

CONFÉDÉRATION SUISSE
INSTITUT FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

(11) CH

696 146 A5

(19)

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

(51) Int. Cl.: **C12M** 3/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) **FASCICULE DU BREVET**

(21) Numéro de la demande: 00833/01

(22) Date de dépôt: 09.05.2001

(30) Priorité: 10.05.2000 US 09/568,254
18.01.2001 GB 0101315.0
26.02.2001 US 60/271,497
21.03.2001 GB 0107093.7

(24) Brevet délivré: 15.01.2007

(45) Fascicule du brevet publié: 15.01.2007

(73) Titulaire(s):
TriStem Trading (Cyprus) Limited,
Arch. Makariou III, 2-4 Capital Center, 9th Floor, P.C. 1505
Nicosia (CY)

(72) Inventeur(s):
ABULJADAYEL, Ilham, Mohamed, Saleh, Saeed,
London NW8 6QP (GB)

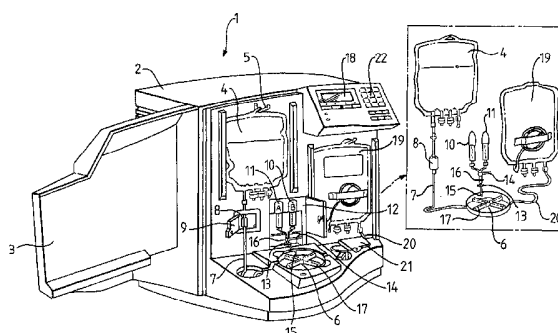
(74) Mandataire:
Micheli & Cie ingénieurs-conseils,
122, rue de Genève Case postale 61
1226 Thônex (Genève) (CH)

(54) **Dispositif et procédé pour la préparation de cellules indifférenciées.**

(57) L'invention concerne un dispositif pour la formation et/ou l'augmentation du nombre relatif de cellules indifférenciées dans une population cellulaire comprenant des cellules engagées.

Le dispositif comprend un moyen pour mettre en contact une cellule plus engagée avec un agent qui provoque la rétro-différenciation de la cellule plus engagée en une cellule indifférenciée.

Application: procédé pour la préparation d'une cellule indifférenciée.



Description

[0001] La présente invention a pour objet un dispositif ainsi qu'un procédé de mise en action de ce dispositif. De manière plus détaillée, la présente invention concerne un dispositif pour la préparation d'une cellule non différenciée. La présente invention concerne en particulier, mais non exclusivement, un dispositif pour la préparation d'une cellule non différenciée à partir d'une cellule plus engagée. Dans un aspect supplémentaire, la présente invention concerne également un procédé pour former des cellules non différenciées. Le dispositif peut également communiquer à distance avec le producteur/distributeur/fabricant/centre d'appel/centre de service, etc., par exemple pour commander à distance un agent nouveau et/ou pour confirmer que des opérations sont ou ont été effectuées correctement. Ainsi, la présente invention concerne également des procédés pour effectuer une tâche faisant intervenir le dispositif et ses utilisations, par exemple la communication à distance avec un produit/distributeur/fabricant/centre d'appel/centre de service ou un centre similaire et la réponse du producteur/distributeur/fabricant/centre d'appel/centre de service, ou centre similaire à de telles communications (par exemple la réception et/ou le remplissage de bons de commande, la réception et/ou le traitement et/ou la réponse à des données/informations concernant des opérations et/ou leur exactitude).

[0002] La différenciation est un processus dans lequel des structures et fonctions de cellules sont engendrées progressivement pour donner des cellules plus spécialisées, par exemple la formation de lymphocytes T ou de lymphocytes B à partir de précurseurs hématopoïétiques immatures. En conséquence, lorsque les cellules deviennent plus engagées, elles deviennent plus spécialisées. Dans la plupart des types cellulaires de mammifères, la différenciation cellulaire est un processus unidirectionnel conduisant finalement à des cellules différenciées de manière terminale. Cependant, bien que certains types cellulaires se maintiennent pendant toute la vie sans division et sans renouvellement, de nombreux types cellulaires continuent à se diviser au cours de la durée de vie de l'organisme et subissent un renouvellement. Cela peut s'effectuer par une division simple (par exemple les cellules hépatiques) ou, comme dans le cas de cellules telles que les cellules hématopoïétiques et les cellules épidermiques, par division de cellules souches relativement indifférenciées avec ensuite l'engagement d'une des cellules filles dans un programme de différenciation irréversible ultérieure. Cependant, tous ces processus ont une caractéristique en commun: les cellules conservent leur état de différenciation ou deviennent plus différenciées. Elles ne deviennent pas indifférenciées ou même moins différenciées.

[0003] La rétrodifférenciation est un processus dans lequel les structures et les fonctions des cellules sont progressivement modifiées pour engendrer des cellules moins spécialisées. Certaines cellules subissent naturellement une différenciation inverse limitée (rétrodifférenciation) in vivo en réponse à une altération tissulaire. Par exemple, il a été observé que les cellules hépatiques subissent une réversion à un motif d'expression enzymatique similaire au motif enzymatique fœtal au cours de la régénération hépatique (Curtin et Snell, 1983, Br. J. Cancer. Vol. 48; 495-505).

[0004] Il a été montré dans le document WO96/23870 qu'il était possible de traiter des cellules différenciées de telle sorte qu'elles se transforment en cellules indifférenciées, y compris les cellules souches. Ces cellules indifférenciées étaient capables de proliférer et d'engendrer une descendance redifférenciée de la même lignée ou de n'importe quelle autre lignée. Dans le cas de cellules hématopoïétiques rétrodifférenciées, ces cellules souches sont pluripotentes et peuvent engendrer plus d'une lignée cellulaire. La découverte féconde du document WO96/23870 était totalement inattendue.

[0005] Les implications cliniques de cette découverte sont considérables. Les cellules souches sont extrêmement difficiles à obtenir à partir de patients humains. Elles sont habituellement obtenues à partir de tissu ombilical, de moelle osseuse ou de sang où elles sont présentes seulement en de très faibles quantités. Cependant, la présente invention propose un dispositif pour la production de cellules souches à partir de cellules plus engagées, en particulier par le processus de rétrodifférenciation.

[0006] Le document US 6 087 168 décrit un procédé de transdifférenciation de cellules épidermiques en cellules neuronales, procédé dans lequel des cellules épidermiques sont dédifférenciées ou rétrodifférenciées avec un milieu approprié. De manière similaire, Lake J.A. et al. Journal of Cell Science 113, 556-566 (2000) et Rathjen J. et al. Journal of Cell Science 112, 601-612 (1999) décrivent la rétrodifférenciation de cellules souches embryonnaires (ES) en cellules de type ectodermique primitives précoces (EPL), en réponse à deux facteurs séparables.

[0007] Dans un aspect général, il est proposé un dispositif pour la préparation d'une cellule indifférenciée, ledit dispositif comprenant un moyen pour permettre à une cellule plus engagée de subir une rétrodifférenciation en une cellule indifférenciée.

[0008] Aucun des documents de l'art antérieur (tels que le document US 6 087 168, le document de Lake et al. ou le document de Rathjen et al.) ne décrit un dispositif pouvant être utilisé convenablement dans la préparation de cellules indifférenciées. Bien que la préparation de cellules indifférenciées puisse être effectuée par l'homme de l'art sans utiliser un dispositif conforme à la présente invention, le produit final tend à être inconstant car, chaque fois que le mode opératoire est mis en œuvre, les résultats dépendent de la dextérité et de l'expérience de la personne mettant en œuvre ce mode opératoire. En outre, le temps «pratique requis» pour préparer manuellement des cellules indifférenciées est important et, ainsi, est d'un coût élevé pour un laboratoire.

[0009] Dans une forme de réalisation spécifique, il est proposé un dispositif pour former et/ou augmenter le nombre relatif de cellules indifférenciées dans une population cellulaire comprenant des cellules engagées, dispositif qui comprend une chambre, un moyen pour introduire dans ladite chambre une population cellulaire comprenant des cellules engagées, un

moyen pour introduire dans ladite chambre des moyens de rétrodifférenciation qui sont capables de provoquer la rétrodifférenciation d'une cellule engagée en une cellule indifférenciée, et des moyens d'incubation pour la mise en incubation desdites cellules engagées en présence desdits moyens de rétrodifférenciation de telle sorte qu'une cellule engagée subisse une rétrodifférenciation en une cellule indifférenciée.

[0010] Dans une autre forme de réalisation spécifique, il est proposé un dispositif pour former et/ou augmenter le nombre relatif de cellules indifférenciées dans une population cellulaire comprenant des cellules engagées, dispositif qui comprend une chambre, un moyen pour introduire dans ladite chambre une population cellulaire comprenant des cellules engagées, un moyen pour introduire dans ladite chambre un agent qui provoque la rétrodifférenciation d'une cellule engagée en une cellule indifférenciée, et un moyen d'incubation pour mettre en incubation ledit agent et lesdites cellules engagées de telle sorte qu'une cellule engagée subisse une rétrodifférenciation en une cellule indifférenciée.

[0011] Avantageusement, l'agent engage un récepteur qui assure la médiation de la capture, de la reconnaissance ou de la présentation d'un antigène à la surface des cellules engagées. Plus avantageusement, le récepteur est un antigène du complexe majeur histocompatibilité (CMH) de catégorie I ou un antigène du CMH de catégorie II, tel qu'un antigène de catégorie I choisi entre le récepteur A associé aux leucocytes humains (HLA)-A, un récepteur HLA-B, un récepteur HLA-C, un récepteur HLA-E, un récepteur HLA-F et un récepteur HLA-G, ou un antigène de catégorie II choisi entre un récepteur HLA-DM, un récepteur HLA-DP, un récepteur HLA-DQ et un récepteur HLA-DR.

[0012] De manière convenable, le récepteur peut comprendre une chaîne β ayant des régions homologues. De préférence, le récepteur peut comprendre au moins la région homologue de la chaîne β du HLA-DR.

[0013] Habituellement, les cellules engagées sont des cellules différenciées. De préférence, les cellules engagées sont des cellules hématopoïétiques engagées, de préférence des cellules choisies entre des cellules formant des colonies de lymphocytes T (cellule CFC-T), des cellules formant des colonies de lymphocytes B (cellule CFC-B), des cellules formant des colonies de cellules éosinophiles (cellules CFC-eosin.), des cellules formant des colonies de cellules basophiles (cellules CFC-bas.), des cellules formant des colonies de granulocytes/monocytes (cellules CFC-GM), des cellules formant des colonies de mégacaryocytes (cellules CFC-MEG), des cellules formant des salves d'érythrocytes (cellules BCF-E), des cellules formant des colonies d'érythrocytes (cellules CFC-E), des lymphocytes T et des lymphocytes B.

[0014] Dans une forme préférée de réalisation de la présente invention, la cellule plus engagée n'est pas une cellule cancéreuse. Dans une autre forme préférée de réalisation de la présente invention, l'agent n'est ni cancérogène ni capable de favoriser une croissance cancéreuse.

[0015] Dans une forme de réalisation préférée, l'agent est un anticorps contre le récepteur, tel qu'un anticorps monoclonal contre le récepteur. Des exemples spécifiques comprennent CR3/43 et l'anticorps monoclonal TAL.1B5.

[0016] Dans une forme de réalisation préférée, l'agent module l'expression du gène de CMH. De manière convenable, l'agent peut moduler l'expression de gène de CMH de catégorie I⁺ et/ou de CMH de catégorie II⁺.

[0017] De préférence, l'agent est utilisé conjointement avec un modificateur de réponse biologique, tel qu'un agent alkylant, par exemple un agent alkylant qui est le, ou comprend du, cyclophosphamide.

[0018] Les cellules indifférenciées préférées comprennent un antigène de cellules souches. Dans une forme de réalisation préférée, les cellules indifférenciées sont choisies entre une cellule souche embryonnaire, une cellule souche pluripotente, une cellule souche lymphoïde, une cellule souche hématopoïétique, une cellule souche neuronale, une cellule souche épithéliale, une cellule souche mésenchymateuse, une cellule souche endothéliale et une cellule souche myéloïde. De préférence, les cellules indifférenciées sont caractérisées par une ou plusieurs des désignations suivantes de marqueur de surface cellulaire: CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻, CD117, AC133, CD90 et/ou CD45low. Plus avantageusement, la cellule indifférenciée est une cellule CD34⁺ ou une cellule CD38⁻, notamment une cellule CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁻ ou CD45low.

[0019] Ainsi, dans une forme de réalisation préférée, la présente invention propose également un dispositif pour augmenter le nombre relatif de cellules ayant la désignation de marqueur de surface cellulaire CD34⁺ et/ou CD38⁻ et/ou HLA-DR⁻ et/ou CD45low et/ou CD90 et/ou CD117 et/ou AC133 dans une population cellulaire comprenant des cellules engagées, dispositif qui comprend:

- (i) une chambre,
- (ii) un moyen pour introduire dans ladite chambre une population cellulaire comprenant des cellules engagées,
- (iii) un moyen pour introduire dans ladite chambre un agent qui enrôle de manière fonctionnelle lesdites cellules engagées; et
- (iv) un moyen d'incubation apte à la mise en incubation desdites cellules engagées qui sont enrôlées par ledit agent dans ladite chambre de telle sorte que le nombre relatif de cellules CD34⁺ et/ou CD38⁻ et/ou HLA-DR⁻ et/ou CD45low et/ou CD90 et/ou CD117 et/ou AC133 augmente en résultat dudit enrôlement.

[0020] Un dispositif conforme à la présente invention peut comprendre en outre, facultativement, un moyen de purification ou d'isolement pour enrichir lesdites cellules indifférenciées, éliminer l'agent et/ou séparer lesdites cellules indifférenciées de la population cellulaire modifiée. De préférence, le moyen de purification comprend un moyen pour identifier un marqueur de surface cellulaire présent sur la surface de la cellule indifférenciée ou un marqueur de surface cellulaire présent sur la surface des cellules engagées, mais pratiquement absent de la surface des cellules indifférenciées. De manière

convenable, le moyen de purification peut utiliser par exemple des anticorps engendrés contre le marqueur de surface cellulaire. Des exemples de marqueurs convenables comprennent CD34, CD45 et HLA-DR. A titre d'exemple seulement, un moyen de purification convenable est le système de purification de CD34⁺ CliniMACs/Isolex. Dans une autre forme de réalisation de la présente invention, un tel moyen de purification ou d'isolement peut être fourni, facultativement, sous forme d'un moyen distinct.

[0021] Un dispositif conforme à la présente invention peut comprendre en outre, facultativement, un moyen en amont de sélection négative et/ou d'enrichissement cellulaire. En variante, la population de cellules peut être, facultativement, soumise à une sélection négative et/ou un enrichissement cellulaire avant l'insertion dans ledit dispositif.

[0022] Dans une autre forme de réalisation préférée, la cellule indifférenciée de la présente invention est une cellule CD34⁺, CD45⁺ et négative pour des marqueurs des lignées hématopoïétiques.

[0023] Les cellules plus différenciées peuvent être de la même lignée que les cellules engagées initiales ou bien d'une lignée différente.

[0024] Ainsi, en plus de produire des cellules indifférenciées, un dispositif conforme à la présente invention peut être utilisé pour convertir des cellules d'une lignée en celles d'une autre lignée.

[0025] En conséquence, dans un aspect supplémentaire, la présente invention propose un dispositif pour induire dans une population cellulaire comprenant des cellules hématopoïétiques engagées d'une lignée hématopoïétique la transformation en cellules d'une autre lignée hématopoïétique, dispositif qui comprend:

- (i) une chambre,
- (ii) un moyen pour introduire dans ladite chambre une population cellulaire comprenant des cellules engagées,
- (iii) un moyen pour introduire dans ladite chambre un agent qui enrôle de manière fonctionnelle un récepteur qui assure la médiation de la capture, de la reconnaissance ou de la présentation d'un antigène dans la surface desdites cellules hématopoïétiques engagées; et
- (iv) un moyen d'incubation apte à mettre en incubation lesdites cellules hématopoïétiques engagées qui sont enrôlées par ledit agent dans ladite chambre de telle sorte qu'elles deviennent des cellules d'une lignée hématopoïétique en résultat dudit enrôlement.

[0026] De préférence, lesdites cellules hématopoïétiques engagées sont des cellules d'une lignée de lymphocytes B et deviennent des cellules d'une autre lignée hématopoïétique choisie entre une lignée de lymphocytes T et une lignée myéloïde.

[0027] Les cellules indifférenciées produites par le dispositif de la présente invention peuvent être utilisées pour produire un médicament pour le traitement d'une affection ou maladie immunologique. De manière similaire, des cellules réengagées produites suivant les procédés de la présente invention peuvent être utilisées pour produire un médicament destiné au traitement d'une affection ou maladie immunologique.

[0028] La présente invention est extrêmement avantageuse car il est à présent possible de préparer aisément des cellules indifférenciées à partir de cellules plus engagées et ensuite d'utiliser ces cellules indifférenciées comme, ou pour préparer des, médicaments in vitro ou in vivo, ou de manière mixte, pour le traitement d'affections.

[0029] La présente invention est également avantageuse car il est possible d'utiliser le dispositif pour engager la cellule indifférenciée préparée par rétrodifférenciation en une cellule réengagée, telle qu'une cellule différenciée nouvelle, avec pour objectif de corriger ou de supprimer la cellule plus engagée initiale ou de corriger ou de supprimer un produit de cette cellule. Par exemple, des cellules indifférenciées pourraient être utilisées pour produire des cellules réengagées telles que les cellules tapissant les alvéoles des poumons, en créant ainsi un mécanisme permettant de remplacer ou de réparer un tissu pulmonaire altéré ou pathologique (voir Le Page, New Scientist, 19 décembre 2000, page 20).

[0030] L'expression «cellule réengagée» désigne une cellule dérivée d'une cellule indifférenciée – c'est-à-dire une cellule plus engagée nouvelle. L'expression «plus engagée» signifie plus différenciée et peut être aisément déterminée par référence à des voies et stades connus de différenciation cellulaire.

[0031] Les cellules les plus indifférenciées et les cellules différenciées comprennent des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de catégorie I et/ou de catégorie II. Si ces antigènes sont associés à ces cellules, ces cellules peuvent alors être appelées cellules de catégorie I* et/ou de catégorie II*. De préférence, la cellule plus engagée est apte à la rétrodifférenciation en une cellule indifférenciée de CMH de catégorie I* et/ou de catégorie II*.

[0032] De préférence, la cellule plus engagée est apte à la rétrodifférenciation en une cellule indifférenciée, comprenant un antigène de cellule souche.

[0033] De préférence, la cellule plus engagée est apte à la rétrodifférenciation en une cellule indifférenciée CD34⁺.

[0034] De préférence, la cellule plus engagée est apte à la rétrodifférenciation en une cellule mère lymphohématopoïétique.

[0035] De préférence, la cellule plus engagée est apte à la rétrodifférenciation en une cellule souche pluripotente.

[0036] De préférence, ladite augmentation se produit en un temps de 24 heures, de préférence de 4 à 8 heures (de telle sorte que n'importe quelle variation ne puisse seulement être due à une prolifération cellulaire).

[0037] Habituellement, la détermination des variations des nombres de cellules indifférenciées est effectuée en contrôlant les variations des nombres de cellules ayant des marqueurs de surface cellulaire caractéristiques des cellules indifférenciées. Des exemples de marqueurs de surface cellulaire convenables comprennent les marqueurs CD34⁺, HLA-DR⁺, CD38⁺, AC133, CD90 et/ou CD45low. En variante ou en outre, des diminutions des nombres de cellules portant des marqueurs de surface cellulaire caractéristiques des cellules différenciées et non des cellules indifférenciées peuvent être contrôlées.

[0038] De manière convenable, un dispositif selon la présente invention peut comprendre en outre, facultativement, un moyen de dépistage pour contrôler les variations du nombre de cellules portant des marqueurs de surface cellulaire caractéristiques des cellules indifférenciées.

[0039] De préférence, les cellules engagées utilisées dans l'analyse sont des cellules hématopoïétiques engagées telles que des cellules choisies entre des cellules CFC-T, des cellules CFC-B, des cellules CFC-eosin., des cellules CFC-Bas., des cellules CFC-GM, des cellules CFC-MEG, des cellules BFC-E, des cellules CFC-E, des lymphocytes T et des lymphocytes B, de préférence des lymphocytes B.

[0040] De préférence, un dispositif conforme à la présente invention comprend en outre une ou plusieurs, avantageusement deux ou plus de deux, mieux encore trois ou plus de trois et encore plus avantageusement quatre ou plus de quatre des caractéristiques suivantes:

- (i) un moyen de mesure pour mesurer le volume d'une population cellulaire,
- (ii) un moyen de comptage (tel qu'un compteur Coulter, miniaturisé si besoin, ou un autre cytomètre convenable) pour effectuer des numérations cellulaires et mesurer ainsi la concentration en cellules d'une population de cellules,
- (iii) un moyen de transfert pour transférer une quantité (telle qu'une quantité prédéterminée) d'une population cellulaire d'un récipient de stockage à la chambre, moyen de transfert qui peut comprendre facultativement, par exemple, une pompe,
- (iv) un moyen de calcul pour calculer le volume d'agent à introduire dans la chambre, le volume d'agent dépendant à la fois du volume et de la concentration en cellules de la population cellulaire,
- (v) un moyen de transfert supplémentaire pour transférer un volume (tel qu'un volume calculé) d'agent à la chambre, moyen de transfert supplémentaire qui peut comprendre facultativement, par exemple, une seringue commandée par un moteur, par exemple un moteur pas à pas,
- (vi) un moyen de régulation de concentration de dioxyde de carbone (faisant partie, par exemple, du moyen d'incubation) pour réguler la concentration du dioxyde de carbone dans la chambre,
- (vii) un moyen de régulation de température (faisant partie, par exemple, du moyen d'incubation) pour réguler la température dans la chambre,
- (viii) un moyen de mélange (faisant partie, par exemple, du moyen d'incubation) pour mélanger la population cellulaire et l'agent dans la chambre,
- (ix) un moyen de chronométrage (faisant partie, par exemple, du moyen d'incubation) pour établir le temps d'incubation et/ou facultativement, un moyen d'affichage pour afficher à l'utilisateur la période de temps restante et/ou un moyen d'alarme pour alerter l'utilisateur de l'achèvement de la période d'incubation,
- (x) un moyen collecteur pour recueillir les cellules présentes dans la chambre, en particulier pour recueillir les cellules indifférenciées présentes dans la chambre,
- (xi) un moyen d'évacuation pour évacuer une population de cellules, comprenant les cellules indifférenciées, de la chambre et les introduire dans un récipient de stockage; le moyen d'évacuation pouvant comprendre par exemple une pompe, et
- (xii) un moyen d'obturation hermétique pour obturer hermétiquement un récipient de stockage comprenant une population de cellules comprenant les cellules indifférenciées.

[0041] De manière convenable, dans un dispositif de la présente invention, le moyen de transfert (iii) peut transférer une quantité (telle qu'une quantité prédéterminée) d'une population cellulaire directement d'un patient à ladite chambre (c'est-à-dire sans la nécessité du récipient de stockage) et/ou le moyen d'évacuation (xi) peut évacuer une population de cellules, comprenant des cellules indifférenciées, de la chambre et l'introduire directement dans un patient (c'est-à-dire sans la nécessité du récipient de stockage).

[0042] De manière convenable, le moyen de transfert (iii) peut comprendre une pompe péristaltique, pompe qui transfère une population cellulaire d'un récipient de stockage par un moyen d'interconnexion, par exemple une tubulure, à la chambre. De préférence, le moyen d'interconnexion passe à travers un compteur Coulter ou un autre cytomètre convenable (de la manière indiquée en (ii)). De cette manière, la concentration en cellules de la population cellulaire peut être calculée au cours du transfert de la population cellulaire du récipient de stockage à la chambre.

[0043] De préférence, le ou les récipients de stockage mentionnés en (iii) et (xi) ci-dessus sont des poches de stockage, qui sont avantageusement jetables. Il est préférable que le récipient de stockage de (iii) soit différent du récipient de stockage de (xi), le premier étant un récipient de stockage d'entrée et le dernier étant un récipient de stockage de sortie.

[0044] De préférence, le moyen de transfert supplémentaire (v) comprend un réservoir d'agent afin de garantir qu'une quantité d'agent suffisante soit disponible à n'importe quel moment. Lorsque le moyen de transfert consiste en une seringue, le réservoir peut être muni d'une seringue supplémentaire, de telle sorte que, lorsqu'une seringue devient vide, l'autre seringue commence à fournir l'agent.

[0045] De préférence, le moyen de régulation de concentration de dioxyde de carbone destiné à réguler la concentration de dioxyde de carbone dans la chambre comprend une valve, qui permet l'introduction d'une quantité prédéterminée de dioxyde de carbone à partir d'une bouteille de gaz. La quantité prédéterminée de dioxyde de carbone est calculée en utilisant le volume connu d'air dans la chambre, la tubulure et le récipient de stockage de sortie et le volume mesuré de la population cellulaire provenant du récipient de stockage d'entrée. De manière convenable, le dioxyde de carbone est introduit dans la chambre par un orifice qui est le même que celui servant à ajouter l'agent; de cette manière, le dioxyde de carbone peut être utilisé pour purger la totalité de l'agent restant dans l'orifice et le dispositif environnant. Outre ce qui précède, le moyen de régulation de concentration de dioxyde de carbone peut comprendre en outre une poche d'air gonflable destinée à recevoir le volume supplémentaire d'air résultant de l'introduction d'une quantité supplémentaire de dioxyde de carbone dans le système. En variante, le récipient de stockage d'entrée, une fois vide, peut jouer le rôle de poche d'air. De préférence, du dioxyde de carbone est introduit pour produire une concentration finale de 5% dans la chambre.

[0046] Le moyen de régulation de température (vii) peut comprendre convenablement un moyen de chauffage, moyen de chauffage qui peut être muni d'une plaque chauffante placée par exemple au-dessous de la chambre. En variante, le moyen de chauffage peut être muni d'une chemise de circulation d'eau chauffée située en position adjacente à la chambre ou à une partie de cette chambre. Il est nettement préféré que la température dans la chambre soit régulée dans l'intervalle d'environ 25°C à environ 37°C.

[0047] Le moyen de mélange (viii) comprend de préférence au moins une branche de pale, qui tourne lentement afin de mélanger la population cellulaire et l'agent dans la chambre. En variante, il est possible d'utiliser un agitateur magnétique. A titre de variante supplémentaire, la chambre peut être agitée mécaniquement, par exemple par agitation douce par secousses. Un avantage de l'utilisation d'un moyen de mélange comprenant au moins une branche de pale consiste en le fait que la branche peut être également conçue pour jouer le rôle de racleur au cours de la collecte des cellules, c'est-à-dire de telle sorte que, lorsque la branche tourne lentement, les cellules fixées à la surface de la chambre soient délogées doucement. De manière avantageuse, le moyen de mélange peut fonctionner pour effectuer un mouvement giratoire.

[0048] De préférence, le moyen d'évacuation (xi) comprend une pompe péristaltique. Avantageusement, le moyen d'évacuation aspire la population cellulaire, comprenant les cellules indifférenciées, à travers un orifice de sortie au fond de la chambre et dans le récipient de stockage de sortie par un moyen d'interconnexion tel que, par exemple, une tubulure.

[0049] En remplacement ou en plus du moyen d'évacuation, un agent séquestrant et/ou chélatant les ions libres, par exemple un anticoagulant tel que l'EDTA, peut être introduit dans la chambre avant l'évacuation d'une population de cellules hors de cette chambre. L'introduction d'un tel agent séquestrant et/ou chélatant les ions dans la chambre provoque la dissociation des colonies de cellules souches en une suspension de cellules isolées et facilite donc l'évacuation des cellules de la chambre par un moyen de balayage.

[0050] Le moyen d'obturation hermétique (xii) comprend de préférence un dispositif de thermosoudage, dispositif de thermosoudage qui ferme le récipient de stockage de sortie en pressant ensemble deux parties du récipient ou deux parties du moyen d'interconnexion immédiatement avant le récipient jusqu'à ce qu'il existe un joint étanche complet. Par exemple, le dispositif de thermosoudage peut avoir pour résultat un joint étanche ayant une largeur d'environ 2 cm, le dispositif de thermosoudage coupant ensuite le joint étanche le long d'une partie centrale de ce joint étanche.

[0051] De préférence, chaque partie du dispositif conforme à la présente invention peut être commandée indépendamment par un système informatique central. De manière avantageuse, le système informatique est capable de recevoir des signaux d'entrée provenant d'une partie du dispositif, d'effectuer des calculs sur la base de ces signaux d'entrée et d'envoyer des signaux de sortie à la même partie ou une autre partie du dispositif.

[0052] Le dispositif de la présente invention a plusieurs avantages; en particulier, le dispositif garantit l'obtention d'un résultat constant chaque fois que le mode opératoire est mis en œuvre et qu'aucune déperdition d'agent intéressant n'a lieu. En outre, le dispositif peut être programmé pour alerter l'utilisateur lorsque la rétrodifférenciation a été achevée et/ou pour afficher le temps restant avant l'achèvement. S'il est programmé de cette manière, le dispositif peut inciter l'utilisateur à acquérir une quantité d'agent nouvelle. Cela signifie que le dispositif peut contrôler l'utilisation de l'agent et la quantité stockée et, ainsi, peut alerter l'utilisateur lorsque la quantité d'agent stockée diminue au-dessous d'une valeur critique.

[0053] Le dispositif de la présente invention peut comprendre en outre une pluralité de chambres, chacune destinée à produire une cellule indifférenciée engagée à former des lignées cellulaires différentes, par exemple de cellules musculaires, capillaires, neuronales, etc. Ainsi, la production simultanée de cellules indifférenciées engagées à la formation de lignées cellulaires différentes peut être réalisée. De préférence, lorsqu'une pluralité de chambres est utilisée, chaque chambre comporte un orifice de sortie distinct et un récipient de stockage de sortie distinct. La lignée cellulaire peut être commandée dans le dispositif de la présente invention en utilisant des matières plastiques traitées différemment pour la ou les chambres ou en introduisant des agents chimiques différents dans chaque chambre.

[0054] De préférence, un ou plusieurs des constituants du dispositif sont jetables. Par exemple, un ou plusieurs des constituants suivants peuvent être jetables: la chambre, le récipient de stockage d'entrée, le récipient de stockage de sortie, le moyen d'interconnexion assurant la connexion entre le récipient de stockage et la chambre, et le moyen de transfert supplémentaire (v). De manière convenable, les constituants jetables peuvent être fournis sous forme d'une cartouche destinée à l'insertion dans le dispositif. A titre d'exemple seulement, une cartouche peut comprendre une première poche de sang (récipient de stockage d'entrée), une chambre et une seconde poche de sang (de sortie), la chambre étant connectée à chacune des première et seconde poches de sang par une tubulure (un moyen d'interconnexion). De manière convenable, il est possible de considérer que le dispositif est un système consistant en une partie instrumentale et une partie jetable.

[0055] De préférence, la chambre et/ou les autres constituants du dispositif en contact avec la population cellulaire sont formulés à partir d'une matière USP de catégorie VI, de plaques de polycarbonate ou d'autres matières plastiques incapables d'engendrer d'autres formes de transformants de cellules.

[0056] De préférence, la population cellulaire comprenant des cellules engagées est le sang. De préférence, l'agent est un anticorps.

[0057] Dans un aspect supplémentaire, la présente invention propose un procédé pour la préparation d'une cellule indifférenciée, procédé comprenant la rétrodifférenciation d'une cellule plus engagée en une cellule indifférenciée, dans lequel la rétrodifférenciation de la cellule plus engagée donne une cellule plus engagée, dans ou à partir d'un échantillon de couche leucocytaire sanguine.

[0058] Dans un aspect supplémentaire, la présente invention propose un procédé pour la préparation d'une cellule indifférenciée, procédé comprenant la mise en contact d'une cellule plus engagée dans un, ou provenant d'un, échantillon de couche leucocytaire sanguine avec un agent qui provoque la rétrodifférenciation de la cellule plus engagée en une cellule indifférenciée.

[0059] Dans une forme préférée de réalisation de la présente invention, la cellule plus engagée n'est pas une cellule cancéreuse. Dans une autre forme préférée de réalisation de la présente invention, l'agent n'est ni cancérogène ni capable de favoriser une croissance cancéreuse.

[0060] De préférence, les cellules engagées sont des cellules différenciées. De préférence, les cellules engagées sont des cellules hématopoïétiques engagées, telles que des cellules choisies entre des cellules CFC-T, des cellules CFC-B, des cellules CFC-eosin., des cellules CFC-Bas., des cellules CFC-GM, des cellules CFC-MEG, des cellules BFC-E, des cellules CFC-E, des lymphocytes T et des lymphocytes B, de préférence des lymphocytes B.

[0061] De préférence, les cellules indifférenciées sont des cellules indifférenciées choisies entre des cellules souches pluripotentes, des cellules souches hématopoïétiques, des cellules souches neuronales, des cellules souches épithéliales, des cellules souches mésenchymateuses et des cellules souches embryonnaires. De préférence, les cellules indifférenciées sont caractérisées par une ou plusieurs des désignations de marqueurs de surface cellulaire suivantes: CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻, CD117, AC133, CD90 et/ou CD45low. Plus avantageusement, les cellules indifférenciées sont des cellules CD34⁺ et CD38⁻, mieux encore CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁻ et CD45low.

[0062] De manière convenable, les cellules indifférenciées sont des cellules de CMH de catégorie I⁺ et/ou de catégorie II⁺.

[0063] De préférence, l'agent enrôle un récepteur qui assure la médiation de la capture, de la reconnaissance ou de la présentation d'un antigène à la surface des cellules engagées. Plus avantageusement, le récepteur est un antigène de CMH de catégorie I ou un antigène de CMH de catégorie II, tel qu'un antigène de catégorie I choisi entre le récepteur A associé aux leucocytes humains (HLA), un récepteur HLA-B, un récepteur HLA-C, un récepteur HLA-E, un récepteur HLA-F et un récepteur HLA-G, ou un antigène de catégorie II choisi entre un récepteur HLA-DM, un récepteur HLA-DP, un récepteur HLA-DQ et un récepteur HLA-DR.

[0064] De manière convenable, le récepteur peut comprendre une chaîne β comprenant des régions homologues. Dans une forme de réalisation, le récepteur peut comprendre au moins les régions homologues de la chaîne β de HLA-DR.

[0065] Dans une forme de réalisation préférée, l'agent est un anticorps contre le récepteur, tel qu'un anticorps monoclonal contre le récepteur. Des exemples spécifiques comprennent CR3/43 et l'anticorps monoclonal TAL.1B5.

[0066] De manière convenable, l'agent peut moduler l'expression d'un gène de CMH, par exemple l'expression de gènes de CMH de catégorie I⁺ et/ou de catégorie II⁺.

[0067] Dans une autre forme préférée de réalisation de la présente invention, il est proposé un procédé pour augmenter les nombres relatifs de cellules ayant une désignation de marqueur de surface cellulaire CD34⁺ et/ou HLA-DR⁻ et/ou CD38⁻ et/ou CD117 et/ou AC133 et/ou CD90 et/ou CD45low dans un échantillon de couche leucocytaire sanguine, procédé comprenant la mise en contact d'une cellule plus engagée dans un échantillon de couche leucocytaire sanguine avec un agent qui enrôle de manière fonctionnelle lesdites cellules engagées, de telle sorte que le nombre relatif de cellules CD34⁺ et/ou HLA-DR⁻ et/ou CD38⁻ et/ou CD117 et/ou AC133 et/ou CD90 et/ou CD45low augmente, en résultat dudit enrôlement.

[0068] Dans un aspect supplémentaire, la présente invention propose un procédé pour la préparation d'une cellule indifférenciée, procédé comprenant la mise en contact d'une ou plusieurs cellules différenciées dans une population cellulaire

avec un moyen de rétrodifférenciation efficace pour déplacer le taux de cellules différenciées normal dans ladite population, ce qui provoque la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs desdites cellules différenciées en une ou plusieurs cellules indifférenciées.

[0069] Dans un aspect supplémentaire, la présente invention propose l'utilisation de moyens de rétrodifférenciation pour déplacer le taux de cellules différenciées normal dans une population cellulaire afin d'effectuer la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs desdites cellules différenciées en une ou plusieurs cellules indifférenciées.

[0070] Dans un aspect supplémentaire, la présente invention propose un procédé pour la préparation d'une cellule indifférenciée, procédé comprenant la rétrodifférenciation d'une cellule différenciée dans une population cellulaire en une cellule indifférenciée, dans lequel l'environnement comprenant ladite population cellulaire comprenant une ou plusieurs cellules différenciées est transformé, d'un premier environnement en un second environnement, dans lequel la concentration en ions libres dudit second environnement est modifiée efficacement comparativement au premier environnement de manière à provoquer la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs desdites cellules différenciées en une ou plusieurs cellules indifférenciées.

[0071] Dans un aspect supplémentaire, la présente invention propose un procédé pour la préparation d'une cellule indifférenciée, procédé comprenant la mise en contact d'une ou plusieurs cellules différenciées dans une population cellulaire avec un moyen de rétrodifférenciation efficace pour déplacer le taux de cellules différenciées normales, la culture de la population cellulaire dans un premier environnement dépourvu d'ions ou dont les ions sont séquestrés, et la transformation du premier environnement en un second environnement dans lequel la concentration d'ions présente dans le second environnement est modifiée efficacement comparativement audit premier environnement, pour provoquer ainsi la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs des cellules différenciées en une ou plusieurs cellules indifférenciées.

[0072] De préférence, le moyen de rétrodifférenciation consiste en n'importe quel moyen qui provoque la suppression du taux de cellules différenciées normales dans une population cellulaire, qui est appelée ci-après sélection négative, dans la population cellulaire et qui provoque ainsi une rupture de taux de cellules différenciées normales dans une population cellulaire.

[0073] Le moyen de rétrodifférenciation peut consister, par exemple, en un ou plusieurs des suivants: un anticorps (pur ou conjugué (c'est-à-dire lié à des ligands fixes et des ligands libres, par exemple des billes magnétiques, des billes de verre ou des billes de polystyrène); l'Histopaque, le LymphoPrep (Sigma) ou n'importe quel autre milieu à gradient de densité utilisé pour séparer des cellules en fonction de la densité des cellules; ou le dextrane (qui provoque par exemple la sédimentation des globules rouges). D'autres moyens convenables qui provoquent un déplacement cellulaire sont indiqués par Vettese-Dadey (The Scientist, 13 septembre 1999, 13 (18):21).

[0074] De préférence, la concentration en ions libres du second environnement est accrue comparativement à celle du premier environnement.

[0075] Plus avantageusement, la concentration relative en ions libres des premier et second environnements est accrue, ce qui signifie que la concentration en ions libres du second environnement est accrue. De préférence, la concentration relative en ions est augmentée suffisamment pour provoquer la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs des cellules différenciées en une ou plusieurs cellules indifférenciées. A titre d'exemple seulement, le transfert de cellules d'un milieu contenant 5 mM d'EDTA (un agent séquestrant et/ou chélatant les ions libres) à un autre milieu contenant moins d'EDTA ou ne contenant pas d'EDTA provoque une augmentation de la concentration en ions libres (par exemple de la concentration en ions calcium) suffisante pour provoquer une rétrodifférenciation.

[0076] De préférence, l'ion libre est un anion.

[0077] De préférence, l'ion libre est un métal du Groupe I ou du Groupe II.

[0078] De préférence, l'anion est un ion calcium et/ou un ion magnésium.

[0079] De manière convenable, la concentration en ions libres d'un environnement peut être modifiée en traitant l'environnement avec un agent capable de modifier relativement la concentration en ions libres de l'environnement.

[0080] Ainsi, dans une forme de réalisation préférée, la présente invention propose un procédé pour la préparation d'une cellule indifférenciée, procédé comprenant la rétrodifférenciation d'une cellule différenciée dans une population cellulaire en une cellule indifférenciée, dans lequel l'environnement comprenant ladite population cellulaire est modifié en traitant un premier environnement avec un agent capable de modifier relativement la concentration en ions libres de l'environnement pour engendrer un second environnement.

[0081] Par exemple, le premier environnement peut être traité avec un ou plusieurs agents séquestrant les ions libres, agents qui sont ensuite éliminés ou dont la quantité est réduite de manière à engendrer un second environnement ayant une concentration en ions libres relativement accrue, ce qui provoque la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs cellules différenciées présentes dans la population cellulaire. Cela signifie que l'agent séquestrant peut être éliminé ou sa quantité peut être réduite, par exemple en éliminant physiquement/chimiquement l'agent séquestrant ou une partie de cet agent séquestrant du premier environnement ou en transférant la population cellulaire à un second environnement dépourvu d'un tel agent séquestrant les ions libres ou avec un agent séquestrant les ions libres à une plus faible concentration que dans le premier environnement.

[0082] Dans tous les cas, le second environnement a une concentration accrue en ions libres comparativement au premier environnement, ce qui provoque la rétrodifférenciation de la ou des cellules plus différenciées présentes dans la population cellulaire.

[0083] En variante, la population cellulaire peut être cultivée dans le premier environnement comprenant une concentration faible ou nulle d'ions libres, avec ensuite le transfert de la population cellulaire au premier environnement ou bien l'ajustement de ce premier environnement de telle sorte qu'il se transforme en un second environnement comprenant des ions ou comprenant des ions à une plus forte concentration que dans le premier environnement, ce qui provoque la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs cellules différenciées dans la population cellulaire. Le terme «faible» utilisé dans le présent mémoire désigne un environnement ayant une concentration de départ en ions libres relativement faible par rapport à la concentration finale du second environnement.

[0084] Ainsi, dans une forme de réalisation préférée, la présente invention propose également un procédé pour la préparation d'une cellule indifférenciée, procédé comprenant la rétrodifférenciation d'une cellule différenciée dans une population cellulaire en une cellule indifférenciée, dans lequel l'environnement comprenant ladite population cellulaire comprenant une ou plusieurs cellules différenciées est transformé, d'un premier environnement ayant une concentration faible ou nulle en ions calcium ou magnésium libres en un second environnement comprenant des ions calcium ou magnésium libres ou comprenant des ions calcium ou magnésium libres à une plus forte concentration que le premier environnement, ce qui provoque la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs cellules différenciées dans la population cellulaire.

[0085] Sans souhaiter être lié à une théorie, il est considéré que des modifications de la concentration en ions, en particulier des augmentations de la concentration en ions, provoquent l'agrégation de la population cellulaire en colonies (ces cellules subissant par exemple une agrégation homotypique) et que le contact physique entre ces cellules peut induire leur rétrodifférenciation.

[0086] De préférence, l'agent séquestrant est un agent chélatant les ions.

[0087] De préférence, l'agent séquestrant comprend à la fois un groupe aminé et un groupe acide carboxylique.

[0088] De préférence, l'agent séquestrant comprend une pluralité de groupes -N (CH₂CO₂H)_n, dans lesquels n est égal à 1 ou 2.

[0089] De manière convenable, l'agent séquestrant peut consister en un ou plusieurs des agents suivants: EDTA, héparine, EGTA, DTPA, citrate trisodique et d'autres agents chélatants similaires et/ou des anticoagulants.

[0090] De manière convenable, l'agent séquestrant doit être ajouté à une concentration suffisamment forte pour que son élimination provoque une rétrodifférenciation. Habituellement, la concentration d'agent séquestrant suffisante pour provoquer la rétrodifférenciation lorsque sa présence est supprimée, est supérieure ou égale à environ 2 mM.

[0091] Dans une forme préférée de réalisation de la présente invention, la cellule plus engagée n'est pas une cellule cancéreuse. Dans une autre forme préférée de réalisation de la présente invention, l'agent n'est ni cancérogène ni capable de favoriser une croissance cancéreuse.

[0092] De préférence, les cellules engagées sont des cellules différenciées. De préférence, les cellules engagées sont des cellules hématopoïétiques engagées, telles que des cellules choisies entre des cellules CFC-T, des cellules CFC-B, des cellules CFC-eosin., des cellules CFC-Bas., des cellules CFC-GM, des cellules CFC-MEG, des cellules BFC-E, des cellules CFC-E, des lymphocytes T et des lymphocytes B, de préférence des lymphocytes B.

[0093] De préférence, les cellules indifférenciées sont des cellules indifférenciées choisies entre des cellules souches pluripotentes, des cellules souches hématopoïétiques, des cellules souches neuronales, des cellules souches épithéliales, des cellules souches mésenchymateuses et des cellules souches embryonnaires. De préférence, les cellules indifférenciées sont caractérisées par une ou plusieurs des désignations de marqueurs de surface cellulaire suivantes: CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻, CD117, AC133, CD90 et/ou CD45low. Plus avantageusement, la cellule indifférenciée est une cellule CD34⁺ et CD38⁻, mieux encore CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁻ et CD45low.

[0094] Ainsi, dans une autre forme de réalisation préférée, la présente invention propose également un procédé pour la préparation d'une cellule indifférenciée, procédé comprenant la rétrodifférenciation d'une cellule hématopoïétique différenciée dans une population cellulaire en une cellule indifférenciée, dans lequel l'environnement comprenant ladite population cellulaire comprenant une ou plusieurs cellules hématopoïétiques différenciées est transformé, d'un premier environnement en un second environnement dans lequel la concentration en ions libres dudit second environnement est modifiée efficacement comparativement au premier environnement pour provoquer la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs desdites cellules hématopoïétiques différenciées en une ou plusieurs cellules indifférenciées.

[0095] De manière convenable, les cellules indifférenciées sont des cellules du CMH de catégorie I⁺ et/ou de catégorie II⁺.

[0096] Dans une forme de réalisation, la population cellulaire comprenant des cellules engagées est un échantillon de couche leucocytaire sanguine ou est issue d'un échantillon de couche leucocytaire sanguine.

[0097] Avantageusement, un procédé conforme à la présente invention peut être utilisé pour cultiver efficacement des cellules souches érythroïdes pour la production d'érythrocytes, érythrocytes qui peuvent être utilisés par exemple pour

renouveler les stocks en cas de pénurie. De manière convenable, un procédé conforme à la présente invention peut être utilisé pour produire des mégacaryocytes destinés à être utilisés dans la production de plaquettes.

[0098] Afin que la présente invention puisse être nettement comprise et aisément mise en pratique, il est fait à présent référence, à titre d'exemple, aux dessins annexés.

- La fig. 1 représente une vue en perspective d'un dispositif conforme à la présente invention avec son panneau antérieur ouvert, conjointement avec un encart représentant une coupe du dispositif séparé de son environnement;
- la fig. 2 représente une vue en perspective du dispositif de la fig. 1, avec le panneau antérieur fermé;
- la fig. 3 représente une photographie de cellules sanguines;
- la fig. 4 représente un diagramme de la différenciation de LSC pour former des lymphocytes T et des lymphocytes B;
- la fig. 5 représente un diagramme de la différenciation de MSC pour former des cellules éosinophiles, des cellules basophiles, des cellules neutrophiles, des mégacaryocytes, des monocytes, des érythrocytes, des granulocytes, des mastocytes, des cellules NK et des lymphocytes;
- la fig. 6 représente des cellules souches lymphohématopoïétiques;
- la fig. 7 représente l'aspect de cellules CD45⁺CD14⁻ après traitement avec des anticorps CR3/43;
- la fig. 8 représente une microphotographie de lymphocytes B différenciés;
- la fig. 9 représente une microphotographie de cellules indifférenciées formées par rétrodifférenciation de lymphocytes B;
- la fig. 10 représente une microphotographie de cellules indifférenciées identiques à celles de la fig. 9, mais à un plus faible grossissement;
- la fig. 11 représente une microphotographie de lymphocytes B différenciés;
- la fig. 12 représente une microphotographie de cellules indifférenciées formées par la rétrodifférenciation de lymphocytes B;
- la fig. 13 représente une microphotographie de la formation de granulocytes différenciés à partir de cellules indifférenciées identiques à celles de la fig. 12;
- la fig. 14 représente, à deux grossissements différents, des microphotographies d'un échantillon de sang non traité provenant d'un patient souffrant de BCLL;
- la fig. 15 représente des microphotographies d'un échantillon de sang traité;
- les fig. 16 et 17 représentent des microphotographies au cours du temps, pendant le traitement d'échantillons de sang;
- la fig. 18 représente un transfert d'empreinte par la méthode de Southern;
- la fig. 19 représente d'autres transferts d'empreintes par la méthode de Southern obtenus en utilisant des cellules du sang périphérique provenant de patients souffrant de B-CLL;
- la fig. 20 représente l'utilisation de trois agents pour augmenter le nombre relatif de cellules CD34⁺ dans une population cellulaire;
- la fig. 21 représente une analyse de colonies de cellules souches au moyen d'un microscope inversé à fond clair;
- la fig. 22 représente une couche de cellules adhérentes lors de son examen au moyen d'un microscope inversé à fond clair; et
- la fig. 23 représente deux images fixes provenant d'une caméra vidéo en accéléré au cours du traitement de lymphocytes B avec l'anticorps monoclonal (Acm) CR3/43.

Description détaillée de l'invention

I. Dispositif

[0099] Le dispositif est représenté de manière générale par le numéro de référence 1 et comprend un boîtier 2 comportant un panneau antérieur 3, panneau 3 qui peut être ouvert pour permettre l'accès à l'intérieur du dispositif 1. Un récipient de stockage d'entrée, à savoir une poche de sang 4, est suspendu à un crochet de support 5. Le crochet de support 5 forme une partie d'une balance électronique (non représentée), qui peut être actionnée pour peser la poche de sang d'entrée 4.

[0100] Le dispositif comprend en outre une chambre 6, chambre 6 qui est interconnectée à la poche de sang d'entrée 4 par une tubulure 7. La tubulure 7 comprend une fenêtre transparente 8, fenêtre qui est positionnée à l'intérieur d'une cuve à circulation 9 d'un compteur Coulter. Une pompe péristaltique (non représentée) est actionnée pour aspirer le sang de la poche de sang d'entrée 4 à travers la cuve à circulation 9 du compteur Coulter et dans la chambre 6.

[0101] Des seringues 10 et 11 contiennent un antigène et chacune est commandée par un moteur pas à pas (non représenté). Les seringues 10, 11 sont maintenues de manière permanente à 4°C dans un «réfrigérateur» Peltier 12 isolé verrouillable. Deux seringues 10, 11 sont présentes afin de garantir que le dispositif ait toujours un apport d'anticorps suffisant. La stérilité des seringues 10, 11 est maintenue à la fois par des antibiotiques et des filtres jetables de 0,2 µm (désignés de manière générale par le numéro de référence 13).

[0102] Le dispositif comprend en outre un orifice d'admission de dioxyde de carbone 14, qui dirige le dioxyde de carbone d'une bouteille de gaz (non représentée) dans la chambre 6 par la tubulure 15. Les seringues 10, 11 sont également en communication de fluide avec la chambre 6 par la tubulure 15. Une valve 16 commande le passage du dioxyde de carbone et de l'antigène à travers la tubulure 15. Un moyen de chauffage (non représenté) est présent au-dessous de la chambre 6. Dans la chambre 6 se trouve une pale rotative 17, qui peut fonctionner pour mélanger l'anticorps et le sang dans la chambre 6. Un dispositif de chronométrage (non représenté) contrôle une période d'incubation pendant laquelle l'anticorps et le sang restent à l'intérieur de la chambre 6. Le temps restant pour l'incubation peut être affiché sur l'écran d'affichage de panneau de contrôle 18.

[0103] Un récipient de stockage de sortie, à savoir une poche de sang de sortie 19, est également suspendu dans le dispositif 1 et est interconnecté avec la chambre 6 par la tubulure 20. La tubulure 20 passe à travers un dispositif de thermosoudage 21, qui peut fonctionner pour obturer hermétiquement le tube 20, et ainsi, la poche de sang de sortie 19. Une pompe péristaltique supplémentaire (non représentée) est présente pour pomper le contenu de la chambre 6 dans la poche de sang de sortie 19.

[0104] La chambre 6 conjointement avec la tubulure 7, 20 et la poche de sang de sortie 19 sont des articles jetables, qui sont jetés après chaque opération.

[0105] Lors du fonctionnement, l'utilisateur insère dans le dispositif 1 une poche de sang d'entrée 19, une chambre 6 et une tubulure 7, 20. La tubulure 20 est passée à travers le dispositif de thermosoudage 21 et la pompe péristaltique. La tubulure 7 est passée à travers l'autre pompe péristaltique et la cuve à circulation de compteur Coulter 9. L'utilisateur insère également la poche de sang 4 contenant le sang d'un patient et la fixe à la tubulure 7. Outre ce qui précède, l'utilisateur fixe la tubulure 15 de la chambre 6 au filtre stérile 13. L'utilisateur ferme alors le panneau antérieur 3 du boîtier 2 et déclenche le dispositif 1 au moyen des touches de clavier numérique 22 du dispositif.

[0106] Le dispositif 1 pèse automatiquement la poche de sang d'entrée 4. Le poids de la poche de sang d'entrée 4 est envoyé automatiquement à un système informatique central (non représenté) situé à l'intérieur du dispositif 1. D'après le poids de la poche de sang d'entrée 4, le système informatique peut déterminer le volume de sang dans la poche 4. La pompe péristaltique aspire alors le sang de la poche de sang d'entrée 4 à travers la tubulure 7. Le sang s'écoule à travers la fenêtre transparente 8 de la tubulure 7 et le compteur Coulter 9 détermine la concentration de cellules passant à travers la tubulure 7. Le compteur Coulter envoie un signal directement au système informatique central. Le système informatique central détermine d'après le volume calculé de sang et la concentration cellulaire, le volume correct d'anticorps qui doit être introduit à la seringue dans la chambre 6 par une ou plusieurs des seringues 10, 11. La pompe péristaltique continue à pomper le sang de la poche 4 jusqu'à ce qu'un signal soit reçu en provenance du système informatique central, qui interrompt le fonctionnement de la pompe. Le signal provenant du système informatique central est envoyé en réponse à un signal provenant du compteur Coulter 9 au système informatique central, signal qui est envoyé lorsque le compteur Coulter 9 détermine qu'aucune cellule supplémentaire ne passe devant la fenêtre 8.

[0107] Le système informatique central envoie alors un signal au moteur pas à pas (non représenté) fixé aux seringues 10, 11 pour comprimer une ou plusieurs des seringues 10, 11 afin de délivrer le volume calculé d'anticorps dans la chambre 6 par la tubulure 15.

[0108] Puis le dispositif, facultativement, introduit du dioxyde de carbone par l'orifice d'admission de dioxyde de carbone 14 en ouvrant la valve 16 (le mécanisme d'ouverture et de fermeture de la valve 16 pouvant être commandé par le système informatique central). La quantité de dioxyde de carbone à ajouter est calculée par le système informatique central sur la base du volume connu d'air dans la chambre 6, de la tubulure 7, 20 et de la poche de sang de sortie 19 et le volume calculé de sang provenant de la poche de sang d'entrée. La concentration finale de dioxyde de carbone dans la chambre 6 est portée à environ 5%. Le dioxyde de carbone est introduit dans la chambre 6 par la tubulure 15. Le dioxyde de carbone

chasse ainsi toute quantité d'anticorps restante dans la tubulure 15, ce qui garantit l'introduction de la totalité de l'anticorps libéré dans la chambre 6. La poche de sang d'entrée 4, une fois vide, joue le rôle de poche d'air pour recevoir le volume de gaz supplémentaire après l'introduction du dioxyde de carbone.

[0109] Le dispositif peut comprendre en outre un élément chauffant (non représenté), sous le contrôle du système informatique central, élément chauffant qui est situé au-dessous de la chambre 6 et qui régule la température dans la chambre 6 dans l'intervalle de 25 à 37°C. Un thermostat connecté à l'élément chauffant empêche une surchauffe ou un chauffage insuffisant.

[0110] Le sang et l'anticorps sont ensuite mis en incubation dans la chambre 6 pendant une période de temps prédéterminée. De manière convenable, l'appareil d'incubation ne dépasse pas 24 heures et est compris de préférence dans l'intervalle de 4 à 8 heures. Le temps choisi doit être suffisant pour permettre à la réaction de rétrodifférenciation de s'effectuer.

[0111] Au cours de l'incubation, les branches de pale 17 tournent lentement pour effectuer le mélange de l'anticorps et du sang.

[0112] Une fois la période d'incubation écoulée, les branches de pale 17 continuent à tourner et jouent efficacement le rôle de branches de racleur pour déloger toutes les cellules fixées à la surface de la chambre 6 et faciliter ainsi la collecte des cellules. La pompe péristaltique aspire le contenu de la chambre 6 (c'est-à-dire le sang contenant les cellules indifférenciées, c'est-à-dire les cellules souches) par la partie inférieure de la chambre 6 et dans la poche de sang de sortie 19. La pompe continue le pompage jusqu'à ce qu'un volume mesuré de sang (de la manière déterminée par l'utilisation d'une pompe péristaltique étalonnée) ait pénétré dans la poche de sang de sortie 19.

[0113] Finalement, le dispositif de thermosoudage 21 pince la tubulure 20 et provoque l'obturation hermétique d'une longueur d'environ 2 cm de la tubulure 20, l'appareil de thermosoudage 21 coupe ensuite la tubulure 20 approximativement dans la région centrale de la jonction étanche.

[0114] Le dispositif 1 peut ensuite indiquer à l'utilisateur que la mise en œuvre du procédé est achevée.

[0115] L'utilisateur peut ensuite enlever la poche de sang de sortie 19. La chambre 6 conjointement avec la tubulure 7, 20 et la poche de sang d'entrée 4 peuvent être jetées.

[0116] La poche de sang de sortie/9 peut, si besoin, être transférée à un système de purification, par exemple à un système pour identifier des cellules portant des marqueurs de surface cellulaire caractéristiques des cellules indifférenciées, bien que des variations morphologiques puissent également être utilisées comme guide. Le système de purification peut être utilisé pour éliminer un anticorps et/ou enrichir facultativement les cellules indifférenciées (cellules souches). Un système de purification convenable est le système de purification CliniMACs/Isolex.

II. Cellules indifférenciées et cellules différenciées

[0117] Il existe de nombreuses cellules indifférenciées et cellules différenciées présentes in vivo et il existe dans le domaine technique général de nombreux enseignements généraux les concernant.

[0118] A titre d'exemple, en ce qui concerne des cellules des lignées de cellules hématopoïétiques, il est possible de se référer, entre autres, à Levitt et Mertelsman 1995 (Haematopoietic Stem Cells, publié par Marcel Dekker Inc – notamment les pages 45–59) et Roitt et al. (Immunology, 4^e édition, Eds. Roitt, Brostoff and Maie 1996, Publ. Mosby – notamment le chapitre 10).

[0119] Une cellule indifférenciée est une cellule immature qui ne présente pas une caractéristique différenciée mature mais qui est capable de donner une descendance présentant une telle caractéristique. Un exemple bien connu d'une cellule indifférenciée est une cellule souche.

[0120] Les cellules souches sont des cellules immatures indifférenciées, aptes à l'autorenouvellement (division sans limite) et à la différenciation (spécialisation). Ces cellules juvéniles sont abondantes dans un embryon en développement; cependant, leur nombre diminue lorsque le développement progresse. A l'opposé, un organisme adulte contient un nombre limité de cellules souches qui sont confinées à certains compartiments de l'organisme.

[0121] Il est considéré généralement que les cellules souches sont monopotentes, bipotentes ou pluripotentes. Les cellules souches monopotentes et bipotentes sont plus limitées en ce qui concerne le développement et donnent, respectivement, un ou deux types de cellules spécialisées. A l'opposé, les cellules souches pluripotentes (PSC) peuvent se différencier en de nombreux types de cellules différents, en donnant un tissu (qui constitue des organes) ou, dans le cas de cellules souches totipotentes, l'organisme entier.

[0122] Les cellules souches pluripotentes, à l'opposé des cellules souches monopotentes ou bipotentes, sont aptes à la différenciation en lignées multiples, en donnant un tissu qui consiste en un ensemble de cellules de types différents ou lignées différentes.

[0123] La cellule souche hématopoïétique est un exemple de cellules souches pluripotentes qui est présent parmi les cellules de la moelle osseuse et qui engendre tous les différents types de cellules sanguines (y compris les leucocytes et érythrocytes).

[0124] Le sang est un tissu fluide, consistant en lymphocytes (Ly), monocytes (Mo), cellules neutrophiles (Ne), cellules basophiles (Ba), cellules éosinophiles (Eso), plaquettes (Pl) et globules rouges (Rbc) – voir la fig. 3. Ce tissu spécialisé est produit par la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Hsc). En général, les globules blancs (à l'intérieur du plus grand cercle) combattent les infections, tandis que les globules rouges (à l'intérieur du cercle plus petit) transportent les substances nutritives, l'oxygène et les produits résiduels dans l'organisme.

[0125] Auparavant, les cellules souches hématopoïétiques ont été extraites par isolement à partir (i) de moelle osseuse, (ii) de sang périphérique mobilisé avec un facteur de croissance ou (iii) de sang de cordon (placenta). Récemment, des cellules souches hématopoïétiques ont été préparées à partir de cellules souches embryonnaires (ES) qui sont extraites d'embryons obtenus en utilisant des techniques de fécondation in vitro. Ces cellules indifférenciées sont aptes à la différenciation en lignées multiples et la reconstitution de la totalité des tissus d'un organisme, c'est-à-dire sont totipotentes.

[0126] Les procédés d'extraction précités sont laborieux, parfois dangereux et, dans certains cas, peuvent être considérés comme étant non conformes à l'éthique, notamment dans le cas du procédé d'extraction de cellules souches embryonnaires.

[0127] Il existe un certain nombre de cellules souches indifférenciées de la lignée hématopoïétique. Ces cellules comprennent des cellules souches pluripotentes (PSC), des cellules souches lymphoïdes (LSC) et des cellules souches myéloïdes (MSC), connues collectivement sous le nom de cellules souches lymphohématopoïétiques (LPC). Les LSC et MSC sont chacune formée par la différenciation de PSC. En conséquence, les LSC et MSC sont plus engagées que les PSC.

[0128] Des exemples de cellules différenciées de la lignée hématopoïétique comprennent les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules éosinophiles, les cellules basophiles, les cellules neutrophiles, les mégacaryocytes, les monocytes, les érythrocytes, les granulocytes, des mastocytes et les lymphocytes.

[0129] Les lymphocytes T et les lymphocytes B sont formés par la différenciation des LSC. En conséquence, les lymphocytes T et les lymphocytes B sont plus engagés que les LSC. De manière plus détaillée, la chaîne de différenciation est la suivante: LSC → pro-lymphocyte B ou prothymocyte. Prolymphocyte B → pré-lymphocyte B → lymphocyte B mature → cellule plasmotique. Prothymocyte → thymocyte → commun → thymocyte mature (lignées d'auxiliaires/inducteurs ou de cytotoxiques/suppresseurs) – voir la fig. 4.

[0130] Les cellules éosinophiles, les cellules basophiles, les cellules neutrophiles, les mégacaryocytes, les monocytes, les érythrocytes, les granulocytes, les mastocytes, les cellules NK et les lymphocytes sont formés par différenciation des MSC. Par conséquent, chacune de ces cellules est plus engagée que les MSC. De manière plus détaillée, la chaîne de différenciation est la suivante: MSC → mégacaryoblaste immature (→ mégacaryoblaste → mégacaryocyte → plaquette) ou proéthroblast (→ érythroblast → réticulocyte → érythrocyte) ou cellule souche myélomonocytaire, une cellule souche bipotente qui se différencie en un myéloblaste (→ promyélocyte → myélocyte → granulocyte) ou un monoblaste (→ promonocyte → monocyte → macrophage) – voir la fig. 5.

[0131] Les voies de différenciation de l'hématopoïèse ont été ainsi caractérisées de manière approfondie et les divers stades cellulaires sont aisément identifiables en fonction de la morphologie et de marqueurs de surface cellulaires spécifiques des lignées (voir ci-dessous).

[0132] D'autres cellules souches comprennent des cellules souches neurales, des cellules souches pluripotentes qui peuvent engendrer les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes (Nakafuku et Nakamura, 1995, J. Neurosci Res., vol 41(2) : 153–68; Anderson, 1994, FASEB J., vol 8(10) : 707–13; Morshead et al., 1994, Neuron, vol 13 (5) : 1071–82). Les cellules satellites des muscles squelettiques constituent un autre type de cellules souches, plus précisément une catégorie distincte de cellules myogènes qui sont maintenues sous la forme de cellules souches quiescentes chez l'adulte et qui peuvent engendrer des cellules musculaires nouvelles lorsque cela est requis (Bischoff, 1986, Dev Biol., vol 115 (1) : 129–39). D'autres types de cellules souches sont les cellules souches épithéliales, une sous-catégorie de cellules basales, les cellules souches endodermiques et les cellules souches mésenchymateuses.

[0133] Un type très important de cellules souches est constitué des cellules souches embryonnaires (ES). Ces cellules ont été étudiées et caractérisées de manière approfondie. En effet, les cellules ES sont utilisées couramment dans la production d'animaux transgéniques. Il a été montré que les cellules ES subissent une différenciation in vitro en plusieurs types cellulaires comprenant les précurseurs de cellules lymphoïdes (Potocnik et al., 1994, EMBO J.; vol 13 (22) : 5274–83) et les cellules neurales. Les documents US 5 843 780 et US 6 200 806 décrivent l'isolement de cellules ES de primates. Les cellules ES sont caractérisées par un certain nombre de marqueurs spécifiques de stades tels que des marqueurs embryonnaires spécifiques de stades 3 et 4 (SSEA-3 et SSEA-4), des glycoprotéines de haut poids moléculaire TRA-1-60 et TRA-1-81 et la phosphatase alcaline (Andrews et al., 1984, Hybridoma, vol 3 : 347–361; Kannagi et al., 1983, EMBO J., vol 2 : 2355–2361; Fox et al., 1984, Dev. Biol., vol 103 : 263–266; Ozawa et al., 1985, Cell. Differ., vol 16 : 169–173).

[0134] Divers antigènes sont associés aux cellules indifférenciées et aux cellules différenciées. Le terme «associé» désigne dans ce cas des cellules exprimant ou capables d'exprimer, ou bien présentant ou capables de subir une induction pour présenter, ou comprenant, le ou les antigènes respectifs.

[0135] La plupart des cellules indifférenciées et des cellules différenciées comprennent des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de catégorie I et/ou de catégorie II. Si ces antigènes sont associés à de telles cellules, ces cellules sont alors appelées cellules de catégorie I⁺ et/ou de catégorie II⁺.

[0136] Chaque antigène spécifique associé à une cellule indifférenciée ou une cellule différenciée peut jouer le rôle de marqueur. En conséquence, des types différents de cellules peuvent être différenciés les uns des autres sur la base du ou des antigènes particuliers qui leurs sont associés ou sur la base d'une association particulière d'antigènes associés.

[0137] Des exemples de tels antigènes marqueurs comprennent les antigènes CD34, CD19 et CD3. Si ces antigènes sont présents, alors ces cellules particulières sont appelées, respectivement, cellules CD34⁺, CD19⁺ et CD3⁺. Si ces antigènes ne sont pas présents, alors ces cellules sont appelées, respectivement, CD34⁻, CD19⁻ et CD3⁻.

[0138] De manière plus détaillée, les PSC sont des cellules CD34⁺, DR⁻, TdT⁻ (d'autres marqueurs utiles étant les marqueurs CD38⁻ et CD36⁺). Les LSC sont des cellules DR⁺, CD34⁺ et TdT⁺ (également CD38⁺). Les MSC sont des cellules CD34⁺, DR⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD7⁺ et TdT⁺. Les lymphocytes B sont des cellules CD19⁺, CD21⁺, CD22⁺ et DR⁺. Les lymphocytes T sont des cellules CD2⁺, CD3⁺ et soit CD4⁺, soit CD8⁺. Les lymphocytes immatures sont des cellules CD4⁺ et CD8⁺. Les lymphocytes T activés sont des cellules DR⁺. Les cellules tueuses naturelles (NK) sont des cellules CD56⁺ et CD16⁺. Les lymphocytes T sont des cellules CD7⁺. Les leucocytes sont des cellules CD45⁺. Les granulocytes sont des cellules CD13⁺ et CD33⁺. Les cellules macrophages monocytaires sont des cellules CD14⁺ et DR⁺. Des détails supplémentaires sont présentés sur les fig. 4 et 5.

[0139] Les cellules souches embryonnaires expriment SSEA-3 et SSEA-4, des glycoprotéines de haut poids moléculaire TRA-1-60 et TRA-1-81 et la phosphatase alcaline. En outre, elles n'expriment pas SSEA-1, dont la présence est un indicateur de différenciation. D'autres marqueurs sont connus pour d'autres types de cellules souches, des exemples étant le marqueur Nestin pour les cellules souches neuro-épithéliales (J. Neurosci, 1985, vol 5:3310). Les cellules souches mésenchymateuses sont positives pour SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a et CD124, par exemple, et négatives pour CD34, CD45 et CD14.

[0140] En variante, ou en outre, de nombreuses cellules peuvent être identifiées par leurs caractéristiques morphologiques. L'identification de cellules par microscopie, facultativement avec des techniques de coloration, est une branche extrêmement bien développée de la science appelée histologie et on possède dans ce domaine une grande dextérité. Il est manifeste que la coloration de cellules est seulement effectuée sur des portions aliquotes de cellules pour confirmer l'identité puisque les colorants provoquent en général la mort des cellules.

[0141] En conséquence, en recherchant la présence des marqueurs consistant en les antigènes énumérés ci-dessus, il est possible d'identifier certains types de cellules (par exemple pour déterminer si une cellule est ou non une cellule indifférenciée ou une cellule différenciée) et la spécialisation de ce type cellulaire (par exemple pour déterminer si cette cellule est un lymphocyte T ou un lymphocyte B).

[0142] Les cellules indifférenciées peuvent comprendre n'importe quels constituants qui sont concernés par la présentation, la capture ou la reconnaissance d'antigènes. De préférence, la cellule indifférenciée est une cellule du CMH de catégorie I⁺ et/ou de catégorie II⁺.

[0143] La cellule plus engagée peut comprendre n'importe quels constituants qui sont concernés par la présentation, la capture ou la reconnaissance d'antigènes. De préférence, la cellule plus engagée est une cellule du CMH de catégorie I⁺ et/ou de catégorie II⁺.

[0144] La cellule plus engagée consiste en n'importe quelle cellule dérivée ou pouvant être dérivée d'une cellule indifférenciée. Ainsi, dans une forme de réalisation préférée, la cellule plus engagée est également une cellule indifférenciée. En conséquence, à titre d'exemple, la cellule indifférenciée plus engagée peut être une cellule souche lymphoïde ou une cellule souche myéloïde, et la cellule indifférenciée est une cellule souche pluripotente.

[0145] Dans une autre forme de réalisation préférée, la cellule plus engagée est une cellule différenciée, telle qu'une cellule CFC-T, une cellule CFC-B, une cellule CFC-eosin., une cellule CFC-Bas, une cellule CFC-GM, une cellule CFC-MEG, une cellule BFC-E, une cellule CFC-E, un lymphocyte T, un lymphocyte B, une cellule éosinophile, une cellule basophile, une cellule neutrophile, un monocyte, un mégacaryocyte ou un érythrocyte; et la cellule indifférenciée est une cellule souche myéloïde, une cellule souche lymphoïde ou une cellule souche pluripotente.

[0146] Si la cellule plus engagée est une cellule différenciée, alors la cellule différenciée est de préférence un lymphocyte B (activé ou non activé), un lymphocyte T (activé ou non activé), une cellule provenant de la lignée des monocytes macrophages, une cellule nucléée capable d'exprimer des antigènes de catégorie I ou de catégorie II, une cellule qui peut être soumise à l'induction de l'expression d'antigènes de catégorie I ou de catégorie II ou une cellule énucléée (c'est-à-dire une cellule qui ne contient pas de noyau – telle qu'un globule rouge).

[0147] Dans d'autres formes de réalisation préférées, la cellule différenciée est n'importe quelle cellule choisie parmi un groupe de cellules comprenant des lymphocytes granulaires volumineux, des lymphocytes nuls et des cellules tueuses naturelles, chacun exprimant les récepteurs de surface cellulaire CD56 et/ou CD16.

[0148] La cellule différenciée peut même être formée par nucléation d'une cellule énucléée.

III. Agents

[0149] L'agent enrôle de manière fonctionnelle la cellule plus engagée afin de provoquer la rétrodifférenciation de cette cellule en une cellule indifférenciée. A cet égard, l'agent pour la rétrodifférenciation de la cellule plus engagée en la cellule indifférenciée peut agir par enrôlement direct ou enrôlement indirect avec la cellule plus engagée.

[0150] L'agent peut agir au niveau intracellulaire à l'intérieur de la cellule plus engagée. Cependant, de préférence, l'agent agit au niveau extracellulaire de la cellule plus engagée.

[0151] Un exemple d'enrôlement direct est celui dans lequel la cellule plus engagée comporte au moins un récepteur de surface cellulaire sur sa surface, tel qu'une chaîne β ayant des régions homologues (régions qui sont présentes couramment avec la même séquence ou une séquence similaire) telles que celles qui peuvent être présentes sur les lymphocytes B, et dans lequel l'agent enrôle directement le récepteur de surface cellulaire. Un autre exemple est celui dans lequel la cellule plus engagée comporte un récepteur de surface cellulaire sur sa surface tel qu'une chaîne α ayant des régions homologues telles que celles qui peuvent être présentes sur les lymphocytes T, et dans lequel l'agent enrôle directement le récepteur de surface cellulaire.

[0152] Un exemple d'enrôlement indirect est celui dans lequel la cellule plus engagée comporte au moins deux récepteurs de surface cellulaire sur sa surface et l'enrôlement de l'agent avec un des récepteurs influe sur l'autre récepteur qui induit alors la rétrodifférenciation de la cellule plus engagée.

[0153] L'agent pour la rétrodifférenciation de la cellule plus engagée en une cellule indifférenciée peut être un composé chimique ou une composition. Cependant, de préférence, l'agent est capable d'enrôler un récepteur de surface cellulaire sur la surface de la cellule plus engagée. Ainsi, dans une forme de réalisation préférée, l'agent enrôle de manière fonctionnelle un récepteur présent sur la surface de la cellule plus engagée récepteur qui peut être exprimé par la cellule plus engagée, tel qu'un récepteur qui est capable d'être exprimé par la cellule plus engagée.

[0154] Par exemple, des agents appréciés comprennent un ou plusieurs quelconques des agents consistant en adénosine-monophosphate cyclique (AMPC), une molécule CD4, une molécule CD8, une partie ou la totalité d'un récepteur de lymphocytes T, un ligand (fixe ou libre), un peptide, un récepteur de lymphocyte T (TCR), un anticorps, un anticorps à réactivité croisée, un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal. Il est possible également d'utiliser des facteurs de croissance, tels que des facteurs de croissance hématopoïétiques, par exemple l'érythropoïétine et le facteur de stimulation de colonies de granulocytes-monocytes (GM-CSF).

[0155] Si l'agent est un anticorps, un anticorps à réactivité croisée, un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal, alors l'agent consiste de préférence en un ou plusieurs quelconques des agents consistant en un anticorps, un anticorps à réactivité croisée, un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal contre un ou plusieurs quelconques des agents suivants: la chaîne β d'un antigène de CMH de catégorie II, la chaîne β d'un antigène de CMH HLA-DR, la chaîne α d'un antigène de CMH de catégorie I ou de catégorie II, la chaîne α d'un antigène HLA-DR, la chaîne α et la chaîne β d'un antigène de CMH de catégorie II ou d'un antigène de CMH de catégorie I. Un exemple d'anticorps convenable est l'anticorps CR3/43 (fourni par Dako).

[0156] Le terme «anticorps» comprend les divers fragments (qu'ils soient obtenus par clivage protéolytique ou par la technologie de recombinaison) et dérivés qui conservent l'activité de liaison, tels que des fragments Fab, $F(ab')_2$ et les anticorps scFv, ainsi que leurs formes mimétiques ou bio-isostères. Il comprend également des anticorps qui sont des variants modifiés génétiquement dans lesquels une partie des séquences d'acides aminés a. été modifiée, par exemple par remplacement de résidus d'acides aminés pour accroître la liaison ou, lorsque les anticorps ont été produits dans une espèce différente de l'organisme dont il est désiré de traiter les cellules suivant les méthodes de la présente invention, pour diminuer la possibilité de réactions immunitaires néfastes (un exemple de tels anticorps consiste en les anticorps monoclonaux de souris «humanisés»).

[0157] Les agents utilisés pour effectuer la conversion d'une cellule plus engagée en une cellule indifférenciée agissent de préférence au niveau extracellulaire de la cellule plus engagée. En particulier, il est préférable que la cellule plus engagée comprenne un récepteur qui puisse être enrôlé de manière fonctionnelle par l'agent et/ou que l'agent enrôle de manière fonctionnelle le récepteur.

[0158] Par exemple, le récepteur peut être un récepteur de surface cellulaire. Des exemples spécifiques de récepteurs de surface cellulaire comprennent les récepteurs de CMH de catégorie I et de catégorie II. De préférence, le récepteur comprend un constituant α et/ou un constituant β , comme dans le cas des récepteurs de CMH de catégorie I et de catégorie II.

[0159] Plus avantageusement, le récepteur comprend une chaîne β comportant des régions homologues, par exemple au moins les régions homologues de la chaîne β de HLA-DR.

[0160] En variante, ou en outre, le récepteur comprend une chaîne α ayant des régions homologues, par exemple au moins les régions homologues de la chaîne α de HLA-DR.

[0161] De préférence, le récepteur est un antigène de catégorie I ou de catégorie II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Dans des formes de réalisation préférées, le récepteur de surface cellulaire est l'un quelconque des suivants: un récepteur HLA-DR, un récepteur DM, un récepteur DP, un récepteur DQ, un récepteur HLA-A, un récep-

teur HLA-B, un récepteur HLA-C, un récepteur HLA-E, un récepteur HLA-F ou un récepteur HLA-G. Dans des formes de réalisation plus appréciées, le récepteur de surface cellulaire est un récepteur HLA-DR.

[0162] L'agent est avantageusement un anticorps contre le récepteur; l'agent est de préférence un anticorps monoclonal contre le récepteur.

[0163] Un autre exemple apprécié d'un agent est un agent qui module l'expression de gène de CMH telle que l'expression de gène de CMH de catégorie I⁺ et/ou de catégorie II⁺.

[0164] Dans une forme de réalisation préférée, l'agent est utilisé conjointement avec un modificateur de réponse biologique. Des exemples de modificateurs de réponse biologique comprennent un agent alkylant, un immuno-modulateur, un facteur de croissance, une cytokine, un récepteur de surface cellulaire, une hormone, un acide nucléique, une séquence de nucléotides, un antigène ou un peptide. Un agent alkylant apprécié est ou comprend le cyclophosphamide.

[0165] D'autres modificateurs de réponse biologique appréciés comprennent des composés aptes à la régulation positive de l'expression d'antigènes de CMH de catégorie I et/ou de catégorie II. Dans une forme de réalisation préférée, ils sont également destinés à permettre à un agent qui se lie à un récepteur de CMH d'agir plus efficacement. Puisque n'importe quel type cellulaire peut être amené à exprimer des antigènes du CMH de catégorie I et/ou de catégorie II, cela devrait fournir un procédé pour la rétrodifférenciation d'une large gamme de types cellulaires, que ces types cellulaires expriment de manière constitutive ou non des antigènes du CMH de catégorie I et/ou de catégorie II.

IV. Procédé pour la rétrodifférenciation de cellules

[0166] Dans les procédés de la présente invention, une population de cellules comprenant des cellules engagées est mise en contact avec un agent qui enrôle de manière fonctionnelle une ou plusieurs cellules engagées dans la population. Puis la population cellulaire est mise en incubation de manière à permettre à ces cellules qui ont été enrôlées de manière fonctionnelle par l'agent, de progresser dans le processus de rétrodifférenciation et de devenir finalement indifférenciées.

[0167] De préférence, l'étape de mise en contact comprend l'enrôlement de l'agent avec un ou plusieurs des constituants suivants: des régions homologues de la chaîne α d'antigènes de catégorie I, des régions homologues de la chaîne α d'antigènes de catégorie II, un récepteur de surface de cellule CD4, un récepteur de surface de cellule CD8, des régions homologues de la chaîne β d'antigènes de catégorie II en présence de lymphocytes, des régions homologues de la chaîne α d'antigènes de catégorie I en présence de lymphocytes, ou des régions homologues de la chaîne α d'antigènes de catégorie II en présence de lymphocytes. De préférence, l'étape de mise en contact a lieu en présence du modificateur de réponse biologique (voir ci-dessus).

[0168] Habituellement, la population de cellules est dérivée d'un échantillon biologique, tel que le sang ou des tissus apparentés comprenant la moelle osseuse, le tissu neuronal provenant du système nerveux central ou du système nerveux périphérique, le tissu musculaire ou l'épiderme et/ou le derme de la peau (c'est-à-dire par exemple par un raclage buccal). De préférence, la substance biologique est d'origine post-natale. Il est préférable d'utiliser du sang entier ou des produits obtenus par traitement du sang entier, tels que le plasma ou la couche leucocytaire, puisque leur prélèvement chez des sujets peut être effectué avec le minimum de supervision médicale. Les échantillons de sang sont habituellement traités avec des anticoagulants tels que l'héparine ou un citrate. Les cellules dans l'échantillon biologique peuvent être traitées pour enrichir certains types cellulaires, éliminer certains types cellulaires ou dissocier les cellules d'une masse tissulaire. Des procédés utiles pour purifier et séparer des cellules comprennent la centrifugation (telle que la centrifugation à gradient de densité, la cytométrie de flux et la chromatographie d'affinité (par exemple l'utilisation de billes magnétiques comprenant des anticorps monoclonaux contre des marqueurs de surface cellulaire ou un lavage) (voir Vettese-Dadey *The Scientist* (Sep. 13 1999) (18) : 21). A titre d'exemple, une séparation sur Ficoll-Hypaque est utile pour séparer les érythrocytes et les granulocytes en laissant les cellules mononucléées telles que les lymphocytes et les monocytes.

[0169] Puisque les cellules sont essentiellement des cultures primaires, il peut être nécessaire de supplémenter les populations de cellules avec des substances nutritives convenables pour maintenir la viabilité. Des conditions de culture convenables sont connues de l'homme de l'art. Néanmoins, le traitement des populations de cellules est de préférence déclenché dès que possible après le prélèvement d'échantillons biologiques chez des patients, habituellement en un temps de 12 heures, de préférence en un temps de 2 à 4 heures. La viabilité des cellules peut être contrôlée en utilisant des techniques bien connues telles que l'exclusion de bleu Trypan.

[0170] Les populations cellulaires sont généralement mises en incubation avec un agent pendant au moins 2 heures, habituellement pendant un temps de 2 à 24 heures, de préférence de 2 à 12 heures. Les incubations sont habituellement effectuées à une température comprise dans l'intervalle d'approximativement la température ambiante, par exemple environ 22°C, jusqu'à environ 37°C, y compris une température de 33°C. L'évolution du mode opératoire de rétrodifférenciation peut être contrôlée périodiquement en prélevant une petite portion aliquote de l'échantillon et en examinant les cellules par microscopie et/ou cytométrie de flux. En variante, le dispositif peut comprendre des moyens de dépistage pour le contrôle en ligne de l'évolution du mode opératoire de rétrodifférenciation.

[0171] Une fois que les nombres relatifs du type cellulaire désiré ont augmenté à une valeur convenable, pouvant par exemple être limitée à 0,1% ou atteindre 5%, les populations cellulaires modifiées résultantes peuvent être utilisées d'un certain nombre de manières. En ce qui concerne les nombres de cellules indifférenciées formées, il est important

d'apprécier l'aptitude à la prolifération des cellules souches. Bien que, dans certaines circonstances, les nombres de cellules souches ou d'autres cellules indifférenciées formées puissent se révéler être faibles, des études ont montré qu'un nombre de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes seulement égal à 50 peut reconstituer un système hématopoïétique entier dans une souris servant de donneur. Ainsi, l'utilité thérapeutique ne nécessite pas la formation d'un grand nombre de cellules.

[0172] La conversion de cellules plus engagées en cellules indifférenciées peut également être effectuée in vivo par administration de l'agent, en mélange avec un support ou diluant pharmaceutique, à un patient. Cependant, il est préférable dans la plupart des cas d'effectuer la rétrodifférenciation in vitro/ex vivo.

[0173] Les populations traitées de cellules obtenues in vitro peuvent être utilisées ultérieurement avec un traitement minimal. Par exemple, elles peuvent être simplement associées à un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable et administrées à un patient nécessitant l'administration de cellules souches.

[0174] Cependant, il peut être souhaitable d'enrichir la population cellulaire en cellules indifférenciées ou de purifier les cellules à partir de la population cellulaire. Cela peut être effectué convenablement en utilisant un certain nombre de procédés (voir Vattese-Dadey – *The Scientist* 13 (18) : 21 Sep 1999). Un dispositif conforme à la présente invention peut comprendre facultativement des moyens de purification et d'isolement pour enrichir lesdites cellules indifférenciées ou recueillir lesdites cellules indifférenciées à partir de la population cellulaire modifiée. Par exemple, les cellules peuvent être purifiées sur la base de marqueurs de surface cellulaire en utilisant la chromatographie et/ou la cytométrie de flux. Néanmoins, il n'est souvent ni nécessaire ni souhaitable de purifier de manière poussée les cellules indifférenciées à partir de la population cellulaire puisque d'autres cellules présentes dans la population (par exemple les cellules stromales) peuvent maintenir la viabilité et la fonction des cellules souches.

[0175] La cytométrie de flux est une technique bien établie, fiable et puissante pour caractériser des cellules dans des populations mixtes, également pour effectuer le tri de cellules. Ainsi, le moyen de purification ou d'isolement peut comprendre un cytomètre de flux. La cytométrie de flux fonctionne sur la base des caractéristiques physiques de particules en suspension dans un liquide, qui peuvent être différenciées lors de l'interrogation avec un faisceau lumineux. Ces particules peuvent être bien entendu des cellules. Les caractéristiques physiques comprennent les dimensions et la structure des cellules ou, comme cela est devenu très populaire ces dernières années, des marqueurs de surface cellulaire liés par des anticorps monoclonaux conjugués à des molécules fluorescentes.

[0176] Kreisseg et al., 1994, *J. Hematother* 3(4) : 263–89 indiquent «en raison de la disponibilité d'anticorps monoclonaux anti-CD34, la cytométrie de flux à paramètres multiples est devenue l'outil de choix pour la détermination des cellules souches ou mères hématopoïétiques» et continuent en décrivant des techniques générales pour la quantification et la caractérisation de cellules exprimant CD34 par cytométrie de flux. En outre, Korbling et al., 1994, *Bone Marrow Transplant*, 13 : 649–54 font connaître la purification de cellules CD34⁺ par immuno-absorption, puis par cytométrie de flux sur la base de l'expression de HLA-DR. De la manière décrite ci-dessus, CD34⁺ est un marqueur utile en rapport avec les cellules souches/cellules mères.

[0177] Des techniques de cytométrie de flux pour trier les cellules souches sur la base d'autres caractéristiques physiques sont également disponibles. Par exemple, Visser et al., 1980, *Blood Cells* 6 : 391–407 révèlent que des cellules souches peuvent être isolées sur la base de leur dimension et de leur degré de structuration. Grogan et al., 1980, *Blood Cells*, 6 : 625–44 révèlent également que «des cellules souches viables peuvent être triées en les séparant de tissus hématopoïétiques simples en une grande pureté vérifiable».

[0178] Outre la sélection de cellules sur la base de la présence d'un marqueur de surface cellulaire ou d'une autre propriété physique (sélection positive), des populations cellulaires peuvent être enrichies et purifiées en utilisant des critères négatifs. Par exemple, des cellules qui possèdent des marqueurs spécifiques de lignées tels que les marqueurs CD4, CD8, CD42 et CD3 peuvent être séparées de la population cellulaire par cytométrie de flux ou chromatographie d'affinité.

[0179] Une technique très utile pour purifier des cellules comprend l'utilisation d'anticorps ou d'autres ligands d'affinité liés à des billes magnétiques. Les billes sont mises en incubation avec la population cellulaire et les cellules qui portent un marqueur de surface cellulaire, par exemple CD34, auquel se lie un ligand d'affinité, sont capturées. Le tube d'échantillon contenant les cellules est placé dans un concentrateur d'échantillon magnétique dans lequel les billes sont attirées aux faces du tube. Après une ou plusieurs étapes de lavage, les cellules intéressantes ont été purifiées partiellement ou pratiquement totalement en les séparant des autres cellules. Lors de l'utilisation dans un format de sélection négative, au lieu de laver les cellules liées aux billes en rejetant la phase liquide, la phase liquide est conservée et ensuite les cellules liées aux billes sont séparées efficacement de la population cellulaire.

[0180] Ces procédés de purification basés sur l'utilisation de ligands d'affinité peuvent être utilisés avec n'importe quel type cellulaire pour lequel des marqueurs convenables ont été caractérisés ou peuvent être caractérisés.

[0181] Urbankova et al., 1996, (*J. Chromatogr B Biomed Appl.* 687 : 449–52) font connaître la micropréparation de cellules souches hématopoïétiques à partir d'une suspension de moelle osseuse de souris par fractionnement par écoulement en champ de gravitation. Urbankova et al., 1996, indiquent en outre que le procédé est utilisé pour la caractérisation de cellules souches de moelle osseuse de souris car ces cellules sont plus volumineuses que les autres cellules dans

la moelle osseuse et il est donc possible de les séparer du mélange. Ainsi, des paramètres physiques autres que des marqueurs de surface cellulaire peuvent être utilisés pour la purification/l'enrichissement des cellules souches.

[0182] Des populations cellulaires comprenant des cellules indifférenciées et des cellules indifférenciées purifiées produites par les procédés de la présente invention peuvent être maintenues *in vitro* en utilisant des techniques connues. Habituellement, un milieu minimal de croissance tel que le milieu de Hanks, le milieu RPMI 1640, le milieu essentiel minimal de Dulbecco (DMEM) ou le milieu de Dulbecco modifié selon Iscove est utilisé, en étant supplémenté avec du sérum de mammifère tel que du sérum bovin fœtal (SBF) et, facultativement, du plasma autologue, pour fournir un environnement convenable de croissance pour les cellules. Dans une forme de réalisation préférée, des cellules souches sont cultivées sur des couches nourricières telles que des couches de cellules stromales (voir Deryugina et al., 1993, Crit Rev. Immunology, vol 13 : 115–150). Il est considéré que les cellules stromales sécrètent des facteurs qui maintiennent les cellules mères à l'état indifférencié. Un système de culture à long terme de cellules souches est décrit par Dexter et al., 1977 (J. Cell Physiol, vol 9:335) et Dexter et al., 1979 (Acta. Haematol., vol 62 : 299).

[0183] Par exemple, Lebkowski et al., 1992 (Transplantation 53(5): 1011-9) révèlent que des cellules hématopoïétiques CD34⁺ humaines peuvent être purifiées en utilisant une technologie basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui sont immobilisés par covalence sur des surfaces de polystyrène et que les cellules CD34⁺ purifiées par ce procédé peuvent être maintenues avec une viabilité supérieure à 85%. Lebkowski et al., 1993 (J. Hematother, 2(3) : 339–42) révèlent également la manière d'isoler et de cultiver des cellules CD34⁺ humaines. Voir également Haylock et al., 1994 (Immunomethods, vol 5(3) : 217–25) pour un passage en revue de divers procédés.

[0184] La confirmation de l'identité des cellules souches peut être effectuée en utilisant un certain nombre d'essais *in vitro* tels que les essais de CFC (voir également les exemples). Des cellules souches hématopoïétiques très primitives sont souvent dosées en utilisant l'analyse de cellules à déclenchement de culture à long terme (LTC-IC) (Eaves et al., 1991, J. Tiss. Cult. Meth. Vol 13 : 55–62). L'analyse LTC-IC maintient l'hématopoïèse pendant 5 à 12 semaines.

[0185] Les populations cellulaires comprenant des cellules indifférenciées et des préparations purifiées comprenant des cellules indifférenciées peuvent être congelées à des fins d'utilisation ultérieure. Des techniques convenables pour la congélation de cellules et ensuite la reviviscence de ces cellules sont connues dans ce domaine. Un dispositif conforme à la présente invention peut comprendre en outre facultativement un moyen de congélation pour congeler des populations cellulaires comprenant des cellules indifférenciées et/ou des préparations purifiées comprenant des cellules indifférenciées.

[0186] Dans un aspect, la rétrodifférenciation est effectuée de préférence sur des cellules provenant d'échantillons de couche leucocytaire sanguine ou présentes dans de tels échantillons. L'expression «couche leucocytaire» désigne la couche de globules blancs qui se forme entre la couche de globules rouges et le plasma lorsque du sang non coagulé est centrifugé ou laissé au repos.

V. Déplacement du taux de cellules différenciées normales dans une population cellulaire

[0187] Dans un tissu normal, le nombre relatif des différents types de cellules, comprenant des cellules différenciées et des cellules indifférenciées, à un temps donné est habituellement constant. Par exemple, une numération de globules blancs d'un individu sain âgé de 21 ans comprend classiquement environ 8×10^6 globules blancs par ml, dont 27% consistent en lymphocytes, 6% consistent en monocytes et 67% consistent en granulocytes. Les proportions de ces cellules (comportant à la fois le nombre relatif et la numération cellulaire absolue) sont perturbées au cours d'une maladie, par exemple dans le sang leucémique de patients souffrant d'une leucémie lymphocytaire chronique à lymphocytes B (B-CLL).

[0188] Le nombre relatif (c'est-à-dire le taux) de cellules différenciées peut être perturbé, modifié ou déplacé, par exemple dans des fractions de cellules mononucléées en déposant en couche du sang entier ou une couche leucocytaire sur de l'Histopaque pour éliminer les granulocytes, afin de provoquer ainsi une rétrodifférenciation des cellules différenciées en cellules indifférenciées, cellules indifférenciées qui s'auto-renouvellent (prolifèrent) et subissent une redifférenciation en divers types cellulaires pour le renouvellement des cellules déplacées.

[0189] Le nombre relatif (c'est-à-dire le taux) de cellules différenciées peut également être perturbé, modifié ou déplacé dans, par exemple, des couches leucocytaires (obtenues à partir de donneurs sains de sang) après prélèvement (par centrifugation sur un milieu à gradient de densité ou sélection négative en utilisant des billes magnétiques revêtues d'un anticorps) des globules rouges, des plaquettes, des granulocytes, des monocytes et des lymphocytes T. Ce traitement peut être appelé sélection négative ou enrichissement d'un certain type de cellules différenciées et est un exemple de traitement d'un tissu déplacé. Lorsque de telles cellules sont cultivées, par exemple dans un milieu contenant du calcium tel que le milieu de Dulbecco modifié selon Iscove (ISDM), les cellules différenciées subissent une rétrodifférenciation en cellules indifférenciées, cellules indifférenciées qui s'auto-renouvellent (prolifèrent) et subissent une redifférenciation en divers types cellulaires pour le renouvellement des cellules déplacées.

[0190] Au cours de ce processus, on constate tout d'abord que les cellules s'amassent sous forme de colonies (subissent une agrégation homocytaire) afin de subir la rétrodifférenciation. Une fois les cellules plus engagées transformées en cellules indifférenciées, ces cellules acquièrent l'aptitude à proliférer et à se développer sous forme de divers types cellulaires redifférenciés, dans une tentative de renouveler le nombre relatif de cellules déplacées.

[0191] Des moyens de rétrodifférenciation utilisables pour déplacer le taux de cellules différenciées normales dans une population cellulaire comprennent, par exemple, des anticorps (purs et conjugués, c'est-à-dire liés à des ligands fixes et libres tels que, par exemple, des billes magnétiques, des billes de verre ou des billes de polystyrène); l'Histopaque, le LymphoPrep ou n'importe quel milieu à gradient de densité utilisé pour séparer des cellules en fonction de la densité de ces cellules; ou le dextrane (capable de provoquer par exemple la sédimentation des globules rouges). D'autres moyens de rétrodifférenciation convenables peuvent être identifiés dans un article de Vettese-Dadey (voir *The Scientist* (Sep. 13 1999) 13 (18) : 21).

[0192] L'exposition des cellules déplacées à un agent chélatant convenable, comprenant l'EDTA, l'EGTA et l'héparine (agent chélatant qui peut être désigné sous le nom de modificateur de réponse biologique), peut provoquer la rétrodifférenciation de cellules encore plus engagées en cellules indifférenciées. Par exemple, l'exposition des cellules déplacées à de l'EDTA pendant une période de temps prédéterminée suivie par la culture des cellules dans un milieu contenant du calcium et renfermant la cortisone a provoqué la rétrodifférenciation de cellules plus engagées en cellules indifférenciées. Ces cellules se sont elles-mêmes auto-renouvelées et embarquées sur une voie de différenciation nouvelle, donnant des cellules mères érythroïdes telles que des cellules érythroïdes unitaires engendrant des salves (érythroïdes BFU). Les cellules mères érythroïdes peuvent être cultivées et multipliées pendant de longues périodes de temps et peuvent être utilisées dans le traitement de troubles des globules rouges et dans des pénuries en globules rouges.

VI. Modification de la concentration en ions libres d'un milieu comprenant une population cellulaire

[0193] L'exposition de cellules différenciées à un agent chélatant les ions tel que, par exemple, l'EGTA, pendant une période de temps donnée suivie par la culture de telles cellules dans un milieu contenant du calcium, tel que le IMDM, contenant de l'hydrocortisone, provoque la rétrodifférenciation de cellules plus engagées en cellules indifférenciées. Ces cellules s'auto-renouvellent d'elles-mêmes et s'embarquent sur une voie de différenciation nouvelle donnant des cellules mères mégacaryocytaires, telles que des mégacaryocytes d'unités formant des colonies (CFU-Meg), qui donnent finalement les plaquettes.

VII. Procédé pour le réengagement de cellules indifférenciées

[0194] Une application importante des cellules indifférenciées de la présente invention concerne la reconstitution de tissus, par exemple de tissus nerveux ou de cellules hématopoïétiques. Cela comprend la différenciation des cellules indifférenciées produites par les procédés de la présente invention. Cela peut être effectué en administrant simplement les cellules indifférenciées à un patient, habituellement à un site spécifique intéressant tel que la moelle osseuse, la moelle épinière ou le poumon, et en laissant les conditions physiologiques naturelles dans le patient effectuer la différenciation. Un exemple spécifique de ce procédé est la reconstitution ou la supplémentation du système hématopoïétique, par exemple dans le cas de patients souffrant du SIDA, ayant un nombre réduit de lymphocytes CD4⁺.

[0195] En variante, la différenciation (appelée également dans le présent mémoire «réengagement») peut être effectuée in vitro et les cellules qui se sont multipliées peuvent être ensuite, par exemple, administrées à des fins thérapeutiques. Cela est généralement effectué en administrant des facteurs de croissance. Par exemple, l'acide rétinoïque a été utilisé pour différencier des cellules ES en cellules neuronales. De la méthylcellulose suivie par une co-culture avec une lignée stromale de moelle osseuse et de la IL-7 a été utilisée pour différencier des cellules ES en précurseurs de lymphocytes (Nisitani et al., 1994, *Int. Immuno.*, vol 6(6) : 909–916). Le Page (*New Scientist*, 16 décembre 2000) révèle que des cellules ES peuvent être différenciées en cellules épithéliales pulmonaires. Bischoff, 1986 (*Dev. Biol.*, vol 115 (1): 129–39) fait connaître la manière de provoquer la différenciation de cellules satellites musculaires en fibres musculaires matures. Des cellules précurseurs neuronales peuvent être multipliées avec le facteur de croissance des fibroblastes basique et le facteur de croissance épidermique (Nakafuku et Nakamura, 1995, *J. Neurosci. Res.*, vol 41 (2): 153–168). Des cellules souches hématopoïétiques peuvent être multipliées en utilisant un certain nombre de facteurs de croissance comprenant le GM-CSF, l'érythropoïétine, le facteur de cellules souches et des interleukines (IL-1, IL-3, IL-6) – voir Metcalf, 1989 (*Nature*, vol 339 : 27–30) pour un passage en revue de ces divers facteurs.

[0196] Potocnik et al., 1994 (*EMBO J.*, vol 13(22) : 5274–83) ont même démontré la différenciation de cellules ES en cellules hématopoïétiques en utilisant des conditions de basse teneur en oxygène (5%).

[0197] Ainsi, dans une forme préférée de réalisation de la présente invention, la cellule indifférenciée est ensuite transformée en une cellule réengagée, telle qu'une cellule différenciée. La cellule réengagée peut être de la même lignée que la cellule plus engagée de laquelle la cellule indifférenciée a été dérivée. En variante, la cellule réengagée peut être de lignée différente de celle de la cellule plus engagée de laquelle la cellule indifférenciée était dérivée. Par exemple, un lymphocyte B peut être rétrodifférencié en une cellule souche CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁻. La cellule souche peut être ensuite réengagée dans une ligne de lymphocytes B (la même lignée) ou une lignée lymphoïde (lignée différente).

[0198] L'engagement de la cellule indifférenciée en une cellule réengagée, telle qu'une cellule différenciée, peut être effectué de différentes manières connues de l'homme de l'art. Notamment, en cultivant des cellules indifférenciées d'une manière particulière et dans un milieu particulier, il est possible de parvenir à la différenciation en cellules choisies.

[0199] A titre d'exemple seulement, les cellules indifférenciées peuvent être différenciées en myocytes cardiaques en suivant le régime de culture souligné:

[0200] Jour 1: Passage des cellules indifférenciées à densité normale sur une plaque gélatinisée pour débarrasser la culture des fibroblastes contaminants.

[0201] Traiter les cellules à la trypsine comme pour le passage normal jusqu'au soulèvement des colonies. Manipuler doucement afin de maintenir ensemble les amas étroitement connectés de cellules. Puis étaler directement les cellules dans le rapport 1 : 3 dans des boîtes de Pétri de qualité pour culture bactérienne dans du milieu de culture cellulaire dépourvu de LIF (voir ci-dessous).

[0202] Jour 3: Aspirer le milieu avec précaution. Eviter d'aspirer une trop grande quantité des agrégats. Puis ajouter du milieu nouveau.

[0203] Jour 5: Effectuer une aspiration comme au jour 3 et remplacer le milieu.

[0204] Jour 7: Etaler les cellules dans une plaque de qualité pour culture de tissu à 24 puits.

[0205] Jour 9: Remplacer la moitié du milieu et observer les battements.

[0206] Jour 11: Remplacer la moitié du milieu et observer les battements.

[0207] A titre d'exemple supplémentaire, les cellules indifférenciées peuvent être différenciées en cellules gliales et neurones en suivant le mode opératoire souligné:

[0208] Jour 1: Passer les cellules indifférenciées à densité normale sur une plaque gélatinisée pour débarrasser la culture des fibroblastes contaminants.

[0209] Traiter les cellules à la trypsine comme pour le passage normal jusqu'au soulèvement des colonies. Manipuler doucement afin de maintenir ensemble les amas étroitement connectés de cellules. Puis étaler directement les cellules dans le rapport 1 : 3 dans des boîtes de Pétri de qualité pour culture bactérienne dans du milieu dépourvu de LIF contenant 1 μ M d'acide rétinoïque totalement à configuration trans (disponible auprès de Sigma).

[0210] Jour 3: Recueillir les agrégats cellulaires et réétaler dans des boîtes de culture de tissu (approximativement 25 agrégats cellulaires par boîte de culture de tissu de 6 cm) dans du milieu de culture de cellules ES sans LIF ou RA. Aspirer le milieu avec précaution.

[0211] Jour 8: Remplacer la moitié du milieu. A partir de ce jour, au moins 10% des cellules présentent les phénotypes neuronaux. Ces cellules sont colorées spécifiquement avec du violet de crésyle et donnent une réponse fortement positive pour l'antigène N-CAM.

[0212] L'homme de l'art connaît parfaitement des modes opératoires convenables pour effectuer l'engagement d'une cellule indifférenciée en n'importe quelle cellule différenciée choisie.

[0213] Une cellule souche indifférenciée de la présente invention peut être cultivée en utilisant n'importe quelle technique usuelle de culture de cellules souches embryonnaires (ES). A titre d'exemple seulement, un milieu convenable pour la culture de cellules indifférenciées ou cellules ES est décrit en détail ci-dessous.

[0214] Pour préparer 100 ml de milieu:

DMEM (N° de catalogue GIBCO 11965– 062	80 ml
SVF à 15%	15 ml
Pen/Strep	1 ml
L-glutamine	1 ml
Amino-acides non essentiels MEM (N° de catalogue GIBCO 11140–050	1 ml
Lif (10^5 U/ml)	1 ml
BME (0,1 M)	0,2 ml

[0215] Le Lif est fourni en ampoules de 1 ml en tant que LIF ESGRO AMRAD à 10^7 U/ml, ce liquide peut être dilué dans 100 ml de DMEM et 10% de SVF et stocké par portions aliquotes de 5 ml à -20°C .

[0216] En ce qui concerne le BME, un volume de 0,1 ml de BME (14,4 M) peut être ajouté à 14,3 ml de SBF, le mélange peut être filtré à travers un acrodisque de 0,2 micromètre et stocké à -20°C pendant un temps allant jusqu'à 1 mois.

[0217] Un milieu convenable supplémentaire peut être, par exemple, le milieu PMEF dont 100 ml sont préparés de la manière décrite en détail ci-dessous:

DMEM (N° de catalogue GIBCO 11965–062	88 ml
SVF à 10%	10 ml
Pen/Strep	1 ml
L-glutamine	1 ml
BME (0,1 M)	0,2 ml

[0218] D'autres milieux convenables pour les cultures de cellules ES seront manifestes pour l'homme de l'art.

VIII. Analyses pour identification d'agents de rétrodifférenciation

[0219] En plus des agents mentionnés ci-dessus, d'autres agents convenables peuvent être identifiés en utilisant les méthodes d'analyse du document WO96/23870 ou de la présente invention. En ce qui concerne ce dernier aspect, la présente invention propose également une méthode pour identifier une substance capable de provoquer la rétrodifférenciation d'une cellule engagée/différenciée en une cellule indifférenciée, méthode qui comprend les étapes consistant à mettre en contact une population de cellules comprenant des cellules engagées avec une substance servant de candidat et à déterminer s'il existe une augmentation des nombres relatifs de cellules indifférenciées dans ladite population cellulaire, ladite mise en contact ayant lieu en présence d'une couche leucocytaire.

[0220] Des substances convenables comme candidats comprennent des ligands qui se lient à des récepteurs de surface cellulaire tels que des produits d'anticorps (par exemple anticorps monoclonaux et polyclonaux, anticorps monocaténaires, anticorps chimères et anticorps greffés avec CDR), tels que des anticorps qui se lient à des récepteurs de surface cellulaire. Des récepteurs de surface cellulaire particulièrement intéressants ont été décrits ci-dessus et comprennent des récepteurs du CMH et des protéines de surface ayant les désignations CD, telles que les protéines CD4 et GD8. D'autres ligands qui se lient à des récepteurs de surface cellulaire comprennent des facteurs de croissance.

[0221] En outre, des banques combinatoires, des peptides et agents mimétiques de peptide, des entités chimiques définies, des oligonucléotides et des banques de produits naturels peuvent être sélectionnés pour déterminer leur activité comme agents de rétrodifférenciation. Les substances servant de candidats peuvent être utilisées dans une sélection initiale par lots, par exemple, de 10 substances par réaction, et les substances des lots qui présentent une inhibition peuvent être testées individuellement.

[0222] Une analyse classique comprend l'introduction d'une portion aliquote de cellules comprenant des cellules engagées dans un récipient convenable tel qu'une plaque à puits multiples. Une substance servant de candidat est introduite dans le puits et les cellules sont mises en incubation dans le puits. Les incubations sont effectuées habituellement à une température comprise dans l'intervalle d'approximativement la température ambiante, par exemple environ 22°C, jusqu'à environ 37°C, comprenant une température de 33°C.

[0223] La rétrodifférenciation peut être mesurée en prélevant une petite portion aliquote de cellules et en essayant les cellules au microscope et/ou par cytométrie de flux pour déterminer s'il s'est produit une variation des nombres de cellules indifférenciées. Habituellement, la détermination des variations des nombres de cellules indifférenciées a été effectuée en contrôlant les variations des nombres de cellules ayant des marqueurs de surface cellulaire caractéristiques des cellules indifférenciées, bien que des modifications morphologiques puissent également être utilisées comme guide. Des exemples de marqueurs de surface cellulaire convenables comprennent CD34⁺. En variante, ou en outre, des diminutions des nombres de cellules ayant des marqueurs de surface cellulaire caractéristiques des cellules différenciées et non des cellules indifférenciées peuvent être contrôlées, un exemple étant une réduction des nombres relatifs de cellules possédant des marqueurs spécifiques de lignées tels que CD3, CD4 et CD8.

[0224] De préférence, toute augmentation des nombres de cellules ayant des caractéristiques propres aux cellules indifférenciées se produit en un temps de 24 heures, de préférence de 4 à 8 heures, de telle sorte que n'importe quelle variation ne puisse être seulement due à une prolifération cellulaire.

[0225] Il peut être souhaitable de sélectionner préalablement des agents qui se lient, par exemple, à des récepteurs de surface cellulaire, tels que des récepteurs de CMH de catégorie I ou de catégorie II. N'importe quels agents identifiés en tant qu'agents se liant à des récepteurs de surface cellulaire servant de cibles peuvent être ensuite utilisés dans l'analyse précitée pour déterminer leur effet sur la rétrodifférenciation. A titre d'exemple particulier, des banques de présentation de phages qui expriment des domaines de liaison d'anticorps peuvent être utilisées pour identifier des fragments d'anticorps (habituellement scFvs) qui se lient à un marqueur de surface cellulaire cible, par exemple la région homologue de la chaîne β des récepteurs de CMH de catégorie II. Des analyses de liaison convenables sont connues dans ce domaine, tout comme la production et la sélection de banques de présentation de phages. Des analyses peuvent également être utilisées pour identifier des anticorps ou fragments d'anticorps optimisés, par exemple pour sélectionner une banque mutagénisée de dérivés d'un anticorps qui s'est déjà révélé provoquer la rétrodifférenciation.

IX. Utilisations

[0226] La présente invention propose des procédés et un dispositif pour la rétrodifférenciation de cellules engagées en cellules indifférenciées. En particulier, la présente invention propose un procédé et un dispositif pour la préparation d'une cellule souche à partir d'une cellule plus différenciée. Les implications cliniques sont considérables puisque les cellules souches sont utilisées dans une large gamme d'applications thérapeutiques mais, jusqu'à présent, étaient difficiles, laborieuses et parfois problématiques du point de vue éthique, à obtenir.

[0227] Les cellules souches produites conformément à la présente invention peuvent être utilisées pour renouveler des populations de cellules spécifiques chez un patient, telles qu'une population de cellules hématopoïétiques ou une sous-population de ces cellules hématopoïétiques, par exemple des lymphocytes T CD4. Les cellules plus engagées utilisées pour produire les cellules souches peuvent provenir du même patient ou bien d'un donneur apparié. Ainsi, les cellules souches produites conformément à la présente invention peuvent être utilisées pour guérir et reconstituer des tissus et organes à cellules spécialisées. Par exemple, des cellules indifférenciées pourraient être utilisées pour produire des cellules réengagées telles que les cellules garnissant les alvéoles des poumons, en créant ainsi un mécanisme permettant de remplacer ou de réparer le tissu pulmonaire altéré ou pathologique (voir Le Page, New Scientist, 19 décembre 2000, page 20).

[0228] Ainsi, les cellules souches produites conformément à la présente invention peuvent être introduites dans le patient pour le renouvellement des cellules dans l'organisme. De manière convenable, les cellules souches se greffent tout d'abord et assurent ensuite le renouvellement.

[0229] De manière convenable, les cellules souches peuvent être introduites in vivo en utilisant un transfert liposomal.

[0230] Ainsi, la présente invention peut être utilisée pour un médicament comprenant une cellule indifférenciée préparée par l'un quelconque de ces modes opératoires ou par le dispositif, en mélange avec un diluant, support ou excipient convenable.

[0231] Un tel médicament comprenant la cellule indifférenciée peut être utilisé pour produire une cellule plus engagée bénéfique, telle qu'une cellule ayant une structure génomique correcte, afin de soulager n'importe quels symptômes ou états engendrés par, ou associés à, une cellule plus engagée ayant une structure génomique incorrecte. Ainsi, il est possible d'imaginer un procédé pour supprimer une mutation acquise d'une cellule plus engagée, dans lequel le mode opératoire comprend la formation d'une cellule indifférenciée par le procédé conforme à la présente invention, l'engagement de la cellule indifférenciée en une cellule réengagée, ce qui permet de supprimer l'arrangement ou le réarrangement du génome et/ou du noyau de la cellule qui est la cause de la mutation.

[0232] De préférence, le gène est inséré dans la région d'immunoglobuline ou la région de TCR du génome.

[0233] De tels médicaments peuvent être utilisés pour le traitement d'un patient souffrant d'une maladie ou d'une affection résultant d'une cellule défective ou d'une cellule indésirable, méthode qui comprend la préparation d'une cellule indifférenciée en mettant en contact une cellule plus engagée avec un agent qui provoque la rétrodifférenciation de la cellule plus engagée en la cellule indifférenciée, et ensuite, facultativement, l'engagement de la cellule indifférenciée en une cellule réengagée; dans laquelle la cellule indifférenciée, ou la cellule réengagée, affecte la cellule défective ou la cellule indésirable pour soulager les symptômes de la maladie ou de l'affection ou pour guérir le patient de cette maladie ou affection.

[0234] En variante, la cellule indifférenciée peut être utilisée pour produire une cellule plus engagée qui produit une entité qui guérit n'importe quels symptômes ou états provoqués par, ou associés à, une cellule plus engagée ayant une structure génomique incorrecte.

[0235] Par exemple, la présente invention peut être utilisée pour préparer des anticorps ou des récepteurs de lymphocytes T contre un antigène qui est exprimé par la cellule plus engagée qui a subi une rétrodifférenciation à la cellule indifférenciée. A cet égard, l'antigène peut être un antigène fetospécifique ou un antigène fetospécifique à réactivité croisée.

[0236] La présente invention comprend également un procédé et un dispositif pour ajuster les quantités de cellules indifférenciées et de cellules plus engagées. Par exemple, la présente invention comprend un procédé comprenant la formation d'une cellule indifférenciée par le procédé conforme à la présente invention et ensuite l'activation d'un gène d'apoptose pour affecter la cellule indifférenciée, par exemple pour provoquer sa mort.

[0237] Dans une forme de réalisation préférée, la présente invention concerne un procédé pour l'introduction d'un gène dans le génome d'une cellule indifférenciée, ledit procédé comprenant l'introduction du gène dans une cellule plus engagée, et ensuite la préparation d'une cellule indifférenciée par le procédé conforme à la présente invention, le gène étant ainsi présent dans la cellule indifférenciée.

[0238] Dans une forme de réalisation plus appréciée, la présente invention concerne un procédé pour introduire un gène dans le génome d'une cellule indifférenciée, ledit procédé comprenant l'insertion du gène dans le génome d'une cellule plus engagée et ensuite la préparation d'une cellule indifférenciée par le procédé conforme à la présente invention, le gène étant ainsi présent dans la cellule indifférenciée.

[0239] Le gène peut être un gène qui rend la cellule indifférenciée et les cellules plus différenciées obtenues à partir de cette cellule indifférenciée plus résistantes à des infections pathogènes telles qu'une infection virale. En particulier, à titre d'exemple, des lymphocytes B de patients souffrant du SIDA peuvent être utilisés pour produire des cellules souches

qui sont ensuite modifiées génétiquement de manière à être résistantes à l'infection par le VIH. Lors de la multiplication et de l'introduction dans les patients, les lymphocytes T auxiliaires résultants peuvent également être résistants à une infection par le VIH.

[0240] Dans une autre forme de réalisation, la présente invention a pour objet un procédé pour l'introduction d'un gène dans une cellule indifférenciée, ledit procédé comprenant l'insertion du gène dans le génome d'une cellule plus engagée et ensuite la préparation d'une cellule indifférenciée par le procédé conforme à la présente invention, le gène étant ainsi présent dans le génome de la cellule indifférenciée.

[0241] En outre, la présente invention comprend également le procédé de la présente invention pour la préparation d'une cellule indifférenciée, ledit procédé comprenant l'engagement de la cellule indifférenciée en une cellule réengagée et ensuite la fusion de la cellule réengagée avec un myélome. Cela permet l'expression in vitro de grandes quantités du produit désiré, tel qu'un anticorps, un antigène, une hormone, etc.

[0242] La présente invention comprend une cellule indifférenciée préparée par l'un quelconque de ces procédés conformes à la présente invention.

[0243] Dans une autre forme de réalisation, le dispositif et/ou le procédé conformes à la présente invention peuvent être utilisés pour cultiver efficacement des cellules mères érythroïdes pour la production d'érythrocytes, érythrocytes qui peuvent être utilisés à des fins de renouvellement en cas de pénurie par exemple dans des banques de sang. De manière convenable, un procédé conforme à la présente invention peut être utilisé pour produire des mégacaryocytes destinés à être utilisés dans la production de plaquettes.

[0244] Dans une autre forme de réalisation, le dispositif et/ou le procédé de la présente invention peuvent être utilisés dans la préparation de banques de cellules indifférenciées, c'est-à-dire de banques de cellules traitées.

[0245] D'autres aspects de la présente invention comprennent les suivants:

[0246] L'utilisation de n'importe lequel des agents de la présente invention pour la préparation d'une cellule indifférenciée à partir d'une cellule plus engagée.

[0247] L'utilisation d'une cellule indifférenciée produite conformément au procédé de la présente invention pour produire n'importe lequel des anticorps consistant en anticorps monoclonaux, anticorps polyclonaux ou anticorps spécifiques à partir d'un lymphocyte B ou d'un lymphocyte T; d'une cellule de la lignée des monocytes macrophages; d'une cellule nucléée capable d'exprimer des antigènes de catégorie I ou de catégorie II; d'une cellule apte à l'induction pour l'expression d'antigènes de catégorie I ou de catégorie II; d'une cellule énucléée; d'une cellule fragmentée ou d'une cellule apoptotique.

[0248] L'utilisation d'une cellule indifférenciée produite conformément au procédé de la présente invention pour la production de lymphocytes T effecteurs à partir de lymphocytes B et/ou vice versa.

[0249] L'utilisation d'une cellule indifférenciée produite conformément au procédé de la présente invention pour la production d'un ou plusieurs quelconques des agents suivants: un médicament, tel qu'un médicament comprenant ou préparé à partir d'un lymphocyte B, d'un lymphocyte T, d'une cellule, de la lignée des monocytes macrophages, d'une cellule nucléée capable d'exprimer un antigène de catégorie I ou de catégorie II, d'une cellule apte à l'induction pour l'expression d'un antigène de catégorie I ou de catégorie II ou d'une cellule énucléée.

[0250] La présente invention comprend également des procédés utilisant les utilisations précitées et les produits ou compositions préparés par ces procédés.

[0251] La présente invention comprend également un médicament comprenant une cellule indifférenciée conforme à la présente invention ou un produit pouvant être obtenu à partir de cette cellule, en mélange avec un diluant, support ou excipient convenable.

[0252] Dans une forme de réalisation préférée, le médicament comprend un anticorps ou antigène obtenu à partir d'une cellule indifférenciée conforme à la présente invention en mélange avec un diluant, support ou excipient convenable.

[0253] De préférence, le médicament est destiné au traitement de n'importe laquelle des maladies suivantes: un cancer, des maladies auto-immunes et des troubles sanguins; pour une régénérescence cellulaire ou tissulaire, pour une régénérescence d'organe, pour le traitement d'organes ou de tissus transplantés ou pour le traitement de troubles métaboliques congénitaux.

[0254] Les procédés de la présente invention et les produits obtenus par ces procédés, par exemple des cellules indifférenciées, peuvent être utilisés en recherche, par exemple pour étudier la rétrodifférenciation, la différenciation et identifier et étudier des antigènes du développement nouveaux et des antigènes de différenciation en amas.

IX Administration

[0255] Les cellules souches et cellules réengagées de la présente invention, ainsi que les agents qui se sont révélés provoquant la rétrodifférenciation de cellules, peuvent être utilisés dans des méthodes thérapeutiques. De préférence, les cellules ou agents de la présente invention sont associés à divers constituants pour produire des compositions conformes à la présente invention. Plus avantageusement, les compositions sont associées à un support ou diluant pharmaceutiquement

acceptable pour produire une composition pharmaceutique (qui peut être destinée à une utilisation chez l'homme ou des animaux). Des supports et diluants convenables comprennent le sérum physiologique isotonique, par exemple le sérum physiologique tamponné avec un phosphate. La composition de la présente invention peut être administrée par injection directe. La composition peut être formulée pour l'administration parentérale, intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée, intra-oculaire, orale ou transdermique.

[0256] Des compositions comprenant des cellules sont délivrées habituellement par injection ou implantation. Des cellules peuvent être délivrées en suspension ou incluses dans une matrice de support telle que des matrices biodégradables, naturelles et/ou synthétiques. Les matrices naturelles comprennent les matrices de collagène. Les matrices biodégradables synthétiques comprennent des polyanhydrides et un polymère d'acide lactique. Ces matrices assurent le support de cellules fragiles in vivo et sont préférées pour les cellules non hématopoïétiques.

[0257] L'administration peut également être effectuée par libération contrôlée, c'est-à-dire pendant une période de temps qui peut aller de plusieurs minutes à plusieurs heures ou plusieurs jours. L'administration peut être générale (par exemple par injection intraveineuse) ou bien dirigée à un site particulier intéressant.

[0258] Des cellules sont habituellement administrées à des doses de 1×10^5 à 1×10^7 cellules par kg. Par exemple, un patient de 70 kg peut recevoir 14×10^6 cellules CD34⁺ pour la reconstitution des tissus hématopoïétiques.

[0259] Les voies d'administration et les doses décrites sont destinées seulement à servir de guide puisque l'homme de l'art serait capable de déterminer aisément la voie optimale d'administration et la dose optimale pour n'importe quel patient particulier et n'importe quelle affection particulière.

[0260] Tous les procédés décrits en détail ci-dessous conviennent à l'utilisation avec un dispositif conforme à la présente invention.

A. Matériel et méthodes

Patients

[0261] Des échantillons de sang ont été obtenus dans des tubes contenant de l'EDTA à partir de patients souffrant de leucémies lymphocytaires chroniques à lymphocytes B, de patients présentant une déficience en anticorps (y compris une déficience en IgA et des hypogammaglobulinémies infantiles liées aux chromosomes X), de patients souffrant d'infections par le VIH et du syndrome du SIDA, d'un patient souffrant d'une infection par le CMV, d'un patient présentant des lymphomes de Hodgkin, d'un patient ayant une leucémie aiguë à lymphocytes T, d'un bébé âgé de 6 jours souffrant de blastocytose, de divers patients souffrant de différentes infections et de divers états cliniques, de sang de cordon, de moelle osseuse et de préparations enrichies en lymphocytes B provenant de donneurs de sang sains. En outre, des échantillons de couches leucocytaires sanguines ont été obtenus à partir de donneurs sains.

Conditions cliniques expérimentales

[0262] Les conditions cliniques et de traitement expérimental de patients, comprenant différents types de traitements appliqués à leurs échantillons de sang, sont décrites sur le tableau 1. Les différences de comptage de globules blancs (WBC) ont été obtenues en utilisant un compteur Coulter et ces valeurs sont incluses sur le même tableau.

Traitement du sang

[0263] Les échantillons de sang, une fois obtenus, ont été introduits dans une chambre conjointement avec un anticorps monoclonal pur contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR (DAKO) et ont été soumis à un mélange à température ambiante pendant un temps maximal de 24 heures. Certains échantillons ont été mélangés tout d'abord pendant 15 minutes, temps au bout duquel ils ont été laissés en incubation dans la chambre à 22°C. La concentration d'anticorps monoclonal ajoutée aux échantillons de sang varie de 10 à 50 μ l/ml de sang.

[0264] En outre, d'autres traitements ont été appliqués aux mêmes concentrations et ces traitements comprenaient l'addition d'un anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne α , de l'antigène HLA-DR, d'un anticorps monoclonal contre la région homogène d'antigènes de catégorie I, d'un anticorps monoclonal contre CD4, d'un anticorps monoclonal contre CD8, et d'un anticorps monoclonal, conjugué à du PE, contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR.

[0265] D'autres traitements comprenaient l'addition simultanée d'anticorps monoclonaux contre les régions homologues des chaînes α et β de l'antigène HLA-DR à des échantillons de sang.

[0266] En outre, des agents alkylants tels que le cyclophosphamide ont été ajoutés à des échantillons de sang en association avec un anticorps monoclonal pur contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR.

[0267] Après ces traitements, les échantillons de sang ont été colorés avec des gammes d'anticorps monoclonaux marqués suivant les instructions du fabricant et ont été ensuite analysés par cytométrie de flux.

[0268] Les périodes d'incubation avec les anticorps monoclonaux allaient d'intervalles de 2 heures, 4 heures, 6 heures, 12 heures à 24 heures.

Anticorps marques

[0269] Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés pour détecter les marqueurs suivants sur les cellules par cytométrie de flux: CD19 et CD3, CD4 et CD8, DR et CD3, CD56 & 16 et CD3, CD45 et CD14, CD8 et CD3, CD8 et CD28, témoin de test simultané (IgG1 FITC + IgG2a PE), CD34 et CD2, CD7 et CD13 & 33, CD10 et CD25, CD5 et CD10, CD5 et CD21, CD7 et CD5, CD13 et CD20, CD23 et CD57 et CD25 et CD45 RA (Becton & Dickenson et DAKO). Des marqueurs supplémentaires peuvent comprendre CD71 (marqueur des globules rouges), CD61 (marqueur des mégacaryocytes), la glycophorine A (marqueur des globules rouges), AC133 (marqueur des cellules souches), CD38 (marqueur des cellules souches primitives), CD90 (marqueur des cellules souches) et CD117 (marqueur des cellules souches pluripotentes).

[0270] Des échantillons de sang de chaque patient, traités et non traités, et comprenant chaque échantillon de couche leucocytaire, ont été analysés en utilisant une pluralité de la gamme précitée dans un dispositif conforme à la présente invention afin de tenir compte des variations immunophénotypiques accompagnant différents types de traitements et ces analyses ont été effectuées sur des portions aliquotes différentes du même échantillon de sang. Les échantillons non traités et d'autres échantillons de traitement témoins ont été colorés et analysés simultanément.

Cytométrie de flux

[0271] Un échantillon de sang entier a été coloré et lysé suivant les instructions du fabricant. L'analyse par cytométrie de flux a été effectuée sur un appareil FACScan® avec un logiciel simultest ou PAINT A GATE (BDIS) comprenant un suivi des témoins négatifs. 10 000 à 20 000 événements ont été acquis et stockés dans des fichiers en mode liste.

Morphologie

[0272] La morphologie était analysée par microscopie et au moyen du colorant de Wright.

Préparation de cellules souches a partir de lymphocytes B-CLL (ou normaux) enrichis ou purifiés ou a partir d'échantillons de couches leucocytaires sanguines

[0273] Des techniques aseptiques doivent être utilisées tout au long des modes opératoires suivants:

(A) Séparation des cellules mononucléées:**[0274]**

- (i) Obtenir des cellules mononucléées à partir d'échantillons de sang périphérique/couche leucocytaire par centrifugation sur un milieu de séparation Histopaque, Lymphoprep ou n'importe quel milieu de séparation de lymphocytes (densité 1,077) pendant 30 minutes à 400 x g.
- (ii) Recueillir les cellules mononucléées dans un tube conique de 50 ml et laver avec 30 ml de solution de sels équilibrée de Hank (dépourvue de Ca^{2+} et Mg^{+} , Sigma) contenant 2% de sérum de veau fœtal (SVF) activé par la chaleur et 2 mM d'EDTA ou 0,6% de citrate, et centrifugé à 400 x g pendant 10 minutes.
- (iii) Après lavage, compter les cellules et déterminer la viabilité au moyen de bleu Trypan et d'un hémocytomètre.
- (iv) Si la numération de lymphocytes B est élevée, supérieure à 70% ($20 \times 10^9/\text{l}$, WBC), passer directement à A (vi).
- (v) Si la numération des lymphocytes B est basse, inférieure à 70% ($20 \times 10^9/\text{l}$ WBC), effectuer une sélection négative en utilisant des microbilles Macs ou une technique de purification de Facs Vantage, de la manière décrite ci-dessous dans le paragraphe C.
- (vi) Remettre en suspension le culot cellulaire à une concentration de $3 \times 10^6/\text{ml}$ dans du milieu IMDM (100 µg/ml de streptomycine) contenant 10% de SVF (inactivé par la chaleur) et 10% de HS (inactivé par la chaleur), et introduire dans une poche à sang. Note: si on ne dispose ni de SVF ni de HS, utiliser 20% à 50% de plasma autologue.

Préparation de cellules souches (indifférenciées) dans des fractions de cellules mononucléées obtenues a partir d'échantillons de sang périphérique ou de patients souffrant de B-CLL

[0275] Suivre le protocole ci-dessus pour la séparation des cellules mononucléées (A), sauf qu'une sélection négative ne doit pas être effectuée lorsque la numération des globules blancs dépasse $20 \times 10^6/\text{ml}$, plus de 50% des globules blancs consistant en lymphocytes B.

[0276] Les modes opératoires suivants peuvent être mis en œuvre dans un dispositif conforme à la présente invention.

(B) Traitement des cellules en utilisant un anticorps monoclonal CR3/43 pur (Dako):

[0277] Après avoir réalisé la séparation des cellules mononucléées dans l'étape A (vi), mettre en œuvre les étapes suivantes:

- (i) Placer la poche de sang d'entrée [de l'étape A (vi) ci-dessus] sur le crochet de support.
- (ii) Utiliser une chambre avec six puits, programmer le dispositif pour l'introduction de 2 ml de la suspension cellulaire provenant de la poche de sang d'entrée [de l'étape A (vi) ci-dessus] dans chaque puits de ce plateau ou de cette chambre de culture à puits multiples.

- (iii) Programmer le dispositif pour traiter un nombre approprié de puits chacun avec 99 µl/ml (ou 49,5 µl/ml en ce qui concerne les échantillons de couches leucocytaires) d'anticorps CR3/43 (anticorps monoclonal pur, Dako) au moyen d'une seringue contenant le Acm CR3/43 et laisser les autres puits sans traitement (témoin négatif).
- (iv) Mettre en incubation la chambre dans une atmosphère à 5% de CO₂ à 37°C (ou 33°C) dans une atmosphère humide.

(C) Purification des cellules:

[0278] Divers procédés sont connus pour la séparation et la purification de cellules (voir Vettese-Dadey Scientist 13(18):21, 13 septembre 1999).

[0279] Un procédé convenable consiste en la sélection négative de lymphocytes B en utilisant des microbilles MACS (Miltenyi Biotec, le mieux consistant dans ce cas à suivre les instructions du fabricant):

- (i) Obtenir des cellules mononucléées comme dans le paragraphe A ci-dessus.
- (ii) Rassembler en un culot et remettre en suspension les cellules dans un volume final de 300 µl pour 10⁸ cellules totales dans du HBSS (consistant en 2% de SVF et 2 mM d'ETA ou 0,6% de citrate).
- (iii) Ajouter 100 µl pour 10⁸ cellules totales d'anticorps monoclonal pur contre CD2 (IgG1, DAKO).
- (iv) A la même suspension cellulaire, ajouter 50 µl pour 10⁸ cellules totales d'anticorps monoclonal pur contre CD33 (IgG1, DAKO).
- (v) Laisser le mélange en incubation pendant 10 minutes à température ambiante.
- (vi) Laver les cellules avec HBSS (contenant 2% de SVF et 2 mM d'EDTA) et remettre en suspension à une concentration finale de 400 µl pour 10⁸ cellules totales, avec le même tampon. Centrifuger à 400 x g pendant 10 minutes. Remettre le culot en suspension dans du HBSS (comme ci-dessus).
- (vii) Ajouter 100 µl de microbilles marguées avec une IgG1 de lapin anti-anticorps de souris pour 10⁸ cellules totales (ou suivre les instructions du fabricant).
- (viii) Mélanger énergiquement les cellules et mettre en incubation à une température de 6°C à 12°C (réfrigérateur) pendant 15 minutes.
- (ix) Laver de nouveau les cellules avec du HBSS (contenant 2% de SVF et 2 mM d'EDTA), centrifuger à 400 x g pendant 10 minutes et remettre en suspension à une concentration finale de 500 µl pour 10⁸ cellules totales avec le même tampon.
- (x) Assembler la colonne MS⁺/RS⁺ dans le champ magnétique du séparateur MACS. Si la numération de cellules mononucléées est élevée, utiliser deux colonnes MS⁺/RS⁺.
- (xi) Laver la colonne avec 3 ml de HBSS (contenant 2% de SVF et 2 mM d'EDTA).
- (xii) Passer les cellules à travers la colonne et ensuite laver avec 4x500 µl de HBSS (contenant 2% de SVF et 2 mM d'EDTA).
- (xiii) Eluer et recueillir les cellules dans un tube conique, puis rassembler en un culot et remettre en suspension dans du IMDM et placer dans une poche à sang comme dans le paragraphe A (vi).

(D) Lymphocytes B purifiés au moyen de FACS Vantage:

[0280]

- (i) Obtenir des cellules mononucléées à partir d'échantillons de sang périphérique provenant de patients B-CLL, de la manière décrite dans le paragraphe A ci-dessus.
- (ii) Colorer ces cellules avec une association d'anticorps monoclonaux conjugués CD19-PE et CD20-FITC pour identifier les lymphocytes B.
- (iii) Sur la base de la fluorescence de CD19/CD20, trier approximativement 10⁷ cellules en utilisant un FACS Vantage Beckton Dickenson et un laser à argon émettant à 488 nm.
- (iv) Laver les cellules purifiées avec une solution de sels équilibrée de Hank contenant 50% de SVF, puis laisser le rétablissement s'effectuer pendant une nuit à 37°C dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂.
- (v) Rassembler en un culot, remettre en suspension les cellules et introduire dans une poche à sang, de la manière décrite dans le paragraphe A (vi) ci-dessus, puis traiter avec CR3/43 de la manière décrite dans le paragraphe B ci-dessus.

Transformation de cellules souches en cellules du sang entier

[0281] Le traitement de cellules avec l'anticorps monoclonal CD3/43 pur (Dako) dans du sang entier peut être effectué dans un dispositif conforme à la présente invention:

- (i) Choisir des patients ayant des numérations de WBC de 30 à 200 x 10⁹/l (comprenant 73 à 95% de lymphocytes B).
- (ii) Recueillir le sang par ponction veineuse dans des tubes contenant de l'héparine sans citrate, EDTA ni conservateur, et placer le sang dans une poche à sang. De préférence, le sang recueilli est utilisé immédiatement, de manière convenable, approximativement dans les 6 heures suivant le prélèvement. Cependant, du sang stocké/congelé sous atmosphère d'azote peut également être utilisé après décongélation.
- (iii) Placer la poche à sang de l'étape (ii) comprenant le sang entier dans le dispositif conforme à la présente invention.

- (iv) La numération différentielle automatisée des globules blancs était effectuée en utilisant un compteur Coulter. Les patients ayant des numérations de globules blancs de 30 à 200 x 10⁶ par ml (dont 60 à 95% consistent en lymphocytes B) sont choisis de préférence.
- (v) La viabilité du sang peut également être déterminée automatiquement; des méthodes convenables comprennent l'utilisation d'iodure de propidium et de la cytométrie de flux ou l'utilisation de bleu Trypan et d'un hémocytomètre après la lyse des globules rouges en utilisant une solution de chlorure d'ammonium.
- (vi) L'anticorps CR3/43, est ajouté à un échantillon du sang entier dans la chambre du dispositif, à une concentration finale de 1 à 3 µl/10⁶ cellules (par exemple, si la numération de WBC est égale à 50 x 10⁹/l, alors 50 µl d'anticorps monoclonal CR3/43, à une concentration en IgG de souris de 159 µg/ml, doivent être ajoutés par ml de sang).
- (vii) Mélanger le sang et l'anticorps énergiquement en utilisant une pale dans la chambre du dispositif et laisser le mélange pendant une période de temps prédéterminée, non inférieure à 2 heures, à température ambiante, de préférence à une température comprise dans l'intervalle de 18°C à 37°C, dans la chambre d'incubation.
- (viii) Analyser les cellules sanguines par cytométrie de flux, des analyses clonales, une culture de longue durée et/ou une analyse PCT 0 heure, 2 heures, 6 heures et 24 heures après l'addition des Acn en utilisant les moyens de dépistage du dispositif.

[0282] Note: En raison de l'agrégation homotypique des lymphocytes B et de la formation de cellules adhérentes au fond du tube à essai, induites par le Acn CR3/43, mélanger énergiquement et échantillonner les cellules en utilisant des embouts de pipettes à large orifice avant l'analyse.

[0283] Afin d'obtenir une population uniforme de cellules pendant toute l'analyse, diviser l'échantillon de sang en portions aliquotes distinctes dans une pluralité de chambres avant le traitement avec CR3/43.

Préparation pour l'analyse de cellules souches produites en traitant des lymphocytes B en culture avec l'anticorps monoclonal CR3/43

[0284] Les cellules souches produites au moyen des procédés de la présente invention peuvent être évaluées à un certain nombre de points de temps, par exemple toutes les 2 heures, 7 heures ou 24 heures, chaque jour, tous les 7 jours ou des périodes plus longues (des mois, après alimentation chaque semaine des cellules avec du milieu de culture de longue durée). Un ou plusieurs puits de traitement et un ou plusieurs puits témoins peuvent être analysés à chaque point de temps, les puits de traitement et puits témoins restants étant analysés ensuite à des périodes de temps successives.

[0285] Cette évaluation peut également être effectuée automatiquement par des moyens de dépistage incorporés au dispositif de la présente invention.

- (i) Prélever doucement la couche non adhérente en utilisant une pipette à large orifice et dissocier les amas de cellules par aspiration répétée à travers une pipette à large orifice pour obtenir une suspension monocellulaire.
- (ii) Utiliser un racleur de cellules pour racle la couche adhérente et dissocier doucement les amas de cellules pour obtenir une suspension monocellulaire par aspiration répétée à travers une pipette à large orifice.
- (iii) En variante, traiter à la trypsine la couche adhérente tout d'abord par rinçage avec du HBSS et ensuite par introduction de 2 ml d'une solution à 0,25% de trypsine dans chaque puits, et mettre en incubation à 37°C pendant 10 minutes.
- (iv) Déranger doucement les amas de cellules par aspiration répétée dans une pipette à large orifice.
- (v) Au bout de 10 minutes, mettre en incubation avec 20% de SVF à une concentration finale pour inactiver la trypsine.
- (vi) Les cellules cultivées obtenues en (ii) ou (v) ci-dessus peuvent être réunies pour chaque type (c'est-à-dire cellules traitées et cellules non traitées) à chaque point de temps et centrifugées à 400 x g pendant 10 minutes.
- (vii) Pour l'analyse par PCR (voir C), le culot cellulaire (cellules traitées et cellules non traitées) obtenu en (vi) doit être utilisé directement.
- (viii) Pour l'analyse clonale, le culot cellulaire (cellules traitées et cellules non traitées) obtenu dans l'étape (ii) ou l'étape (v) ci-dessus est remis en suspension dans du milieu IMDM contenant 2% de SVF inactivé par la chaleur. Une petite portion aliquote de cellules peut être prélevée pour le comptage des cellules et pour déterminer leur viabilité en utilisant du bleu Trypan et un hémocytomètre.
- (ix) Pour l'analyse FACs, remettre en suspension le culot cellulaire (cellules traitées et cellules non traitées) obtenu dans l'étape (ii) ou l'étape (v) ci-dessus dans une solution de sels équilibrée de Hank (dépourvue de calcium et de magnésium) contenant 2% de SVF inactivé par la chaleur et 5 mM d'EDTA.

Analyse des cellules souches

[0286] Les méthodes suivantes peuvent être utilisées pour l'évaluation des cellules souches. Le dispositif conforme à la présente invention peut comprendre des moyens de dépistage pour la mise en œuvre des procédés ou d'une partie des procédés décrits en détail ci-dessous.

(A) Immunophénotype:

[0287] Pour l'analyse immunophénotypique (par cytométrie de flux) d'échantillons de sang entier:

- (i) Effectuer une immunocoloration (suivant les instructions du fabricant), lyser les érythrocytes et laver les cellules après la période d'incubation et traiter avec Acm. Les solutions de lyse et de lavage de Becton Dickinson peuvent être utilisées habituellement.
- (ii) Les leucocytes (dans le sang entier, fraction mononucléée, microbilles MACS, lymphocytes B sélectionnés négativement ou B-CLL triés) doivent être marqués avec des Acm conjugués directement à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou de la phyco-érythrine (PE).
- (iii) Les gammes de marqueurs utilisées dans l'analyse immunophénotypique peuvent être les suivantes:
 - CD38PE + CD45FITC + CD34PE-Cy5
 - CD 19 PE + CD 10 FITC + CD34 PE-Cy5
 - CD117PE + CD3FITC + CD34PE-Cy5
 - CD33PE + CD61FITC + CD34PE-Cy5
 - Glycophorine A PE + CD71 FITC + CD34 PE-Cy5
 - AC133PE + CD90FITC + CD34PE-Cy5
 - CD19PE + CD5FITC
 - IgG1 PE + IgG1 FITC + IgG1 PE-Cy5 (témoin négatif d'isotype)
- (iv) Le double marquage au moyen du kit IMK+ (Becton Dickinson) peut être effectué en utilisant les paires d'anticorps monoclonaux suivantes:
 - CD45-FITC et CD14-PE;
 - CD19-PE et CD3-FITC;
 - CD8-PE et CD4-FITC;
 - HLA-DR-PE et CD3-FITC; et
 - CD56, CD16-PE et CD3-FITC.
 En outre, des témoins négatifs de concordance d'isotypes pour IgG₁-FITC et IgG_{2a}-PE sont inclus.
- (v) Les anticorps supplémentaires suivants qui sont produits par Dako et par Becton Dickinson peuvent également être utilisés:
 - conjugués au PE: anti-CD8, anti-CD33, anti-13, anti-CD34, anti-CD19, anti-CD2, anti-CD14, anti-CD33 et anti-CD5;
 - conjugués au FITC: anti-CD3, anti-CD7, anti-IgM, anti-CD22, anti-CD20, anti-CD10, anti-CD7, anti-CD16, anti-TCR $\alpha\beta$.
- (vi) Les anticorps suivants peuvent également être utilisés.
 - Un Acm IgG₃ purifié également par affinité spécifique de CD34 (Dako) peut être utilisé et détecté avec un fragment F(ab)₂ d'immunoglobuline de chèvre antianticorps de souris marqué au FITC ou au PE comme anticorps secondaire (DAKO).
 - Un anticorps anti-CD34 conjugué à du rouge Quantum (PE-Cy5) (Dako) a été également utilisé.
- (vii) Analyser les cellules au moyen d'un appareil FACScan ou FACS Vantage (Becton Dickinson) ou de n'importe quel cytomètre de flux. Un nombre égal d'événements correspondant à 100 000 cellules doit être analysé et le temps doit être noté.
- (viii) Analyser les données en utilisant des logiciels du commerce Paint-a-Gate, Lysis II, Consort 30 et CellQuest.

[0288] Pour l'analyse immunophénotypique (par cytométrie de flux) d'échantillons de couches leucocytaires, par exemple:

- (i) Effectuer une immunocoloration (suivant les instructions du fabricant), lyser les érythrocytes et laver les cellules après la période d'incubation et traiter avec un Acm. Des solutions de lyse et de lavage de Becton Dickinson peuvent être utilisées habituellement.
- (ii) Les leucocytes doivent être soumis à un marquage double ou unique avec des Acm conjugués directement à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), de la phyco-érythrine (PE) ou du RPE-Cy5.

[0289] Les marqueurs suivants peuvent être utilisés convenablement:

CD34 (marqueur des cellules souches), CD19 (marqueur des lymphocytes B), CD45 (marqueur des leucocytes), CD3 (marqueur de lymphocytes T), CD33 (marqueur des myélocytes), CD71 (marqueur des globules rouges), CD61 (marqueur des mégacaryocytes), glycophorine A (marqueur des globules rouges), AC133 (marqueur des cellules souches), CD38 (marqueur des cellules souches primitives), CD90 (marqueur des cellules souches), CD10 (marqueur des cellules souches lymphoïdes), CD117 (marqueur des cellules souches pluripotentes), IgG1 (témoin négatif).

(B) Morphologie:

[0290] Pour l'analyse morphologique:

[0291] Microscopie optique

- (i) Remettre en suspension les cellules énergiquement dans du milieu IMDM contenant 2% de SVF inactivé par la chaleur en utilisant des embouts de pipettes à large orifice.
- (ii) Examiner sous un microscope Leitz en utilisant une solution colorante appropriée; par exemple, la solution colorante de May et Greenwald (BDH Chemical Ltd) peut être utilisée pour l'analyse des cellules myéloïdes et des cellules lymphoïdes. L'homme de l'art déterminera aisément d'autres colorants convenables pour l'identification d'autres colonies, par exemple le colorant de Wright ou le colorant de Giemsa.

- (iii) L'analyse morphologique des lymphocytes B-CLL peut être effectuée, respectivement, dans des frottis sanguins ou des préparations cytocentrifugées.

[0292] Microscopie confocale

- (i) Obtenir des lymphocytes B de la manière décrite ci-dessus (lymphocytes B-CLL ou lymphocytes B sains obtenus à partir de la couche leucocytaire de donneurs de sang sains).
- (ii) Traiter les lymphocytes B avec l'anticorps monoclonal CR3/43 de la manière décrite ci-dessus.
- (iii) Introduire 2 ml de suspension cellulaire dans une boîte de culture d'organes (le fond de cette boîte est modifié de manière à porter une lamelle).
- (iv) Ajouter 15 µl d'anticorps monoclonal au conjugué CD19-FITC et 15 µl d'anticorps monoclonal au conjugué CD34 PE/Cy5 (Quantum Red).
- (v) Utiliser de l'iodure de propidium pour déterminer la viabilité et du colorant de Hoechst pour colorer les noyaux.

(C) Analyse par PCR du réarrangement de gènes VDJ/JHF

[0293] La région VDJ et/ou la région JHF du gène IgH ont été analysées par PCR (à cycles thermiques Perkin Elmer) en utilisant de l'ADN de matrice provenant d'échantillons de sang périphérique B-CLL et de couche leucocytaire avant et après (2 heures, 6 heures et 24 heures) traitement avec l'anticorps. Ce protocole est une adaptation du protocole de Stolc et al. (American Journal of Hematology 38:1–8, 1991). Les amorces JHF sont utilisées pour la détection positive du gène de chaîne lourde d'immunoglobuline dans une configuration de lignée germinale. L'amorce JH6 est utilisée comme témoin interne positif pour le gène de chaîne lourde d'immunoglobuline. Dans les lymphocytes B, dans les lymphocytes de sujet leucémique et également dans les lymphocytes normaux, la région JHF est toujours éliminée par délétion et, en conséquence, ne peut être amplifiée, tandis que le gène JH6, servant de témoin interne, reste intact. Le gène de β -actine est utilisé comme témoin.

- (i) Isoler l'ADN génomique du sang entier en utilisant le kit d'analyse de sang Qiagen QiAmp Maxi. Utiliser le protocole de rendement maximal. Extraire la totalité de l'ADN de chaque échantillon (échantillon traité et échantillon non traité).
- (ii) Analyser à l'état pur et sur des dilutions dans le rapport 1:5 d'ADN sur un gel à 1,5% d'agarose pour déterminer la concentration et la qualité.
- (iii) PCR-chauffer 2 à 3 µl de matrice d'ADN génomique pure à 96°C pendant 5 minutes.

I) JH6a/JH6g, JHFα/JHFg

[0294] Préparer un «mélange-maître» suffisant pour 4 patients (8 mélanges réactionnels traités et non traités) suivant le tableau décrit en détail ci-dessous. Cette préparation peut être effectuée à plus grande ou plus petite échelle de la manière appropriée.

	Volume/µl	[final]
Eau dépourvue de nucléases	370	–
Tampon de PCR 10 x	80	1x
MgCl ₂ 25 mM*	64	2 mM
dNTP 5 mM*	128	0,8 mM
P1 10 µM	80	1 µM
P2 10 µM	80	1 µM
Pol. Taq 5 U/µl	2	10 unités

* Agiter par tourbillonnement les tubes 2 ou 3 fois à chaque fois pendant 5 secondes avant utilisation pour équilibrer l'échantillon.

[0295] Introduire une portion aliquote de 95 µl de «mélange-maître» dans chaque tube contenant l'ADN génomique dénaturé. Régler l'appareil de cycles thermiques à 95°C pendant 1 minute 30 secondes; 55°C pendant 2 minutes; 72°C pendant 1 minute 30 secondes (35 cycles) et 72°C pendant 5 minutes (1 cycle).

II) β -actine

[0296] Préparer un «mélange-maître» suffisant pour 8 réactions de la manière décrite dans le paragraphe I) ci-dessus. Effectuer la préparation à plus grande ou plus petite échelle de la manière appropriée.

	Volume/ μ l	[final]
Eau dépourvue de nucléases	380	—
Tampon de PCR 10 x	80	1x
MgCl ₂ 25 mM*	48	1,5 mM
dNTP 5 mM*	128	0,8 mM
P1 10 μ M	80	1 μ M
P2 10 μ M	80	1 μ M
Pol. Taq 5 U/ μ l	2	10 unités

* Agiter par tourbillonnement les tubes 2 ou 3 fois à chaque fois pendant 5 secondes avant utilisation pour équilibrer l'échantillon.

[0297] Introduire une portion aliquotée de 95 μ l de «mélange-maître» dans chaque tube contenant l'ADN génomique dénaturé. Régler l'appareil de cycles thermiques à 95°C pendant 1 minute 30 secondes; 55°C pendant 2 minutes; 72°C pendant 1 minute 30 secondes (25 cycles) et 72°C pendant 5 minutes (1 cycle).

Amorces de PCR

[0298] La première série d'amorces, conçue pour amplifier un fragment de 240 pb du gène IgH JHF était la suivante:

JHFa AAA GGT GCT GGG GGT CCC CTG

JHfB CCCAGTGCTGGAAGTATTCAGC

[0299] La deuxième série d'amorces, conçue pour amplifier un fragment de 242 pb de la région de jonction 6 du gène IgH JHF était la suivante:

JH6a CAT TGT GAT TAC TAC TAC TAC TAC

JH6b GAT CCT CAA GGC ACC CCA GTG C

[0300] La troisième série d'amorces, conçue pour amplifier un fragment de 249 pb du gène de β -actine, était la suivante:

Beta ACT-1 AAG GCC AAC CGC GAG AAG AT

Beta ACT-2 TCG GTG AGG ATC TTC ATG AG

(D) Analyse de réarrangement de gène VDJ par transfert d'empreinte par la méthode Southern

[0301]

- Digérer l'ADN génomique d'échantillons de sang périphérique traités et non traités ou de lymphocytes B purifiés (de patients B-CLL) en utilisant BamHI/HindII – habituellement, les cellules d'un certain nombre de puits sont nécessaires pour obtenir une quantité d'ADN suffisante pour effectuer l'analyse.
- Les produits de digestion ont été séparés sur des gels à 0,8% d'agarose et transférés à des membranes en Nylon GeneScreen® (Dupont) suivant les instructions du fabricant (Southern, 1975).
- Le réarrangement du gène IgH peut être caractérisé en analysant la région J du locus IgH, au moyen d'une sonde d'ADN J_H humaine marquée au ³²P isolée d'ADN génomique placentaire (Calbiochem, Oncogene Science).
- Les autoradiographies doivent être maintenues à -70°C pendant plusieurs jours avant le développement.

(E) Culture de longue durée:

[0302] Les cultures cellulaires préparées de la manière décrite ci-dessus peuvent être maintenues pendant des périodes de temps plus longues (culture à long terme) par alimentation chaque semaine avec du milieu de culture de longue durée (milieu de Dulbecco modifié selon Iscove (IMDM - Gibco BRL Life Technologie Ltd) avec 10% de SVF activé par la chaleur, 10% de sérum de cheval (HS) activé par la chaleur, 1% d'hydrocortisone et 1% de pénicilline/streptomycine solution concentrée à 5 $\times$ 10⁻⁷ M).

- Tout d'abord, après un certain point de temps, par exemple de 24 heures, par rapport au début du traitement avec CR3/43, diluer les cellules dans chaque puits en ajoutant 2 ml de milieu de culture de longue durée.
- Nourrir les cellules présentes dans les puits chaque semaine après prélèvement de la moitié du milieu de croissance.
- Examiner les puits par microscopie à contraste de phase.

(F) Analyses clonales:**[0303]**

- (i) Après chaque période de temps depuis le début du traitement, 300 µl du milieu de culture des cellules non adhérentes peuvent être obtenus de la manière décrite ci-dessus.
- (ii) Ajouter à la suspension cellulaire dans le milieu de culture ci-dessus 3 ml de Methocult GFH4 434 (StemCell Technologies, consistant en méthylcellulose dans du IMDM, SVF, SAB, L-glutamine, facteur de cellules souches rh, GM-CSF rh, IL-3 rh et érythropoïétine rh).
- (iii) Prélever 1,1 ml de mélange cellulaire et étaler en triple sur des plaques.
- (iv) Mettre les plaques en incubation à 37°C dans une boîte de Pétri humidifiée avec 5% de CO₂ et 5% de O₂ pendant 14 jours.
- (v) Examiner les puits avant et après traitement avec l'anticorps monoclonal CR3/43 par microscopie à contraste de phase.
- (vi) Au bout de 14 jours, les cellules (colonies) peuvent être analysées par cytométrie de flux, microscopie confocale et/ou PCR.
- (vii) Lors de la mise en œuvre de l'analyse clonale, un aérosol d'alcool doit être évité, car cela provoque une aggrégation ou une destruction des cellules, entravant la survie des deux types de cellules (traitées et non traitées).

B. Resultats**GAMME CD19 et CD3**

[0304] Le traitement d'échantillons de sang dans le dispositif conforme à la présente invention avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR a toujours provoqué une diminution du nombre relatif de cellules CD19⁺. Ce marqueur est un antigène de tous les lymphocytes B (voir les tableaux). Cet antigène est présent sur tous les lymphocytes B humains à tous les stades de maturation, mais est perdu sur les cellules plasmiques à différenciation terminale. En conséquence, cela constitue une indication que les lymphocytes B ont subi une rétrodifférenciation en cellules indifférenciées.

[0305] Le même traitement a provoqué une augmentation considérable du nombre relatif de cellules CD3⁺ notamment dans le sang de patients souffrant de B-CLL, qui était toujours accompagnée par une augmentation du nombre relatif de cellules CD3⁺CD19⁻. CD3 est présent sur tous les lymphocytes T matures et sur 65% à 85% des thymocytes. Ce marqueur est toujours présent en association avec des récepteurs de lymphocytes T α/β ou gamma/delta (TCR) et, conjointement, ces complexes sont importants dans l'introduction de signaux à l'intérieur de la cellule. En conséquence, cela constitue une indication que les lymphocytes B ont subi une rétrodifférenciation en cellules indifférenciées et ont été ensuite engagés en cellules différenciées nouvelles, à savoir des lymphocytes T.

[0306] Un clone nouveau de cellules est apparu dans le sang traité de patients souffrant de B-CLL exprimant conjointement les marqueurs CD19 et CD3 – c'est-à-dire de cellules CD19⁺ et CD3⁺ (voir le schéma 1, patient 2, 3 et 4 à 2 heures, 6 heures et 24 heures après le début du traitement), traitement qui peut être effectué dans le dispositif conforme à la présente invention. D'autres patients souffrant d'affections différentes ont présenté une augmentation du nombre relatif de ces clones de cellules. Ces cellules étaient exceptionnellement volumineuses et fortement granuleuses et des taux extrêmement élevés de CD19 ont été exprimés sur leurs membranes cellulaires. Il semble que le marqueur CD3 soit exprimé sur ces cellules à des teneurs similaires à celles exprimées sur les lymphocytes matures normaux.

[0307] Sur le tableau 2, les numéros de patient 2, 3 et 4 sont en réalité des numéros représentant le même patient et leur indication était simplement destinée à mettre en évidence l'effet du traitement sur le sang au cours du temps (voir le tableau 1 pour la partie expérimentale et l'état clinique de ce patient).

[0308] Les clones CD19⁺CD3⁺ dans les échantillons traités semblent diminuer au cours du temps, en atteignant des taux initiaux égaux à ceux déterminés dans les échantillons non traités au bout de 2 heures, 6 heures et 24 heures.

[0309] Un autre type de cellule de même dimension et de même granularité a été détecté dans les échantillons traités et ces cellules avaient des taux élevés CD19 exprimés sur leur surface, mais étaient négatives en ce qui concerne le marqueur CD3 et étaient riches en récepteurs FC. Cependant, le nombre relatif de ces cellules s'est révélé diminuer au cours du temps. Il est intéressant de noter qu'au bout de 24 heures de traitement de l'échantillon de sang (2, 3 et 4), il se produit une diminution du nombre relatif de cellules CD19⁺CD3⁻ dans un groupe de cellules pour lequel avait été observée initialement une augmentation après 2 et 6 heures de traitement des échantillons de sang. Cependant, les numérations de populations de WBC au moyen d'un compteur Coulter ont été réduites lors du traitement du sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β dans l'antigène HLA-DR. Cette découverte suggère que ce type de traitement engendre des cellules atypiques qui ne peuvent être détectées au moyen d'un compteur Coulter (tableau 1), mais qui peuvent être prises en considération lors de la mesure par cytométrie de flux qui compte les cellules sur la base de marqueurs de surface, des dimensions et de la granularité. En outre, ces cellules atypiques ont été prises en compte par analyse de la morphologie en utilisant le colorant de Wright sous un microscope. Les diagrammes de cytométrie de flux de ces phénomènes sont représentés sur les schémas 1, 2, 3 et 4 et les modifications immunophénotypiques obtenues lors du traitement des échantillons de sang semblent suggérer que les lymphocytes CD19⁺ et CD3⁺ constituent un groupe

interconnecté de cellules, mais restent distincts sur la base de l'expression relative de CD19 et CD3 comparativement aux cellules souches.

[0310] Sur le tableau 2, les numéros de patient 5 et 6 représentent le même patient, mais les analyses d'échantillons de sang traités et d'échantillons de sang non traités ont été contrôlées au cours du temps et en même temps (voir le tableau 1).

[0311] Des échantillons de sang de patients ne présentant aucun état malin à lymphocytes B ont présenté des tendances similaires de modifications immunophénotypiques comparativement au sang de patients souffrant de B-CLL, mais les variations n'étaient pas de la même ampleur. Cependant, le nombre relatif et le nombre absolu de lymphocytes B et de cellules positives en ce qui concerne le CMH,- de catégorie II dans le sang de ces patients sont extrêmement bas comparativement à ceux trouvés dans le sang de patients souffrant de B-CLL.

[0312] Deux frères souffrant tous deux d'une hypogammaglobulinémie infantile liée aux chromosomes X, qui présentaient une déficience en lymphocytes B ont présenté des modifications immunophénotypiques différentes en ce qui concerne le nombre relatif de cellules CD3⁺ lors du traitement de leur sang. Le plus jeune frère qui était âgé de 2 mois et qui n'était pas malade, lors du traitement de son sang, a présenté une légère augmentation du nombre relatif de cellules CD3⁺ qui était accompagnée par une diminution du nombre relatif de cellules CD3⁺CD19⁻. D'autre part, l'autre frère qui était âgé de 2 ans et qui était extrêmement malade et qui présentait un nombre relativement élevé de lymphocytes T activés exprimant les antigènes DR a présenté une diminution du nombre de cellules CD3⁺ lors du traitement de son sang. Aucun autre marqueur n'a été utilisé pour mesurer d'autres modifications immunophénotypiques qui pourraient s'être produites car les échantillons de sang obtenus à partir de ces deux patients étaient extrêmement petits (tableau 2, ID 43/BD et 04/BD).

[0313] Le patient 91 sur le tableau 2 présente une diminution du nombre relatif de cellules CD3⁺ après le traitement du sang, qui est accompagnée par une augmentation du nombre relatif de cellules CD3⁺CD19⁻. Cependant, lors de l'analyse d'autres marqueurs de surface tels que CD4 et CD8 (voir le tableau 3), il a été observé que le patient présentait un nombre relatif élevé de cellules CD4⁺CD8⁺ dans son sang et cela a été noté avant le traitement des échantillons de sang avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène DR et ces cellules doublement positives ont diminué de manière appréciable après le traitement du sang. En outre, lorsque d'autres marqueurs ont été analysés, il a été constaté une élévation du nombre relatif de cellules CD3⁺ (voir le tableau 4).

[0314] Une préparation enrichie de lymphocytes B obtenue de donneurs de sang sains, lors du traitement avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β d'antigènes DR dans un dispositif conforme à la présente invention, a présenté une augmentation considérable du nombre relatif de cellules CD3⁺ qui était toujours accompagnée par une diminution du nombre relatif de cellules CD19⁺ et par une augmentation du nombre relatif de cellules CD19⁺CD3⁻. Une analyse supplémentaire au moyen de marqueurs tels que CD4 et CD8 met en évidence une augmentation concomitante du nombre relatif de ces marqueurs. Cependant, une préparation enrichie de lymphocytes T des mêmes donneurs de sang, lors du traitement avec le même anticorps monoclonal, n'a pas présenté les mêmes variations.

GAMME CD4 ET CD8

[0315] L'antigène CD4 est le récepteur du virus de l'immunodéficience humaine. La molécule CD4 se lie à l'antigène de CMH de catégorie II dans le domaine B2, une région qui est similaire aux sites de liaison de CD8 sur les antigènes de catégorie I. La liaison de CD4 à l'antigène de catégorie II augmente la capacité de réponse des lymphocytes T aux antigènes et, ainsi, la liaison de CD8 aux antigènes de catégorie I. Les antigènes CD8 sont présents sur la sous-catégorie de lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques humains ainsi que sur une sous-catégorie de lymphocytes tueurs naturels (NK) et la plupart des thymocytes normaux. Les antigènes CD4 et CD8 sont coexprimés sur les thymocytes et ces cellules perdent chaque marqueur lors de leur maturation en lymphocytes T.

[0316] Lors de l'analyse des marqueurs CD4 et CD8 – voir ci-dessous – et à partir de la plupart des échantillons de sang présentés sur le tableau 2, il apparaît un motif de coloration qui vient à l'appui de la présence d'un processus de rétrodifférenciation des lymphocytes B en cellules indifférenciées et de la différenciation ultérieure en lymphocytes T.

[0317] Les cellules CD4⁺CD8⁺, qui sont des cellules doublement positives, sont toujours apparues après le traitement des échantillons de sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β et ces types de cellules ont été fortement accrus dans le sang d'échantillons traités de patients souffrant de B-CLL et étaient totalement absents dans les échantillons non traités (voir le tableau 3 et les schémas 1, 2, 3 et 4). Dans les mêmes échantillons, il a été également noté l'augmentation simultanée du nombre relatif de cellules positives uniques telles que les cellules CD8⁺ et CD4⁺. En outre, il a été noté une diminution considérable du nombre relatif de cellules CD4⁺CD8⁻ qui, au moins dans le cas de B-CLL, correspondent aux lymphocytes B, dans les échantillons traités comparativement aux échantillons non traités qui sont restés au même taux lors de la mesure au cours du temps. Cependant, la mesure du nombre relatif de cellules CD4⁺CD8⁺ au cours du temps dans les échantillons traités a montré qu'il existait une augmentation concomitante du nombre de cellules positives uniques avec une diminution du nombre relatif de cellules doublement positives. Ce type de variation immunophénotypique est caractéristique du développement thymique des cellules mères de la lignée des lymphocytes T dans le thymus (patients numéros 2, 3 et 4). L'antigène CD4 est présent sur les sous-catégories de lymphocytes T auxiliaires/inducteurs (CD4⁺CD3⁺) et la plupart des thymocytes normaux. Cependant, cet antigène est présent à une faible densité sur la surface cellulaire des monocytes et dans le cytoplasme des monocytes et des macrophages (CD3⁺CD4⁺).

[0318] Le nombre relatif de cellules CD4⁺ low a été affecté différemment dans des échantillons de sang différents après traitement dans le dispositif conforme à la présente invention. Le nombre relatif de ce type de cellules semble être non affecté dans les échantillons de sang de patients souffrant de B-CLL après traitement, comparativement aux échantillons non traités. Ces faibles taux d'expression de CD4 sont observés sur les monocytes et les thymocytes très précoces.

[0319] Le patient HIV⁺25, par traitement, a présenté une augmentation importante du nombre de cellules doublement positives exprimant simultanément CD4 et CD8. D'autre part, le patient 91, par traitement, a présenté une diminution de son sous-type de cellules et l'observation de ce phénomène est sous la dépendance du temps. Il a été observé une augmentation du nombre relatif de cellules CD8⁺ dans les échantillons de sang non traités de patients souffrant de B-CLL lors de la mesure au cours du temps, tandis qu'il a été observé une diminution du nombre relatif de cellules CD4⁺ et CD4⁺low pendant les mêmes temps (tableau 3, patients 2, 3 et 4).

GAMME DR ET CD3

[0320] Les marqueurs DR sont présents sur les monocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés.

[0321] Des échantillons traités et des échantillons non traités analysés avec cette gamme ont présenté des variations immunophénotypiques similaires à celles obtenues lorsque des échantillons de sang ont été analysés avec les marqueurs CD19 et CD3 (voir le tableau 2) et ces antigènes, de la manière mentionnée précédemment, consistent, respectivement, en marqueurs des lymphocytes T et B pan.

[0322] Le traitement du sang dans un dispositif conforme à la présente invention avec des anticorps monoclonaux semble affecter le nombre relatif de lymphocytes B DR⁺, ce qui fait que la quantité de cellules DR⁺ diminue. A l'opposé, le nombre relatif de cellules CD3⁺ (lymphocytes T) augmente de manière significative (voir le tableau 4 et le schéma). En outre, le nombre relatif de lymphocytes T activés a augmenté dans la plupart des échantillons de sang traités de patients souffrant de B-CLL et ces types de cellules ont été affectés de manière variable dans les échantillons traités de patients souffrant d'autres affections.

[0323] En outre, le nombre relatif de cellules hautement positives DR est apparu dans des nombres importants d'échantillons traités de patients souffrant de B-CLL et chez un bébé âgé de 6 jours avec une augmentation du nombre de blastocytes DR⁺CD34⁺ dans son sang. Cependant, il faut noter que les blastocytes qui étaient présents dans le sang de ce patient étaient négatifs pour les marqueurs de lymphocytes T et B avant et après traitement, mais sont devenus plus positifs pour les antigènes de la lignée myéloïde après traitement. Le nombre relatif de cellules CD3⁺DR⁺ a augmenté dans la plupart des échantillons de sang traités et était proportionnel aux augmentations du nombre relatif de cellules CD3⁺ (lymphocytes T) et était inversement proportionnel aux diminutions du nombre relatif de cellules DR⁺ (lymphocytes B).

GAMME CD56&16 ET CD3

[0324] Les marqueurs CD56&CD16 sont présents sur un groupe hétérogène de cellules, une sous-catégorie de lymphocytes connus généralement sous le nom de lymphocytes granulaires volumineux et lymphocytes tueurs naturels (NK). L'antigène CD16 est exprimé sur pratiquement tous les lymphocytes NK au repos et est faiblement exprimé sur certains lymphocytes T CD3⁺ provenant de certains individus. Cet antigène est présent sur les granulocytes en une plus petite quantité et est associé aux lymphocytes contenant des granules azurophiles volumineux. L'antigène CD16 est le récepteur FC de IgG III.

[0325] Un nombre variable de lymphocytes CD16⁺ effectue la coexpression de l'antigène CD57 ou de l'antigène CD8 basse densité ou bien de ces deux antigènes. Chez la plupart des individus, il n'existe pratiquement aucun chevauchement avec d'autres antigènes de lymphocytes T tels que les antigènes CD5, CD4 ou CD3. L'antigène CD56 est présent sur pratiquement tous les lymphocytes NK CD16⁺ au repos et activés et ces sous-catégories de cellules portent une cytotoxicité restreinte du complexe non majeur d'histocompatibilité.

[0326] L'immunophénotypage d'échantillons de sang traités et d'échantillons de sang non traités de patients souffrant de B-CLL et de certains autres patients souffrant d'autres affections a mis en évidence une augmentation du nombre relatif de cellules exprimant conjointement les antigènes CD56 et CD16 qui étaient fortement granuleuses et de dimensions moyennes (voir le tableau 5 et les schémas 1, 2, 3 et 4). Ces observations ont été également accompagnées par une forte augmentation du nombre relatif de cellules exprimant l'antigène CD3 seulement (sans l'expression des marqueurs CD56 et CD16) et de cellules exprimant conjointement les marqueurs CD56&CD16 et CD3 ensemble.

[0327] Sur le tableau 5, les numéros de patient 2, 3 et 4 représentent le même échantillon de sang, mais analysé, respectivement, au bout de 2 heures, 6 heures et 24 heures (avant et après traitement). Cet échantillon montre que le traitement du sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR semble provoquer la production spontanée de cellules CD56⁺ et CD16⁺, de cellules CD3⁺ et CD56⁺ et de cellules CD16⁺ et CD3⁺ et ces observations ont été toujours accompagnées par la disparition des marqueurs de lymphocytes B (CD19, DR, CD56, CD16⁺CD3⁺).

[0328] La poursuite de l'analyse de cet échantillon de sang avant et après traitement a montré que les taux de cellules CD56⁺ et CD16⁺ diminuent au cours du temps et que le taux de cellules CD3⁺ augmente au cours du temps.

[0329] Des échantillons de sang du patient 7 souffrant de B-CLL n'ont présenté aucune variation du nombre de cellules exprimant les antigènes CD56, CD16 et CD3 comparativement aux variations immunophénotypiques observées dans les échantillons traités et échantillons non traités et cela est dû au fait que la quantité d'anticorps monoclonal ajoutée est extrêmement faible par rapport au nombre de lymphocytes B. Cependant, le traitement d'un échantillon de sang de ce patient à une autre occasion avec une quantité appropriée d'anticorps monoclonal a mis en évidence des augmentations significatives du nombre relatif de cellules CD3⁺, CD56⁺&CD16⁺ et CD56⁺ et CD16⁺CD3⁺.

[0330] Des échantillons de sang d'autres patients souffrant d'autres affections ont présenté des modifications variables du taux de ces cellules et cela semble dépendre du nombre de lymphocytes B présents dans le sang avant traitement, de la durée du traitement et probablement de l'état clinique des patients.

GAMME CD45 ET CD14

[0331] L'antigène CD45 est présent sur tous les leucocytes humains, comprenant les lymphocytes, les monocytes, les cellules polynucléées, les cellules éosinophiles et les cellules basophiles dans le sang périphérique, le thymus, la rate et les amygdales, et les cellules mères des leucocytes dans la moelle osseuse.

[0332] L'antigène CD14 est présent sur 70% à 93% des lymphocytes de sang périphérique normaux, 77% à 90% des phagocytes du fluide pleural ou péritonéal. Cet antigène est faiblement exprimé sur les granulocytes et n'existe pas sur les lymphocytes non stimulés, les lymphocytes T activés avec un agent mitogène, les érythrocytes ou les plaquettes.

[0333] L'antigène CD45 représente une famille de protéine-tyrosine-phosphatases et cette molécule interagit avec des stimuli extérieurs (antigènes) et effectue la transduction de signaux par l'intermédiaire des membres de la famille Src conduisant à la régulation de la croissance et de la différenciation des cellules.

[0334] L'enrôlement de la chaîne β des antigènes DR dans des échantillons de sang traités, notamment ceux obtenus à partir de patients souffrant de B-CLL, suggère qu'un tel traitement a une influence sur le taux d'antigènes CD45 sur les lymphocytes B. Les variations immunophénotypiques totales qui ont eu lieu lors de la stimulation de la chaîne β dans l'antigène DR semblent engendrer des types différents de cellules qui peuvent être séparés sur la base du taux d'expression CD45 et CD14 ainsi que sur la base de la morphologie de la manière déterminée par diffusion directe et diffusion latérale (respectivement dimensions et granularité) et ces résultats sont présentés sur le tableau 6 et les schémas 1, 2, 3 et 4. Voir également la fig. 7 qui démontre l'apparition de cellules CD45⁺CD14⁺ après traitement avec l'anticorps CR3/43. Ces cellules ne sont pas des cellules hématopoïétiques.

[0335] Lors du traitement dans le dispositif conforme à la présente invention, le nombre relatif de cellules CD45^{low} (comparativement aux échantillons non traités) a augmenté fortement et, de même le nombre relatif de cellules exprimant conjointement les antigènes CD45 et CD14. Ce type de variations immunophénotypiques coïncidait avec une diminution du nombre relatif de cellules CD45^{high} (comparativement aux échantillons non traités). Cependant, cette dernière population de cellules peut être divisée en outre sur la base de la morphologie et du degré d'expression de CD45. Un type était extrêmement important et avait des taux extrêmement élevés d'antigène CD45 comparativement au reste des cellules présentes sur les schémas (voir les schémas 1, 2, 3 et 4). Lors de l'analyse de cette gamme après traitement au cours du temps (voir le tableau 6, patient 2, 3 et 4 et le schéma 1), le nombre relatif de cellules CD45⁺ a diminué initialement de manière drastique au cours du temps en donnant des cellules CD45^{low}. Cependant, l'analyse du sang 24 heures plus tard a mis en évidence le cas opposé.

[0336] Les échantillons 5 et 7 révèlent des modifications immunophénotypiques opposées à celles obtenues avec d'autres échantillons obtenus à partir d'autres patients souffrant de B-CLL et cela est dû au fait que les échantillons ont été analysés à un temps d'incubation beaucoup plus précoce avec l'anticorps monoclonal. En fait, l'analyse séquentielle d'échantillons de sang après traitement semble suggérer que les variations immunophénotypiques effectuées par les lymphocytes B dépendent du temps car cela représente un stade de développement et les variations immunophénotypiques mesurées au temps X ne sont pas de la même ampleur qu'au temps X plus (non fixées une fois induites). Cependant, ces types de variations doivent se produire d'une manière plus drastique dans l'organisme car, dans le cas contraire, il apparaîtrait une immunopathologie. L'effet du traitement d'échantillons de sang provenant d'autres patients ne souffrant d'aucun état malin à lymphocytes B a mis en évidence des modifications variables des immunophénotypes des cellules et cela est dû au fait que les lymphocytes B sont présents en une plus faible quantité. Cependant, le traitement de fractions enrichies de lymphocytes B obtenus à partir de donneurs de sang sains a présenté des variations immunophénotypiques similaires à celles obtenues avec des patients souffrant de B-CLL ayant des numérations élevées à lymphocytes B.

GAMME CD8 ET CD3

[0337] Le déterminant antigénique de CD8 interagit avec les molécules du CMH de catégorie I, avec pour résultat une adhérence accrue entre les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules cibles. Ce type d'interaction augmente l'activation des lymphocytes au repos. L'antigène CD8 est couplé à une protéine-tyrosine-kinase (p56^{lck}) et, alors, le complexe CD8/p56^{lck} peut jouer un rôle dans l'activation des lymphocytes T.

[0338] Le traitement d'échantillons de sang dans le dispositif conforme à la présente invention, obtenus à partir de patients souffrant de B-CLL, avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne B provoque une augmentation importante du nombre

relatif de cellules positives CD3CD8 et CD3 (susceptibles de manière extrêmement vraisemblable de consister en cellules CD4CD3), ce qui indique plus nettement que les cellules doublement positives engendrées initialement subissent un développement en lymphocytes T matures. Ce processus est un processus qui peut être mesuré directement par l'antigène CD19 et par l'antigène DR et indirectement par l'antigène CD8⁺CD3⁻. L'évaluation en série d'échantillons de sang traités du même patient au cours du temps semble être en accord avec la présence d'un processus qui est identique au développement des thymocytes (tableau 7, patient 2, 3 et 4 et schéma 1).

[0339] Le nombre relatif de cellules CD8⁺ a augmenté au cours du temps dans les échantillons traités et les échantillons non traités, mais dans une plus grande mesure dans les échantillons non traités. D'autre part, le nombre relatif de cellules CD8⁺CD3⁺ a diminué au cours du temps dans les échantillons non traités. Cependant, le nombre relatif de cellules CD3⁺ a augmenté dans les échantillons de sang traités lors de la mesure au cours du temps et ces types de cellules correspondent étroitement aux cellules positives uniques CD4⁺CD3⁺; une forme plus mature de thymocytes. En outre, puisque ces échantillons ont été également immunophénotypés avec d'autres gammes (mentionnées ci-dessus sur les tableaux 3, 4, 5 et 6), les modifications totales incriminent fortement les lymphocytes B dans la production des cellules mères des lymphocytes T et des cellules filles.

[0340] Des échantillons de sang provenant d'un patient souffrant de B-CLL (numéros 2, 3 et 4, tableaux 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) en portions aliquotes distinctes ont été traités avec rien, un anticorps monoclonal conjugué au PE contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR, et une forme non conjuguée du même anticorps monoclonal. Le traitement par conjugaison avec PE indique nettement l'absence de variation du nombre relatif de cellules positives CD3 et des marqueurs associés tels que CD4 qui ont été observés en des teneurs importantes lorsque le même échantillon de sang a été traité avec la forme non conjuguée de l'anticorps. Cependant, une augmentation du nombre de cellules positives CD45 sans aucun antigène DR exprimé sur leur surface a été notée lors de la mesure au cours du temps (voir le tableau 8). Une découverte qui a été similaire à celle notée dans les échantillons non traités lors de l'immunophénotypage au cours du temps (tableau 6). En outre, le nombre relatif de cellules exprimant CD45^{low} a diminué au cours du temps, phénomène qui a été également noté dans les échantillons non traités (lors de la mesure au cours du temps) du même patient (voir le schéma 1A).

Analyse FAC de cellules dérivées d'échantillons de couche leucocytaire humaine

[0341] Le traitement d'échantillons de couche leucocytaire dans un dispositif conforme à la présente invention avec l'anticorps monoclonal CR3/43 a pour résultat une plus forte incidence de CD34 (marqueur des cellules souches) et une plus faible incidence de CD19 (marqueur des lymphocytes B) – voir le tableau 21.

[0342] Des analyses de formation de colonies ont révélé que, dans les échantillons non traités, la colonie prédominante était de type érythroïde, tandis que la variation du type de colonies dans les échantillons traités était beaucoup plus grande, le type principal de colonies étant constitué de colonies de cellules pluripotentes, avec des granulocytes/macrophages et des mégacaryocytes conjointement avec des unités de formation de colonies de cellules érythroïdes observées également.

[0343] Ces résultats démontrent que les cellules traitées sont beaucoup plus capables de subir la différenciation avec d'autres voies lymphohématopoïétiques, avec pour résultat diverses lignées cellulaires spécialisées.

C. Comparaison de l'effet d'autres anticorps monoclonaux ayant une spécificité différente sur la lymphoïèse T

GAMME CD19 ET CD3

[0344] Le traitement d'échantillons de sang dans un dispositif conforme à la présente invention avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne α de l'antigène DR et la région homologue d'antigènes du CMH de catégorie I a provoqué une diminution du nombre de cellules CD3⁺ et une augmentation du nombre de cellules CD19⁺. Le traitement du même sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR a provoqué une diminution du nombre de cellules CD19⁺ et une augmentation du nombre de cellules CD3⁺. Le traitement avec ce dernier anticorps monoclonal en utilisant du cyclophosphamide a révélé le même effet (tableau 14, patient 5/6 souffrant de B-CLL à 2 heures de traitement).

[0345] La poursuite de l'analyse des cellules CD19⁺ et CD3⁺ dans les mêmes échantillons a révélé des augmentations supplémentaires du nombre relatif de cellules CD3⁺ seulement dans le sang traité avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR (tableau 14, patient 5/6 24 heures après traitement). Cependant, la poursuite de l'analyse (24 heures plus tard, patient 5/6, tableau 14) d'échantillons de sang traités avec du cyclophosphamide plus l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène DR a mis en évidence l'inversion du nombre relatif de cellules CD19⁺ et CD3⁺ comparativement au nombre observé à un temps d'incubation de 2 heures exactement dans les mêmes conditions.

[0346] En général, le traitement d'échantillons de sang du même patient avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne α de l'antigène DR ou l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne α de l'antigène de catégorie I met en évidence une augmentation du nombre relatif de cellules CD19⁺ (marqueur B pan) comparativement à l'échantillon non traité. Le nombre relatif de cellules CD19⁺CD3⁺ a diminué légèrement dans les échantillons de sang traités avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne α de l'antigène DR ou traités avec l'anticorps monoclonal contre les

antigènes de catégorie I (voir le tableau 14 et les schémas 2, 3 et 4). Le traitement d'échantillons de sang du patient 09 avec l'anticorps monoclonal contre les antigènes de catégorie I a provoqué une augmentation du nombre relatif de cellules CD3⁺ et une légère diminution du nombre relatif de cellules CD19⁺ et CD19⁺CD3⁺. Cependant, le traitement d'une préparation enrichie de lymphocytes B obtenus à partir de donneurs de sang sains avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β ou la chaîne α de l'antigène DR a mis en évidence des variations immunophénotypiques similaires à celles obtenues avec un patient souffrant de B-CLL.

[0347] Le traitement de patients HIV⁺ et présentant une déficience en IgA avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène DR a provoqué une augmentation du nombre relatif de cellules CD3⁺ et une diminution du nombre relatif de cellules CD19⁺. Cependant, le traitement du même échantillon de sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de l'antigène de catégorie I n'a pas produit le même effet. Le traitement d'échantillons de sang obtenus à partir de patients (34/BD et 04/BD) présentant une déficience en lymphocytes B a présenté des variations immunophénotypiques variables lors du traitement avec des anticorps monoclonaux contre la chaîne β de l'antigène DR, des antigènes de catégorie I et de l'antigène CD4.

GAMME CD4 ET CD8

[0348] Des échantillons de sang analysés en utilisant la gamme CD19 et CD3 (tableau 14) ont été également immunophénotypés avec la gamme d'anticorps CD4 et CD8 (tableau 15). Les deux gammes semblent concorder et se confirmer mutuellement. Une incubation pendant 2 heures d'échantillons de sang de patients souffrant de B-CLL (tableau 15, patients 5/6 et 10, schémas 2, 3 et 4) avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR ou avec cet anticorps monoclonal plus du cyclophosphamide a provoqué une augmentation du nombre relatif de cellules CD8⁺ et CD4⁺ et de cellules exprimant conjointement les deux marqueurs. D'autre part, le traitement des mêmes échantillons avec des anticorps monoclonaux contre la région homologue de la chaîne α de l'antigène DR ou la région homologue de la chaîne α de l'antigène de catégorie I n'a pas produit les mêmes effets. La comparaison des tendances immunophénotypiques obtenues après des périodes d'incubation de 2 heures et 24 heures avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène DR plus du cyclophosphamide a révélé des variations inverses des nombres relatifs de cellules CD4 et CD8 positives (tableau 15, patient 5/6 souffrant de B-CLL au bout de 2 heures et 24 heures) et ces variations étaient en accord avec celles obtenues lorsque le même échantillon de sang a été analysé avec la gamme d'anticorps CD19 et CD3 (tableau 14, le même patient). Les découvertes ultérieures indiquent que la différenciation suivante est réversible car les cellules indifférenciées peuvent subir la différenciation en lymphocytes T ou lymphocytes B.

GAMME DR ET CD3

[0349] Les variations immunophénotypiques obtenues avec la gamme DR et CD3 (tableau 16) confirment les découvertes obtenues avec la gamme CD19 et CD3 et la gamme CD4 et CD8 (tableaux 14 et 15 et schémas 2, 3 et 4) qui ont suivi le traitement des mêmes échantillons de sang avec des anticorps monoclonaux contre la région homologue de la face bêta ou alpha de l'antigène DR ou un anticorps monoclonal contre les antigènes de catégorie I ou un anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène DR plus du cyclophosphamide au bout de 2 heures d'analyse.

[0350] D'après les résultats, il se révèle que l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR est extrêmement capable de commander la production de cellules CD3 positives à partir de cellules DR⁺.

[0351] En outre, des traitements tels que ceux impliquant l'enrôlement de la chaîne α des antigènes DR ou l'enrôlement de la chaîne β de la molécule conjointement avec du cyclophosphamide (temps d'incubation prolongé) ont favorisé des augmentations du nombre relatif de cellules CD19⁺ ou de cellules DR⁺.

GAMME CD56&16 ET CD3

[0352] Le traitement d'échantillons de sang dans un dispositif conforme à la présente invention, notamment de ceux de patients souffrant de B-CLL ayant des numérations élevées en lymphocytes B, avec un anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR a provoqué une augmentation du nombre relatif de cellules CD56&16 positives.

[0353] Chez ces patients, les nombres relatifs de cellules CD3⁺ et CD56⁺ et CD16⁺CD3⁺ ont également augmenté après le traitement d'échantillons de sang avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β , ce qui confirme les observations antérieures notées avec le même traitement lorsque les mêmes échantillons de sang ont été analysés avec les gammes CD3 et CD19 et DR et CD3.

GAMME CD45 ET CD14

[0354] Des échantillons de sang traités dans un dispositif conforme à la présente invention avec des anticorps monoclonaux contre les chaînes β ou α de l'antigène DR ou contre la chaîne β plus du cyclophosphamide ou des antigènes de catégorie I ont été également analysés avec la gamme CD45 et CD14 (tableau 18). L'indication CD45 low, CD45 high ou CD45 medium est arbitraire. Le traitement de l'échantillon de sang 5/6 (au bout de 2 heures) avec des anticorps monoclonaux contre la chaîne β de l'antigène DR ou avec cet anticorps monoclonal plus du cyclophosphamide a engendré des cellules CD45⁺ low et a augmenté le nombre relatif de cellules CD45⁺ medium. Cependant, le premier traitement a

provoqué une augmentation du nombre relatif de cellules CD45⁺ high et le traitement ultérieur a provoqué une diminution du nombre relatif de cellules CD45⁺ medium et ces variations se révèlent être dépendantes du temps.

[0355] Des échantillons de sang des patients 5/6 et 10 (B-CLL), par traitement avec l'anticorps monoclonal contre les antigènes de catégorie I, ont présenté une diminution du nombre relatif de cellules CD45⁺ medium et des observations similaires ont été notées dans les échantillons de sang 09 et HIV⁺ après le même traitement comparativement aux échantillons non traités. Le traitement des échantillons de sang de patients HIV⁺ et IgA/D avec l'anticorps monoclonal contre l'antigène de catégorie I a provoqué une augmentation du nombre relatif de cellules CD45⁺ low comparativement aux échantillons non traités ou aux échantillons traités avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène DR. Cependant, des échantillons de sang de ces patients ont présenté une diminution du nombre relatif de cellules CD45⁺ medium lors du traitement avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR. Les cellules CD45⁺ medium ont augmenté dans les échantillons de sang du patient IgA/D après le traitement avec l'anticorps monoclonal contre l'antigène de catégorie I. Des cellules qui étaient extrêmement volumineuses, fortement granulaires et qui exprimaient des taux considérables d'antigène CD45 ont été notées dans les échantillons de sang traités avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR des antigènes du CMH de catégorie II (voir les schémas 1, 2, 3 et 4).

GAMME CD8 ET CD28

[0356] L'antigène CD28 est présent sur approximativement 60% à 80% des lymphocytes T du sang périphérique (CD3⁺), 50% des lymphocytes T CD8⁺ et 5% des thymocytes CD3⁺ immatures.

[0357] Au cours de la maturation des thymocytes, l'expression de l'antigène CD28 augmente d'une densité basse sur la plupart des thymocytes immatures CD4⁺CD8⁺ jusqu'à une densité plus forte sur pratiquement tous les thymocytes CD3⁺CD4⁺ ou CD8⁺ matures. L'activation des cellules augmente davantage la densité de l'antigène CD28. L'expression de CD28 divise également les lymphocytes CD8⁺ en deux groupes fonctionnels. Les lymphocytes CD8⁺CD28⁺ assurent la médiation de la cytotoxicité spécifique d'allo-antigène, c'est-à-dire la restriction du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de catégorie I. La suppression de la prolifération cellulaire est assurée par la médiation de la sous-catégorie CD8⁺CD28⁻. L'antigène CD28 est une molécule d'adhésion cellulaire et joue le rôle de ligand pour l'antigène B7/BB-1 qui est présent sur les lymphocytes B activés.

[0358] Le traitement d'échantillons de sang dans un dispositif conforme à la présente invention, provenant de patients (tableau 19, patients 5/6 et 8) souffrant de B-CLL, avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR a provoqué une augmentation du nombre relatif de cellules CD8⁺, CD28⁺ et CD8⁺CD28⁺ et tous les autres types de traitements n'ont pas provoqué une telle augmentation.

GAMME CD34 ET CD2

[0359] L'antigène CD34 est présent sur les cellules mères hématopoïétiques immatures et sur toutes les cellules de formation de colonies hématopoïétiques dans la moelle osseuse, comprenant les cellules mères unipotentes (CFU-GM, BFU-E) et les cellules mères pluripotentes (CFU-GEMM, CFU-Mix et CFU-blast). CD34 est également exprimé sur les précurseurs de cellules stromales. Les précurseurs de cellules lymphoïdes B et T à désoxynucléotidyl-transférase terminale (TdT)⁺ dans le tissu osseux normal sont des cellules CD34⁺. L'antigène CD34 est présent sur les cellules myéloïdes précoces qui expriment l'antigène CD33, mais qui sont dépourvues des antigènes CD14 et CD15 et sur les cellules érythroïdes précoces qui expriment l'antigène CD71 et qui expriment faiblement l'antigène CD45. L'antigène CD34 est également présent sur les cellules endothéliales capillaires et approximativement 1% des thymocytes humains. Les lymphocytes, les monocytes, les granulocytes et les plaquettes du sang périphérique normal n'expriment pas l'antigène CD34. La densité de l'antigène CD34 est plus élevée sur les cellules mères hématopoïétiques précoces et diminue lors de la maturation des cellules. L'antigène est absent sur les cellules hématopoïétiques totalement différenciées.

[0360] Les cellules mères CD34⁺ non engagées sont des cellules CD38⁻DR⁻ et sont dépourvues d'antigènes spécifiques de lignées, tels que les antigènes CD71, CD33, CD10 et CD5, tandis que les cellules CD34⁺ qui sont engagées dans des lignées expriment l'antigène CD38 à une haute densité.

[0361] La plupart des cellules CD34⁺ expriment réciproquement l'antigène CD45RO ou l'antigène CD45RA. Approximativement 60% des cellules de leucémie lymphoïde aiguë à lymphocytes B et de cellules de leucémie myéloïde aiguë expriment l'antigène CD34. L'antigène n'est pas exprimé sur les cellules de leucémie lymphoïde chronique (lignée B ou T) ou les cellules de lymphomes. L'antigène CD2 est présent sur les lymphocytes T et une sous-catégorie de lymphocytes tueurs naturels (NK).

[0362] Les résultats sont représentés sur les schémas 2, 3 et 4.

[0363] L'analyse d'échantillons de sang chez un patient souffrant de B-CLL (tableau 20, patient 5/6 à 2 heures) après traitement avec des anticorps monoclonaux contre la chaîne β de l'antigène DR ou la chaîne α du même antigène a révélé des augmentations importantes du nombre relatif de cellules CD34⁺ et CD34⁺CD2⁺ après traitement avec le premier anticorps. Puisque les mêmes échantillons de sang ont été immunophénotypés avec les gammes mentionnées ci-dessus (voir les tableaux 14 à 19) pour d'autres marqueurs, l'augmentation du nombre relatif de cellules CD34⁺ et CD34⁺CD2⁺

observée dans ce cas semble coïncider avec des augmentations des nombres relatifs de cellules positives uniques (SP) $CD4^+CD8^+$, $CD8^+CD3^+$ et $CD4^+CD3^+$. En outre, ces découvertes qui semblent exclusives à l'enrôlement de la chaîne β de l'antigène HLA-DR fournissent des indications directes que le procédé engendre la lymphopoïèse T par régression de lymphocytes B.

[0364] Lors de l'analyse du même traitement 24 heures plus tard, les cellules $CD34^+$ ont semblé diminuer à des teneurs provoquant une augmentation supplémentaire du nombre relatif de lymphocytes T. Le processus de rétrodifférenciation qui a engendré initialement la lymphopoïèse T peut être inversé pour engendrer une lymphopoïèse B. Le premier phénomène a été observé à un temps d'incubation de 2 heures avec un anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène HLA-DR plus du cyclophosphamide, tandis que le dernier procédé a été noté à un temps d'incubation de 24 heures avec le même traitement dans le même échantillon (schéma 2).

[0365] Le traitement d'échantillons de sang d'un patient HIV^+ (tableau 20, patient HIV^+) avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène HLA-DR a augmenté fortement le nombre relatif de cellules $CD34^+$ et $CD2^+CD34^+$, tout comme le traitement du même échantillon de sang avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène HLA-DR et l'anticorps monoclonal contre la chaîne α du même antigène lors de leur addition simultanément. Cependant, le traitement de cet échantillon de sang avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne α de l'antigène HLA-DR n'a pas affecté le taux de cellules $CD34^+$. Le traitement d'échantillons de sang obtenus chez un bébé âgé de 6 jours (BB/ST, tableau 20), qui, en même temps, a été étudié en ce qui concerne la leucémie et qui avait un nombre très élevé de cellules atypiques (blastocytes) dans le sang, avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène HLA-DR ou l'anticorps monoclonal contre la chaîne α du même antigène ou bien les deux anticorps monoclonaux ajoutés conjointement a eu pour résultat les modifications immunophénotypiques suivantes.

[0366] Lors de l'analyse d'échantillons de sang non traités, les nombres relatifs de cellules $CD34^+$ et DR^+ ont été fortement accrus et, par traitement avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β , le nombre relatif de cellules $CD34^+$ a augmenté davantage mais il a été noté qu'il diminuait par traitement avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne α de l'antigène HLA-DR ou traitement avec les anticorps monoclonaux contre les chaînes α et β de la molécule lors de leur addition simultanée. Cependant, ce dernier traitement a provoqué une augmentation du nombre relatif de cellules $CD34^+CD2^+$ et le phénomène opposé a eu lieu lorsque le même échantillon de sang a été traité avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène HLA-DR seul. Lors de l'analyse de portions aliquotes de sang traitées et non traitées du même patient 24 heures plus tard, le nombre relatif de cellules $CD34^+$ a diminué avec l'ensemble des traitements précités, sauf qu'il a été maintenu à une valeur beaucoup plus élevée lors du traitement avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène HLA-DR. Ce dernier traitement a été continué pour provoquer une diminution du nombre relatif de cellules $CD34^+CD2^+$ 24 heures plus tard.

[0367] Ces résultats indiquent que l'enrôlement de l'antigène HLA-DR par l'intermédiaire de la chaîne β favorise la production d'un plus grand nombre de cellules $CD34^+$ à partir de l'ensemble $CD2^+CD34^+$ ou à partir de types plus matures de cellules telles que des lymphocytes B de patients souffrant de B-CLL et ces résultats indiquent que ce type de traitement favorise la rétrodifférenciation. Cependant, l'immunophénotypage d'échantillons de sang 24 heures plus tard suggère que ces types de cellules semblent exister dans une autre lignée et, dans ce cas, les cellules semblent exister ou s'engager relativement d'elles-mêmes dans la lignée myéloïde qui a été observée par analyse d'un échantillon de sang traité avec la gamme CD7 et CD13&33.

[0368] La morphologie modifie les caractéristiques immunophénotypiques des lymphocytes B de patients souffrant de B-CLL et de fractions enrichies d'individus sains (en utilisant des billes CD19) par traitement avec des anticorps monoclonaux contre les régions homologues de la chaîne β des antigènes du CMH de catégorie II. Ces phénomènes étaient accompagnés par une modification de la morphologie des lymphocytes B. Il a été observé que les lymphocytes B colonisant des lames de verre dans des frottis sanguins non traités étaient remplacés par des granulocytes, des monocytes, de grandes nombres de cellules d'aspect primitif et de globules rouges nucléés. Il n'a été observé ni figures de mitose ni mort cellulaire significatives dans les frottis sanguins traités ou non traités.

[0369] Les résultats du tableau 20 démontrent également une découverte de la plus haute importance, consistant en la possibilité de préparer, conformément au procédé de la présente invention, une cellule indifférenciée par la rétrodifférenciation d'une cellule indifférenciée plus mature.

D. Microphotographies

[0370] En plus de l'essai antigénique mentionné ci-dessus, le procédé de la présente invention a été suivi visuellement au moyen d'un microscope. Le dispositif de la présente invention peut être programmé pour suivre les variations automatiquement par un moyen de dépistage.

[0371] A cet égard, la fig. 8 est une microphotographie de lymphocytes B différenciés avant la mise en œuvre du procédé de la présente invention. La fig. 9 est une microphotographie de cellules indifférenciées formées par la rétrodifférenciation de lymphocytes B conformément à la présente invention, dans laquelle l'agent était un anticorps monoclonal contre les régions homologues de la chaîne β de l'antigène HLA-DR. Les cellules indifférenciées consistent en les amas de cellules de couleur foncée. La fig. 10 est une microphotographie des mêmes cellules indifférenciées, mais à un plus faible grossissement.

[0372] Les fig. 8 à 10 démontrent donc visuellement la rétrodifférenciation des lymphocytes B en cellules souches indifférenciées par le procédé de la présente invention.

[0373] La fig. 11 est une microphotographie de lymphocytes B différenciés avant la mise en œuvre du procédé de la présente invention. La fig. 12 est une microphotographie de cellules indifférenciées formées par la rétrodifférenciation des lymphocytes B conformément à la présente invention, dans laquelle l'agent utilisé est un anticorps monoclonal contre les régions homologues de la chaîne β de l'antigène HLA-DR. Les cellules indifférenciées sont de nouveau les amas de cellules de couleur foncée. La fig. 13 est une microphotographie de la formation de granulocytes différenciés à partir de cellules indifférenciées identiques à celles de la fig. 12.

[0374] Les fig. 11 à 13 démontrent donc visuellement la rétrodifférenciation des lymphocytes B en cellules souches indifférenciées par le procédé de la présente invention, suivie par l'engagement des cellules indifférenciées en cellules différenciées nouvelles qui sont d'une lignée différente de celle des cellules différenciées initiales.

[0375] Ces expériences de microscopie ont été également effectuées avec du sang provenant de patients souffrant de B-CLL, traités avec l'anticorps monoclonal CR3/43 de la manière décrite ci-dessus. De la manière indiquée ci-dessus, le sang provenant de cellules B-CLL est un moyen utile pour étudier le processus de rétrodifférenciation car le sang contient des nombres de lymphocytes B supérieurs à la normale. Ces résultats sont représentés en détail sur les fig. 14 à 17.

[0376] La fig. 14 représente, à deux grossissements différents, un échantillon de sang non traité provenant d'un patient souffrant de B-CLL. Les lymphocytes B non traités (cellules bleues) présentent une morphologie classique, c'est-à-dire une structure de chromatine condensée et un cytoplasme épars. Les cellules restantes sont des érythrocytes (globules rouges).

[0377] Le traitement d'échantillons de sang avec l'anticorps CR3/43 conduit initialement à un rassemblement des lymphocytes B sous forme d'agrégats (fig. 15).

[0378] Les lymphocytes B sous forme d'agrégats ont perdu leur morphologie classique, caractérisée par la formation de zones cellulaires analogues à des cailloux, la décondensation de la structure de chromatine, l'apparition de nucléoles saillants, l'augmentation du volume cellulaire et une basophilie cytoplasmique caractéristique des cellules indifférenciées (fig. 16). Une structure de chromatine relaxée (décondensée) est une caractéristique importante des cellules indifférenciées comparativement aux cellules différenciées. Cela doit être vraisemblablement dû à un besoin d'un accès plus poussé aux unités de transcription pour déterminer les modifications dans l'expression de gènes requise pour l'engagement dans une lignée cellulaire donnée. A l'opposé, il est bien connu qu'une cellule plus différenciée a une structure de chromatine plus condensée puisque seule une petite quantité de chromatine doit être active du point de vue de la transcription.

[0379] L'apparition de cellules indifférenciées est toujours accompagnée par l'apparition de cellules (17A à 17J) ayant une morphologie différenciée. Il est important de noter que ces cellules n'ont pu être engendrées par prolifération, puisque (i) le temps d'incubation était trop bref pour qu'une ou plusieurs divisions cellulaires totales aient lieu, (ii) aucune fig. de mitose n'est observée et (iii) le nombre absolu de leucocytes est resté le même avant et après traitement. En outre, les cellules mères moins différenciées ont été observées en association avec leurs cellules filles plus différenciées (voir le précurseur myéloïde sur la fig. 17J), ce qui indique que ces cellules spécialisées sont apparues par différenciation.

[0380] Les micrographies des fig. 17A à 17J représentent les types de cellules différenciées observés après traitement de lymphocytes B-CLL avec les anticorps monoclonaux CR3/43: plaquettes (Pl) – fig. 17A, cellules neutrophiles (Ne) – fig. 17B, cellules éosinophiles (Eso) – fig. 17C, mégacaryocytes (Meg) – fig. 17D, cellules basophiles (Ba) – fig. 17G, lymphocytes (Ly) – fig. 17H, monocytes (Mo) – fig. 17I et cellules mères myéloïdes (Mp) – fig. 17J. Il a été également observé des cellules mères érythroïdes et des macrophages (résultats non présentés).

[0381] Ainsi, en résumé, ces résultats d'étude de microscopie mettent en évidence les modifications de la morphologie des lymphocytes B dans des échantillons provenant de patients souffrant de BCLL, qui avaient des taux élevés de lymphocytes B matures. Les microphotographies représentent les modifications de la morphologie des lymphocytes B, qui subissent initialement une agrégation, suivie par l'apparition de différentes cellules avec une gamme étendue de morphologies allant des cellules mères aux cellules différenciées (cellules neutrophiles, cellules basophiles, cellules éosinophiles, mégacaryocytes, plaquettes, lymphocytes, macrophages, granulocytes, granulocytes non segmentés et cellules de type stromal).

[0382] En outre, et de manière très importante, la présence de cellules mères érythroïdes et myéloïdes est observée (fig. 17J – résultats non présentés). La cellule mère myéloïde est nettement différenciable du point de vue morphologique des autres cellules, étant plus grande et avec une morphologie nucléaire distincte, et contenant également des granules cytoplasmiques.

[0383] Les résultats d'études de microscopie étaient donc du point de vue morphologique, ce qui est indiqué par les résultats de cytométrie de flux en termes de marqueurs de surface cellulaire. Ces résultats permettent de conclure que le traitement de lymphocytes B avec un anticorps contre la chaîne β de l'antigène HLA-DR du CMH a pour résultat une diminution des nombres de lymphocytes B et une augmentation du nombre de cellules d'autres lignées hématopoïétiques, comprenant les cellules précurseurs immatures.

[0384] La rétrodifférenciation des lymphocytes T traités avec un anticorps contre une chaîne α d'antigène du CMH de catégorie II (anticorps monoclonal TAL.1B5) en cellules souches indifférenciées par le procédé de la présente invention

suivie par l'engagement des cellules indifférenciées en cellules différenciées nouvelles d'une lignée différente de celle des cellules différenciées initiales a été également suivie par microscopie (résultat non présenté).

E. Analyse de réarrangements par recombinaison VDJ dans des lymphocytes rétrodifférenciés

[0385] A titre d'information de base, les cellules différenciées utilisées dans ces expériences (lymphocytes B ou cellules ayant certaines propriétés des lymphocytes T) ont des gènes qui ont déjà subi un réarrangement pour coder, respectivement, pour une Ig mature ou un TCR. Dans le processus de réarrangement, des portions intermédiaires d'ADN qui ne font pas partie du gène TCR ou Ig final exprimé, consistant principalement en ADN qui est situé entre le segment codant pour la région variable (V) et le segment codant pour la région constante (C) de ces récepteurs, sont éliminés du génome par épissage. Ces fragments excisés sont retenus dans la cellule sous forme d'ADN extrachromosomique. Pour que les cellules subissent une véritable rétrodifférenciation, l'ADN excisé serait réinséré dans le génome, en plaçant les cellules dans un état similaire à celui précédant leur différenciation initiale. Pour cette raison, il est prévu qu'une forme complémentaire d'une séquence dans le gène réarrangé s'hybride à un fragment de restriction d'ADN plus grand lorsque l'ADN est revenu à son état non réarrangé ou état de lignée germinale comparativement à l'ADN réarrangé qui caractérise l'état différencié.

1. Réarrangement de gènes TCR dans des cellules Daudi

[0386] Dans l'expérience ayant pour résultat l'empreinte de Southern représentée sur la fig. 18, une lignée cellulaire bien connue, Daudi, consistant en une lignée de cellules de lymphome à lymphocytes B avec un gène TCR réarrangé (et l'autre éliminé par délétion) a été utilisée. L'ADN génomique a été préparé à partir de cellules Daudi et digéré avec EcoRI, soumis à une électrophorèse sur gel et sondé avec une sonde d'ADN de chaîne β TCR marquée. Des cellules Daudi ont été utilisées plutôt que des lymphocytes B obtenus par purification à partir de patients humains car ces cellules sont apparentées du point de vue clonal et forment une population cellulaire homogène avec les mêmes réarrangements de gènes qui peuvent être constatés nettement par analyse par transfert d'empreinte par la méthode de Southern de l'ADN génomique digéré. Dans un échantillon de sang normal, différentes cellules ont des réarrangements différents et, ainsi, un transfert d'empreinte par la méthode de Southern apparaîtrait sous forme d'un frottis.

[0387] Un gène fonctionnel codant pour la chaîne β de TCR est assemblé dans des lymphocytes par une série de réarrangements somatiques qui ont lieu au cours de la maturation des lymphocytes pour réunir un segment V, un segment D et un segment J. Une explication très nette de ces processus de réarrangement est fournie dans Gènes VI, Lewin, Oxford University Press, 1997 (pages 1994–1023) – un ouvrage classique pour étudiants. Des pages particulières sont citées ci-dessous.

[0388] Tout d'abord, un segment D est joint par un processus de recombinaison à l'un de plusieurs segments J dans une réaction de jonction D-J. Puis un des nombreux segments V possibles (<60) est joint au segment DJ résultant (jonction V-D) pour former un gène de chaîne β de TCR complet. Le gène de région constante est immédiatement en aval du segment VDJ réarrangé, bien qu'il puisse exister des segments J intermédiaires qui sont épissés au cours de la maturation de l'ARN pour amener l'exon de gène constant à proximité du segment de gène VDJ réarrangé (Lewin, page 998).

[0389] Dans les cellules humaines, il existe deux segments différents de gène de région constante de chaîne β de TCR, appelés C β 1 et C β 2, présents à deux locus différents, dont chacun est précédé par un amas de 6 ou 7 segments de gène de région de jonction (J β) (J β 1, J β 2) et un segment D (D β 1 et D β 2) (voir fig. 1, Toyonaga et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8624–8628 et Lewin, page 1017).

[0390] Les événements de recombinaison qui conduisent au rapprochement des segments V, D et J-C sont catalysés par une multitude de protéines, comprenant RAG-1 et RAG-2 qui reconnaissent des séquences nonamères et heptamères présentes aux extrémités de recombinaison des séquences de gènes V, D et J-C. En fonction de l'orientation de ces séquences nonamères/heptamères, la recombinaison a pour résultat une inversion ou une délétion. Les deux types d'événements ont pour résultat une modification du schéma de fragments de digestion par des enzymes de restriction de l'ADN génomique. En outre, un événement de délétion n'a pas obligatoirement pour résultat une perte totale du fragment excisé. En variante, les extrémités du fragment excisé sont rejointes pour produire un ADN circulaire qui reste dans la cellule (Okazaki et al., 1987, Cell 49:477–85; David et al., 1991, J. Exp. Med. 173:743–6; Livak et Schatz, 1996, Mol. Cell Biol. 16:609–18; Harriman et al., 1993, Annu Rev Immunol. 11:361–84). Chaque segment de gène comporte bien entendu deux allèles puisque les cellules ont un complément chromosomique diploïde.

[0391] Dans l'état de lignée germinale normal, les gènes C β 1 et C β 2 sont arrangés de la manière représentée sur la fig. 1, Toyonaga et al., 1985. Un produit de digestion par restriction de l'ADN génomique avec EcoRI engendre deux bandes correspondantes détectables par la sonde utilisée dans l'expérience (la sonde est un fragment d'ADN marqué dérivé de C β 1 qui s'hybride également à C β 2 en raison d'un haut degré d'homologie de séquence): (i) une bande de 12 kb contenant la séquence C β 1; et (ii) une bande de 4 kb contenant la séquence C β 2. Cette configuration de lignée germinale est constatée dans des cellules immatures indifférenciées (voie A de la fig. 18). Cette configuration de lignée germinale est également parfaitement illustrée par la voie 3 (2 heures avec l'anticorps CR3/43) de la fig. 18, donnant un motif identique à celui de la voie A.

[0392] A l'état différencié, les deux allèles des gènes C β 1 et C β 2 subissent un réarrangement de telle sorte qu'il n'existe plus un fragment de 12 kb au niveau du locus C β 1 ou un fragment de 4 kb au niveau du locus C β 2. En fait, aucun fragment

hybridant dérivé du locus C β 1 n'est présent sur le gel (cela est dû à la délétion de la séquence hybridante provenant des deux allèles C β 1 en résultat de la recombinaison). Comme pour le locus C β 2, il existe réellement à présent deux bandes principales correspondant à des «allèles» différents résultant de réarrangements sur les deux chromosomes. La plus grande bande, qui a une dimension inférieure à 4 kb, correspond à un fragment d'un des deux allèles réarrangés. La bande la plus petite est un fragment de l'autre allèle réarrangé. La bande secondaire intermédiaire est probablement dérivée d'un clone secondaire de cellules Daudi avec un réarrangement différent – en conséquence, elle est présente en une quantité sous-molaire pour chaque allèle. Néanmoins, l'état de réarrangement est observé très nettement dans la voie 1 où les deux bandes principales sont nettement visibles.

[0393] Deux heures avec l'anticorps témoin négatif (TAL.1B5) qui se lie à la chaîne α de MHC-DR ont effectivement pour résultat la perte de la bande supérieure, tandis que la bande inférieure a une intensité similaire à celle des cellules non traitées dans la voie 1 (voir la voie 2). Une explication possible de ce phénomène consiste en la différenciation des cellules, ayant en outre pour résultat un événement de recombinaison supplémentaire au niveau du locus C β 2 d'un allèle, qui conduit à la perte des séquences C β 2. Cela est totalement en accord avec les phénomènes connus.

[0394] Vingt-quatre heures avec l'anticorps témoin négatif se révèlent rétablir les trois bandes observées dans les cellules non traitées (voir la voie 4). Cependant, les bandes migrent effectivement à une position inférieure à celle des bandes observées dans la voie 2. La manière dont cela se produit n'a pas été nettement établie. Une explication possible consiste en la réintégration de séquences éliminées par délétion, en conséquence avec le modèle de formation de boucle – excision – réintégration (Malissen et al., 1986, *Nature* 319:28–32). Néanmoins, aucun résultat constaté avec l'anticorps TAL.1B5 au bout de 2 heures ou de 24 heures n'indique un réarrangement en le motif de lignée germinale. Les voies 2 et 4 représentent réellement un témoin négatif – l'anticorps contre la chaîne α n'a pas pour résultat le rétablissement des séquences de la lignée germinale.

[0395] A l'opposé, les résultats obtenus avec un anticorps monoclonal (CR3/43) contre la chaîne β de MHC-DR au bout de deux heures mettent en évidence un motif de bandes qui correspond à la configuration de la lignée germinale, à savoir une bande de 12 kb et une bande de 4 kb (comparer la voie 3 avec la voie A). En d'autres termes, ces résultats montrent que le motif de restriction de lignée germinale au niveau des locus C β 1 et C β 2 a été rétabli pour tous les allèles.

[0396] D'après ces résultats, on conclut que le motif de bandes observé dans la voie 3 est une indication d'un réarrangement de l'ADN génomique des cellules différenciées pour régénérer la configuration de lignée germinale.

[0397] L'importance de cette découverte ne doit pas être sous-estimée. Un réarrangement génomique, comprenant des délétions, peut être inversé pour rétablir le génome à l'état dans lequel il existait avant que le processus de différenciation n'ait lieu. L'explication la plus vraisemblable consiste en le fait que l'inversion provoquée par le réarrangement des allèles C β 2 au cours de la différenciation a été inversée, et la délétion de la séquence C β 1 qui a provoqué une perte des bandes de 12 kb a été également inversée. La source de la séquence C β 1 manquante est vraisemblablement l'ADN circulaire épisomique présent dans le noyau à partir de l'événement de délétion initiale. L'existence de cet ADN circulaire a été établie dans l'art antérieur (voir les références précitées). Néanmoins, le mécanisme précis par lequel ce rétablissement du génome de lignée germinale s'est produit n'est pas important. Ce qui est important est le fait qu'il se soit produit.

[0398] Une incubation continue avec l'anticorps monoclonal (CR3/43) contre la chaîne β de MHC-DR pendant 24 heures dans le dispositif conforme à la présente invention a pour résultat un motif de bandes plus complexe (voie 5). Cependant, ces bandes ne représentent pas des bandes identiques à celles existant dans le témoin non traité. En particulier, des fragments d'environ 12 kb qui s'hybrident à la sonde sont encore présents («allèles C β 2»). En outre, il est important d'apprécier que les bandes désignées sous le nom de «allèles C β 2» ne correspondent pas à la bande de moins de 4 kb observée dans le témoin non traité (voie 1). L'explication la plus vraisemblable pour les résultats observés dans la voie 5 est l'apparition d'un processus de réarrangement secondaire puisque le motif d'hybridation ressemble à celui de lymphocytes T en raison du fait qu'il est caractérisé par un gène TCR réarrangé (cette explication est en accord avec les résultats de cytométrie de flux mettant en évidence une augmentation du nombre de cellules ayant des marqueurs cellulaires caractéristiques des lymphocytes T). Néanmoins, quelle que soit l'explication moléculaire précise, les résultats observés dans la voie 5 au bout de 24 heures d'exposition à l'anticorps CR3/43 viennent à l'appui des résultats obtenus après 2 heures d'exposition dans la voie 3.

2. Réarrangement du gène Ig dans des cellules B-CLL

[0399] Le transfert d'empreinte par la méthode de Southern représenté sur la fig. 19B a été obtenu en utilisant des cellules de sang périphérique provenant de patients souffrant de leucémie lymphocytaire chronique (B-CLL). L'ADN génomique a été préparé à partir de ces lymphocytes B essentiellement monoclonaux et a été digéré avec BamHI et HindIII, soumis à une électrophorèse sur gel et sondé avec une sonde d'ADN TCR marquée. Ces cellules B-CLL ont été traitées pendant 24 heures avec l'antigène CR3/43 (anti-chaîne de CMH de catégorie II de HLA-DR, DP et DQ) qui a été décrit ci-dessus. Les empreintes ont été sondées avec une sonde de région J de Ig radiomarquée. Les deux bandes obtenues à partir des cellules non traitées dans la voie A représentent les deux allèles Ig réarrangés (paternel et maternel). Ces bandes ne sont pas apparues dans la voie B qui montre le motif 24 heures après le traitement des cellules avec l'anticorps. A leur place est apparue une bande de 5,4 kb caractéristique du gène de Ig de lignée germinale.

[0400] Dans une autre expérience, représentée sur la fig. 19A, les cellules ont été laissées sans traitement ou bien ont été traitées pendant les temps indiqués avec l'anticorps anti-chaîne β d'antigène de CMH de catégorie II. La région VDJ de Ig a été amplifiée par PCR dans les cellules B-CLL différenciées (témoin) et les cellules B-CLL traitées avec l'anticorps (moitié gauche du gel). Cela a engendré un produit d'amplification VDJ à partir des cellules non traitées. Cependant, aucune telle bande n'a été observée dans les cellules traitées avec l'anticorps car, en résultat de l'insertion de l'ADN génomique excisé, cette configuration d'ADN «de lignée germinale» n'était pas sensible à l'amplification par PCR au moyen des amorces particulières pour VDJ. Une expérience similaire (côté droit du gel) a permis de visualiser le comportement d'un gène témoin, consistant en le gène d'entretien codant pour la β -actine. Il n'existe aucune différence dans le produit d'amplification par PCR de β -actine, quel que soit le traitement. Ainsi, ce gène «témoin» ne s'est pas révélé être affecté par le processus de rétrodifférenciation qui a provoqué de profondes modifications dans le gène Ig des mêmes cellules dans les mêmes conditions.

[0401] Les résultats présentés ci-dessus montrent que le traitement de cellules avec un agent qui enrôle un récepteur de surface cellulaire approprié induit la rétrodifférenciation de ces cellules, ce qui est prouvé au niveau moléculaire (et contrôlé) en observant la régression des réarrangements de l'ADN chromosomique caractérisant l'état différencié. Ainsi, il est conclu sur la base d'épreuves génétiquement moléculaires et d'épreuves morphologiques que les cellules de la lignée de lymphocytes B, traitées avec un agent (Acm) qui enrôle la chaîne β du CMH de catégorie II, subissent une rétrodifférenciation. A l'opposé, les mêmes cellules traitées avec des anticorps qui enrôlent la chaîne α de catégorie II ne subissent pas une induction de rétrodifférenciation similaire. S'il existe une quelconque différenciation, il se révèle que ces cellules subissent une différenciation (directe) dans la voie des lymphocytes B.

F. Etudes supplémentaires concernant la rétrodifférenciation de lymphocytes B

[0402] Des cellules BCLL purifiées au moyen de FACsVantage (lymphocytes B purs à 95%) provenant de patients souffrant de BCLL ont été traitées avec l'anticorps CR3/43 dans un dispositif conforme à la présente invention, répondant à la description précitée, et les cellules ont été traitées par cytométrie de flux. Les résultats présentés ci-dessous sur le tableau A fournissent une confirmation supplémentaire des résultats obtenus ci-dessus. Une augmentation importante du nombre de cellules CD34⁺ a été obtenue conjointement avec une forte réduction du nombre de cellules ayant des marqueurs de surface cellulaire caractéristiques de la lignée de lymphocytes B (CD19, CD20 et CD22). Un point important à noter sur le tableau A est qu'il met également en évidence une augmentation du nombre de cellules qui sont, à la fois, CD34-négatives et négatives vis-à-vis de la lignée. Ces cellules indifférenciées ne sont pas engagées dans la lignée hématopoïétique et précèdent les cellules souches CD34⁺ dans la différenciation. En outre, l'étude d'échantillon par microscopie optique a révélé la présence d'une gamme de types cellulaires adhérents ayant les caractéristiques morphologiques des cellules non hématopoïétiques.

Tableau

[0403]

Marqueur	0 heure	2 heures	24 heures
CD20	73	67	16
CD14	0	3	23
CD34	7	1	23
CD7	0	2	0
CD16	8	3	2
CD19	95	71	1
CD22	5	3	2
CD33	0	0	0
CD3	0	0	0

[0404] La perte des marqueurs de surface cellulaire CD19 accompagnée par l'apparition de marqueurs de surface cellulaire CD34 sur la même cellule a été également démontrée et enregistrée en vidéo en temps réel par microscopie confocale. Les lymphocytes B, avant l'addition du Acm CR3/43, étaient colorés en vert avec un anticorps monoclonal, conjugué à du FITC, contre CD19. Après l'addition du Acm CR3/43, les cellules ont perdu leur fluorescence verte et ont commencé à prendre une couleur rouge avec un anticorps monoclonal, conjugué au PE/Cy5 (ou rouge Quantum), contre CD34 mais non une couleur verte (voir la fig. 23 qui représente deux images vidéo). Les résultats confirment nettement que, au cours

de la rétrodifférenciation des lymphocytes B, des marqueurs spécifiques de la lignée tels que CD19 sont perdus, tandis qu'un marqueur de cellules souches tel que CD34 est réexprimé.

G. Autres agents qui induisent la rétrodifférenciation des lymphocytes B en cellules souches hématopoïétiques

[0405] Des études initiales ont identifié réellement trois agents – le facteur de stimulation des colonies de granulocytes/monocytes (GM-CSF), l'érythropoïétine et le Acm CR3/43. Une préparation de lymphocytes B normaux enrichis purifiés a été traitée dans un dispositif conforme à la présente invention avec un de ces 3 agents d'une manière similaire à celle décrite ci-dessus pour CR3/43 et TAL.1B5 et les échantillons traités ont été étudiés par cytométrie de flux de la manière décrite ci-dessus. Comparativement au témoin négatif, les trois échantillons traités avec le GM-CSF, l'érythropoïétine ou le Acm CR3/43 ont tous présentés des modifications en accord avec la rétrodifférenciation. En particulier, les trois agents ont tous provoqué une augmentation du nombre relatif de cellules CD34⁺ dans la population cellulaire (voir la fig. 20). Cependant, l'effet le plus prononcé a été constaté avec CR3/43, en conséquence, cet agent a été choisi à des fins d'utilisation dans les études plus détaillées figurant dans le présent mémoire.

H. Propriétés des cellules souches hématopoïétiques produites par le processus de rétrodifférenciation

Essais de formation de colonies

[0406] Pour confirmer que les cellules CD34⁺ observées par cytométrie de flux et les cellules indifférenciées identifiées par microscopie avaient les propriétés de cellules hématopoïétiques indifférenciées, des échantillons de sang traités avec un anticorps contre la chaîne β du CMH de catégorie II (CR3/43 – voir ci-dessus) ont été soumis à des essais de formation de colonies – un procédé classique connu dans ce domaine pour évaluer les capacités de cellules hématopoïétiques primitives. Les essais de formation de colonies peuvent être effectués automatiquement dans le dispositif conforme à la présente invention en tant qu'une partie du mécanisme de dépistage.

[0407] Des analyses clonales in vitro des cellules souches hématopoïétiques permettent la quantification des cellules mères primitives qui possèdent l'aptitude à proliférer, se différencier et se développer en cellules myéloïdes et/ou érythroïdes matures du point de vue phénotypique et fonctionnel. Par exemple, en présence de facteurs de croissance, les cellules souches, lors de leur ensemencement/immobilisation dans une matrice de gel mou in vitro, sont aptes à la croissance clonale (prolifération) et à la différenciation.

[0408] La fig. 21 est une analyse de colonies de cellules souches produites conformément aux procédés de la présente invention, en utilisant un microscope inversé à fond clair. Dans cet essai, les lymphocytes B obtenus à partir de la couche leucocytaire de donneurs de sang sains ont été traités avec le Acm CR3/43 et ont été ensuite soumis à des essais de colonies de la manière décrite dans le paragraphe matériels et méthodes.

[0409] Les panneaux (a) à (e) sur la fig. 21 ont les significations suivantes:

- a) Microscopie à fond clair d'une boîte de culture examinée à un grossissement de x 3 représentant des colonies de cellules érythroïdes, cellules myéloïdes et cellules mixtes (consistant en cellules myéloïdes et érythroïdes matures) qui peuvent être observées aisément même à l'œil nu. Chaque colonie est issue d'une seule cellule souche hématopoïétique par prolifération et ensuite différenciation.
- b) MIX-CFC: cette colonie est issue d'une seule cellule souche hématopoïétique pluripotente (cellules souches capables de donner des cellules de la lignée myéloïde et de la lignée érythroïde).
- c) M-CFC: cette colonie consiste en macrophages.
- d) GM-CFC: cette colonie consiste en la lignée myéloïde comprenant les macrophages, les granulocytes et les mégacaryocytes.
- e) BFU-E: cette colonie consiste en cellules appartenant à la lignée érythroïde telles que les normoblastes et les globules rouges non nucléés. La coloration rouge des cellules montre que ces cellules étaient convenablement hémoglobinisées. La grande dimension de cette colonie indique qu'elle est issue d'une cellule souche extrêmement primitive.

[0410] Les mêmes résultats ont été obtenus avec des cellules B-CLL (résultats non présentés). Des lymphocytes B non traités ne donnent pas de colonies hématopoïétiques (résultats non présentés). En conséquence, ces résultats démontrent la présence de cellules souches hématopoïétiques viables dans des échantillons de sang traités avec l'anticorps monoclonal CR3/43 contre la chaîne β du CMH de catégorie II, mais non dans les échantillons de sang non traités.

Culture de longue durée

[0411] L'essai de culture de longue durée étudie le potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques. Dans cette culture, la plupart des constituants de l'hématopoïèse de la moelle osseuse sont reproduits in vitro. La caractéristique importante de cette culture est l'hématopoïèse prolongée, qui a lieu en l'absence de facteurs de croissance ajoutés. Dans cet essai, le processus d'hématopoïèse est absolument dépendant de l'établissement d'une couche adhérente de cellules stromales dérivées de la moelle osseuse. Les cellules stromales (consistant en diverses cellules non hématopoïétiques, par exemples les fibroblastes, les adipocytes et tous les types cellulaires appartenant au système

mésenchymateux) entretiennent l'hématopoïèse en fournissant l'environnement approprié (sécrétion de facteurs de croissance et synthèse de la matrice extracellulaire) pour assurer la survie, l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des cellules souches.

[0412] Dans cette analyse, le traitement de lymphocytes B obtenus à partir de couches leucocytaires de donneurs de sang sains (les mêmes résultats ont été obtenus avec des cellules B-CLL) avec le Acm CR3/43 a engendré la formation d'une couche cellulaire adhérente dans les heures suivant l'addition de l'anticorps, qui a également augmenté au cours du temps.

[0413] La couche adhérente consistant en cellules stromales (cellules de couverture, consistant principalement en fibroblastes/cellules de type mésenchymateux/cellules volumineuses photoréfringentes lors de l'examen au microscope inversé à fond clair – voir la fig. 22) assurant la croissance et le développement des cellules hématopoïétiques jusqu'à des temps atteignant et dépassant 12 semaines (ces cellules présentent un contact intime avec les cellules hématopoïétiques). Des groupes de cellules hématopoïétiques primitives (connues également sous le nom de zones en forme de cailloux/amassés de cellules d'aspect foncé) qui sont l'origine de production prolongée de cellules hématopoïétiques étaient également visibles dans la couche adhérente.

[0414] Les couches non adhérentes qui sont la partie supérieure de la couche stromale (amas de cellules d'aspect brillant) consistent en petites cellules arrondies formant des amas de foyers hématopoïétiques. Cette couche contient des cellules souches et également des cellules mères plus engagées du système hématopoïétique. La couche non adhérente était capable d'engendrer des MIX-CFC, GM-CFC, M-CFC, BFU-E (de la manière déterminée par l'analyse clonale) et CFU-F (fibroblastes en unités formant des colonies) (lors de la sous-culture avec du milieu de culture de longue durée).

I. RT-PCR de cellules traitées avec un anticorps contre la chaîne β de HLA-DR

[0415] La transcription de gène a été mesurée dans des cellules Ramos (cellules de lymphome à lymphocytes B) et K562 (leucémie à cellules érythroïdes) traitées avec le Acm CR3/43 pour les gènes CD34, c-kit (ligand de facteur de cellules souches), ϵ -hémoglobine (forme embryonnaire d'hémoglobine) et β -actine).

Procédés

[0416] L'ARNm a été extrait avant et après traitement avec le Acm CR3/43 en utilisant du RNazol (CINA BIOTECH). L'ARNm a été soumis à une transcription inverse par amorçage avec un hexamère par mise en incubation à température ambiante pendant 5 minutes avec 4 μ l de tampon de référence, 2 μ l des dNTP, 1 μ l de RNASIN, 1 μ l d'amorce inverse (amorce hexamère aléatoire) et 1 μ l d'enzyme consistant en transcriptase inverse MMLV. Ce mélange a été mis en outre en incubation pendant 1 heure à 38°C. Puis les mélanges ont été soumis à une PCR dans les conditions classiques en utilisant des amorces conçues pour l'amplification des séquences de CD34, c-kit, ϵ -hémoglobine et β -actine. Les amorces ont été synthétisées au Randell Institute Kings College suivant les résultats publiés.

Résultats

[0417] Les résultats obtenus montrent que, tandis que les taux d'ARNm de β -actine n'ont pas varié, les taux d'ARNm de CD34, c-kit et ϵ -hémoglobine ont tous augmenté fortement après le traitement avec le Acm CR3/43. Les résultats pour CD34 et c-kit fournissent des indications supplémentaires à l'appui des résultats décrits en détail ci-dessus démontrant la rétrodifférenciation des lymphocytes B pour la production de cellules souches hématopoïétiques.

[0418] Les résultats obtenus pour la ϵ -hémoglobine sont encore plus intéressants puisque la ϵ -hémoglobine est normalement exprimée seulement dans les cellules embryonnaires. Il est donc possible que le traitement avec le Acm CR3/43 engendre non seulement des cellules souches hématopoïétiques mais également des cellules indifférenciées encore plus primitives telles que des cellules souches embryonnaires.

J. Résumé

[0419] En résumé, le dispositif conforme à la présente invention peut être utilisé dans la rétrodifférenciation de cellules différenciées en cellules souches. Les exemples décrivent des expériences in vitro qui révèlent les découvertes fécondes extrêmement intéressantes concernant l'ontogénie et le développement des lymphocytes T et des lymphocytes B, qui peuvent être utilisés dans la production de cellules souches pour influencer la lymphohématopoïèse dans des échantillons de sang périphérique en quelques heures.

[0420] Le traitement d'échantillons de sang périphérique obtenus à partir de patients souffrant d'une leucémie lymphocytaire chronique à lymphocytes B (B-CLL) ayant des numérations élevées en lymphocytes B avec un anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β d'antigènes de catégorie II a provoqué une forte augmentation du nombre relatif de lymphocytes T positifs uniques (SP) et de leurs cellules mères qui étaient doublement positives pour les marqueurs de thymocytes consistant en les antigènes CD4 et CD8, qui ont été coexprimés simultanément. Cependant, ces phénomènes étaient toujours accompagnés par une diminution importante du nombre relatif de lymphocytes B. Ces observations n'ont pas été notées lorsque les mêmes échantillons de sang ont été traités avec des anticorps monoclonaux contre la région homologue de la chaîne α d'antigènes de catégorie II ou contre la région homologue d'antigènes de catégorie I.

[0421] Le traitement de sang entier obtenu à partir de patients souffrant d'une leucémie lymphocytaire chronique à lymphocytes B (CLL) dans un dispositif conforme à la présente invention avec un anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR s'est révélé engendrer une lymphopoïèse T. Cet événement a été marqué par l'apparition de cellules doublement positives coexprimant les marqueurs CD4 et CD8, l'apparition de cellules exprimant CD34 et l'augmentation concomitante du nombre de lymphocytes positifs uniques CD4⁺CD3⁺ et CD8⁺CD3⁺. En outre, les variations immunophénotypiques qui ont eu lieu lors de la production de ces cellules étaient identiques à celles mentionnées pour le développement des thymocytes, notamment lors de la mesure effectuée au cours du temps.

[0422] Les pourcentages de cellules doublement positives (DP) engendrées au bout d'un temps d'incubation de 2 heures du sang entier avec un anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR ont diminué au cours du temps et ces événements étaient accompagnés par une augmentation des pourcentages de cellules positives uniques CD4⁺CD3⁺ et CD8⁺CD3⁺ simultanément et également ultérieurement. Les chaînes α et γ de TCR ont été également exprimées sur ces types de cellules.

[0423] Il a été constamment observé que les lymphocytes B perdaient des marqueurs tels que CD19, CD21, CD23, IgM et DR et cela coïncidait avec l'apparition de cellules CD34⁺ et CD34⁺CD2⁺, des augmentations du nombre de cellules CD7⁺, des augmentations du nombre de cellules CD8⁺CD28⁺ et CD28⁺, des augmentations du nombre de cellules CD25⁺, l'apparition de cellules CD10⁺ et CD34⁺ et de cellules CD34⁺ et CD19⁺, des augmentations du nombre de cellules CD5⁺, et de cellules exprimant des taux bas d'antigène CD45. Ces variations étaient dues au traitement du sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR.

[0424] Les variations immunophénotypiques associées à un tel traitement sont en accord avec la rétrodifférenciation et l'engagement ultérieur (c'est-à-dire le réengagement) des lymphocytes B, car la plupart des globules blancs dans le sang de patients souffrant de B-CLL avant traitement étaient des lymphocytes B. En outre, les lymphocytes B de patients souffrant de B-CLL qui ont été soumis à une induction de transformation en lymphocytes T après traitement avec du cyclophosphamide et l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène HLA-DR étaient aptes à la réversion en lymphocytes B après une incubation prolongée avec ce traitement.

[0425] Lors de l'analyse d'échantillons traités avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de l'antigène HLA-DR, avec les gammes CD16&56 et CD3 et CD8 et CD3, le nombre relatif de cellules exprimant ces marqueurs a augmenté constamment par incréments en accord avec ceux déterminés avec des gammes telles que CD19 et CD3 et DR et CD3. Des études du surnageant d'échantillons traités et d'échantillons non traités provenant de patients infectés par le VIH en utilisant la néphélométrie et l'immuno-électrophorèse révèlent des taux accrus de IgG indiquant que les lymphocytes B doivent être passés par le stade de cellules plasmatiques. L'augmentation du nombre relatif de toutes les cellules précitées a été également accompagnée par l'apparition de cellules fortement granuleuses de dimension moyenne exprimant les antigènes CD56&16 en des quantités extrêmement élevées. D'autres cellules qui étaient extrêmement volumineuses et fortement granuleuses ont été observées de manière transitoire et ces cellules étaient positives pour CD34 et doublement positives pour les marqueurs CD4CD8. D'autres cellules transitoires ont été également observées et ces cellules étaient volumineuses et granuleuses ainsi que positives pour les récepteurs CD3 et CD19. CD35 qui était présent sur la plupart des lymphocytes B a été perdu et est devenu exprimé par les lymphocytes nouvellement formés qui ont été toujours observés en un nombre croissant.

[0426] Des cellules CD28⁺CD8⁺ et CD28⁺ sont apparues après traitement du sang entier de patients sous forme de B-CLL avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène DR. Ces découvertes étaient dues au traitement du sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR.

[0427] La lymphopoïèse T engendrée de cette manière a été également observée dans le sang périphérique de donneurs de sang sains, le sang de cordon, la moelle osseuse, chez des patients souffrant de diverses infections comprenant des individus HIV⁺ et des patients atteints du SIDA, des fractions enrichies en lymphocytes B obtenus à partir d'échantillons de sang de donneurs de sang sains, des patients présentant une déficience en IgA et d'autres patients souffrant de diverses autres affections. En outre, l'analyse de marqueurs myéloïdes dans les échantillons traités de deux patients souffrant de B-CLL avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR a mis en évidence une forte augmentation du nombre relatif de cellules exprimant les marqueurs myéloïdes tels que CD13 et CD33. Ces marqueurs étaient coexprimés avec les antigènes CD56&16 ou l'antigène CD7. Cependant, le nombre relatif de cellules CD7⁺ avec des marqueurs de lymphocytes T et sans antigènes myéloïdes a été observé sur une population de cellules distincte. Ces observations particulières n'ont pas été constatées dans les échantillons non traités ou dans les échantillons traités avec des anticorps monoclonaux contre les antigènes de catégorie I ou la région homologue de la chaîne α de l'antigène HLA-DR (voir les schémas 2 et 3). Ces résultats finals suggèrent que les lymphocytes B, une fois déclenchés par la chaîne β de l'antigène HLA-DR, sont non seulement aptes à la régression en cellules mères des lymphocytes T, mais sont également capables d'exister dans les lignées myéloïdes et érythroïdes.

[0428] Ainsi, en résumé, les résultats indiqués dans la présente demande démontrent que, dans un dispositif conforme à la présente invention, (i) il est possible de convertir des cellules saines d'une lignée en cellules comprenant les marqueurs de surface cellulaire et les caractéristiques morphologiques de cellules, de plusieurs autres lignées, et (ii) il est possible d'obtenir des cellules comprenant les marqueurs de surface cellulaire et des caractéristiques morphologiques des cellules précurseurs primitives (par exemple des cellules souches), à partir de lymphocytes B et lymphocytes T différenciés.

[0429] Il faut noter qu'un certain nombre d'expériences ont été effectuées avec des cellules BCLL. Les cellules BCLL sont des lymphocytes B matures qui sont incapables de se différencier en une cellule plasmatique au stade final de différenciation terminale. En variante, en raison d'une déficience chromosomique, ces cellules présentent des degrés élevés de prolifération d'où les grands nombres de lymphocytes B dans le sang de patients souffrant de BCLL. A l'opposé d'un certain nombre de cellules tumorales décrites dans l'art antérieur, les cellules BCLL n'ont subi aucun type de différenciation inverse limité avant utilisation dans les procédés de la présente invention. En outre, elles ne présentent aucune caractéristique des cellules indifférenciées en termes de structure génomique, de marqueurs cellulaires ou de morphologie cellulaire. Elles consistent à tous égards en lymphocytes B matures.

[0430] Ainsi, tandis que certaines cellules malignes peuvent présenter à un degré limité certaines caractéristiques des cellules indifférenciées, cela n'est pas le cas pour les cellules BCLL, qui constituent un système expérimental parfaitement acceptable pour l'étude des lymphocytes B. En fait, les cellules BCLL et les cellules Daudi ne sont pas suffisamment différenciées des cellules normales à tous égards en ce qui concerne ces expériences. En effet, l'aptitude des cellules BCLL comme système servant de modèle est confirmée par Martensson et al., 1989, Eur. J. Immunol. 19:1625-1629 (voir les pages 1625 et suivantes, premier paragraphe).

[0431] En outre, le traitement d'échantillons de couches leucocytaires sanguines humaines provenant de donneurs sains avec l'anticorps monoclonal CR3/43 a eu pour résultat une plus forte incidence de CD34 (marqueur des cellules souches) et une plus faible incidence de CD19 (marqueur des lymphocytes B).

[0432] Il faut noter que les cellules souches qui sont produites par le procédé de la présente invention peuvent être des cellules souches de n'importe quel tissu et ne sont pas obligatoirement limitées aux cellules mères lymphohématopoïétiques.

[0433] D'autres modifications de la présente invention seront manifestes pour l'homme de l'art.

[0434] Comme cela sera aisément manifeste pour l'homme de l'art, le dispositif de la présente invention n'est pas obligatoirement limité à l'utilisation avec une population cellulaire comprenant des cellules engagées et/ou un agent tel que décrit dans le présent mémoire, et est apte à l'utilisation avec n'importe quel mode opératoire qui nécessite le mélange à l'incubation d'un fluide avec un agent.

[0435] Toutes les publications mentionnées dans la description ci-dessus sont citées à titre de référence dans le présent mémoire. Diverses modifications et variantes apportées aux procédés et systèmes décrits de la présente invention seront manifestes pour l'homme de l'art sans s'écarter du cadre et de l'esprit de la présente invention. Bien que la présente invention ait été décrite en rapport avec des formes de réalisation préférées spécifiques, il doit être entendu que la présente invention, telle qu'elle est revendiquée, ne doit pas être limitée excessivement à de telles formes de réalisation spécifiques. En effet, diverses modifications des modes décrits de mise en pratique de la présente invention qui sont manifestes pour le spécialiste de la biologie moléculaire ou de domaines apparentés sont destinées à entrer dans le cadre des revendications suivantes.

Tableau 1

[0436] Diagnostic clinique de patients et conditions expérimentales d'échantillons de sang, comprenant des numérations au moyen d'un compteur Coulter (WBC) après et avant traitement d'échantillons de sang avec divers anticorps monoclonaux et d'autres agents

[0437]

Patient ID	Diagnostic	Expt COND	WBC/l		% LYMPH		#LYMPH/l		AGENT
			X10-9				10X-9		ML/mL
			B	A	B	A	B	A	
1	B-CLL	12 h à 22C	100	ND	86,1	ND	86,1	ND	ANTI-B 50
2	B-CLL	2 h à 22 C	39,1	9,6	74,4	63,3	29,9	6,1	ANTI-B 50
		2 h à 22 C	39,1	37,7	74,4	75,1	29,9	28,3	ANTI-B PE 50
3	B-CLL	6 h à 22 C	39,5	9,3	71,9	67,2	28,3	6,2	ANTI-B 50
		6 h à 22 C	39,5	37,7	71,9	72,5	28,3	27,4	ANTI-B PE 50
4	B-CLL	24 h à 22 C	39	9,3	73	66,5	28,4	6,2	ANTI-B 50
		24 h à 22 C	39	36,2	73	70,4	28,4	25,5	ANTI-B PE 50
5	B-CLL	2 h à 22 C							ANIT-B 50 ANTI-A 50 ANTI-I 50

CH 696 146 A5

Patient ID	Diagnostic	Expt COND	WBC/l		% LYMPH		#LYMPH/l		AGENT ML/mL
			X10-9				10X-9		
			B	A	B	A	B	A	
									ANTI-B & agent toxique 25+25
6	B-CLL	24 h à 22 C							ANTI-B 50
7	B-CLL	24 h à 22 C	170	128 178 130	95,4	91,1 94,2 90,4	16,9	11,6 16,8 11,9	ANTI-B 10 ANTI-I 10 ANTI-B & agent toxique 10+20
8	B-CLL	24 h à 22 C	16	7	81,9	51,2	14	3,0	ANTI-B 20
9	B-CLL	12 h à 22 C	+++	89,5 +++ +++ 95,4	87	85,1 85,4 89,4 84,9	+++	76,2 +++ +++	ANTI-B 30 ANTI-I 30 ANTI-4 30 ANTI-I+II+4 10+10+10
10	B-CLL	2 h à 22 C	19,3	ND	86	ND	16,7	ND	ANTI-B 30 ANTI-I 30
92	consultant externe	2 h à 22 C	5,4	ND	74,5	ND		ND	ANTI-B 20
87	consultant externe	2 h à 22 C	4,8	ND	59,3	ND		ND	ANTI-B 20
91	consultant externe	2 h à 22 C	4,2	ND	54,0	ND		ND	ANTI-B 20
21	consultant externe	2 h à 22 C	3,9	ND	47,4	ND		ND	ANTI-B 20
34	consultant externe	2 h à 22 C	7,2	ND	20,0	ND		ND	ANTI-B 20
36	nourrisson CMV	4 h à 22 C	13,4	ND	7,3	ND		ND	ANTI-B 20
93	nourrisson HIV+	4 h à 22 C	5,6	ND	43,4	ND		ND	ANTI-B 20
BB/ST	40% de blast dans le sang age de jours	2 h à 22 C 24 h à 22 C	60,5	ND	20,2	ND	12,2	ND	ANTI-B 5= ANTI-A 50 ANTI-AB 25+25
HIV25	SIDA	2 h à 22 C	7,5	ND	34,8	ND	2,6	ND	ANTI-B 50 ANTI-A 50 ANTI-AB 25+25
43/BD	déficience en lympho- cytes B	4 h à 22 C							ANTI-B 20 ANTI-I 20 ANTI-4 20

Patient ID	Diagnostic	Expt COND	WBC/I		% LYMPH		#LYMPH/I		AGENT
			X10-9				10X-9		
			B	A	B	A	B	A	
0B/BD	déficience en lymphocytes B	4 h à 22 C							ANTI-B 20 ANTI-I 20 ANTI-4 20
HIV+	SIDA	6 h à 22 C							ANTI-B 20 ANTI-I
IgA-D	déficience en IgA	6 h à 22 C							ANTI-B 20 ANTI-I 20

Cond Exp: Conditions expérimentales

B: Avant

A: Après

[0438]

ANTI-B: anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR

ANTI-A: anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne α de l'antigène HLA-DR

ANTI-I: anticorps monoclonal contre la région homologue d'antigènes de catégorie I

ANTI-AB: ANTI-B et ANTI-A ajoutés conjointement

ANTI-4: anticorps monoclonal contre l'antigène CD4

ANTI-I-II+4: ANTI-I et ANTI-B et ANTI-4 ajoutés conjointement

Agent cytotoxique: cyclophosphamide

μ l/ml: microlitre par ml

1: litre

Tableau 2

[0439] Immunophénotypage de patients souffrant de B-CLL et d'autres affections avant et après traitement d'échantillons de sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR avec les anticorps monoclonaux contre CD19 et CD3

Patient	% CD19+		% CD3+		% CD19+CD 3+		% CD3- CD19-		% CD19+HG CD3-FC+	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
1	88	40	5	19	1	2	6	26	0	12
2	73	15	10	33	2	7	15	41	0	5
3	73	11	11	33	2	2	14	52	0	2
4	71	13	11	37	2	2	16	47	0	2
5	85	40	5	16	1	1	6	26	3	18
6	85	43	5	18	1	1	6	27	3	10
7	90	72	2	4	0	2	7	8	0	14
8	62	25	7	13	0	1	29	55	2	6

CH 696 146 A5

Patient	% CD19+		% CD3+		% CD19+CD 3+		% CD3- CD19-		% CD19+HG CD3-FC+	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
9	90	85	2	3	0	0	2	1	1	4
10	78	50	7	14	0	0	14	26	0	8
92	12	10	38	49	0	1	49	40	0	0
91	7	3	35	29	0	1	59	67	0	0
87	5	3	32	38	1	1	63	58	0	0
21	1	1	27	29	1	0	71	70	0	0
34	1	1	13	13	0	2	86	84	0	0
39	10	6	23	25	0	0	67	69	0	0
93	6	3	26	27	1	1	68	70	0	0
BB/ST	1	1	12	13	0	0	87	86	0	0
HIV25	7	2	26	27	0	0	68	67	0	0
43/BD	0	0	40	42	0	1	58	54	0	0
04/BD	0	0	49	41	0	3	43	41	0	0
HIV+	1	1	10	14	0	0	89	87	0	0
IgA/D	10	1	21	25	2	3	67	71	0	0

B: avant A: après

Tableau 3

[0440] Immunophénotypage de patients souffrant de B-CLL et d'autres affections avant et après traitement d'échantillons de sang avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de la région homologue de HLA-DR avec les anticorps monoclonaux contre CD4 et CD8

Patient	%CD8+		%CD4+		%CD4+CD 8+		%CD4-CD8-		CD4+LO W	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
1	2,8	16	2,9	11,4	0	3,2	93,1	67,6	0	0
2	6,2	13,2	9,1	24,3	0	9,4	78,7	46	5,8	6,3
3	7,2	13,1	7,4	23,9	0	8,2	78,8	48,1	6,3	6,6
4	10,1	24,2	7,6	24,9	0,3	2,8	77,5	42	4,6	5
5	2,9	16,2	1,8	7,6	0	2	95	62,3	0	0
6	ND	12	ND	8,1	ND	1,7	ND	75,7	ND	0
7	1,9	2,6	1,9	2,8	0	0	95,8	94,3	0	0
8	3,2	7	3,9	6,9	0,1	2	87,3	79,8	4,3	6
9	2,8	2,9	3	3	0	0	94	94,1	0	0
10	5,7	9,4	4,7	9,1	0,6	0,8	88,7	79,2	0	0
92	21	19	21,6	21	0,8	1,9	50,5	52,5	5,3	4,8

CH 696 146 A5

Patient	%CD8+		%CD4+		%CD4+CD 8+		%CD4-CD8-		CD4+LO W	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
91	15,4	18,1	13,6	17,9	6,2	2,6	57	57,3	7,3	3,5
87	16,8	21,8	13,4	20,4	2,9	2,6	59,5	48,9	7	5,6
21	16	24,1	9,1	15,2	1	2,6	69,6	53,2	3,7	4,2
34	9,4	11,9	5,7	4,9	2	3,3	67,6	65,3	14,4	14,5
39	12,1	12,6	13,1	14,6	0,4	1,3	62,3	66,7	11,9	4,3
93	18,9	20,3	9,7	10,3	1,8	1,4	65,5	65,9	3,4	1,8
BB/ST	6,3	13	5,7	7,3	2,2	1,1	34,7	70,3	50,3	7,6
HIV25	24,1	24,9	0,8	1,1	1,3	5	70,2	69,3	2,9	3,8

[0441] Tableau 4

[0442] Immunophénotypage de patients souffrant de B-CLL et d'autres affections avant et après traitement d'échantillons avec l'anticorps monoclonal contre la chaîne β de HLA-DR avec les anticorps monoclonaux contre CD3 et DR

Patient	DR+		CD+		CD+DR+		DR-CD3-		DR+HCD3-	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
1	87	45,5	3,5	20,8	2,5	4,2	6,9	21,6	0	7,6
2	76,2	19,4	9,6	29,2	3,9	8,7	10,3	36,8	0	5,5
3	77,7	18,3	8,4	29,4	4,1	8,8	9,6	38,1	0	4,7
4	76,8	19,2	7,6	29,5	6,2	10,5	9,1	37,2	0	3,3
5	ND	47,1	ND	11,5	ND	9,9	ND	22,4	ND	7,3
6	ND									
7	91,4	85,8	2,4	2,5	0,7	0,7	5,1	4,2	0	6,3
8	61,8	28,9	6,5	11,2	2	3,3	28,6	54,6	0	1,5
9	ND									
10	82,6	44,7	4,3	9,8	3,3	5	9,8	22,2	0	17,9
92	23,8	14,1	39,3	41,9	4,5	3,5	32,4	40,5	0	0
91	13,3	7,9	29,6	32,5	3,4	2,9	53,4	56,5	0	0
87	14,8	12,2	28,4	34,1	5,5	6,6	51,1	46,5	0	0
21	ND									
34	11,9	12,9	10,4	13,7	0,8	0,6	76,7	72,8	0	0
39	25,6	13,7	24,6	25,2	3	2,8	46,5	25,2	0	0
93	13,3	8,9	18,4	18,9	9,9	10,1	58,2	61,7	0	0
BB/ST	44,2	32,5	11,7	12,2	0,8	0,8	43	49,4	0	4,6

Tableau 5

[0443] Immunophénotypage de patients souffrant de B-CLL et d'autres affections avant et après traitement d'échantillons de sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de HLA-DR avec les anticorps monoclonaux contre CD16+56 et CD3

Patient	CD56+&16		CD3+		CD56+&16+C D3+		CD56+&16-CD3-	
	B	A	B	A	B	A	B	A
1	2	4,3	5,7	19,7	0,7	1,7	91,3	73
2	11,5	38,9	12,4	32,6	1	6,6	74,5	21
3	12	36,2	12,1	34,5	0,7	6	75,5	23
4	12,2	32,6	12,4	39,6	0,5	5	74,7	22,2
5	ND	13,1	ND	9,4	ND	2,6	ND	73,5
6	ND							
7	0,8	0,8	2,8	2,4	0,3	0,2	96,2	96,4
8	24,8	52	5,4	12,4	0,9	4,1	68,3	31,1
9	ND							
10	1,1	1,3	6,1	13,7	2,1	2,5	90,5	82,4
92	23,8	34,5	44,3	44,8	2	1,5	29,2	18,6
91	4,6	3,9	28,8	29,4	3	3,2	63,3	63,3
87	47,9	46,4	28,8	36,5	5,8	3,7	16,9	13
21	9,4	9,4	19,7	23,6	4,2	6,7	66	59,5
34	21,5	12,8	11,4	13,7	1,8	0,6	64,6	72,8
39	7	2,7	23,4	26,1	1,1	0,1	68,2	71
93	55,8	54,9	26,2	26,3	1,7	2	16,1	16,8
BB/ST	28,8	29,9	12	14,3	0,8	1,8	49,4	53,6

Tableau 6

[0444] Immunophénotypage de patients souffrant de B-CLL et d'autres affections avant et après traitement du sang avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de HLA-DR avec les anticorps monoclonaux contre GD45 et CD14

Patients	CD45+H		CD45+L		CD45+CD14+	
	B	A	B	A	B	A
1	90,5	70,1	7,5	21,9	0,8	3,3
2	85,8	52,2	8,8	38,3	5,3	9,5
3	84,3	52,2	9,9	33,8	5,1	13,2
4	91,5	79,2	2,1	7	5,7	10,8
5	63,1	84,6	34,9	9,4	0,5	3,6
6	ND					
7	52,8	85,2	45,6	13,9	0,5	0,6

CH 696 146 A5

Patients	CD45+H		CD45+L		CD45+CD14+	
	B	A	B	A	B	A
8	71,1	55	71,1	34,5	5,3	8,7
9	SEE					
10	79,7	47,3	16,3	48	2,1	1,9
92	61,7	64,7	27,4	26,6	5,9	3,6
91	49,4	49,2	40,4	44,3	6,5	3,2
87	52,4	61,5	36,1	28,7	7	6,5
21	45,8	43,3	44,3	47,6	6,2	3,3
34	24,4	24,6	54,8	59,6	13,3	9,7
39	48,7	46,3	30,5	42,1	14,5	8,8
93	SEE					
HIV+	22,6	26,9	66,8	63,5	6,8	6,7
IgA/D	47,4	59,8	41,9	33,3	5,9	4,1

[0445] Tableau 7

[0446] Immunophénotypage de patients souffrant de B-CLL et d'autres affections avant et après traitement du sang avec les anticorps monoclonaux contre la région homologue de la chaîne β de HLA-DR avec les anticorps monoclonaux contre CD8 et C3

Patients	CD8+			CD3+	3+	CD8+CD	CD3-	CD8-
	B	A	B	A	B	A	B	A
2	0,6	1,3	7,5	19,3	4,2	19,3	87,7	63,8
3	1,1	1,4	8,3	20,3	5,6	18,4	84,8	59,8
4	3,5	2,9	8,3	27	3,9	16,6	84,2	53,1
92	3,5	19	27,6	25,2	18,4	19	50,3	52,8
91	4	3,1	18,2	19	14,1	12,6	63,6	65,3
87	5,7	3,9	19,9	23,6	15,4	17,4	58,8	55
21	4,8	7,4	16,3	17,3	13,7	13	65,2	62
34	3	3,6	5,2	6,7	7,6	7,5	84,1	82,3

Tableau 8

[0447] Immunophénotypage d'un patient souffrant de B-CLL au cours du temps après traitement du sang avec l'anticorps monoclonal, conjugué au PE, contre la région homologue de la chaîne β de HLA-DR. Mesure avec les anticorps monoclonaux contre CD45 et CD14

Temps	DR+CD45+CD14+r	CD45+L	CD45+H
2 h	81,7	8,2	8,2
6 h	80,7	8,1	10,6
24 h	79	1,1	18,4

Tableau 9

[0448] Immunophénotypage d'un patient souffrant de B-CLL au cours du temps après traitement du sang avec l'anticorps monoclonal, conjugué au PE, contre la région homologue de la chaîne β de HLA-DR. Mesuré avec les anticorps monoclonaux contre CD19 et CD3

temps	CD19+DR+r	CD3+	CD3+DR+	CD19-CD3-DR-
2 h	87,4	10,1	1,8	10,7
6h	75,5	10,4	3,1	10,7
24 h	74	11,7	2,9	11

Tableau 10

[0449] Immunophénotypage d'un patient souffrant de B-CLL au cours du temps après traitement du sang avec l'anticorps monoclonal, conjugué au PE, contre la région homologue de la chaîne β de HLA-DR. Mesuré avec les anticorps monoclonaux contre CD4 et CD8

temps	CD8+& DR+r	CD4+	CD4+&CD8+&DR +r	CD4+DR+	CD4-CD8-DR-
2 h	77,6	6,8	5,4	1,3	8,8
6 h	75,8	6,7	6,4	1,8	9,3
24 h	77	6,4	4,8	1,9	11

Tableau 11

[0450] Immunophénotypage d'un patient souffrant de B-CLL au cours du temps après traitement du sang avec l'anticorps monoclonal, conjugué au PE, contre la région homologue de la chaîne β de HLA-DR. Mesuré avec les anticorps monoclonaux contre CD3 et DR

[0451]

temps	DR+	CD3+	CD3+DR+	CD3+DR
2 h	75	9,5	4,2	10,9
6 h	74,8	8,8	4,8	10,9
24 h	ND	ND	ND	ND

Tableau 12

[0452] Immunophénotypage d'un patient souffrant de B-CLL au cours du temps après traitement du sang avec l'anticorps monoclonal, conjugué au PE, contre la région homologue de la chaîne β de HLA-DR. Mesuré avec les anticorps monoclonaux contre CD16&56 et CD3

[0453]

temps	CD56+&16+DR+r	CD3+	CD56+CD16+&CD3+DR+r	CD56-CD16-&CD16-DR-
2 h	82,5	9,5	4,1	3,5
6 h	84,3	7,5	4,1	3,3
24 h	ND	ND	ND	ND

Tableau 13

[0454] Immunophénotypage d'un patient souffrant de B-CLL au cours du temps après traitement du sang avec l'anticorps monoclonal, conjugué au PE, contre la région homologue de la chaîne β de HLA-DR. Mesuré avec les anticorps monoclonaux contre CD8 et CD3

CH 696 146 A5

temps	CD8+DR+	CD3+	CD8+CD+3&DR+r	CD8-CD3-DR-
2 h	76,2	6,6	6,7	10,6
6 h	76,5	6,2	6,2	10,3

Tableau 14

[0455] Immunophénotypage de patients souffrant de B-CLL avant et après traitement du sang avec les anticorps monoclonaux contre la région homologue de la chaîne α de HLA-DR, la région homologue de la chaîne β de HLA-DR, les deux anticorps monoclonaux ensemble, l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β plus du cyclophosphamide et la région homologue d'antigènes de catégorie I. Mesuré au cours du temps

ID	CD19+					CD3+					CD19+CD3+					CD19-CD3-				
	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI
		A		BC			A		BC			A		BC			A		BC	
5/6 2 h 24	86 N	91 88	54 51	40 60	89 86	5 N	4 4	16 18	23 10	5 4	1 N	1 2	3 1	2 2	1 3	6 N	4 4	27 29	33 28	5 7
10 2 h	77	N	59	N	80	7	N	13	N	7	1	N	1	N	0	14	N	26	N	12
09 24	8	N	N	N	6	32	N	N	N	38	1	N	N	N	1	59	N	N	N	56
43/ BD 6 h	0	N	0	0	0	40	N	42	43	49	0	N	1	0	1	58	N	54	54	47
04/ BD 6 h	0	N	0	0	0	49	N	41	45	46	0	N	3	1	3	43	N	42	44	41
HIV+ 6 h	1	N	0	N	1	10	N	14	N	12	0	N	0	N	0	89	N	86	N	87
IgA/D 6 h	10	N	1	N	12	21	N	25	N	20	2	N	1	N	3	67	N	71	N	68

B = avant; A = après; AB = après addition de l'anticorps contre la chaîne bêta; AA = après addition de l'anticorps contre la chaîne alpha; ABC = après addition de l'anticorps contre la chaîne alpha ou bêta et de cyclophosphamide; A1 = après addition de l'anticorps contre la catégorie I.

Tableau 15

[0456] CD8 et CD 4

ID	CD8+					CD4+					CD4+CD8+					CD4-CD8-				
	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI
		A		BC			A		BC			A		BC			A		BC	
5/6 2 h 24	3 N	2 3	14 9	10 4	4 4	2 N	2 3	8 8	8 4	3 3	0 N	0 0	3 2	2 2	1 0	95 N	94 94	74 81	79 90	93 93
10 2 h	3	N	7	N	4	4	N	7	N	3	1	N	2	N	1	91	N	83	N	92
09 24	10	N	N	N	15	21	N	N	N	38	2	N	N	N	2	61	N	N	N	53

CH 696 146 A5

Tableau 16

[0457] CD3 et DR

ID	DR+					CD3+					CD3+DR+					CD3-DR-				
	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI
5/6 2 h	N	90	54	N	87	N	4	12	N	4	N	2	10	N	3	N	5	22	N	5
10 2 h	83	N	63	N	81	4	N	8	N	4	4	N	7	N	4	9	N	23	N	12
09 24	14	N	N	N	13	30	N	N	N	36	3	N	N	N	3	51	N	N	N	47

Tableau 17

[0458] CD16 & 56 et CD3

ID	CD56+&16+					CD3+					CD56+&16+CD3+					CD56-&16-CD3-				
	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI
5/6 2 h	N	0	13	N	4	N	5	9	N	5	N	1	3	N	1	N	94	74	N	90
10 2 h	0	N	1	N	1	6	N	14	N	6	1	N	2	N	1	92	N	65	N	92
09 24	42	N	N	N	41	36	N	N	N	38	2	N	N	N	2	20	N	N	N	19

Tableau 18

[0459] CD45 et CD 14

ID	CD45+L					CD45+M					CD45+H					CD45+CD1 4+				
	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI
5/6 2 h	0	0	5	10	0	44	43	50	50	32	55	43	50	31	67	1	1	1	2	0
10 2 h	0	N	0	N	0	43	N	54	N	35	54	N	42	N	62	1	N	1	N	0
09 24	2	N	N	N	1	18	N	N	N	16	71	N	N	N	76	7	N	N	N	5
HIV + 6 h	4	N	3	N	6	63	N	61	N	41	23	N	27	N	40	7	N	7	N	7
IgA/D 6 h	2	N	2	N	4	40	N	31	N	44	47	N	60	N	44	6	N	4	N	6

Tableau 19

[0460] CD8 et CD28

CH 696 146 A5

ID	CD8+					CD28+					CD8+CD28+					CD8-CD28-				
	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI
5/6 2 h	N	3	6	N	3	N	1	4	N	2	N	1	4	N	1	N	95	86	N	94
8 2 h	4	N	6	N	N	3	N	5	N	N	1	N	3	N	N	92	N	86	N	N

Tableau 20

[0461] CD34 et CD2

ID	CD34+					CD2+					CD34+CD2+					CD34-CD2-				
	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI	B	A A	AB	A BC	AI
5/6 2 h 24	N	1	34	N	N	N	6	13	N	N	N	3	30	N	N	N	90	21	N	N
	N	1	6	9	N	N	7	23	4	N	N	3	33	43	N	N	87	34	34	N
HIV + 2 h	2	1	12	13	N	20	21	21	12	N	4	5	9	14	N	73	73	64	60	N
BB/ST 2h 24	26	23	33	14	N	15	14	15	15	N	3	30	23	36	N	27	32	28	35	N
	N	11	29	11	N	N	13	12	9	N	1	27	9	18	N	N	48	49	61	N
											N									

Tableau 21

[0462] Analyse par FACS en utilisant des cellules dérivées de la couche leucocytaire humaine

Marqueur cd	Analyse initiale	Analyse à 2 heures	Analyse à 2 heures	Analyse à 24 heures	Analyse à 24 heures	Analyse à 5 jours	Analyse à 5 jours
Marqueur cd	Analyse initiale	Cellules non traitées	Cellules traitées	Cellules non traitées	Cellules traitées	Cellules non traitées	Cellules traitées
CD 45							
CD 38	54,9	55,6	30,1	51,8	52,8	13,0	5,4
CD34	0,6	0,5	11,5	9,7	8,0	0,4	25,1
CD10	0,2	0,0	0,9	1,9	1,8	0,0	0,2
CD19	13,2	0,0	15,1	11,1	2,3	8,7	0,7
CD34	1,8	13,1	0,4	13,0	9,1	0,4	25,8
CD3	56,3	62,6	29,7	46,9	69,2	79,8	63,4
CD117	0,3	0,6	0,0	1,3	0,8	0,2	0,1
CD34	1,8	0,6	7,4	6,4	6,0	0,2	24,6
CD71	1,5	0,4	0,0	4,8	3,9	0,2	42,9
GLYCA	5,4	2,3	10,1	3,6	2,8	3,8	1,8
CD34	1,3	0,6	14,3	12,5	8,9	0,4	24,3

CH 696 146 A5

Marqueur cd	Analyse initiale	Analyse à 2 heures	Analyse à 2 heures	Analyse à 24 heures	Analyse à 24 heures	Analyse à 5 jours	Analyse à 5 jours
Marqueur cd	Analyse initiale	Cellules non traitées	Cellules traitées	Cellules non traitées	Cellules traitées	Cellules non traitées	Cellules traitées
CD90	18,4	12,6	0,0	9,3	5,0	0,1	0,3
AC133	0,1	0,0	2,0	0,3	0,4	0,0	0,1
CD34	1,5	0,6	11,9	10,8	7,7	0,0	13,2

[0463] Les valeurs sont exprimées par le pourcentage de cellules exprimant les marqueurs

Schema 1

[0464] Modifications immunophénotypiques d'échantillons de sang non traités et traités de patient (2, 3 et 4) avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR; mesure au cours du temps

[0465]

RIEN	AVEC	FL1	FL2	TEMPS
Rien	001 avec	002 CD45	CD14	2 h
NO001	WE002	CD45	CD14	6 h
001001	002002	CD45	CD14	24 h
rien	003 avec	004 CD3	CD19	2 h
NO003	WE004	CD3	CD19	6 h
001003	002004	CD3	CD19	24 h
rien	004 avec	005 CD4	CD8	2 h
NO004	WE005	CD4	CD8	6 h
001004	002005	CD4	CD8	24 h
rien	005 avec	006 CD3	DR	2 h
NO005	WE006	CD3	DR	6 h
001005	002006	CD 3	DR	24 h
rien	006 avec	007 CD 3	CD56&16	2 h
NO006	WE007	CD3	CD56&16	6 h
001006	002007	CD3	CD56&16	24 h
N003	W004	CD3	CD8	2 h
NO007	WE008	CD3	CD8	6 h
001	002008	CD3	CD8	24 h

Schema 1A

[0466] Modifications immunophénotypiques d'échantillons de sang non traités et traités de patient (2, 3 et 4) avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR conjugué à du PE; mesuré au cours du temps

ID	FL1	FL2	heure
WL003	CD45	CD14	2 h

CH 696 146 A5

ID	FL1	FL2	heure
WEL003	CD45	CD14	6 h
003003	CD45	CD14	24 h
WL005	CD3	CD19	2 h
WEL005	CD3	CD19	6 h
003005	CD3	CD19	24 h
WL006	CD4	CD8	2 h
WEL006	CD4	CD8	6 h
003006	CD4	CD8	24 h
WL007	CD3	DR	2 h
WEL 007	CD3	DR	6 h
WL008	CD3	CD65&16	2 h
WEL 008	CD3	CD56&16	6 h
WL005	CD3	CD8	2 h
WEL009	CD3	CD8	6 h

Schema 2

[0467] Modifications immunophénotypiques de sang non traité et de sang traité du patient (1) avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR avec cet anticorps et du cyclophosphamide, avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne α de l'antigène HLA-DR et l'anticorps monoclonal contre la région homologue de l'antigène de catégorie I; mesuré au cours du temps

avec sans	sans	FL1	FL2	heures
	NA001	CD45	CD14	2 h
A2B001:AB		CD45	CD14	2 h
A2A: AA		CD45	CD14	2 h
DNAA001:ABC		CD45	CD14	2 h
A1001:AI		CD45	CD14	2 h
	NC001	CD3	CD19	2 h
C2B001:AB		CD3	CD19	1 h
C2A001:AA		CD3	CD19	2 h
DNAC001:ABC		CD3	CD19	2 h
C1001: al.		CD3	CD19	2 h
A124H001:AI		CD3	CD19	24 h
A2B24H001: AB		CD3	CD19	24 h
A2A24H001:AA		CD3	CD19	24 h
A2BX24H001:ABC		CD3	CD19	24 h
	ND001	CD4	CD8	2 h

CH 696 146 A5

avec sans	sans	FL1	FL2	heures
D2B001:AB		CD4	CD8	2 h
D2A001:AA		CD4	C08	2 h
DNAD001:ABC		CD4	CD8	2 h
D1001:AI		CD4	CD8	2 h
D124H001:AI		CD4	CD8	24 h
D2BX24H001:ABC		CD4	CD8	24 h
D2B001: AB		CD4	CD8	24 h
D2A001:AA		CD4	CD8	24 h
E1001:AI		CD3	DR	2 h
E2B001:AB		CD3	DR	2 h
E2A001:AA		CD3	DR	2 h
F1001:AI		CD3	CD56&16	2 h
F2B001:AB		CD3	CD56&16	2 h
F2A001:AA		CD3	CD56&16	2 h
G1001:AI		CD28	CD8	2 h
G2A001:AA		CD28	CD8	2 h
G2B001:AB		CD28	CD8	2 h
H1001:AI		CD7	CD33&13	2 h
H2A001: AA		CD7	CD33&13	2 h
H2B001:AB		CD7	CD33&13	2 h
I2A001:AA		CD21	CD5	2 h
I2B001:AB		CD21	CD5	2 h
J2A001:AA		CD34	CD2	2 h
J2B001:AB		CD34	CD2	2 h
B2A24H001:AA		CD34	CD2	24 h
B2B24H001:AB		CD34	CD2	24 h
B2BX24H001: ABC		CD34	CD2	24 h
K2B001:AB		CD10	CD25	2 h
K2A001:AA		CD10	CD25	2 h

Schema 3

[0468] Modifications immunophénotypiques de sang non traité et de sang traité du patient (8) avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR

CH 696 146 A5

		FL1	FL2	
avec	sans			
	AN001	CD45	CD14	2 h
A2001		CD45	CD14	2 h
	CN001	CD3	CD19	2 h
C2001		CD3	CD19	2 h
	DN001	CD4	CD8	2 h
D2001		CD4	CD8	2 h
	EN001	CD3	DR	2 h
E2001		CD3	DR	2 h
	FN001	CD3	CD56&16	2 h
F2001		CD3	CD56&16	2 h
	GN001	CD28	CD8	2 h
G2001		CD28	CD8	2 h
	HN001	CD7	CD5	2 h
H2001		CD7	CD5	2 h
	IN001	CD13	CD20	2 h
I2001		CD13	CD20	2 h
	JN001	CD45RA	CD25	2 h
J2001		CD45RA	CD25	2 h
	KN001	CD57	CD23	2 h
K2001		CD57	CD23	2 h

Schema 4

[0469] Modifications immunophénotypiques d'échantillons de sang non traités et traités du patient (10) avec l'anticorps monoclonal contre la région homologue de la chaîne β de l'antigène HLA-DR et l'anticorps monoclonal contre la région homologue d'antigènes de catégorie I

		FL1	FL2	
avec	sans			
	CLL0001	CD45	CD14	2 h
CLL1001		CD45	CD14	2 h
CLL2001		CD45	CD14	2 h
	CLL0003	CD3	CD19	2 h
		CD3	CD19	2 h
CLL1003		CD3	CD19	2 h
CLL2003		CD3	CD19	2 h
	CLL0004	CD4	CD8	2 h

		FL1	FL2	
avec	sans			
CLL1004		CD4	CD8	2 h
CLL2004		CD4	CD8	2 h
	CLL005	CD3	DR	2 h
CLL1005		CD3	DR	2 h
CLL2005		CD3	DR	2 h
	CLL0006	CD3	CD56&16	2 h
CLL1006		CD3	CD56&16	2 h
CLL2006		CD3	CD56&16	2 h

Revendications

1. Dispositif pour la formation et/ou l'augmentation du nombre relatif de cellules indifférenciées dans une population cellulaire comprenant des cellules engagées, dispositif qui comprend une chambre, un moyen pour introduire dans ladite chambre une population cellulaire comprenant des cellules engagées, un moyen pour introduire dans ladite chambre des moyens de rétrodifférenciation qui sont capables de provoquer la rétrodifférenciation d'une cellule engagée en une cellule indifférenciée, et un moyen d'incubation pour la mise en incubation desdites cellules engagées en présence desdits moyens de rétrodifférenciation de manière à parvenir à la rétrodifférenciation d'une cellule engagée en une cellule indifférenciée selon la revendication 1 dans lequel les moyens de rétrodifférenciation sont réalisés par un agent qui provoque la rétrodifférenciation de la cellule engagée en une cellule indifférenciée.
2. Dispositif suivant la revendication 1, qui comprend un moyen de mesure pour mesurer le volume de la population cellulaire.
3. Dispositif suivant les revendications 1 à 2, qui comprend un moyen pour effectuer des numérations cellulaires et pour mesurer la concentration en cellules de la population cellulaire.
4. Dispositif suivant la revendication 3, dans lequel le moyen pour effectuer les numérations cellulaires est un compteur Coulter, de préférence miniaturisé, ou un autre cytomètre convenable.
5. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de transfert pour transférer une quantité de la population cellulaire d'un récipient de stockage à la chambre.
6. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de transfert pour transférer une quantité prédéterminée de la population cellulaire d'un récipient de stockage à la chambre.
7. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de calcul pour calculer le volume d'agent à introduire dans la chambre.
8. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de transfert supplémentaire pour transférer un volume d'agent à la chambre, ledit moyen de transfert supplémentaire étant de préférence une seringue commandée par un moteur.
9. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de transfert supplémentaire pour transférer un volume calculé d'agent à la chambre.
10. Dispositif suivant la revendication 8 ou 9, dans lequel le moyen de transfert supplémentaire est une seringue commandée par un moteur.
11. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen d'ajustement de concentration en dioxyde de carbone pour ajuster la concentration de dioxyde de carbone dans la chambre.
12. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de régulation de température pour réguler la température dans la chambre.
13. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de mélange pour mélanger la population cellulaire et l'agent dans la chambre.
14. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de chronométrage pour commander le temps d'incubation.

15. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen d'affichage pour afficher à l'utilisateur la période de temps restante de la période d'incubation.
16. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen d'alarme pour alerter l'utilisateur de l'achèvement de la période d'incubation.
17. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de collecte pour recueillir les cellules à partir de la chambre.
18. Dispositif suivant la revendication 17, dans lequel le moyen de collecte recueille les cellules indifférenciées à partir de la chambre.
19. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen de prélèvement pour prélever un échantillon de cellules, comprenant des cellules indifférenciées, dans la chambre et l'introduire dans un récipient de stockage.
20. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend un moyen d'obturation hermétique pour obturer hermétiquement un récipient de stockage comprenant une population de cellules comprenant des cellules indifférenciées.
21. Dispositif selon la revendication 1, qui comprend un moyen pour introduire dans ladite chambre une population cellulaire comprenant des cellules hématopoïétiques, un moyen pour introduire dans ladite chambre des moyens de rétrodifférenciation qui sont capables de provoquer la rétrodifférenciation d'une cellule hématopoïétique engagée en une cellule indifférenciée, et un moyen d'incubation pour mettre en incubation lesdites cellules engagées en présence desdits moyens de rétrodifférenciation de manière à parvenir à la rétrodifférenciation d'une cellule hématopoïétique engagée en une cellule indifférenciée.
22. Dispositif selon la revendication 1, qui comprend un moyen pour introduire dans ladite chambre un agent qui enrôle de manière fonctionnelle lesdites cellules engagées, et un moyen d'incubation pouvant agir pour mettre en incubation lesdites cellules engagées qui sont enrôlées par ledit agent dans ladite chambre de telle sorte que le nombre relatif de cellules CD34⁺ et/ou HLA-DR⁺ et/ou CD38⁺ et/ou CD117 et/ou AC133 et/ou CD90 et/ou CD45low augmente en résultat dudit, enrôlement.
23. Procédé de mise en action d'un dispositif selon l'une des revendications précédentes pour la préparation d'une cellule indifférenciée, procédé comprenant la rétrodifférenciation d'une cellule plus engagée en une cellule indifférenciée, dans lequel la rétrodifférenciation de la cellule plus engagée en la cellule indifférenciée se produit dans un, ou à partir d'un, échantillon de couche leucocytaire sanguine.
24. Procédé selon la revendication 23, procédé comprenant la mise en contact d'une cellule plus engagée dans un échantillon de couche leucocytaire sanguine avec un agent qui provoque la rétrodifférenciation de la cellule plus engagée en une cellule indifférenciée.
25. Procédé suivant les revendications 23 à 24, dans lequel les cellules engagées sont des cellules non cancéreuses.
26. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 23 à 25, dans lequel les cellules engagées sont des cellules différenciées.
27. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 23 à 26, dans lequel les cellules engagées sont des cellules hématopoïétiques engagées.
28. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 23 à 27, dans lequel les cellules engagées sont choisies entre des cellules CFC-T, des cellules CFC-B, des cellules CFC-Eosin, des cellules CFC-Bas, des cellules CFC-GM, des cellules CFC-MEG, des cellules CFC-E, des lymphocytes T et des lymphocytes B.
29. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 23 à 28, dans lequel les cellules indifférenciées sont des cellules souches pluripotentes.
30. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 23 à 29, dans lequel les cellules indifférenciées sont des cellules souches choisies dans le groupe consistant en des cellules souches hématopoïétiques, des cellules souches neuronales, des cellules souches épithéliales, des cellules souches mésenchymateuses et des cellules souches embryonnaires.
31. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 23 à 30, dans lequel les cellules indifférenciées sont caractérisées par une ou plusieurs des désignations de marqueurs de surface cellulaire suivantes: CD34⁺, HLA-DR⁺, CD38⁺, CD117, AC133, CD90 et/ou CD45low.
32. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 23 à 31, dans lequel les cellules indifférenciées sont des cellules du CMH de catégorie I⁺ et/ou du CMH de catégorie II⁺.
33. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 23 à 32, dans lequel l'agent enrôle un récepteur qui assure la médiation de la capture, de la reconnaissance ou de la présentation d'un antigène dans la surface des cellules engagées.

34. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel le récepteur est un antigène du CMH de catégorie I ou un antigène du CMH de catégorie II.
35. Procédé suivant la revendication 34, dans lequel l'antigène de catégorie I est un récepteur HLA-A, un récepteur HLA-B, un récepteur HLA-C, un récepteur HLA-E, un récepteur HLA-F ou un récepteur HLA-G et l'antigène de catégorie II est un récepteur HLA-DM, un récepteur HLA-DP, un récepteur HLA-DQ ou un récepteur HLA-DR.
36. Procédé suivant la revendication 35, dans lequel le récepteur est un récepteur HLA-DR.
37. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel le récepteur comprend une chaîne β ayant des régions homologues.
38. Procédé suivant la revendication 37, dans lequel le récepteur comprend au moins les régions homologues de la chaîne β de HLA-DR.
39. Procédé suivant la revendication 33, dans lequel l'agent est un anticorps contre le récepteur.
40. Procédé suivant la revendication 39, dans lequel l'agent est un anticorps monoclonal contre le récepteur.
41. Procédé suivant la revendication 39 ou 40, dans lequel l'anticorps est choisi dans le groupe consistant en l'anticorps monoclonal CR3/43 et l'anticorps monoclonal TAL.1B5.
42. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 24 à 41, dans lequel l'agent module l'expression de gènes du CMH.
43. Procédé suivant la revendication 42, dans lequel l'agent module l'expression du CMH de catégorie I⁺ et/ou du CMH de catégorie II⁺.
44. Procédé selon la revendication 31, comprenant la mise en contact d'une cellule plus engagée dans un échantillon de couche leucocytaire sanguine avec un agent qui enrôle de manière fonctionnelle lesdites cellules engagées, de telle sorte que le nombre relatif de cellules CD34⁺ et/ou HLA-DR⁺ et/ou CD38⁺ et/ou CD117 et/ou AC133 et/ou CD90 et/ou CD45low augmente en résultat dudit enrôlement.
45. Procédé selon l'une des revendications 23 à 44, procédé comprenant la mise en contact d'une ou plusieurs cellules différenciées dans une population cellulaire avec un moyen de rétrodifférenciation efficace pour déplacer le taux de cellules différenciées normal dans ladite population, une ou plusieurs desdites cellules différenciées étant ainsi amenées à subir la rétrodifférenciation en une ou plusieurs cellules indifférenciées.
46. Procédé selon l'une des revendications 23 à 45, dans lequel l'environnement comprenant ladite population cellulaire comprenant une ou plusieurs cellules différenciées est modifié, d'un premier environnement à un second environnement, la concentration en ions libres dudit second environnement étant modifiée efficacement comparativement au premier environnement de manière à provoquer la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs desdites cellules différenciées en une ou plusieurs cellules indifférenciées.
47. Procédé selon l'une des revendications 23 à 45, procédé comprenant la mise en contact d'une ou plusieurs cellules différenciées dans une population cellulaire avec un moyen de rétrodifférenciation efficace pour déplacer le taux de cellules différenciées normal, la culture de la population cellulaire dans un premier environnement dépourvu d'ions ou renfermant des ions séquestrés, et la modification du premier environnement en un second environnement, la concentration d'ions présente dans le second environnement étant modifiée efficacement comparativement au premier environnement, pour provoquer ainsi la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs des cellules différenciées en une ou plusieurs cellules indifférenciées.
48. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 45 ou 47, dans lequel le moyen de rétrodifférenciation consiste en n'importe quel moyen qui provoque une sélection négative dans la population cellulaire et qui provoque ainsi une rupture du taux de cellules différenciées normal dans une population cellulaire.
49. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 45 ou 47 à 48, dans lequel le moyen de rétrodifférenciation consiste en un ou plusieurs quelconques des suivants: un anticorps, un milieu à gradient de densité utilisé pour séparer les cellules en fonction de la densité des cellules; ou une substance qui provoque la sédimentation des globules rouges.
50. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 46 et 47, dans lequel la concentration en ions libres du second environnement est accrue comparativement à celle du premier environnement.
51. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 46 à 47 ou 50, dans lequel la concentration relative en ions libres du second environnement est accrue comparativement au premier environnement.
52. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 46 à 47 ou 50 à 51, dans lequel l'ion libre est un anion.
53. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 46 à 47 ou 50 à 52, dans lequel l'ion libre est un métal du Groupe I ou du Groupe II.
54. Procédé suivant les revendications 46 à 47 ou 50 à 53, dans lequel l'ion libre est un ion calcium et/ou un ion magnésium.

55. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 46 à 47 ou 50 à 54, dans lequel la concentration en ions libres de l'environnement est modifiée en traitant le premier environnement avec un agent capable de modifier relativement la concentration en ions libres de l'environnement pour engendrer le second environnement.
56. Procédé suivant la revendication 55, dans lequel le premier environnement est traité avec un ou plusieurs agents séquestrant les ions, qui sont ensuite éliminés ou soumis à une réduction de concentration, pour engendrer ainsi un second environnement ayant une concentration en ions libres relativement accrue, ce qui provoque la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs cellules différenciées dans la population cellulaire.
57. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 46 à 47 ou 50 à 56, dans lequel le premier environnement est traité avec un ou plusieurs agents séquestrant les ions libres et la population cellulaire est ensuite transférée à un second environnement, second environnement qui a une concentration en ions libres accrue comparativement au premier environnement, ce qui provoque la rétrodifférenciation de la ou des cellules différenciées dans la population cellulaire.
58. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 46 à 47 ou 50 à 56, dans lequel la population cellulaire peut être cultivée dans un premier environnement comprenant une concentration faible ou nulle en ions libres, avec ensuite le transfert de la population cellulaire au, ou l'ajustement du, premier environnement de telle sorte qu'il devienne un second environnement comprenant des ions libres ou comprenant des ions libres à une concentration supérieure à celle du premier environnement, ce qui provoque la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs cellules différenciées dans la population cellulaire.
59. Procédé suivant les revendications 56 à 57, dans lequel l'agent séquestrant est un agent chélatant les ions libres.
60. Procédé suivant les revendications 56 à 57 ou 59, dans lequel l'agent séquestrant comprend à la fois un groupe aminé et un groupe carboxylique.
61. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 56 à 57 ou 59 à 60, dans lequel l'agent séquestrant comprend une pluralité de groupes $-N(CH_2CO_2H)_n$ dans lesquels n est égal à 1 ou n est égal à 2.
62. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 56 à 57 ou 59 à 61, dans lequel l'agent séquestrant peut consister en un ou plusieurs quelconques des suivants: EDTA, héparine, AGTA, DTPA, citrate trisodique et d'autres agents chélatants et/ou anticoagulants similaires.
63. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 56 à 57 ou 59 à 62, dans lequel l'agent séquestrant est ajouté à une concentration suffisamment forte pour que la suppression de la présence dudit agent séquestrant provoque la rétrodifférenciation.
64. Procédé suivant la revendication 63, dans lequel la concentration de l'agent séquestrant suffisante pour provoquer la rétrodifférenciation lorsque la présence de cet agent est supprimée est supérieure ou égale à environ 2 mM.
65. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 47 à 64, dans lequel les cellules plus différenciées sont des cellules non cancéreuses.
66. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 45 à 65, dans lequel les cellules plus différenciées sont des cellules hématopoïétiques engagées.
67. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 45 à 66, dans lequel les cellules plus différenciées sont choisies entre des cellules CFC-T, des cellules CFC-B, des cellules CFC-Eosin, des cellules CFC-Bas, des cellules CFC-GM, des cellules CFC-MEG, des cellules CFC-E, des lymphocytes T et des lymphocytes B.
68. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 45 à 67, dans lequel les cellules indifférenciées sont des cellules souches pluripotentes.
69. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 45 à 68, dans lequel les cellules indifférenciées sont des cellules souches du groupe consistant en des cellules souches hématopoïétiques, des cellules souches neuronales, des cellules souches épithéliales, des cellules souches mésenchymateuses, des cellules souches endodermiques et des cellules souches embryonnaires.
70. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 45 à 69, dans lequel les cellules indifférenciées sont caractérisées par une ou plusieurs des désignations de marqueurs de surface cellulaire suivantes: CD34⁺, HLA-DR⁺, CD38⁺, CD117, AC133, CD90 et/ou CD45^{low}.
71. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 45 à 70, dans lequel les cellules indifférenciées sont des cellules du CMH de catégorie I⁺ et du CMH de catégorie II⁺.
72. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 45 à 71, dans lequel la population cellulaire comprenant des cellules engagées consiste en un échantillon de couche leucocytaire sanguine ou bien est issue d'un échantillon de couche leucocytaire sanguine.
73. Procédé selon l'une des revendication 23 à 72, dans lequel l'environnement comprenant ladite population cellulaire comprenant une ou plusieurs cellules différenciées est modifié, d'un premier environnement ayant une concentration faible ou nulle en ions calcium ou magnésium libres en un second environnement comprenant des ions calcium ou

magnésium ou comprenant des ions calcium ou magnésium libres à une concentration supérieure à celle du premier environnement, ce qui provoque la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs cellules différenciées dans la population cellulaire.

74. Procédé selon la revendication 27, dans lequel l'environnement comprenant ladite population cellulaire comprenant une ou plusieurs cellules hématopoïétiques différenciées est modifié d'un premier environnement à un second environnement, la concentration en ions libres dudit second environnement étant modifiée efficacement comparativement au premier environnement de manière à provoquer la rétrodifférenciation d'une ou plusieurs desdites cellules hématopoïétiques différenciées en une ou plusieurs cellules indifférenciées.
75. Procédé selon l'une des revendications 23 à 74, dans lequel l'environnement comprenant ladite population cellulaire est modifié en traitant un premier environnement avec un agent capable de modifier relativement la concentration en ions libres de l'environnement pour engendrer un second environnement.

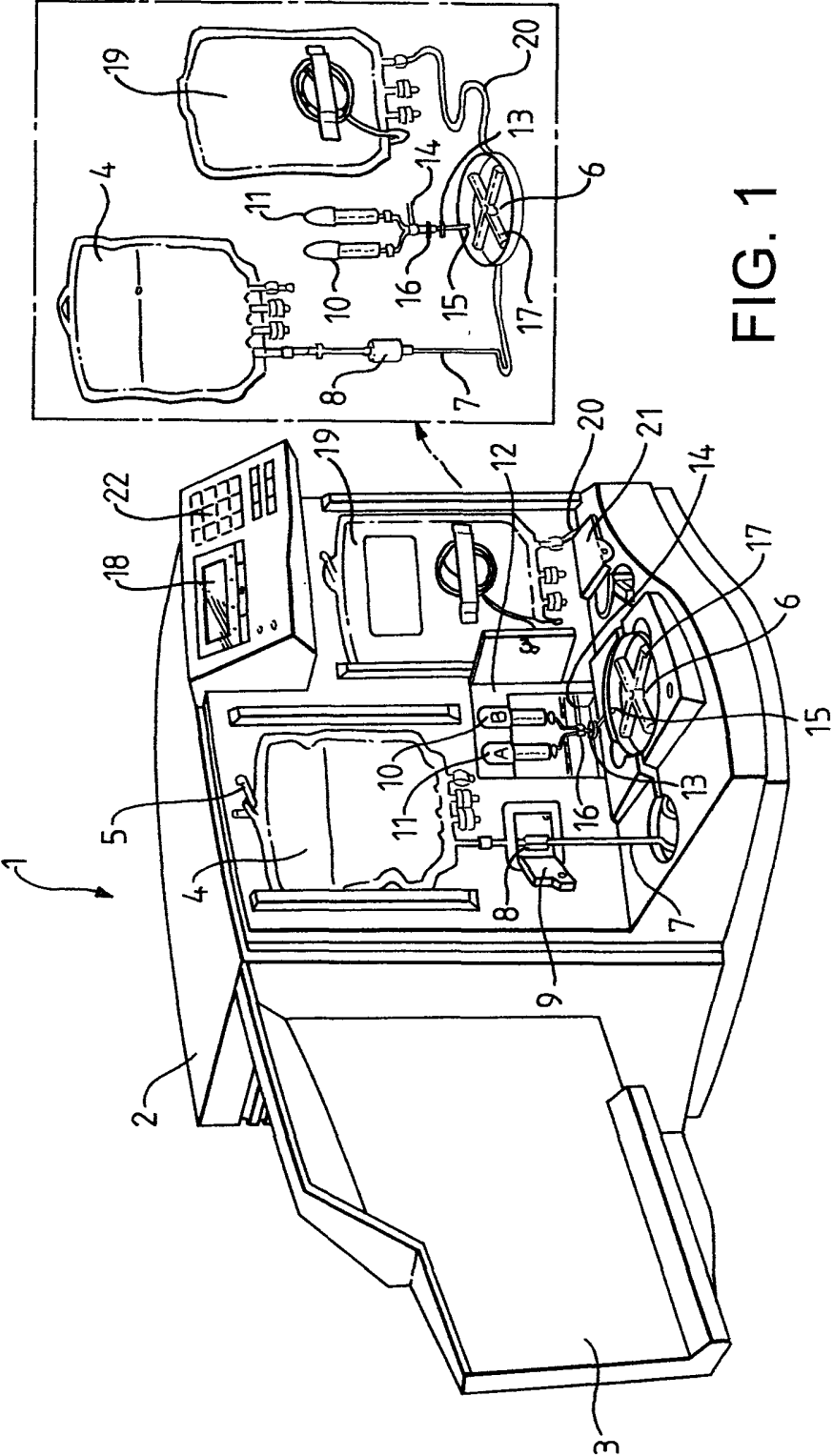


FIG. 1

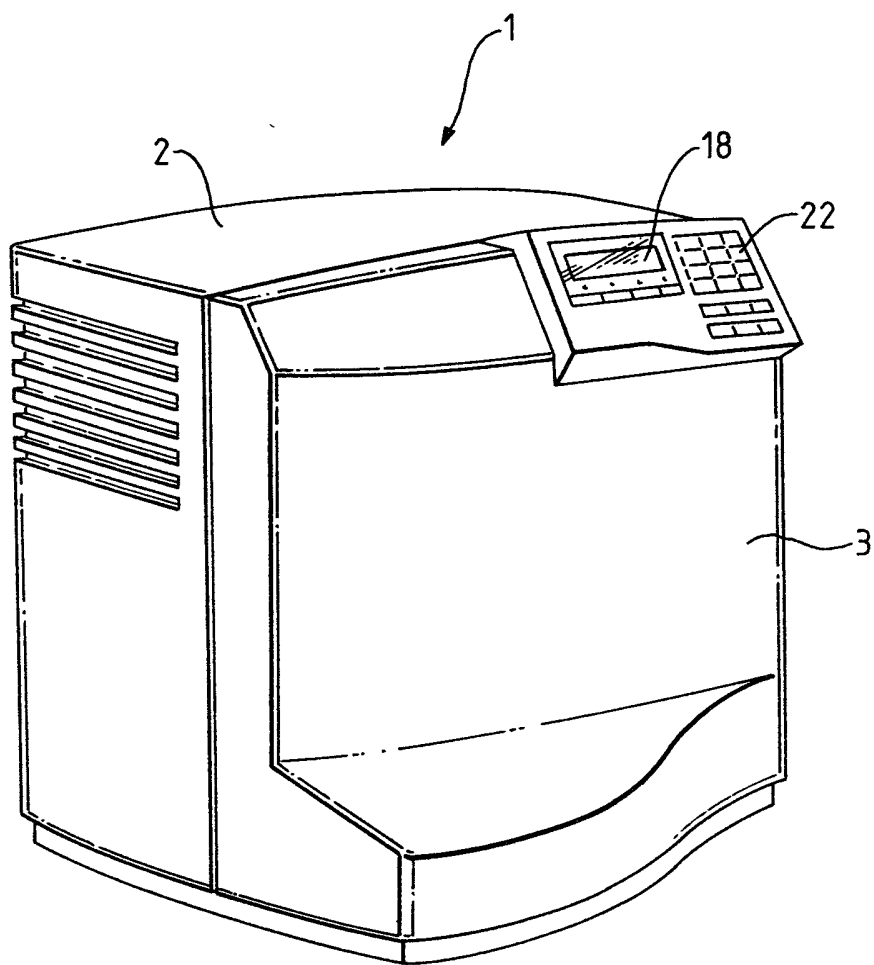


FIG. 2

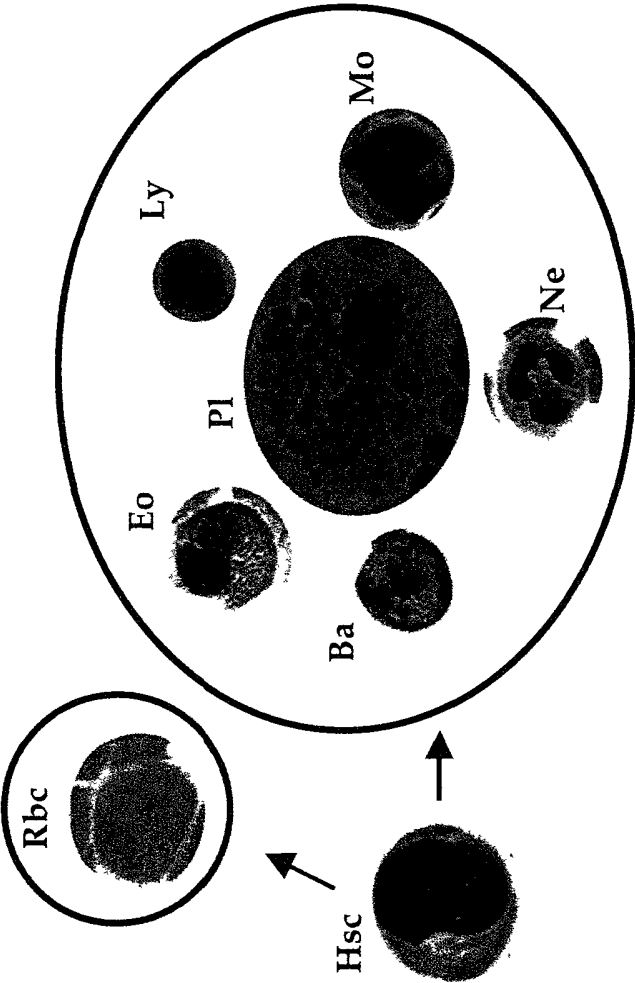


FIG. 3

FIG. 4

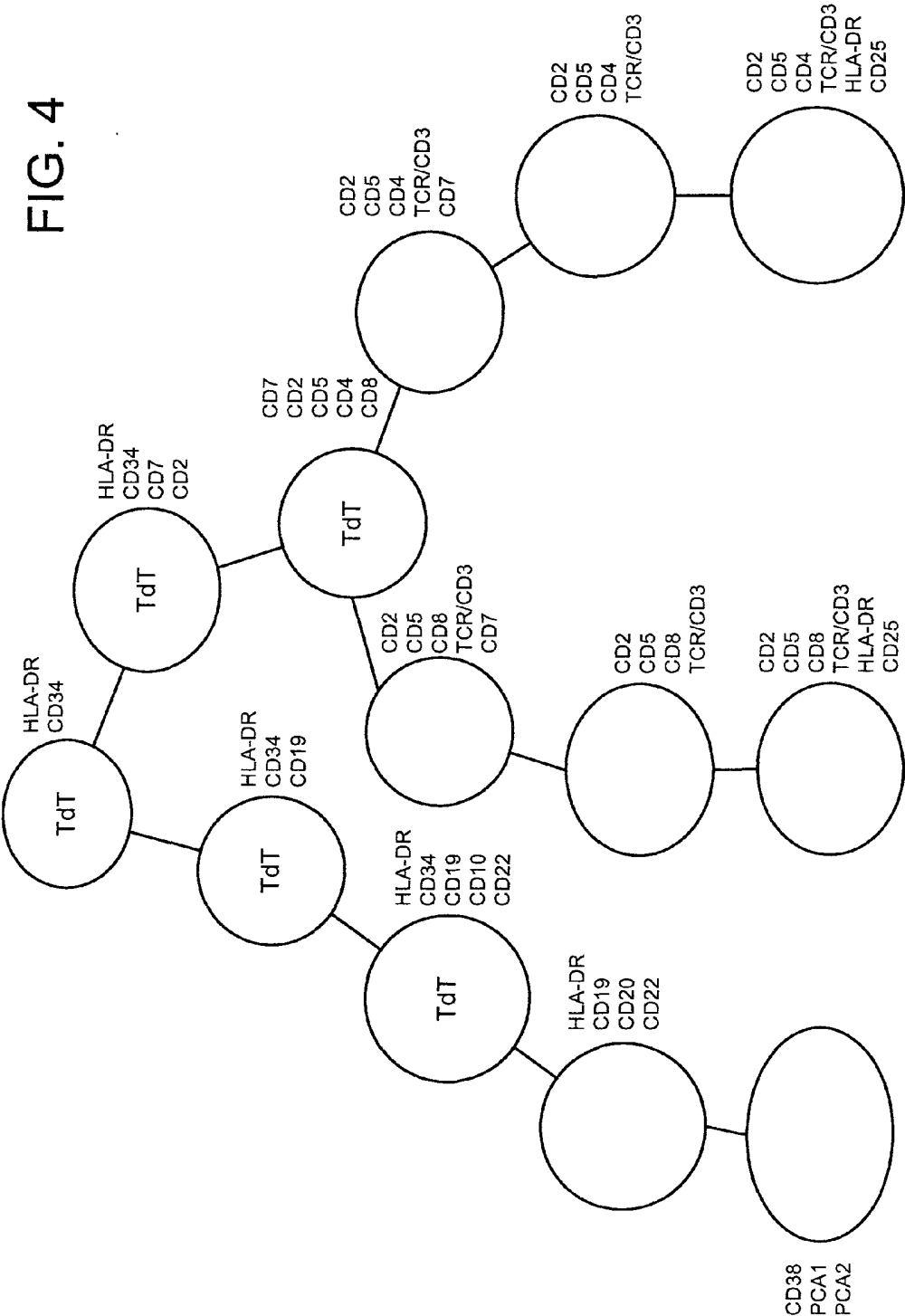


FIG. 5

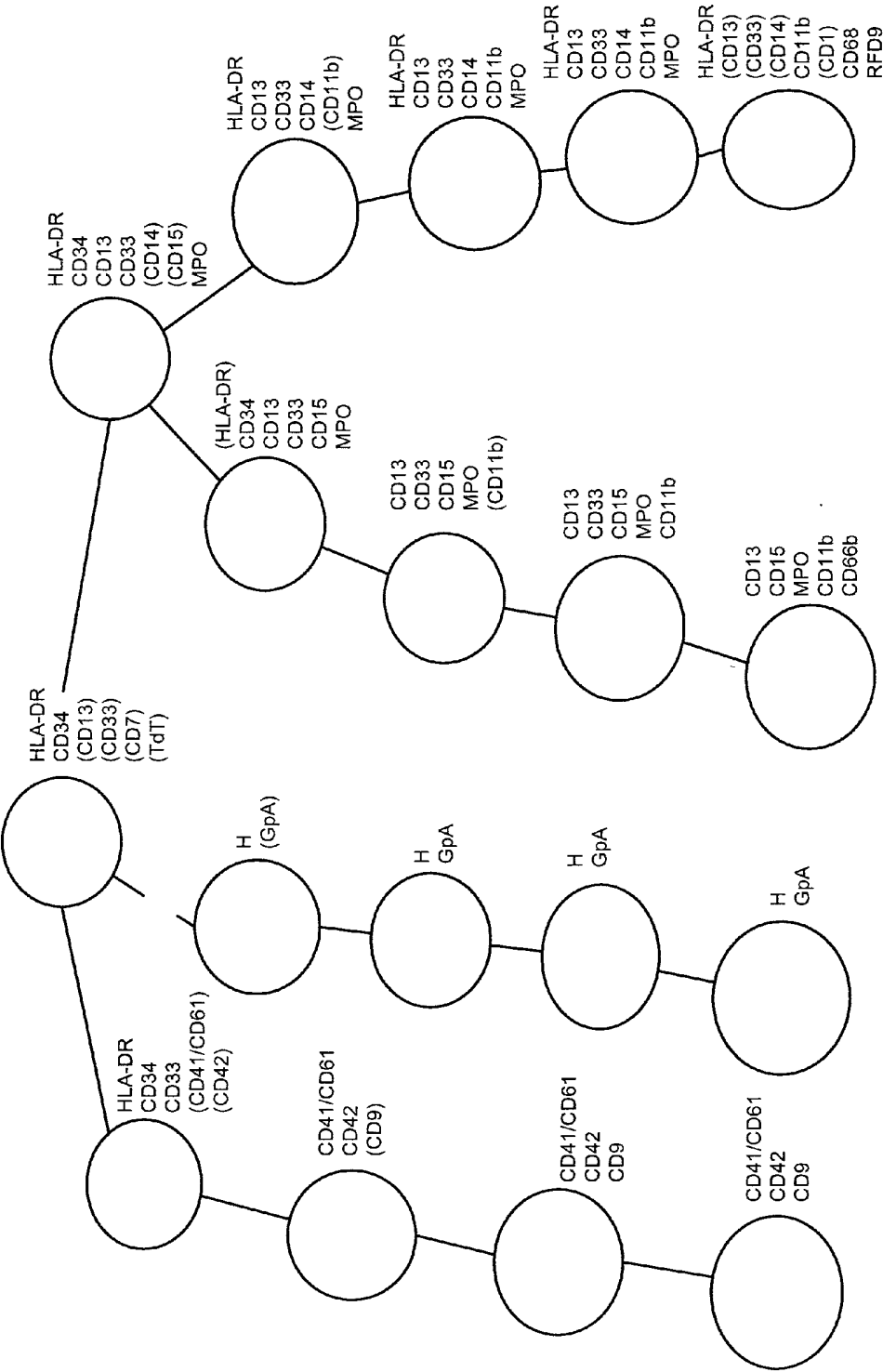
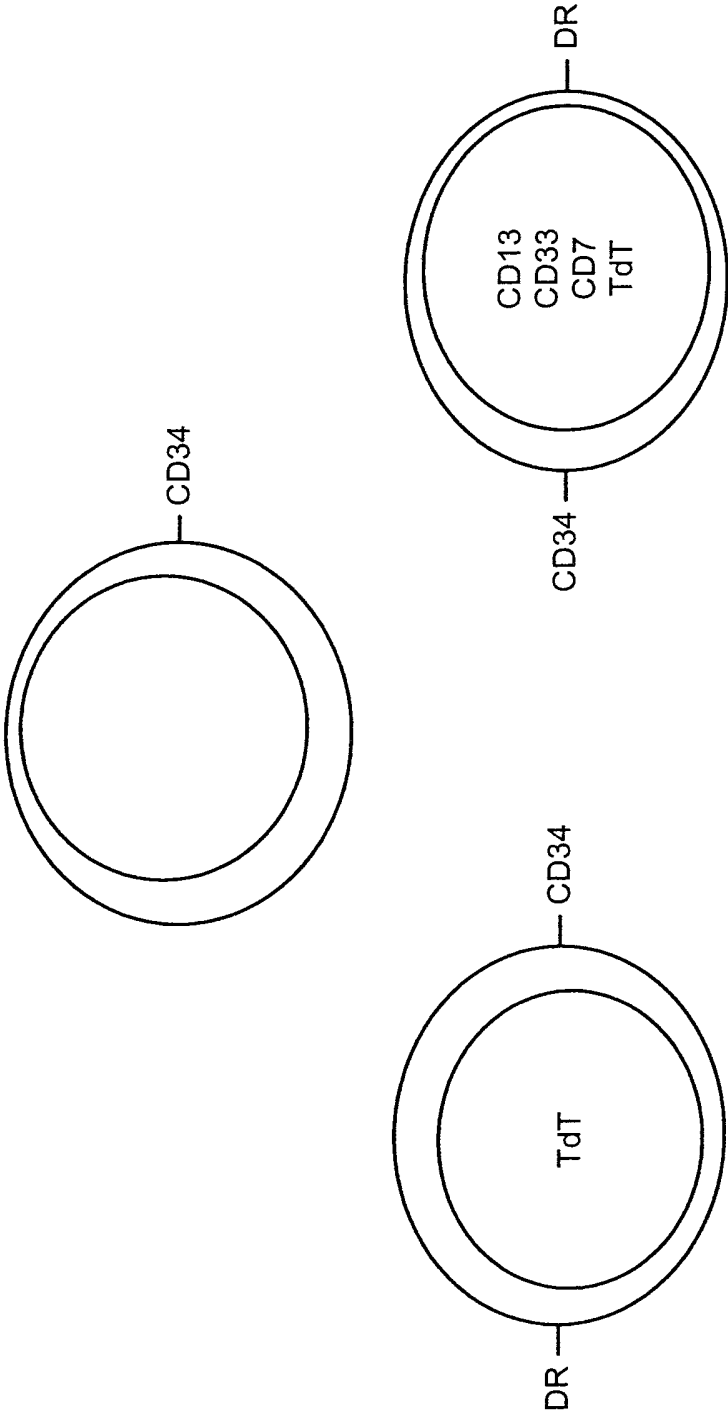
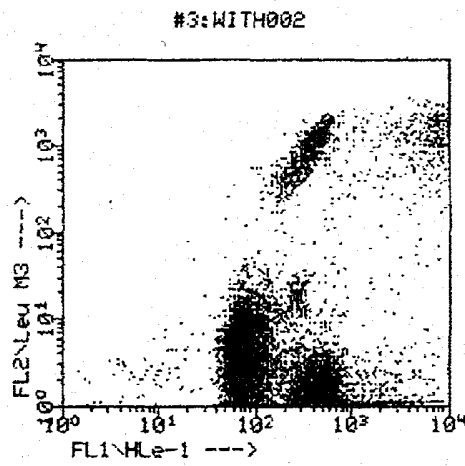
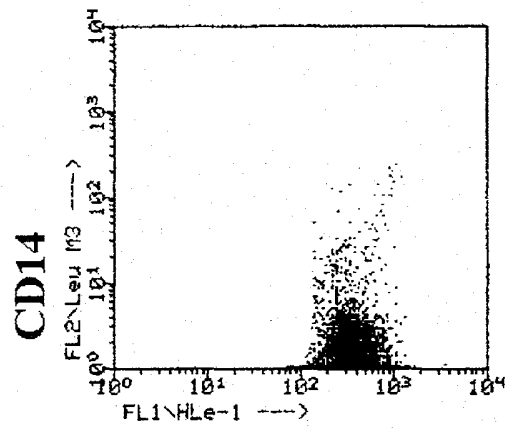
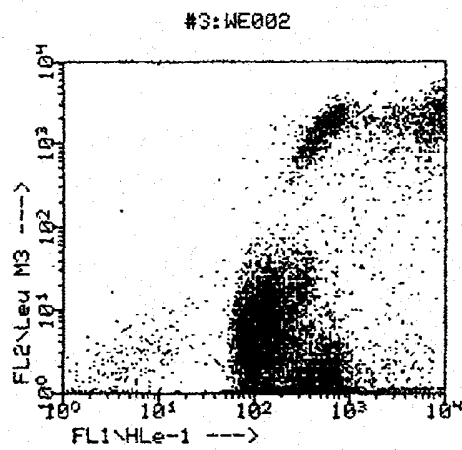


FIG. 6





2hr CR3/43



24hr CR3/43

CD45

FIG. 7

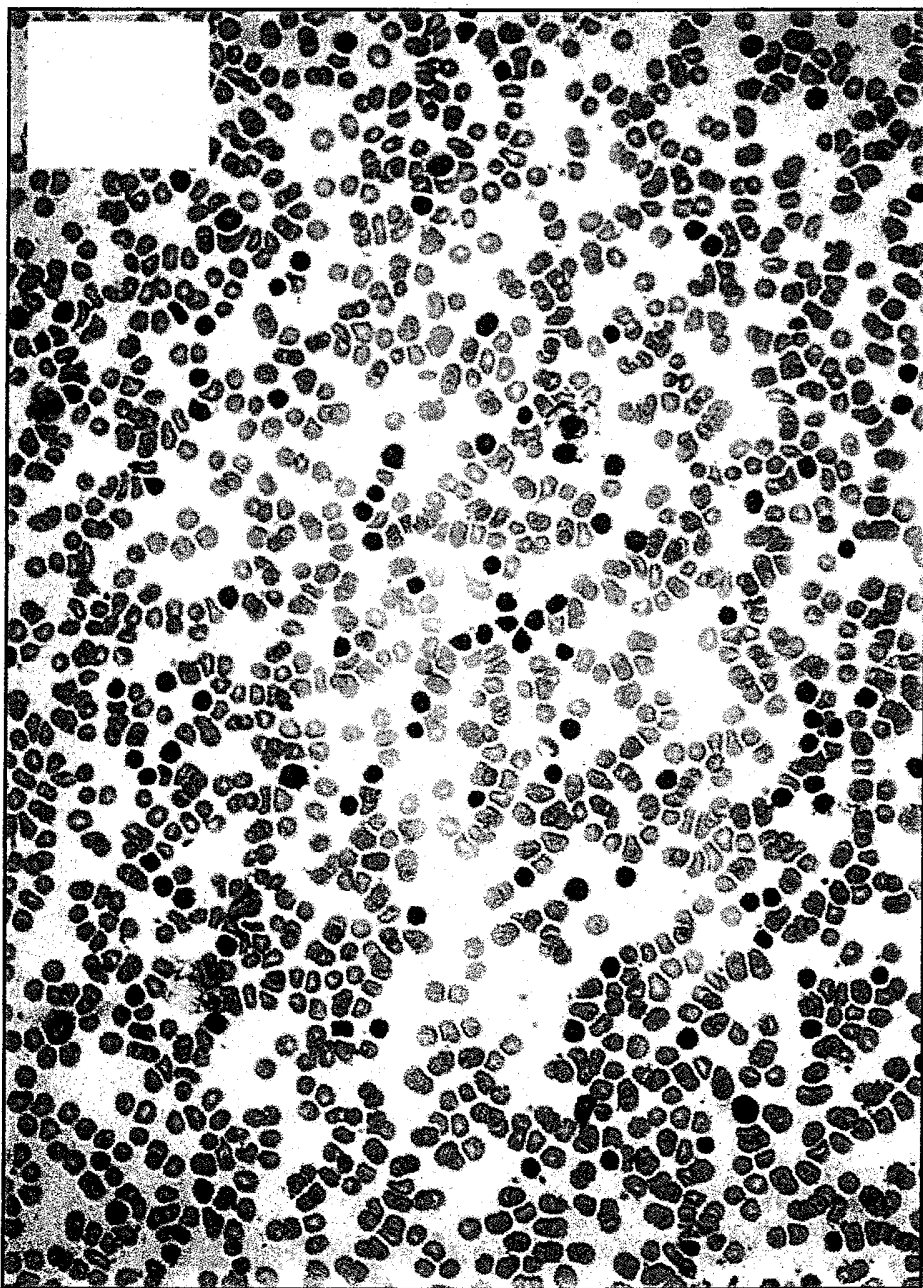


FIG. 8

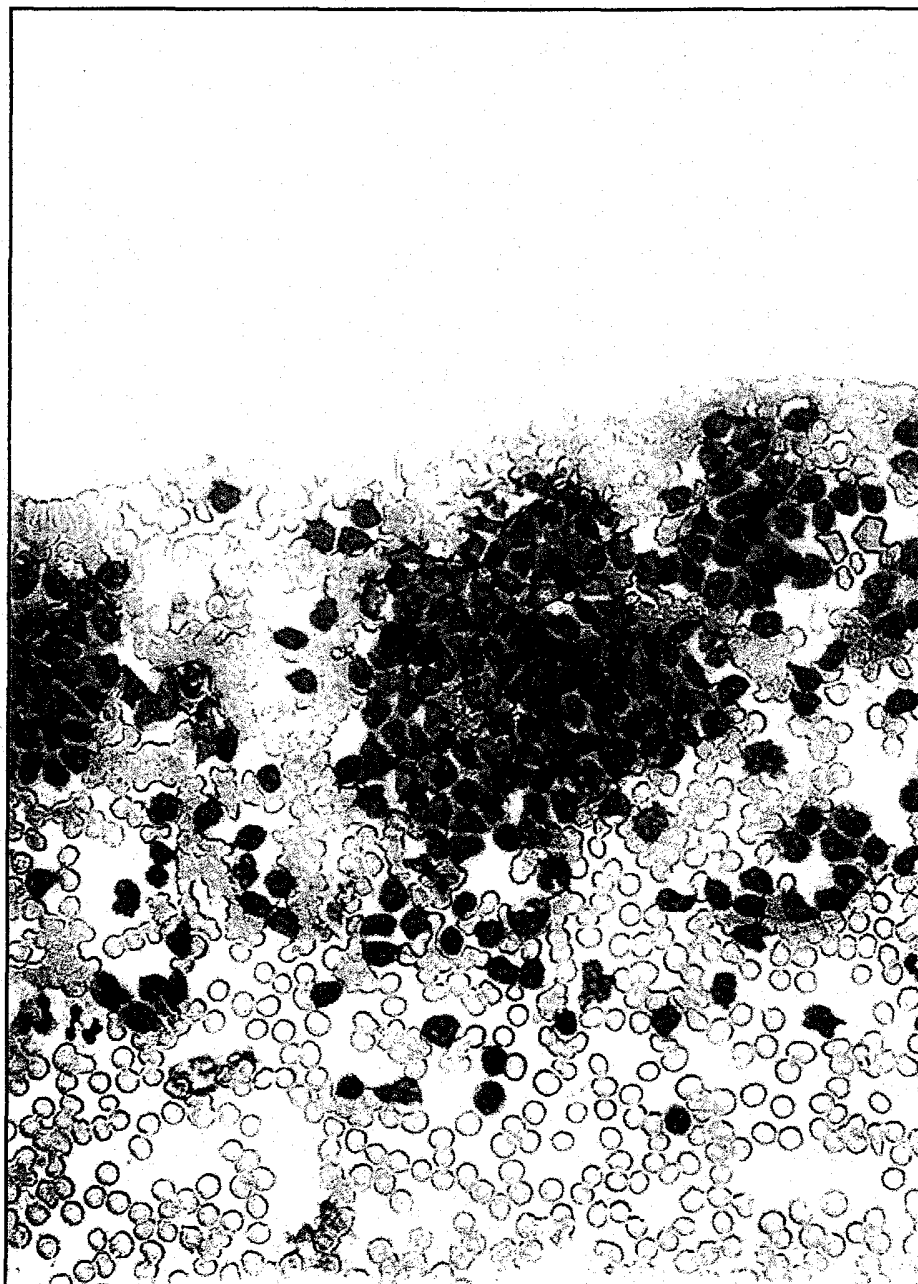


FIG. 9

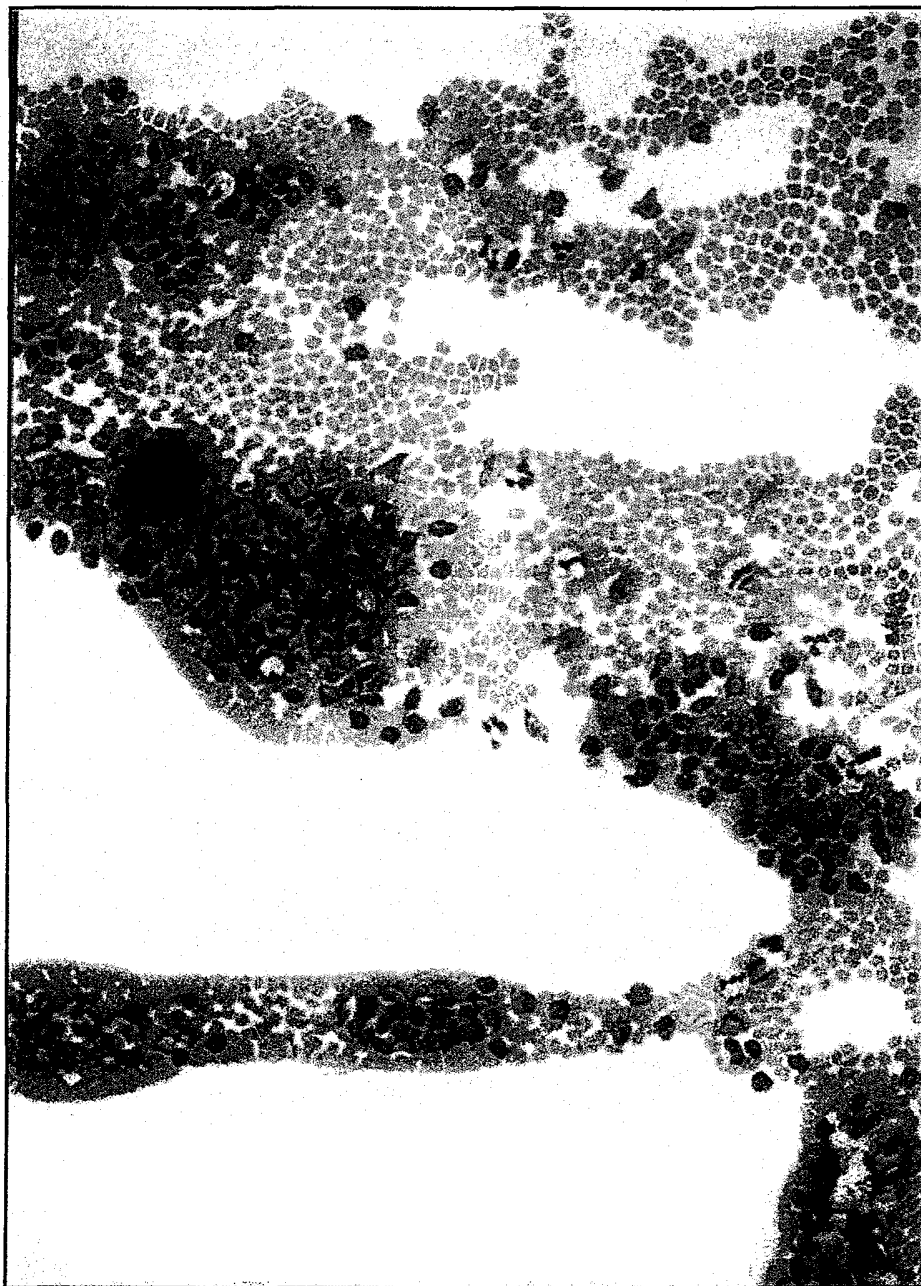


FIG. 10

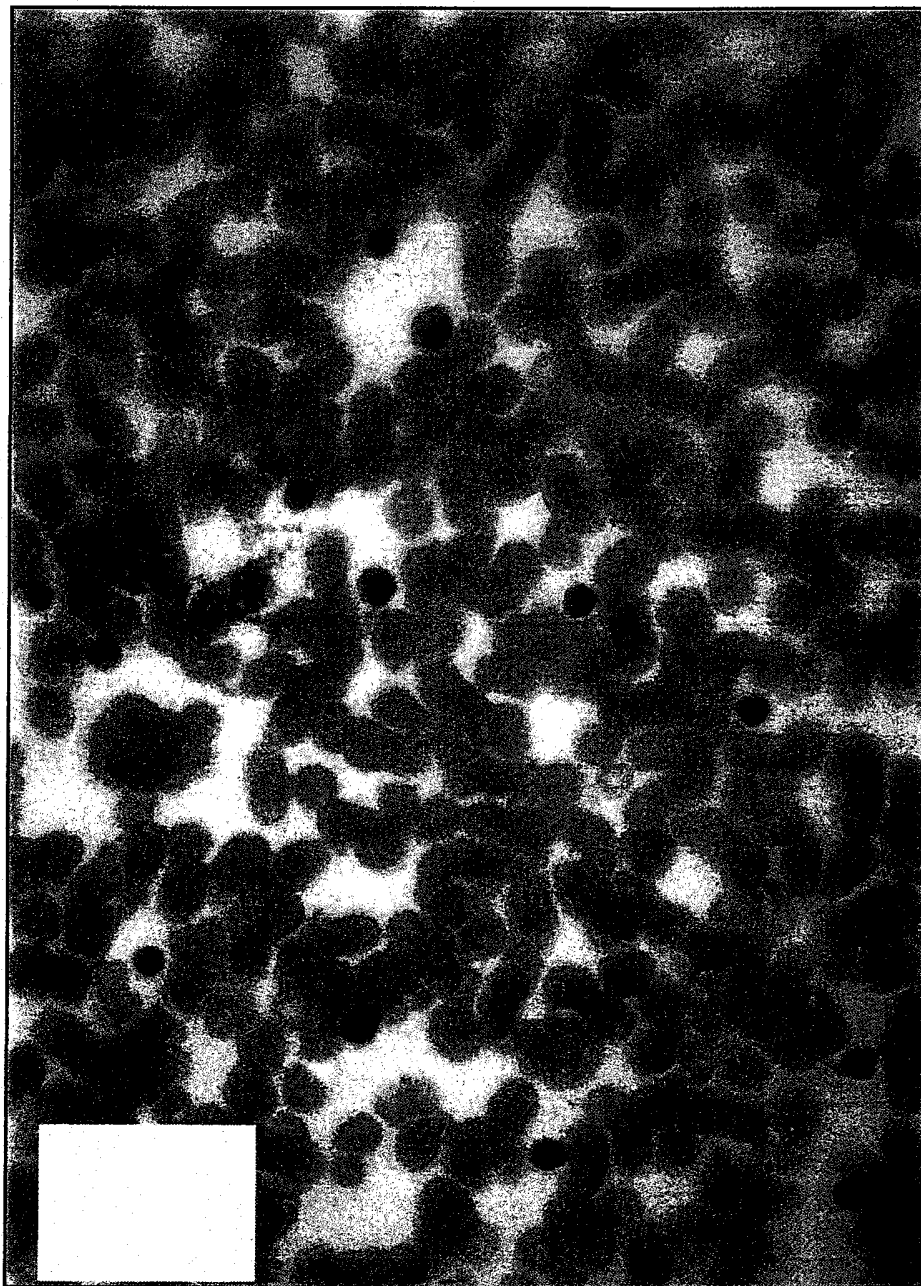


FIG. 11

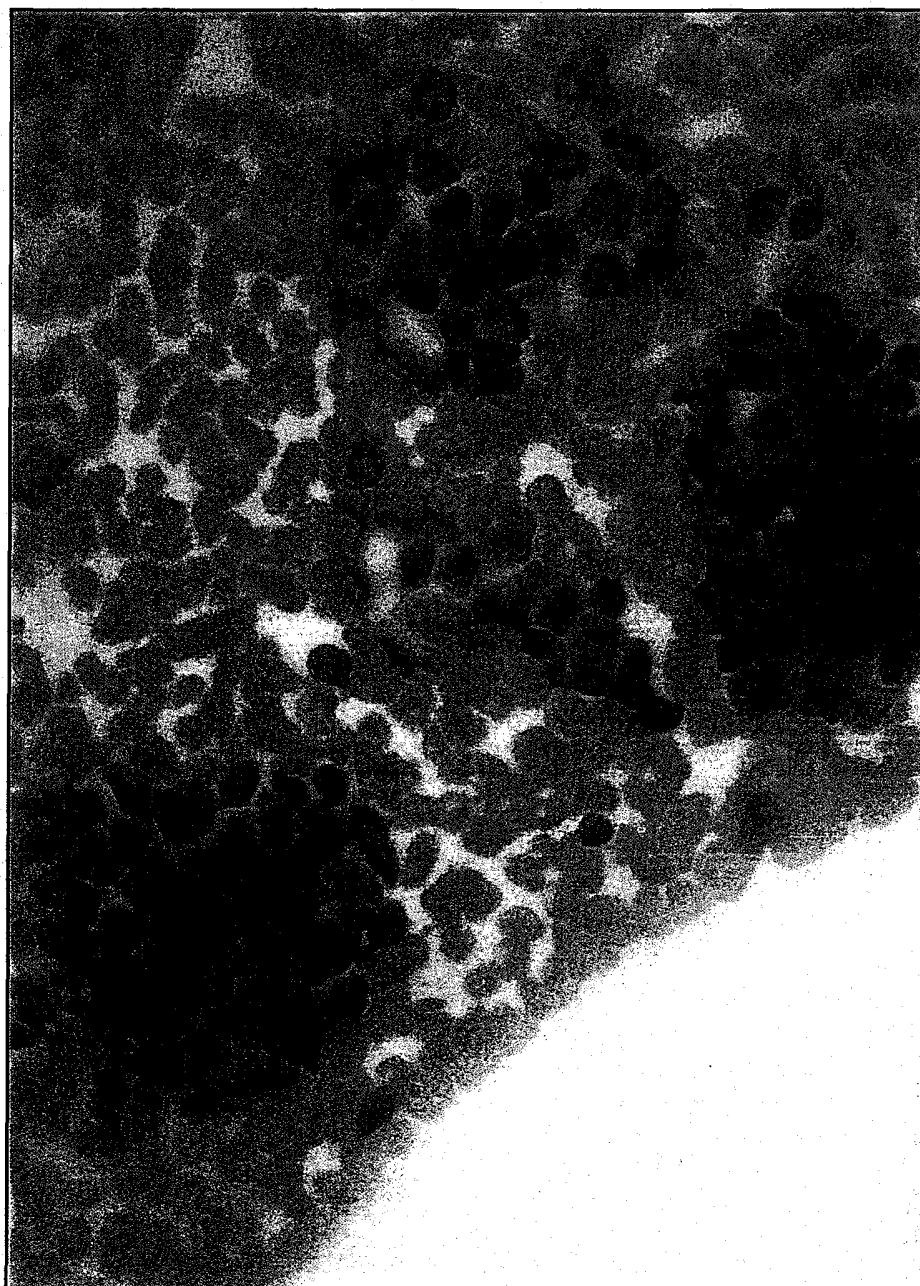


FIG. 12

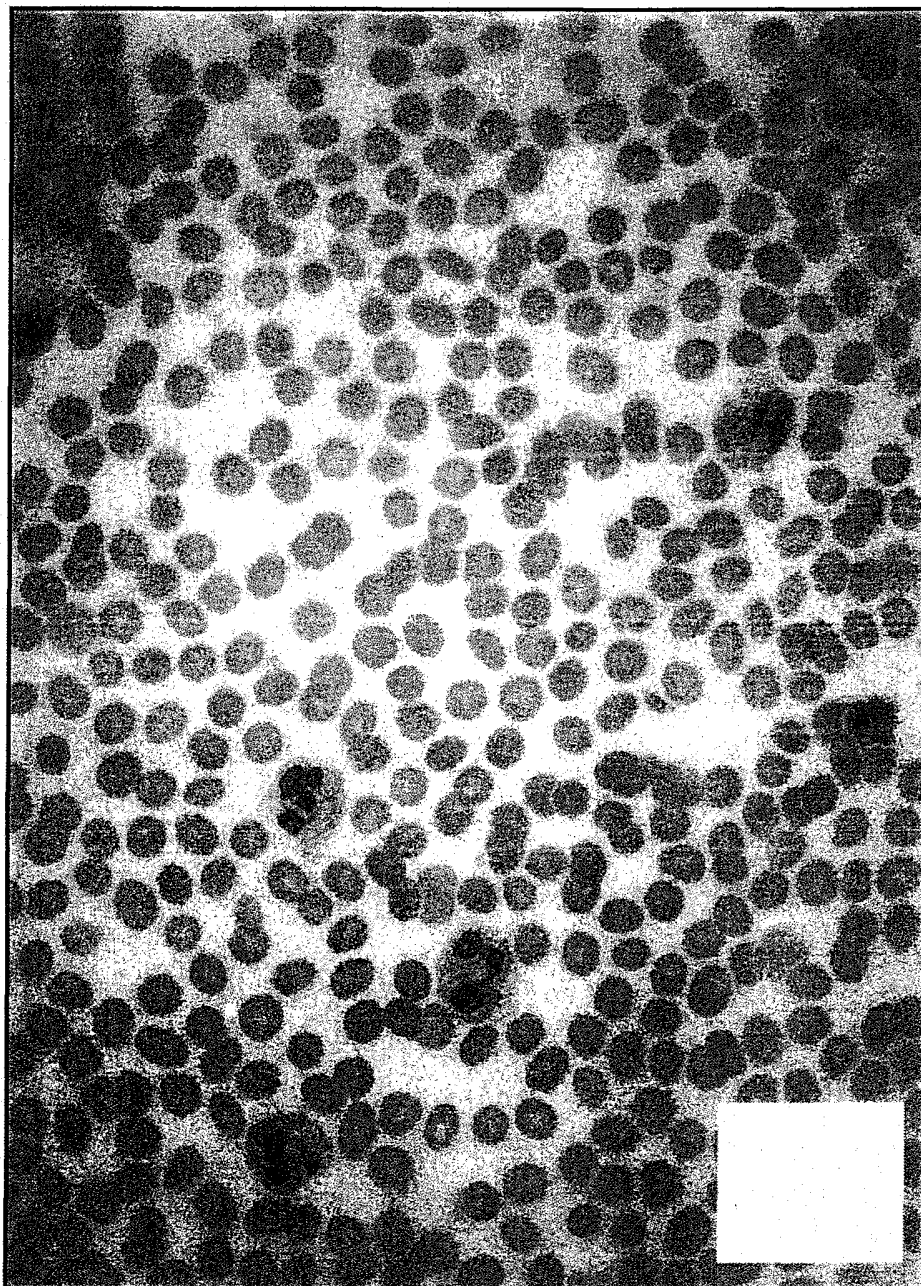


FIG. 13

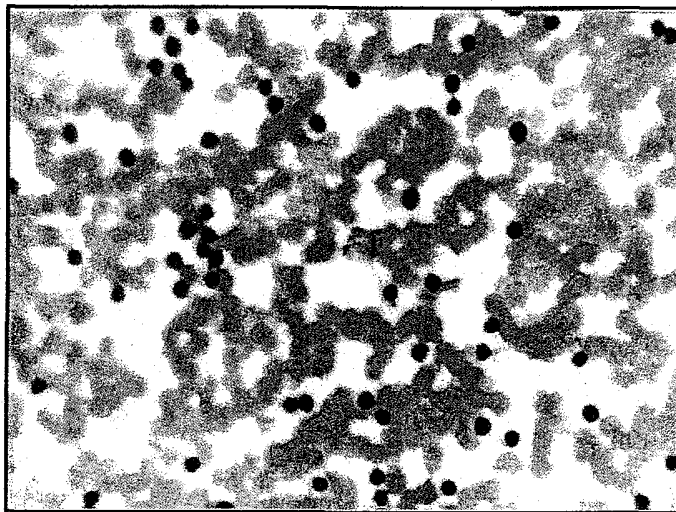


FIG. 14A

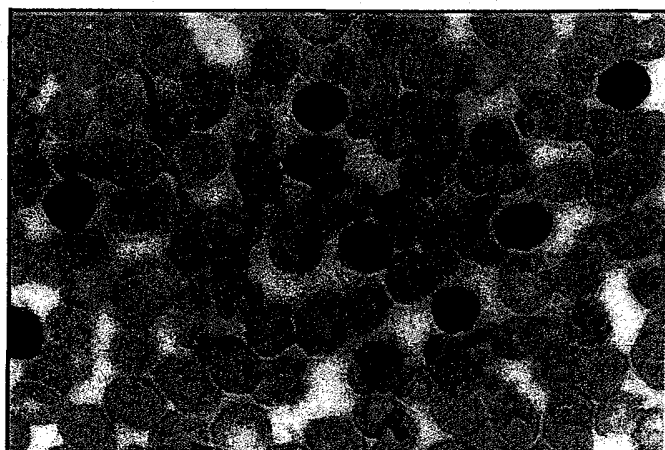


FIG. 14B

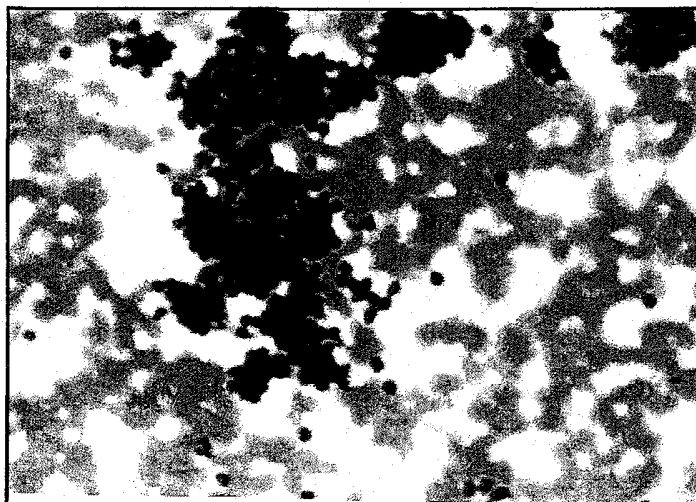


FIG. 15A



FIG. 15B

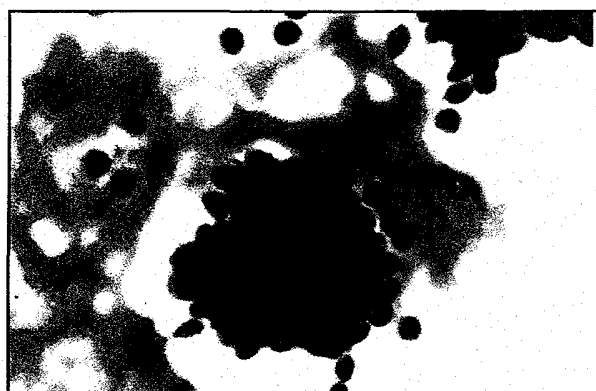


FIG. 15C

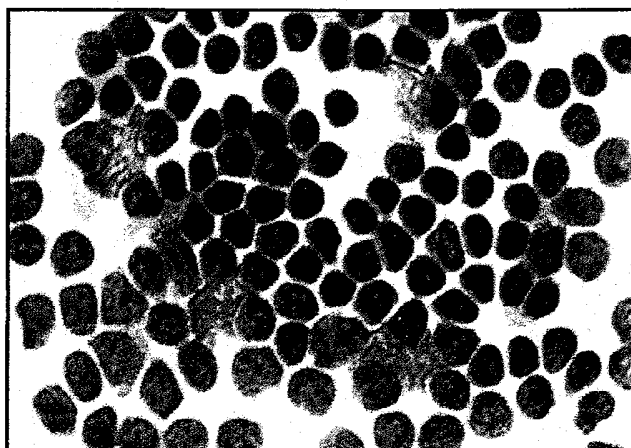


FIG. 16A

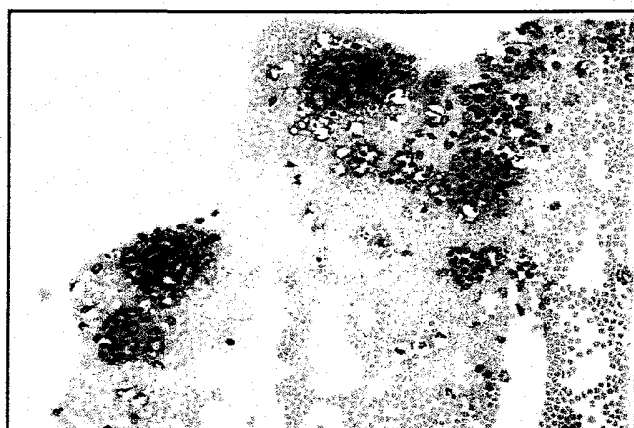


FIG. 16B

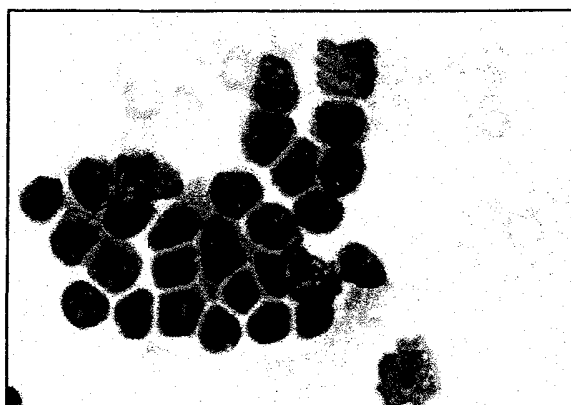


FIG. 16C

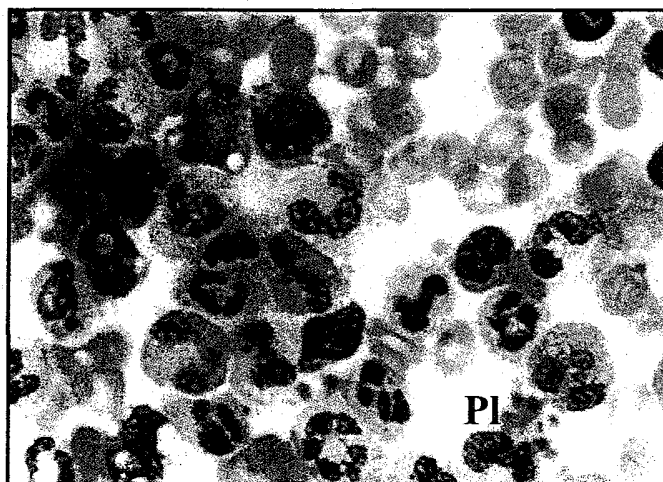


FIG. 17A

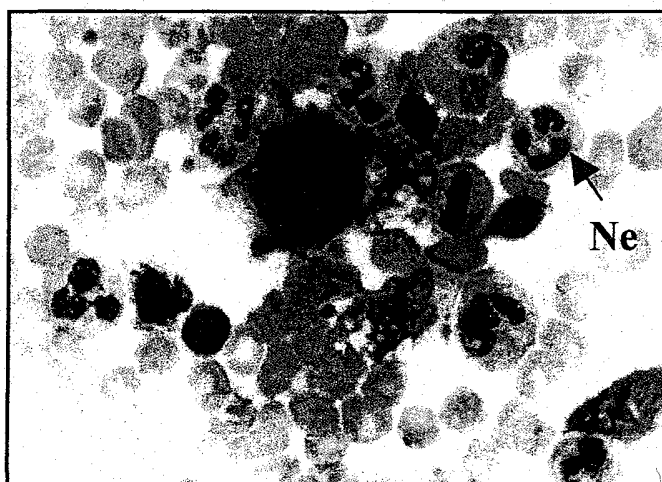


FIG. 17B

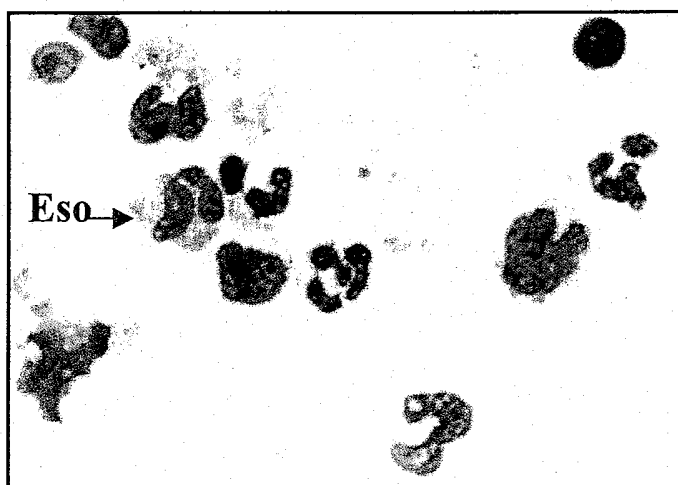


FIG. 17C

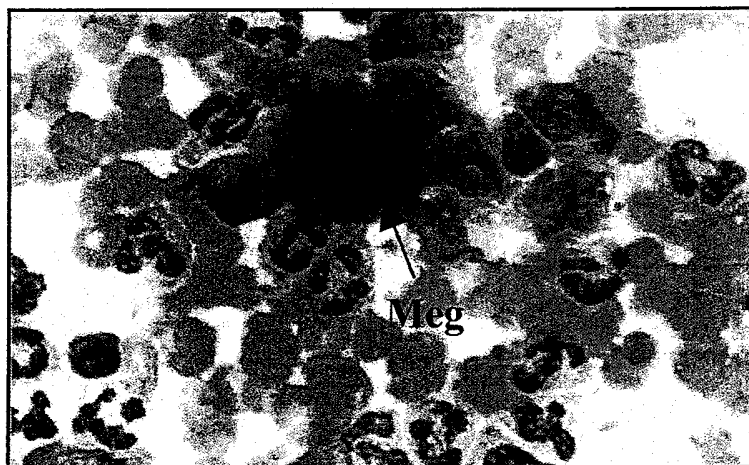


FIG. 17D

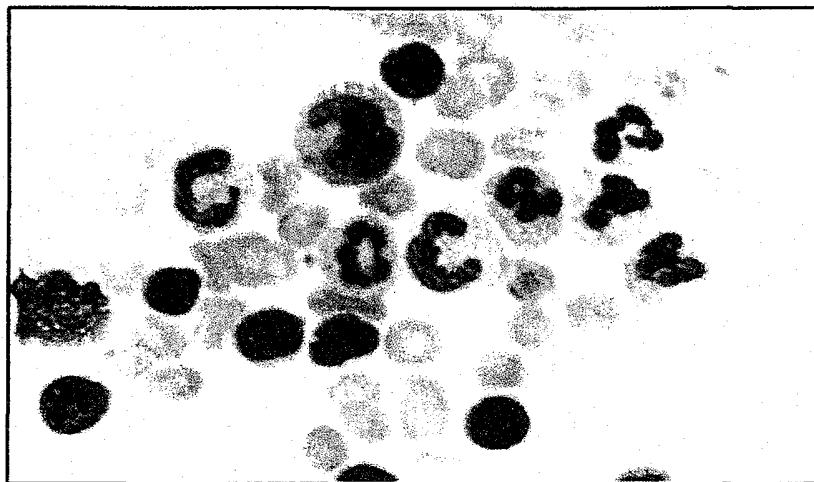


FIG. 17E

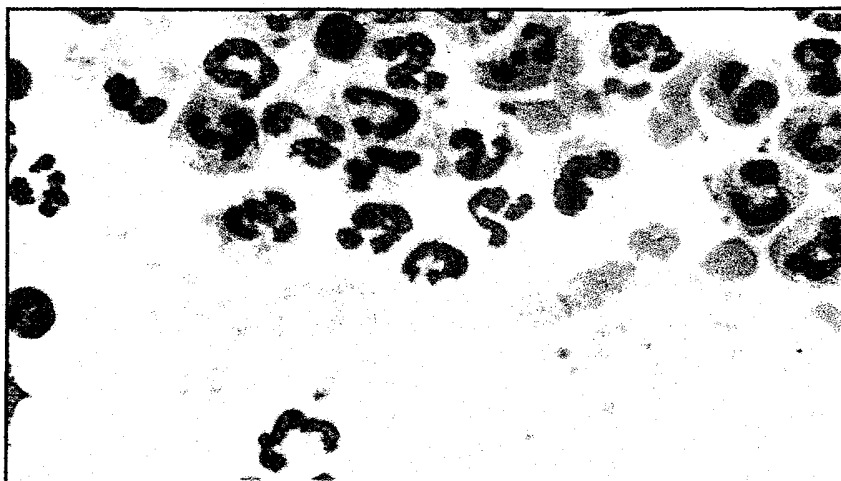


FIG. 17F

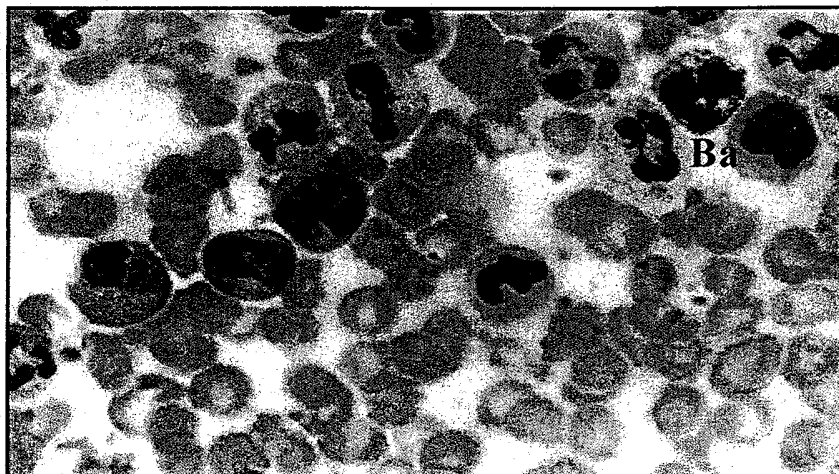


FIG. 17G

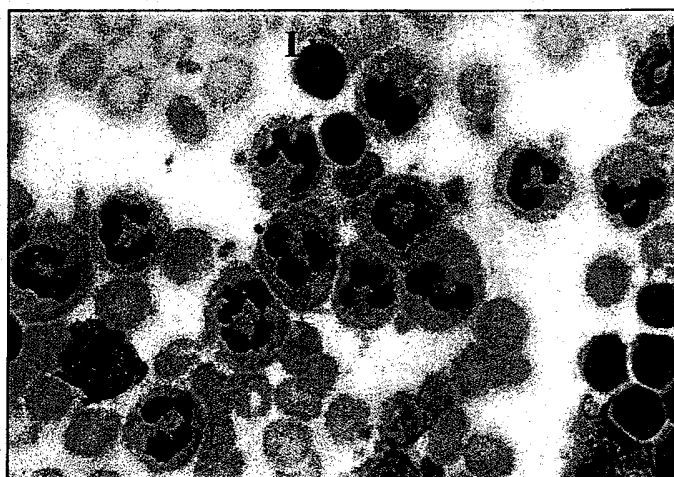


FIG. 17H

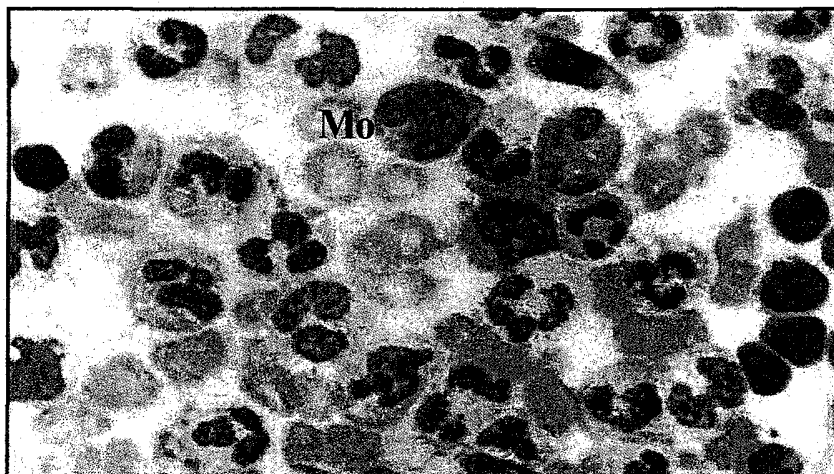


FIG. 17I

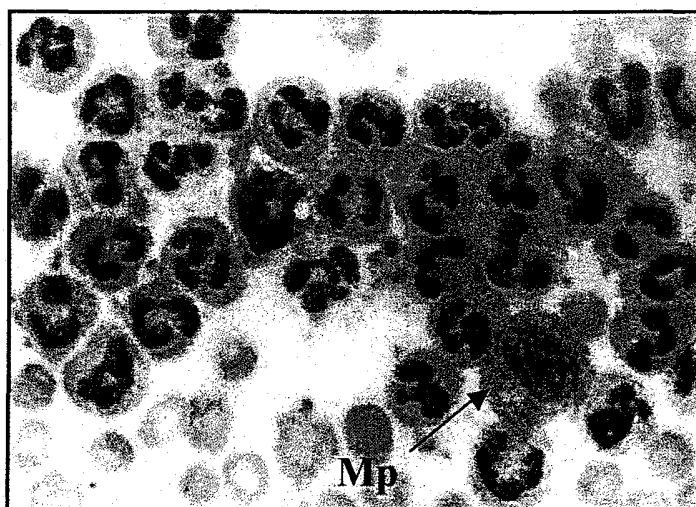


FIG. 17J

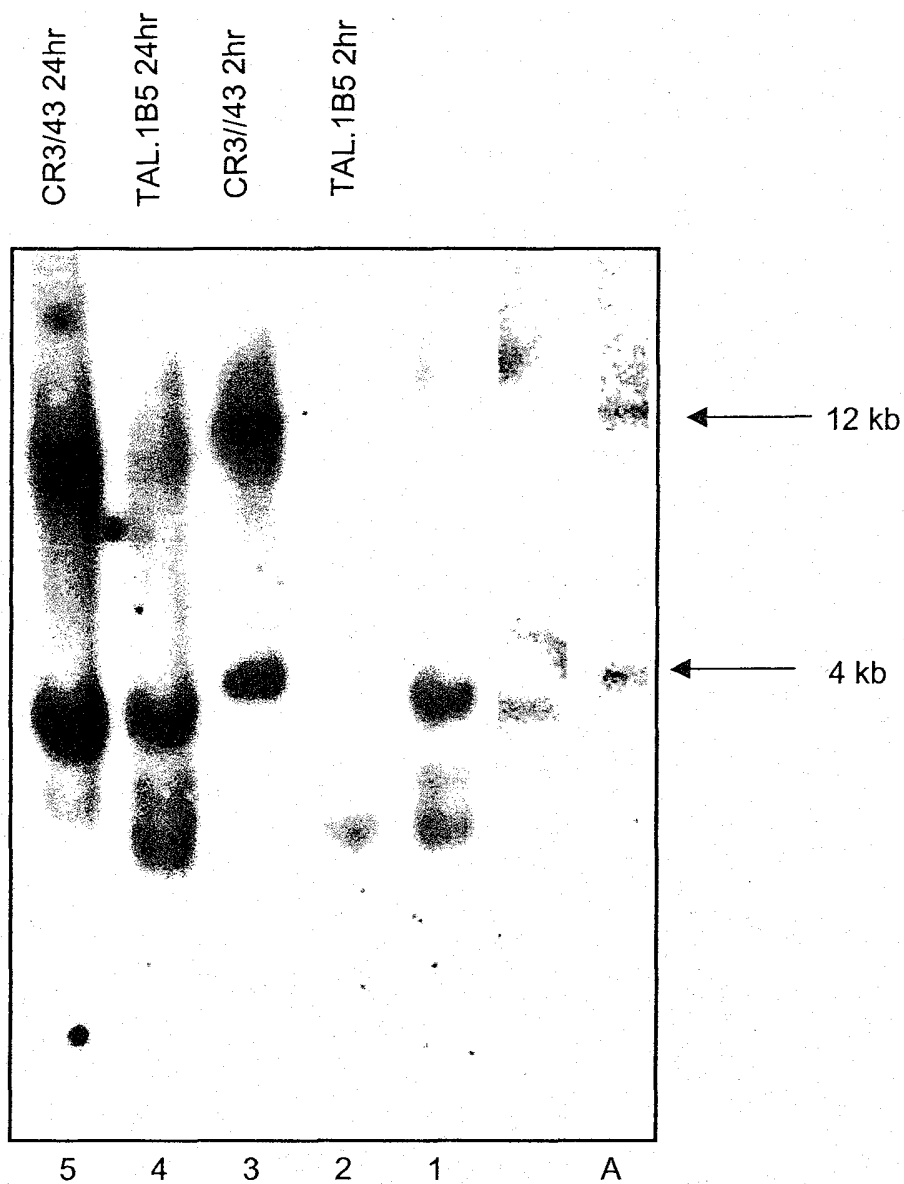
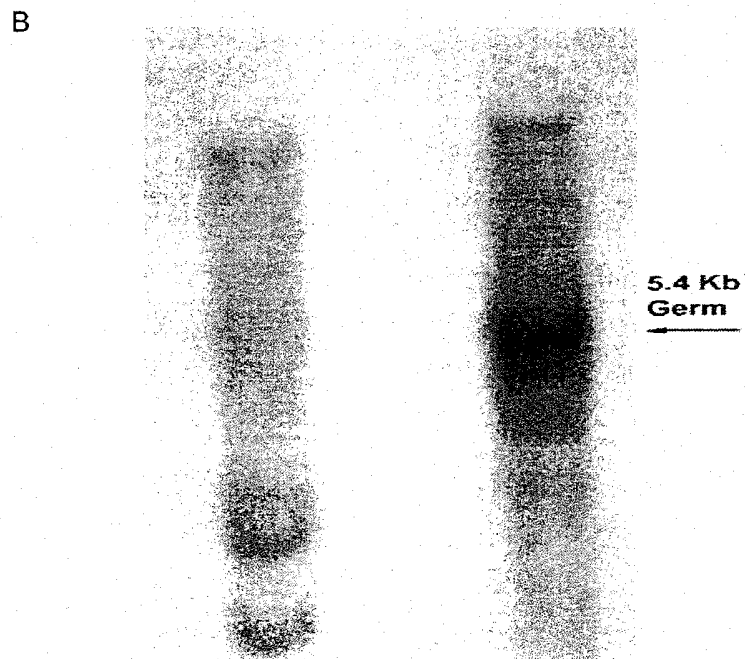
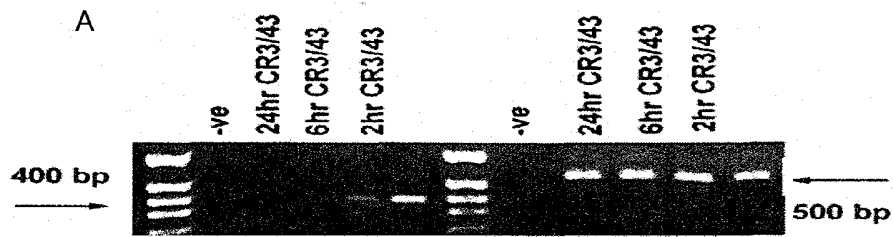


FIG. 18



A B

FIG. 19

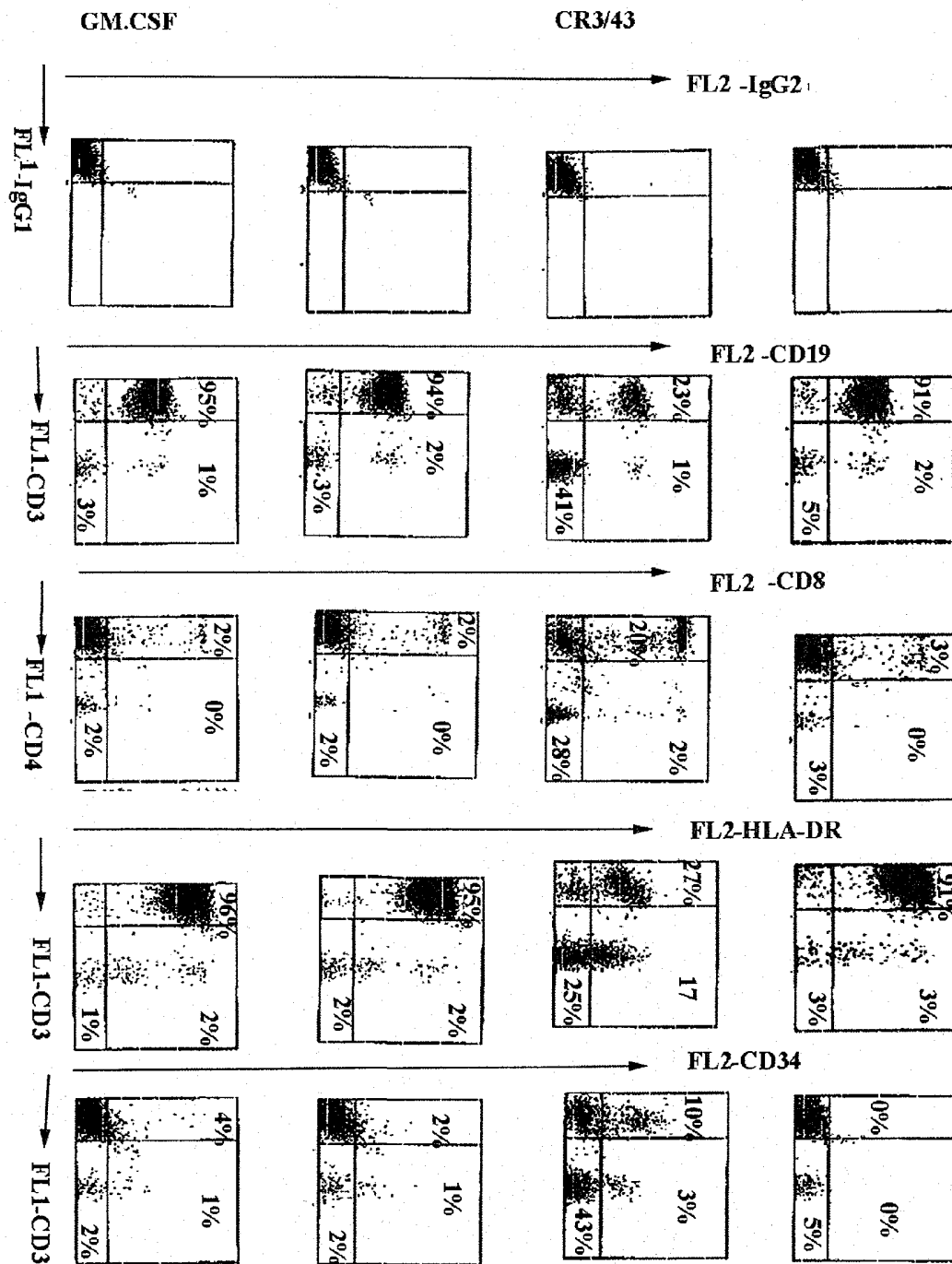


FIG. 20

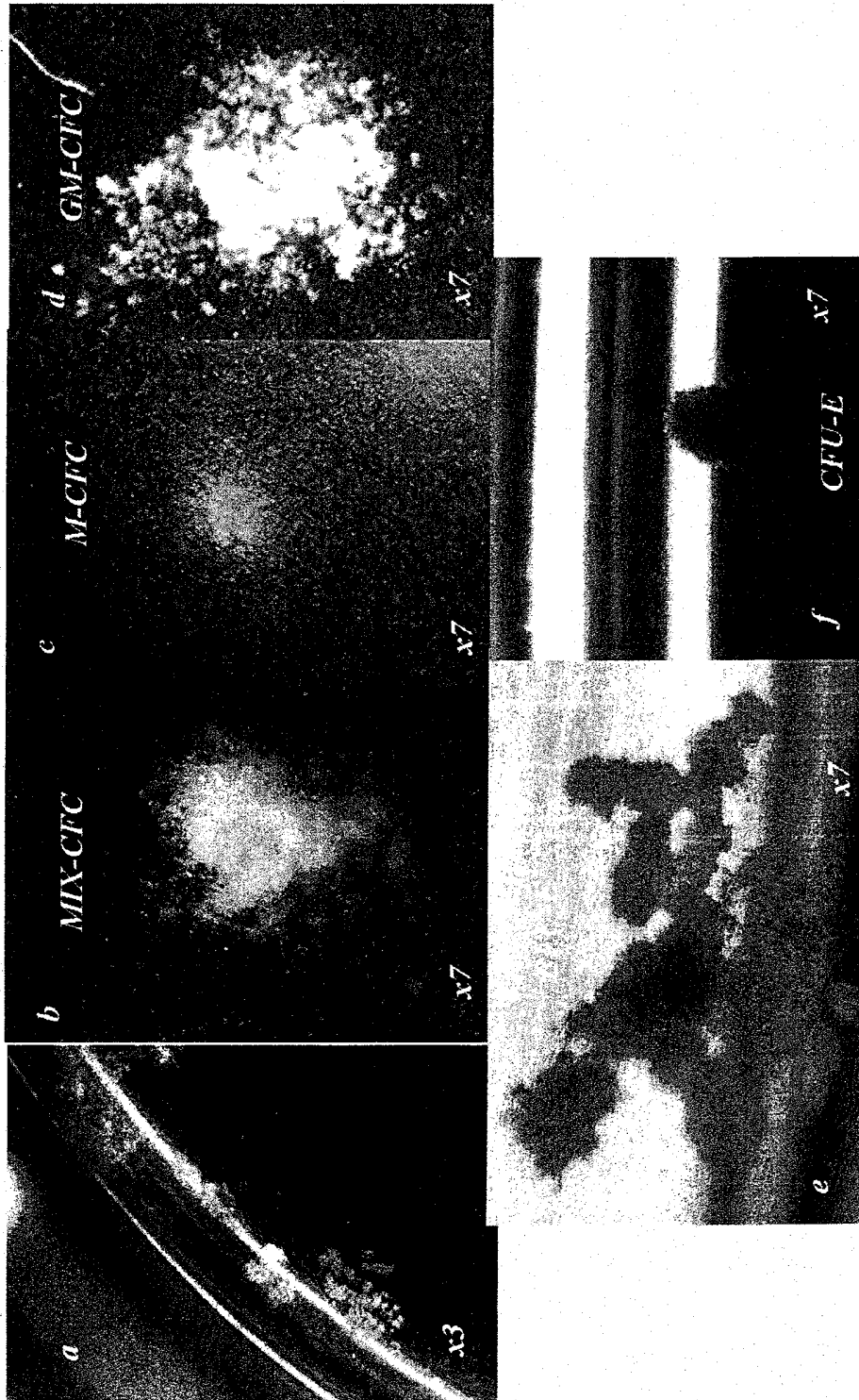


FIG. 21

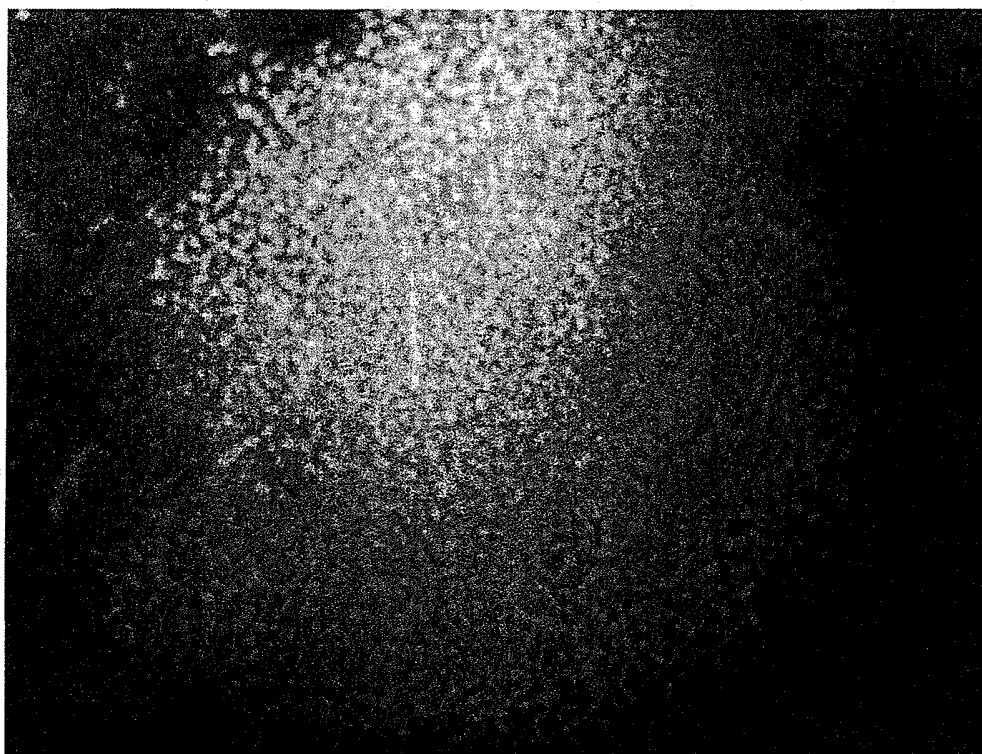
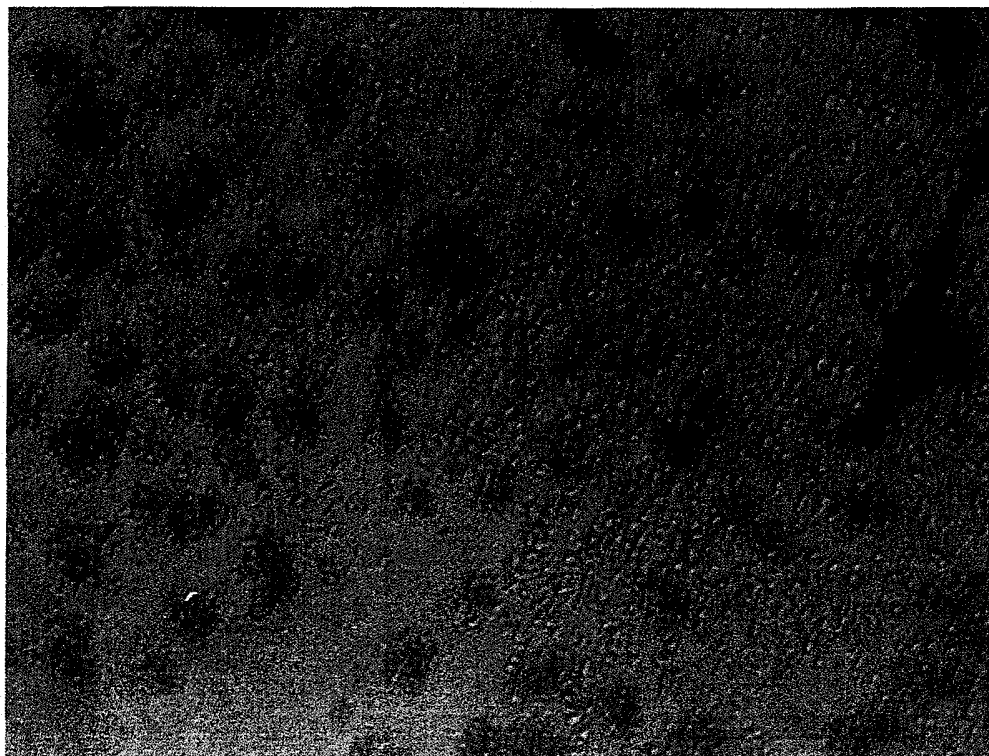


FIG. 22

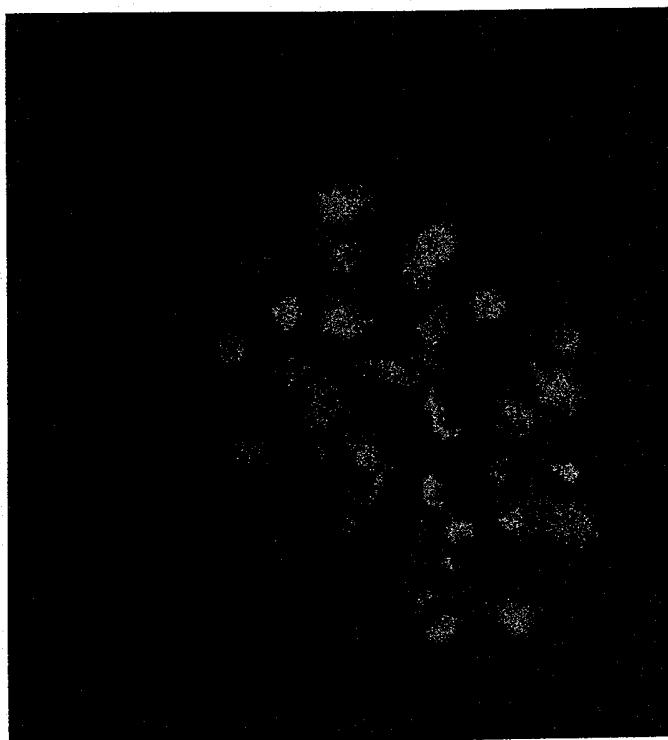
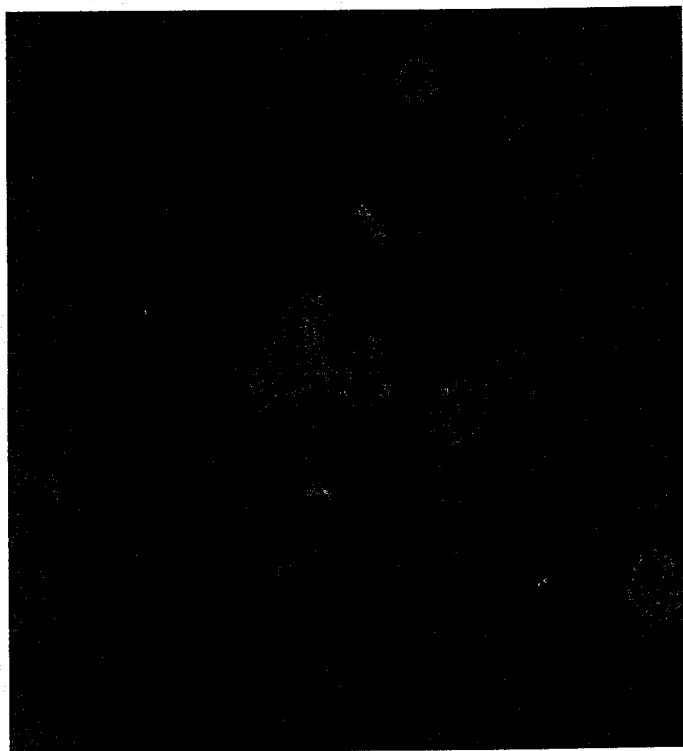


FIG. 23