



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2002/08/02  
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2003/02/20  
 (45) Date de délivrance/Issue Date: 2013/01/08  
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 2004/02/03  
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2002/002789  
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2003/014333  
 (30) Priorité/Priority: 2001/08/03 (FR01/10443)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 5/07* (2010.01),  
*A61K 35/12* (2006.01), *A61K 35/32* (2006.01),  
*A61K 35/36* (2006.01), *A61L 27/38* (2006.01),  
*C12N 5/071* (2010.01), *C12Q 1/02* (2006.01)  
 (72) Inventeurs/Inventors:  
 FARJANEL, JEAN, FR;  
 DAMOUR NEE BAUDOUX, ODILE, FR;  
 SOMMER, PASCAL, FR;  
 BRAYE, FABIENNE, FR;  
 FESSY, MICHEL-HENRI, FR  
 (73) Propriétaires/Owners:  
 UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1, FR;

(54) Titre : UTILISATION D'INHIBITEURS DES LYSYL OXYDASES POUR LA CULTURE CELLULAIRE ET LE GENIE  
 TISSULAIRE  
 (54) Title: USE OF LYSYL OXIDASE INHIBITORS FOR CELL CULTURE AND TISSUE ENGINEERING

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs des lysyl oxydases dans le cadre de la mise en oeuvre de procédés de culture in vitro de cellules susceptibles d'être utilisées en thérapie tissulaire, ou cellulaire, ou en pharmacologie expérimentale.

(73) Propriétaires(suite)/Owners(continued):CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, FR

(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(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  
20 février 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/014333 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 5/06,  
A61K 35/32, 35/36, C12Q 1/02(74) Mandataires : DEMACHY, Charles etc.; Gros-  
set-Fournier & Demachy SARL, 54, rue St. Lazare,  
F-75009 Paris (FR).(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/02789(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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 2 août 2002 (02.08.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/10443 3 août 2001 (03.08.2001) FR(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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris  
Cedex 16 (FR). UNIVERSITE CLAUDE BERNARD  
LYON 1 [FR/FR]; 43, boulevard du 11 novembre 1918,  
F-69622 Villeurbanne Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

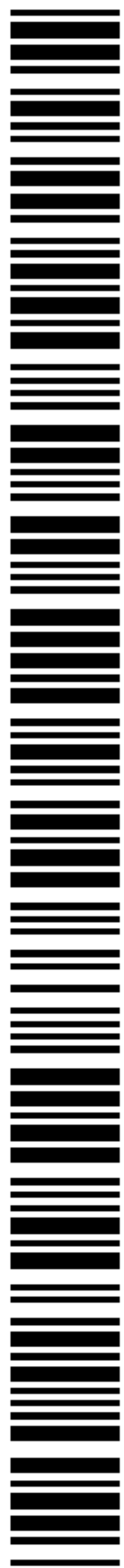
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : FAR-  
JANEL, Jean [FR/FR]; 28 Cours Lafayette, F-69003  
Lyon (FR). DAMOUR née BAUDOUX, Odile [FR/FR];  
32, rue Charles Luizet, F-69230 St Genis Laval (FR).  
SOMMER, Pascal [FR/FR]; 2, allée de la Citadelle,  
F-69230 St Genis-Laval (FR). BRAYE, Fabienne  
[FR/FR]; 97, chemin de Villeneuve, 69780 Saint Pierre de  
Chandieu (FR). FESSY, Michel-Henri [FR/FR]; 7, rue  
Ninon Vallin, F-69390 Millery (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

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

(54) Title: USE OF LYSYL OXIDASE INHIBITORS FOR CELL CULTURE AND TISSUE ENGINEERING

(54) Titre : UTILISATION D'INHIBITEURS DES LYSYL OXYDASES POUR LA CULTURE CELLULAIRE ET LE GENIE  
TISSULAIRE(57) Abstract: The invention concerns the use of lysyl oxidase inhibitors for implementing *in vitro* cell culture processes capable  
of being used in tissue or cell engineering, or in experimental pharmacology.(57) Abrégé : L'invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs des lysyl oxydases dans le cadre de la mise en oeuvre de procédés  
de culture *in vitro* de cellules susceptibles d'être utilisées en thérapie tissulaire, ou cellulaire, ou en pharmacologie expérimentale.

WO 03/014333 A1

**UTILISATION D'INHIBITEURS DES LYSYL OXYDASES POUR LA CULTURE  
CELLULAIRE ET LE GÉNIE TISSULAIRE**

---

5

L'invention concerne l'utilisation d'inhibiteurs des lysyl oxydases dans le cadre de la mise en œuvre de procédés de culture *in vitro* de cellules susceptibles d'être utilisées en thérapie tissulaire, ou cellulaire, ou en pharmacologie expérimentale.

Les lysyl oxydases sont des amine oxydases qui induisent la réticulation des collagènes et de l'élastine en catalysant et qui catalysent la désamination oxydative de résidus lysyls et hydroxylysyls en  $\alpha$ -aminoadipic-S-semialdéhyde correspondants (pour revue, Smith-Mango & Kagan, Matrix Biology 1998, 16 : 387):  $RCH_2NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow$

$RCHO + NH_3 + H_2O_2$ . Les résidus aldéhydes formés vont subir une série de condensations spontanées avec d'autres fonctions aldéhydes ou amines non modifiées voisines, conduisant à des liaisons intra et inter-moléculaires. Ces condensations sont à l'origine des pontages intra et intermoléculaires des collagènes et de l'élastine. Parmi les inhibiteurs directs de l'activité LO, qui agissent sur le site actif de l'enzyme, le  $\beta$ APN en est le plus couramment utilisé (voir revue de H.M.Kagan Acta Tropica 77 (2000) 147-152).

La réticulation dépendante des LO des collagènes et d'élastine est un paramètre essentiel de la formation des tissus et implants néosynthétisés *in vitro*: L'absence de réticulation ne permet pas la constitution de tissus résistants, trop de réticulation (ou une réticulation chimique inappropriée) entraînent une trop grande rigidité et une rétractation des tissus.

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que l'adjonction d'un inhibiteur spécifique des LO à des chondrocytes, cellules spécifiques du cartilage, permet d'annuler la dédifférenciation de ces cellules. En effet, le problème majeur de la formation d'implants de cartilage par les chondrocytes est que ceux-ci se dédifférencient, et perdent leur potentiel à fabriquer du collagène de cartilage (collagènes de type cartilage: II, IX, XI et X). Sans cet inhibiteur, les chondrocytes dédifférenciés synthétisent des types de collagènes anormaux dans le cartilage sain (I, III). L'adjonction temporaire de l'inhibiteur de LO a donc un effet important et réversible sur la formation du

cartilage, dont les propriétés physiques spécifiques sont liées à la présence des collagènes qui le constituent.

De plus, les Inventeurs ont également mis en évidence que l'adjonction du même inhibiteur des LO lors de la constitution d'un modèle de peau reconstruite se traduit aussi par un effet sur le phénotype des cellules. Les composants cellulaires du modèle testé de peau reconstruite sont des fibroblastes et des kératinocytes. Les fibroblastes synthétisent notamment les collagènes fibrillaires (type I et III) et l'élastine du derme, alors que les kératinocytes se différencient pour former toutes les couches de l'épiderme jusqu'à la couche cornée assurant la fonction de barrière. En présence de l'inhibiteur de LO, les propriétés de la peau reconstruite sont modifiées. On observe que l'absence de réticulation des collagènes permet une meilleure colonisation du support éponge par les fibroblastes et une augmentation de la formation de la matrice extracellulaire, ainsi qu'une diminution *in vitro* de la rétraction de la peau reconstruite. D'autre part, on observe une meilleure organisation de l'épiderme, avec une couche granuleuse très bien formée. L'adjonction temporaire d'inhibiteur des LO a donc un effet positif sur la gestion de la formation et l'organisation de la peau reconstruite en facilitant la préparation en grande quantité de ce matériel.

A partir de biopsies de cartilage, et en présence d'inhibiteurs de LO, les Inventeurs ont démontré qu'il devient possible de multiplier des chondrocytes sur un support plastique en 2 dimensions en présence de sérum du donneur selon les conditions classiques, tout en obtenant la production d'une matrice extracellulaire dénuée de tout collagène anormal, même après 2 semaines de culture, et malgré une solubilisation accrue des collagènes synthétisés dans le milieu de culture (Fig 1, 2). Une telle matrice voit sa fluidité diminuer au cours du temps de culture : on choisit le temps de culture optimal en fonction de la quantité de matrice produite et de sa fluidité recherchées. Il est alors inutile de recourir à l'emploi de support exogène dont, ultérieurement, le rejet ou une résorption déficiente éventuelles annuleraient les propriétés favorables déjà obtenues.

En l'absence de l'inhibiteur type de l'activité LO, le  $\beta$ APN, la matrice extracellulaire est très appauvrie en collagènes de type cartilage, et majoritairement constituée de collagènes de type I ainsi que, pour une faible part, de collagène de type III, c'est à dire de collagènes qui ne participent pas à l'élaboration du cartilage. De plus, la matrice présente une absence de fluidité incompatible avec le recours éventuel à des injections par seringue.

WO 03/014333

PCT/FR02/02789

L'expression de plusieurs isoformes de Lysyl oxydase (LOX et LOL1 au moins) par les chondrocytes est manifeste, mais n'est pas modifiée par le traitement par le  $\beta$ APN (fig 3) qui n'inhibe que l'activité de l'Enzyme (tableau I).

L'adjonction de  $\beta$ APN, utilisée à différentes concentrations (entre 50 ou 200 $\mu$ g/ml),  
5 permet la formation de peaux reconstruites humaines dont la rétraction peut être diminuée *in vitro*. De plus, le  $\beta$ APN à 50  $\mu$ g/ml améliore la colonisation de l'éponge par les fibroblastes et l'extension de la synthèse de la matrice extracellulaire. Il améliore aussi l'organisation de l'épiderme, avec une couche granuleuse très bien formée qui génère une couche cornée très structurée. Cet effet sur la différenciation de l'épiderme et la diminution de la rétraction  
10 réduisent la formation de feuillets qui se détachent et peuvent faciliter la préparation de peau reconstruite (fig 4).

L'utilisation d'inhibiteurs de l'activité LO peut s'appliquer à toute culture de cellules  
aux fins d'obtenir tout implant tissulaire, puisque les collagènes et les LO sont des  
constituants et des intervenants ubiquitaires de tous les tissus animaux. Les conditions des  
15 cultures peuvent cependant varier en fonction des types cellulaires utilisés et des substrats ciblés.

L'invention concerne l'utilisation d'inhibiteurs directs ou indirects des lysyl  
oxydases (LO), en tant qu'inhibiteurs de la dédifférenciation des cellules en culture *in vitro*,  
en vue du maintien quasiment constant du phénotype desdites cellules dans le cadre de la  
20 mise en œuvre de procédés de culture *in vitro* de ces dernières, et ce pendant la quasi  
totalité du temps de culture.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement l'utilisation d'inhibiteurs  
susmentionnés pour la préparation de cellules différenciées dont le phénotype est préservé.

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation d'inhibiteurs  
25 susmentionnés pour la préparation d'une matrice cellulaire, constituée de cellules  
différenciées cultivées en présence desdits inhibiteurs, et du milieu extracellulaire  
conditionné par lesdites cellules et au contact de ladite matrice, ladite matrice cellulaire  
étant susceptible de pouvoir être utilisée en tant que tissus ou implants tissulaires.

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, d'inhibiteurs directs  
30 des LO choisis parmi :

WO 03/014333

PCT/FR02/02789

A) les amines primaires réagissant avec le groupe carbonyle du site actif des LO, et plus particulièrement celles donnant, après liaison au carbonyle, un produit stabilisé par résonance, telles que les amines primaires suivantes :

- l'éthylènediamine,
- 5 - l'hydrazine, la phénylhydrazine, et leurs dérivés, le semicarbazide, et les dérivés de l'urée,
- les aminonitriles, tels que le  $\beta$ -aminopropionitrile ( $\beta$ -APN), ou le 2-nitroéthylamine,
- les haloamines insaturées ou saturées, telles que la 2-bromo-éthylamine, 2-10 chloroéthylamine, 2-trifluoroéthylamine, 3-bromopropylamine, les p-halobenzylamines,
- la sélénohomocystéine lactone,

B) les chélateurs de cuivre, pénétrant ou non les cellules en culture,

C) les anticorps bloquant anti-LO, dirigés contre le site actif des LO.

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, d'inhibiteurs  
15 indirects des LO choisis parmi :

A) les composés bloquants les dérivés aldéhydes issus de la désamination oxydative des résidus lysyls et hydroxylysyls par les LO, tels que les thiolamines, notamment la D-pénicillamine, ou ses analogues tels que l'acide 2-amino-5-mercapto-5-méthylhexanoïque, l'acide D-2-amino-3-méthyl-3-((2-acétamidoéthyl)dithio) butanoïque, l'acide p-2-amino-3-20 méthyl-3-((2-aminoéthyl)dithio) butanoïque, le sulfinate de sodium-4-((p-1-diméthyl-2-amino-2-carboxyéthyl)dithio) butane, le sulfanate de 2-acétamidoéthyl-2-acétamidoéthanethiol, le trihydrate de sodium-4-mercaptobutanesulfinate.

B) les composés inhibiteurs de la biosynthèse des LO tels que les antisens.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée,  
25 d'inhibiteurs des LO choisis parmi le  $\beta$ -APN et/ou la D-pénicillamine.

L'invention concerne également l'utilisation d'inhibiteurs de LO tels que définis ci-dessus, pour la mise en œuvre de procédés de culture *in vitro* de toutes cellules d'origine humaine ou animale, lesdites cellules sont maintenues à un phénotype de différenciation constant, et sont choisies notamment parmi les chondrocytes des cartilages, les cellules de la  
30 cornée, les cellules de la peau (tels que les fibroblastes de derme, et kératinocytes de l'épiderme), les cellules endothéliales des vaisseaux, les ostéoblastes des os, les hépatocytes, les cellules rénales, les cellules musculaires, les cellules souches ou pluripotentes.

WO 03/014333

PCT/FR02/02789

L'invention concerne également l'utilisation d'inhibiteurs de LO tels que définis ci-dessus, pour la mise en œuvre de procédés de culture *in vitro* de cellules, en vue de l'obtention de cellules susceptibles d'être utilisées en thérapie cellulaire, ou en pharmacologie expérimentale, notamment dans le cadre du criblage de médicaments.

5 L'invention concerne également l'utilisation d'inhibiteurs de LO tels que définis ci-dessus, pour la mise en œuvre de procédés de culture *in vitro* de cellules en vue de l'obtention de tissus, tels que de la peau ou du cartilage, lesdits tissus étant susceptibles d'être utilisés en tant que greffons ou implants en thérapie tissulaire, ou en pharmacologie expérimentale, notamment dans le cadre du criblage de médicaments.

10 L'invention concerne également tout milieu de culture cellulaire caractérisé en ce qu'il contient un ou plusieurs inhibiteurs de LO tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne également un procédé de culture *in vitro* de cellules telles que définies ci-dessus, au cours duquel le phénotype desdites cellules est maintenue à un stade identique à celui où se trouvaient initialement lesdites cellules lors de leur mise en culture,  
15 ledit procédé comprenant la mise en culture desdites cellules dans un milieu approprié contenant un ou plusieurs inhibiteurs de LO tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé de maintien constant du phénotype de cellules différenciées en culture à un stade proche ou identique à celui où se trouvaient lesdites cellules lors de leur mise en culture, caractérisé en ce qu'il comprend la  
20 mise en culture desdites cellules dans un milieu approprié contenant un ou plusieurs inhibiteurs de LO tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne également un procédé de préparation de cellules différenciées au phénotype identique, ou d'implants cellulaires constitués de telles cellules, caractérisé en ce qu'il comprend :

25 - la mise en œuvre d'un procédé de culture *in vitro* de cellules tel que défini ci-dessus,

- le cas échéant, une ou plusieurs étapes de lavage des cellules en culture à l'aide d'une solution tampon appropriée, afin d'éliminer en tout ou partie le ou les inhibiteurs de LO utilisés,

30 - le cas échéant une étape de digestion enzymatique de la matière extracellulaire susceptible de s'être formée, à l'aide d'enzymes appropriées,

- le cas échéant une étape de récupération des cellules mises en culture.

WO 03/014333

PCT/FR02/02789

L'invention concerne également un procédé de préparation *in vitro* d'une matrice cellulaire telle que définie ci-dessus, susceptible de pouvoir être utilisée en tant que tissus ou implants tissulaires, constitués de cellules différenciées, caractérisé en ce qu'il comprend :

5 - la mise en œuvre d'un procédé de culture *in vitro* de cellules tel que défini ci-dessus, jusqu'à la formation d'une matrice cellulaire telle que définie ci-dessus, suffisante pour constituer une trame tissulaire,

- le cas échéant, une ou plusieurs étapes de lavage de la matrice cellulaire en culture à l'aide d'une solution tampon appropriée, afin d'éliminer en tout ou partie le ou les inhibiteurs de LO utilisés,

10 - le cas échéant une étape de récupération de la matrice cellulaire telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé de préparation *in vitro* de tissus ou implants tissulaires tel que défini ci-dessus, appliqué à la néosynthèse d'implants de cartilage lorsque ledit procédé est effectué à partir de chondrocytes, ou à la préparation de substitut cutanés lorsque ledit procédé est effectué à partir de fibroblastes et/ou de  
15 kératinocytes.

L'invention concerne également un procédé de criblage de molécules d'intérêt pharmacologique, notamment de médicaments, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 - la mise en œuvre d'un procédé de culture *in vitro* de cellules tel que défini ci-dessus, le cas échéant jusqu'à la formation d'une matrice cellulaire suffisante pour constituer une trame tissulaire,

- le cas échéant, une ou plusieurs étapes de lavage de la matrice cellulaire en culture à l'aide d'une solution tampon appropriée, afin d'éliminer en tout ou partie le ou les inhibiteurs de LO utilisés,

25 - une étape de mise en présence de la molécule testée avec les cellules ou tissus obtenus lors des étapes précédentes,

- la détection de l'éventuel effet de ladite molécule sur les cellules ou les tissus susmentionnés.

L'invention concerne également les cellules différenciées au phénotype maintenu, ou implants cellulaires constitués de telles cellules, tels que définis ci-dessus, caractérisés en  
30 ce qu'ils contiennent des inhibiteurs de LO tels que définis ci-dessus, le cas échéant à l'état de traces.

WO 03/014333

PCT/FR02/02789

L'invention concerne également les matrices cellulaires ou tissus ou implants tissulaires à base de cellules telles que définies ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils contiennent des inhibiteurs de LO tels que définis ci-dessus, le cas échéant à l'état de traces.

5 L'invention concerne plus particulièrement les cellules ou implants cellulaires, ou matrices cellulaires ou tissus ou implants tissulaires susmentionnés, tels qu'obtenus par mise en œuvre d'un procédé tel que défini ci-dessus.

L'invention concerne également les implants de cartilage comprenant une matrice extracellulaire essentiellement exempte de collagènes normalement absents du cartilage sain (à savoir les collagènes I et III), et comprenant la totalité des collagènes spécifiques du  
10 cartilage (à savoir les collagènes II, IX, XI, et le cas échéant X).

L'invention concerne plus particulièrement les implants de cartilage susmentionnés, caractérisés en ce qu'ils contiennent des inhibiteurs de LO tels que définis ci-dessus, le cas échéant à l'état de traces.

L'invention concerne plus particulièrement encore les implants de cartilage  
15 susmentionnés, tels qu'obtenus par mise en œuvre d'un procédé tel que défini ci-dessus.

L'invention concerne également les implants de chondrocytes, dont le phénotype initial, de type cartilage, a été maintenu pendant la phase préliminaire de multiplication cellulaire *in vitro*.

L'invention concerne également les implants tissulaires susmentionnés  
20 correspondant à des implants de peau reconstituée, ou substitut cutanés, tels qu'obtenus par mise en œuvre d'un procédé selon l'invention et tel que défini ci-dessus, effectué à partir de fibroblastes et/ou de kératinocytes.

L'invention sera davantage détaillée à l'aide de la description qui suit des utilisations possibles des inhibiteurs de LO.

25 La fabrication d'implants tissulaires en Génie Tissulaire en général doit surmonter un obstacle majeur : éviter de produire un tissu anormal présentant des propriétés physico-chimiques incompatibles avec l'usage envisagé. La culture des cellules *in vitro* en vue de leur multiplication et de leur production d'une matrice extracellulaire s'accompagne malheureusement d'une altération de leur phénotype biochimique qui est plus ou moins  
30 profond suivant le type de culture de cellules.

La culture de chondrocytes a été jusqu'alors, de ce point de vue, toujours accompagnée de cette altération phénotypique. Les solutions proposées jusqu'alors pour les

cultures de chondrocytes ont consisté à ajouter (ou retrancher parfois) des facteurs solubles à la culture (hormones, vitamines, facteurs cellulaires essentiellement), que celle ci soit effectuée sur support plastique plan ou dans un support en trois dimensions de diverses natures (éponges de collagènes plus ou moins réticulées associés à divers constituants, céramiques etc.).

La production de peau reconstruite est fondée sur l'interaction de fibroblastes et de kératinocytes placés dans des conditions particulières. Les interventions permettant d'améliorer cette production sont limitées et mal définies, souvent sur une base empirique. Plusieurs nutriments s'avèrent ainsi indispensables et ont été ajoutés aux conditions de culture.

10 Le traitement au  $\beta$ APN présente la singularité de s'adresser aux deux types cellulaires.

La méthode de la présente invention s'applique à tout type de culture en Génie Tissulaire. Elle consiste à agir sur l'état physique de la matrice extracellulaire synthétisée par les cellules en culture afin de moduler les signaux que celle ci envoie aux cellules, via divers récepteurs cellulaires, et ainsi de réguler l'état de différenciation des cellules isolées à partir de biopsies.

L'inhibition de la LO (notamment par le  $\beta$ APN) a été jusqu'alors utilisée dans le cadre de procédés de production de collagènes, pour inhiber la réticulation des collagènes sécrétés par les cellules et améliorer ainsi les conditions de leur solubilisation. Un tel inhibiteur est, pour cette raison, classiquement reconnu pour altérer la matrice extracellulaire et n'a été jusqu'alors utilisé que dans trois circonstances :

- la production de collagènes non réticulés facilement extractibles,
- l'étude fondamentale du mécanisme d'action de la LO,
- contribuer à inhiber les pontages excessifs des collagènes dans certaines pathologies fibrosantes.

25 En dehors de ces trois domaines, l'inhibition de l'activité LO est apparue jusqu'alors comme une gêne, non comme un avantage.

Les principaux avantages de la présente invention sont les suivants.

Le  $\beta$ APN, l'inhibiteur type de l'activité LO, est un amino-nitrile. Ce composé, très bon marché, n'a jusqu'alors jamais été utilisé pour maintenir le phénotype des cellules en culture. Non toxique aux doses employées pour les cellules en culture, son action peut néanmoins atteindre d'autres cellules au sein d'un organisme : il ne peut à ce titre être utilisé

WO 03/014333

PCT/FR02/02789

sans risques à des fins thérapeutiques, nécessairement ciblées. Son élimination des cultures avant leur utilisation comme implant est aisée par lavages successifs pour épuiser la culture en  $\beta$ APN. Les autres inhibiteurs spécifiques de l'activité LO pourraient utilement être comparés quant à leur niveau de tolérance *in vivo* dans un tel modèle.

5 L'efficacité du  $\beta$ APN à la concentration classique de 50  $\mu$ g/ml a été totale après 2 semaines de culture où, en son absence, la dédifférenciation des chondrocytes était devenue maximale. Cette concentration est utilisable pour le traitement des peaux reconstruites.

L'arrêt du traitement par le  $\beta$ APN permet alors de restaurer l'activité des LO qui sont sécrétées en continu (voire plus exprimées en présence de  $\beta$ APN) par les cellules et présentent  
10 une durée d'activité limitée dans le temps. Bien que l'inhibition des LO par le  $\beta$ APN soit irréversible, l'élimination du  $\beta$ APN, par lavages et arrêt du traitement, permet de restaurer *in vitro* au moment choisi l'activité de cette enzyme. La réticulation souhaitée des fibrilles de collagènes et d'élastine, substrats des LOs, peut ainsi être programmée.

La méthode de la présente invention s'applique à tout type de culture en Génie  
15 Tissulaire, c'est à dire :

- tout type de support : le plus simple comme le support plastique des boîtes de culture, ou le plus sophistiqué comme certains modèles de culture en trois dimensions.

- tout type de cellules en vue d'implants tissulaires divers (cartilage, os, peau, cornée, vaisseaux sanguins, etc). Le traitement décrit peut être utilisé pour deux types  
20 d'implantations :

a) suspension de chondrocytes multipliés *in vitro*. De plus, le traitement préalable de la culture par le  $\beta$ APN améliore le rendement d'isolement des cellules viables par trypsination.

b) matrice cartilagineuse riche en chondrocytes et de viscosité définie .

25 Dans le cas de cartilages articulaires lésés ou nécrosés localement (hanche en particulier), il peut être souhaitable de recourir à des injections d'une matrice riche en chondrocytes non dédifférenciés. La fluidité du tapis cellulaire est fonction de la durée de la culture et peut donc être aisément choisie par le chirurgien en fonction des besoins. Cet avantage est bien sûr généralisable à toute autre situation rencontrée en Génie tissulaire.

30 Les tapis cellulaires ainsi obtenus après un temps donné de contact avec un inhibiteur de LO peuvent également servir de support d'étude en pharmaco - toxicologie.

Selon un aspect, l'invention concerne l'utilisation d'un inhibiteur direct ou indirect des lysyl oxydases (LO), ledit inhibiteur étant une amine primaire qui est :

- l'éthylènediamine ;
- un aminonitrile qui est le  $\beta$ -aminopropionitrile ( $\beta$ -APN) ou le 2-nitroéthylamine ;
- une haloamine, insaturée ou saturée, qui est la 2-bromo-éthylamine, la 2-chloroéthylamine, la 2-trifluoroéthylamine, la 3-bromopropylamine, une p-halobenzylamine, ou un composé halogéné insaturé ; ou
- la sélénohomocystéine lactone,

en tant qu'inhibiteur de la dédifférenciation des cellules en culture *in vitro*, en vue du maintien constant du phénotype de différenciation desdites cellules dans le cadre de la mise en oeuvre de procédé de culture *in vitro* de ces dernières, et ce pendant la totalité du temps de culture, pour la préparation de cellules différenciées dont le phénotype de différenciation est identique, ou pour la préparation d'une matrice cellulaire constituée de cellules différenciées conservant le même phénotype de différenciation et cultivées en présence dudit inhibiteur, et du milieu extracellulaire sécrété par lesdites cellules et liant ces dernières dans ladite matrice, ladite matrice cellulaire pouvant être utilisée en tant que tissus ou implants tissulaires.

## 1. Descriptif détaillé

### 1.1.) Matériel et Méthodes

#### Modèle de culture de chondrocytes :

5 a) Le modèle expérimental de culture de chondrocytes est celui de la culture sur plastique en deux dimensions de chondrocytes embryonnaires de poulet. L'état embryonnaire des cellules permet un haut niveau de synthèse des collagènes, contrairement aux chondrocytes adultes. Le sternum de poulet d'où sont issus les chondrocytes permet d'obtenir deux sous populations pures de chondrocytes capables ou non de s'hypertrophier ultérieurement  
10 (respectivement, les chondrocytes de la partie craniale ou caudale du sternum). Les biopsies de cartilage bovin ou humain ne permettent pas cette distinction. Les résultats qui sont décrits distinguent toujours la sous-population des chondrocytes étudiés.

Les cultures avec antibiotiques L-glutamine 4 mM, et 25 µg/ml ascorbate (facteur nécessaire à la stabilité des unités en triple hélice de collagènes sécrétés) sont poursuivies  
15 pendant 2 semaines en présence ou en absence de 10% sérum, remplacé éventuellement par l'insuline 100 ng/ml, et de 50 µg/ml βAPN. L'absence de sérum nécessite l'adjonction d'agents protecteurs (1 mM cystéine et 1 mM pyruvate). Un jour avant prélèvements, 10 µCi de <sup>14</sup>C Proline sont ajoutés aux cultures dont les tapis ou les milieux seront ensuite pepsinés  
20 (0.2 mg pepsine /ml / pH 4/ 24 hrs) et soumis à l'analyse électrophorétique (SDS PAGE en gradient de 4,5 à 15% d'acrylamide) puis fluorographique. Les fluorogrammes révéleront alors les seules bandes protéiniques pepsino-résistantes, essentiellement les collagènes et des lipocalines (protéines de transport lipidique). La position connue de ces bandes permet de signer la dédifférenciation des cellules par l'apparition de la chaîne α2 I du collagène I associée à la baisse de synthèse des collagènes de type cartilage.

25 L'activité Lysyl oxydase a été dosée avec 300.000 dpm d'élastine marquée sur la Lysine, substrat de l'enzyme (Shackelton et Hulmes Anal. Biochem.(1990) 185 : 359-362) . La détermination de la présence de Lysyl oxydases dans les cultures de chondrocytes est effectuée selon les méthodes classiques d'immuno-décoration des supports où ont été transférées les bandes séparées des protéines extraites à partir des milieux de culture ou des  
30 tapis cellulaires correspondants.

b) Les cultures de chondrocytes humains normaux proviennent de cartilages prélevés lors d'interventions de prothèses de hanche ou de ligamentoplastie, puis soumis à une digestion enzymatique. Ces biopsies de cartilage sont considérées comme res nullus.

Les chondrocytes extraits du bouret cotyloïdien ont été utilisés pour la culture en deux dimensions sur plastique en présence de BAPN: ont été comparées les cultures obtenues après digestion enzymatique des cartilage en présence ou en absence de hyaluronidase (figures 4 et 5).

Les chondrocytes obtenus après ligamentoplastie ont été utilisés pour la culture en trois dimensions en éponge de collagène-GAG-chitosan (Collombel et al. 1987) \* en présence ou en absence de BAPN (figures 7 et 8).

\* Collombel C., Damour O., Gagneu C., Poinsignon F., Echinard C., Marichy J. : Peau artificielle et son procédé de fabrication. Brevet d'invention français n° 87-08752 (15 juin 1987), brevet d'invention européen n° 88- 420194.8 (14 juin 1988).

#### 15 **Modèle de culture de peau reconstruite :**

Le procédé permettant la formation de la peau reconstruite est celui décrit dans le brevet français 87 08252 du 15 juin 1987.

Le support du modèle de peau reconstruite est constitué d'un substrat dermique (SD) à base de collagène-glycosaminoglycane réticulé par du chitosane selon la technique publiée par Duplan-Perrat et al (*J Invest Dermatol* 2000 114:365). Des fibroblastes sontensemencés à l'intérieur du SD pour obtenir un derme équivalent. La peau reconstruite (PR) est obtenue par ensemencement des kératinocytes après 15 jours (J15) de culture en derme équivalent. Les fibroblastes dermiques sont obtenus à partir d'explants de prépuces humains après séparation dermo-épidermique et cultivés en monocouche en milieu DMEM (Sigma) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, de L-glutamine 4 mM, d'EGF (Austral Biologic) à 10 ng/ml, de pénicilline à 100 UI/ml, de gentamicine à 100 µg/ml et d'amphotéricine B à 1 µg/ml. Les kératinocytes sont issus d'un prélèvement de biopsie de peau humaine après séparation dermo-épidermique par trypsination. Les cellules sont ensemencées sur des couches nourricières (fibroblastes irradiés) et cultivées en en DMEM et HAM F12 à 30% supplémenté en sérum de veau foetal à 10%, d'EGF à 10 ng/ml, d'hydrocortisone à 1,6 ng/ml, d'umuline à 0,12 UI/ml, de cholératoxine à 0,1 nM, de triiodothyronine à 0,2 µM, d'adénine à 24 µg/ml, de L-Glutamine à 4 mM, de pénicilline à 100 UI/ml, de gentamicine à 100 µg/ml et d'amphotéricine B à 1 µg/ml.

Un mélange à base de collagène bovin de type I et III (72%), de glycosaminoglycane (8%) réticulé par du chitosane (20%) est coulé dans des plaques 6 puits. Les substrats dermiques ainsi obtenus sont ensuite congelés à -80°C et lyophilisés. Les fibroblastes sont ensemencés dans le substrat dermique réhydraté et stérilisé à raison de 250 000 cellules par 5 cm<sup>2</sup>. Des kératinocytes sont ensemencés après 15 jours (J15) avec une densité de 200 000 à 250 000 cellules/ cm<sup>2</sup>. Les peaux reconstruites sont cultivées 8 jours de façon immergée, dans le milieu décrit précédemment supplémenté de 50µg/ml de vitamine C. Ensuite les peaux reconstruites sont élevées à l'interface air liquide en utilisant un milieu de culture simplifié à base de DMEM, supplémenté en sérum de veau fœtal, d'EGF, d'hydrocortisone, d'umuline, 10 de L-glutamine, de pénicilline, de gentamicine, et d'amphotéricine B, et d'acide ascorbique, aux concentrations décrites ci-dessus. Les peaux reconstruites sont cultivées jusqu'à J60. Des prélèvements sont réalisés à J30 et J60 pour les différentes analyses.

#### **Utilisation de l'inhibiteur de Lysyl oxydases :**

15 Le βAPN (50µg/ml) est ajouté dès l'ensemencement, au milieu de culture renouvelé tous les 2 jours et fourni aux cultures de chondrocytes comme à celles de fibroblastes puis de kératinocytes lors de la formation de la peau reconstruite. La concentration de 50µg/ml n'est pas toxique pour les cellules et n'affecte pas sensiblement la multiplication cellulaire. Des concentrations plus élevées de 200µg/ml s'avèrent avoir peu d'effet sur la viabilité et la 20 multiplication des fibroblastes et des kératinocytes en cultures isolées.

#### **1.2.) Résultats**

Des anticorps spécifiques de diverses enzymes de la famille lysyl oxydase ont permis d'identifier pour la première fois ces différentes isoformes dans les chondrocytes, tant par 25 immuno-décoration après séparation électrophorétique que par immuno-marquage de tapis cellulaires observé au microscope à fluorescence. Une activité lysyl oxydase spécifique a aussi, pour la première fois, été démontrée dans les milieux de culture des chondrocytes (tableau I).

Les anticorps anti LO ont aussi permis de détecter ces isoformes dans la peau reconstruite. 30 Des résultats ont mis en évidence une forte expression des LOX (figure 4), LOXL1 et LOXL2 au niveau du derme, de l'épiderme et de la jonction dermo-épidermique. L'observation d'une

expression de ces isoformes de LO dans des kératinocytes est tout à fait originale à ce niveau, où il n'y a synthèse ni de collagène ni d'élastine.

### **Régulation du phénotype "cartilage" des chondrocytes :**

5 En présence de sérum, avec lequel les taux de multiplication et de synthèse protéiques sont optimaux, les chondrocytes étudiés se dédifférencient nettement après la première semaine de culture, en accord avec les données de la littérature. L'adjonction de  $\beta$ APN pendant toute la culture supprime toute dédifférenciation, comme l'atteste l'absence de la chaîne collagénique  $\alpha$ 2I sur les fluorogrammes. De même, le  $\beta$ APN supprime également les altérations  
10 morphologiques observées par ailleurs dès les premiers jours dans les cultures non traitées où sont bien visibles des cellules de forme fibroblastique.

En l'absence de sérum, les chondrocytes adhèrent bien sur le support plastique mais s'étalent très difficilement, voire pas du tout pour les chondrocytes caudaux. La présence d'un anabolisant des chondrocytes, comme l'insuline, augmentent quelque peu les taux de  
15 synthèse, n'induisent pas de dédifférenciation biochimique avec ou sans  $\beta$ APN, mais laissent apparaître une altération morphologique en l'absence de  $\beta$ APN (Fig. 1).

La présence de sérum dans le milieu de culture est donc néanmoins souhaitable pour obtenir un taux élevé de multiplication et de synthèses, le  $\beta$ APN permettant de supprimer l'altération du phénotype biochimique et morphologique.

20 Les cultures de chondrocytes ainsi traitées mais étudiées entre le 2ème et le 3ème jour ont montré la présence de collagènes normaux aussi bien dans le tapis cellulaire que dans le milieu de culture. Néanmoins, le  $\beta$ APN a permis l'apparition normale de collagène X par les chondrocytes hypertrophiques : la baisse de cette synthèse, en l'absence de  $\beta$ APN, est connue pour précéder la synthèse de collagène I, marqueur de dédifférenciation (fig 2). Ces  
25 collagènes, tous de type cartilage, sembleraient donc bien acquérir, sous l'effet de pontages dépendants de LO, une structure qui progressivement contribuerait à l'envoi de signaux aux chondrocytes, à l'origine de l'altération du phénotype biochimique en culture in vitro.

Il restait à prouver l'origine de cette inhibition de dédifférenciation par le  $\beta$ APN. Les cultures en présence de  $\beta$ APN ne modifient en rien la synthèse et la sécrétion de ces LO (Fig  
30 3). Le  $\beta$ APN n'agit donc bien que sur l'activité amine oxydase de l'enzyme, et non sur sa sécrétion.

### **Application du modèle aux cellules de cartilage humain.**

Le mode d'extraction des cellules par digestion enzymatique du cartilage permet de mettre en évidence des sous populations différentes de chondrocytes au sein d'une même biopsie de cartilage. C'est le cas des chondrocytes superficiels et profonds du cotyle du cartilage fémoral après ajout de hyaluronidase dans le milieu d'extraction. A l'ensemencement, ces deux populations de cellules produisent bien du collagène II, mais pas de collagène I. Seuls, les chondrocytes profonds vont ensuite être capable en présence de  $\beta$ APN de conserver leur morphologie et leur phénotype pendant les deux semaines suivantes où elles se multiplient en produisant une matrice extracellulaire de type cartilagineux, dépourvue de collagène I.

Il est donc nécessaire d'utiliser aux fins de Génie tissulaire des zones de cartilage dont les populations de chondrocytes sensibles au  $\beta$ APN ont été correctement isolées.

Néanmoins, des chondrocytes humains dédifférenciés aux termes du temps de culture nécessaire à leur multiplication en culture sur plastique, peuvent être, avec profit, mis en culture tridimensionnelle 3D en présence de  $\beta$ APN. La mise en culture 3D pouvant ne pas suffire, à elle seule, à assurer un retour au phénotype cartilage perdu pendant la culture en 2 dimensions en présence de sérum, tel que cela a été décrit pour des cultures 3D en agarose. Effectivement, l'immunofluorescence en triple marquage des collagène I, collagène II et aggrécane sur des coupes obtenues à partir de cultures tridimensionnelles de chondrocytes en éponge a permis de mettre en évidence l'effet favorable du BAPN sur la préservation du phénotype cartilage des chondrocytes après trois mois de culture :

une extension de la zone de dépôt de collagène II dans l'éponge et une nette augmentation de l'intensité de marquage du collagène II et de l'aggrécane (marqueurs du cartilage) associée à une forte diminution de celle du collagène I dues au  $\beta$ APN.

Il est nécessaire de s'assurer de l'efficacité du traitement destiné à éliminer le  $\beta$ APN de la culture de cellules avant son utilisation comme implant tissulaire autologue. Cette opération répond à deux exigences :

1°- rétablir une activité Lysyl oxydase normale au sein du cartilage implanté en cours de réparation.

2°- éliminer le risque , hypothétique mais non démontré, d'un éventuel effet préjudiciable du  $\beta$ APN sur les cellules du patient.

Les modifications, observées pour la première fois, sous l'effet de l'inhibition par le  $\beta$ APN de l'activité Lysyl oxydase, dans les pontages entre chaînes de collagène IX se sont avérées très précoces (précédant l'apparition de collagène I marqueur de différenciation) et réversibles. (au plus tard dans les 6 jours qui succèdent à l'élimination du  $\beta$ APN)(figure 9).  
5 Nous avons prouvé ainsi que des lavages répétés du tapis cellulaire par du PBS précédant l'usage de milieu de culture sans  $\beta$ APN s'avèrent suffisants pour éliminer toute trace de  $\beta$ APN actif.

10 Il a été par ailleurs vérifié qu'un ensemencement à haute densité retarde bien l'apparition de la différenciation en culture 2D.

### **Régulation de la formation de la peau reconstruite :**

#### Etude préliminaire du $\beta$ APN sur les fibroblastes et les kératinocytes cultivés en monocouche

15 La numération cellulaire montre que le  $\beta$ APN ne présente un effet inhibiteur sur la prolifération des fibroblastes et des kératinocytes que pour des doses relativement fortes. En effet, le nombre de ces cellules est diminué d'environ 50% par rapport au témoin lorsqu'elles sont cultivées en présence de 600  $\mu$ g/ml de  $\beta$ APN. Cependant, à la concentration de 200  $\mu$ g/ml, la prolifération des fibroblastes est légèrement augmentée, alors que celle des  
20 kératinocytes est diminuée d'environ 10%. En revanche, aucun effet toxique du  $\beta$ APN n'est observé sur les fibroblastes et les kératinocytes à confluence jusqu'à 800  $\mu$ g/ml. Les résultats du test de viabilité au MTT confirment ceux de la numération cellulaire. En conclusion, ces résultats indiquent que le  $\beta$ APN, à des concentrations élevées (supérieures à 500  $\mu$ g/ml), présente un effet inhibiteur sur la prolifération des fibroblastes et des kératinocytes. Il faut  
25 souligner que le  $\beta$ APN à 200  $\mu$ g/ml peut éventuellement engendrer une augmentation de l'activité cellulaire (prolifération et viabilité) sur les fibroblastes ensemencés à faible densité, et sur les fibroblastes et les kératinocytes ensemencés à forte densité.

#### Peaux reconstruites (PR)

30 Un effet important du  $\beta$ APN pour les greffes serait la réduction possible de la rétractation induite par la réticulation des collagènes (figure 10).

La surface des peaux reconstruites immergées traitées au  $\beta$ APN est supérieure à celle des PR immergées non traitées, suggérant une atténuation du phénomène de rétractation. En effet, si l'on considère les résultats obtenus avant l'élévation à l'interface air-liquide, les peaux témoin non traitées présentent une diminution de surface de 40% par rapport à leur état original, contre 17% seulement pour les peaux traitées par 500  $\mu$ g/ml de  $\beta$ APN.

A 35 jours de culture, la surface des peaux reconstruites témoin ou traitées par 50  $\mu$ g/ml de  $\beta$ APN est de 50% par rapport à la surface de départ, tandis que les peaux reconstruites traitées à 200 et 500  $\mu$ g/ml de  $\beta$ -APN ne présentent qu'une surface de 40%. L'effet du  $\beta$ APN observé sur la surface des peaux reconstruites après deux semaines de culture à l'interface air-liquide n'est cette fois plus dose-dépendant. On note bien une surface significativement supérieure des PR traitées par 200 ou 500  $\mu$ g/ml de  $\beta$ APN, par rapport à celle du témoin. Les PR traitées par 50  $\mu$ g/ml de  $\beta$ APN ne montrent aucune différence significative de leur surface par rapport au témoin non traité.

L'histologie des PR (figure 11) ne semble pas fondamentalement changée par le traitement au  $\beta$ APN à 50  $\mu$ g/ml ou 200  $\mu$ g/ml. Les PR traitées apparaissent constituées d'un derme présentant une matrice extracellulaire (MEC) riche, et d'un épiderme présentant les couches basales, spineuses, granuleuses et cornées. Même si les PR formées sont plus fragiles et l'épiderme plus fin, la structure générale classique de l'épiderme est conservée. La colonisation initiale de l'éponge par les fibroblastes est favorisée par la présence de  $\beta$ APN, ce qui se traduit par une synthèse accrue de MEC.

Dans la peau normale et dans notre modèle de peau reconstruite, les kératinocytes de la couche basale représentent les cellules souches. L'évolution de leur phénotype concomitant et leur migration vers les couches externes de l'épiderme vont permettre la formation de la couche cornée. Cette couche cornée est indispensable, car elle assure la fonction de barrière de la peau. Sa formation doit cependant être contrôlée afin de permettre la synthèse d'échantillons de peau suffisamment important. Même si l'apport temporaire de  $\beta$ APN semble ralentir l'évolution du phénotype initial des kératinocytes, l'organisation générale en couches basales, granuleuse, spineuse et cornée est maintenue.

30

Les analyses immunohistologiques et ultrastructurales révèlent des modifications significatives des PR traitées. Les constituants structurants de la MEC que sont les collagènes fibrillaires voient leur organisation en fibres modifiées. Les molécules de collagène sécrétées sont déposées sous forme de fibres de diamètres irréguliers, présentant des fusions entre fibres adjacentes. Nous avons enfin montré par hybridation in situ que le traitement par 50 µg/ml de βAPN se traduisait par une légère augmentation de la détection des gènes de LOX et LOXL, à la fois dans le derme et l'épiderme.

### Légendes des figures

10 **Fig 1** : Effet de l'activité Lysyl oxydase sur la dédifférenciation de chondrocytes après 2 semaines de culture en deux dimensions sur plastique

4 millions de chondrocytes de la partie craniale du sternum de poulet embryonnaire ont été ensemencés par boîte de Petri de 35 mm de diamètre (P35) en milieu DMEM avec ou sans serum 10% (remplacé par insuline 100ng/ml) avec ou sans βAPN (50 µg/ml). Les milieux de culture avec 25 µg/ml d'ascorbate sont changés tous les deux jours. Les collagènes neosynthétisés marqués à la Proline 14C pendant les dernières 24 heures sont isolés après pepsination classique des milieux de culture conditionnés puis soumis à SDS PAGE, sans conditions réductrices, et fluorographie.

#### Observations :

20 - en présence de serum, fortement anabolisant, la dédifférenciation biochimique des chondrocytes (collagène I sécrété, arrêt de synthèse de collagène X) est totalement inhibée sous l'action du βAPN qui augmente la proportion de collagène X spécifique de ces chondrocytes hypertrophiques. De même, le βAPN préserve l'hypertrophie et la morphologie non étalée caractéristiques de ces chondriomes.

25 - en l'absence de serum, les chondrocytes adhèrent au plastique des boîtes mais ne s'étalent pas. Après 15 jours de culture, l'absence de βAPN ne génère que la seule altération morphologique, mais la croissance cellulaire reste dans l'ensemble ralentie malgré la présence d'insuline.

30 **Fig 2** : Effet de l'activité Lysyl oxydase sur la dédifférenciation de chondrocytes après 3 jours de culture, en présence de serum, en deux dimensions sur plastique

WO 03/014333

PCT/FR02/02789

L'étude fluorographique décrite pour la figure 1 a portée ici sur les tapis et milieux de culture pepsinés

Observations :

5 Seule la présence de  $\beta$ APN permet l'expression normale de collagène X (bandes inférieures des fluorogrammes) par les chondrocytes hypertrophiques (craniaux) identifié dans les milieux et les tapis cellulaires. L'inhibition de la synthèse de collagène X est connue pour précéder l'apparition de collagène I par les chondrocytes en cours de dédifférenciation, qui s'initie donc aux premiers jours de culture alors que les collagènes anormaux n'ont pas encore été synthétisés.

10

Fig 3 : Immunodécoration par anticorps anti LOX, LOXL1, d'extraits de tapis cellulaires et de milieu de culture de chondrocytes soumis à SDS PAGE puis transfert sur membrane de nitro cellulose.

15 Le jour qui précède les prélèvements, le tapis cellulaire est lavé trois fois par du milieu sans serum. Le milieu est alors changé pour 24 heures par du milieu complet sans serum.

Au 6<sup>o</sup> ou 14<sup>o</sup> jour de culture les milieux sont prélevés et précipités classiquement par TCA 10% final / 4°C / 30 mn. Les culots de centrifugation sont rincés à l'acétone puis solubilisés dans un 50  $\mu$ l de tampon d'électrophorèse. Les tapis cellulaires rincés sont lysés 2h / 4°C (300  $\mu$ l/P35) dans le mélange urée 8M, Nonidet™ 0,5%, phosphate de sodium disodique 16 20 mM pH 8 et inhibiteurs de protéases. La concentration d'urée est amenée à 4M avant centrifugation de la suspension. Les surnageant sont précipité par TCA puis traités comme pour les milieux correspondants.

Après séparation par SDS PAGE et transfert par Western Blot, les bandes protéiques sont analysées par immunodécoration à l'aide d'anticorps anti-LOX et anti-LOXL1 polyclonaux 25 de lapin, puis d'un 2<sup>o</sup> anticorps anti lapin marqué à la phosphatase alcaline avant révélation au réactif NBT/BCIP (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany).

Observations :

1) La LOX et la LOXL1 sont exprimées par les chondrocytes cultivés dans les conditions décrites pour le dosage d'activité enzymatique. Les Lysyl oxydases accumulées dans les tapis 30 après 1 à 2 semaines peuvent être mises en évidence, à l'inverse des milieux de culture de seulement 24 hrs.

2) La présence de  $\beta$ APN ne modifie pas l'expression des molécules de Lysyl oxydases, seule l'activité enzymatique est inhibée comme le montre le tableau I.

5 **Fig 4** : Identification par fluorographie des collagènes radiomarqués synthétisés par les chondrocytes de cartilages cotyloïdiens en culture 2D sur plastique. Effets de la hyaluronidase ajoutée au milieu de digestion enzymatique des cartilages

10 Les radiomarquages de 24 hrs à la proline  $^{14}\text{C}$  ont été effectués au 2<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> et 14<sup>o</sup> jour de culture en présence de sérum et  $\beta$ APN (D2, D7 et D14 respectivement). Les extraits pepsinés de milieu de culture et de tapis cellulaire ont été soumis à électrophorèse puis fluorographie.

Les zones superficielle (n<sup>o</sup> pairs) et profonde (n<sup>o</sup> impairs) du cartilage cotyloïdien ont été séparées- avant d'être soumises à la digestion enzymatique en présence ou non de hyaluronidase.

15 Observations :

b) les deux sous-populations de chondrocytes, profonde et superficielle, présentent un phénotype cartilage au 2<sup>o</sup> jour de culture, où elles ne synthétisent pas de collagène I, dans le tapis cellulaire comme dans le milieu.

20 c) En présence de hyaluronidase pendant la digestion préalable du cartilage: la zone profonde continue à ne pas synthétiser de collagène I, au 7<sup>o</sup> comme au 14<sup>o</sup> jour de culture. Inversement, les cellules de la zone superficielle se différencient en produisant du collagène I de façon croissante du 7<sup>o</sup> au 14<sup>o</sup> jour de culture. Du collagène I neosynthétisé est également présent dans le tapis cellulaire. Du collagène III est produit tardivement et en faible proportion au 14<sup>o</sup> jour dans le milieu de culture, mais est très peu retenu dans le tapis  
25 cellulaire, à l'inverse du collagène II.

d) En l'absence de hyaluronidase pendant la digestion préalable du cartilage: les deux sous- populations de chondrocytes qui viennent d'être définies évoluent de façon similaire au cours des deux semaines de culture en se différenciant.

30 **Fig 5** : Morphologie des cellules de cartilage cotyloïdien en culture 2D sur plastique.

Les observations ont été effectuées aux 7<sup>o</sup> et 14<sup>o</sup> jours de culture (D7 et D14) en présence de sérum et  $\beta$ APN sur les mêmes cultures utilisées pour les radiomarquages.

Digestions enzymatiques préalables des cartilages en présence (+) ou absence (-) de hyaluronidase.

Observations :

5 e) digestion en présence de hyaluronidase (+): au 7<sup>o</sup> jour de culture (a, e) : les cellules de la zone profonde présentent une morphologie caractéristique des chondrocytes , telle qu'elle peut être observée in situ. A l'opposé, les cellules de la zone superficielle, de type fibroblastoïde, présentent de nombreux et fins prolongements. Ces différences sont maintenues au cours des multiplications successives au moins jusqu'au 14<sup>o</sup> jour de culture (c,  
10 g).

f) digestion en absence de hyaluronidase (-): les cellules sont incluses dans une matrice extracellulaire plus abondante où les différences morphologiques entre les deux sous-types de cellules sont moins nettes (b, f, d et h).

15 **Fig 6 : Structure du cartilage humain normal**

**Fig 7 : Chondrocytes humains normaux cultivés 1 mois en 3D sous agitation en présence de BAPN**

20 Culture en 3 D dans des éponges de collagène-GAG-chitosan en présence de serum et  $\beta$ APN de chondrocytes humains normaux. Les chondrocytes ont été préalablement multipliés, et différenciés, en culture 2D sur plastique.

L'analyse histologique montre en surface la présence d'une zone dense épaisse de structure histologique très proche de celle du cartilage humain normal (figure 6). Les chondrocytes sont  
25 entourés d'une matrice extracellulaire importante qu'ils ont néosynthétisée et sont logés dans de petites lacunes. Plus profondément, on observe une colonisation de l'éponge avec une synthèse de matrice très pauvre.

30 **Fig 8 : Chondrocytes humains normaux cultivés 1 mois en 3D sous agitation sans  $\beta$ APN**

Les mêmes éponges de collagène-GAG-chitosan traitées ici sans  $\beta$ APN présentent en surface une zone dense peu épaisse localisée sur une surface limitée de l'éponge. Plus

profondément, la colonisation et la synthèse de matrice ne diffèrent pas des éponges traitées au  $\beta$ APN.

En conclusion le traitement au  $\beta$ APN semble favoriser le développement d'une structure proche de celle du cartilage humain normal en surface.

5

**Fig 9** : Réversibilité des effets du  $\beta$ APN sur les pontages des chaînes de collagène IX produit dans le tapis cellulaire de chondrocytes hypertrophiques de poulet embryonnaire. Etude fluorographique.

10 Des chondrocytes de la partie craniale de sternum ont étéensemencés à forte concentration (5 millions de cellules par boîte de Petri P35) puis soumis à 24 hrs de radiomarquage à la proline  $^{14}\text{C}$  aux  $7^\circ$ ,  $14^\circ$  et  $24^\circ$  jour de culture (respectivement D7, D14 et D21).

Le  $\beta$ APN a été présent (+) ou absent (-) pendant toute la durée de culture, ou présent seulement pendant la première semaine ((+)).

15

Observations :

La présence de deux bandes principales de collagène IX varie en fonction de la présence ou non de  $\beta$ APN pendant toute la culture : la bande A est reliée à l'absence de  $\beta$ APN, alors que la bande B est observée essentiellement en présence de  $\beta$ APN. La présence de  $\beta$ APN limitée à la seule première semaine donne un profil électrophorétique après 2 et 3 semaines de culture qui est caractéristique d'une culture sans  $\beta$ APN.

20

Dans tous les cas, la synthèse de collagène X augmente avec l'âge de la culture, mais la synthèse de collagène I est ralentie par la forte densité d'ensemencement initiale (5 millions de cellules / P35 au lieu de 1,5).

25

Conclusions :

L'effet du  $\beta$ APN sur les pontages du collagène IX est montré, il précède celui sur la différenciation caractérisée par la synthèse de collagène I. Ces résultats montrent :

b) la réversibilité des effets du  $\beta$ APN.

c) l'efficacité de l'élimination du  $\beta$ APN de la culture cellulaire après lavages répétés des

30

tapis cellulaires puis utilisation d'un milieu de culture sans  $\beta$ APN.

**Fig 10:** Effet du  $\beta$ -APN sur la rétraction de peaux reconstruites :

Le  $\beta$ -APN entraîne une diminution dose-dépendante et significative de la rétraction par rapport au témoin, lorsque les peaux sont encore en culture immergée (en gris). Après deux semaines à l'interface air-liquide (en blanc), la rétraction est toujours diminuée par rapport  
5 au témoin mais pour les concentrations 200 et 500  $\mu$ g/ml seulement.

**Fig 11 :** Analyse immunohistochimique de la peau reconstruite avec et sans  $\beta$ APN

1 et 2 : coloration Témoin à l'hématoxyline sans 1<sup>o</sup> anticorps.

3 à 6 : immunodétection de la LOX par un 2<sup>o</sup> anticorps marqué à la peroxydase en absence  
10 (1, 3, 5) ou en présence (2, 4, 6) de  $\beta$ APN

Les colorations brun sombre marquent la présence de l'antigène LOX et sont absentes des coupes Témoin.

Après 35 jours de formation, la peau reconstruite est constituée d'un derme déposé sur l'éponge de collagène-glycosaminoglycane-chitosane, et d'un épiderme formé par les  
15 kératinocytes.

Au niveau du derme, le traitement au  $\beta$ APN permet une colonisation plus importante de l'éponge par les fibroblastes, ce qui se traduit par une synthèse accrue de matrice extracellulaire (1 et 2). L'expression de LOX apparaît plus intense.

Au niveau de l'épiderme, la stratification générale est retrouvée, mais le traitement au  
20  $\beta$ APN fait apparaître une ligne granuleuse plus intense. L'expression de LOX est également augmentée.

## TABLEAU I

Activités Lysyl oxydase recueillie dans les tapis cellulaires de chondrocytes en culture sur plastique.

Deux populations de chondrocytes de sternum d'embryon de poulet (hypertrophiques dans la partie craniale, synthétisant du collagène X, et non hypertrophiques dans la partie caudale)

Ensemencement: 4 millions cellules / Pétri 35mm (P35).

Culture + 25 µg/ml ascorbate, + 1 mM pyruvate, ± 10% FCS, ± 1 mM cys. 24 hrs avant la collecte en milieu sans serum (1,5 ml) le tapis cellulaire est lavé par le milieu sans sérum + cys. Des aliquotes du milieu de culture après 24 hrs sont concentrés 10 fois puis soumis au dosage de l'activité Lysyl oxydase avec différents lots de substrat élastine tritiée.

	<u>dpm -βAPN</u>	<u>dpm + βAPN</u>	<u>activité / P 35</u>	
<b><u>expérience 1 (substrat n°1)</u></b>				
<b><u>(culture - FCS, + cys)</u></b>				
<b><u>jour 3</u></b>				
15	chondrocytes caudaux (milieu de 15% P35)	930 1002	674 718	1925
<b><u>expérience 2 (substrat n°2)</u></b>				
<b><u>(culture +FCS, - cys)</u></b>				
<b><u>jour 7</u></b>				
20	chondrocytes caudaux (milieu de 25% P35)	8158 8464	5296 6210	10232
25	chondrocytes craniaux (milieu de 100 % P35)	10932 10510	5800 6536	4553
	LO aortique purifiée standard	8544 8810	4340 4762	/
<b><u>jour 13</u></b>				
30	chondrocytes caudaux (milieu de 75% P35)	5016 5322	4344 4702	861
35	chondrocytes craniaux (milieu de 100% P35)	5038 5840	4580 4618	840

**Conclusions :**

Des activités lysyl oxydase (inhibées par le βAPN et dosées par la production d'eau tritiée) sont sécrétées dans les milieux de culture. L'activité spécifique recueillie dans les milieux est plus forte au 7° jour de culture qu'au 13° jour. La matrice extracellulaire étant plus riche en substrats collagéniques naturels de l'activité Lysyl oxydase au 13° jour de culture, elle retiendrait donc l'enzyme dans le tapis cellulaire.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un inhibiteur direct ou indirect des lysyl oxydases (LO), ledit inhibiteur étant l'éthylènediamine, le  $\beta$ -aminopropionitrile ( $\beta$ -APN), le 2-nitroéthylamine, la 2-bromo-  
 5 éthylamine, la 2-chloroéthylamine, la 2-trifluoroéthylamine, la 3-bromopropylamine, une p-halobenzylamine, un composé halogéné insaturé ou la sélénohomocystéine lactone, en tant qu'inhibiteur de la dédifférenciation des cellules en culture *in vitro*, en vue du maintien constant du phénotype de différenciation desdites cellules dans le cadre de la mise en œuvre de procédé de culture *in vitro* de ces dernières, et ce pendant la totalité du  
 10 temps de culture, pour la préparation (a) de cellules différenciées dont le phénotype de différenciation est identique à celui où se trouvaient initialement lesdites cellules lors de leur mise en culture ; ou (b) pour la préparation d'une matrice cellulaire constituée de cellules différenciées dont le phénotype de différenciation est identique à celui où se trouvaient initialement lesdites cellules lors de leur mise en culture , les cellules étant  
 15 cultivées en présence dudit inhibiteur, et du milieu extracellulaire secrété par lesdites cellules et liant ces dernières dans ladite matrice.
  
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'inhibiteur des LO est indirect et est un composé bloquant les dérivés aldéhydes issus de la désamination oxydative des  
 20 résidus lysyls et hydroxyls par les LO, ledit composé étant la D-pénicillamine, l'acide 2-amino-5-mercapto-5-méthylhexanoïque, l'acide D-2-amino-3-méthyl-3-((2-acétamidoéthyl) dithio) butanoïque, l'acide p-2-amino-3-méthyl-3-((2-aminoéthyl) dithio) butanoïque, le 4-((p-1-diméthyl-2-amino-2-carboxyéthyl) dithio) butanesulfinate de sodium, le sulfinate de 2-acétamidoéthyl-2-acétamidoéthanethiol, ou le 4-  
 25 mercaptobutanesulfinate de sodium trihydrate.
  
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'inhibiteur des LO est le  $\beta$ -APN, la D-pénicillamine ou une combinaison des deux.
  
- 30 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour cultiver des cellules d'origine humaine ou animale *in vitro*, lesdites cellules étant des chondrocytes des cartilages, des cellules de la cornée, des cellules de la peau qui sont les fibroblastes de derme, des kératinocytes de l'épiderme, des cellules endothéliales des vaisseaux, des

ostéoblastes des os, des hépatocytes, des cellules rénales, des cellules musculaires, ou des cellules souches et pluripotentes.

- 5 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour cultiver des cellules *in vitro*.
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour cultiver des cellules *in vitro*, lesdites cellules étant les cellules de peau ou de cartilage, pour obtenir des tissus de peau ou de cartilage.
- 10 7. Procédé de culture *in vitro* de cellules telles que définies dans la revendication 4, comprenant la mise en culture desdites cellules avec un ou plusieurs inhibiteurs des LO tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 3.
- 15 8. Procédé de préparation de cellules ou d'implants cellulaires, caractérisé en ce qu'il comprend :
- la mise en œuvre d'un procédé de culture *in vitro* de cellules tel que défini dans la revendication 7 ;
  - le cas échéant, une ou plusieurs étapes de lavage des cellules en culture à l'aide d'une
- 20 solution tampon appropriée, afin d'éliminer en tout ou partie le ou les inhibiteurs des LO utilisés ;
- le cas échéant, une étape de digestion enzymatique de la matière extracellulaire susceptible de s'être formée, à l'aide d'enzymes appropriées ; et
  - le cas échéant, une étape de récupération des cellules mises en culture.
- 25 9. Procédé de préparation *in vitro* d'une matrice cellulaire telle que définie dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend :
- la culture *in vitro* de cellules telle que définie dans la revendication 7, jusqu'à la formation d'une matrice cellulaire telle que définie dans la revendication 1, suffisante pour
- 30 constituer une trame tissulaire ;
- le cas échéant, une ou plusieurs étapes de lavage de la matrice cellulaire en culture à l'aide d'une solution tampon appropriée, afin d'éliminer en tout ou partie le ou les inhibiteurs de LO utilisés ; et

- le cas échéant, une étape de récupération de la matrice cellulaire telle que définie dans la revendication 1.

5 10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel ladite matrice constitue une trame tissulaire, appliqué à la néosynthèse d'implants de cartilage lorsque ledit procédé est effectué à partir de chondrocytes, ou à la préparation de substituts cutanés lorsque ledit procédé est effectué à partir de fibroblastes, de kératinocytes ou d'une combinaison des deux.

11. Procédé de criblage de médicaments, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 (a) la mise en œuvre d'un procédé de culture *in vitro* de cellules tel que défini dans la revendication 7, le cas échéant jusqu'à la formation d'une matrice cellulaire suffisante pour constituer une trame tissulaire ;

15 (b) le cas échéant, une ou plusieurs étapes de lavage des tissus en culture à l'aide d'une solution tampon appropriée, afin d'éliminer en tout ou partie le ou les inhibiteurs de LO utilisés ;

(c) une étape de mise en présence de la molécule testée avec les cellules ou tissus obtenus lors des étapes (a) et (b) ; et

(d) la détection de l'éventuel effet de ladite molécule sur les cellules ou les tissus susmentionnés.

20

12. Implants tissulaires, tels qu'obtenus par la mise en œuvre d'un procédé tel que défini dans la revendication 10 effectué à partir de chondrocytes, comprenant une matrice extracellulaire exempte de collagènes I et III normalement absents du cartilage sain, et  
25 comprenant les collagènes spécifiques du cartilage, lesdits collagènes spécifiques étant les collagènes II, IX, XI, et le cas échéant X.

13. Implants tissulaires de peau reconstituée, ou substitut cutanés, tels qu'obtenus par la mise en œuvre d'un procédé tel que défini dans la revendication 10 effectué à partir de  
30 fibroblastes, de kératinocytes ou d'une combinaison des deux.

Application number / numéro de demande: 02456271

Figures: 5/11 & 9/11

Pages: ~~26/27~~ 26 & 27

Unscannable items  
received with this application  
(Request original documents in File Prep. Section on the 10<sup>th</sup> floor)

Documents reçu avec cette demande ne pouvant être balayés  
(Commander les documents originaux dans la section de préparation des dossiers au  
10ème étage)

**EFFET DE L'ACTIVITÉ LYSYL OXYDASE SUR LA DEDIFFERENCIATION DE CHONDROCYTES APRÈS 2 SEMAINES DE CULTURE 2D**

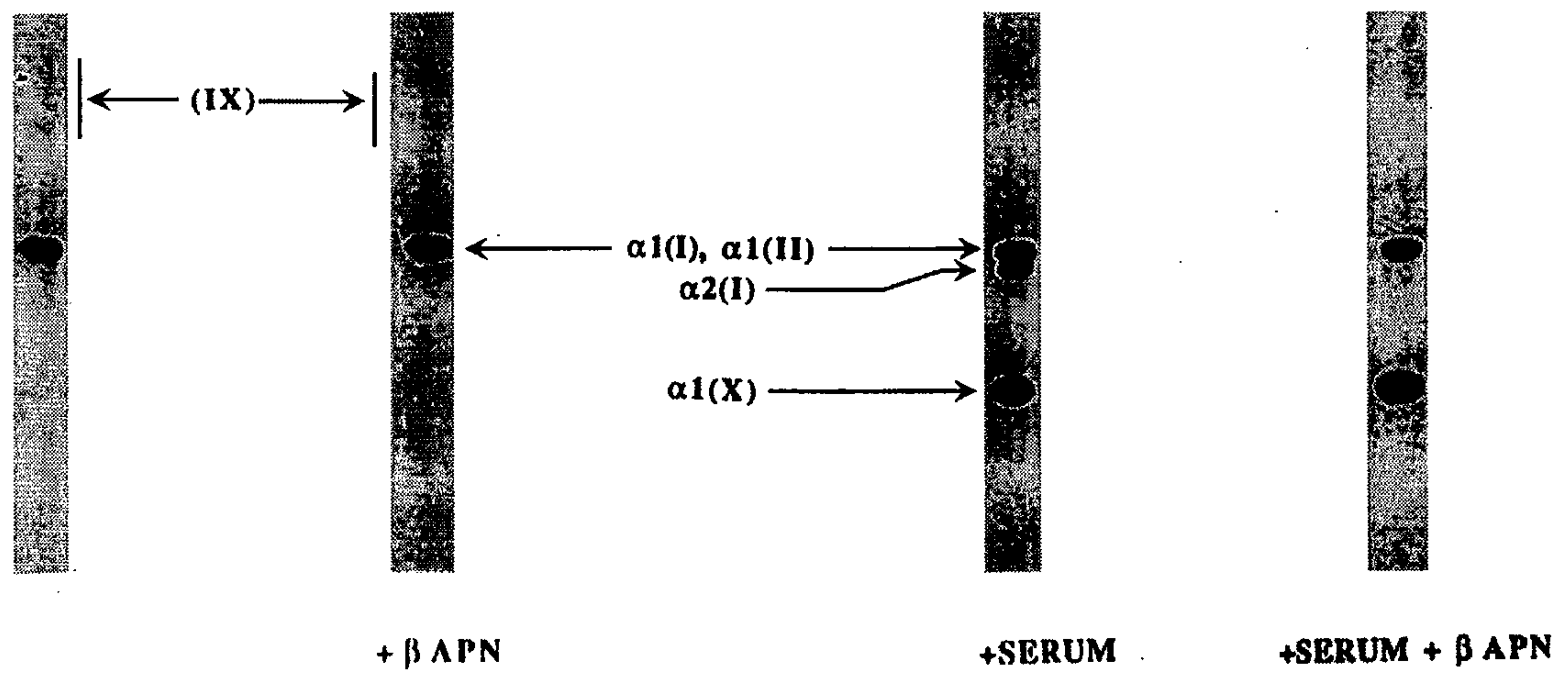
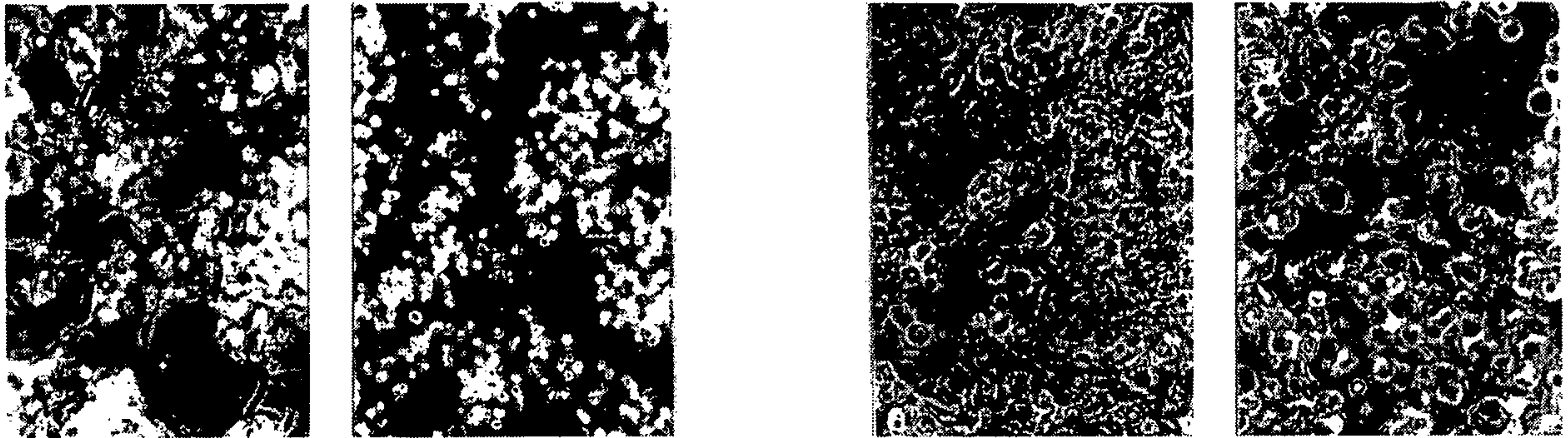


FIGURE 1

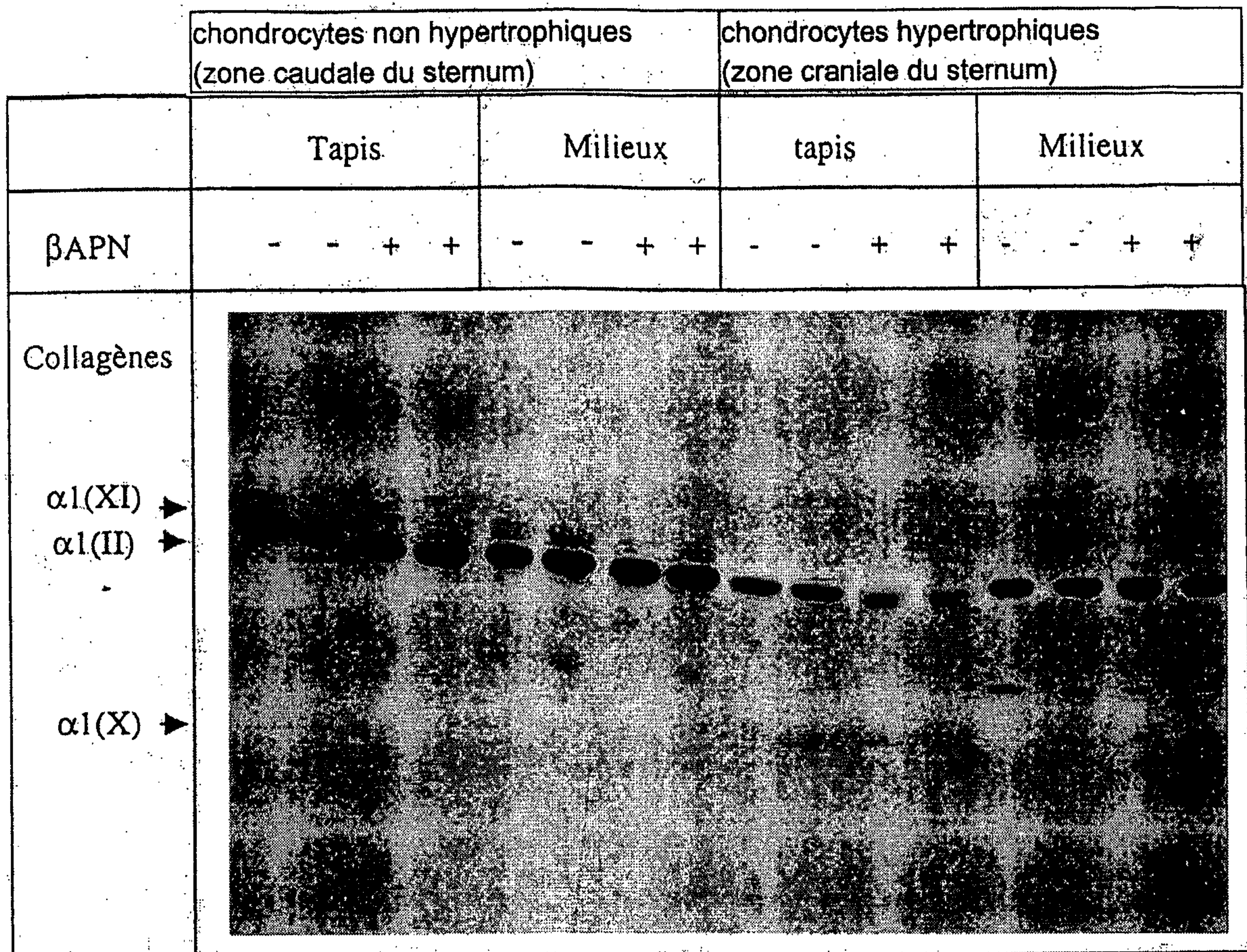


FIGURE 2.

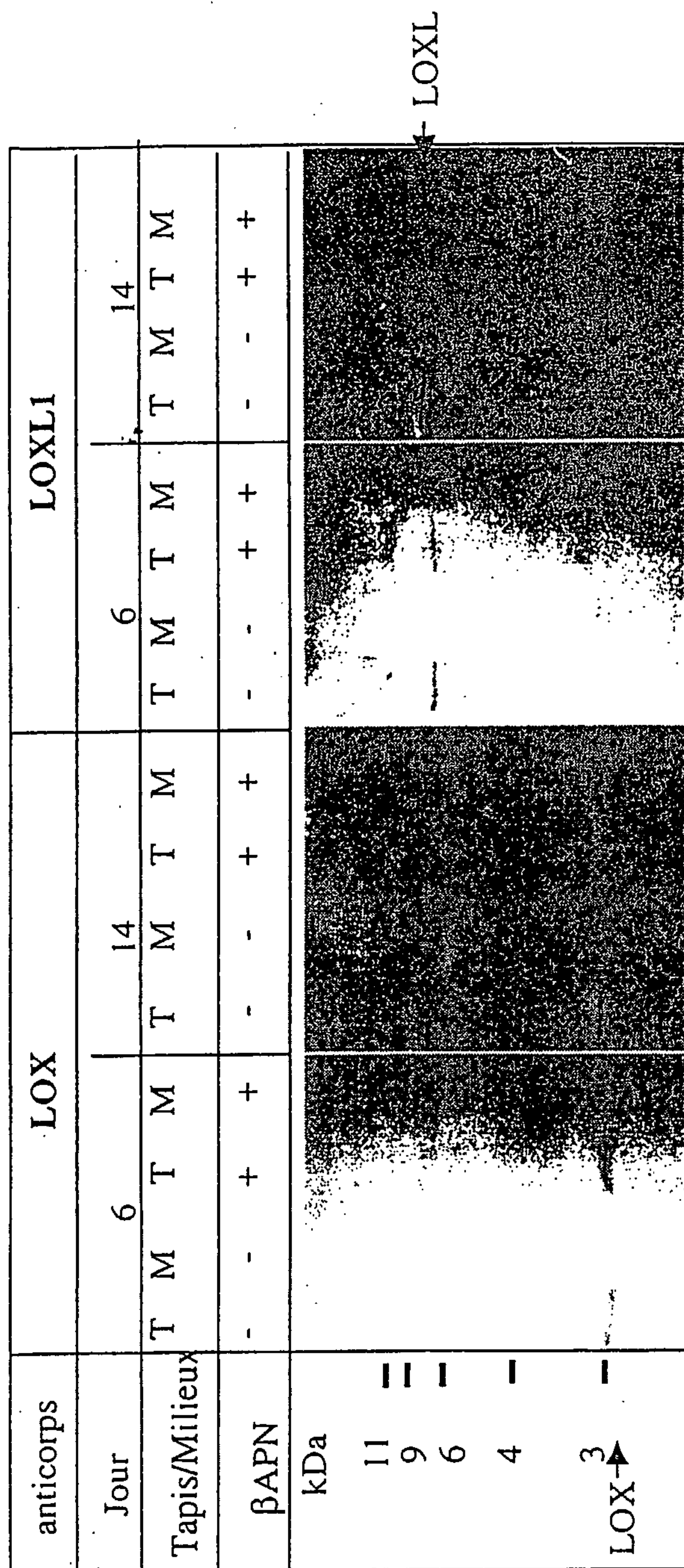


FIGURE 3 :

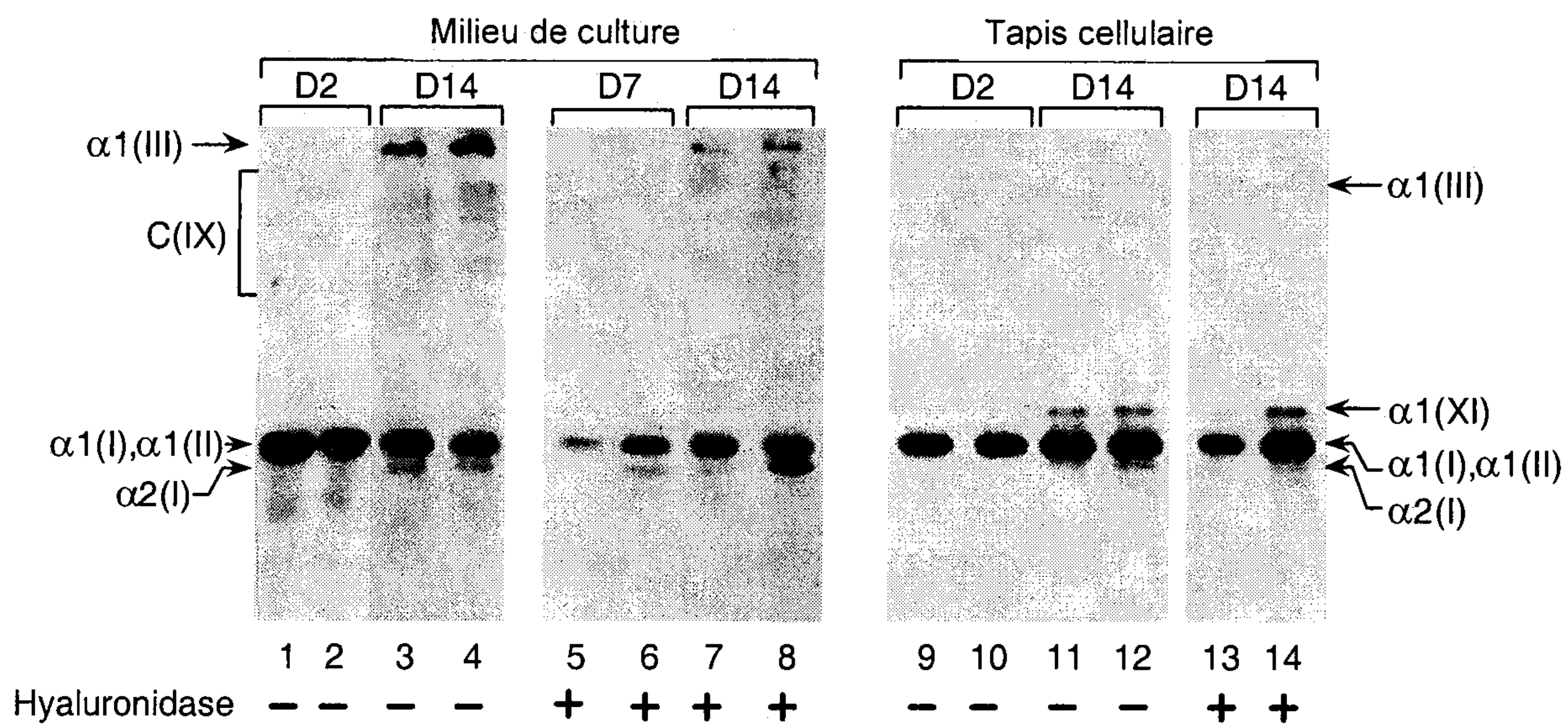


Figure . 4

7/11

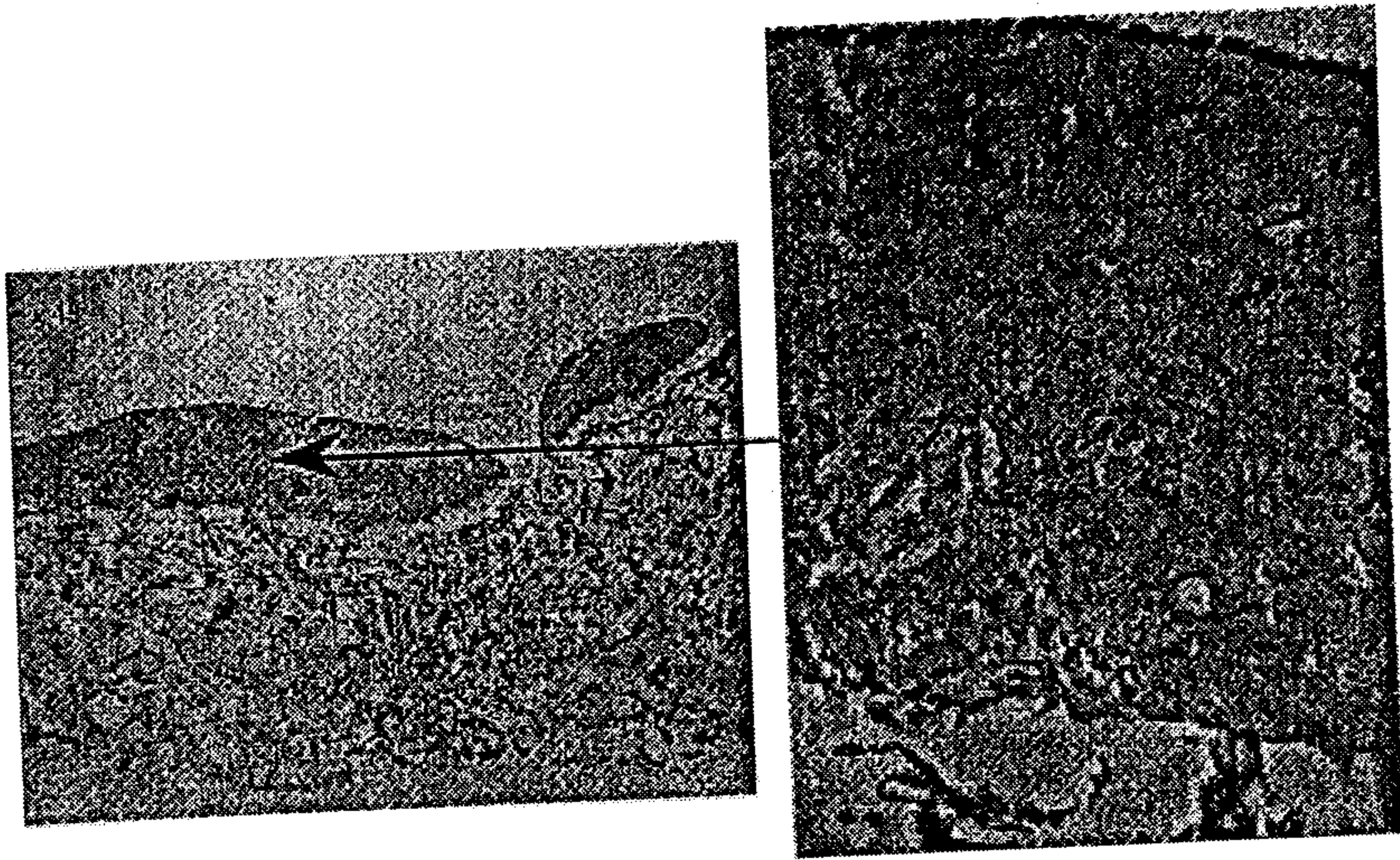


Figure 7

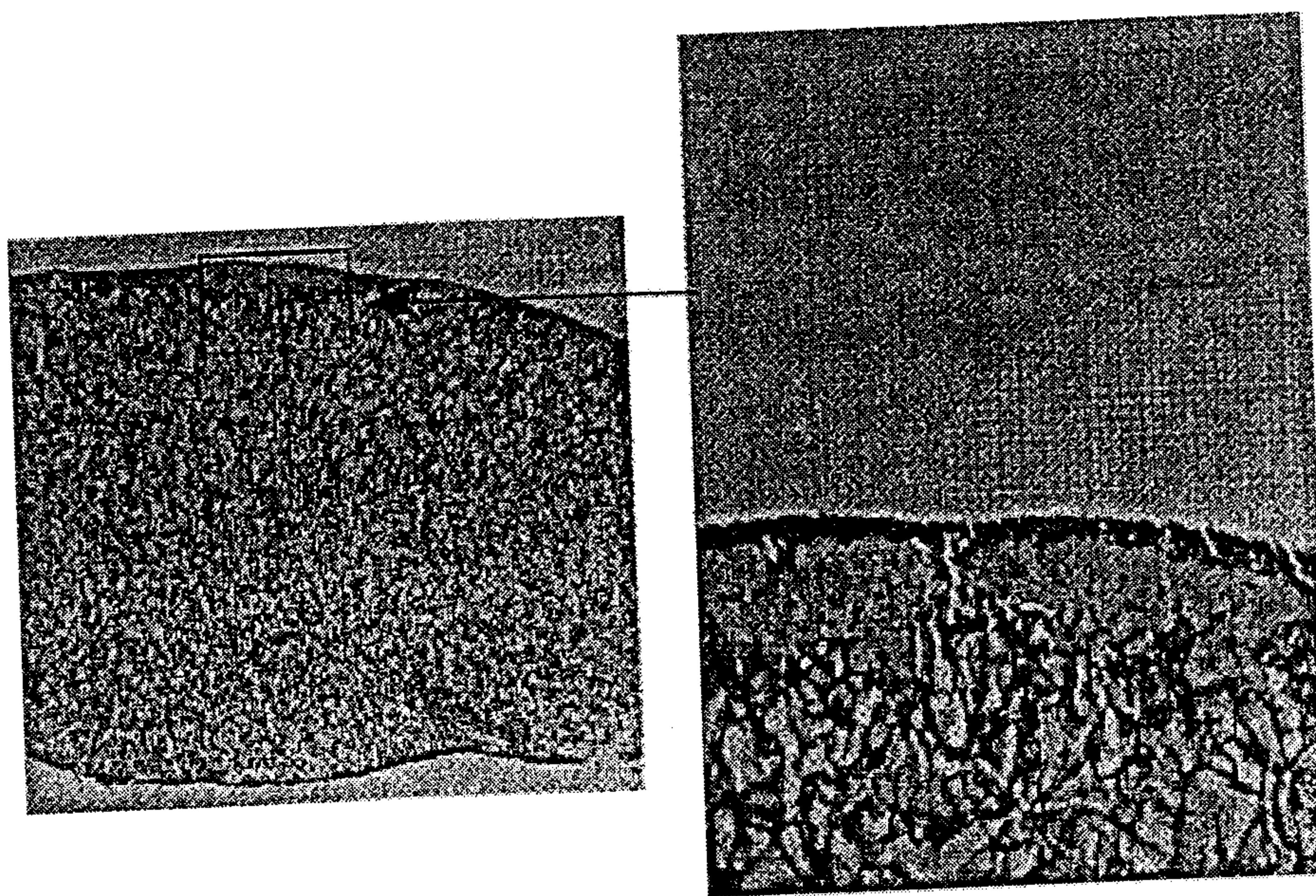


Figure 8

9/11

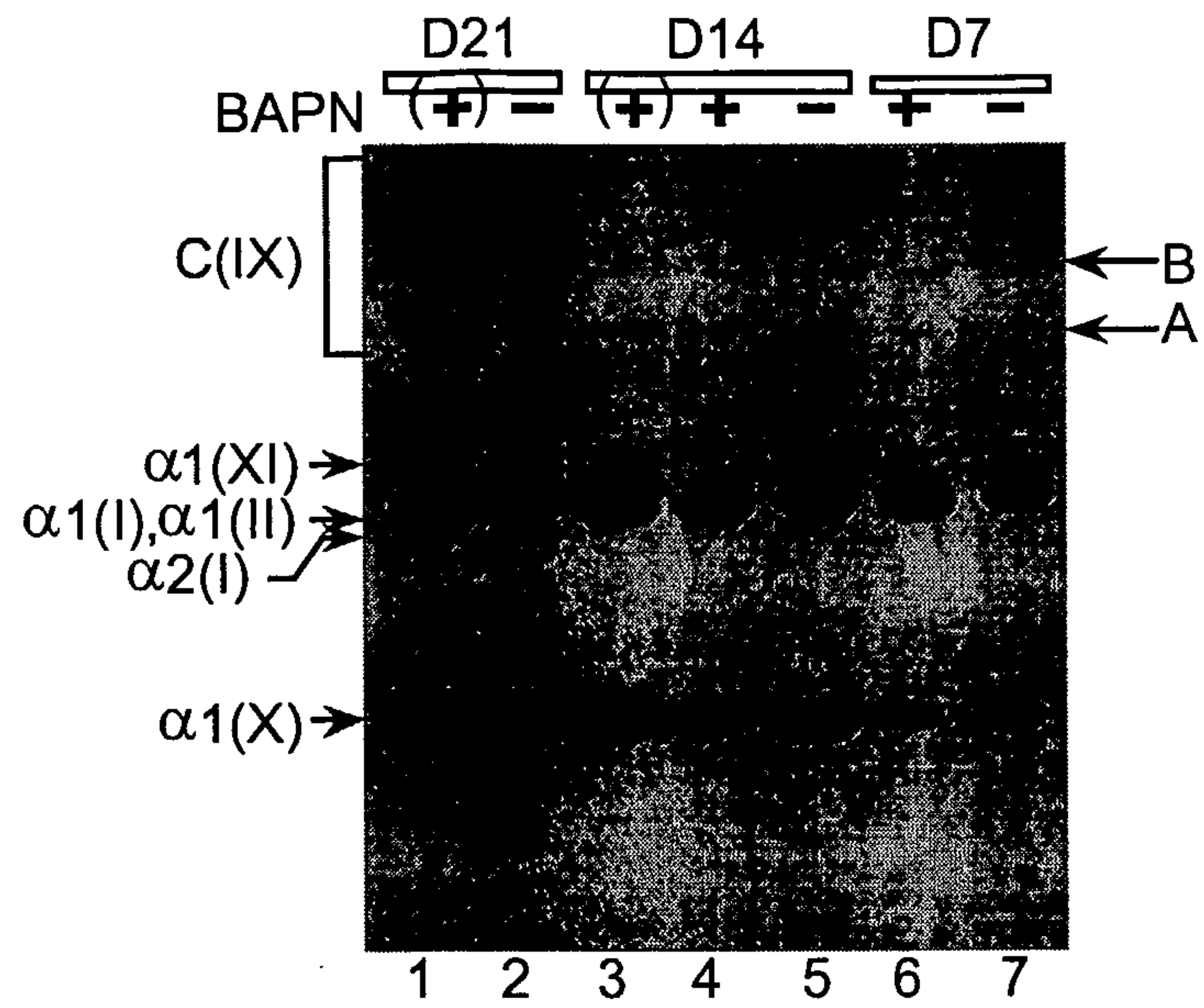


Figure 9

10/11

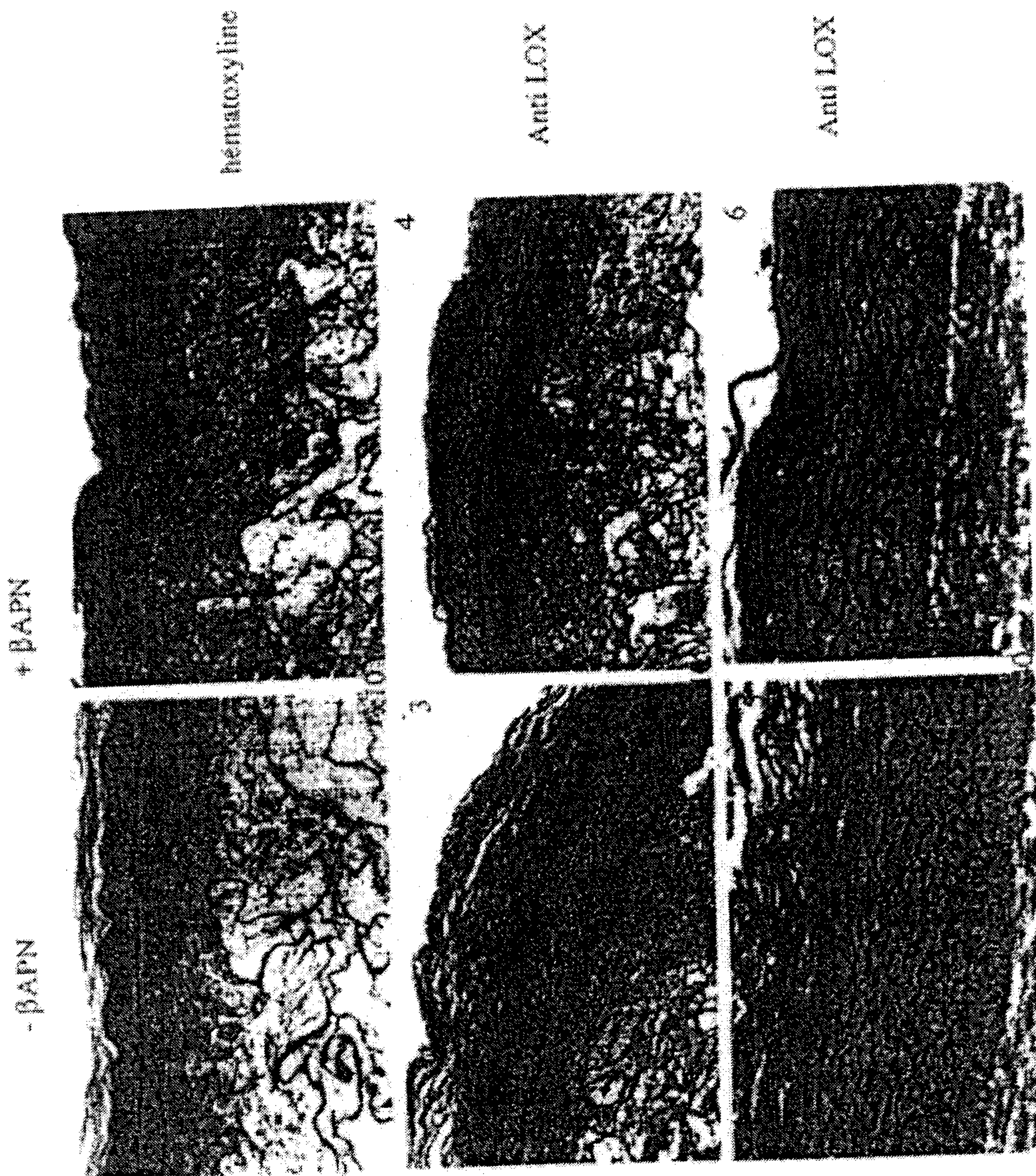
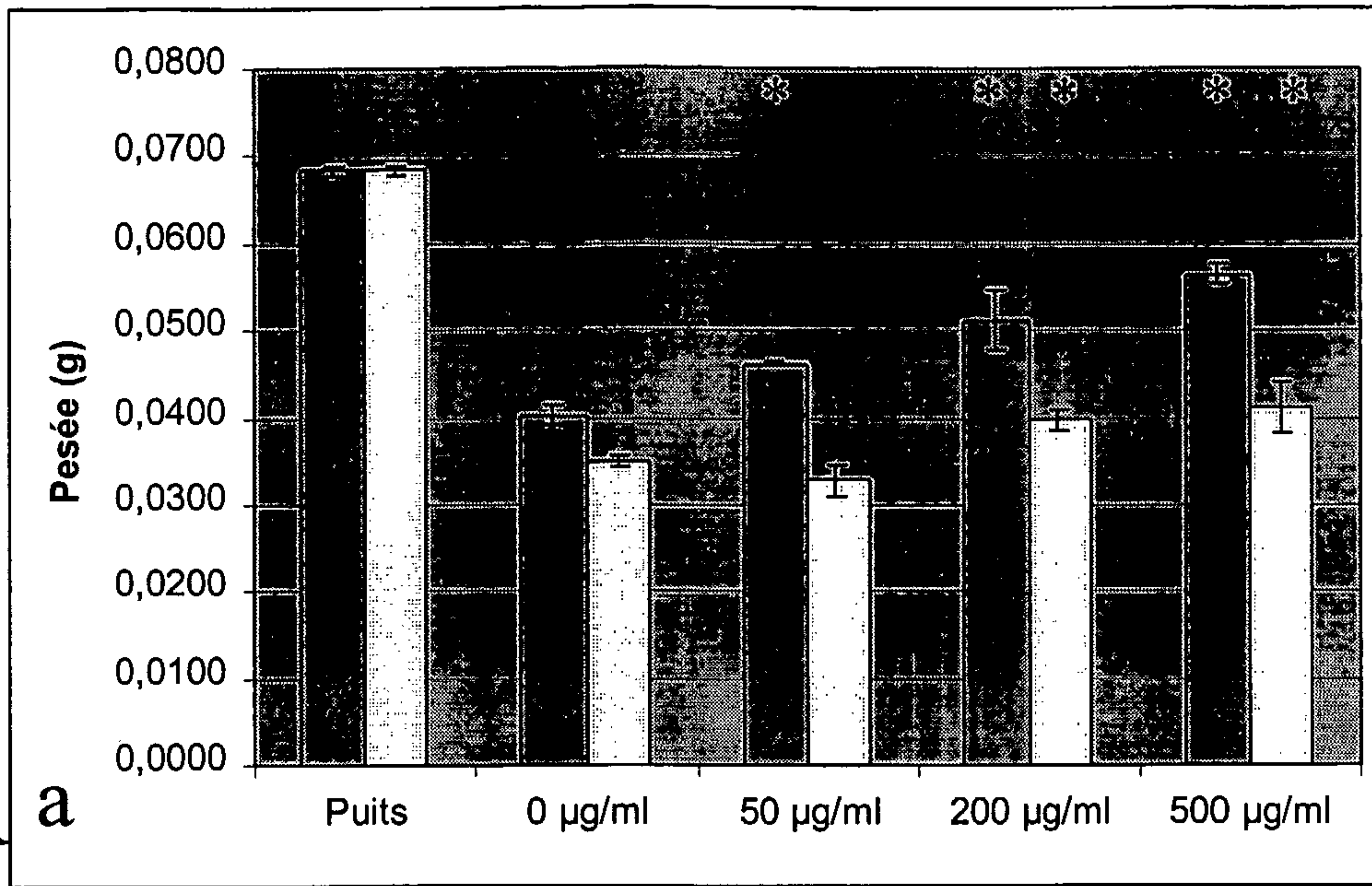


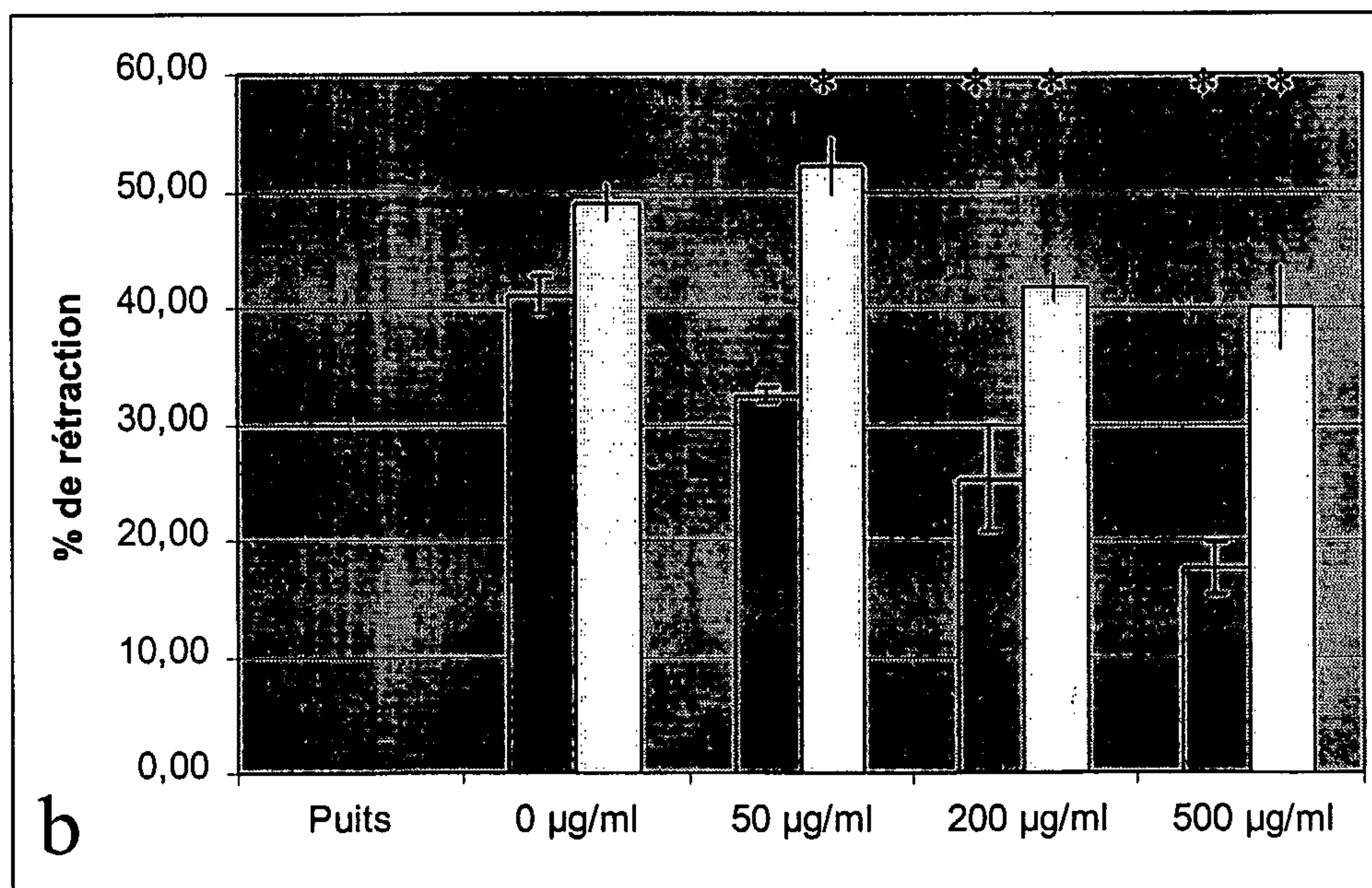
FIGURE 10

Figure 11



\* p < 5%

n = 3



\* p < 5%

n = 3



Peaux immergées soit J21



Peaux à 2 semaines air-liquide, soit J35