

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication : **3 035 407**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **15 53659**

⑤① Int Cl⁸ : **C 12 N 5/02 (2015.01), A 01 N 1/00, C 12 N 5/07**

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ PROCÉDE DE CONSERVATION DE CELLULES, TISSUS OU ORGANES EN HYPOTHERMIE.

②② Date de dépôt : 23.04.15.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 28.10.16 Bulletin 16/43.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 17.06.22 Bulletin 22/24.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *ETABLISSEMENT FRANCAIS DU
SANG — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *IVANOVIC ZORAN, GERBY SANDIE
et VLASKI-LAFARGE MARIJA.*

⑦③ Titulaire(s) : *UNIVERSITE DE BORDEAUX
Etablissement public à caractère scientifique, culturel
et professionnel, CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement public à
caractère scientifique technique et industriel,
ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG.*

⑦④ Mandataire(s) : *Cabinet Becker & Associés.*

FR 3 035 407 - B1



La présente invention se rapporte à un nouveau procédé de conservation à moyen et long termes de cellules, tissus ou organes. Ce procédé est plus particulièrement destiné à la conservation des greffons jusqu'à leur transplantation chez le receveur.

ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE DE L'INVENTION

5 A ce jour, la cryopréservation est la seule méthode disponible pour la conservation des greffons de cellules hématopoïétiques à moyen et long termes. En effet, sans congélation et à une température de 4°C, il a été observé que le nombre et la capacité fonctionnelle des cellules progénitrices contenues dans les greffons diminuaient drastiquement après seulement 3 jours de conservation (Hechler et al., 1996).

10 La cryopréservation présente cependant des inconvénients notables, notamment la possibilité d'agglutination durant la décongélation ou le risque de réaction anaphylactique déclenchée par la présence de cryoprotecteurs. De plus, cette méthode n'est pas applicable à tous les types cellulaires.

De précédentes études ont démontré que la conservation à court-terme à 4°C des
15 cellules souches hématopoïétiques CD34+ était améliorée en modifiant les conditions atmosphériques des cultures, notamment en diminuant la concentration en oxygène et augmentant la concentration en dioxyde de carbone (Vlaski et al., 2014). Bien que notables, ces améliorations demeurent insuffisantes pour assurer la survie et le maintien des capacités fonctionnelles des cellules, et en particulier des cellules progénitrices, pour
20 une conservation à long terme à 4°C.

Un procédé optimal permettrait de conserver à long terme les greffons en conditions d'hypothermie, sans congélation, et simplifierait ainsi la logistique et les processus de greffe tout en améliorant les résultats obtenus chez le receveur.

RESUME DE L'INVENTION

25 Les inventeurs ont démontré que la pré-incubation de cellules en hypothermie modérée et sous une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique avant d'être conservées en hypothermie sévère permettait d'améliorer considérablement la survie et la capacité de prolifération desdites cellules, notamment dans le cas de cellules souches.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention concerne un procédé *in vitro* ou *ex vivo* de conservation de cellules animales, de préférence de cellules humaines, en hypothermie sévère comprenant une étape consistant à maintenir lesdites cellules en hypothermie modérée et sous une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique durant
5 environ 12 à environ 72 heures, avant de les conserver en hypothermie sévère.

Les cellules peuvent être conservées en hypothermie sévère à une température comprise entre environ 1°C et environ 12°C, de préférence environ 4°C.

Les cellules peuvent être maintenues en hypothermie modérée à une température comprise entre environ 20°C et environ 35°C, de préférence environ 30°C.

10 Les cellules peuvent être maintenues en hypothermie modérée et sous une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique durant environ 24 à environ 48 heures, de préférence durant environ 48 heures.

L'atmosphère hypoxique peut comprendre environ 0,5 à environ 10 % de dioxygène, de préférence environ 5 % de dioxygène.

15 L'atmosphère hypercapnique peut comprendre environ 5 à environ 20 % de dioxyde de carbone, de préférence environ 9 % de dioxyde de carbone.

De préférence, les cellules sont maintenues en hypothermie modérée et sous une atmosphère hypoxique et hypercapnique.

20 Les cellules conservées selon le procédé de l'invention peuvent être des cellules de peau, de cartilage, des ostéocytes, des cellules endothéliales, des cellules musculaires, des cellules neurales, des cellules rétinienne, des cellules pancréatiques, des cellules sanguines, ou des cellules souches ou progénitrices capables de se différencier en ces cellules.

25 Ces cellules peuvent notamment être organisées en tissu, de préférence sélectionné dans le groupe constitué de la peau, la cornée, un tendon, un tissu osseux, un vaisseau sanguin, un nerf, une valve cardiaque, une membrane amniotique, un tissu cartilagineux, un îlot de Langerhans et un tissu musculaire, ou organisées en organe complet ou partiel, de préférence sélectionné dans le groupe constitué du rein, foie, cœur, cordon ombilical, placenta, intestin, poumon et pancréas.

30 De préférence, les cellules conservées sont des cellules souches hématopoïétiques, des cellules souches mésenchymateuses, ou une combinaison de celles-ci, de préférence des cellules souches hématopoïétiques.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne également une trousse comprenant un milieu de conservation cellulaire, un premier conteneur stérile destiné à recevoir des cellules, tissus ou organes et le milieu de conservation cellulaire, et un dispositif permettant de créer une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique dans le premier conteneur comprenant les cellules, tissus ou organes, et optionnellement un second conteneur permettant d'assurer le maintien du premier conteneur et/ou des cellules, tissus ou organes à une température contrôlée.

Alternativement, la trousse peut comprendre un conteneur stérile destiné à recevoir des cellules, tissus ou organes et le milieu de conservation cellulaire renfermant une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique, ledit conteneur stérile étant optionnellement pré-rempli avec du milieu de conservation cellulaire.

Selon encore un autre aspect, la présente invention concerne également l'utilisation d'une trousse selon l'invention pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, c'est-à-dire pour conserver des cellules animales en hypothermie sévère.

15 BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

Figure 1 : Cellules CD34+ de sang placentaire. Rendement des cellules viables par rapport à t=0. Air : 21% O₂, et 0.01% CO₂ ; HH : 9% CO₂ et 5% O₂; Hypo : 5% O₂ et 0.001 CO₂ ; Hyper : 20% O₂ et 20% CO₂. * : p < 0,5 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

Figure 2 : Cellules CD34+ de sang placentaire. Rendement des progéniteurs clonogéniques par rapport à t=0. Air : 21% O₂, et 0.01% CO₂ ; HH : 9% CO₂ et 5% O₂; Hypo : 5% O₂ et 0.001 CO₂ ; Hyper : 20% O₂ et 20% CO₂. * : p < 0,5 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

Figure 3 : Cellules mésenchymateuses humaines. Rendement des cellules viables par rapport à t=0. Air : 21% O₂, et 0.01% CO₂ ; HH : 9% CO₂ et 5% O₂; Hypo : 5% O₂ et 0.001 CO₂ ; Hyper : 20% O₂ et 20% CO₂. * : p < 0,5 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

Figure 4 : Cellules mésenchymateuses humaines. Rendement des progéniteurs clonogéniques par rapport à t=0. Air : 21% O₂, et 0.01% CO₂ ; HH : 9% CO₂ et 5% O₂; Hypo : 5% O₂ et 0.001 CO₂ ; Hyper : 20% O₂ et 20% CO₂. * : p < 0,5 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

Figure 5 : Cellules FDCPmix. Rendement des cellules viables par rapport à t=0. Air : 21% O₂, et 0.01% CO₂ ; HH : 9% CO₂ et 5% O₂; Hypo : 5% O₂ et 0.001 CO₂ ; Hyper : 20% O₂ et 20% CO₂. * : p < 0,5 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

5 Dans de précédentes études, les inventeurs de la présente invention ont observé que l'hypoxie et l'hypercapnie permettaient d'améliorer la conservation des cellules souches hématopoïétiques par rapport à leur exposition à l'air (Jeanne et al., 2009 ; Ivanovic et al., 2010 ; Vlaski et al., 2014).

10 Dans la partie expérimentale de la présente demande, les inventeurs ont démontré que la pré-incubation de cellules souches durant deux jours en hypothermie modérée (30°C) avant de les transférer à 4°C, améliorerait de manière très significative la survie de ces cellules et la capacité fonctionnelle des progéniteurs par rapport à un placement direct à 4°C. Les résultats obtenus sont d'autant plus marqués lorsque la pré-incubation est combinée à une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique. Ces résultats, validés sur
15 trois types cellulaires différents, à savoir des cellules hématopoïétiques CD34+, des cellules mésenchymateuses et des cellules de la lignée FDCPmix, indiquent que ce procédé peut être utilisé pour améliorer la conservation des cellules, tissus ou organes en hypothermie, notamment en vue d'une transplantation.

20 Ainsi, selon un premier aspect, la présente demande concerne un procédé *in vitro* ou *ex vivo* de conservation de cellules animales en hypothermie sévère comprenant une étape consistant à maintenir lesdites cellules en hypothermie modérée durant une brève période, avant de les conserver en hypothermie sévère.

25 Le procédé selon l'invention a pour but d'améliorer la préservation des cellules animales lorsque celles-ci sont conservées en hypothermie sévère, sans congélation. Tel qu'utilisé ici, le terme « hypothermie sévère » se réfère à des températures supérieures à 0 °C et inférieures à 15°C. De manière préférée, ce terme se réfère à des températures comprises entre environ 1°C et environ 12°C, à savoir environ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12°C, en particulier entre environ 2°C et environ 8°C. De manière plus
30 particulièrement préférée, des conditions d'hypothermie sévère correspondent à une température d'environ 4°C.

Tel qu'utilisé ici, le terme « environ » fait référence à une plage de valeurs de $\pm 5\%$ de la valeur spécifiée, de préférence $\pm 2\%$ de la valeur spécifiée. Par exemple, «environ 20» inclut les $\pm 5\%$ de 20, ou de 19 à 21.

5 Avant d'être placées en hypothermie sévère, les cellules sont maintenues en hypothermie modérée durant une brève période. Tel qu'utilisé ici, le terme « hypothermie modérée » se réfère à des températures comprises entre environ 20°C et environ 35°C, à savoir environ 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 ou 35°C, de préférence entre environ 25°C et environ 32°C. De manière plus particulièrement préférée, une hypothermie modérée correspond à une température d'environ 30°C.

10 Dans le procédé selon l'invention, les cellules sont placées en hypothermie modérée durant environ 12 à environ 72 heures avant d'être placées en hypothermie sévère en vue d'une conservation à plus long terme. De préférence, la phase d'hypothermie modérée dure d'environ 24 à environ 48 heures, et de manière tout particulièrement préférée, environ 48 heures.

15 Selon un mode de réalisation préféré, les cellules sont placées en hypothermie sévère immédiatement après l'étape en hypothermie modérée.

Dans le procédé selon l'invention, les cellules peuvent être conservées en hypothermie sévère durant 1 à 15 jours, de préférence durant 5 à 10 jours.

20 Les cellules conservées par le procédé selon l'invention sont de préférence des cellules qui ont été prélevées sur un animal ou donneur, de préférence un mammifère, et de manière particulièrement préférée un humain. En particulier, ces cellules peuvent être destinées à être administrées ultérieurement à un receveur dans le cadre d'une transplantation.

25 Selon un mode de réalisation préféré, les cellules ne sont ni congelées ni soumises à des conditions d'hypothermie sévère avec d'être placées en hypothermie modérée. Les cellules sont de préférence placées en hypothermie modérée dans un délai d'au maximum 4 heures après leur prélèvement sur le donneur. De manière tout particulièrement préférée, les cellules sont placées en hypothermie modérée immédiatement après leur prélèvement, c'est-à-dire dans l'heure suivant le prélèvement.

30 Avant conservation, les cellules peuvent être soumises à différentes analyses telles que la sérologie, le typage HLA, et des examens phénotypiques, morphologiques (notamment dans le cas de cellules organisées en tissus ou organes) ou bactériologiques.

Comme démontré dans la partie expérimentale, l'étape préalable en hypothermie modérée suffit à améliorer la conservation des cellules. Cependant, selon certains modes préférés, cette étape est combinée à un ajustement des conditions atmosphériques de la culture afin de constituer une atmosphère hypoxique, hypercapnique ou
5 hypoxique/hypercapnique, de préférence une atmosphère hypoxique/hypercapnique.

Une atmosphère hypoxique est une atmosphère comprenant une concentration réduite en dioxygène par rapport à la concentration dans l'air qui est habituellement de 20 à 21%. Tel qu'utilisé ici, le terme d'« atmosphère hypoxique » se réfère à une atmosphère comprenant moins de 10% d'O₂. Ainsi, une atmosphère hypoxique peut
10 comprendre par exemple entre environ 0,5 et environ 10% d'O₂, c'est-à-dire environ 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10%. Selon certains modes de réalisation préférés, une atmosphère hypoxique comprend entre environ 1% et environ 5% d'O₂. De manière tout particulièrement préférée, l'atmosphère hypoxique comprend environ 5% d'O₂. Dans une
15 atmosphère hypoxique, la concentration en dioxyde de carbone correspond de préférence à celle de l'air ambiant, à savoir environ 0,05%. Le complément du mélange gazeux est en général composé de dioxyde d'azote.

Une atmosphère hypercapnique est une atmosphère comprenant une concentration en dioxyde de carbone augmentée par rapport à la concentration dans l'air qui est habituellement inférieure à 0,05%. Tel qu'utilisé ici, le terme d'« atmosphère
20 hypercapnique » se réfère de préférence à une atmosphère comprenant plus de 5% de CO₂. Ainsi, une atmosphère hypercapnique peut comprendre par exemple entre environ 5 et environ 20% de CO₂, c'est-à-dire environ 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20%. Selon certains modes de réalisation préférés, une atmosphère hypercapnique comprend entre environ 5% et environ 10% de CO₂. De manière tout
25 particulièrement préférée, l'atmosphère hypercapnique comprend environ 9% de CO₂. Dans une atmosphère hypercapnique, la concentration en dioxygène correspond de préférence à celle de l'air ambiant, à savoir environ 20-21%. Le complément du mélange gazeux est en général composé de dioxyde d'azote.

Une atmosphère hypoxique/hypercapnique est une atmosphère comprenant une
30 concentration réduite en dioxygène et une concentration augmentée en dioxyde de carbone par rapport aux concentrations habituelles dans l'air ambiant. De manière plus spécifique, tel qu'utilisé ici, le terme d'« atmosphère hypoxique/hypercapnique » se réfère à une atmosphère comprenant moins de 10% d'O₂ et plus de 5% de CO₂. Les

gammes de valeurs préférées en O₂ et CO₂ sont telles que définies ci-dessous pour les conditions hypoxique et hypercapnique. De manière particulièrement préférée, l'atmosphère hypoxique/hypercapnique comprend environ 5% d'O₂ et environ 9% de CO₂. Le complément du mélange gazeux est en général composé de dioxyde d'azote.

5 Chacun de ces mélanges gazeux particuliers peut être obtenu par des procédés bien connus de l'homme du métier, notamment au moyen de chambres d'incubation à atmosphère contrôlée disponibles auprès de nombreux fournisseurs.

Les cellules conservées par le procédé selon l'invention peuvent être toute cellule animale pour laquelle une conservation en hypothermie sévère est souhaitée.

10 De préférence, les cellules sont des cellules de mammifère, et de manière tout particulièrement préférée, des cellules humaines.

Selon un mode de réalisation préférée, les cellules sont des cellules destinées à être transplantées chez un receveur et sont de préférence issues d'un prélèvement chez un donneur. Le donneur et le receveur peuvent être le même individu (greffe autologue) ou
15 des individus différents (greffe allogénique).

Les cellules peuvent être des cellules isolées ou des cellules organisées en tissus ou organes.

Selon un mode de réalisation, les cellules conservées sont des cellules isolées. Ces cellules peuvent être sélectionnées par exemple dans le groupe constitué des cellules de
20 peau, de cartilage, des ostéocytes, des cellules endothéliales, des cellules musculaires, des cellules neurales, des cellules rétiniennes, des cellules pancréatiques, des cellules sanguines, ou des cellules souches ou cellules progénitrices capables de se différencier en ces cellules.

Les cellules souches peuvent être des cellules souches pluripotentes (capables de
25 se différencier en tous les types cellulaires d'un organisme) choisies parmi les cellules souches embryonnaires non humaines, les cellules progénitrices multipotentes adultes (ou MAPC) ou les cellules souches pluripotentes induites, des cellules souches multipotentes (capables de se différencier en types cellulaires de différents tissus) ou des cellules souches unipotentes (capables de se différencier en types cellulaires d'un seul tissu). Les
30 cellules progénitrices sont des cellules capables de se différencier en différents types cellulaires d'un seul tissu. Elles peuvent être oligopotentes (capables de se différencier en un petit nombre de types cellulaires, par exemples les cellules progénitrices CFU-GEMM), bipotentes (capables de se différencier en deux types cellulaires, par exemple

les cellules progénitrices CFU-GM) ou unipotentes (capables de se différencier en un seul type cellulaire, par exemple les cellules progénitrices CFU-G, CFU-M, CFU-MK, BFU-E et CFU-E). A la différence des cellules progénitrices, les cellules souches possèdent une réelle capacité d'auto-renouvellement et présente une capacité de prolifération
5 largement supérieure.

Dans un mode de réalisation, les cellules souches sont des cellules souches pluripotentes choisies parmi les cellules souches embryonnaires non humaines, les cellules progénitrices multipotentes adultes (ou MAPC) ou les cellules souches pluripotentes induites.

10 Les cellules souches embryonnaires sont dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste et ont la capacité de conduire à la formation de tous les tissus de l'organisme (mésoderme, endoderme, ectoderme), y compris aux cellules de la lignée germinale. La pluripotence des cellules souches embryonnaires peut être évaluée par la présence de marqueurs tels que les facteurs de transcription OCT4 et NANOG et les
15 marqueurs de surface comme SSEA3/4, Tra-1-60 et Tra-1-81. Les cellules souches embryonnaires peuvent être obtenues sans destruction de l'embryon dont elles sont issues par exemple à l'aide de la technique décrite par Chung et al. (2008). Les cellules souches embryonnaires sont des cellules souches embryonnaires non humaines. Les cellules conservées selon le procédé de l'invention ne sont pas des cellules souches embryonnaires
20 humaines.

Les cellules progénitrices multipotentes adultes peuvent, comme les cellules souches embryonnaires se différencier en cellules issues de n'importe lequel des trois feuillets embryonnaires et expriment les facteurs de transcription OCT4 et NANOG. Ces cellules peuvent être isolées à partir de différents organes, notamment à partir de la moelle
25 osseuse (Schwartz et al., 2002).

Les cellules souches pluripotentes induites sont des cellules pluripotentes obtenues par reprogrammation génétique de cellules somatiques différenciées. Outre leur morphologie et leur potentiel d'autorenouvellement et de pluripotence similaires à ceux des cellules souches embryonnaires, les CSPi présentent également une reprogrammation
30 épigénétique avec un profil global de méthylation des histones et d'expression des gènes très proche de celui des cellules souches embryonnaires. Ces cellules sont notamment positives pour les marqueurs de pluripotence, notamment la coloration à la phosphatase alcaline et l'expression des protéines NANOG, SOX2, OCT4 et SSEA3/4. Les procédés

permettant l'obtention des cellules souches pluripotentes induites sont bien connus de l'homme du métier et sont notamment décrits dans les articles de Yu, et al. (2007), Takahashi et al. (2007) et Nakagawa et al., (2008).

Dans un autre mode de réalisation, les cellules souches sont des cellules souches multipotentes. Des exemples non limitatifs de cellules souches multipotentes incluent les cellules souches hématopoïétiques capables de se différencier en cellules sanguines et immunes que sont les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes, en particulier les cellules souches hématopoïétiques exprimant l'antigène CD34, ou les cellules souches mésenchymateuses capables de se différencier en cellules cartilagineuses (chondrocytes), cellules osseuses (ostéoblastes) et cellules graisseuses (adipocytes). Les cellules souches hématopoïétiques CD34+ et les cellules souches mésenchymateuses peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse à l'aide de toute technique connue de l'homme du métier, par exemple à l'aide d'un système immuno-magnétique ou un système de filtration.

Dans un autre mode de réalisation, les cellules souches sont des cellules souches unipotentes. Des exemples non limitatifs de cellules souches unipotentes incluent des cellules souches de la peau, du foie et de la muqueuse intestinale.

Selon un mode de réalisation préférée, les cellules conservées sont ou contiennent des cellules souches, de préférence des cellules souches hématopoïétiques ou mésenchymateuses, ou une combinaison de celles-ci. De manière tout particulièrement préférée, les cellules conservées sont des cellules souches hématopoïétiques.

Dans certains modes de réalisation, les cellules conservées peuvent être organisées en tissus ou organes.

Des exemples non limitatifs de tissus pouvant être conservés selon le procédé de l'invention incluent la peau, la cornée, un tendon, un tissu osseux, un vaisseau sanguin, un nerf, une valve cardiaque, une membrane amniotique, un tissu cartilagineux, un îlot de Langerhans et un tissu musculaire.

Les organes conservés selon le procédé de l'invention peuvent être complets, par exemple un rein ou un foie complet, ou partiels, par exemple un foie partiel. Des exemples non limitatifs d'organes pouvant être conservés selon le procédé de l'invention incluent un rein, foie, cœur, cordon ombilical, placenta, intestin, poumon et pancréas.

Dans le procédé selon l'invention, les cellules, tissus ou organes peuvent être conservés dans tout milieu adapté, de préférence un milieu liquide. Il existe une multitude de milieux adaptés à la conservation des cellules, tissus ou organes. L'homme du métier

peut aisément choisir un milieu adapté en fonction du type de cellules, tissus ou organes à conserver. De tels milieux sont décrits par exemple dans les demandes internationales de brevet WO 2014/057220, WO 2014/120014, WO 2012/129538, WO 2011/159359, WO 06/052133, WO 97/33978 et WO 00/02572. De nombreux fournisseurs commercialisent également des milieux adaptés, tels que par exemple les milieux HP01 et HP02 de Macopharma, les milieux Stem alpha A et Stem alpha S3 de Stemcell ou le milieu Viaspan (ou « University of Wisconsin solution »).

Le milieu permet de préférence une survie des cellules sans pour autant stimuler leur prolifération.

L'un des avantages du procédé selon l'invention est que celui-ci ne requiert pas l'utilisation de cryoprotecteurs dans le milieu de conservation. Celui-ci peut être directement injectable, notamment dans le cas d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, ou nécessiter un lavage du greffon avant administration.

Dans le cas d'organes ou de tissus, ceux-ci peuvent être immergés dans un volume adapté de façon à être totalement recouverts.

Avant utilisation des cellules, notamment dans le cadre d'une transplantation, différents tests peuvent être menés afin de vérifier la qualité du greffon, par exemple la mesure de l'apoptose ou un test clonogénique des progéniteurs CFU-GM (Colony Forming Unit - Granulocyte Macrophage) ou CFC-GM (Colony Forming Cells - Granulocyte Macrophage) réalisé dans le cadre du contrôle de la qualité des greffons hématopoïétiques.

Dans un autre aspect, la présente demande concerne également une trousse.

Selon un premier mode de réalisation, celle-ci comprend

- un milieu de conservation cellulaire,
- un premier conteneur stérile destiné à recevoir des cellules, tissus ou organes et le milieu de conservation cellulaire, et
- un dispositif permettant de créer une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique dans le premier conteneur comprenant les cellules, tissus ou organes.

Optionnellement, le premier conteneur stérile peut être pré-rempli avec du milieu de conservation cellulaire.

Une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique peut être créée dans le premier conteneur après y avoir placé les cellules, tissus ou organes.

Selon un mode particulier de réalisation, ledit conteneur comprend une entrée et une sortie permettant les échanges gazeux et le dispositif permettant de créer une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique est utilisé pour injecter dans ledit conteneur l'atmosphère souhaitée. Ces entrée et sortie sont ensuite fermées pour maintenir les
5 cellules, tissus ou organes dans ladite atmosphère. Le dispositif permettant de créer une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique est de préférence un dispositif sous pression tel qu'une cartouche de gaz.

Selon un autre mode particulier de réalisation, le conteneur stérile comprenant les cellules, tissus ou organes peut être placé dans une chambre d'incubation à atmosphère
10 contrôlée permettant de créer une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique.

Selon un second mode de réalisation, la trousse peut comprendre un conteneur stérile destiné à recevoir des cellules, tissus ou organes et le milieu de conservation cellulaire renfermant une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique. Optionnellement,
15 ce conteneur stérile peut être pré-rempli avec du milieu de conservation cellulaire.

La trousse selon l'invention peut comprendre en outre un second conteneur permettant d'assurer le maintien du premier conteneur et/ou des cellules, tissus ou organes à une température contrôlée.

20 Ce second conteneur permet de maintenir les cellules, tissus ou organes en hypothermie modérée, de préférence immédiatement après le prélèvement. Ce même conteneur peut ensuite être utilisé pour placer les cellules, tissus ou organes en hypothermie sévère. Alternativement, les cellules, tissus ou organes peuvent être changés de conteneur lorsqu'ils sont placés en hypothermie sévère.

25 Le milieu de conservation cellulaire peut être tout milieu de conservation tel que décrit ci-dessous et adapté aux cellules, tissus ou organes à conserver.

La trousse selon l'invention est particulièrement adaptée au transport et à la préservation des cellules, tissus ou organes du donneur au receveur dans le cadre d'une transplantation.

30 Optionnellement, la trousse peut également comprendre d'autres récipients tels qu'un récipient destiné à recevoir l'échantillon sanguin du donneur afin de déterminer le groupe sanguin, ou un récipient destiné à recevoir un échantillon de rate ou de ganglions pour les typages HLA.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une trousse telle que décrite ci-dessous pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention.

- 5 Toutes les références citées dans cette description sont incorporées par référence dans la présente demande. D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants donnés à titre illustratif et non limitatif.

EXEMPLES

10 Exemple 1 : Cellules CD34+ de sang placentaire

Matériels et méthodes

- Après leur isolement par système immuno-magnétique, les cellules CD34+ ont été incubées pendant une nuit dans une culture à 37°C en milieu HP01 (Macopharma) en présence de Stem Cell Factor SCF (100 ng/ml), thrombopoïétine (20 ng/ml) et IL 3 (1
15 ng/ml) à une concentration de environ 10⁵ cellules par mL. Ce milieu assure une survie des cellules CD34+ sans stimuler leur prolifération. Cette culture a été partagée en 8 flacons non perméables au gaz (2 par condition atmosphérique : i) air (21%O₂, - 0.01% CO₂), ii) hypoxie/hypercapnie - HH- (9% CO₂, 5% O₂), iii) hypoxie (5% O₂, 0.001 CO₂), iv) hypercapnie (20%O₂ et 20% CO₂)). Tous les flacons sont placés 1 nuit
20 (environ 16h) à 37°C puis 1h en atmosphère modifiée suivant les conditions précédentes à 37°C. Un flacon par condition est mis directement à +4°C pendant 13 jours et l'autre à 30°C pendant 2 jours, puis à +4°C pendant 11 jours (13 jours au total). A la fin de cette période, les cellules ont été réchauffées à 37°C pendant 2h et évaluées en termes de
25 viabilité/apoptose par analyse de l'expression de l'annexine V et de la fixation d'iodure de propidium, ainsi que par le test fonctionnel de capacité de formation de colonies en culture semi-solide (Duchez et al., 2013).

Résultats

La figure 1 montre le rendement des cellules viables et non-atteintes par l'apoptose. Les résultats présentés sur cette figure démontrent que le placement direct en hypothermie sévère à +4°C et la conservation des cellules pendant 13 jours dans l'air mène à une perte de la totalité des cellules viables.

Si en revanche les suspensions ont été transférées directement à +4°C en atmosphère d'hypoxie/hypercapnie après 13 jours, environ 10% des cellules ont survécu. Cet effet positif d'hypoxie/hypercapnie est multiplié par 4 si les cellules sont pré-incubées pendant 2 jours en hypothermie modérée (30°C).

L'hypoxie seule associée à une pré-incubation à 30°C améliore la survie cellulaire de façon modérée alors qu'elle n'a pas un effet positif sans cette pré-incubation.

L'hypercapnie seule se montre bénéfique avec ou sans pré-incubation, mais l'effet avec pré-incubation en hypothermie modérée est 6 fois supérieur.

Des résultats tout à fait similaires ont été obtenus pour les progéniteurs clonogéniques dans les conditions étudiées (figure 2). Ces données montrent donc clairement que l'association de l'hypercapnie et de l'hypoxie avec une pré-incubation en hypothermie modérée améliore de façon spectaculaire la survie des cellules CD34+ ainsi que des progéniteurs clonogéniques du sang placentaire. La période observée (13 jours) est extrêmement longue et le niveau de survie des cellules et des progéniteurs (40 à 65%) dépasse toute attente.

Exemple 2 : Cellules mésenchymateuses

Matériels et méthodes

Dans cet exemple, et dans un souci de clarté, seules les cellules mésenchymateuses (CM) capables de former des colonies de cellules fibroblastoïdes adhérentes (CFU-F) ont été considérées.

Les cellules mésenchymateuses produites à partir de la moelle osseuse humaine (cellules retenues sur les filtres utilisés pour la filtration de moelle osseuse avant la greffe) préalablement congelées ont été décongelées et mises en culture (α MEM, 10% SVF, β FGF (1ng/ml), L-glutamine (2mM), 0,5% Penicilline-Streptomycine) à 37°C et 5% CO₂ dans 9 flacons et amplifiées jusqu'à confluence. Les flacons sont ensuite aérées à 37°C

de la façon suivante : i) air (21% O₂, - 0.01% CO₂), ii) hypoxie/hypercapnie - HH- (9% CO₂, 5% O₂), iii) hypoxie (5% O₂, 0.001 CO₂), iv) hypercapnie (20% O₂ et 20% CO₂) (deux flacons par condition ; le 9^{ème} flacon étant utilisé pour l'analyse de viabilité/apoptose et pour le test clonogénique avant conservation en hypothermie). Pour
 5 chaque condition, le premier flacon a été mis directement à +4°C et conservé pendant 5 jours à 4°C et le deuxième a été maintenu pendant 48 heures à 30°C puis pendant 3 jours à 4°C. Après 5 jours, les cellules ont été réchauffées pendant 2 heures à 37°C et analysées (viabilité/apoptose et capacité clonogénique par les cultures CFU-F, cf. exemple 1).

Résultats

10 Comme montré dans la figure 3, une période de 48h en hypothermie modérée améliore drastiquement la survie des cellules mésenchymateuses, même à l'air où la totalité des cellules est morte si elles sont incubées à +4°C pendant 5 jours.

L'hypoxie/hypercapnie améliore la survie des CM mises directement à + 4°C et cet effet est multiplié par 3 par un passage à 30°C.

15 Avec un passage en hypothermie modérée, l'hypoxie et l'hypercapnie chacune séparément assurent un maintien maximal des CM (aux alentours de 70%). Des résultats tout à fait similaires sont obtenus pour CSM (CFU-F) (figure 4).

Exemple 3 : Cellules de lignée FDCPmix

Matériels et méthodes

20 Les cellules FDCPmix sont amplifiées à 37°C et 5% de CO₂ en milieu RPMI supplémenté par 20% de sérum de cheval et 8% de milieu conditionné WEHI - source d'interleukine 3. Les cellules sont ensuite partagées dans deux flacons par condition dans les conditions suivantes : i) air (21% O₂, - 0.01% CO₂), ii) hypoxie/hypercapnie - HH- (9% CO₂, 5% O₂), iii) hypoxie (5% O₂, 0.001 CO₂), iv) hypercapnie (20% O₂ et 20%
 25 CO₂). Le protocole suivi est le même que pour les cellules mésenchymateuses dans l'exemple 2.

Résultats

Le maintien des cellules FDCPmix est médiocre dans l'air et en hypoxie/hypercapnie sans passage en hypothermie modérée (directement à +4°C).

En revanche, la combinaison hypoxie/hypercapnie ou hypercapnie seule avec
 5 passage en hypothermie modérée donne un très bon maintien avec environ 60% des cellules FDCPmix (figure 5).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chung et al. Cell Stem Cell. 2008 Feb 7 ; 2(2) : 113-7
- Duchez et al. Transfusion. 2013 Sep;53(9):2012-9.
- 10 Hechler et al. Ann Hematol, 1996 ; 72 :303-6
- Ivanovic et al. Transfusion. 2010 Jan;50(1):120-7.
- Jeanne et al. Transfusion. 2009 Aug;49(8):1738-46
- Nakagawa et al. Nat Biotechnol. 2008 Jan;26(1):101-6.
- Schwartz et al. J Clin Invest. 2002 May;109(10):1291-302.
- 15 Takahashi, et al. 2007. Cell 131 (5): 861–872
- Vlaski et al. J Cell Physiol. 2014, 229 :2153-2165
- Yu et al., 2007. Science 318 (5858): 1917–1920

REVENDEICATIONS

1. Procédé *in vitro* ou *ex vivo* de conservation de cellules animales en hypothermie sévère comprenant une étape consistant à maintenir lesdites cellules en hypothermie modérée et sous une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique durant environ 12 à environ 72
5 heures, avant de les conserver en hypothermie sévère.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel lesdites cellules animales sont des cellules humaines.
- 10 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel les cellules sont conservées en hypothermie sévère à une température comprise entre environ 1°C et environ 12°C.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les cellules sont conservées en hypothermie sévère à une température d'environ 4°C.
- 15 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les cellules sont maintenues en hypothermie modérée à une température comprise entre environ 20°C et environ 35°C.
- 20 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les cellules sont maintenues en hypothermie modérée à une température d'environ 30°C.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les cellules sont maintenues en hypothermie modérée et sous une atmosphère hypoxique et/ou
25 hypercapnique durant environ 24 à environ 48 heures.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les cellules sont maintenues en hypothermie modérée et sous une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique durant environ 48 heures.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'atmosphère hypoxique comprend environ 0,5 à environ 10 % de dioxygène.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel
5 l'atmosphère hypoxique comprend environ 5 % de dioxygène.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'atmosphère hypercapnique comprend environ 5 à environ 20 % de dioxyde de carbone
- 10 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'atmosphère hypercapnique comprend environ 9 % de dioxyde de carbone.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les
15 cellules sont maintenues en hypothermie modérée et sous une atmosphère hypoxique et hypercapnique.
14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les
cellules sont des cellules de peau, de cartilage, des ostéocytes, des cellules endothéliales,
des cellules musculaires, des cellules neurales, des cellules rétinienne, des cellules
20 pancréatiques, des cellules sanguines, ou des cellules souches ou progénitrices capables
de se différencier en ces cellules.
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les
cellules sont organisées en tissu ou organisées en organe complet ou partiel.
25
16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les
cellules sont organisées en tissu, ledit tissu étant sélectionné dans le groupe constitué de
la peau, la cornée, un tendon, un tissu osseux, un vaisseau sanguin, un nerf, une valve
cardiaque, une membrane amniotique, un tissu cartilagineux, un îlot de Langerhans et un
30 tissu musculaire.
17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les
cellules sont organisées en organe complet ou partiel, ledit organe complet ou partiel étant

sélectionné dans le groupe constitué du rein, foie, cœur, cordon ombilical, placenta, intestin, poumon et pancréas.

5 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les cellules sont des cellules souches hématopoïétiques, des cellules souches mésenchymateuses, ou une combinaison de celles-ci.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les cellules sont des cellules souches hématopoïétiques.

10

20. Utilisation d'une trousse pour conserver des cellules animales selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 19, ladite trousse comprenant un milieu de conservation cellulaire, un premier conteneur stérile destiné à recevoir des cellules, tissus ou organes et le milieu de conservation cellulaire, et un dispositif permettant de créer une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique dans le premier conteneur comprenant les
15 cellules, tissus ou organes, et optionnellement un second conteneur permettant d'assurer le maintien du premier conteneur et/ou des cellules, tissus ou organes à une température contrôlée.

20 21. Utilisation d'une trousse pour conserver des cellules animales selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 19, ladite trousse comprenant un conteneur stérile destiné à recevoir des cellules, tissus ou organes et le milieu de conservation cellulaire renfermant une atmosphère hypoxique et/ou hypercapnique, ledit conteneur stérile étant optionnellement pré-rempli avec du milieu de conservation cellulaire.

25

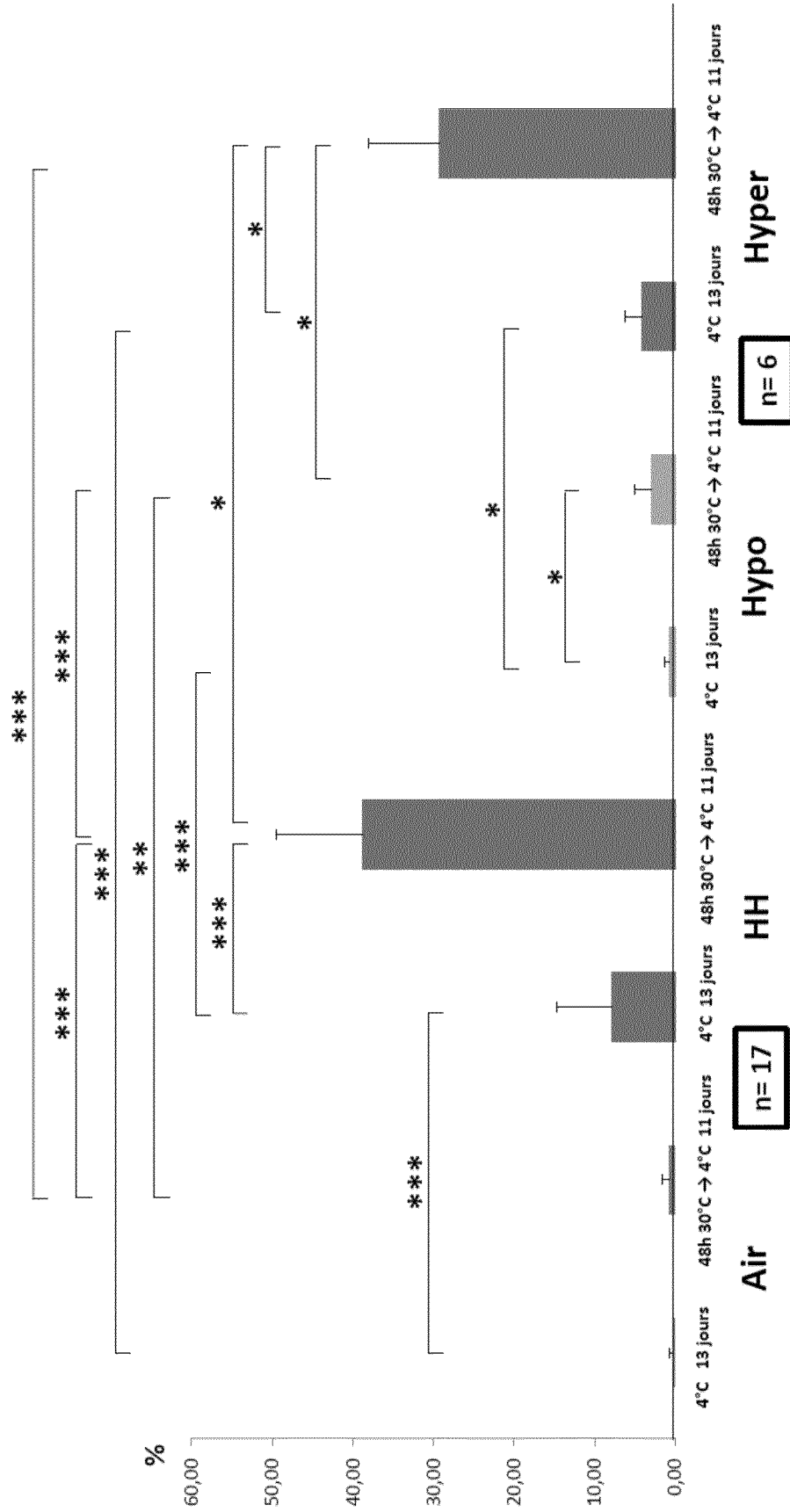


Figure 1

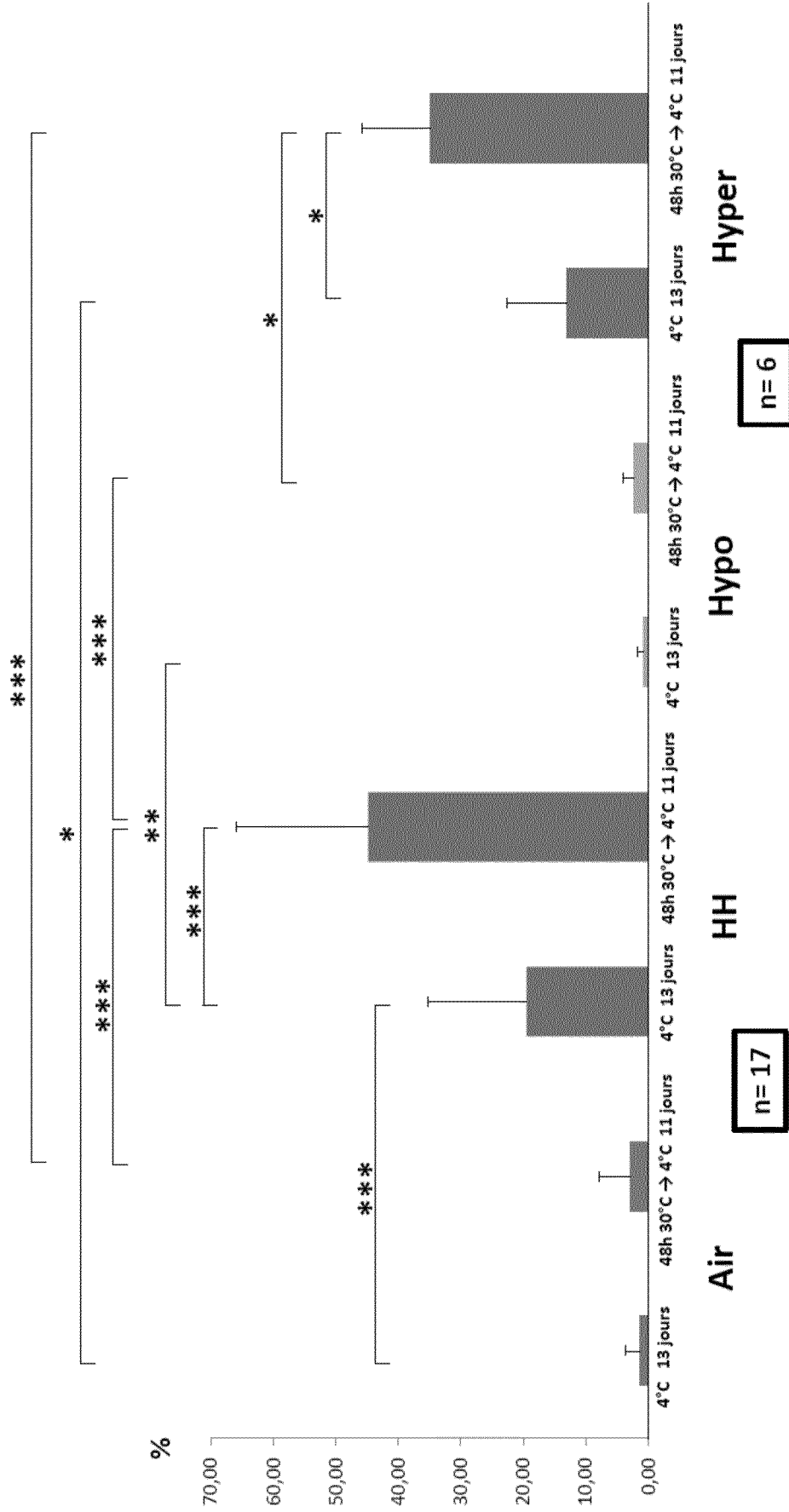


Figure 2

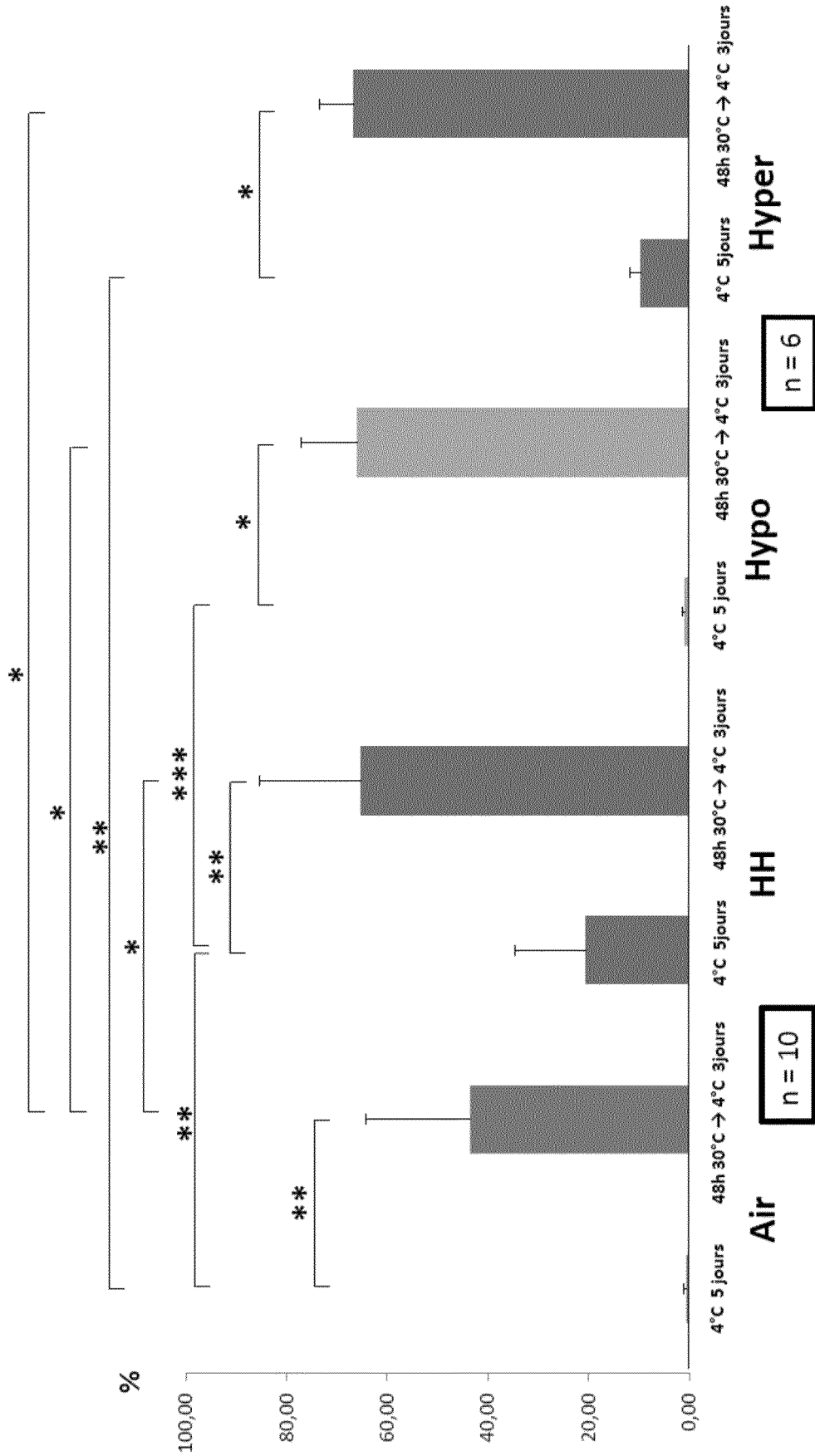


Figure 3

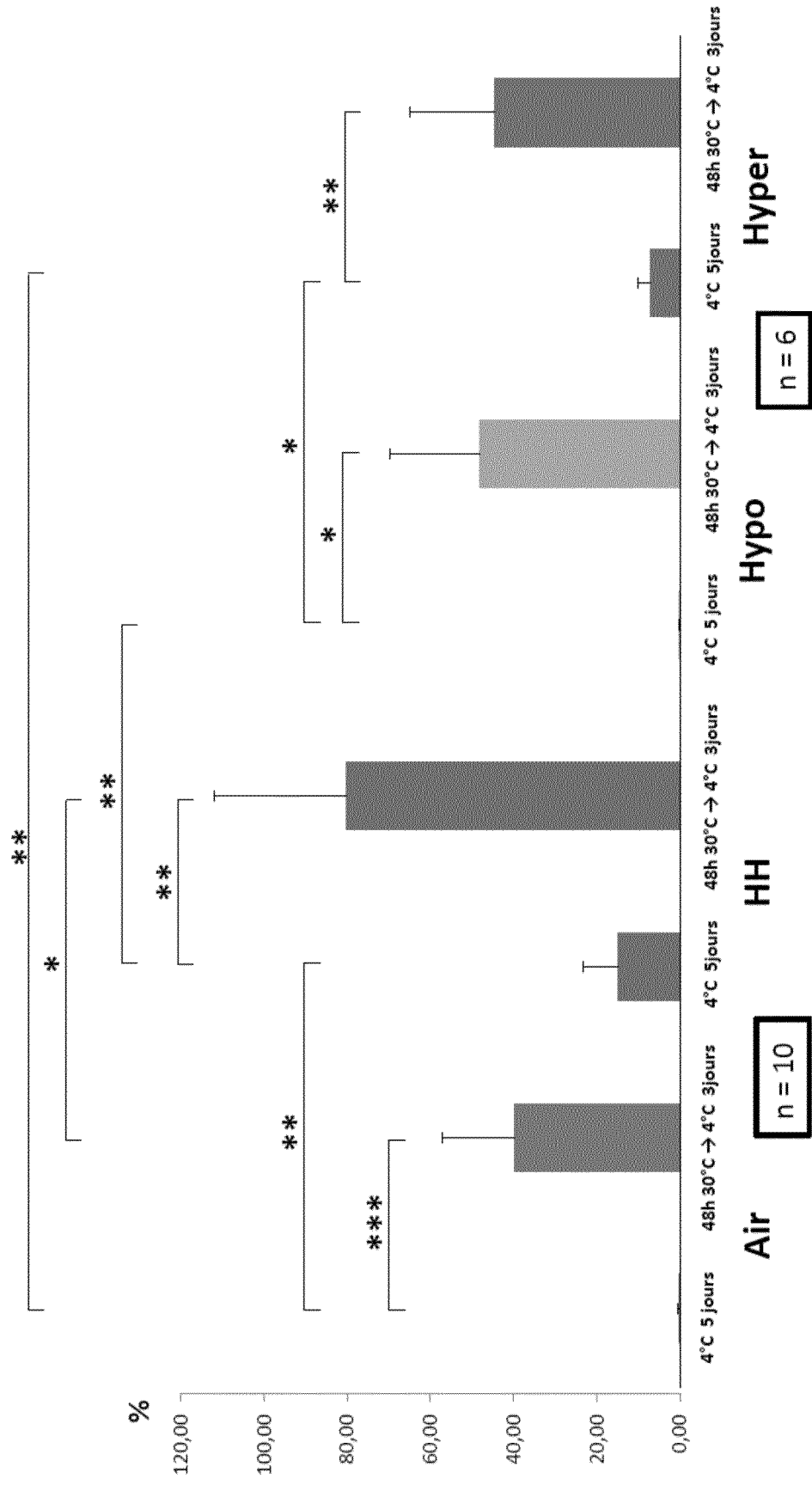


Figure 4

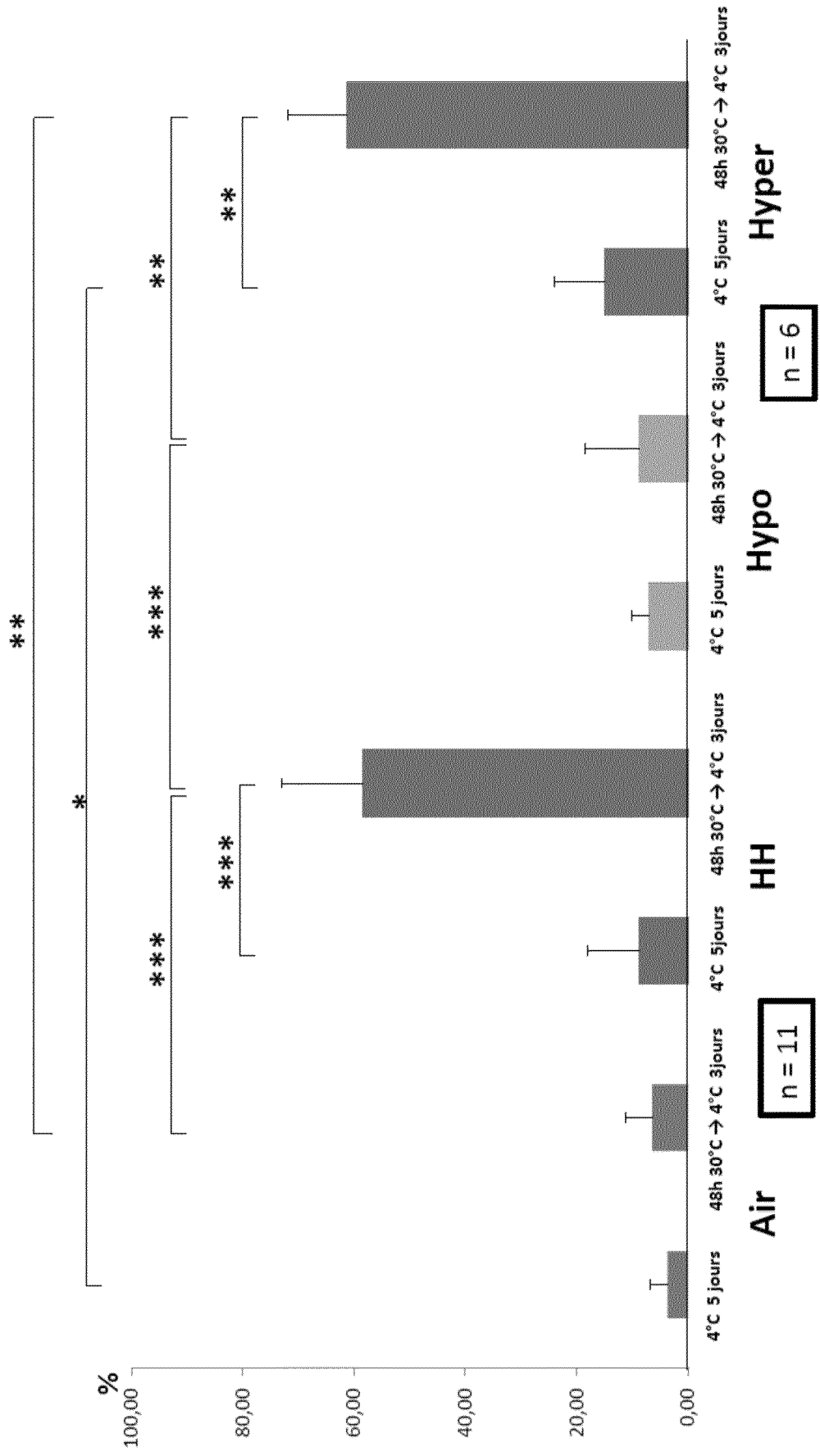


Figure 5

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

WO 2010/050073 A1 (DENTAL SUPPORT CO LTD [JP]; NON PROFIT ORGANIZATION JAPAN [JP]; CORAZO) 6 mai 2010 (2010-05-06)

US 2008/089947 A1 (KNOX CLAYTON D [US] ET AL) 17 avril 2008 (2008-04-17)

US 2012/244067 A1 (ROTH MARK B [US] ET AL) 27 septembre 2012 (2012-09-27)

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN
TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT