendication 23, caractérisée en ce que ladite MEC isolée à l'étape a) est la MEC sécrétée par la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

25 25/ Méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact dudit composé avec une culture de cellules issue de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV-22-AS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2894 le 20 juin 2002 ou de la lignée cellulaire tumorale d'origine humaine IGR-BR-11-
30 NS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2895 le 20 juin 2002 ; et

b) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

26/ Méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales d'un patient atteint d'une tumeur à partir

d'un échantillon de cellules tumorales prélevées préalablement chez ledit patient, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

5 a) l'établissement d'une lignée cellulaire tumorale à partir desdites cellules tumorales prélevées chez le patient par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie selon l'une des revendications 12 à 18 ;

b) la mise en contact dudit composé avec un échantillon de la lignée cellulaire tumorale obtenue à l'étape a) dans des conditions permettant normalement leur croissance et/ou leur prolifération ; et

10 c) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération des cellules de la lignée cellulaire tumorale.

27/ Méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique, notamment par cytogénétique et FISH interphasique de cellules tumorales préalablement prélevées chez un patient, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape dans laquelle lesdites cellules tumorales préalablement prélevées que l'on désire tester sont mises en culture sur une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

28/ Méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse cytogénétique de cellules tumorales préalablement prélevées chez un patient, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) l'établissement d'une lignée cellulaire tumorale à partir desdites cellules tumorales par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie selon l'une des revendications 12 à 18 ; et

25 b) l'analyse cytogénétique d'un échantillon de cellules de ladite lignée obtenue à l'étape a) dans des conditions permettant leur croissance et/ou leur prolifération.

29/ Kit pour la culture de cellules tumorales, notamment issues de tumeur mammaire ou ovarienne, ou pour l'établissement de lignée cellulaire issue desdites cellules tumorales, comprenant une MEC selon l'une des revendications 8 à 10.

30 30/ Réacteur pour culture cellulaire contenant une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10.