

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

11 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 112 558

21 N° d'enregistrement national : 20 07407

51 Int Cl⁸ : C 12 N 5/077 (2020.12), C 12 N 5/077, A 61 P 3/04,
3/00, A 61 K 35/35, G 01 N 33/50

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 15.07.20.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.01.22 Bulletin 22/03.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : Centre National de la Recherche Scientifique (EPST) — FR, Université Côte d'Azur (UCA) établissement public à caractère scientifique, culturel et professionnel expérimental — FR, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (EPST) — FR, CHU de Nice Etablissement Public Régional d'Hospitalisation — FR, Université Toulouse III - Paul Sabatier (EPSCP) — FR et Etablissement Français du Sang (EFS) Etablissement public de l'Etat — FR.

72 Inventeur(s) : DANI Christian, Jean, Lucien, DANI Vincent, CASTEILLA Louis, DOGLIO Alain, Pierre, Louis et LETERTRE Philippe.

73 Titulaire(s) : Centre National de la Recherche Scientifique (EPST), Université Côte d'Azur (UCA) établissement public à caractère scientifique, culturel et professionnel expérimental, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (EPST), CHU de Nice Etablissement Public Régional d'Hospitalisation, Université Toulouse III - Paul Sabatier (EPSCP), Etablissement Français du Sang (EFS) Etablissement public de l'Etat.

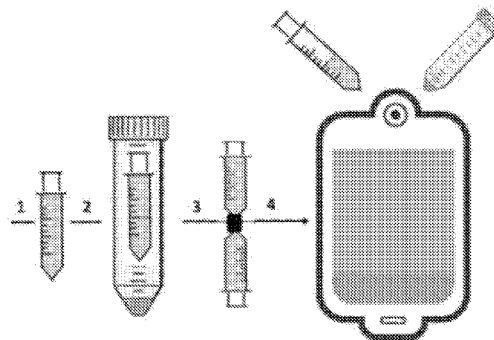
74 Mandataire(s) : MACQUET & ASSOCIES.

54 PROCEDE D'AMPLIFICATION IN VITRO OU EX VIVO DE CELLULES SOUCHES D'ADIPOCYTES BRUNS OU BEIGES.

57 PROCEDE D'AMPLIFICATION IN VITRO OU EX VIVO DE CELLULES SOUCHES D'ADIPOCYTES BRUNS OU BEIGES

La présente invention a pour objet un procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges. Ce procédé comprend les étapes suivantes : extraction, d'une part, d'une fraction stroma-vasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain brun ou beige, et d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain brun ou beige et du collagène ; mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire ; et culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension, dans un milieu de culture.

Figure de l'abrégé : Fig. 1A



FR 3 112 558 - A1



Description

Titre de l'invention : PROCÉDE D'AMPLIFICATION IN VITRO OU EX VIVO DE CELLULES SOUCHES D'ADIPOCYTES BRUNS OU BEIGES

Domaine technique de l'invention

[0001] La présente invention concerne un procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges à partir du tissu adipeux humain. Elle concerne en outre un procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges, une matrice extracellulaire, une composition comprenant un mélange d'une matrice extracellulaire et d'une fraction stroma-vasculaire, un kit comprenant cette composition, une utilisation de la matrice extracellulaire ou de la composition comprenant un mélange de la matrice extracellulaire et de la fraction stroma-vasculaire, des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges et des adipocytes bruns ou beiges, obtenus selon le procédé de l'invention pour leur utilisation.

Art antérieur

[0002] La thérapie cellulaire consiste en une greffe de cellules visant à restaurer les fonctions d'un tissu ou d'un organe lorsqu'elles sont altérées par un accident, une pathologie, le vieillissement et des désordres métaboliques. Elle permet de soigner durablement un patient grâce une injection de cellules dites « thérapeutiques ». Ces cellules sont obtenues, en particulier, à partir de cellules souches multipotentes provenant du patient lui-même.

[0003] On a envisagé d'améliorer la flexibilité métabolique et/ou de stimuler la dépense énergétique d'un patient en augmentant la masse de tissu adipeux brun/beige (TAB) chez ce patient. Il s'agit là d'une piste innovante destinée à lutter contre les maladies métaboliques, telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires et autres dysfonctions métaboliques. En effet, le tissu adipeux brun ou beige participe à la dissipation calorique de l'organisme, au contrôle du métabolisme rédox et il joue un rôle endocrine et paracrine régulateur au travers de la sécrétion d'hormones. Restaurer la fonction dite « TAB » chez ces patients représente donc une option thérapeutique attractive.

[0004] Toutefois, les thérapies cellulaires autologues mettant en œuvre les tissus adipeux bruns ou beiges n'existent pas en pratique, et ce, pour une raison principale qui est la quasi absence de source d'adipocytes bruns chez le patient adulte, plus particulièrement chez le patient obèse, pour une amplification ex vivo. En effet, au contraire du tissu adipeux blanc présent en abondance et surtout chez les patients obèses, le tissu adipeux brun ou beige est particulièrement rare chez l'homme adulte et même quasi-

inexistant chez les patients obèses, pour lesquels cette quasi-inexistence constitue un facteur aggravant, si ce n'est causal majeur, des dérèglements métaboliques notamment, mais non exclusivement, liés au surpoids.

- [0005] Dans ce contexte, il existe un besoin de réaliser des cultures d'adipocytes bruns ou beiges autologues et, par suite, de développer des méthodes d'amplification cellulaire permettant l'obtention de quantités importantes d'adipocytes bruns ou beiges de grade thérapeutique pour lutter contre les maladies métaboliques associées à l'obésité, telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires et autres dysfonctions métaboliques.
- [0006] La procédure standard, pour isoler et amplifier les précurseurs d'adipocytes à partir de prélèvements de tissu adipeux, passe par une dissociation enzymatique puis par leur expansion en deux dimensions (2D) par attachement au plastique de boîtes de culture. Cette procédure est coûteuse, longue, et nécessite de nombreuses manipulations qui augmentent les risques de contaminations. De plus, elle entraîne une destruction de la structure tridimensionnelle du tissu, ainsi que la perte de types cellulaires d'intérêts comme les cellules endothéliales qui jouent un rôle essentiel à la fois pour la vascularisation du greffon et la physiologie de l'adipocyte.
- [0007] La dissociation non-enzymatique du tissu adipeux apparaît comme une méthode alternative beaucoup moins coûteuse, plus rapide et qui présente des avantages incontestables pour la fabrication d'un produit conforme aux standards d'une production de grade thérapeutique (exposition réduite à des produits ou contaminants extérieurs). En revanche, les procédés de dissociation non-enzymatique présentés à ce jour ne sont pas satisfaisants car plusieurs études rapportent que le nombre de précurseurs d'adipocytes obtenu est faible comparé à la dissociation enzymatique. De plus, les adipocytes matures, la matrice extracellulaire ainsi que la structure tridimensionnelle du tissu adipeux sont toujours perdues à la fin du processus de dissociation, ainsi que les cellules endothéliales, après culture.
- [0008] Il a été proposé différentes matrices synthétiques pour yensemencer les précurseurs d'adipocytes et ainsi essayer de reconstituer au mieux la structure du tissu adipeux. Ces matrices seraient également utilisées pour orienter in vitro les précurseurs d'adipocytes vers un type cellulaire non adipeux, essentiellement osseux ou cartilagineux, avant implantation. Du tissu adipeux décellularisé a également été proposé pour augmenter la différenciation des précurseurs et mieux mimer la structure du tissu adipeux. La fabrication de ces types de matrices nécessite de nombreuses étapes faisant intervenir des réactions enzymatiques ou de longs traitements chimiques. De plus, le tissu décellularisé, par définition, perd ces cellules endogènes. Le tissu adipeux non décellularisé et enrichi en précurseurs d'adipocytes (préalablement isolés par dissociation enzymatique) suivi d'une amplification en 2D a été proposé récemment comme matrice pour une meilleure reconstruction osseuse. Le temps pour générer cette matrice

biologique est long, nécessite trois semaines de culture in vitro, et ne permet pas l'amplification des précurseurs d'adipocytes. Seul l'intérêt pour la réparation osseuse a été mis en avant par les auteurs.

[0009] La culture en suspension en trois dimensions (3D) représente une méthode alternative de choix à la méthode standard en 2D car elle permet essentiellement de conserver la structure et les qualités intrinsèques du tissu. Cet avantage est important car, par exemple, l'absence d'un modèle humain pertinent, qui mime au mieux in vitro le tissu adipeux, est une limitation majeure lors des essais de phases précliniques, pour la découverte de nouveaux médicaments efficaces pour lutter contre l'obésité et les maladies métaboliques associées comme le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. De plus, la culture 3D est réalisable en système clos, ce qui diminue les manipulations et les risques de contamination.

Résumé de l'invention

[0010] Compte tenu de ce qui précède, un problème technique que se propose de résoudre l'invention est d'obtenir in vitro ou ex vivo une grande quantité de cellules souches notamment d'adipocytes bruns ou beiges à partir du tissu adipeux blanc humain, de grade thérapeutique.

[0011] La solution de l'invention à ce problème technique a pour premier objet, un procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux humain, comprenant les étapes suivantes : extraction, d'une part, d'une fraction stroma-vasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain et, d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène, l'extraction de ladite matrice extracellulaire comprenant une étape de dissociation mécanique ; mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire ; et culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension, dans un milieu de prolifération cellulaire.

[0012] Ainsi, la culture en suspension de la fraction stroma-vasculaire, rendue possible grâce à la présence de la matrice extracellulaire, permet une amplification en 3D, donnant accès à un grand nombre de cellules dans un environnement du tissu adipeux natif et limitant ainsi les manipulations qui augmentent les risques de contaminations.

[0013] Avantagusement, - l'étape de dissociation mécanique est une étape de dissociation qui ne fait pas intervenir de collagénase ; - l'étape de dissociation mécanique est une étape de dissociation non-enzymatique ; - l'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : centrifugation du tissu

adipeux humain pour obtenir au moins deux fractions distinctes, une fraction A comprenant une matrice extracellulaire centrifugée, et la fraction stroma-vasculaire mécanique ; et dissociation mécanique de la fraction A pour obtenir la matrice extracellulaire ; - le procédé comporte en outre une étape d'élimination des cellules sanguines présentes dans la fraction stroma-vasculaire ; - le collagène de la matrice extracellulaire est du collagène structuré, qui présente une organisation fibrillaire ; - la culture du mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : transfert dudit mélange de manière stérile dans une poche de culture en suspension comprenant le milieu de prolifération ; amplification dudit mélange pour l'obtention d'un mélange amplifié comprenant des amas cellulaires ; - le mélange amplifié comprenant les amas cellulaires fait l'objet d'une dissociation mécanique pour l'obtention d'agrégats cellulaires ; - le milieu de prolifération comprend un sérum, un facteur de croissance de fibroblastes et un facteur de croissance ressemblant à l'insuline ; et – le procédé comporte en outre une étape de tri-cellulaire visant à trier les cellules souches exprimant le marqueur de surface DPP4.

[0014] Selon un second objet, l'invention concerne un procédé d'obtention *in vitro* ou *ex vivo* d'adipocytes bruns ou beiges comprenant les étapes suivantes : extraction, d'une part, d'une fraction stroma-vasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant, des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain et, d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène, l'extraction de ladite matrice extracellulaire comprenant une étape de dissociation mécanique ; mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire ; culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension, dans un milieu de prolifération cellulaire ; et induction d'une différenciation des cellules souches du tissu adipeux dans un milieu de différenciation pour obtenir des adipocytes bruns ou beiges.

[0015] Avantagement, - l'étape de dissociation mécanique est une étape de dissociation qui ne fait pas intervenir de collagénase ; - l'étape de dissociation mécanique est une étape de dissociation non-enzymatique ; - l'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : centrifugation du tissu adipeux humain pour obtenir au moins deux fractions distinctes, une fraction A comprenant une matrice extracellulaire centrifugée, et la fraction stroma-vasculaire mécanique ; et dissociation mécanique de la fraction A pour obtenir la matrice extracellulaire ; - le procédé comporte en outre une étape d'élimination des cellules sanguines présentes dans la fraction stroma-vasculaire ; - le collagène de la matrice extracellulaire est du collagène structuré, qui présente une organisation fibrillaire ; - la

culture du mélange de ladite fraction stroma-vasculaire mécanique et de ladite matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : transfert dudit mélange de manière stérile dans une poche de culture en suspension comprenant le milieu de prolifération ; amplification dudit mélange pour l'obtention d'un mélange amplifié comprenant des amas cellulaires ; - le mélange amplifié comprenant les amas cellulaires fait l'objet d'une dissociation mécanique pour l'obtention d'agrégats cellulaires ; et - le milieu de prolifération comprend un sérum, un facteur de croissance de fibroblastes et un facteur de croissance analogue à l'insuline ; et - le milieu de différenciation comprend de la Rosiglitazone et/ou du SB431542 et - le procédé comporte en outre une étape de tri-cellulaire visant à trier les cellules souches exprimant le marqueur de surface DPP4.

- [0016] Selon un troisième objet, l'invention concerne une matrice extracellulaire isolée susceptible d'être obtenue selon le procédé défini ci-dessus, comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux humain et du collagène.
- [0017] Selon un quatrième objet, l'invention concerne une composition comprenant un mélange de la matrice extracellulaire telle que ci-dessus et d'une fraction stroma-vasculaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux et des cellules souches du tissu adipeux humain.
- [0018] Selon un cinquième objet, l'invention concerne un kit comprenant la composition telle que définie ci-dessus, un milieu de prolifération cellulaire et un milieu de différenciation.
- [0019] Selon un sixième objet, l'invention concerne l'utilisation de la matrice extracellulaire telle que définie ci-dessus ou de la composition telle que définie ci-dessus pour le criblage et/ou la caractérisation d'actifs pharmacologiques.
- [0020] Selon un septième objet, l'invention concerne des adipocytes bruns ou beiges issus d'une composition telle que ci-dessus, pour leur utilisation en thérapie cellulaire, ou pour le traitement de désordres métaboliques.
- [0021] Selon un huitième objet, l'invention concerne des adipocytes bruns ou beiges issus d'une composition telle que ci-dessus, pour le traitement de l'obésité.
- [0022] Selon un neuvième objet, l'invention concerne un milieu de différenciation pour la différenciation de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges en adipocytes bruns ou beiges, comprenant un milieu de croissance de cellules endothéliales supplémenté en sérum, en facteurs de croissance, en rosiglitazone et en SB431542 et, préférentiellement, en sérum fœtal de veau, en facteurs de croissance de fibroblastes, en facteurs de croissance ressemblant à l'insuline, en facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire, en acide ascorbique, en rosiglitazone, en T3, en insuline, et en SB431542.

Brève description des Figures

- [0023] L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description non limitative qui suit, rédigée au regard des dessins annexés, dans lesquels :
- [0024] [fig.1A] - la [fig.1A] représente schématiquement les étapes nécessaires et suffisantes pour l'extraction d'une matrice extracellulaire et d'une fraction stroma-vasculaire (étapes 1 à 3), et leur mise en coculture (étape 4), selon l'invention ;
- [0025] [fig.1B] - la [fig.1B] est une représentation schématique plus détaillée de la méthode qui permet l'extraction séquentielle de matrices extracellulaires (M1-M4) et de populations de cellules (C1-C3) de fraction stroma-vasculaire (étapes 1 à 5), et de leur mise en coculture (étape 6), selon l'invention ;
- [0026] [fig.1C] - la [fig.1C] est une illustration de produits selon l'invention, à savoir le produit dénommé ExAdEx-tissue, qui est issu de l'amplification du mélange de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire, et le produit dénommé ExAdEx-lobules, qui est issu de la formation d'agrégats, conformément à une étape additionnelle du procédé selon l'invention ;
- [0027] [fig.1D] - la [fig.1D] illustre les étapes d'obtention du produit ExAdEx-lobules à partir du produit ExAdEx-tissue selon le procédé de l'invention ;
- [0028] [fig.2A][fig.2B][fig.2C][fig.2D][fig.2E][fig.2F][fig.2G][fig.2H][fig.2I][fig.2J][fig.2K] - les Figs. 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H, 2I, 2J et 2K sont des graphes qui comparent, respectivement, les quantités exprimées, en PCR quantitative, des gènes suivants listés ci-après dans les produits ExAdEx-lobules et ExAdEx-tissue : FABP4, PLIN1, Adiponectine, CD31, DPP4, ICAM1, PDGFR α , InhibineA, MSCA1, IL1b(M1), MRC1(M2) ;
- [0029] [fig.3A][fig.3B][fig.3C][fig.3D][fig.3E][fig.3F][fig.3G][fig.3H] - les Figs 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G et 3H sont des photographies, obtenues par imagerie confocale, des produits ExAdEx-lobules, mettant en évidence, par marquage immuno-fluorescent, dans lesdits produits, respectivement le collagène I, le collagène IV, la fibronectine, la laminine, l'élastine, DPP4, ICAM1 et CD31 ;
- [0030] [fig.4A][fig.4B][fig.4C] - les Figs. 4A, 4B et 4C sont des figures représentatives de la présence, respectivement, du marqueur d'hypoxie CA9, dans les cellules souches adipocytaires humaines pour cinq milieux de prolifération différents testés selon le procédé de l'invention et PLIN1 et UCP1 dans les cellules souches différenciées, pour cinq milieux de prolifération différents enrichis en facteurs de différenciation testés selon le procédé de l'invention ;
- [0031] [fig.5A][fig.5B][fig.5C] - les Figs. 5A, 5B et 5C sont des images de microscopie optique qui montrent, respectivement, que le milieu de différenciation permet une différenciation en adipocytes ([fig.5A]), qu'il est toxique pour les cellules endothéliales en

- présence de dexaméthasone et de l'IBMX ([fig.5B]), mais qu'il ne l'est pas, lorsqu'on retire ces composés dudit milieu ([fig.5C]) ;
- [0032] [fig.6A][fig.6B] - les Figs. 6A et 6B sont des figures qui illustrent l'expression de PLIN1 et de UCP1 dans différents milieux de différenciation selon l'invention ;
- [0033] [fig.7A][fig.7B][fig.7C] - les Figs. 7A, 7B et 7C présentent des images de microscopie à fluorescence qui permettent de visualiser les cellules endothéliales et différentes populations de cellules souches du tissu adipeux selon la présence du marqueur CD31 ([fig.7A]), DPP4 ([fig.7B]) et ICAM1([fig.7C]) dans le tissu adipeux avant la mise en œuvre du procédé selon l'invention (photographies de gauche), après 20 jours dans le milieu de prolifération (photographies du centre) et après 20 jours dans le milieu de prolifération puis 20 jours dans le milieu de différenciation, sauf pour ICAM1 (photographies de droite sauf pour ICAM1) ;
- [0034] [fig.8A][fig.8B] - les Figs. 8A et 8B présentent des images de microscopie à fluorescence avec marquage, par des anticorps couplés à des fluorochromes, des protéines DPP4 et ICAM1 dans les fractions stroma-vasculaire et la matrice extracellulaire formant la fraction dite « Endostem » sur ces figures, avant mélange selon le procédé selon l'invention ;
- [0035] [fig.9A] – la [fig.9A] montre, par microscopie à fluorescence, que la matrice M2 est de type riche en collagène ; collagène marqué au PicroSirius Red (gris clair) et marquage des noyaux (blanc) ;
- [0036] [fig.9B] - la [fig.9B] montre, par microscopie à fluorescence, que la matrice M3 est de type fibreux ; collagène marqué au PicroSirius Red (gris clair et fibres blanches) et marquage des noyaux (blanc) ;
- [0037] [fig.9C] - la [fig.9C] caractérise, en microscopie, le type fibreux de la matrice M1 ;
- [0038] [fig.9D] – la [fig.9D] montre, par microscopie, que la matrice M2 est hétérogène en termes de types matricielles : type fibreux et type riche en collagène ;
- [0039] [fig.9E] – la [fig.9E] est une image de microscopie illustrant le type fibreux de la matrice M3 ;
- [0040] [fig.10A] – la [fig.10A] est une photographie du tissu adipeux centrifugé de la fraction A après dissociation mécanique contenant la matrice M4 ;
- [0041] [fig.10B] – la [fig.10B] met en évidence par microscopie en fluorescence, dans la matrice M4, des adipocytes matures par coloration Oil red O (gris clair) et une matrice riche en collagène par marquage du collagène de type I (gris très clair) ;
- [0042] [fig.10C] – la [fig.10C] montre, par l'immunomarquage CD31, les structures capillaires formées par des cellules endothéliales CD31+ (blanc) dans la matrice M4 ; marquage des noyaux (gris foncé) ;
- [0043] [fig.10D] – la [fig.10D] illustre la présence du réseau de cellules souches du tissu adipeux PDGFRa+ (points gris clair) dans la matrice M4 ; marquage des noyaux (gris

foncé) ;

- [0044] [fig.11] – la [fig.11] montre, par incorporation d'Edu, 5-ethylnyl-2'-deoxyuridine, dans le noyau des cellules en prolifération, que les cellules endogènes, dans la matrice extracellulaire de l'invention sont maintenues en prolifération dans le milieu EGM+™ en suspension ; noyaux (gris foncé), cellules en prolifération (blanc) auto-fluorescence de la matrice (gris clair) ;
- [0045] [fig.12] – la [fig.12] montre que des cellules souches du tissu adipeux exogènes, mises en coculture avec la matrice extracellulaire de l'invention, forment des structures composées de ces cellules souches du tissu adipeux et des cellules endogènes présentent dans la matrice ; image prise après 3 jours de coculture, noyaux (gris foncé), collagène (gris clair), cellules souches exogènes du tissu adipeux (gris clair/blanc) ;
- [0046] [fig.13A] – la [fig.13A] montre l'absence de prolifération de cellules lors de la culture cellulaire des cellules souches du tissu adipeux et des cellules endothéliales en suspension sans matrice extracellulaire, issue de la fraction stroma vasculaire ; image prise après 10j de co-culture ; noyaux (gris foncé), noyaux de cellules en prolifération (gris très clair) ;
- [0047] [fig.13B] – la [fig.13B] met en évidence une capacité de prolifération des cellules de la fraction stroma-vasculaire, en suspension, avec la matrice extracellulaire de l'invention ; image prise après 10j de co-culture ; noyaux (gris foncé), matrice collagène (gris clair), noyaux de cellules en prolifération par marquage Edu (blanc) ;
- [0048] [fig.14A] – la [fig.14A] montre le niveau d'expression du marqueur de cellules endothéliales CD31 dans des populations cellulaires différenciées obtenues par culture, en suspension, avec (droite) et sans (gauche) la matrice extracellulaire de l'invention ;
- [0049] [fig.14B] - la [fig.14B] montre le niveau d'expression du marqueur de cellules souches adipocytaires PDGFRa dans les populations cellulaires différenciées obtenues par culture, en suspension, avec (droite) et sans (gauche) la matrice extracellulaire de l'invention ;
- [0050] [fig.14C] - la [fig.14C] montre le niveau d'expression du marqueur d'adipocytes matures PLIN1 dans les populations cellulaires différenciées obtenues par culture, en suspension, avec (droite) et sans (gauche) la matrice extracellulaire de l'invention ;
- [0051] [fig.14D] - la [fig.14D] montre le niveau d'expression du marqueur d'adipocytes matures Adiponectine dans les populations cellulaires différenciées obtenues par culture, en suspension, avec (droite) et sans (gauche) la matrice extracellulaire de l'invention ;
- [0052] [fig.15A][fig.15B] - les Figs. 15A et 15B sont des images qui mettent en évidence l'activation des capacités de prolifération du procédé selon l'invention. En [fig.15A], un tissu adipeux non dissocié ne montre pas de cellules en prolifération. En [fig.15B], la composition montre des cellules en prolifération, les noyaux des cellules en proli-

fération étant représentés en blanc sur cette Fig. ;

- [0053] [fig.16A][fig.16B][fig.16C][fig.16D][fig.16E][fig.16F] - les Figs. 16A, 16B, 16C, 16D, 16E et 16F sont des images dans lesquelles les cellules en prolifération, qui sont contenues dans la matrice dite Endostem, sont marquées, en l'absence de la fraction stroma-vasculaire (Figs. 16A, 16C, 16E) et avec l'ajout de cette fraction stroma-vasculaire (Figs. 16B, 16D, 16F) après 20 jours de culture dans le milieu de prolifération ;
- [0054] [fig.17A][fig.17B][fig.17C][fig.17D][fig.17E][fig.17F] - les Figs. 17A, 17B, 17C, 17D, 17E et 17F illustrent l'expression de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), qui est concentrée dans la fraction stroma vasculaire isolée, et l'expression de ICAM1 et CD31, qui est concentrée dans la matrice isolée (Figs. 17A, 17C, 17E), et l'expression de DPP4, ICAM1 et CD31 dans la composition amplifiée (Figs. 17B, 17D, 17F) ;
- [0055] [fig.18] - la [fig.18] est composée de quatre photographies qui illustrent la capacité de prolifération des cellules (EdU positives) qui présentent le marqueur DPP4 au sein de la matrice extracellulaire du tissu adipeux dans le procédé selon l'invention ;
- [0056] [fig.19] - la [fig.19] est composée de photographies qui illustrent la capacité de différenciation en adipocytes bruns ou beiges des populations cellulaires présentent le marqueur DPP4 (trois photographies du haut de la figure) ou qui ne présentent pas ce marqueur DPP4 (trois photographies du bas) ;
- [0057] [fig.20A][fig.20B] - les Figs. 20A et 20B sont des graphes qui illustrent la capacité de différenciation en adipocytes bruns ou beiges des populations cellulaires, exprimant DPP4 ou pas, obtenues en PCR quantitative, en temps réel du marqueur PLIN1 ([fig.20A]) et du marqueur UCP1 ([fig.20B]) ;
- [0058] [fig.21A][fig.21B] - les Figs. 21A et 21B illustrent la présence de macrophages de type M1 et de type M2 respectivement, dans la composition amplifiée selon l'invention ; et
- [0059] [fig.22] - la [fig.22] comprend un ensemble de photographies qui démontrent la présence de certaines protéines dans la matrice extracellulaire selon l'invention, et la conservation d'un réseau capillaire ;
- [0060] [fig.23] - la [fig.23] montre l'expression relative de l'UCP1 humain, au jour J0, soit avant transplantation du produit ExAdeX-tissue amplifié et au jour J21, dans le produit ExAdeX-tissue, après transplantation chez la souris ; et
- [0061] [fig.24] - la [fig.24] montre trois photographies de microscopie a fluorescence, la photographie de gauche montrant l'absence d'adipocytes bruns/beiges dans le tissu adipeux blanc avant la mise en œuvre du procédé de l'invention, la photographie du centre montrant la présence d'adipocytes bruns/beiges, spécifiquement marqués en gris clair par l'expression, chez un individu en surpoids, de la protéine UCP1, ex vivo après le procédé d'amplification et de différenciation chez un patient ne présentant pas de

surpoids, et la photographie de droite montrant la présence d'adipocytes bruns/beiges ex vivo, après la mise en œuvre de l'invention, chez un patient, avec une obésité sévère.

Description détaillée de l'invention

- [0062] Le tissu adipeux est fourni pour réaliser l'invention. Il s'agit en pratique de tissu adipeux par exemple blanc provenant d'individus, par exemple, mais non exclusivement, d'individus en surpoids, notamment obèses et/ou présentant des désordres métaboliques tels que le diabète de type 2 et des maladies cardio-vasculaires.
- [0063] L'invention a pour premier objet, un procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges à partir du tissu adipeux, par exemple blanc, humain comprenant les étapes suivantes : extraction, d'une part, d'une fraction stroma-vasculaire ([fig.1A], étapes 1-2 et [fig.1B], étapes 1-3 et étape 5) dite mécanique d'un tissu adipeux humain comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain et, d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain([fig.1A], étape 3 et [fig.1B], étape 4), ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène, l'extraction de ladite matrice extracellulaire comprenant une étape de dissociation mécanique ([fig.1A], étape 3 et [fig.1B], étape 4) ; mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire ([fig.1A], étape 4 et [fig.1B], étape 6) ; et culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension, dans un milieu de culture, à savoir de prolifération cellulaire. Ce procédé est également dénommé, ci-après, « procédé ExAdEx » (pour Ex vivo Adipocytes Expansion).
- [0064] Au sens de la présente invention, il est entendu par « fraction stroma-vasculaire » les cellules présentes dans un prélèvement de tissu adipeux humain. Cette fraction stroma-vasculaire comprend des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain.
- [0065] Au sens de l'invention, il est entendu par « matrice extracellulaire » une matrice bioactive, c'est à dire une matrice qui comprend différentes protéines du tissu adipeux ([fig.22]) et des cellules endogènes, comprenant notamment des cellules endothéliales ([fig.10C]), des cellules souches du tissu adipeux ([fig.10D]), des adipocytes et des macrophages. La [fig.11] montre la présence de cellules en prolifération dans la matrice extracellulaire (marquage Edu en blanc). Cette matrice extracellulaire permet l'amplification cellulaire en 3D, c'est-à-dire la prolifération des cellules en trois dimensions. La matrice extracellulaire de l'invention est également notée ci-après « EndoStem-Matrix » ou « matrice EndoStem ».

- [0066] Les protéines de la matrice extracellulaire du tissu adipeux comprennent du collagène. Ce collagène est structuré. Il présente une organisation fibrillaire. Il s'agit notamment de collagène de type I et de type III (voir les Figs. 9A et 9B montrant des fibres de collagène fibrillaire marqué par le PicroSirius Red et la [fig.10B] qui montre le collagène de type I marqué par un anticorps anti-collagène I et observé par microscopie confocale). Les protéines de la matrice extracellulaire du tissu adipeux comprennent en outre notamment de la fibronectine, de l'élastine, de la laminine et du collagène de type IV ([fig.22]).
- [0067] L'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation non-enzymatique, en particulier l'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation mécanique. La « dissociation mécanique » de l'invention permet de conserver intacte la structure de la matrice extracellulaire tandis qu'une digestion enzymatique fait généralement intervenir de la collagénase qui la digère. La dissociation mécanique permet ainsi le maintien de la « vasculature », ainsi que cela est montré à la [fig.7A], dans laquelle apparaît le réseau vasculaire avant dissociation dans le tissu adipeux humain dans la photographie de gauche et le réseau vasculaire après dissociation et amplification dans la photographie du milieu. Cette dissociation mécanique permet en outre le maintien de la microstructure de la matrice extracellulaire, qui présente en conséquence une organisation semblable à l'organisation du tissu adipeux in vivo.
- [0068] L'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : centrifugation du tissu adipeux humain pour obtenir au moins deux fractions distinctes, une fraction A comprenant une matrice extracellulaire centrifugée, et la fraction stroma-vasculaire ; et dissociation mécanique de la fraction A pour obtenir la matrice extracellulaire ([fig.1A]).
- [0069] L'étape de centrifugation du tissu adipeux humain permet en outre d'éliminer de l'huile, du sang et du liquide anesthésique contenus dans le tissu adipeux humain fourni. Cette étape permet également d'éliminer du liquide physiologique issu de lavages préalables du tissu adipeux humain fourni.
- [0070] Dans un mode de réalisation particulier, l'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : centrifugation du tissu adipeux humain pour obtenir au moins deux fractions distinctes, une fraction A comprenant une matrice extracellulaire centrifugée et une fraction B comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain ; dissociation mécanique de la fraction A pour obtenir une fraction A' comprenant une matrice extracellulaire dissociée ; centrifugation de la fraction A' pour obtenir au moins la matrice extracellulaire et une fraction B' comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et

des cellules souches du tissu adipeux humain; et mélange des fractions B et B' pour obtenir la fraction stroma-vasculaire mécanique ([fig.1B]).

- [0071] Dans ce mode de réalisation, l'étape de centrifugation du tissu adipeux humain permet en outre d'éliminer de l'huile, du sang et du liquide anesthésique contenus dans le tissu adipeux humain fourni. Cette étape permet également d'éliminer du liquide physiologique issu de lavages préalables du tissu adipeux humain fourni. La centrifugation de la fraction A' permet en outre d'éliminer d'éventuels résidus d'huile et de liquide physiologique. Cette étape de centrifugation de la fraction A' est optionnelle.
- [0072] Dans un mode de réalisation particulier, le procédé selon l'invention comporte en outre une étape d'élimination des cellules sanguines. Il s'agit d'une élimination des cellules sanguines de type érythrocytes, présentes dans le tissu adipeux et dans les différents culots cellulaires, nommées SVF mécanique, obtenus lors des étapes précitées du procédé de dissociation mécanique dit ExAdEx. Il est réalisé lors d'une incubation du tissu adipeux et/ou des culots cellulaires dans un tampon de lyse 1X comprenant du chlorure d'ammonium (« Amonium chlorure lysing solution », Becton Dickinson™) dilué dans de l'eau stérilisée, dans un rapport tampon : échantillon, variant de 1:1 à 1:10, à une température comprise entre 4 et 37°C et durant un temps d'incubation variant de 5 minutes à 30 minutes. Cette étape permet la lyse des érythrocytes, tout en maintenant la viabilité et les capacités de prolifération des cellules souches du tissu adipeux et des cellules endothéliales et de différenciation en adipocytes des cellules souches du tissu adipeux.
- [0073] La culture du mélange de la fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : transfert dudit mélange de manière stérile dans une poche de culture en suspension comprenant du milieu de prolifération ; et amplification dudit mélange formant des amas cellulaires.
- [0074] Le transfert de « manière stérile », au sens de l'invention, est un transfert, de préférence, réalisé en système clos. Ce transfert de manière stérile permet de d'éviter la présence de contaminants lors de la culture cellulaire. La dissociation mécanique des amas cellulaires formés au cours de l'amplification ne nécessite pas d'ouverture du système, évitant ainsi l'exposition des produits cellulaires à une contamination de la culture par les éléments de l'environnement.
- [0075] Dans un mode de réalisation, le milieu de prolifération, dans la poche de culture en suspension, est un milieu EGM+™. Ce milieu de prolifération comprend le milieu de base pour la prolifération des cellules endothéliales (EGM) enrichi en Epidermal Growth Factor (EGF), Basic Growth Factor (FGF2), Insulin-like Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor 165, acide ascorbique, héparine et hydrocortisone (EGM+). Le milieu EGM+ permet également l'amplification des cellules souches adipocytaires sans altérer leur capacité de différenciation en adipocytes.

- [0076] Le procédé de l'invention permet une amplification du nombre de cellules souches du tissu adipeux avec un facteur d'amplification supérieur à 10, avantageusement supérieur à 20, en particulier supérieur à 30, de préférence supérieur à 35. Le facteur d'amplification est le rapport entre le nombre de cellules obtenues après culture de la SVF isolée en présence de ladite matrice extracellulaire et le nombre de cellules avant l'invention. Dans un mode de réalisation particulier décrit dans l'exemple 2, le procédé de l'invention présente un facteur d'amplification de 36 en 8 jours.
- [0077] Selon un second objet, l'invention concerne un procédé d'amplification in vitro ou ex vivo des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges comprenant les étapes suivantes : amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches du tissu adipeux humain telle que définie ci-dessus ; et induction d'une différenciation des cellules souches du tissu adipeux pour obtenir des adipocytes bruns ou beiges.
- [0078] Plus précisément, le procédé d'amplification in vitro ou ex vivo des adipocytes bruns ou beiges comprend donc les étapes suivantes : extraction, d'une part, d'une fraction stroma-vasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant, des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain et, d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène ; mélange de ladite fraction stroma-vasculaire mécanique et de ladite matrice extracellulaire ; culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension, dans un milieu de prolifération cellulaire ; et induction d'une différenciation des cellules souches du tissu adipeux pour obtenir des adipocytes bruns ou beiges.
- [0079] Le procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules différenciées comprenant les étapes liées à l'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches du tissu adipeux, les précisions données ci-dessus pour le procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches du tissu adipeux s'appliquent également pour le procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules différenciées.
- [0080] En particulier, l'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation non-enzymatique, en particulier l'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation mécanique.
- [0081] Dans un mode de réalisation, l'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : centrifugation du tissu adipeux humain pour obtenir au moins deux fractions distinctes, une fraction A comprenant une matrice extracellulaire centrifugée, et la fraction stroma-vasculaire ; et dissociation mécanique de la fraction A pour obtenir la matrice extracellulaire.
- [0082] Dans un autre mode de réalisation, l'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : centrifugation du tissu

adipeux humain pour obtenir au moins deux fractions distinctes, une fraction A comprenant une matrice extracellulaire centrifugée et une fraction B comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain ; dissociation mécanique de la fraction A pour obtenir une fraction A' comprenant une matrice extracellulaire dissociée ; centrifugation de la fraction A' pour obtenir au moins la matrice extracellulaire et une fraction B' comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain ; et mélange des fractions B et B' pour obtenir la fraction stroma-vasculaire.

- [0083] Le collagène de la matrice extracellulaire comprend du collagène de type I et du collagène de type III révélé par coloration au Picrosirius Red (voir [fig.9A] et [fig.9B]).
- [0084] Dans un mode de réalisation particulier du procédé selon l'invention, ledit procédé comporte en outre une étape de tri-cellulaire visant à trier les cellules souches exprimant le marqueur de surface DPP4, aussi appelé CD26. Une variante possible consiste à sélectionner/trier les cellules exprimant CD26/DPP4, principalement avant le procédé dit ExAdEx, après mélange de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire, mais avant culture dudit mélange, en suspension, dans le milieu de prolifération cellulaire. Les objectifs sont notamment d'enrichir le produit utilisé en cellules précurseurs d'adipocytes bruns ou beiges et, d'autre part, d'homogénéiser et de standardiser la composition du produit cellulaire à amplifier.
- [0085] En effet, un tri des cellules souches du tissu adipeux humain trié selon la présence du marqueur de surface CD26 a mis en évidence que les cellules exprimant le marqueur de surface CD26 ont la capacité de se différencier préférentiellement en adipocytes bruns/beiges. La [fig.20A] montre que les populations DPP4+ et DPP4- ont toutes la capacité de se différencier en adipocytes selon l'expression du marqueur PLIN1 ([fig.20A]). En revanche, seule la population DPP4+ se différencie en adipocytes exprimant le marqueur d'adipocyte brun/beige UCP1 ([fig.20B]). Une illustration en [fig.19] montre par imagerie par fluorescence de la protéine UCP1 que la protéine UCP1 n'est exprimée que dans les cellules souches du tissu adipeux exprimant DPP4+ et différenciées dans un milieu adipogénique. L'utilisation du produit, qui est obtenu après culture des cellules triées, concerne principalement les applications de thérapie cellulaire de l'obésité et des maladies métaboliques, toutefois des applications in vitro de ce type de produit à composition contrôlée sont également possibles. Les modalités méthodologiques du tri cellulaire reposent sur la fixation d'anticorps spécifiques de DPP4 pour identifier les cellules exprimant cette protéine. Une première technique de séparation consiste à utiliser anticorps couplés à des fluorochromes, le tri s'opère sur une plateforme de tri cellulaire automatisée (type Aria III™, BD) qui est un cytomètre/

trieur de cellules à haut débit capable de séparer au moins quatre populations cellulaires différentes. L'autre méthode concerne le tri cellulaire immuno-magnétique, basée sur l'utilisation d'anticorps couplés à des billes magnétiques qui permettent la rétention des cellules d'intérêt dans un champs magnétique (technologie type cliniMACs™, Miltenyi Biotec™). Ces deux techniques permettent d'atteindre des degrés élevés d'homogénéité du produit cellulaire d'intérêt dans le produit final (>95%). Ces techniques sont toutes compatibles avec des tris réalisés en condition GMP pour des applications de thérapie cellulaire sous réserve de disposer des plateformes adaptés (Automate CliniMacs™ pour le tri magnétique, Cytomètre trieur GMP).

[0086] Dans un mode de réalisation de l'invention, la culture du mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : transfert dudit mélange de manière stérile dans une poche de culture en suspension comprenant du milieu de culture ; amplification dudit mélange formant des amas cellulaires ;

[0087] Le produit issu de l'amplification du mélange de la fraction SVF mécanique et de la fraction matrice peut être dénommé « ExAdEx-tissue ». Le produit issu de la formation d'agrégats dans une étape supplémentaire en fin de procédé, peut être dénommé « ExAdEx-lobules ». Ces produits sont schématisés en [fig.1C]. Le produit EXADEx-lobules est un produit qui peut être obtenu dans une étape additionnelle du procédé selon l'invention. A l'issue de l'étape de mise en co-culture, le produit est mis en amplification dans le milieu de prolifération EGM+ dans des flasques de culture, comme décrit précédemment. Il constitue alors le produit amplifié ExAdEx-tissue. Ainsi que cela est illustré à la [fig.1D], on transfère ce produit amplifié dans des plaques de cultures ULA (Ultra-Low Attachment – Attachement Ultra-Faible), non-adhérentes, de 6 puits, 12 puits ou 24 puits dans le milieu de prolifération, notamment EGM+, avec ou sans agitation. Une formation d'agrégats est alors observée. Ceux-ci comportent l'ensemble des caractéristiques décrites dans le produit ExAdEx-tissue, après 3 à 10 jours, dans les conditions décrites. Ces caractéristiques sont définies par la présence de cellules souches du tissu adipeux humain, les cellules endothéliales et les composants de la matrice extracellulaire. Ce produit est également caractérisé par la présence de cellules adipocytes matures et de macrophages. Parmi les marqueurs moléculaires, et ainsi que cela est montré aux Figs. 2A à 2K, on retrouve les marqueurs CD31, DPP4, ICAM1, PDGFRA, PLN1, ADIPONECTIN, FABP4, IL1B et MRC1. Ces figures montrent une comparaison de l'expression des marqueurs précédemment cités, retrouvé dans le produit ExAdEx-tissue et ExAdEx-lobules de façon comparable. Seul l'expression de MSCA1 est différente entre les deux produits et constitue la signature moléculaire des ExAdEx-lobules en comparaison au produit ExAdEx-tissue).Une ca-

ractérisation des protéines présentes dans les ExAdEx-lobules a également été faite par microscopie confocale à fluorescence et montre la présence des principales protéines de la matrice extracellulaire du tissu adipeux, notamment le collagène de type I ([fig.3A]) et du collagène de type IV ([fig.3B]), mais également de la fibronectine ([fig.3C]), de la laminine ([fig.3D]), de l'élastine ([fig.3E]) et des marqueurs de cellules souches du tissu adipeux DPP4 (Fig. 3f), ICAM1 ([fig.3G]), ainsi que des cellules endothéliales CD31 ([fig.3H]). Les unités produites sont de tailles plus homogènes que le produit ExAdEx-tissu et sont adaptées aux standards utilisés par les industries pharmaceutiques dans le cadre de criblage de molécules. Le produit ExAdEx-lobules est aussi mieux adapté à l'injection à la seringue dans le cadre d'une thérapie cellulaire. Ces unités ExAdEx-lobules peuvent être produites à partir du produit ExAdEx-tissu à différents temps d'amplification, par exemple à partir de 10 jours d'amplification et jusqu'à 40 jours. Ces agrégats, une fois formés, ne possèdent plus de capacités d'amplification mais possèdent une viabilité en culture supérieure à 10 jours. Les unités de ExAdEx-lobules peuvent être maintenues dans la gamme de produit en adipocytes blancs ou induit en différenciation ou différenciés en adipocytes bruns/beiges.

[0088] En définitive, le procédé selon l'invention a pour objet d'amplifier les cellules souches adipocytaires (hASCs) brunes ou beiges, maintenues dans une matrice extracellulaire active, en 3D et, puis de les différencier en adipocytes bruns ou beiges tout en permettant de maintenir viables des cellules du microenvironnement du tissu adipeux à savoir les cellules endothéliales (hECs) et des macrophages M1 et M2 (Figs. 21A, 21B). A cet effet, des milieux de culture ont été développés, car le milieu de culture utilisé classiquement pour la prolifération et la différenciation des hASCs est toxique pour les hECs et le milieu de culture utilisé classiquement pour la prolifération des hECs est inhibiteur de la différenciation des hASCs. Deux milieux de culture ont donc été établis : un milieu de prolifération, qui permet la prolifération des hASCs et un milieu de différenciation, qui permet la différenciation des hASCs amplifiées en adipocytes exprimant le marqueur UCP1. L'originalité de ces deux milieux de culture est qu'ils sont également compatibles avec le maintien des cellules endothéliales du tissu adipeux humain.

[0089] Le milieu référencé DMEM (Dulbecco™ Modified Eagle Medium), comprenant 10% FCS (Fetal Bovine Serum – Sérum Fœtal de Veau) est le milieu de référence pour la prolifération des hASCs. Toutefois, ce milieu ne permet pas de maintenir viables les cellules endothéliales. Pour la détermination du milieu de prolifération, cinq milieux, qui sont généralement commercialisés pour la prolifération des cellules endothéliales humaines, ont été testés. Il s'agit des milieux suivants :

[0090] N°1: Endo-BM EPC : Commercialisé par la société PrepoTech™ (référence produit :

Cat: GS-EPC)

- [0091] N°2: Endo-BM MacroV Commercialisé par la société PrepoTech™ (référence produit : Cat: GS-MacroV)
- [0092] N°3: Endo-BM MicroV Commercialisé par la société PrepoTech™ (référence produit : Cat: GS-MicroV)
- [0093] N°4: EGM+ Commercialisé par la société Promocell™ (référence produit : Cat: CC-22011 plus C-39216)
- [0094] N°5 MV2 Commercialisé par la société Promocell™ (référence produit : Cat: CC-39226 plus C-22022B)
- [0095] En culture en 2D, ces cinq milieux permettent la prolifération des cellules souches du tissu adipeux humain avec la même efficacité que le milieu de référence. Cependant, le milieu de prolifération N°4, à savoir EGM+, a été choisi, car, notamment, contrairement aux autres milieux testés, l'EGM+ n'induit pas d'hypoxie cellulaire, suivie par le marqueur d'hypoxie CA9, lorsque les hASCs sont en suspension en 3D, ainsi que cela est montré à la [fig.4A].
- [0096] La composition du milieu de prolifération EGM+ est la suivante : Endothelium Cell Growth Medium (milieu de croissance de cellules endothéliales) supplémenté par: 2% FCS ; 5 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF – Facteur de croissance épidermique) ; 10ng/ml Fibroblast Growth factor (FGF2 – Facteur de croissance des fibroblastes 2) ; 20ng/ml long R3 Insulin_like Growth Factor-1 (IGF-1 – Facteur de croissance 1 ressemblant ou analogue à l'insuline) ; 0,5 ng/ml Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF – Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire) 165 ; 1 µg/ml Acide Ascorbique; 22,5 µg/ml Héparine ; 0,2 µg/ml Hydrocortisone.
- [0097] Pour la détermination du milieu de différenciation différents milieux ont été testés. Ces milieux ont été enrichis en facteurs adipogéniques puis testés pour la différenciation des hASCs. Les résultats indiquent que : contrairement aux milieux N°1 à 3, l'EGM+, complémenté en facteurs adipogéniques, permet une différenciation adipocytaire, déterminée par l'expression du marqueur adipocytaire PLIN1, ainsi que cela est montré à la [fig.4B]. Cependant, l'expression du marqueur UCP1 spécifique des adipocytes brun/beige est très faible, ainsi que cela est montré à la [fig.4C]. Ce premier milieu 4 EGM+ de différenciation est donc non optimisé. A noter également que le milieu n°5 est une option à l'EGM+ qui n'a pas été poursuivie plus avant.
- [0098] La composition du milieu de prolifération non optimisé est donc avantageusement celle décrite ci-dessus, supplémentée en facteurs de différenciation adipocytaire à savoir : EGM supplémenté en : 2% FCS ; 5 ng/ml EGF ; 10ng/ml FGF2 ; 20 ng/ml long R3 IGF ; 0.5 ng/ml VEGF factor 165 ; 1 µg/ml acide ascorbique ; 22,5 µg/ml Héparine ; 0,2 µg/ml Hydrocortisone ; 2 µM Rosiglitazone ; 1 nM T3 ; 2,5 µg/ml Insuline ; 0,25 µM Dexaméthasone ; 500 µM IBMX, un inhibiteur non spécifique des

phosphodiesterases.

[0099] Le milieu de différenciation précité, non optimisé, est avantageusement optimisé de la manière suivante. Tout d'abord, avec le retrait de l'EGF et de l'hydrocortisone pour augmenter la différenciation des hASCs : les deux composés sont décrits dans la littérature comme pouvant inhiber l'expression de UCP1. Ensuite, avec le retrait de la Dexaméthasone et de l'IBMX pour maintenir la viabilité des ECs : comme le montre la [fig.5A], le milieu de différenciation permet une différenciation en adipocyte mais est toxique pour les ECs (Cellules Endothéliales - [fig.5B]). En revanche, le retrait de la Dexaméthasone et de l'IBMX du cocktail de différenciation après les trois premiers jours permet de maintenir la viabilité des ECs ([fig.5C]). Ensuite encore, avec l'ajout du composé SB431542 pour compenser le retrait de la Dexaméthasone et de l'IBMX pour la différenciation en adipocytes : l'impact du retrait de la dexaméthasone et de l'IBMX du cocktail de différenciation après les trois premiers jours est une diminution de la différenciation en adipocytes (PLIN1). L'ajout de l'inhibiteur de la voie TGF β , le SB431542, permet de rétablir la différenciation comme le montre la [fig.6A]. Le SB431542 est sans conséquence sur la viabilité des ECs. Finalement, l'ajout de SB431542 et le maintien de la rosiglitazone permet l'expression de UCP1, ainsi que cela est montré à la [fig.6B]. De plus, la présence de la rosiglitazone est particulièrement avantageuse car l'expression est très faible si la rosiglitazone n'est présente que les trois premiers jours.

[0100] La composition finale du milieu de différenciation optimisé est ainsi avantageusement la suivante : EGM supplémenté en : 0,1% à 5%, de préférence 2% FCS ; 2 ng/ml à 20 ng/ml, de préférence 10 ng/ml FGF2 ; 10 ng/ml à 30 ng/ml, de préférence 20ng/ml long R3 IGF-1 ; 0,1 ng/ml à 1 ng/ml, de préférence 0,5 ng/ml VEGF 165 ; 0,5 μ g/ml à 2 μ g/ml, de préférence 1 μ g/ml acide ascorbique ; 0,5 μ M à 4 μ M de préférence 2 μ M Rosiglitazone ; 0,5 nM à 10 nM, de préférence 1 nM T3 ; 0,5 μ g/ml à 10 μ g/ml de préférence 2,5 μ g/ml Insuline ; 0,1 μ M à 0,500 μ M, de préférence 0,25 μ M Dexaméthasone ; 100 μ M à 800 μ M, de préférence 500 μ M de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) ; 1 μ M à 10 μ M, de préférence 5 μ M de SB431542.

[0101] Ce milieu de différenciation est un premier milieu de différenciation, qui comporte de la dexaméthasone et de l'IBMX. Ces composés sont cependant présents uniquement les 3 premiers jours environ de la différenciation. On utilise ensuite un second milieu de différenciation dont la composition est conforme à celle précitée du premier milieu de différenciation, mais qui ne comporte pas de dexaméthasone et d'IBMX.

[0102] La composition finale de ce second milieu de différenciation est donc par exemple la suivante : 0,1% à 5%, de préférence 2% FCS ; 2 ng/ml à 20 ng/ml, de préférence 10 ng/ml FGF2 ; 10 ng/ml à 30 ng/ml, de préférence 20ng/ml long R3 IGF-1 ; 0,1 ng/ml à

1 ng/ml, de préférence 0,5 ng/ml VEGF 165 ; 0,5 µg/ml à 2 µg/ml, de préférence 1 µg/ml acide ascorbique ; 0,5 µM à 4 µM de préférence 2 µM Rosiglitazone ; 0,5 nM à 10 nM, de préférence 1 nM T3 ; 0,5 µg/ml à 10 µg/ml de préférence 2,5 µg/ml Insuline ; 1 µM à 10 µM, de préférence 5 µM de SB431542.

[0103] Par ailleurs, éventuellement, les premier et/ou second milieux de différenciation comprennent 5 µg/ml à 50 µg/ml, par exemple 22,5 µg/ml d'héparine et 1 µM à 20 µM, par exemple 10 µM de Y27632.

[0104] Comme le montre la [fig.7A], les hECs sont toujours détectables après 20 jours dans la composition du milieu de prolifération puis 20 jours de plus dans la composition du milieu de différenciation. A cette Fig., les ECs sont visualisées par expression du marqueur CD31. La photo de gauche est une photo du tissu adipeux avant la mise en œuvre du procédé selon l'invention. La photo du centre est une photo de ce tissu après 20 jours dans le milieu de prolifération. La photo de droite est une photo de ce tissu après 20 jours dans le milieu de prolifération puis 20 jours dans le milieu de différenciation. La [fig.7B] montre également que les cellules DPP4 sont toujours détectables après 20 jours dans la composition du milieu de prolifération puis 20 jours de plus dans la composition du milieu de différenciation. Ceci est également valable pour les précurseurs d'adipocytes ICAM1 toujours détectables dans le tissu amplifié après 20 jours de co-culture ([fig.7C]).

[0105] Les facteurs qui dans le milieu de différenciation peuvent ne pas être nécessaires ou utilisés dans d'autres conditions : - le Y27632 est rapporté comme augmentant la viabilité de cellules en suspension ; - l'héparine ; et - les facteurs adipogéniques peuvent être utilisés à d'autres concentrations.

[0106] Selon un troisième objet, l'invention concerne une matrice extracellulaire isolée susceptible d'être obtenue selon le procédé défini ci-dessus, comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux humain et du collagène.

[0107] Le collagène est du collagène structuré, de type I et du collagène de type III (Figs. 9A et [fig.9B]). La matrice extracellulaire comprend en outre notamment de la fibronectine ([fig.22]).

[0108] Selon un quatrième objet, l'invention concerne une composition comprenant le mélange de la matrice extracellulaire et de la fraction stroma-vasculaire tel que défini ci-dessus, la matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux, et du collagène, et la fraction stroma-vasculaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux et des cellules souches du tissu adipeux brun ou beige.

[0109] Le collagène est du collagène de type I et du collagène de type III. La matrice ex-

tracellulaire comprend en outre de la fibronectine ([fig.22])

- [0110] Selon un cinquième objet, l'invention concerne un kit comprenant la composition telle que définie précédemment, le milieu de prolifération et le milieu de différenciation.
- [0111] Selon un sixième objet, l'invention concerne l'utilisation in vitro de la matrice extracellulaire telle que définie ci-dessus ou l'utilisation in vitro de la composition telle que définie ci-dessus pour le criblage et : ou la caractérisation d'actifs pharmacologiques, notamment contre l'obésité et/ou les maladies métaboliques associées comme le diabète de type 2 et les maladies cardio-vasculaires.
- [0112] L'invention concerne en outre des adipocytes bruns ou beiges obtenus selon le procédé défini ci-dessus, ou issus d'une composition telle que définie précédemment, et destinés à une utilisation, ou pour leur utilisation, en thérapie cellulaire, ou pour le traitement des désordres métaboliques. Le terme « issu » doit être compris comme signifiant que les adipocytes proviennent de la composition, par différenciation de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges.
- [0113] Les adipocytes bruns ou beiges ou les précurseurs de tels adipocytes, peuvent être utilisés pour le traitement de l'obésité chez des individus en surpoids ou obèses. A cet effet, et dans un exemple, on réalise un prélèvement d'un tissu adipeux blanc chez un individu. Ce tissu prélevé est ensuite traité selon le procédé de l'invention, afin d'obtenir, toujours dans cet exemple, des produits ExAdEX-tissu voire ExAdEx-lobules tels que décrits précédemment. Ces produits, dans lesquels les cellules souches précurseurs d'adipocytes bruns ou beiges ont subi une amplification, font alors avantageusement l'objet d'une différenciation en adipocytes bruns ou beiges. Puis, les produits comportant ces adipocytes bruns ou beiges sont transplantés, par exemple, dans un tissu adipeux blanc ou à proximité d'un tel tissu de l'individu. Dans un autre mode de réalisation, on transplante non pas des adipocytes bruns ou beiges mais des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges, ayant subi l'amplification selon le procédé de l'invention, et la différenciation en adipocytes blancs ou beiges mûres s'effectue dans le corps de l'individu transplanté.

EXEMPLES

- [0114] Exemple 1. Extraction mécanique
- [0115] a) Procédé d'extraction mécanique en vue de la caractérisation des populations cellulaires et matricielles au cours du processus
- [0116] L'extraction mécanique de la fraction stroma-vasculaires et de la matrice extracellulaire, à partir d'un prélèvement de tissu adipeux chez un donneur humain, peut être réalisée selon les étapes suivantes (Figs. 1A et 1B) :
- [0117] 1. Prélèvement de tissu adipeux par aspiration dans une seringue stérile de 10cc

équipée d'une canule de Coleman 2mm en dépression -20kPa.

[0118] 2. Afin de séparer les différentes phases, la seringue est centrifugée à 1600 rcf (force centrifuge relative), 3 min dans le tube de collecte. La fraction huile ainsi que la fraction sang et liquide anesthésique sont éliminées. La fraction culotée est conservée.

[0119] 3. Une unité de sérum physiologique est injectée dans la seringue, suivie d'une incubation de 30 min à 37°C en agitation. La seringue est centrifugée à 1600 rcf, 3 min dans le tube de collecte. La fraction de liquide physiologique et la fraction huile sont éliminées. La fraction culotée est conservée.

[0120] 4. La seringue est connectée à une autre seringue de type Luer-Lock mâle reliée par un connecteur de type Tulip® afin de procéder à la dissociation du tissu par une émulsification. Trois types de connecteur Tulip®, 2,4 mm, 1,4 mm puis 1,2 mm, sont successivement utilisés, sur 30 passages.

[0121] 5. Une unité de sérum physiologique est injectée dans la seringue, suivie d'une incubation de 30 min à 37°C en agitation. La seringue est centrifugée à 1600 rcf 3 min dans le tube de collecte. La fraction de liquide physiologique et la fraction huile sont éliminées. La fraction culotée est conservée.

[0122] 6. Le contenu de la seringue ainsi que les contenus des tubes de collecte préalablement débarrassés des cellules sanguines sont transférés par une connexion stérile dans une poche de culture contenant le milieu de culture EGM+ à 37°C pour la phase d'expansion.

[0123] Lors de l'étape 4 ci-dessus de dissociation du tissu, un connecteur d'une autre marque que la marque Tulip® peut être employé. Le nombre de connecteur employé est compris entre 1 et 5. Le nombre de passages à travers ces connecteurs est compris entre 10 et 50.

[0124] b) Caractérisation des populations cellulaires obtenues

[0125] Le procédé décrit ci-dessus permet d'extraire séquentiellement la fraction stroma-vasculaire et une matrice extracellulaire. Les populations cellulaires sont caractérisées en particulier par microscopie à fluorescence et par une caractérisation moléculaire par PCR quantitative.

[0126] - La fraction stroma vasculaire obtenu est caractérisé par une majorité de cellules de type DPP4+ ([fig.17A]) au niveau de l'expression génique du marqueur DPP4 et par observation de la protéine DPP4 par microscopie ([fig.8A]). En comparaison, la protéine ICAM1 est peu présente ([fig.17C] et [fig.8B]).

[0127] - La matrice extracellulaire obtenu est caractérisé par une majorité de cellules de type ICAM1+ ([fig.17C]) et CD31+ ([fig.17E]) au niveau de l'expression génique. Ce résultat est confirmé par la présence de cellules exprimant la protéine ICAM1 observé par microscopie ([fig.8B]).

[0128] c) Caractérisation des matrices M1 à M4 obtenues lors des différentes étapes du

procédé

- [0129] - La matrice obtenue lors de l'étape 2, nommée ici M1 est de type fibreux ([fig.9C]).
- [0130] - La matrice obtenue lors de l'étape 3, nommée ici M2 est de type fibreux et riche en collagène ([fig.9D]). Le collagène est révélé par le PicroSirius Red ([fig.9A]) qui permet, de plus, de visualiser une structure du collagène en bâtonnets. Cette matrice contient des cellules endogènes.
- [0131] - La matrice obtenue lors de l'étape 5 et isolé dans le tube de collecte, nommée ici M3, est de type fibreux ([fig.9E] et [fig.9B]). Cette matrice contient également des cellules endogènes. Le collagène de la matrice isolée est révélé, à la [fig.9B], par le PicroSirius Red qui colore les fibres de collagène de type I et de type III. La coloration rouge (en nuance de gris à la [fig.9B]) obtenue indique que le collagène reste organisé, à savoir que le collagène présent présente toujours une structure secondaire en hélice α et une structure quaternaire en triple hélice. Il n'est pas dégradé. En effet, le collagène désorganisé se colore en vert par le PicroSirius Red.
- [0132] - La matrice obtenue lors de l'étape 5 et contenue dans la seringue, nommée ici M4, est composée d'une majorité d'adipocytes matures et d'une trame de collagène de type I ([fig.10B]). La matrice M4 est également composée de structures capillaires formées par des cellules endothéliales CD31+ ([fig.10C]) et par un réseau de cellules souches du tissu adipeux PDGFRa+ ([fig.10D]).
- [0133] La [fig.1A] montre un procédé permettant de rassembler dans l'étape 2 les populations C1 et C2 ainsi que les matrices M1 et M2. Dans l'étape 3 sont regroupées la population C3 et les matrices M3 et M4.
- [0134] Exemple 2. Expansion cellulaire et différenciation
- [0135] Une méthode d'expansion ex vivo de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux et de différenciation dans un environnement mimant le tissu adipeux comprend les étapes suivantes :
- [0136] 1. Le produit final obtenu à l'exemple 1 contenant les populations C1-C3 ainsi que les matrices dites EndoStem-Matrix M1-M4 sont misent en culture en suspension dans des poches et maintenues dans le milieu de prolifération EGM+ avec une agitation pendant 24h à 37°C 5% CO₂, puis maintenues dans les mêmes conditions, de préférence, avec agitation.
- [0137] 2. Le milieu de prolifération EGM+ est changé à 50% tous les deux jours.
- [0138] 3. Une dissociation mécanique en système clos, par passage à travers 2 seringues ou deux poches de culture montées en tulipe, est effectuée au jour 5 et jour 10.
- [0139] 4. Au jour 14, le milieu de prolifération EGM+ est remplacé par le cocktail de différenciation I composé de EGM+ enrichi en 250 μ M Dexaméthasone ; 500 μ M IBMX ; 1 μ M Rosiglitazone ; 2 μ M T3 et 2,5 μ g/ml insuline.
- [0140] 5. Au jour 17, le milieu de différenciation I est remplacé par le milieu de diffé-

renciation II composé de EGM+ enrichi en 1 μM Rosiglitazone ; 2 μM T3 et 2,5 $\mu\text{g/ml}$ insuline.

[0141] Exemple 3. Caractérisation de la capacité d'amplification de la matrice

[0142] Les matrices extracellulaires dites EndoStem-Matrix de l'invention ont été caractérisées, notamment, par microscopie à fluorescence, en présence de différents marqueurs spécifiques. Des cellules en prolifération ont ainsi été détectées par incorporation, lors de la phase de réplication de l'ADN, de Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) fluorescent dans les matrices EndoStem-Matrix de l'invention, comme illustré sur la [fig.11], prouvant que celles-ci sont bioactives. En effet, la [fig.11] montre que les cellules endogènes aux matrices sont maintenues en prolifération pendant la phase d'amplification.

[0143] Par ailleurs, la [fig.12] met en évidence la présence de cellules souches exogènes du tissu adipeux mises en co-culture après trois jours de co-culture avec la matrice extracellulaire de l'invention. La matrice extracellulaire permet donc de fournir un support pour la prolifération de la fraction stroma-vasculaire : les cellules souches du tissu adipeux ajoutées peuvent s'attacher à la matrice EndoStem-Matrix, en suspension. Ceci montre que des cellules exogènes ont la capacité de s'attacher à la matrice extracellulaire selon l'invention, et démontre que la matrice peut être utilisée en tant que telle et seule pour des applications cliniques ou in vitro et, notamment, pour le criblage et/ou la caractérisation d'actifs pharmacologiques. Les cellules souches exogènes peuvent être génétiquement modifiées, par exemple, pour exprimer une protéine d'intérêt. Les cellules souches exogènes peuvent par ailleurs être des cellules souches non-adipocytaires ou spécifiquement adipocytaires. Il peut s'agir, par exemple, de cellules souches de la peau, notamment des cellules souches épithéliales de la peau ou de cellules souches pluripotentes induites.

[0144] En référence à la [fig.13B], la fraction stroma-vasculaire est amplifiée par sa culture sur l'EndoStem Matrix de l'invention. A l'inverse, en référence à la [fig.13A], lorsque la fraction stroma-vasculaire est mise en culture en suspension sans la matrice extracellulaire, des agrégats cellulaires sans prolifération sont observés. La matrice extracellulaire de l'invention a donc la capacité d'amplifier les cellules souches du tissu adipeux ajoutées.

[0145] De plus, la Fig. 16 permet de mettre en évidence la nécessité de la co-culture de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice pour obtenir une amplification des cellules souches du tissu adipeux. Les Figs. 16A, 16C et 16E montrent une proportion faible de cellules en prolifération dans la matrice Endostem cultivée sans l'ajout de la fraction stroma-vasculaire. En comparaison, les Figs. 16B, 16D et 16F montrent que la co-culture de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire permet d'obtenir une prolifération supérieure des cellules souches du tissu adipeux.

[0146] La capacité d'amplification cellulaire des différentes matrices M1 à M4 obtenues au cours des étapes de l'exemple 1 a été vérifiée. Ainsi, environ 10^4 cellules souches du tissu adipeux ont été maintenues en suspension en présence des différentes matrices M1 à M4 en puits Ultra Low Attachment (ULA). Huit jours après, les cellules sont détachées de la matrice par de la trypsine/EDTA puis comptées. Les valeurs obtenues sont montrées dans le tableau 1 suivant :

[0147] [Tableaux1]

Conditions	Nombre de cellules	Facteur d'amplification
Cellules souches du tissu adipeux sans matrice	$2 \cdot 10^4$	1
Cellules souches du tissu adipeux avec matrice M1	$5 \cdot 10^4$	2,5
Cellules souches du tissu adipeux avec matrice M2	$53 \cdot 10^4$	26,5
Cellules souches du tissu adipeux avec matrice M3	$7,4 \cdot 10^4$	3,7
Cellules souches du tissu adipeux avec matrice M3	$7,4 \cdot 10^4$	3,7
Matrice M4 sans ajout de cellules souches du tissu adipeux	$5 \cdot 10^4$	-

[0148] Dans le tableau ci-dessus, pour le cas particulier des matrices individuelle M1 à M4, le facteur d'amplification est le rapport entre le nombre de cellules obtenues après culture en présence de la matrice extracellulaire et le nombre de cellules obtenu en absence de la matrice extracellulaire.

[0149] Les matrices M2 et M4 ont un fort pouvoir d'amplification des cellules souches du tissu adipeux. Le volume de matrice M2 obtenu est très faible comparé au volume de la M4 ([fig.10A]). La matrice M4 illustre une matrice extracellulaire telle que définie dans l'invention.

[0150] Le niveau d'expression de différents marqueurs cellulaires (marqueur de cellules souches du tissu adipeux et de cellules endothéliales CD31) a été analysé après culture en suspension de la fraction stroma-vasculaire sur la matrice extracellulaire de

l'invention dans le milieu de prolifération. Cette étude révèle une amplification des cellules souches du tissu adipeux brun/beige DPP4 ([fig.17B]), une conservation des cellules souches précurseurs d'adipocytes du tissu adipeux humain ICAM1 ([fig.17D]) et la conservation d'une population de cellules endothéliales ([fig.17F]).

- [0151] Le niveau d'expression de différents marqueurs cellulaires (marqueur de cellules endothéliales CD31, marqueur de cellules souches adipocytaires PDGFRa, et deux marqueurs d'adipocytes matures PLN1 et Adiponectine) a été analysé après culture en suspension de la fraction stroma-vasculaire sur la matrice extracellulaire de l'invention après l'étape d'amplification et de différenciation du produit ExAdEx-tissue. La Fig. 14 montre une comparaison de ces niveaux d'expression avec ceux issus d'une culture en suspension de la fraction stroma-vasculaire sans la matrice extracellulaire de l'invention. Cette étude révèle une amplification des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux ([fig.14A]) et des cellules souches du tissu adipeux ([fig.14B]). Cette étude permet également de mettre en évidence la meilleure capacité de différenciation induite par la matrice extracellulaire de l'invention (Figs. 14C et 14D). Ainsi, les cellules souches du tissu adipeux amplifiées en 3D sur la matrice extracellulaire de l'invention gardent leur capacité à se différencier en adipocytes.
- [0152] On notera qu'un tissu adipeux non dissocié, qui peut être assimilé à un explant, reste viable peu de temps ex vivo. Ainsi que cela est montré notamment à la Fig. 15, la matrice isolée par dissociation contient des cellules en prolifération ([fig.15B]), au contraire d'un tissu non dissocié ([fig.15A]). Les Figs. 15A et 15B permettent de comparer la prolifération cellulaire dans le tissu non dissocié ([fig.15A]) et dans la matrice isolée ([fig.15B]). En [fig.15A], le tissu adipeux non dissocié ne montre pas de cellules en prolifération. En [fig.15B], la composition montre des cellules en prolifération. En effet, cette Fig. fait apparaître, en blanc, les noyaux des cellules en prolifération.
- [0153] On notera que les cellules isolées selon l'invention, par centrifugation du liquide des lavages, sont caractérisées moléculairement par le marqueur DPP4. DPP4 est un marqueur des cellules précurseurs des pré-adipocytes ICAM1, qui ont une grande capacité de prolifération et qui sont localisées dans le réticulum interstitiel du tissu adipeux. Ce sont des cellules qui ont la capacité de prolifération dans la composition selon l'invention. Il est important de noter que ces cellules sont éliminées à la suite des lavages réalisés selon les procédés de l'art antérieur. Ainsi que cela est montré à la [fig.17A], l'expression de DPP4 est concentrée dans la fraction stroma-vasculaire isolée. La matrice en exprime peu. En revanche, et ainsi que cela est montré à la [fig.17C], l'expression de ICAM1, est concentrée dans la matrice isolée, ainsi que les cellules de type CD31 à la [fig.17E]. Les cellules qui portent l'amplification dans la composition sont les cellules exprimant DPP4 ajoutées.

- [0154] En effet, la [fig.18] montre que dans le produit de co-culture, les cellules exprimant le marqueur de prolifération Edu sont les cellules exprimant également le marqueur DPP4. Ainsi, les cellules souches, qui portent le pouvoir d'amplification, sont préférentiellement les cellules de type DPP4 ou CD26+.
- [0155] Par ailleurs, on notera que le tissu adipeux in vivo contient des macrophages et que la composition amplifiée selon l'invention maintient la présence de macrophages de type M1, ainsi que cela est montré à la [fig.21A] et de type M2 ainsi que cela est montré à la [fig.21B]. A la [fig.21A], les macrophages de type M1 sont révélés par le marqueur IL-1b et, à la [fig.21B], les macrophages de type M2 sont révélés par le marqueur MRC1.
- [0156] Enfin, et ainsi que cela est montré à la [fig.22], la matrice isolée selon l'invention comprend des protéines de la matrice extracellulaire, à savoir notamment, le collagène de type I, le collagène de type IV, l'élastine, la fibronectine, la laminine. Le marquage des cellules endothéliales CD31 montre qu'un réseau capillaire est conservé.
- [0157] Exemple 4 – Amplification/différentiation en adipocytes bruns/beiges
- [0158] La [fig.19] montre que ce sont les cellules DPP4 positives qui sont préférentiellement les précurseurs d'adipocytes bruns/beiges. En effet, une population isolée de cellules souches du tissu adipeux humain exprimant DPP4+ et mise en différenciation selon le milieu décrit dans l'invention ([fig.19] ligne du haut), montre une expression du marqueur UCP1 en microscopie confocale. En revanche, une population de cellules souches du tissu adipeux humain n'exprimant pas le marqueur de surface DPP4, ne montre pas d'expression du marqueur UCP1 après différenciation. Des analyses moléculaires confirment ces observations et montrent que le marqueur de différenciation adipocytaire PLIN1 est comparable pour les populations DPP4 positives et négatives ([fig.20A]), en revanche, le marqueur de différenciation du tissu adipeux brun/beige est observable uniquement dans la population différenciée à partir de cellules souches exprimant le marqueur DPP4 ([fig.20B]).
- [0159] Le produit ExAdEx-tissu amplifié - mais non différencié - a été injecté au niveau interscapulaire, à proximité du tissu adipeux brun de la souris immunodéficiente dite « Nude ». Vingt et un jours après injection (J21) le produit ExAdEx-tissu a été prélevé. Les ARN ont été extraits des cellules constitutives du tissu prélevé. Le niveau d'expression du marqueur d'adipocytes bruns/beiges UCP1 a été comparé à celui du produit avant injection (J0). Les niveaux d'expression de UCP1 à J0 et à J21, ont été déterminés par PCR quantitative en temps réel puis ont été normalisés en les rapportant à un gène de référence dont l'expression ne varie pas dans les 2 conditions, à savoir le gène : GUSB humain (beta glucuronidase). Ainsi que cela est montré à la [fig.23], il apparaît que le tissu amplifié transplanté a fait l'objet d'une différenciation cellulaire in vivo en adipocytes bruns/beiges après transplantation. En pratique, et ainsi que cela est

montré à la [fig.24], il n'y a pas d'adipocytes bruns/beiges dans le tissu adipeux sous-cutané blanc avant la mise en œuvre du procédé de l'invention ([fig.24], photographie de gauche). La présence d'adipocytes bruns/beiges (spécifiquement marqués par expression de la protéine UCP1) ex vivo après l'invention à partir de tissu adipeux de personne en surpoids ([fig.24], photographie du milieu). La présence d'adipocytes bruns/beiges ex vivo après l'invention à partir de tissu adipeux d'un patient avec une obésité sévère ([fig.24], photographie de droite).

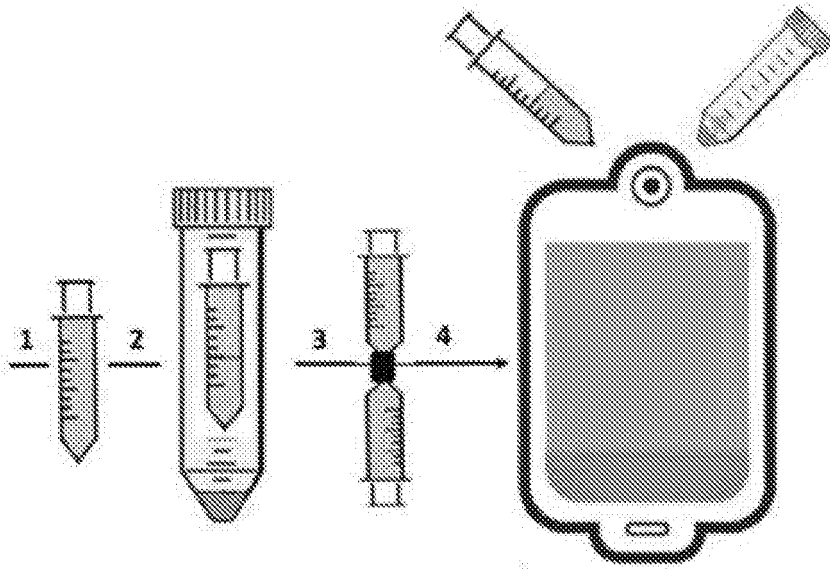
Revendications

- [Revendication 1] Procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux humain comprenant les étapes suivantes :
- extraction, d'une part, d'une fraction stroma-vasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain et, d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène, l'extraction de ladite matrice extracellulaire comprenant une étape de dissociation mécanique ;
- mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire ; et
- culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension, dans un milieu de prolifération cellulaire.
- [Revendication 2] Procédé d'obtention in vitro ou ex vivo d'adipocytes bruns ou beiges comprenant les étapes suivantes :
- extraction, d'une part, d'une fraction stroma-vasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant, des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain et, d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène, l'extraction de ladite matrice extracellulaire comprenant une étape de dissociation mécanique ;
- mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire ;
- culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension, dans un milieu de prolifération cellulaire ; et
- induction d'une différenciation des cellules souches du tissu adipeux dans un milieu de différenciation pour obtenir des adipocytes bruns ou beiges.
- [Revendication 3] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape de dissociation mécanique est une étape de

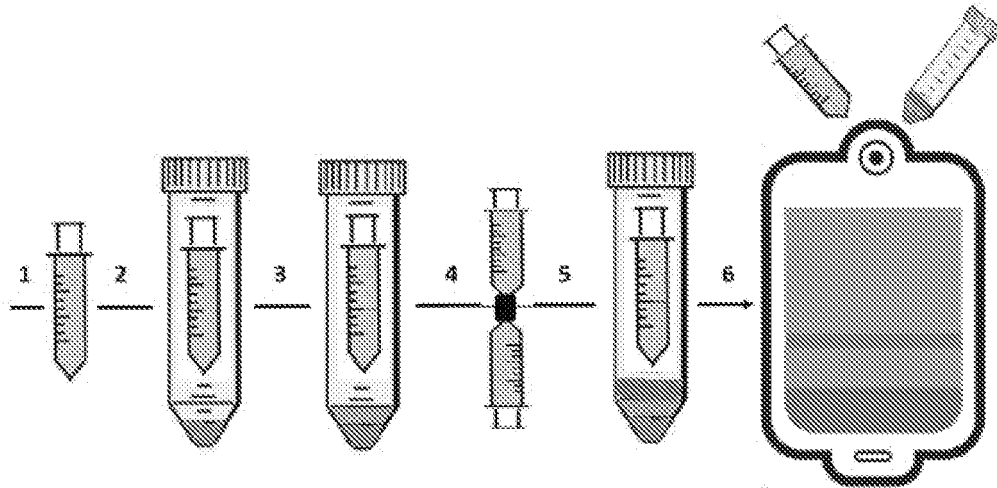
- dissociation qui ne fait pas intervenir de collagénase.
- [Revendication 4] Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape de dissociation mécanique est une étape de dissociation non-enzymatique.
- [Revendication 5] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes :
centrifugation du tissu adipeux humain pour obtenir au moins deux fractions distinctes, une fraction A comprenant une matrice extracellulaire centrifugée, et la fraction stroma-vasculaire ; et dissociation mécanique de la fraction A pour obtenir la matrice extracellulaire.
- [Revendication 6] Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape d'élimination des cellules sanguines présentes dans la fraction stroma-vasculaire.
- [Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le collagène de la matrice extracellulaire est du collagène structuré, qui présente une organisation fibrillaire.
- [Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la culture du mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes :
transfert dudit mélange de manière stérile dans une poche de culture en suspension comprenant le milieu de prolifération ; et amplification dudit mélange pour l'obtention d'un mélange amplifié comprenant des amas cellulaires.
- [Revendication 9] Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le mélange amplifié comprenant les amas cellulaires fait l'objet d'une dissociation mécanique pour l'obtention d'agrégats cellulaires.
- [Revendication 10] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend l'ajout, dans le milieu de prolifération, d'un sérum, d'un facteur de croissance de fibroblastes et d'un facteur de croissance ressemblant à l'insuline.
- [Revendication 11] Procédé selon l'une des revendications 2 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend l'ajout, dans le milieu de différenciation, de la Rosiglitazone et/ou du SB431542.
- [Revendication 12] Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape de tri-cellulaire visant à trier les cellules souches exprimant le marqueur de surface DPP4.

- [Revendication 13] Matrice extracellulaire isolée obtenue selon le procédé selon l'une des revendications 1 à 12, comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux humain, et du collagène.
- [Revendication 14] Composition comprenant un mélange de la matrice extracellulaire selon la revendication 13 et d'une fraction stroma-vasculaire, la fraction stroma-vasculaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux et des cellules souches adipeux humain.
- [Revendication 15] Kit comprenant la composition selon la revendication 14, un milieu de prolifération cellulaire selon la revendication 10 et un milieu de différenciation selon la revendication 11.
- [Revendication 16] Utilisation in vitro de la matrice extracellulaire selon la revendication 13 pour le criblage et/ou la caractérisation d'actifs pharmacologiques.
- [Revendication 17] Utilisation in vitro de la composition selon la revendication 14 pour le criblage et/ou la caractérisation d'actifs pharmacologiques.
- [Revendication 18] Utilisation in vitro du kit selon la revendication 15 pour le criblage et/ou la caractérisation d'actifs pharmacologiques.
- [Revendication 19] Adipocytes bruns ou beiges issus d'une composition selon la revendication 14, pour leur utilisation en thérapie cellulaire, ou pour le traitement des désordres métaboliques.
- [Revendication 20] Adipocytes bruns ou beiges issus d'une composition selon la revendication 14, pour le traitement de l'obésité.
- [Revendication 21] Milieu de différenciation pour la différenciation de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges en adipocytes bruns ou beiges selon le procédé selon l'une des revendications 2 à 12, comprenant un milieu de croissance de cellules endothéliales supplémenté en sérum, en facteurs de croissance, en rosiglitazone et en SB431542 et, préférentiellement, en sérum fœtal de veau, en facteurs de croissance de fibroblastes, en facteurs de croissance ressemblant à l'insuline, en facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire, en acide ascorbique, en rosiglitazone, en T3, en insuline, et en SB431542.

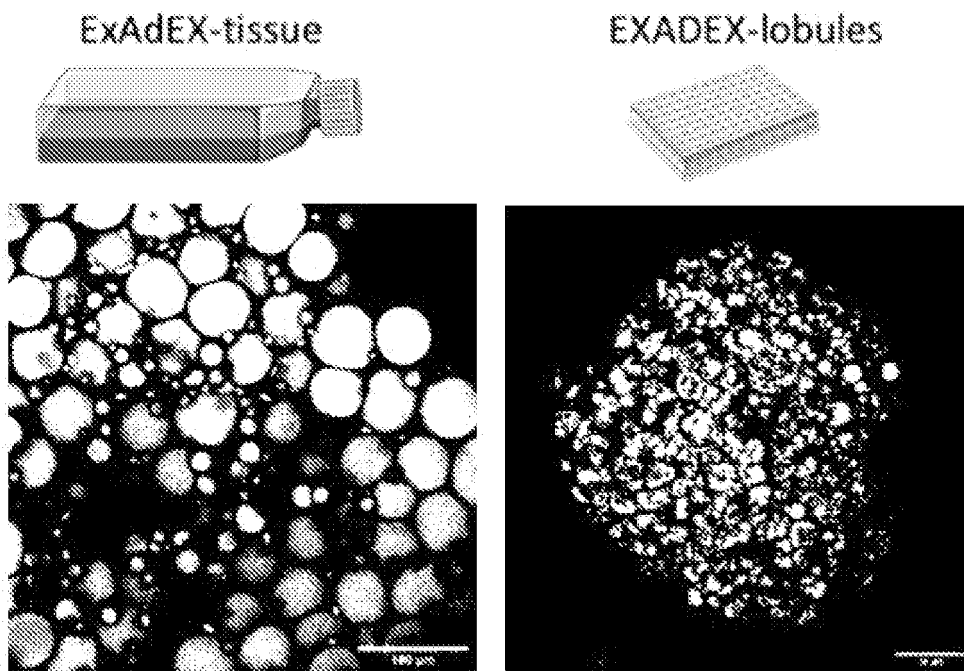
[Fig. 1A]



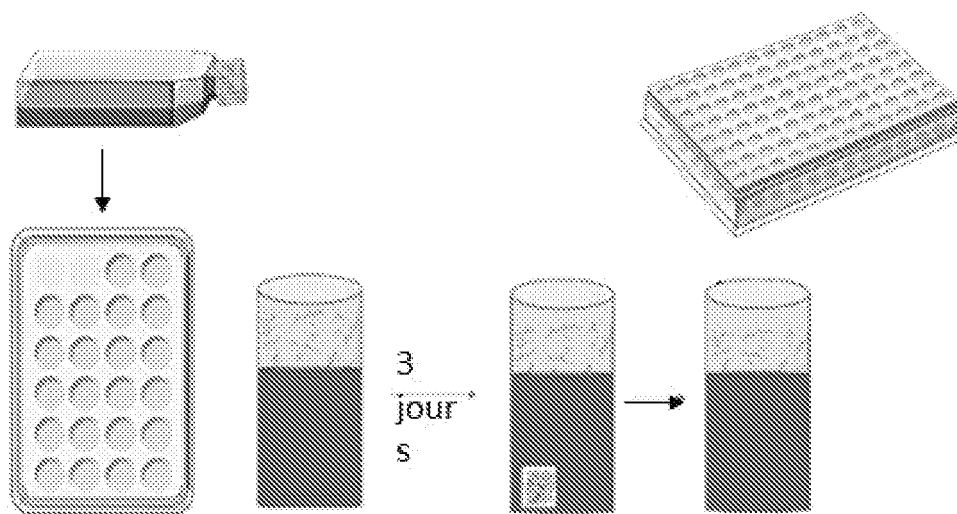
[Fig. 1B]



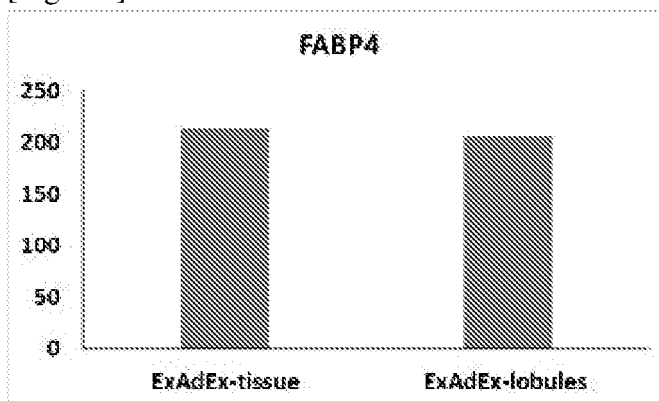
[Fig. 1C]



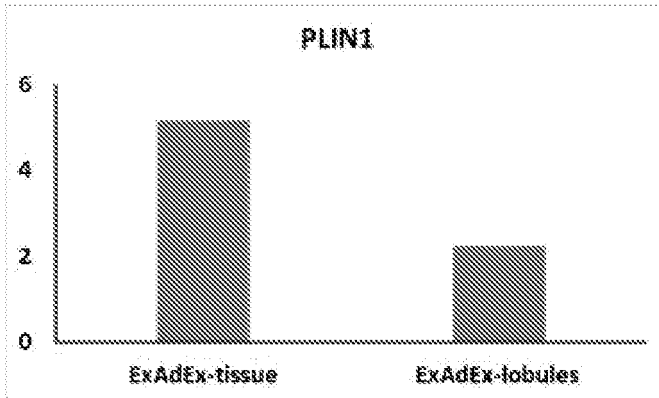
[Fig. 1D]



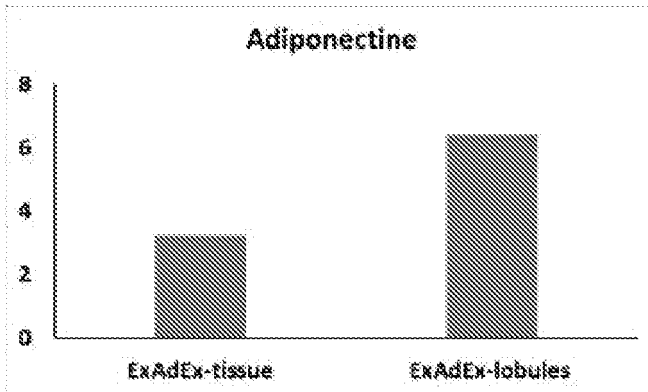
[Fig. 2A]



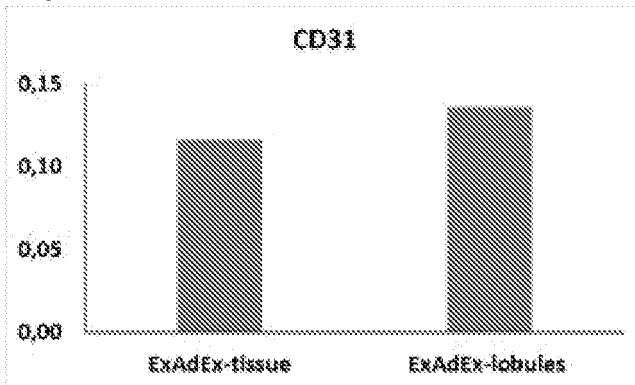
[Fig. 2B]



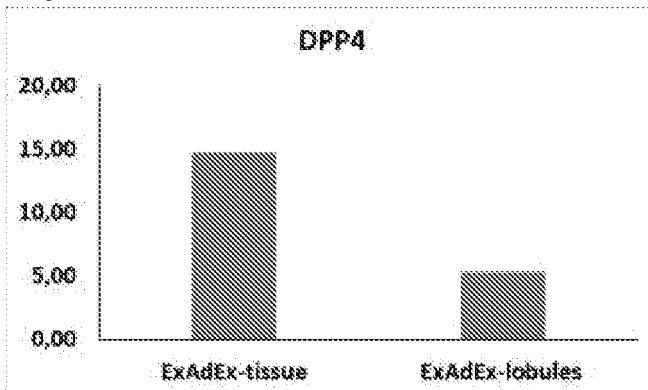
[Fig. 2C]



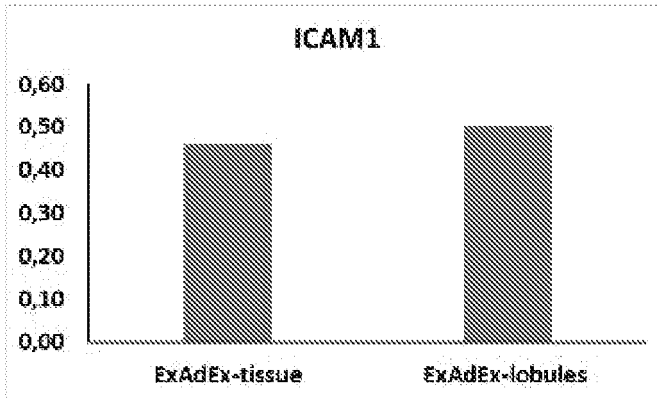
[Fig. 2D]



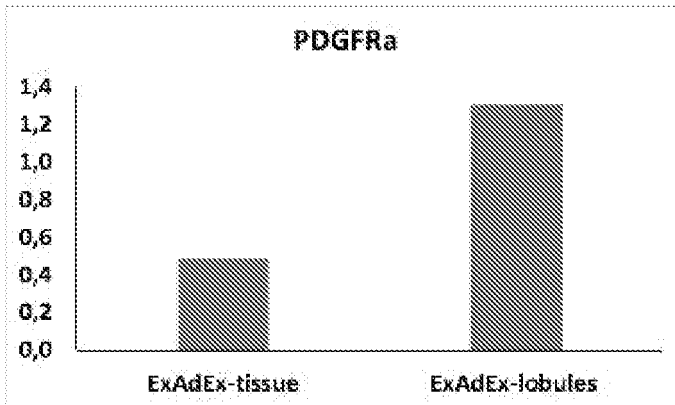
[Fig. 2E]



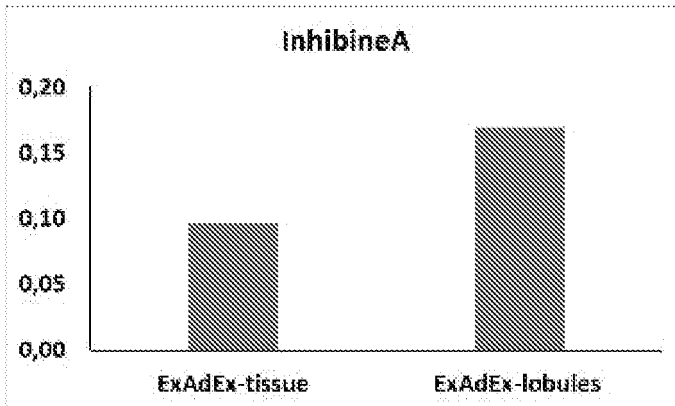
[Fig. 2F]



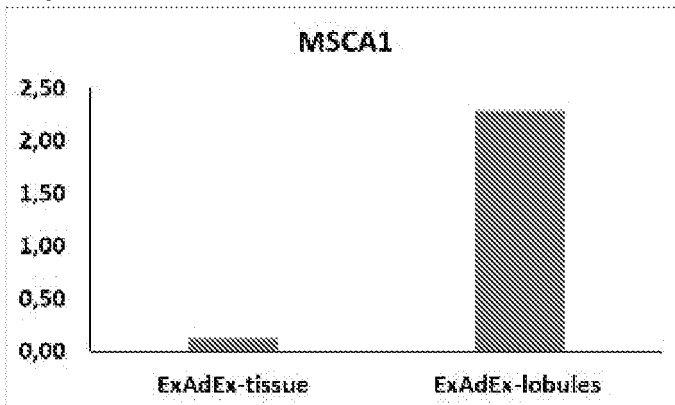
[Fig. 2G]



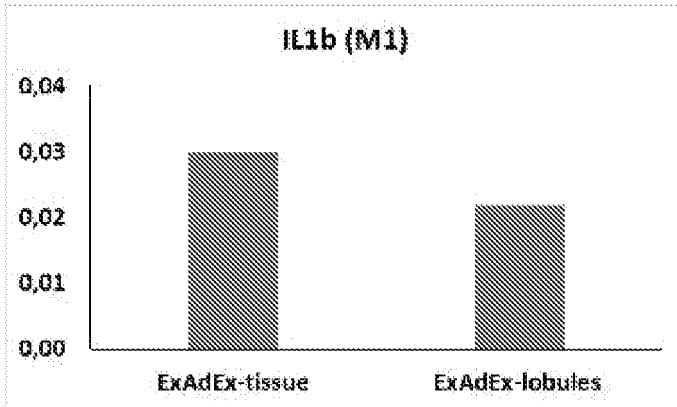
[Fig. 2H]



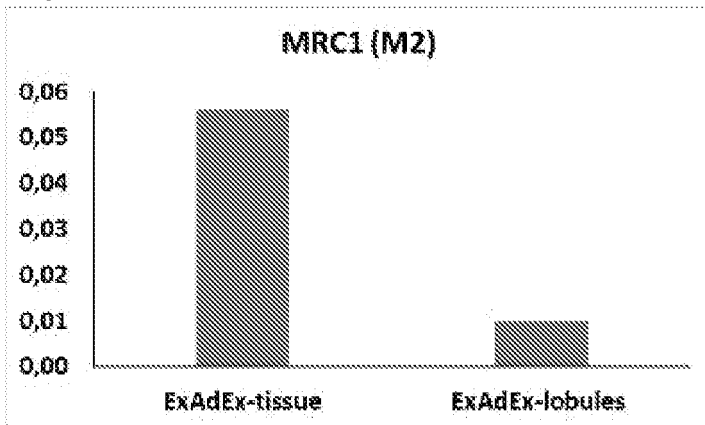
[Fig. 2I]



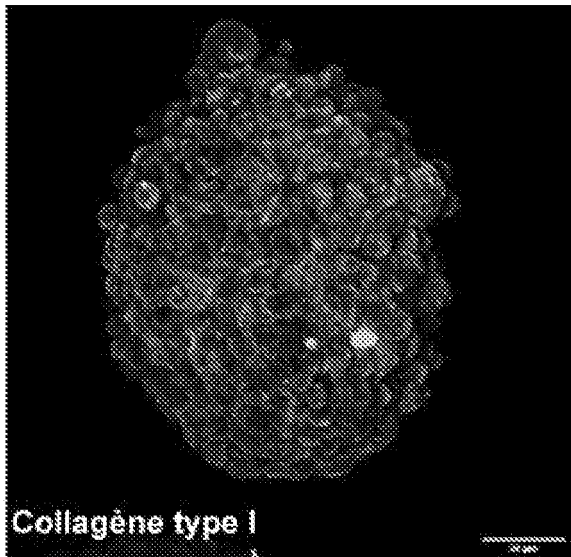
[Fig. 2J]



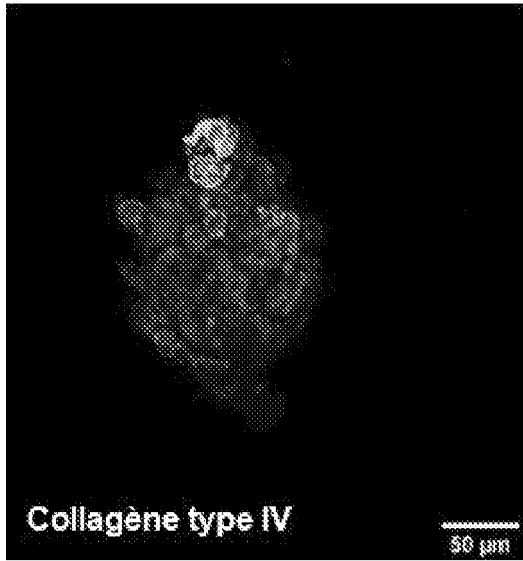
[Fig. 2K]



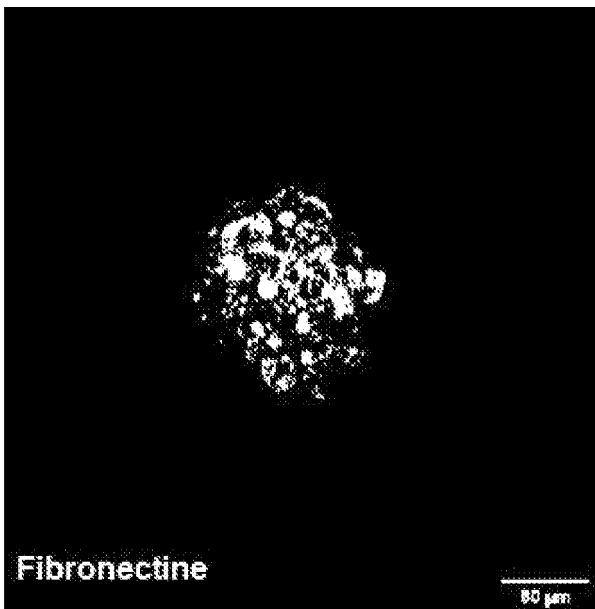
[Fig. 3A]



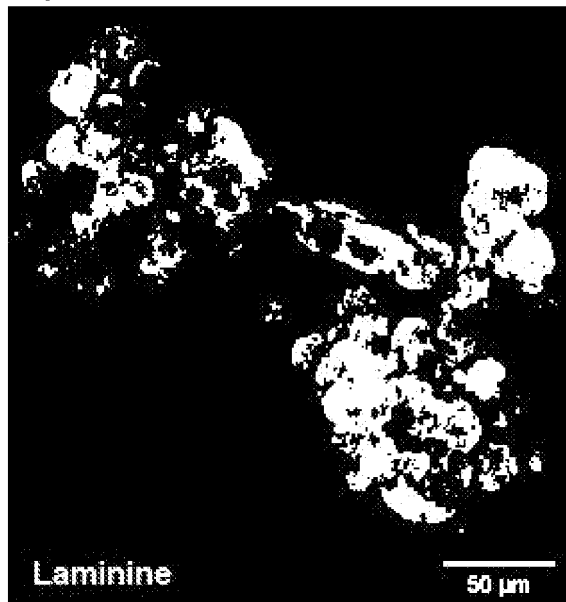
[Fig. 3B]



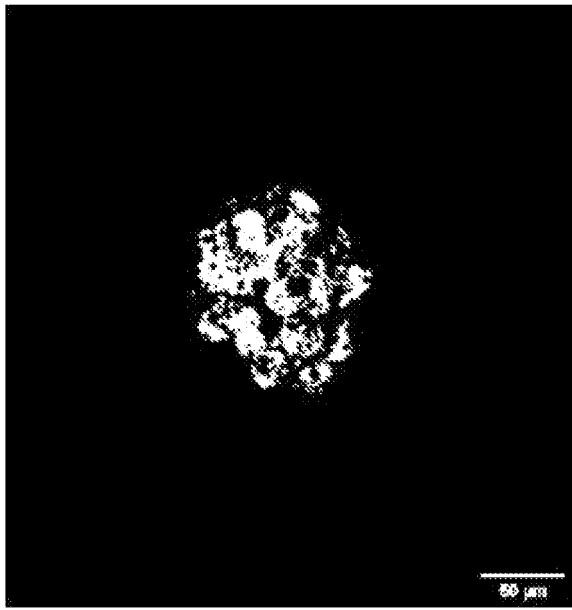
[Fig. 3C]



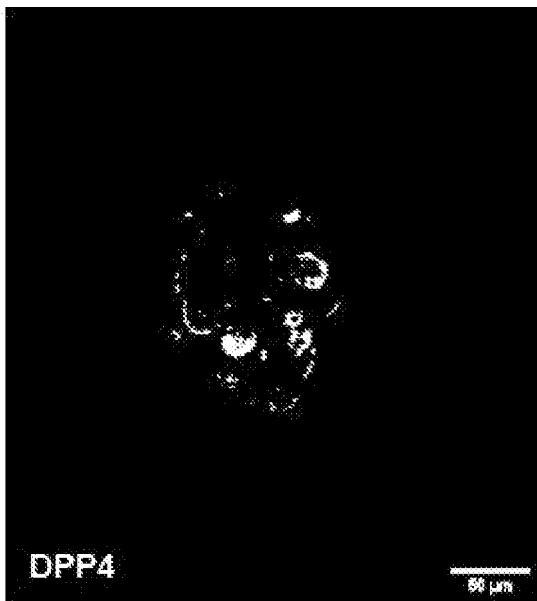
[Fig. 3D]



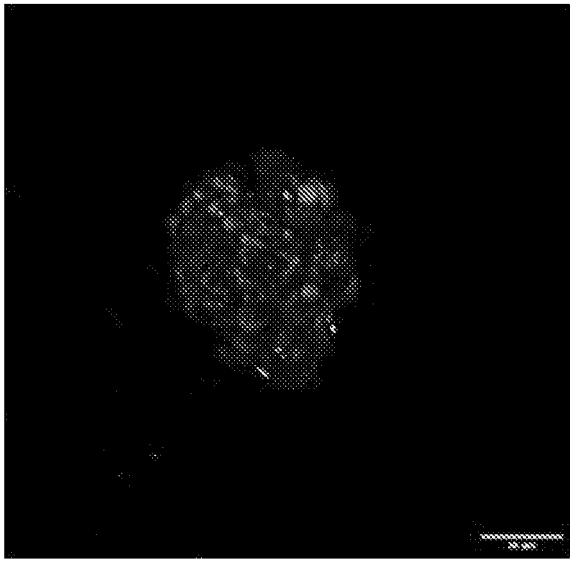
[Fig. 3E]



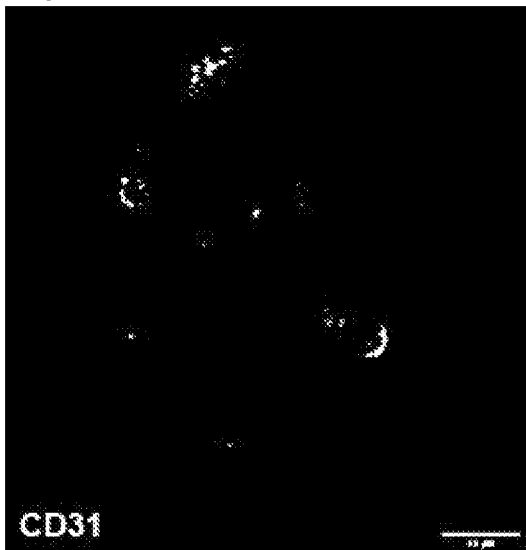
[Fig. 3F]



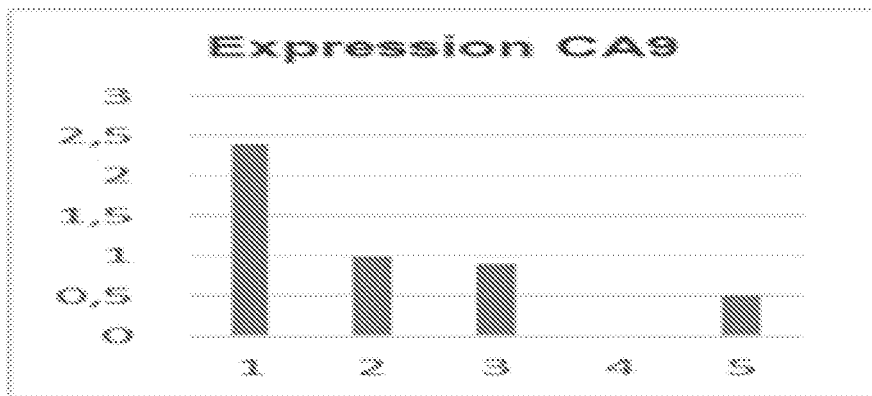
[Fig. 3G]



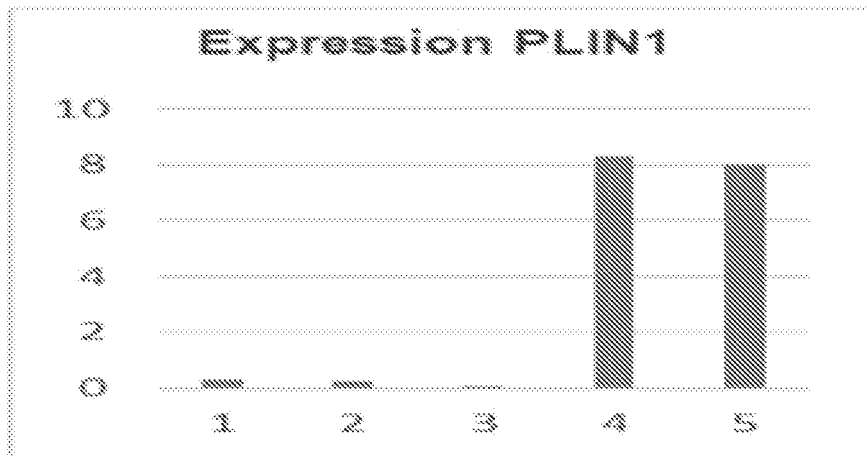
[Fig. 3H]



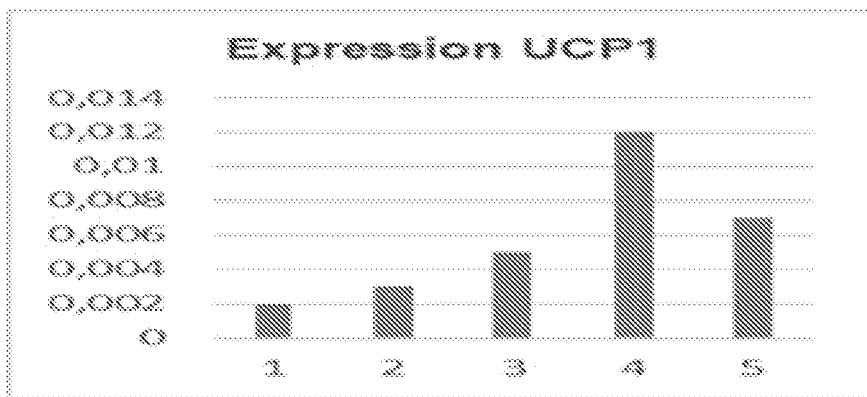
[Fig. 4A]



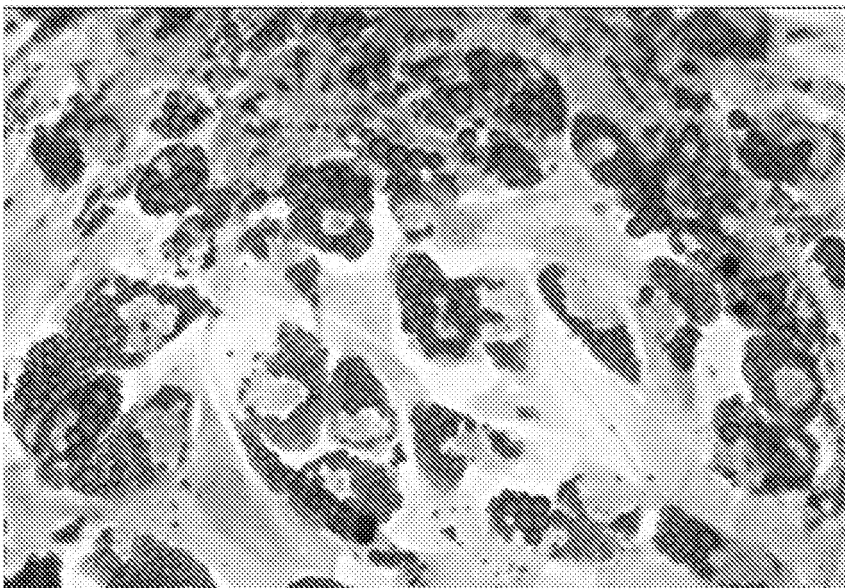
[Fig. 4B]



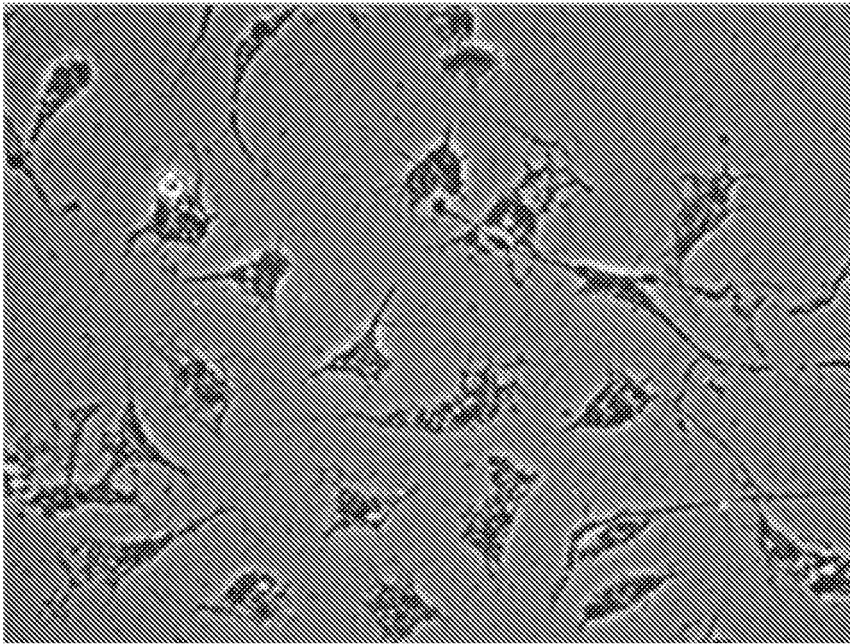
[Fig. 4C]



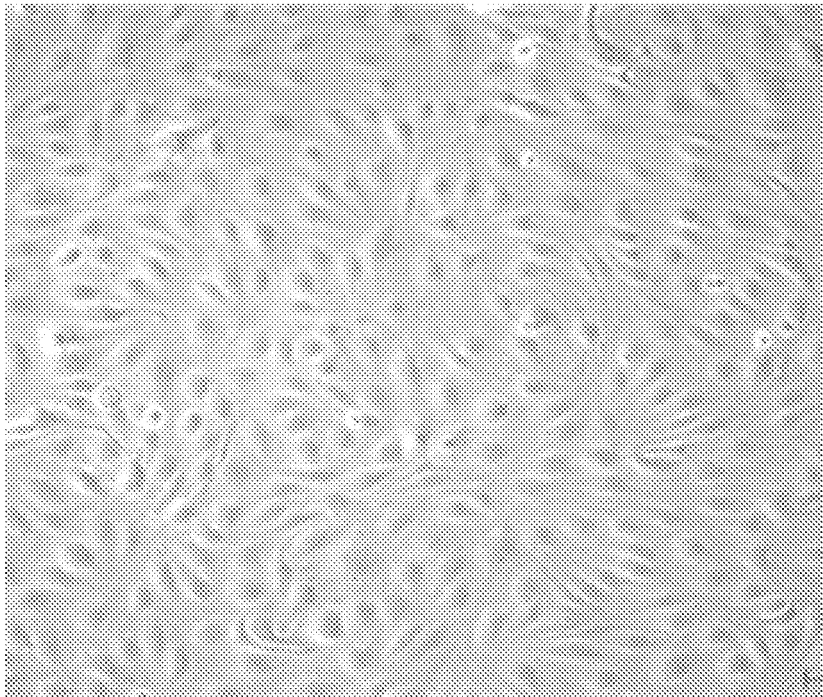
[Fig. 5A]



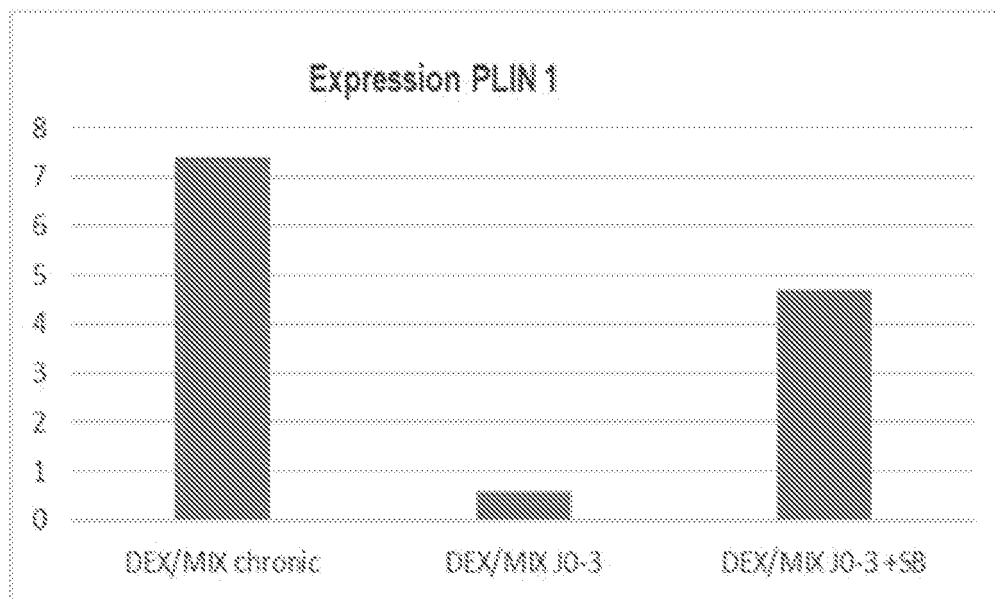
[Fig. 5B]



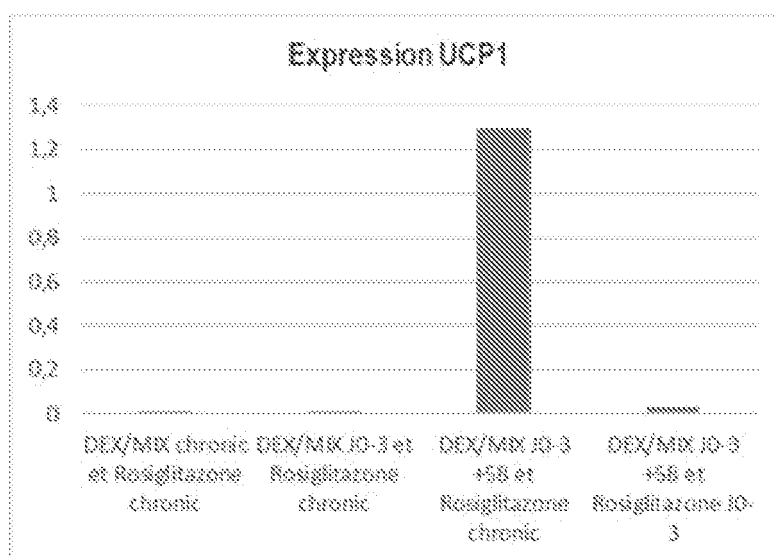
[Fig. 5C]



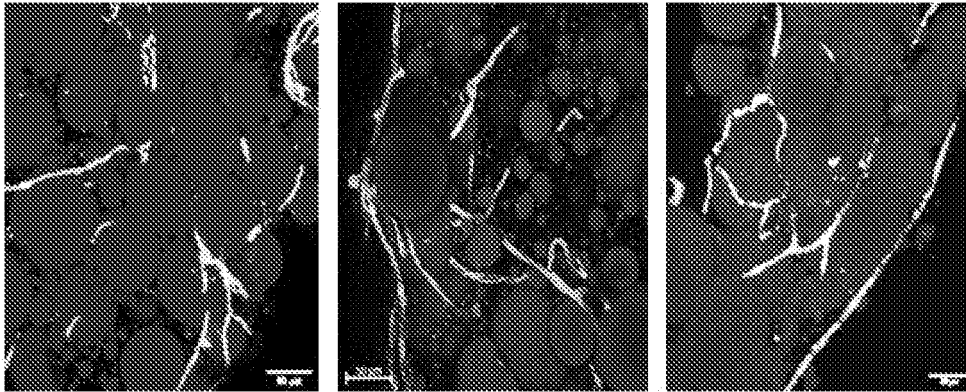
[Fig. 6A]



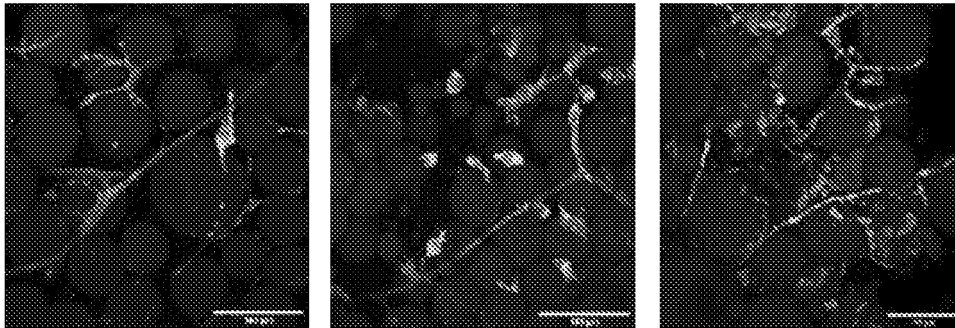
[Fig. 6B]



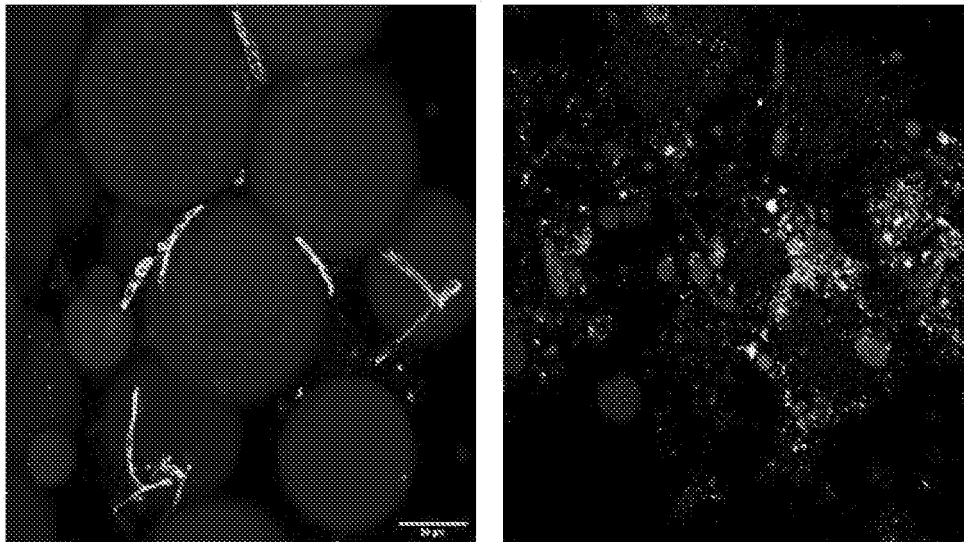
[Fig. 7A]



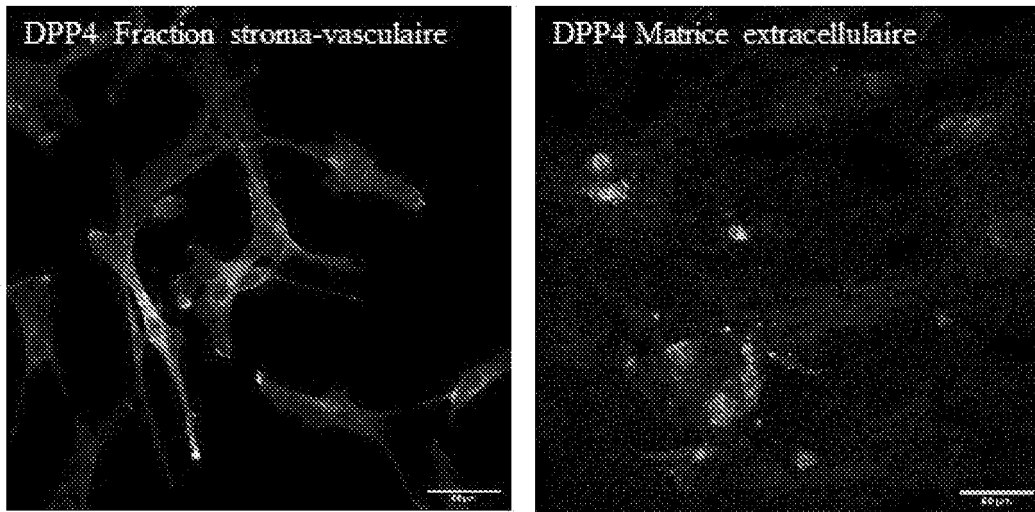
[Fig. 7B]



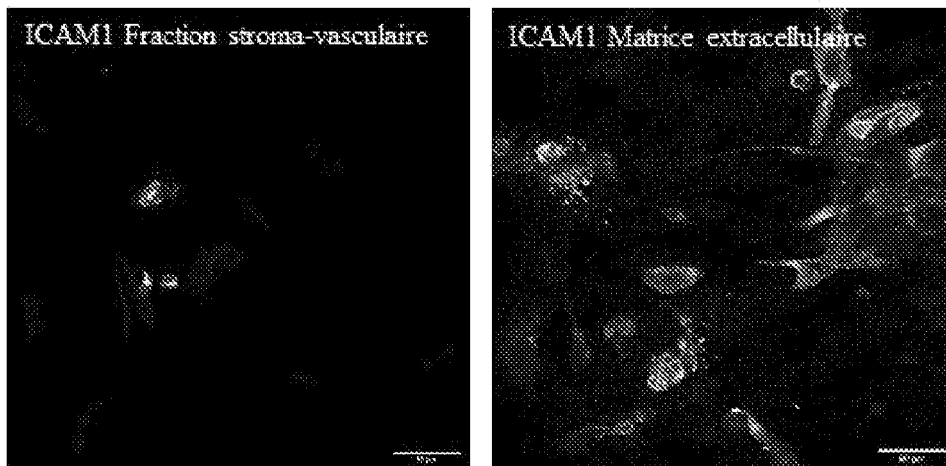
[Fig. 7C]



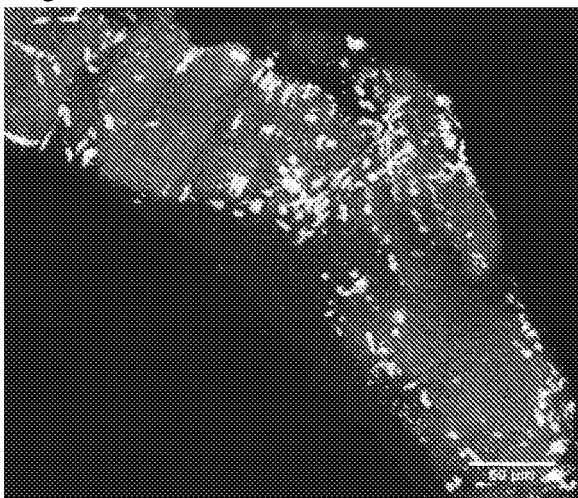
[Fig. 8A]



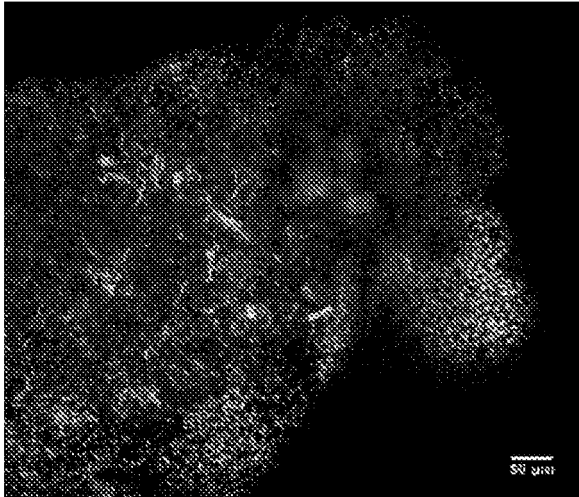
[Fig. 8B]



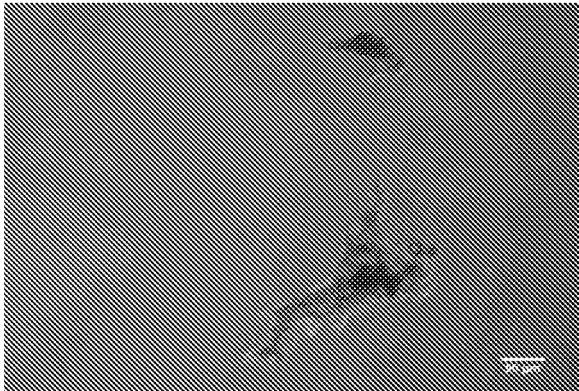
[Fig. 9A]



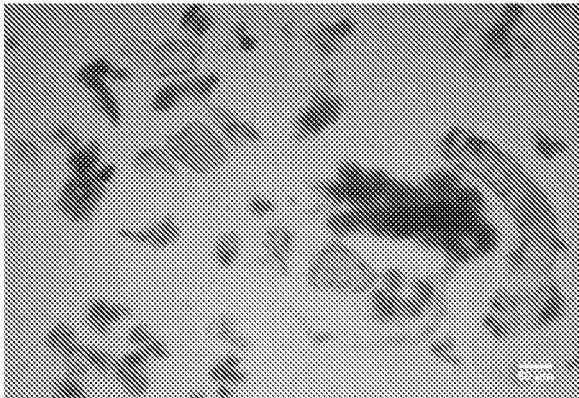
[Fig. 9B]



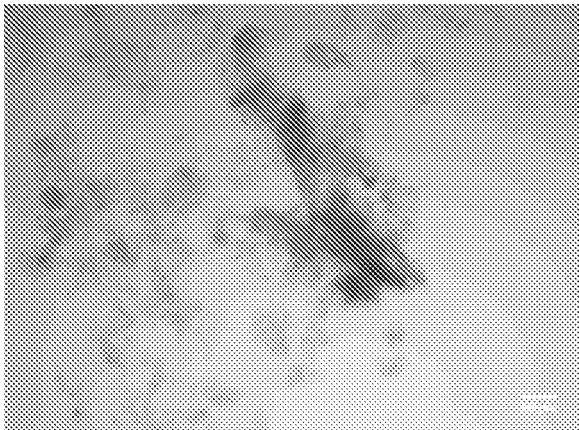
[Fig. 9C]



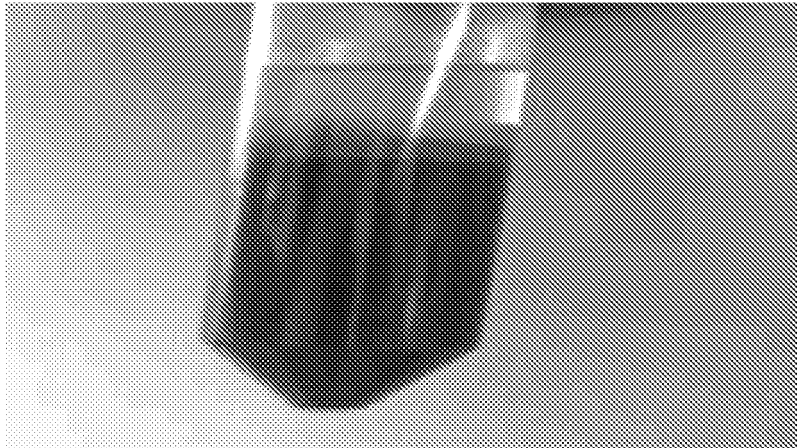
[Fig. 9D]



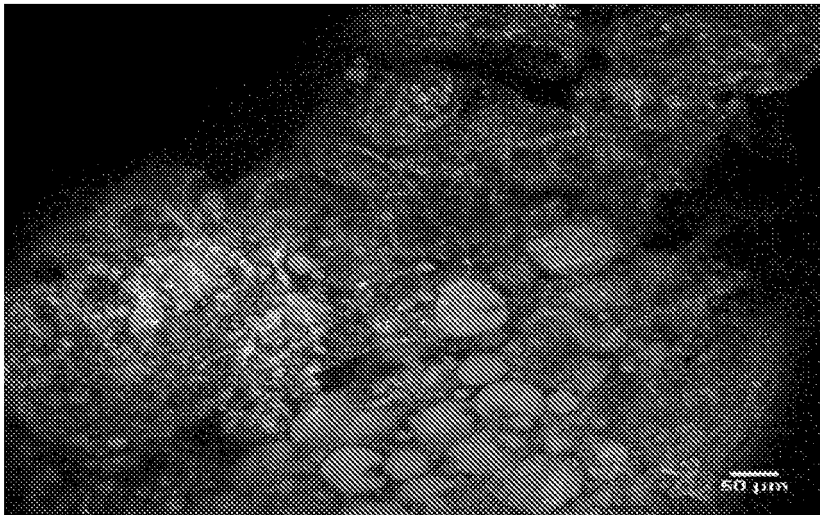
[Fig. 9E]



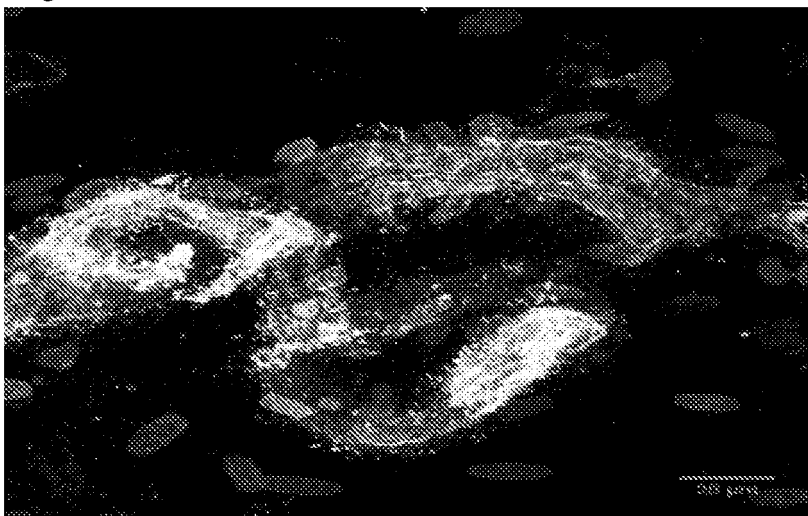
[Fig. 10A]



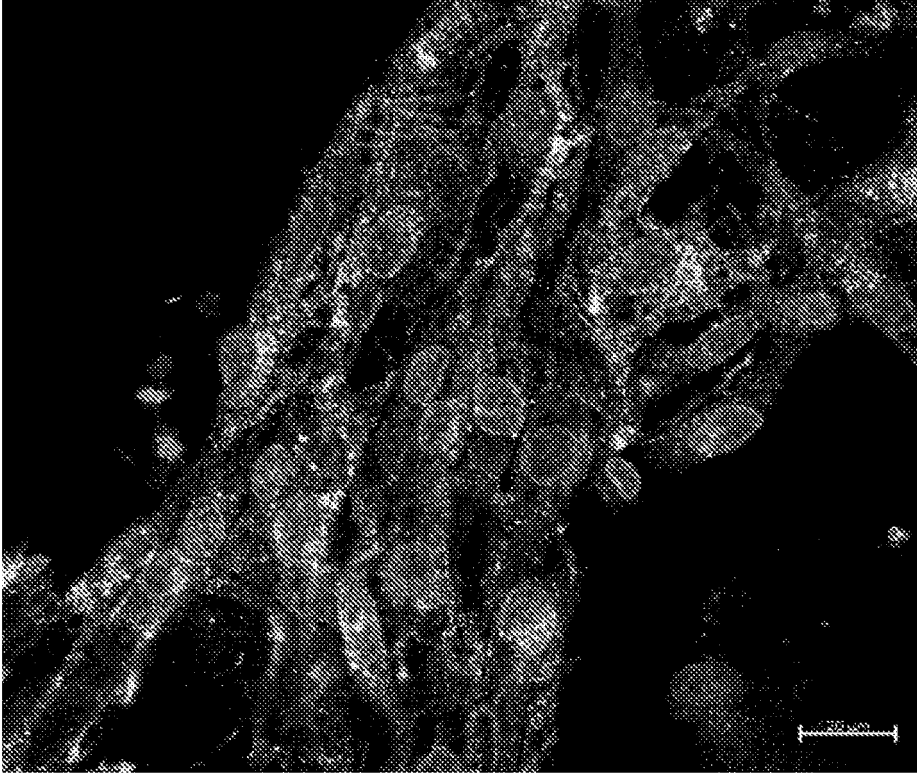
[Fig. 10B]



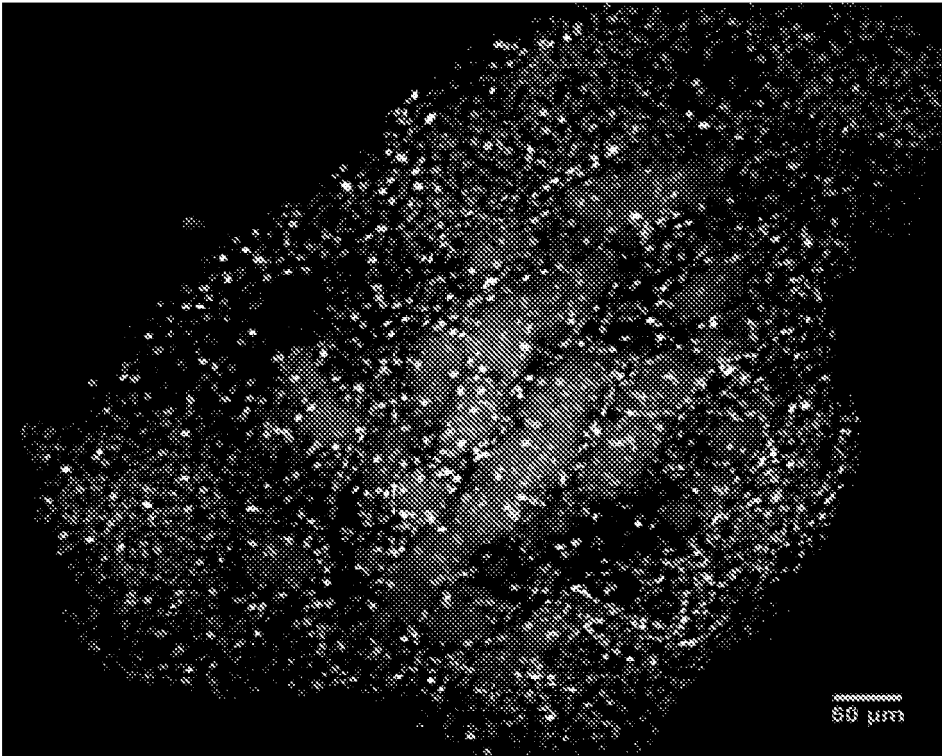
[Fig. 10C]



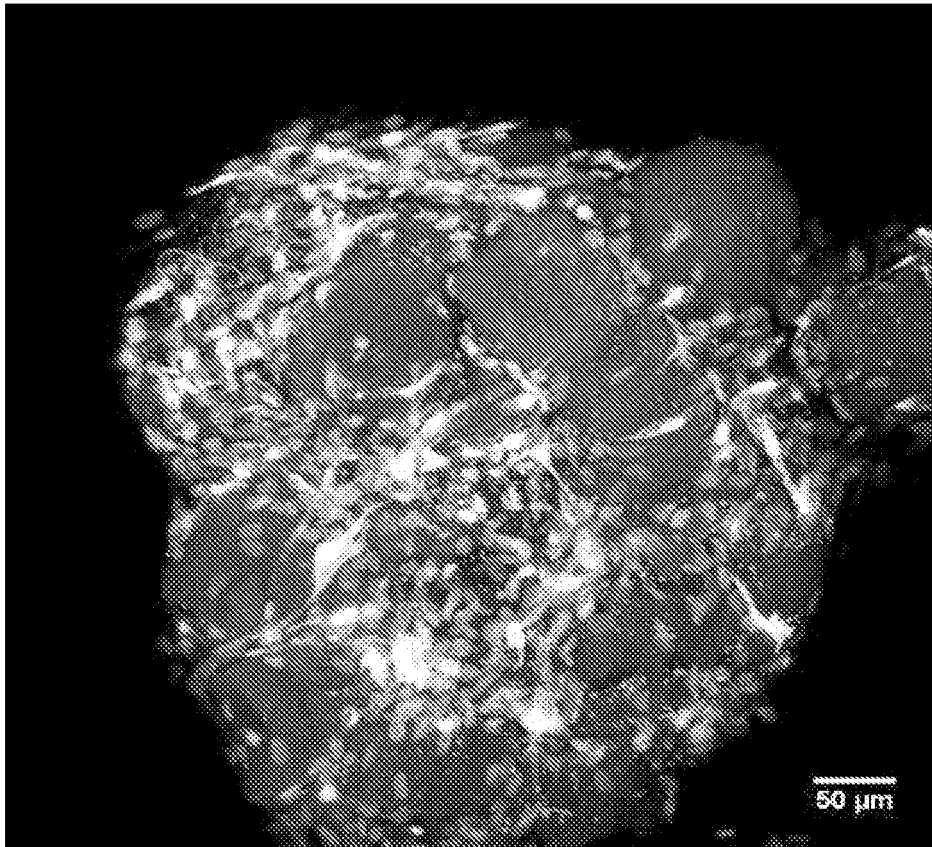
[Fig. 10D]



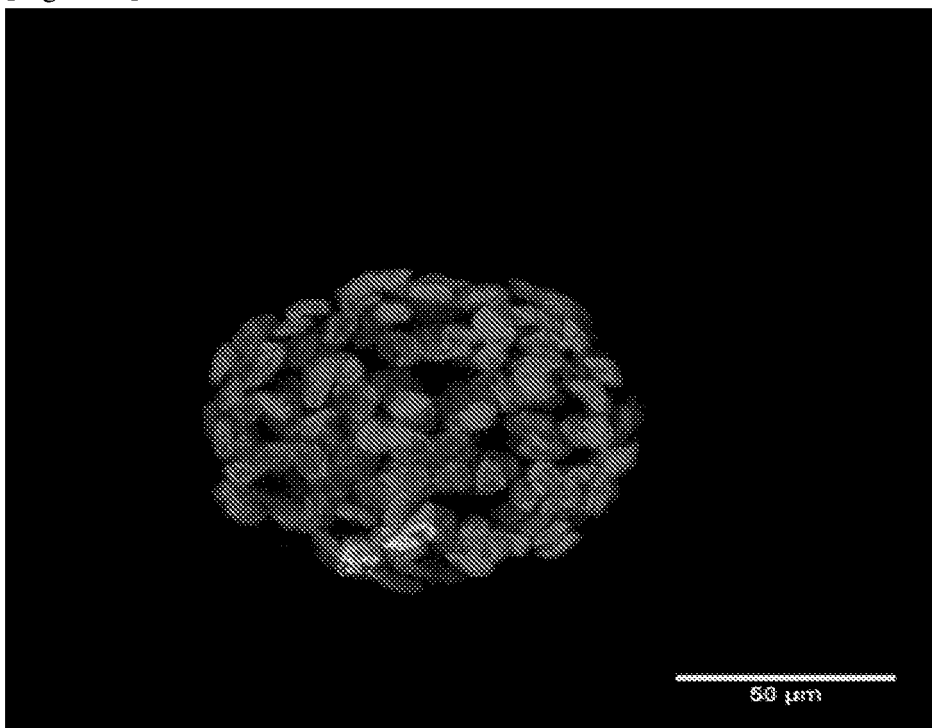
[Fig. 11]



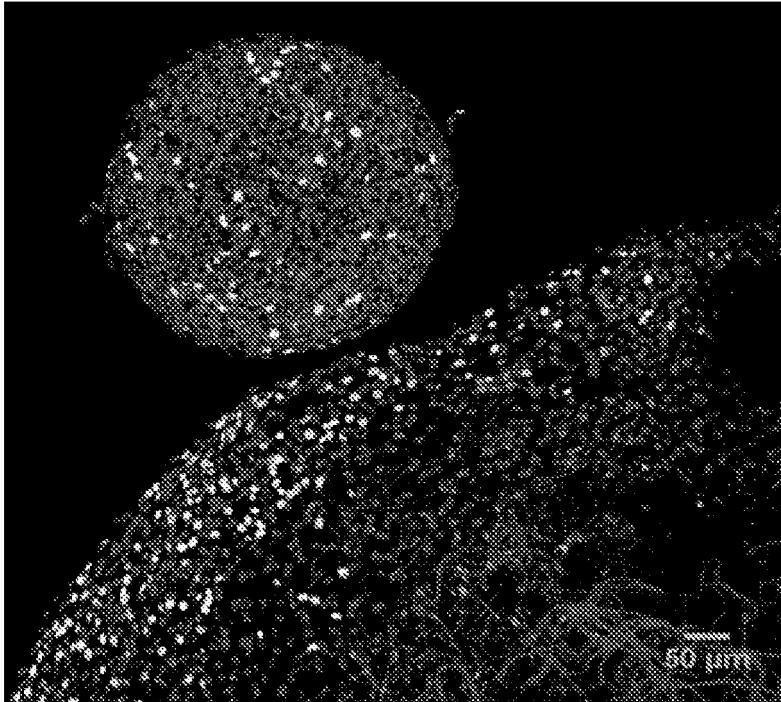
[Fig. 12]



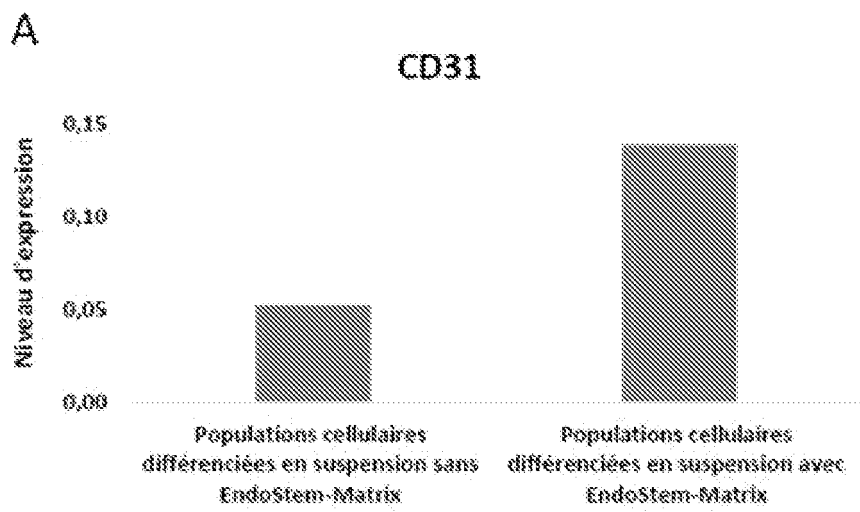
[Fig. 13A]



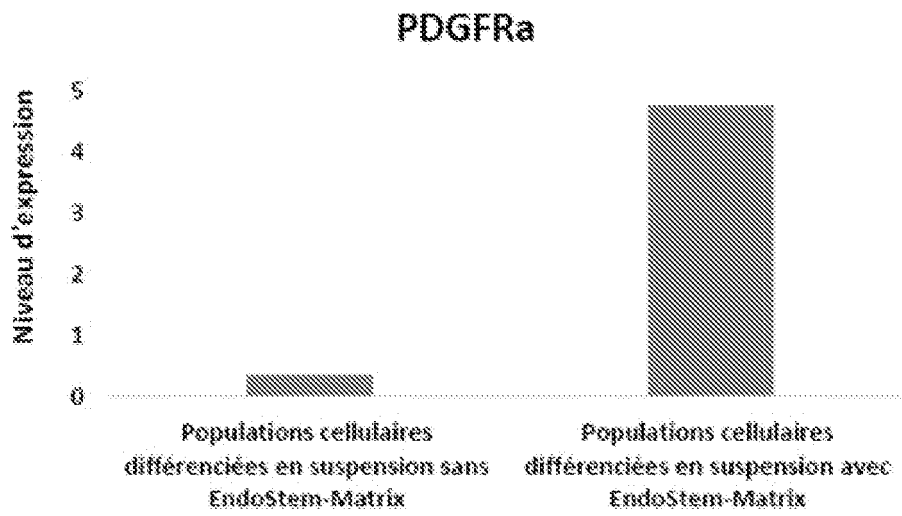
[Fig. 13B]



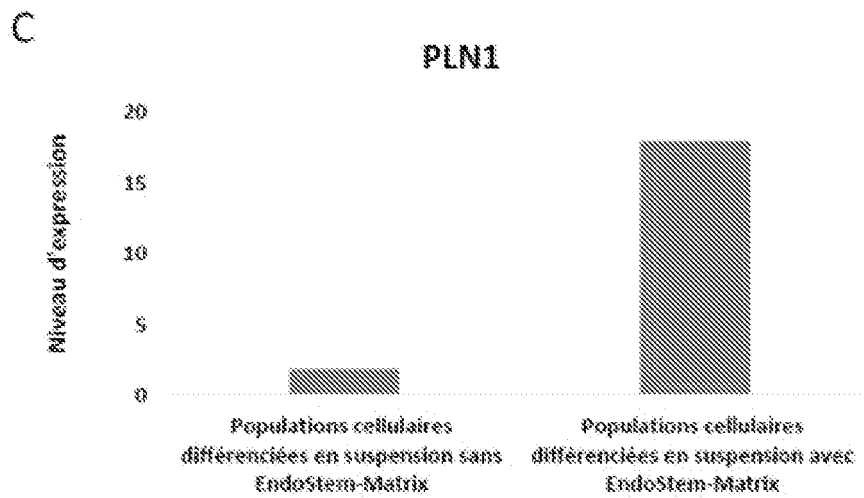
[Fig. 14A]



[Fig. 14B]

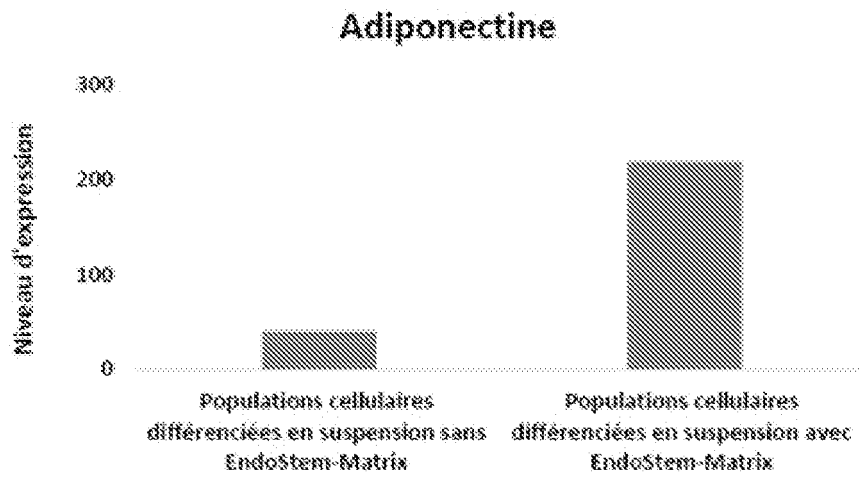


[Fig. 14C]

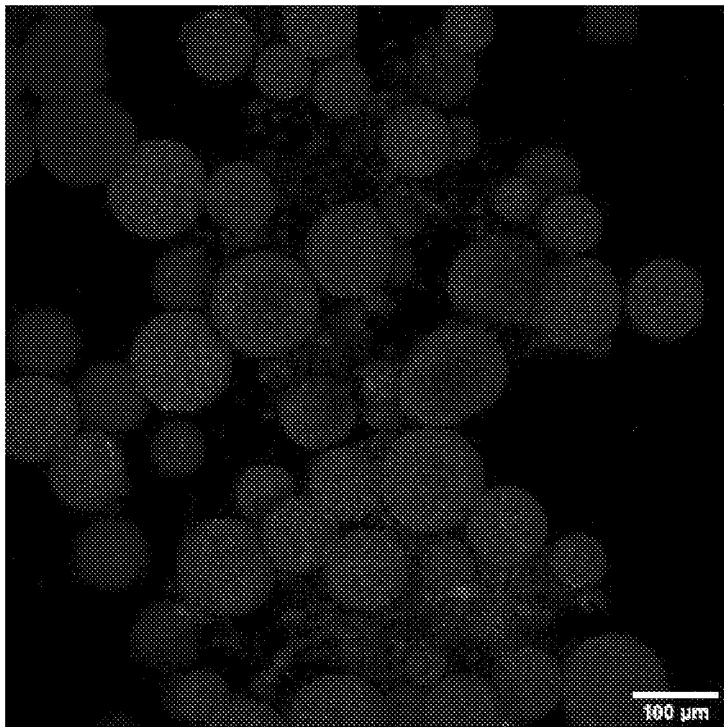


[Fig. 14D]

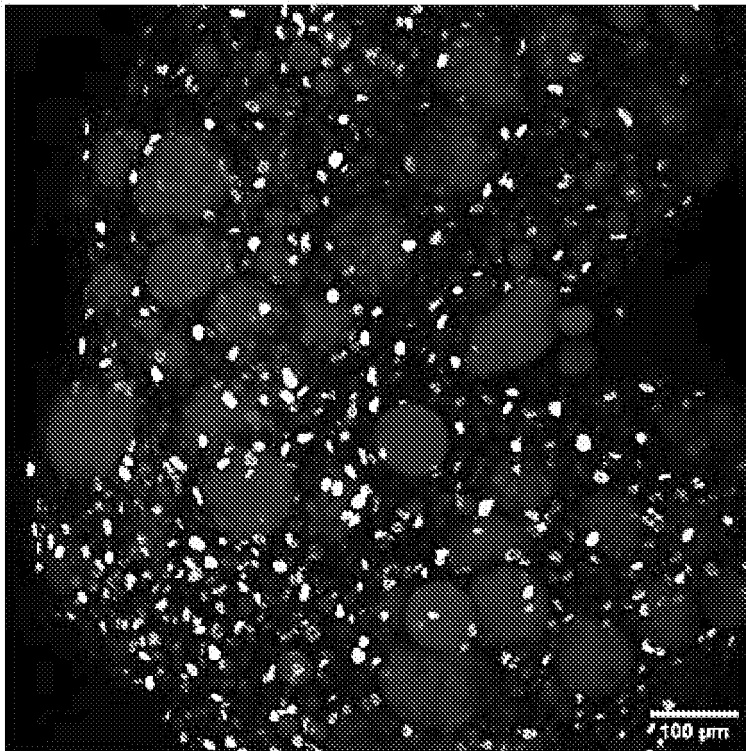
D



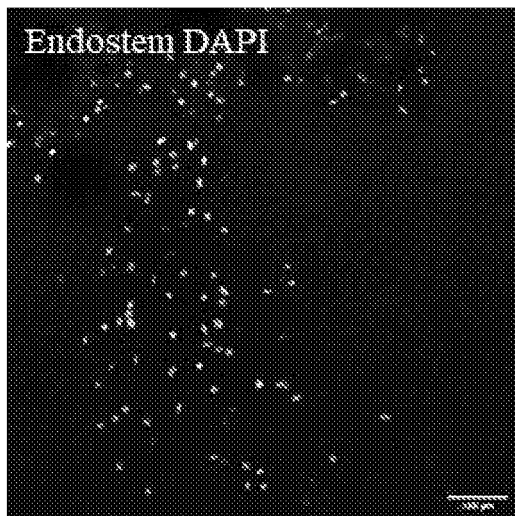
[Fig. 15A]



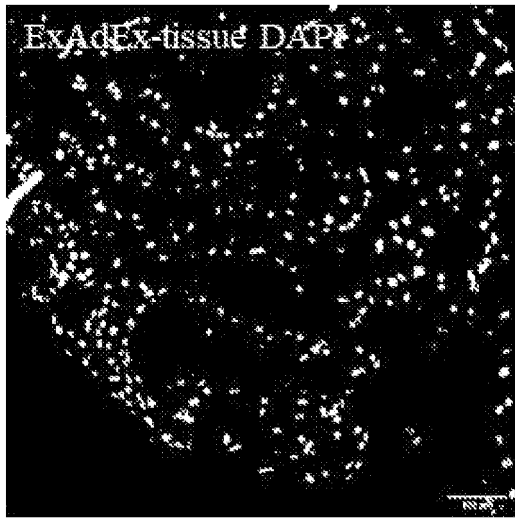
[Fig. 15B]



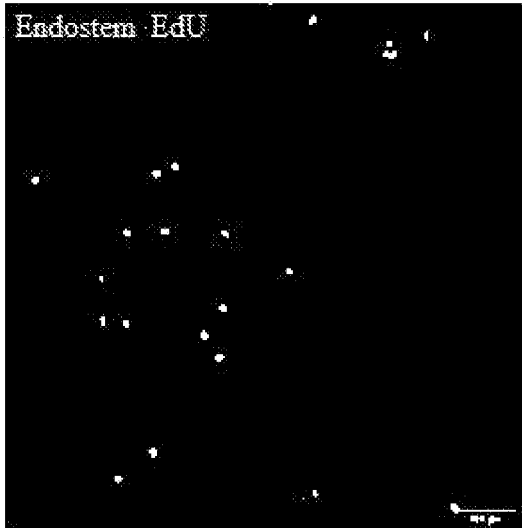
[Fig. 16A]



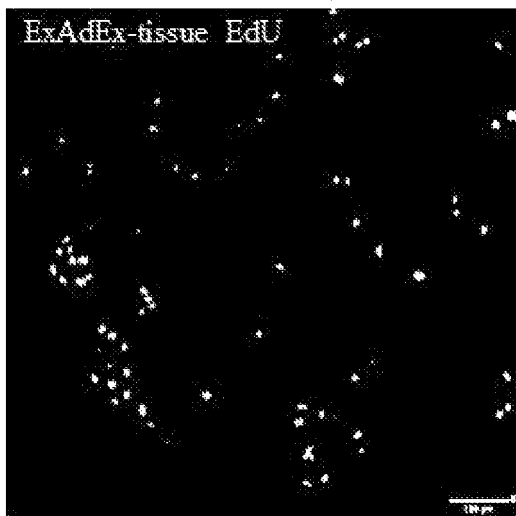
[Fig. 16B]



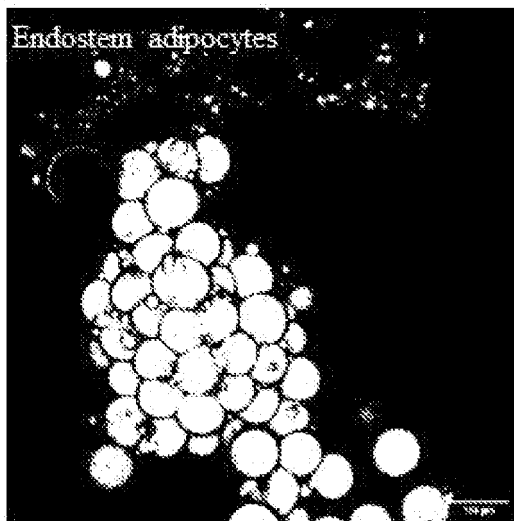
[Fig. 16C]



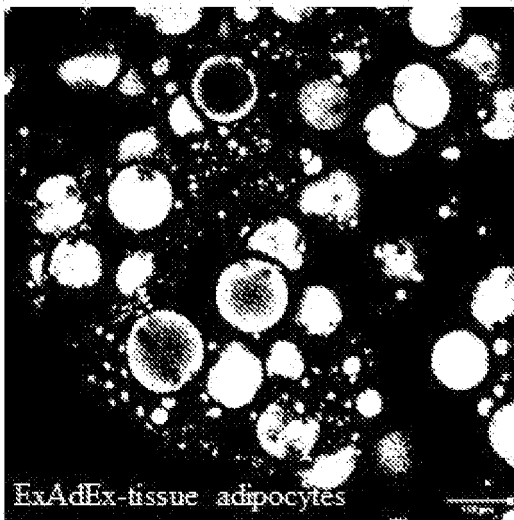
[Fig. 16D]



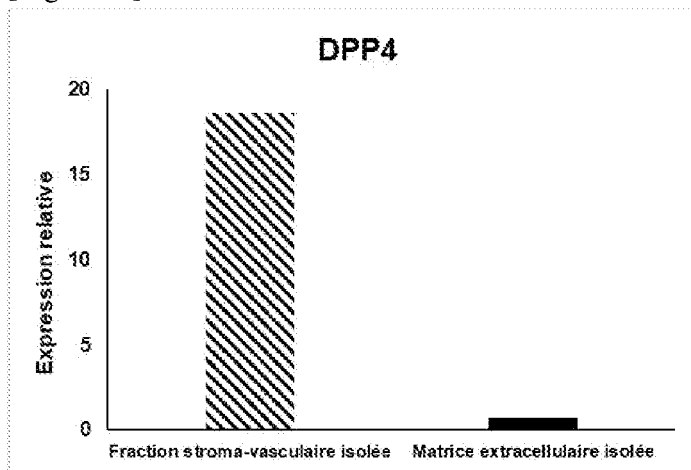
[Fig. 16E]



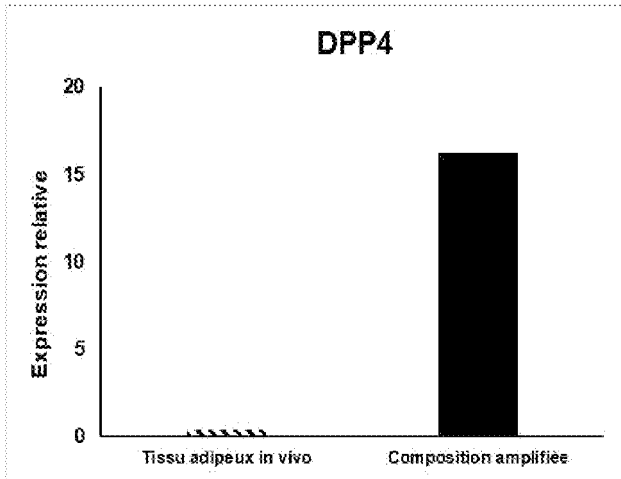
[Fig. 16F]



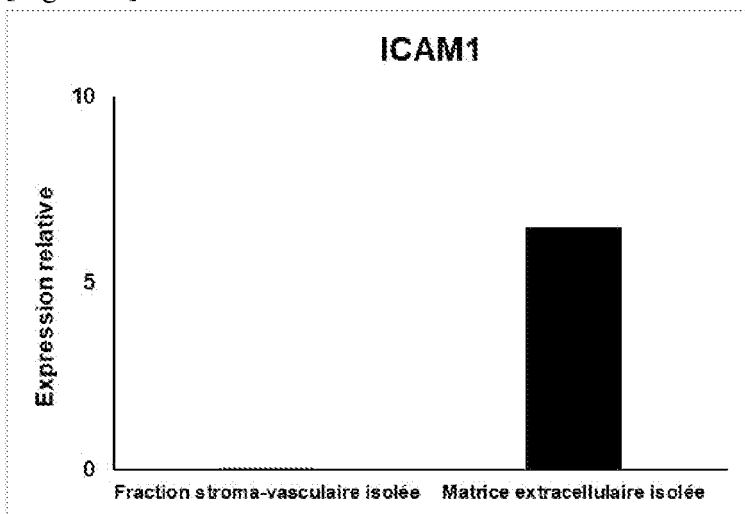
[Fig. 17A]



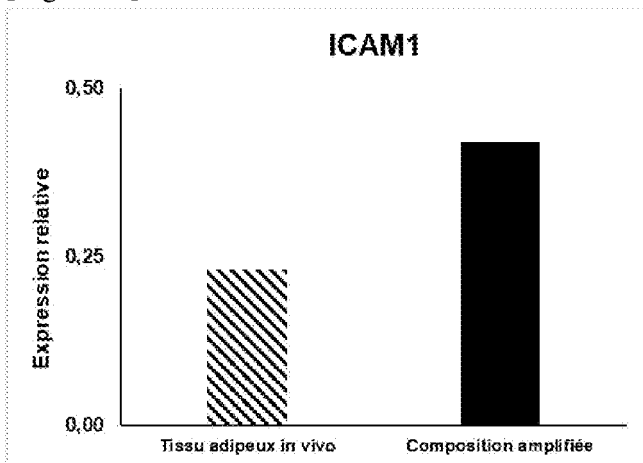
[Fig. 17B]



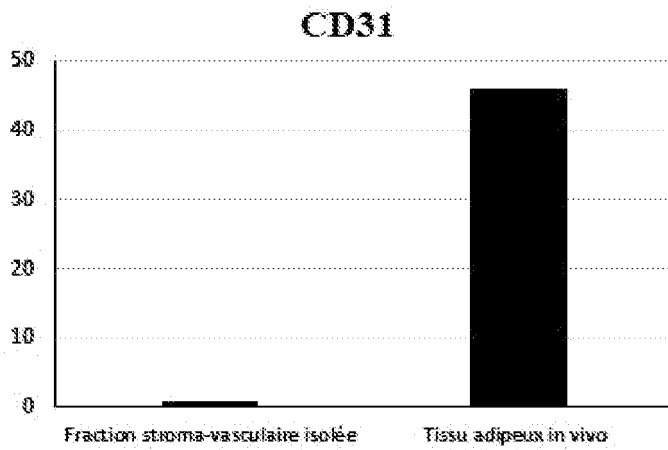
[Fig. 17C]



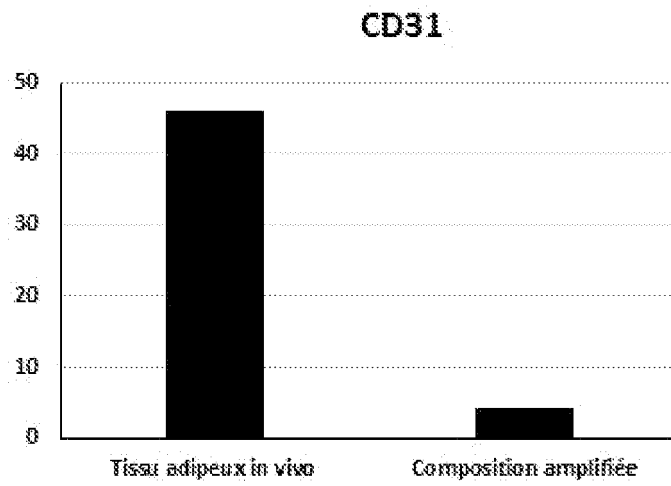
[Fig. 17D]



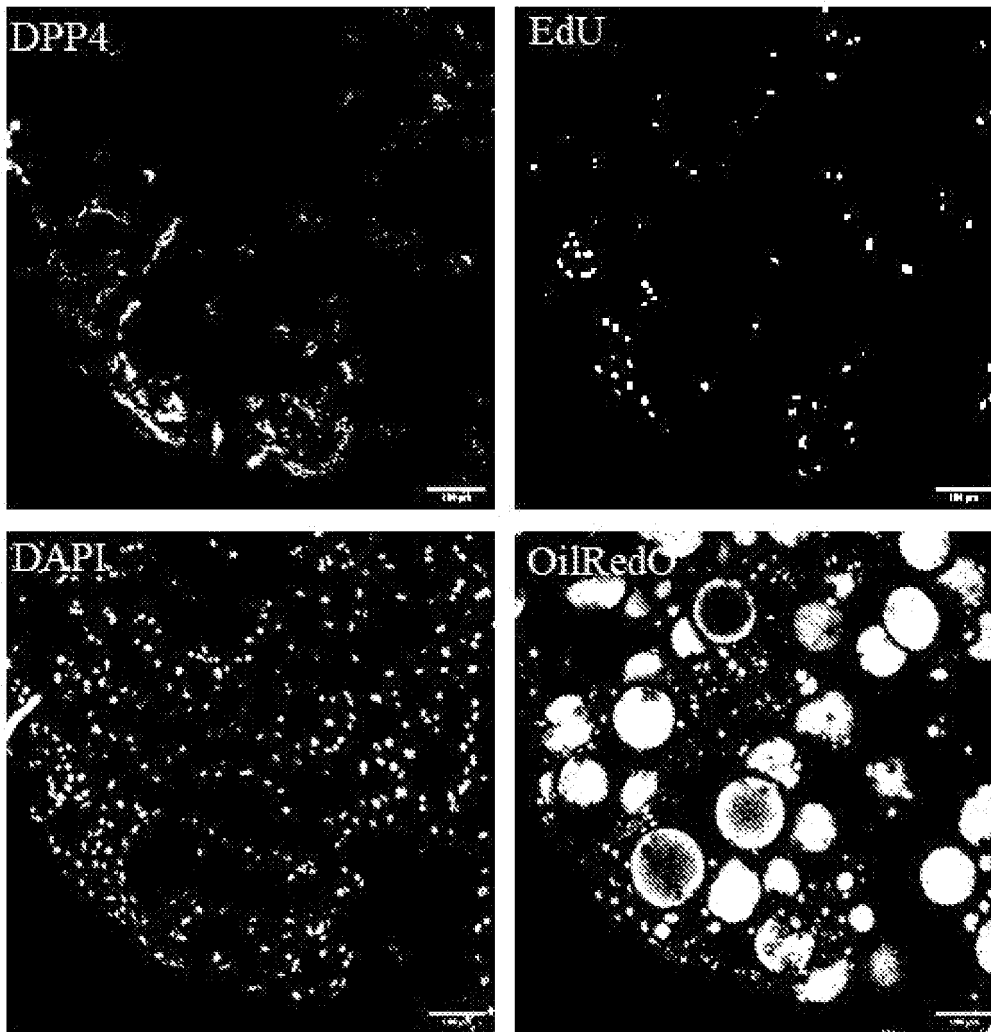
[Fig. 17E]



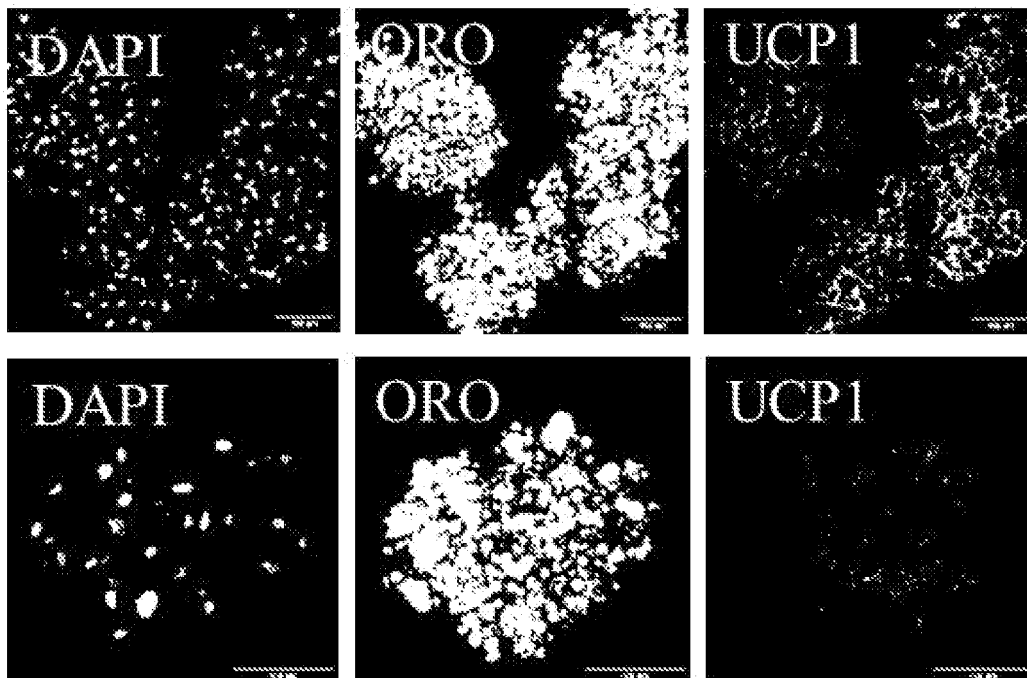
[Fig. 17F]



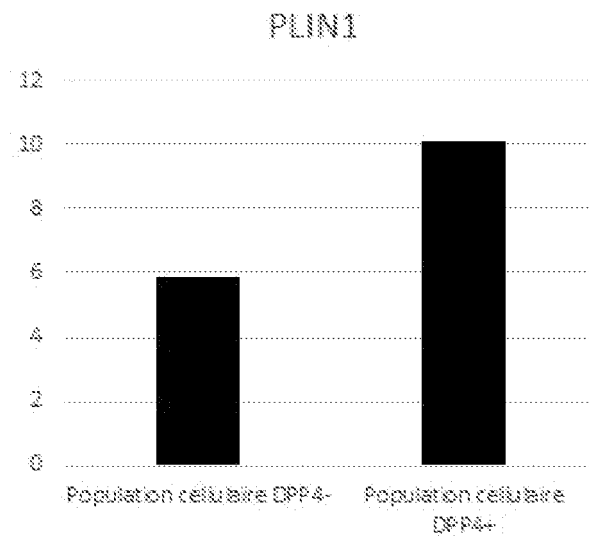
[Fig. 18]



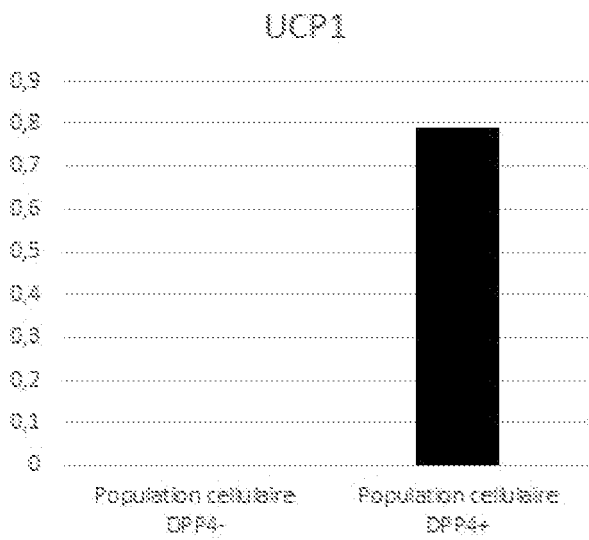
[Fig. 19]



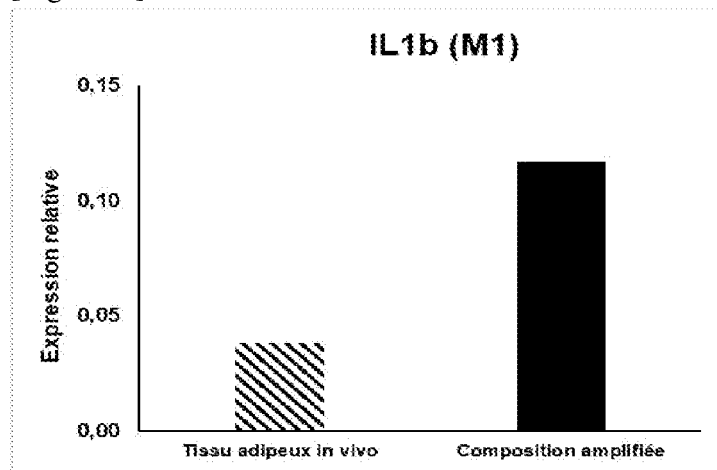
[Fig. 20A]



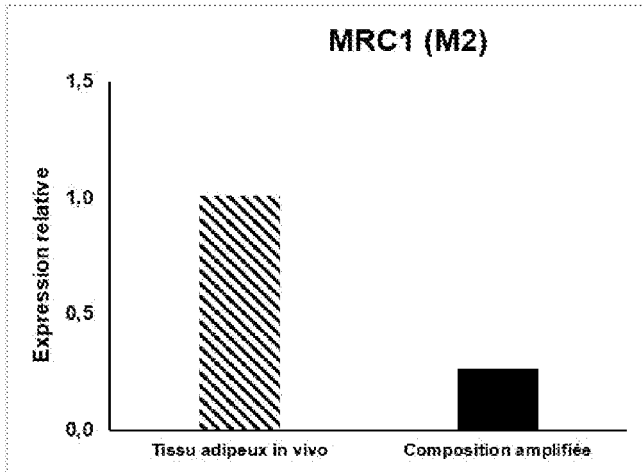
[Fig. 20B]



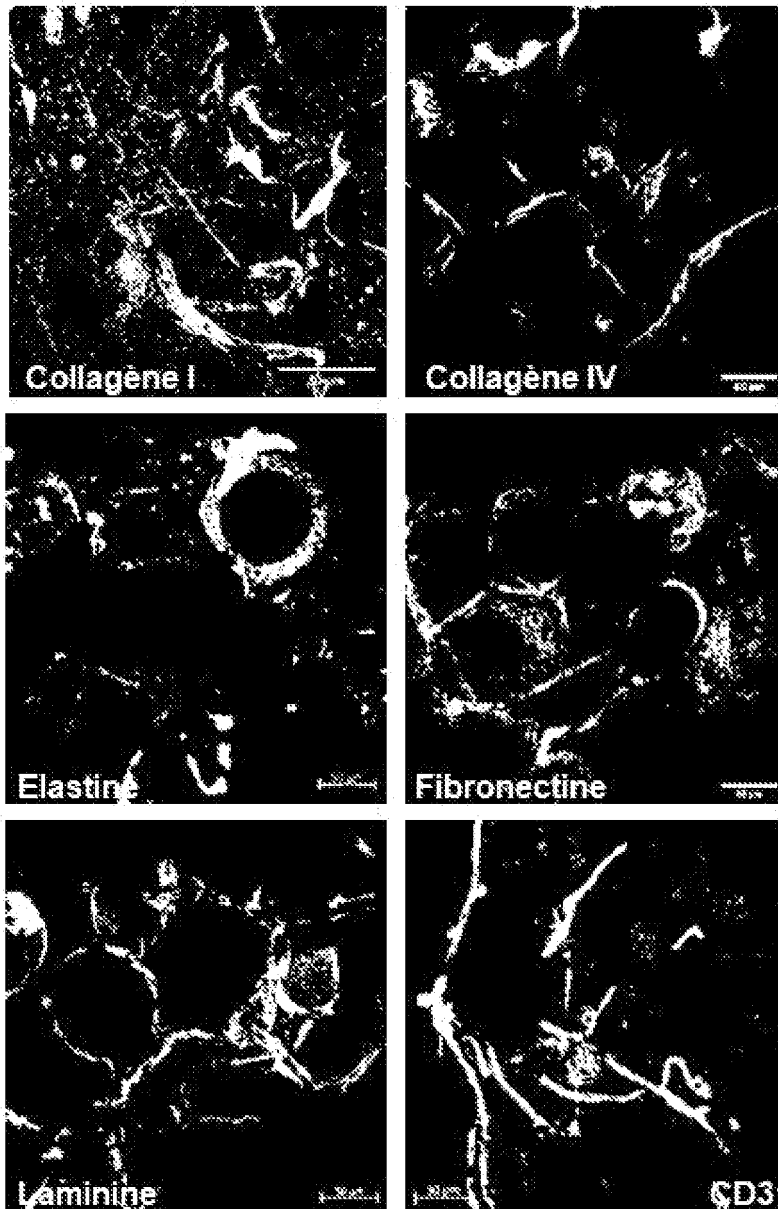
[Fig. 21A]



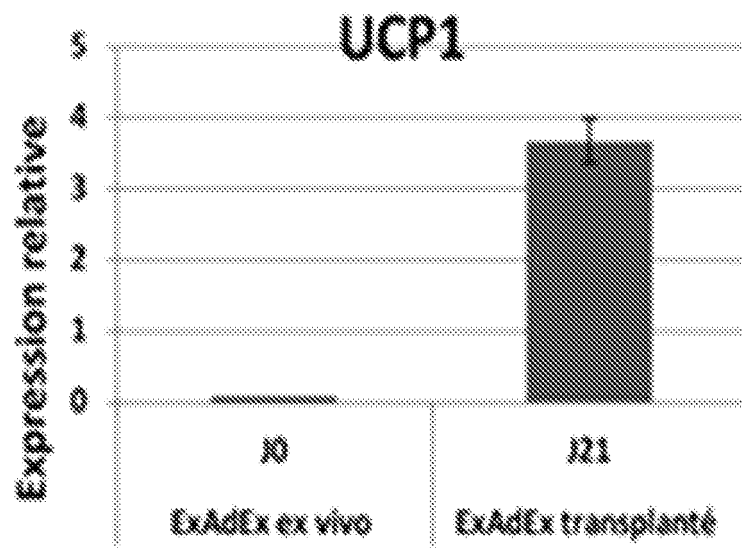
[Fig. 21B]



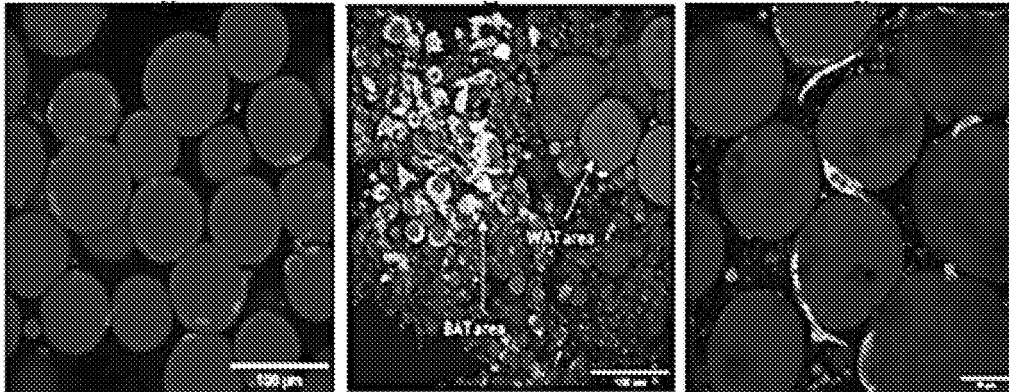
[Fig. 22]



[Fig. 23]



[Fig. 24]



**RAPPORT DE RECHERCHE
 PRÉLIMINAIRE**

 établi sur la base des dernières revendications
 déposées avant le commencement de la recherche
N° d'enregistrement
nationalFA 888769
FR 2007407

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
E	WO 2020/144381 A1 (UNIV COTE DAZUR [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR] ET AL.) 16 juillet 2020 (2020-07-16) * le document en entier * * revendications 1-18 * * exemples 1-3 *	1,3-18	C12N5/077 C12N5/0775 A61P3/04 A61P3/00 A61K35/35 G01N33/50
X	US 2018/216070 A1 (DESCHASEAUX FREDERIC [FR] ET AL) 2 août 2018 (2018-08-02) * le document en entier * * alinéa [0116] - alinéa [0117] * * revendications 1-45 *	19,20	
X	YAO YAO ET AL: "Adipose Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel : A Novel Adipose Tissue-Derived Injectable for Stem Cell Therapy", PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY, vol. 139, no. 4, 1 avril 2017 (2017-04-01) , pages 867-879, XP055637126, US ISSN: 0032-1052, DOI: 10.1097/PRS.00000000000003214	13-18	
Y	* le document en entier * * page 869; figure 1 * * page 871 - page 872 * ----- -/--	1-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 mai 2021		Zuber Perez, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date	
autre document de la même catégorie		de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		
		& : membre de la même famille, document correspondant	

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 888769
FR 2007407

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	CHOI J S ET AL: "Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 139, no. 1, 1 octobre 2009 (2009-10-01), pages 2-7, XP026519049, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2009.05.034 [extrait le 2009-05-28] * le document en entier * -----	1-12,16	
Y	CN 109 010 920 A (SICHUAN NEO LIFE STEM CELL BIOTECH INC) 18 décembre 2018 (2018-12-18) * le document en entier * * revendications 1-10 * -----	16	
A	MAROSJKA SPIEKMAN ET AL: "The power of fat and its adipose-derived stromal cells: emerging concepts for fibrotic scar treatment : Adipose tissue and ADSC for fibrotic scar treatment", JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE, vol. 11, no. 11, 3 février 2017 (2017-02-03), pages 3220-3235, XP055638160, US ISSN: 1932-6254, DOI: 10.1002/term.2213 * le document en entier * ----- -/--	1-21	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		7 mai 2021	Zuber Perez, C
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**RAPPORT DE RECHERCHE
 PRÉLIMINAIRE**

 établi sur la base des dernières revendications
 déposées avant le commencement de la recherche
N° d'enregistrement
nationalFA 888769
FR 2007407

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	PABLO BORA ET AL: "Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation", STEM CELL RESEARCH & THERAPY, vol. 8, no. 1, 15 juin 2017 (2017-06-15), XP055638162, DOI: 10.1186/s13287-017-0598-y * le document en entier * -----	1-21	
A	DAVID MERRICK ET AL: "Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue", SCIENCE, vol. 364, no. 6438, 25 avril 2019 (2019-04-25), page eaav2501, XP055679684, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aav2501 * le document en entier * -----	1-21	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 mai 2021		Zuber Perez, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2007407 FA 888769**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **07-05-2021**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2020144381 A1	16-07-2020	FR 3091707 A1	17-07-2020
		WO 2020144381 A1	16-07-2020

US 2018216070 A1	02-08-2018	BR 112018000470 A2	11-09-2018
		CA 2991523 A1	19-01-2017
		CN 108350423 A	31-07-2018
		EP 3320086 A1	16-05-2018
		HK 1250379 A1	14-12-2018
		US 2018216070 A1	02-08-2018
		WO 2017009263 A1	19-01-2017

CN 109010920 A	18-12-2018	AUCUN	
