

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 décembre 2011 (08.12.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/151595 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/50 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2011/051247

(22) Date de dépôt international :
31 mai 2011 (31.05.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1054350 3 juin 2010 (03.06.2010) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE PARIS DESCARTES [FR/FR]; 12, rue
de l'Ecole de Médecine, F-75006 Paris 6 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
SANQUER, Sylvia [FR/FR]; 24 bis rue Auguste Rodin,
F-92310 Sèvres (FR). BAROUKI, Robert [FR/FR]; 24
bis rue Auguste Rodin, F-92310 Sèvres (FR). HERRY,
Laurence [FR/FR]; 17 rue Roger Salengro, F-92130 Issy
Les Moulineaux (FR). TOMKIEWICZ-RAULET,
Céline [FR/FR]; 9 rue Neuve, F-95850 Mareil-en-France
(FR).

(74) Mandataires : NIEMANN, Frédéric et al.; Cabinet
Plasseraud, 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09
(FR).

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

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

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

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

Publiée :

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

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues (règle 48.2.h))

(54) Title : METHOD FOR REVEALING A TOXIC SUBSTANCE IN A SAMPLE

(54) Titre : METHODE DE REVELATION D'UNE SUBSTANCE TOXIQUE DANS UN ECHANTILLON

(57) Abstract : The invention relates to a method for revealing the presence of a toxic substance in a sample, which includes the steps consisting of: a) polymerising a collagen gel in which a suspension of epithelial cells from an immortalised cell line has been previously placed; b) incubating the gel obtained in step a) with or without said sample; and c) measuring the diameter of the gel.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet une méthode pour révéler la présence d'une substance toxique dans un échantillon comprenant les étapes consistant à : a) polymériser un gel de collagène dans lequel a été préalablement placée une suspension de cellules épithéliales provenant d'une lignée de cellules immortalisées; b) incuber le gel obtenu à l'étape a) avec ou sans ledit échantillon; c) mesurer le diamètre du gel.



WO 2011/151595 A1

METHODE DE REVELATION D'UNE SUBSTANCE TOXIQUE DANS UN ECHANTILLON

L'invention a pour objet une méthode simple de révélation de la présence de
5 substances toxiques dans un échantillon, qui repose sur la mise en évidence d'une
transition épithélio-mésenchymateuse en présence dudit échantillon.

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus au cours duquel les
cellules épithéliales acquièrent un phénotype fibroblastoïde invasif, l'expression
10 des protéines épithéliales spécifiques (protéines des jonctions serrées telles que la
E-cadhérine) étant réprimée et celle des protéines d'origine mésenchymateuse
induite.

Ce processus est impliqué aussi bien lors de processus physiologiques (comme
15 l'embryogenèse ou la cicatrisation) que pathologiques (comme le cancer, la
fibrose et l'inflammation chronique associée à de nombreuses pathologies).

Des études récentes ont montré que certains polluants environnementaux avaient
un effet sur la transition épithélio-mésenchymateuse.

20

En effet, le récepteur aux aryl hydrocarbures, le récepteur AhR, est impliqué dans
les changements morphologiques et le remodelage du cytosquelette liés à la
transition épithélio-mésenchymateuse et à la migration cellulaire (Diry et coll,
2006, Oncogene ; Bui et coll, 2009, Oncogene). Ce récepteur est un facteur
25 transcriptionnel activé par un très grand nombre de ligands incluant les
hydrocarbures aromatiques polycycliques, polyhalogénés (incluant les dioxines,
les furanes, les PCB et certains retardateurs de flamme), certains polyphénols
d'origine naturelle ainsi que des dérivés du tryptophane et d'indoles. Cette
observation démontre une implication potentiellement importante de
30 l'environnement dans le développement, non seulement de la transition épithélio-

mésenchymateuse, mais également des processus physiopathologiques qui y sont associés.

5 Jusqu'à présent, la caractérisation de la transition épithélio-mésenchymateuse reposait principalement sur des techniques d'immunomarquage pour la mise en évidence des modifications du cytosquelette des cellules épithéliales. Ces techniques qualitatives sont fastidieuses à mettre en œuvre pour des études à large échelle.

10 Dans une revue récente, Moreno-Bueno et al. ont décrit les différentes méthodes utilisées pour caractériser la transition épithélio-mésenchymateuse (Moreno-Bueno et al. 2009. Nature Protocols).

15 Parmi celles-ci figurent des techniques reposant sur l'analyse morphologique et phénotypique de cellules cultivées en monocouche (immunofluorescence, Western blot, RT-PCT, microarrays, test de réparation de lésions induites par une blessure).

20 Ce document décrit également des tests qui reposent sur l'invasion par les cellules épithéliales de gels tridimensionnels de collagène (« gel invasion assay »). Dans ce test, les cellules épithéliales sont mises en présence d'un gel de collagène après la polymérisation du collagène. Les cellules sont donc placées à la surface du gel de collagène et leur migration au sein du gel est analysée par des techniques d'imagerie sophistiquées.

25

Aucun des tests décrits ci-dessus ne permet d'envisager des tests de criblage à haut débit quantitatifs reposant sur la mise en évidence d'une transition épithélio-mésenchymateuse.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente invention repose sur la mise en évidence de nouvelles propriétés des cellules épithéliales soumises à une transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, les inventeurs ont découvert que ces cellules sont capables de contracter un gel de collagène lorsqu'elles sont soumises à une transition épithélio-mésenchymateuse. L'apparition de la transition épithélio-mésenchymateuse est quantifiée en mesurant le diamètre de gels de collagène préparés avec des cellules épithéliales en présence ou non d'un milieu réactionnel propice au développement de ce processus.

La présente invention a donc pour objet une méthode pour révéler la présence d'une substance toxique dans un échantillon comprenant les étapes consistant à :

- a) polymériser un gel de collagène dans lequel a été préalablement placée une suspension de cellules épithéliales provenant d'une lignée de cellules immortalisées;
- b) incuber le gel obtenu à l'étape a) avec ou sans ledit échantillon ;
- c) mesurer le diamètre du gel.

Selon la présente invention, l'échantillon peut être n'importe quel type d'échantillon dans lequel on souhaite rechercher la présence d'une substance toxique.

Dans un mode de réalisation, il peut s'agir d'un échantillon non biologique. Il peut s'agir d'un composé chimique déterminé, naturel ou de synthèse, pur, en solution dans un solvant, ou au sein d'un mélange de composés chimiques, ou d'un échantillon prélevé dans l'environnement (eau prélevée dans différents points tels que rivières, nappes phréatiques, stations d'épuration etc., molécules contenues dans l'air atmosphérique dissoutes dans un liquide etc.).

Dans un autre mode de réalisation, l'échantillon est un échantillon biologique dont on cherche à déterminer la toxicité éventuelle. Par «échantillon biologique », on entend tout milieu de culture, ainsi que tout fluide corporel issu d'un organisme mammifère. De préférence, ledit mammifère est un rongeur (souris, rat etc.), un
5 chien, un chat, un cheval, ou un primate. De manière encore plus préférée, ledit mammifère est un homme.

Typiquement, l'échantillon biologique peut être du sang, du plasma, de l'urine, du liquide céphalo-rachidien, du liquide de lavage broncho-alvéolaire ou du liquide
10 amniotique.

On entend ici par substance toxique tout composé ayant la capacité d'induire une transition épithélio-mésenchymateuse lorsqu'il est appliqué à des cellules épithéliales en culture.

15

De telles substances toxiques sont par exemple, de manière non limitative :

- des substances environnementales comme la dioxine, le benzène et ses dérivés etc.
- des substances biologiques telles que des molécules inflammatoires,
20 fibrosantes etc.

Le gel de collagène selon l'invention peut être obtenu par différentes techniques, connues de l'homme du métier.

25 Typiquement, une solution de collagène peut être obtenue auprès de différentes sources commerciales, telles que Sigma-Aldrich, sous la référence C4243.

De manière alternative, la solution de collagène peut être préparée à partir de tendons de queue de rat ou de tout autre tissu riche en collagène.

Typiquement, par solution de collagène ou gel de collagène, on entend une solution ou un gel qui contiennent du collagène, mais qui peuvent contenir d'autres protéines. Il peut s'agir d'une solution de collagène pur, ou bien de collagène en mélange avec d'autres composants de la matrice extracellulaire. Un exemple de gel contenant du collagène, est le Matrigel® commercialisé par BD Biosciences.

La polymérisation du gel de collagène est obtenue par ajout d'une solution neutralisante, telle que la soude (NaOH). En effet, les molécules de collagène, qui sont à l'état de monomères dans la solution acide, polymérisent à pH neutre.

La polymérisation est obtenue en plaçant la solution contenant le collagène, les cellules épithéliales, en milieu neutre dans des conditions adaptées à la culture desdites cellules (incubateur à 37°, dans des conditions standardisées de CO₂ etc.).

Il existe également des kits comprenant à la fois la solution de collagène et la solution de neutralisation (par exemple le kit CBA-201 commercialisé par Cell Biolabs Inc.).

Les cellules épithéliales utiles pour la méthode de l'invention sont tout type de cellules épithéliales susceptible de subir une transition épithélio-mésenchymateuse provenant d'une lignée de cellules immortalisées.

Par lignée de cellules épithéliales, on entend, de manière non limitative, des cellules choisies parmi:

- les cellules épithéliales dérivées d'un adénocarcinome

Cellules d'origine humaine :

Col cervical : HeLa, Hela 229, Hela S3, H1HeLa, Hs 588.T
Colorectal : NCI-H548, Hs 255.T, SW837, NCI-H716, NCI-H747, NCI-H508, NCI-H498, WiDr, COLO 320DM, COLO 320HSR, DLD-1, HCT-15, SW480, SW403, SW48, SW1116, SW948, SW1417, LS123, LS 180, LS 174T, C2BBel, Hs257.T, Hs 587.Int, Caco-2, HT-29, Hs 207.T, SW1463, Hs 200.T, Hs 219.T, HCT-8
Duodenum : HuTu 80

- Rein : A704, SW 839, ACHN, 786-O, 769-P
 Poumon : NCI-H1373, NCI-H1395, Hs 618.T, SK-LU-1, Hs
 229.T, NCI-H1581, NCI-H23, NCI-H522, NCI-H1435, NCI-
 5 H1563, NCI-H1734, NCI-H1651, NCI-H1793, NCI-H1838, NCI-
 H1975, NCI-H2073, NCI-H2085, NCI-H2228, NCI-H2342, NCI-
 H2347, NCI-H2066, NCI-H2286, NCI-H1703
 Glandes Mammaires : Hs 274.T, Hs 280.T, Hs 281.T, Hs 343.T, Hs
 362.T, Hs 739.T, Hs 741.T, Hs 742.T
 Glandes pituitaires : HP75
 10 Ovaire : Caov-3, TOV-21G, TOV-112D
 Pancréas : BxPC-3, HPAF-II, HPAC, Panc 03.27, Panc 08.13,
 Panc 02.03, Panc 02.13, Capan-2, CFPAC-1, PL45, MPanc-96,
 Panc 10.05
 Prostate : CA-HPV-10
 15 Utérus : KLE, HEC-1-A, HEC-1-B
 Estomac : AGS, RF-1
Cellules d'origine non humaine :
 Souris : JC, LTPA, TRAMP-C2, WR21, RAG, LA-4, aTC1, NIT-2
 Rat : 13762 MAT B III, NMU, RBA, SMT/2A LNM, RC-4B/C
 20 Cochon d'Inde : GPC-16

- les cellules épithéliales dérivées d'un carcinome

- Cellules d'origine humaine :
 Glandes adrénales : NCI-H295R, NCI-H295, SW-13
 25 Vessie : Hs 195.T, Hs 228.T, Hs 172.T, 5637, HT-1376, HT-1197,
 UM-UC-3, SW 780, J82, SCaBER, T24, TCCSUP
 Uretère : Hs 789.T
 Urètre : Hs 769.T
 Rein : A-498, Caki-2
 30 Col cervical : C-4 I, C-4 II, DoTc2 4510, C-33 A, SW756, SiHa
 Vulve : SW 954
 Poumon : A549, A-427, NCI-H596, SW 1573, NCI-H358, NCI-
 H1688, NCI-H1417, NCI-H1672, NCI-H1836, HLF-a, NCI-H810,
 NCI-H292, NCI-H2126, Calu-6, DMS 79, DMS 53, DMS 114, SW
 35 1271, NCI-H2227, NCI-H1963, SHP-77, H69AR, NCI-H2170,
 NCI-H520, SW 900, NCI-N417
 Glandes mammaires : Hs 540.T, Hs 566(B).T, Hs 605.T, Hs 606,
 BT-20, UACC-812, HCC1954, Hs 574.T, BT-483, BT-549,
 DU4475, Hs 578.T, BT-474, HCC1806, UACC-893, HCC38,
 40 HCC70, HCC202, HCC1143, HCC1187, HCC1395, HCC1419,
 HCC1500, HCC1599, HCC1937, HCC2157, HCC2218, HCC1569
 Ovaires : Hs 38.T, Hs 571.T, ES-2
 Pancréas : MIA PaCa-2, PANC-1
 Prostate : 22Rv1
 45 Estomac : Hs T40.T, SNU-1
 Utérus : RL95-2

- 5 *Peau* : TE 354.T, A-431, A431NS, A253
Colorectal : SNU-C2B, SNU-C2A, LS513, LS1034, LS411N, HCT 116, Hs 722.T
Testicules : Cates-1B
Glandes salivaires : A-253
Foie : C3A, SNU-398, SNU-449, SNU-182, SNU-475, Hep 3B2.1-7, PLHC-1, SNU-387, SNU-423
Thyroïde : TT, SW579
 10 *Pharynx* : FaDu
Langue : SCC-15, SCC-4, SCC-25, SCC-9, CAL 27
Placenta : BeWo, JAR, JEG-3
Cellules d'origine non humaine :
 15 *Souris* : CT26.WT, CT26.CL25, NFPE, PFHR 9, ES-E14TG2a, ES-D3 GL, CMH1a, CSMab6C, CSMab1H, SCA-9, MTC-M, Erlich-Lettre ascites, TGP49, TGP47, F9, LL/2, CMT-93
Rat : L2-RYC, DSL-6A/C1, DSL-6B/C2, LLC-WRC 256, AT3B-1, MAT-Ly-Lu-B-2, 6-23, FAT 7
Poulet : LMH, LMH/2A
 20 *Lapin* : VX7

De manière préférée, les cellules épithéliales sont des cellules pour lesquelles une transition épithélio-mésenchymateuse a déjà été mise en évidence de manière expérimentale. Il s'agit des cellules humaines HepG2, HaCaT et MCF-7, et des lignées murines NmuMG et EpH4.

25

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les cellules épithéliales sont des cellules HepG2.

30

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, les cellules épithéliales sont des cellules HaCaT.

35

Selon la méthode de l'invention, une suspension de cellules épithéliales dans un milieu de culture approprié est mélangée à la solution de collagène, avant la polymérisation dudit gel de collagène. L'homme du métier saura déterminer, par des tests de routine, le ratio optimal entre les cellules et le collagène pour chaque type de cellules utilisées.

Typiquement, le ratio pourra varier entre 10^5 cellules par mg de collagène à 10^7 cellules par mg de collagène.

5 Le volume total avant polymérisation pourra également varier, de sorte que la concentration en collagène dans le gel final pourra varier, de manière préférée, entre 0,1mg de collagène par mL de gel et 10 mg de collagène. De manière encore plus préférée, la concentration en collagène dans le gel final est de l'ordre de 0,5mg par mL, 1 mg par mL, 1,5 mg/mL, 2 mg/mL, ou 2,5mg/mL.

10 De même, la densité de cellules épithéliales au sein du gel de collagène pourra typiquement varier entre $0,1 \times 10^6$ cellules par mL de gel et 10×10^6 cellules par mL. De manière préférée, la densité de cellules au sein du gel final est de l'ordre de $0,2 \times 10^6$ cellules par mL, $0,3 \times 10^6$ cellules par mL, $0,4 \times 10^6$ cellules par mL, $0,5 \times 10^6$ cellules par mL, $0,55 \times 10^6$ cellules par mL, $0,6 \times 10^6$ cellules par mL,
15 $0,7 \times 10^6$ cellules par mL, $0,8 \times 10^6$ cellules par mL, $0,9 \times 10^6$ cellules par mL, 1×10^6 cellules par mL, $1,5 \times 10^6$ cellules par mL, 2×10^6 cellules par mL, ou 5×10^6 cellules par mL.

20 Une fois que le gel de collagène comprenant les cellules épithéliales a polymérisé, la contraction dudit gel peut être mesurée de différentes manières.

Dans mode de réalisation préféré, le gel de collagène est détaché du puits de la plaque de culture et peut alors se rétracter librement. Le diamètre du gel peut alors être mesuré aisément. Cette étape peut facilement est automatisée à l'aide d'un
25 microscope optique et d'un logiciel de traitement d'image.

La présente invention a également pour objet un kit pour révéler la présence d'une substance toxique dans un échantillon comprenant :

- a) une solution de collagène ;
- 30 b) des cellules épithéliales ;
- c) une substance toxique servant de témoin positif et permettant la calibration ;

d) éventuellement, une notice explicative indiquant que les cellules épithéliales doivent être suspendues dans la solution de collagène avant sa polymérisation et que le diamètre du gel de collagène doit être mesuré pour indiquer la présence d'une substance toxique.

5

Comme substance toxique pouvant servir de témoin positif et permettant la calibration du test, on pourra utiliser n'importe quelle substance toxique connue pour induire une transition épithélio-mésenchymateuse.

10 Typiquement, le témoin positif du kit selon l'invention est la dioxine.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un gel de collagène comprenant des cellules épithéliales pour mettre en évidence une transition épithélio-mésenchymateuse desdites cellules épithéliales.

15

L'étude de ce phénomène trouve notamment des applications dans l'analyse toxicologique d'échantillons, qu'il s'agisse d'échantillons environnementaux ou d'échantillons biologiques humains.

20 Ainsi, la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un gel de collagène comprenant des cellules épithéliales pour révéler la présence d'une substance toxique dans un échantillon.

25 Parmi ces différentes applications, on pourra citer, à titre illustratif et de manière non limitative :

- les criblages de toxicité à haut débit:

30 Dans un premier aspect, ces criblages peuvent servir à déterminer de manière automatisée les effets potentiellement toxiques de molécules chimiques mises sur le marché.

A titre d'exemple, le règlement européen REACH (obligation d'enREgistrement, Evaluation et Autorisation, restriction des produits CHimiques) en vigueur depuis le 1^{er} juin 2007 impose de tester la toxicité de toute substance chimique.

- 5 Sont également envisagés selon l'invention des criblages à haut débit d'échantillons prélevés dans l'environnement dans le cadre de contrôles de pollution (pollution de l'eau, de l'air etc.).

- l'analyse de la toxicité d'échantillons biologiques

- 10 Certaines molécules présentes dans des échantillons biologiques sont susceptibles de provoquer une transition épithélio-mésenchymateuse. Ainsi des cellules épithéliales en culture in vitro développent une transition épithélio-mésenchymateuse en présence de facteurs de croissance tels que EGF, FGF et PDGF (Huber, 2005 ; Peinado, 2007 ; Polyak, 2009 ; Thiery, 2006). Des facteurs
- 15 impliqués fortement dans les processus inflammatoires, tels que TGF- β , TNF- α et IL-1 β , sont également capables d'induire une transition épithélio-mésenchymateuse (Willis, 2007 ; Zhang, 2009 ; Borthwick, 2010). La présence simultanée de ces différents facteurs a un effet synergique sur le développement de la transition épithélio-mésenchymateuse (Borthwick, 2010). Ceci suggère que
- 20 l'association de plusieurs facteurs pourrait induire le développement d'une transition épithélio-mésenchymateuse, y compris lorsque ces facteurs sont présents à des concentrations inférieures à celles établies pour avoir un rôle dans le développement d'une transition épithélio-mésenchymateuse. La révélation précoce et non invasive du développement d'une transition épithélio-mésenchymateuse pourrait être utile pour prédire des réactions indésirables de
- 25 l'organisme dans différentes situations. Par exemple, il est connu que, chez des patients transplantés pulmonaires, il existe un risque de complications de type d'inflammation chronique qui peut provoquer une fibrose pulmonaire et résulter en une bronchiolite oblitérante. Le traitement de notre modèle cellulaire de mise
- 30 en évidence de transition épithélio-mésenchymateuse par du plasma et/ou des liquides de lavage broncho-alvéolaire issus de patients transplantés pulmonaires

devrait permettre de révéler de manière précoce des substances toxiques dans ces échantillons biologiques et ainsi de prédire un risque accru du développement d'une bronchiolite oblitérante chez certains de ces patients.

- 5 L'invention sera mieux comprise à la lecture des figures et exemples ci-dessous. Ces exemples sont présentés à titre illustratif et ne sauraient limiter la portée de la présente invention en aucune manière.

10 La Figure 1 représente la mesure de la contraction des gels de collagène contenant une suspension de cellules HepG2 en présence ou en l'absence de dioxine.

La Figure 2 montre la modification de la morphologie des cellules traitées par la dioxine pendant 3 jours et en particulier la modification du cytosquelette (les cellules ont été marquées par un anticorps anti-actine et un anticorps anti-paxilline).

15

EXEMPLE 1

Mise en évidence des effets de la dioxine sur la transition épithélio-mésenchymateuse

20

Matériel et méthodes

Culture des cellules épithéliales

Des cellules HepG2 ont été cultivées selon des protocoles classiques.

25

Préparation des gels de collagène au sein desquels sont placées les cellules épithéliales

Le collagène a été préparé à partir de tendons de queues de rat selon des protocoles classiques. Le milieu de culture et la concentration en cellules, et les proportions des différents constituants ont été adaptés aux cellules épithéliales.

30

Les gels de collagène ont été préparés dans un tube stérile placé dans un bain de glace en mélangeant les constituants suivants : 5 volumes de DMEM + 10% SVF, 3 volumes de collagène en milieu acide, quelques gouttes de NaOH 0.1N pour neutraliser les milieux et 1 volume de suspension de cellules épithéliales (5×10^6 cellules/ml). Le mélange a alors été rapidement transféré dans des plaques de culture 6 ou 24 puits (5 ou 2 ml par puits), et les plaques immédiatement placées dans une étuve à 37°C en présence de 5% de CO₂ et en atmosphère humide. Le gel a polymérisé en quelques minutes après la neutralisation de l'acidité de la solution de collagène et l'élévation de la température. Environ 2 heures après la fabrication, les gels ont été décollés des parois des puits par une agitation douce afin d'obtenir ensuite une contraction régulière si les cellules épithéliales subissaient une transition épithélio-mésenchymateuse.

Des gels de collagène ont été préparés avec des cellules épithéliales (hepG2) et traités ou non par la dioxine à la concentration 25 nM. Deux expériences indépendantes ont été réalisées et chaque condition a été évaluée dans des cultures en triplicate. Les diamètres des gels étaient mesurés quotidiennement.

Immunomarquages

A différents temps, les gels ont été rincés par une solution de NaCl à 0,9%, puis fixés à l'aide d'une solution de formol 10%, déshydratés et inclus dans un bloc de paraffine. Des immunomarquages par l'actine et la paxilline ont ensuite été réalisés pour visualiser le cytosquelette des cellules et rechercher la présence de molécules d'adhésion.

25

Résultats

Comme l'indique la figure 1, l'ajout de dioxine dans le milieu de culture des gels de collagène contenant les cellules HepG2 a provoqué une importante contraction des gels de collagène. Cette contraction était visible et significative dès 2 jours de culture, par rapport aux conditions témoin sans ajout de dioxine.

30

Les différences de diamètre observées étaient bien dues à une modification du cytosquelette des cellules épithéliales. En effet, des expériences d'immunomarquage ont montré une réorganisation du cytosquelette d'actine avec l'apparition de prolongements marqués par les anticorps anti-actine dans les
5 cellules traitées, ainsi que l'apparition progressive de points focaux d'adhésion marqués par la paxilline (voir figure 2). Les cellules HepG2 commencent alors à émettre des prolongements et prennent un aspect fibroblastoïde alors que les cellules HepG2 témoin non traitées par la dioxine conservent une morphologie de cellule épithéliale. Cette différence de morphologie explique les différences de
10 diamètre observées.

Conclusion

Ce test permet donc de visualiser et de quantifier de manière aisée la transition épithélio-mésenchymateuse induite par différentes substances toxiques, telle que
15 la dioxine.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules HaCaT.

EXEMPLE 2

**Mise en évidence de la présence de substances toxiques au sein de plasmas
20 et/ou de liquide de lavage broncho-alvéolaire chez certains patients
transplantés pulmonaires**

Les gels de collagène sont préparés avec des cellules épithéliales HepG2 comme il est décrit dans l'exemple 1.

25

Pour la mise en évidence de substances toxiques dans le plasma des patients, le SVF utilisé dans l'exemple 1 est remplacé par :

- du plasma issu d'un pool de plasma préparé à partir de sujets sains pour les gels de collagène "témoins"
- 30 - du plasma issu des patients transplantés pulmonaires à différents temps après la transplantation pour les gels de collagène "traités"

Pour la mise en évidence de substances toxiques dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, le SVF utilisé dans l'exemple 1 est remplacé par ;

- un pool de lysat cellulaire préparé à partir du liquide de lavage broncho-alvéolaire obtenus chez une vingtaine de patients environ 1 mois après la transplantation pulmonaire (ne souffrant pas de fibrose pulmonaire) pour les gels de collagène "témoins"
- du lysat cellulaire issu du liquide de lavage broncho-alvéolaire des patients transplantés pulmonaires à différents temps après la transplantation pour les gels de collagène "traités"
- d'un pool de surnageant lyophilisé préparé à partir des liquides de lavage broncho-alvéolaire obtenus chez une vingtaine de patients environ 1 mois après la transplantation pulmonaire (ne souffrant pas de fibrose pulmonaire) pour les gels de collagène "témoins"
- du surnageant lyophilisé préparé à partir du liquide de lavage broncho-alvéolaire des patients transplantés pulmonaires à différents temps après la transplantation pour les gels de collagène "traités"

Chaque condition est évaluée dans des cultures en triplicate, et les diamètres des gels sont mesurés quotidiennement pendant une semaine.

Pour confirmer nos résultats, des immunomarquages par l'actine et la paxilline sont réalisés pour visualiser le cytosquelette des cellules et rechercher la présence de molécules d'adhésion.

On observe une contraction plus importante par rapport aux conditions témoin pour les gels de collagène qui ont été traités par des fluides biologiques (plasma ou liquide de lavage broncho-alvéolaire) provenant de patients transplantés pulmonaires qui développent une bronchiolite oblitérante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Borthwick LA, McIlroy EI, Gorowiec MR, Brodlie M, Johnson GE, Ward C, Lordan JL, Corris PA, Kirby JA, Fisher AJ. *Am J Transplant* 2010, 10 :498-509. Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair.
- 5 Bui LC, Tomkiewicz C, Chevallier A, Pierre S, Bats A-S, Mota S, Raingeaud J, Pierre J, Diry M, Transy C, Garlatti M, Barouki R, Coumoul X. *Oncogene* 2009. Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity.
- 10 Coulomb B, Dubertret L, Bell E, Touraine E. *J Invest Dermatol* 1984, 82 :341-4. The contractility of fibroblasts in a collagen lattice is reduced by corticosteroids. Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. *J Invest Dermatol* 1989, 92 :122-5. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization.
- Diry M, Tomkiewicz C, Koehle C, Coumoul X, Bock KW, Barouki R, Transy C. *Oncogene* 2006, 25 :5570-5. Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism.
- 15 Huber MA, Kraut N, Beug H. *Curr Opin Cell Biol* 2005, 17 :548)58. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, Olmeda D, Cubillo E, Santos V, Palacios J, Portillo F, Cano A. *Nature Protocols* 2009, 4 : 1591-1613. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition.
- 20 Peinado H, Olmeda D, Cano A. *Nat Rev Cancer* 2007, 7 :415-28. Snail, Zeb and bHLH factors in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype? Polyak K, Weinberg RA. *Nat Rev Cancer* 2009, 9 :265-273. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits.
- 25 Thierry JP, Sleeman JP. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7 :131-142. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Willis BC, Borok Z. *Am J Physiol* 2007, 293 :L525-34. TGF-beta-induced EMT: Mechanisms and implications for fibrotic lung disease.
- 30 Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. *Am J Pathol* 2005, 166 :1321-32. Induction of epithelial-mesenchymal

transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1:
Potential role in idiopathic pulmonary fibrosis.

Zhang M, Zhang Z, Pan HY, Wang DX, Deng ZT, Ye XL. TGF-beta1 induces
human bronchial epithelial cell-to-mesenchymal transition in vitro. Lung 2009,
5 187 : 187-94.

REVENDICATIONS

1. Méthode pour révéler la présence d'une substance toxique dans un échantillon
5 comprenant les étapes consistant à :
 - a) polymériser un gel de collagène dans lequel a été préalablement placée une suspension de cellules épithéliales provenant d'une lignée de cellules immortalisées;
 - b) incuber le gel obtenu à l'étape a) avec ou sans ledit échantillon ;
 - 10 c) mesurer le diamètre du gel.
2. Kit pour révéler la présence d'une substance toxique dans un échantillon comprenant :
 - a) une solution de collagène ;
 - 15 b) des cellules épithéliales ;
 - c) une substance toxique servant de témoin positif et permettant la calibration ;
 - d) éventuellement, une notice explicative indiquant que les cellules épithéliales doivent être suspendues dans la solution de collagène avant sa polymérisation et que le diamètre du gel de collagène doit être mesuré pour indiquer la présence
20 d'une substance toxique.
3. Kit selon la revendication 2, dans lequel la substance toxique servant de témoin positif est la dioxine.
- 25 4. Utilisation d'un gel de collagène comprenant des cellules épithéliales provenant d'une lignée de cellules immortalisées pour mettre en évidence une transition épithélio-mésenchymateuse desdites cellules épithéliales, dans laquelle le diamètre dudit gel est mesuré.

5. Utilisation d'un gel de collagène comprenant des cellules épithéliales provenant d'une lignée de cellules immortalisées pour révéler la présence d'une substance toxique dans un échantillon, dans laquelle le diamètre dudit gel est mesuré.

5 6. Méthode, kit ou utilisation selon les revendications 1 à 5, dans laquelle l'échantillon est un échantillon non biologique.

7. Méthode, kit ou utilisation selon les revendications 1 à 5, dans laquelle l'échantillon est un échantillon biologique choisi dans le groupe constitué par le
10 sang, le plasma, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, le liquide de lavage broncho-alvéolaire et le liquide amniotique.

8. Méthode, kit ou utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les cellules épithéliales sont choisies dans le groupe
15 constitué par les cellules HepG2, HaCaT, MCF-7, NmuMG et EpH4.

9. Méthode, kit ou utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la concentration en collagène dans le gel final est de l'ordre de 1 mg par mL.

20

10. Méthode, kit ou utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la densité de cellules au sein du gel final est de l'ordre de $0,55 \times 10^6$ cellules par mL.

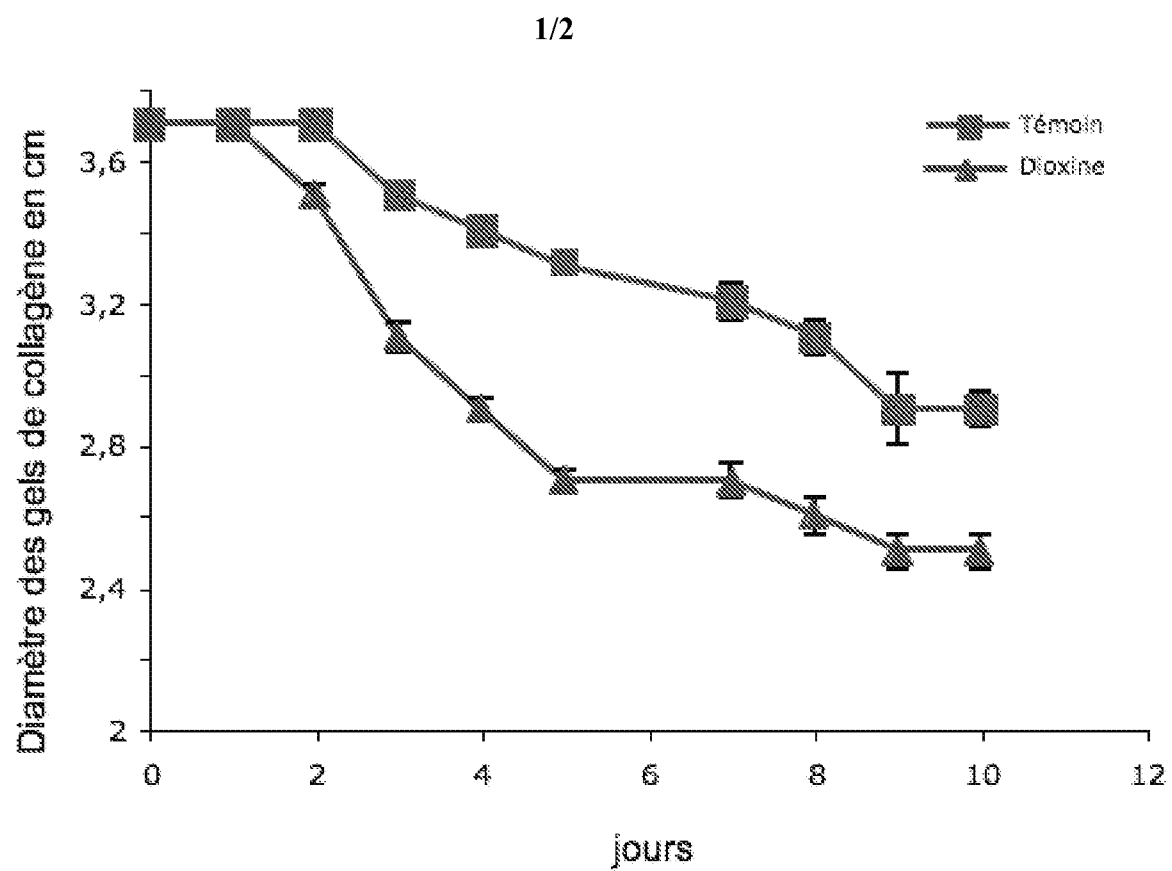
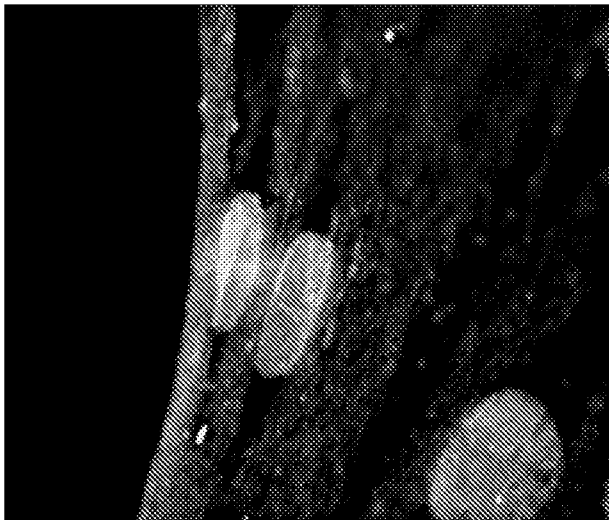


Figure 1

2/2

A- Témoin



B- Dioxine



Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2011/051247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

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

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

EP0-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NOGUCHI CHIKA ET AL: "TGF-beta and glutathione promote tissue repair in cigarette smoke induced injury.", JOURNAL OF MEDICAL AND DENTAL SCIENCES MAR 2007 LNKD- PUBMED:19845143, vol. 54, no. 1, March 2007 (2007-03), pages 109-116, XP9138965, ISSN: 1342-8810 p 114, colonne 1, ligne 15 continue; abstract ----- -/-	1-3,5-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 2011

Date of mailing of the international search report

20/10/2011

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Bigot-Maucher, Cora

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2011/051247

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YASUKAWA TSUTOMA ET AL: "Effect of tranilast on proliferation, collagen gel contraction, and transforming growth factor beta secretion of retinal pigment epithelial cells and fibroblasts.", OPHTHALMIC RESEARCH 2002 JUL-AUG LNKD-PUBMED:12297693, vol. 34, no. 4, July 2002 (2002-07), pages 206-212, XP9138960, ISSN: 0030-3747 abstract; figure 2	1-3,5-10
X	----- UMINO T ET AL: "Modification of type I collagenous gels by alveolar epithelial cells.", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY JUN 2000 LNKD-PUBMED:10837367, vol. 22, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 702-707, XP002601764, ISSN: 1044-1549 p 703, colonne 1, paragraphe 4; p 704, col 1, dernier paragraphe à col 2, premier paragraphe; abstract	1-3,5-10
A	----- POPNIKOLOV N K ET AL: "In vivo growth stimulation of collagen gel embedded normal human and mouse primary mammary epithelial cells.", JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY APR 1995 LNKD- PUBMED:7896900, vol. 163, no. 1, April 1995 (1995-04), pages 51-60, XP002601765, ISSN: 0021-9541 p 1592, col 2, lignes 6-9; abstract	1-10
X	----- MORENO-BUENO GEMA ET AL: "The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition.", NATURE PROTOCOLS 2009 LNKD-PUBMED:19834475, vol. 4, no. 11, 2009, pages 1591-1613, XP1525524, ISSN: 1750-2799 p 1592, col 2, lignes 6-9; abstract	4
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2011/051247

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VERNON ROBERT B ET AL: "An improved method for the collagen gel contraction assay", IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY ANIMAL, vol. 38, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 97-101, XP002660308, ISSN: 1071-2690 abstract -----	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2011/051247

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. G01N33/50
ADD.

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
G01N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NOGUCHI CHIKA ET AL: "TGF-beta and glutathione promote tissue repair in cigarette smoke induced injury.", JOURNAL OF MEDICAL AND DENTAL SCIENCES MAR 2007 LNKD- PUBMED:19845143, vol. 54, no. 1, mars 2007 (2007-03), pages 109-116, XP9138965, ISSN: 1342-8810 p 114, colonne 1, ligne 15 continue; abrégé ----- -/-	1-3,5-10



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



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 octobre 2011

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/10/2011

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

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

Fonctionnaire autorisé

Bigot-Maucher, Cora

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2011/051247

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	YASUKAWA TSUTOMA ET AL: "Effect of tranilast on proliferation, collagen gel contraction, and transforming growth factor beta secretion of retinal pigment epithelial cells and fibroblasts.", OPTHALMIC RESEARCH 2002 JUL-AUG LNKD-PUBMED:12297693, vol. 34, no. 4, juillet 2002 (2002-07), pages 206-212, XP9138960, ISSN: 0030-3747 abrégé; figure 2	1-3,5-10
X	----- UMINO T ET AL: "Modification of type I collagenous gels by alveolar epithelial cells.", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY JUN 2000 LNKD-PUBMED:10837367, vol. 22, no. 6, juin 2000 (2000-06), pages 702-707, XP002601764, ISSN: 1044-1549 p 703, colonne 1, paragraphe 4; p 704, col 1, dernier paragraphe à col 2, premier paragraphe; abrégé	1-3,5-10
A	----- POPNIKOLOV N K ET AL: "In vivo growth stimulation of collagen gel embedded normal human and mouse primary mammary epithelial cells.", JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY APR 1995 LNKD- PUBMED:7896900, vol. 163, no. 1, avril 1995 (1995-04), pages 51-60, XP002601765, ISSN: 0021-9541 p 1592, col 2, lignes 6-9; abrégé	1-10
X	----- MORENO-BUENO GEMA ET AL: "The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition.", NATURE PROTOCOLS 2009 LNKD-PUBMED:19834475, vol. 4, no. 11, 2009, pages 1591-1613, XP1525524, ISSN: 1750-2799 p 1592, col 2, lignes 6-9; abrégé ----- -/--	4

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2011/051247

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	VERNON ROBERT B ET AL: "An improved method for the collagen gel contraction assay", IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY ANIMAL, vol. 38, no. 2, février 2002 (2002-02), pages 97-101, XP002660308, ISSN: 1071-2690 abrégé -----	1-10