

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

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
20 janvier 2022 (20.01.2022)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2022/013404 A1

(51) Classification internationale des brevets :  
C12N 5/077 (2010.01) C12N 5/071 (2010.01)  
C12N 5/0775 (2010.01)

(74) Mandataire : **MACQUET, Christophe** ; Arche des Dolines 7 rue Soutrane, 06560 Valbonne (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/EP2021/069888

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

(22) Date de dépôt international :  
15 juillet 2021 (15.07.2021)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
2007407 15 juillet 2020 (15.07.2020) FR

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

(71) Déposants : **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR] ; 3 rue Michel Ange 7 rue Soutrane, 75016 Paris (FR). **CHU DE NICE** [FR/FR] ; 4 Avenue Reine Victoria, 06200 Nice (FR). **ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG** [FR/FR] ; 20 avenue du Stade de France, 93210 Saint-Denis (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE** [FR/FR] ; 101, rue de Tolbiac, 75013 Paris (FR). **UNIVERSITE COTE D'AZUR** [FR/FR] ; 28 Avenue Valrose BP2135, 06100 Nice (FR). **UNIVERSITE TOULOUSE III - PAUL SABATIER** [FR/FR] ; 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9 (FR).

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

(72) Inventeurs : **DANI, Christian, Jean, Lucien** ; 19 avenue Bellevue, 06100 Nice (FR). **DANI, Vincent** ; 45b boulevard Gorbella Résidence Les Jardins de Gorbella Bât G, 06100 Nice (FR). **CASTELLA, Louis** ; 10bis chemin Basso Cambo, 31000 Toulouse (FR). **DOGLIO, Alain, Pierre, Louis** ; 3341 Route de l'Abadie, 06730 Saint André de la Roche (FR). **LETERTRE, Philippe** ; 343 chemin du Vieux Pont Le Clos Trastour, 06480 La Colle sur Loup (FR).

(54) Title: METHOD FOR THE IN VITRO OR EX VIVO AMPLIFICATION OF STEM CELLS OF BROWN OR BEIGE ADIPOCYTES

(54) Titre : PROCEDE D'AMPLIFICATION IN VITRO OU EX VIVO DE CELLULES SOUCHES D'ADIPOCYTES BRUNS OU BEIGES

(57) Abstract: The subject matter of the present invention is a method for the in vitro or ex vivo amplification of stem cells of brown or beige adipocytes. This method comprises the following steps: extracting, on the one hand, a stromal vascular fraction from human adipose tissue including endothelial cells of the vascular network of human adipose tissue and stem cells of brown or beige human adipose tissue and, on the other hand, an extracellular matrix of said human adipose tissue, said extracellular matrix comprising endothelial cells of the vascular network of human adipose tissue, stem cells of brown or beige human adipose tissue and collagen; mixing said stromal vascular fraction and said extracellular matrix; and culturing the mixture obtained in the preceding step, in suspension, in a culture medium.

(57) Abrégé : 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.



WO 2022/013404 A1

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

DOMAINE TECHNIQUE DE L'INVENTION

5

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  
10 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  
15 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.

20

ART ANTERIEUR

La thérapie cellulaire consiste en une greffe de cellules  
visant à restaurer les fonctions d'un tissu ou d'un organe  
25 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  
30 particulier, à partir de cellules souches multipotentes  
provenant du patient lui-même.

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  
5 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  
10 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.

15 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  
20 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  
25 quasi-inexistence constitue un facteur aggravant, si ce n'est causal majeur, des dérèglements métaboliques notamment, mais non exclusivement, liés au surpoids.

Dans ce contexte, il existe un besoin de réaliser des  
30 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.

5 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  
10 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  
15 qui jouent un rôle essentiel à la fois pour la vascularisation du greffon et la physiologie de l'adipocyte.

La dissociation non-enzymatique du tissu adipeux apparaît  
20 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  
25 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  
30 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.

Il a été proposé différentes matrices synthétiques pour y  
ensemencer les précurseurs d'adipocytes et ainsi essayer  
de reconstituer au mieux la structure du tissu adipeux.  
5 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  
10 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  
15 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  
20 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.

25 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  
30 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.

5

## RESUME DE L'INVENTION

Compte tenu de ce qui précède, un problème technique que se propose de résoudre l'invention est d'obtenir in vitro  
10 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.

La solution de l'invention à ce problème technique a pour  
15 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  
20 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  
25 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  
30 mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension, dans un milieu de prolifération cellulaire.

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.

Avantageusement, - 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.

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 pour obtenir des adipocytes bruns ou beiges.

Avantageusement, - la différenciation des cellules souches du tissu adipeux est induite dans un milieu de différenciation ; - 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  
5 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  
10 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  
15 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  
20 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  
25 étape de tri-cellulaire visant à trier les cellules souches exprimant le marqueur de surface DPP4.

Selon un troisième objet, l'invention concerne une matrice extracellulaire isolée susceptible d'être obtenue selon le  
30 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.

Selon un quatrième objet, l'invention concerne une composition comprenant un mélange de la matrice extracellulaire telle que ci-dessus et d'une fraction  
5 stroma-vasculaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux et des cellules souches du tissu adipeux humain.

Selon un cinquième objet, l'invention concerne un kit  
10 comprenant la composition telle que définie ci-dessus, un milieu de prolifération cellulaire et un milieu de différenciation.

Selon un sixième objet, l'invention concerne l'utilisation  
15 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.

Selon un septième objet, l'invention concerne des  
20 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.

Selon un huitième objet, l'invention concerne des  
25 adipocytes bruns ou beiges issus d'une composition telle que ci-dessus, pour le traitement de l'obésité.

Selon un neuvième objet, l'invention concerne un milieu de  
30 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.

#### BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

10

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description non limitative qui suit, rédigée au regard des dessins annexés, dans lesquels :

15

- la figure 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 ;

20

- la figure 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 ;

25

30

- la figure 1C est une illustration de produits selon l'invention, à savoir le produit dénommé ExAdEx-tissu, 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 ;

5 - la figure 1D illustre les étapes d'obtention du produit ExAdEx-lobules à partir du produit ExAdEx-tissue selon le procédé de l'invention ;

10 - les figures 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 $\alpha$ , Inhibine beta A, MSCA1, IL1b(macrophages M1), MRC1(macrophages M2) ;

15

20 - les figures 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 ;

25 - les figures. 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  
30 de différenciation testés selon le procédé de l'invention ;

- 5 - les figures 5A, 5B et 5C sont des images de microscopie optique qui montrent, respectivement, que le milieu de différenciation permet une différenciation en adipocytes (figure 5A), qu'il est toxique pour les cellules endothéliales en présence de dexaméthasone et de l'IBMX (figure 5B), mais qu'il ne l'est pas, lorsqu'on retire ces composés dudit milieu (figure 5C) ;
- 10 - les figures 6A et 6B sont des figures qui illustrent l'expression de PLIN1 et de UCP1 dans différents milieux de différenciation selon l'invention ;
- 15 - les figures 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 (figure 7A), DPP4 (figure 7B) et ICAM1 (figure 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) ;
- 25 - les figures 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 ;
- 30 - la figure 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) ;

5 - la figure 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) ;

10 - la figure 9C caractérise, en microscopie, le type fibreux de la matrice M1 ;

- la figure 9D montre, par microscopie, que la matrice M2 est hétérogène en termes de types matricielles : type fibreux et type riche en collagène ;

15

- la figure 9E est une image de microscopie illustrant le type fibreux de la matrice M3 ;

20 - la figure 10A est une photographie du tissu adipeux centrifugé de la fraction A après dissociation mécanique contenant la matrice M4 ;

25 - la figure 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) ;

30 - la figure 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) ;

- la figure 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) ;
- 5 - la figure 11 montre, par incorporation d'Edu, 5-ethynyl-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  
10 (gris foncé), cellules en prolifération (blanc) auto-fluorescence de la matrice (gris clair) ;
- la figure 12 montre que des cellules souches du tissu adipeux exogènes, mises en coculture avec la matrice  
15 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 co-culture, noyaux (gris foncé), collagène (gris clair), cellules souches exogènes du tissu adipeux  
20 (gris clair/blanc) ;
- la figure 13A montre l'absence de prolifération de cellules lors de la culture cellulaire des cellules souches du tissu adipeux et des cellules endothéliales en  
25 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) ;
- 30 - la figure 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) ;

5 - la figure 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 ;

10

- la figure 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 ;

15

- la figure 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 ;

20

- la figure 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 ;

25

- les figures 15A et 15B sont des images qui mettent en évidence l'activation des capacités de prolifération du procédé selon l'invention. En figure 15A, un tissu adipeux non dissocié ne montre pas de cellules en prolifération. En figure 15B, la composition montre des cellules en

30

prolifération, les noyaux des cellules en prolifération étant représentés en blanc sur cette figure ;

5 - les figures 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 (figures 16A, 16C, 16E) et avec l'ajout de cette fraction stroma-vasculaire (figures 16B, 16D, 16F) après 20 jours  
10 de culture dans le milieu de prolifération ;

- les figures 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  
15 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) ;

20 - la figure 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 ;

25 - la figure 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  
30 présentent pas ce marqueur DPP4 (trois photographies du bas) ;

- 5 - les figures 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 (Figure 20A) et du marqueur UCP1 (Figure 20B) ;
- 10 - les figures 21A et 21B illustrent la présence de macrophages de type M1 et de type M2 respectivement, dans la composition amplifiée selon l'invention ;
- 15 - la figure 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 ;
- 20 - la figure 23 montre l'expression relative de l'UCP1 humain, au jour J0, soit avant transplantation du produit ExAdeX-tissu amplifié et au jour J21, dans le produit ExAdeX-tissu, après transplantation chez la souris ;
- 25 - la figure 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, et la photographie de droite montrant la présence d'adipocytes bruns/beiges ex vivo, après la mise
- 30 en œuvre de l'invention, chez un patient, avec une obésité sévère ;

- 5 - les figures 25A, 25B et 25C montrent la viabilité de cellules souches du tissu adipeux après purification de la fraction stroma-vasculaire, directement après incubation dans un tampon de lyse 1X, nommé ACL, comprenant du chlorure d'ammonium (figure 25A), après 24h de culture (figure 25B) et après 5 jours en conditions de culture adhérente (figure 25C) ;
- 10 - les figure 26A, 26B, 26C et 26D présentent les résultats graphiques de l'analyse par cytométrie en flux du nombre de cellules viables et mortes après différents temps de traitements dans un tampon de lyse 1X, nommé ACL, comprenant du chlorure d'ammonium ;
- 15 - les figures 27A, 27B et 27C montrent la viabilité de cellules endothéliales du tissu adipeux après purification de la fraction stroma-vasculaire, directement après incubation dans un tampon de lyse 1X, nommé ACL, comprenant du chlorure d'ammonium (figure 27A), après 24h de culture (figure 27B) et après 5 jours en conditions de culture adhérente (figure 27C) ;
- 20 - la figure 28 présente le profil des cellules souches du tissu adipeux, amplifiées selon le procédé ExAdEx de l'invention, obtenu par détermination par cytométrie en flux des marqueurs de surface cellulaire ;
- 25 - les figures 29A et 29B présentent les profils des ASCs du tissu adipeux ex vivo (figure 29A) et du produit amplifié ExAdEx (figure 29B) obtenu par détermination des marqueurs de surface cellulaire obtenu par cytométrie en flux ;
- 30

- les figures 30A, 30B et 30C montrent des cellules endothéliales isolées du tissu adipeux humain qui sont cultivées dans le milieu de prolifération décrit dans l'invention (figure 30A), dans le milieu de  
5 différentiation décrit dans l'invention (figure 30B) et dans un milieu de différentiation standard non optimisé qui comprend du DMEM et du sérum (figure 30C).

- la figure 31 présente une visualisation en blanc, d'un  
10 réseau vasculaire fonctionnel de la composition décrite dans l'invention après transplantation chez la souris Nude (4 semaines post greffe) ; et

- la figure 32 présente une comparaison des capacités de  
15 viabilité et d'amplification des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux selon un procédé ne comprenant pas l'ajout de la fraction stroma-vasculaire (A) et comprenant la purification puis l'ajout des cellules isolés de l'infranatant, également nommé dans  
20 l'invention fraction stroma vasculaire (B).

#### DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Le tissu adipeux est fourni pour réaliser l'invention. Il  
25 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.

30 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 (Figure 1A, étapes 1-2 et Figure 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 (Figure 1A, étape 3 et Figure 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 (Figure 1A, étape 3 et Figure 1B, étape 4) ; mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire (Figure 1A, étape 4 et Figure 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).

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. La fraction stroma-vasculaire selon l'invention, également nommée infranatant, est avantageusement issue des étapes 2 et 3 décrites sur la figure 1B, et est riche en cellules DPP4<sup>+</sup>.

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 (Figure 22) et des cellules endogènes, comprenant  
5 notamment des cellules endothéliales (Figure 10C), des cellules souches du tissu adipeux (Figure 10D), des adipocytes et des macrophages. La Figure 11 montre la présence de cellules en prolifération dans la matrice extracellulaire (marquage Edu en blanc). Cette matrice  
10 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 ».

15

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  
20 (voir les figures 9A et 9B montrant des fibres de collagène fibrillaire marqué par le PicroSirius Red et la figure 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  
25 adipeux comprennent en outre notamment de la fibronectine, de l'élastine, de la laminine et du collagène de type IV (Figure 22).

L'extraction de la matrice extracellulaire comprend une  
30 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  
5 cela est montré à la Figure 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  
10 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.

15 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  
20 stroma-vasculaire ; et dissociation mécanique de la fraction A pour obtenir la matrice extracellulaire (Figure 1A).

L'étape de centrifugation du tissu adipeux humain permet  
25 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.

30 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 (Figure 1B).

15

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.

25

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. Cette

30

étape d'élimination est réalisée lors d'une incubation du tissu adipeux et/ou des culots cellulaires dans un tampon de lyse 1X comprenant du chlorure d'ammonium (« Ammonium chlorure lysing solution », Becton Dickinson™ - nommé ACL) 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. Les figures 25A, 25B et 25C ainsi que les figures 26A, 26B, 26C et 26D présentent l'effet, sur les cellules souches du tissu adipeux, du traitement ACL. Il en résulte qu'une incubation dans l'ACL, sur une période de temps supérieure à 5 minutes, endommage la viabilité et les capacités de prolifération des cellules souches contenues dans l'infranatant. Par ailleurs, les figures 27A, 27B et 27C illustrent l'absence d'effet de l'incubation dans l'ACL sur la viabilité et les capacités de prolifération des cellules endothéliales du tissu adipeux contenues dans l'infranatant.

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.

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 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.

5 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  
10 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.

15

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  
20 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  
25 procédé de l'invention présente un facteur d'amplification de 36 en 8 jours.

Selon un second objet, l'invention concerne un procédé d'amplification in vitro ou ex vivo des cellules souches  
30 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. Autrement dit, selon un second objet, l'invention concerne un procédé d'obtention in vitro ou ex vivo d'adipocytes bruns ou beiges comprenant les étapes  
5 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.

10

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,  
15 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  
20 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  
25 cellulaire ; et induction d'une différenciation des cellules souches du tissu adipeux pour obtenir des adipocytes bruns ou beiges. Autrement dit, le procédé d'obtention in vitro ou ex vivo des adipocytes bruns ou beiges comprend donc les étapes suivantes : extraction,  
30 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 d'adipocytes bruns ou beiges 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 d'adipocytes  
5 bruns ou beiges 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  
10 différenciation des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux pour obtenir des adipocytes bruns ou beiges.

Le procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules différenciées comprenant les étapes liées à  
15 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  
20 différenciées. Autrement dit, le procédé d'obtention in vitro ou ex vivo d'adipocytes bruns ou beiges comprenant les étapes liées à l'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux, les précisions données ci-dessus pour le procédé  
25 d'amplification in vitro ou ex vivo de cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux s'appliquent également pour le procédé d'obtention in vitro ou ex vivo d'adipocytes bruns ou beiges.

30 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.

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.

10

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.

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 Figure 9A et Figure 9B).

30

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.

5 Une variante possible consiste à sélectionner/trier les cellules exprimant CD26/DPP4, principalement avant le procédé dit ExAdEx, après mélange de la fraction stromavasculaire et de la matrice extracellulaire, mais avant culture dudit mélange, en suspension, dans le milieu de

10 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.

15

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

20 préférentiellement en adipocytes bruns/beiges. La Figure 20A montre que les populations DPP4+ et DPP4- ont toutes la capacité de se différencier en adipocytes selon l'expression du marqueur PLIN1 (Figure 20A). En revanche, seule la population DPP4+ se différencie en adipocytes

25 exprimant le marqueur d'adipocyte brun/beige UCP1 (Figure 20B). Une illustration en Figure 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

30 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

5 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  
10 consiste à utiliser des 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  
15 (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  
20 des applications de thérapie cellulaire sous réserve de disposer des plateformes adaptés (Automate CliniMacs™ pour le tri magnétique, Cytomètre trieur GMP).

25 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  
30 cellulaires ;

Le produit issu de l'amplification du mélange de la fraction SVF mécanique et de la fraction matrice peut être

dénoté « ExAdEx-tissu ». Le produit issu de la formation d'agrégats dans une étape supplémentaire en fin de procédé, peut être dénoté « ExAdEx-lobules ». Ces produits sont schématisés en Figure 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-tissu. Ainsi que cela est illustré à la Figure 1D, on transfère ce produit amplifié dans des plaques de cultures ULA (Ultra-Low Attachment - Attachment 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-tissu, 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 Figures. 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-tissu 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-tissu. Une caractérisation 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 (Figure 3A) et du collagène de type IV (Figure 3B), mais également de la fibronectine (Figure 3C), de la laminine (Figure 3D), de l'élastine (Figure 3E) et des marqueurs de cellules souches du tissu adipeux DPP4 (Figure 3f), ICAM1 (Figure 3G), ainsi que des cellules endothéliales CD31 (Figure 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.

25

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,

30

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.

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 :

N°1: Endo-BM EPC : Commercialisé par la société PrepoTech™ (référence produit : Cat: GS-EPC)

N°2: Endo-BM MacroV Commercialisé par la société PrepoTech™ (référence produit : Cat: GS-MacroV)

30

N°3: Endo-BM MicroV Commercialisé par la société PrepoTech™ (référence produit : Cat: GS-MicroV)

N°4: EGM+ Commercialisé par la société Promocell™  
(référence produit : Cat: CC-22011 plus C-39216)

5 N°5 MV2 Commercialisé par la société Promocell™ (référence  
produit : Cat: CC-39226 plus C-22022B)

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.  
10 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  
15 Figure 4A.

La composition du milieu de prolifération EGM+ est la  
suivante : Endothelium Cell Growth Medium (milieu de  
croissance de cellules endothéliales) supplémenté par: 2%  
20 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  
25 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.

30 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+, complété en facteurs adipogéniques, permet une différenciation adipocytaire, déterminée par l'expression du marqueur adipocytaire PLIN1, ainsi que cela est montré à la Figure 4B. Cependant, l'expression du marqueur UCP1 spécifique des adipocytes brun/beige est très faible, ainsi que cela est montré à la Figure 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.

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 phosphodiésterases.

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 hECs : comme le montre la Figure 5A, le milieu de différenciation permet une différenciation en adipocyte mais est toxique pour les hECs (Cellules Endothéliales - Figure 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 hECs (Figure 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 $\beta$ , le SB431542, permet de rétablir la différenciation comme le montre la Figure 6A. Le SB431542 est sans conséquence sur la viabilité des hECs. Finalement, l'ajout de SB431542 et le maintien de la Rosiglitazone permet l'expression de UCP1, ainsi que cela est montré à la Figure 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.

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  $\mu$ g/ml à 2  $\mu$ g/ml, de préférence 1  $\mu$ g/ml acide ascorbique ; 0,5  $\mu$ M à 4  $\mu$ M de préférence 2  $\mu$ M Rosiglitazone ; 0,5 nM à 10 nM, de préférence 1 nM T3 ; 0,5  $\mu$ g/ml à 10  $\mu$ g/ml de préférence 2,5  $\mu$ g/ml Insuline ; 0,1  $\mu$ M à 0,500  $\mu$ M, de préférence 0,25  $\mu$ M Dexaméthasone ; 100  $\mu$ M à 800  $\mu$ M, de préférence 500  $\mu$ M de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) ; 1  $\mu$ M à 10  $\mu$ M, de préférence 5  $\mu$ M de SB431542.

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.

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.

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.

Comme le montre la Figure 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 Figure, 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 Figure 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 (Figure 7C).

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.

Selon un exemple de réalisation de l'invention, la différenciation des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux en adipocytes bruns ou beiges est induite in vivo. L'exemple 4 ci-dessous démontre en effet que le produit amplifié selon le procédé de l'invention permet une différenciation des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux en adipocytes bruns ou beiges, après transplantation chez la souris Nude.

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. Autrement dit, la matrice extracellulaire est extraite lors de l'étape d'extraction du procédé de l'invention, et comprend donc

toutes les caractéristiques de la matrice extracellulaire décrite ci-dessus.

5 Le collagène est du collagène structuré, de type I et du collagène de type III (Figure 9A et Figure 9B). La matrice extracellulaire comprend en outre notamment de la fibronectine (Figure 22).

10 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  
15 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.

20 Autrement dit, la composition comprend la matrice extracellulaire qui est extraite lors de l'étape d'extraction du procédé de l'invention, ainsi que la fraction stroma-vasculaire qui est extraite lors de cette même étape d'extraction du procédé de l'invention. La  
25 matrice extracellulaire de la composition comprend donc toutes les caractéristiques de la matrice extracellulaire décrite ci-dessus. Et la fraction stroma-vasculaire de la composition comprend donc toutes les caractéristiques de la fraction stroma-vasculaire décrite ci-dessus.

30 Le collagène est du collagène de type I et du collagène de type III. La matrice extracellulaire comprend en outre de la fibronectine (Figure 22).

Cette composition, obtenue selon le procédé de l'invention, avant amplification du mélange de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire, est  
5 une composition tissulaire. Cette composition comprend en outre des adipocytes matures.

Selon un cinquième objet, l'invention concerne un kit comprenant la composition telle que définie précédemment,  
10 le milieu de prolifération et le milieu de différenciation.

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  
15 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.

20 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  
25 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.

30 L'invention concerne ainsi une composition, obtenue selon les procédés de l'invention, comprenant des adipocytes bruns ou beiges ou les précurseurs de tels adipocytes, et

destinés à une utilisation, ou pour leur utilisation, en  
thérapie cellulaire, ou pour le traitement des désordres  
métaboliques. Cette composition est une composition  
tissulaire du tissu adipeux humain et comprend l'ensemble  
5 du produit obtenu par les procédés de l'invention, c'est-  
à-dire le mélange de la fraction stroma-vasculaire et de  
la matrice extracellulaire, après prolifération, voire  
après différenciation.

10 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  
15 ensuite traité selon le procédé de l'invention, afin  
d'obtenir, toujours dans cet exemple, des produits ExAdEx-  
tissue voire ExAdEx-lobules tels que décrits précédemment.  
Ces produits, dans lesquels les cellules souches  
précurseurs d'adipocytes bruns ou beiges ont subi une  
20 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. Il est à noter  
25 que les produits comportant les adipocytes bruns ou beiges  
sont une composition tissulaire telle que définie au  
paragraphe précédent. 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  
30 subi l'amplification selon le procédé de l'invention,  
autrement dit une composition tissulaire telle que définie  
ci-dessus, comprenant le mélange de la fraction stroma-  
vasculaire et de la matrice extracellulaire après

prolifération, et la différenciation en adipocytes blancs ou beiges mature s'effectue dans le corps de l'individu transplanté.

## 5 EXEMPLES

### EXEMPLE 1. EXTRACTION MECANIQUE

10 a) Procédé d'extraction mécanique en vue de la caractérisation des populations cellulaires et matricielles au cours du processus

15 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) :

1. Prélèvement de tissu adipeux par aspiration dans une seringue stérile de 10cc équipée d'une canule de Coleman 2mm en dépression -20kPa.

20 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, nommée C1, est conservée.

25 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, nommée C2, est conservée.

30 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.

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, nommée C3, est conservée.

10 6. Le contenu de la seringue ainsi que les contenus C1, C2 et C3 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.

15 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.

20 La Figure 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.

25 b) Caractérisation des populations cellulaires obtenues

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

- 5 - La fraction stroma vasculaire obtenu est caractérisé par une majorité de cellules de type DPP4+ (Figure 17A) au niveau de l'expression génique du marqueur DPP4 et par observation de la protéine DPP4 par microscopie (Figure 8A). En comparaison, la protéine ICAM1 est peu présente (Figure 17C et Figure 8B).
- 10 - La matrice extracellulaire obtenu est caractérisé par une majorité de cellules de type ICAM1+ (Figure 17C) et CD31+ (Figure 17E) au niveau de l'expression génique. Ce résultat est confirmé par la présence de cellules exprimant la protéine ICAM1 observé par microscopie (Figure 8B)
- 15 - le produit amplifié ExAdEx obtenu est caractérisé en particulier par la présence de cellules de type CD26+ (figure 28). En particulier, des profils des cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux ex vivo et du produit amplifié ExAdEx, sont obtenus par détermination, par cytométrie en flux, des marqueurs de surface cellulaire. Il est ainsi démontré que le procédé de l'invention permet une augmentation de la population de
- 20 cellules exprimant le marqueur CD26 de 4% à 51% (figure 29A). Les cellules exprimant le marqueur CD54 sont présentes mais pas amplifiées par le procédé de l'invention (figure 29B).
- 25 c) Caractérisation des matrices M1 à M4 obtenues lors des différentes étapes du procédé
- La matrice obtenue lors de l'étape 2, nommée ici M1 est de type fibreux (Figure 9C).
- 30 - La matrice obtenue lors de l'étape 3, nommée ici M2 est de type fibreux et riche en collagène (Figure 9D). Le collagène est révélé par le PicroSirius Red (Figure 9A) qui permet, de plus, de visualiser une structure du

collagène en bâtonnets. Cette matrice contient des cellules endogènes.

5 - La matrice obtenue lors de l'étape 5 et isolé dans le tube de collecte, nommée ici M3, est de type fibreux (Figure 9E et Figure 9B). Cette matrice contient également des cellules endogènes. Le collagène de la matrice isolée est révélé, à la Figure 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 Figure 9B) 10 obtenue indique que le collagène reste organisé, à savoir que le collagène présent présente toujours une structure secondaire en hélice  $\alpha$  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.

15 - 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 (Figure 10B). La matrice M4 est également composée de structures capillaires formées par des cellules 20 endothéliales CD31+ (Figure 10C) et par un réseau de cellules souches du tissu adipeux PDGF $\alpha$ + (Figure 10D).

#### d) Purification de l'infranatant C1/C2

25 Les populations C1 et C2 sont préalablement débarrassées des cellules sanguines par une incubation des culots cellulaires dans un tampon de lyse 1X comprenant du chlorure d'ammonium, nommé ACL, dilué dans de l'eau stérilisée, dans un rapport tampon : échantillon, variant 30 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. Afin de déterminer l'effet de ce traitement ACL sur les cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du

tissu adipeux, une analyse en cytométrie en flux a été réalisée. Ainsi, un total de  $1.10^5$  cellules souches du tissu adipeux humain ont été incubées, dans une solution saline comme contrôle, ou à différents temps, dans 10 volumes de la solution de lyse des cellules sanguines. La figure 25A illustre la viabilité directe en termes de nombres de cellules viables après incubation dans les différentes compositions. La figure 25B illustre la viabilité après 24h de culture et la figure 25C présente la capacité de prolifération après 5 jours en conditions de culture adhérente (Test Post hoc de Tuckey \* < 0,05 ; \*\* < 0,01 ; \*\*\* < 0,001 pour n= 5). Un résultat graphique de cette analyse par cytométrie en flux est présenté sur les figures 26A, 26B, 26C et 26D et permet de visualiser le nombre de cellules viables et mortes après différents temps de traitements dans l'ACL. Une solution saline est prise comme référence. Sur ces figures apparaissent, dans l'encadré gris à gauche, les cellules viables et dans l'encadré à droite, les cellules mortes, identifiées par le marquage à l'Iodure de Propidium. Ce marquage a la propriété de ne pénétrer que les cellules dont la membrane cellulaire est endommagée. Une autre analyse par cytométrie en flux a également été réalisée afin de déterminer l'influence de la purification de l'infranatant sur les cellules endothéliales du tissu adipeux. Ainsi, un total de  $1.10^5$  cellules endothéliales du tissu adipeux humain ont été incubées dans une solution saline comme contrôle, ou à différent temps, dans 10 volumes de la solution de lyse des cellules sanguines. La figure 27A illustre la viabilité directe en termes de nombres de cellules viables après incubation dans les différentes compositions. La figure 27B illustre la viabilité après 24h de culture et la figure 27C présente la capacité de

prolifération après 5 jours en conditions de culture adhérente. Il résulte de ces analyses qu'une période d'incubation dans l'ACL supérieure à 5 minutes endommage la viabilité et les capacités de prolifération des cellules souches du tissu adipeux contenues dans l'infranatant. L'incubation dans l'ACL n'a, par ailleurs, pas d'effets sur la viabilité ou les capacités de prolifération des cellules endothéliales du tissu adipeux humain.

## 10 EXEMPLE 2. EXPANSION CELLULAIRE ET DIFFERENCIATION

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 :

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% CO<sub>2</sub>, puis maintenues dans les mêmes conditions, de préférence, avec agitation.
2. Le milieu de prolifération EGM+ est changé à 50% tous les deux jours.
- 25 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.
4. Au jour 14, le milieu de prolifération EGM+ est remplacé par le cocktail de différenciation I composé de EGM+ enrichi en 250 µM Dexaméthasone ; 500 µM IBMX ; 1 µM Rosiglitazone ; 2 µM T3 et 2,5 µg/ml insuline.

5. Au jour 17, le milieu de différenciation I est remplacé par le milieu de différenciation II composé de EGM+ enrichi en 1  $\mu$ M Rosiglitazone ; 2  $\mu$ M T3 et 2,5  $\mu$ g/ml insuline.

5 EXEMPLE 3. CARACTERISATION DE LA CAPACITE D'AMPLIFICATION DE LA MATRICE

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

20 Par ailleurs, la Figure 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  
25 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  
30 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  
5 s'agir, par exemple, de cellules souches de la peau, notamment des cellules souches épithéliales de la peau ou de cellules souches pluripotentes induites.

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

De plus, la figure 16 permet de mettre en évidence la  
20 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 figures 16A, 16C et 16E montrent une proportion faible de cellules en prolifération dans la matrice Endostem cultivée sans  
25 l'ajout de la fraction stroma-vasculaire. En comparaison, les Figures 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. De la  
30 même manière, afin de comparer la viabilité et les capacités d'amplification des cellules souches du tissu adipeux, des cellules contenues dans une composition sans ajout de la fraction stroma-vasculaire (figure 32A) ou une

composition comprenant un mélange de la matrice extracellulaire et des cellules isolées de l'infranatant (figure 32B) sont isolées par digestion mécanique, mises en culture en conditions adhérentes 48h, puis fixées et colorées au cristal violet, permettant ainsi d'observer la densité cellulaire. Les cellules contenues dans le puits cellulaire apparaissent en noir sur la figure 32. La figure 32A montre ainsi une faible amplification de la population cellulaire en absence de l'ajout de la fraction stroma-vasculaire. A l'inverse, la figure 32B montre une amplification des populations cellulaires de la fraction stroma-vasculaire après mise en culture.

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 104 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 :

[Table 1]

Conditions	Nombre de cellules	Facteur d'amplification
Cellules souches du tissu adipeux sans matrice	2·10 <sup>4</sup>	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 M4	$72 \cdot 10^4$	36
Matrice M4 sans ajout de cellules souches du tissu adipeux	$5 \cdot 10^4$	-

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.

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 (Figure 10A). La matrice M4 illustre une matrice extracellulaire telle que définie dans l'invention.

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 (Figure 17B), une conservation des cellules souches précurseurs d'adipocytes du tissu adipeux humain ICAM1 (Figure 17D) et la conservation d'une population de cellules endothéliales (Figure 17F).

Le niveau d'expression de différents marqueurs cellulaires (marqueur de cellules endothéliales CD31, marqueur de cellules souches adipocytaires PDGFR $\alpha$ , 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 Figure 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 (Figure 14A) et des cellules souches du tissu adipeux (Figure 14B). Cette étude permet également de mettre en évidence la meilleure capacité de différenciation induite par la matrice extracellulaire de l'invention (Figures. 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.

Le procédé ExAdEx de l'invention permet, en outre, de conserver le réseau vasculaire natif, lors de l'amplification et de la différenciation cellulaire. Les figures 30A, 30B et 30C illustrent les cellules endothéliales isolées du tissu adipeux humain après culture dans différents milieux. La figure 30A montre les

cellules endothéliales du tissu adipeux après culture dans le milieu de prolifération de l'invention. La figure 30B montre les cellules endothéliales du tissu adipeux après culture dans le milieu de différenciation de l'invention.

5 Et la figure 30C montre les cellules endothéliales du tissu adipeux après culture dans un milieu de différenciation standard, non optimisé, qui comprend du DMEM et du sérum. Il en résulte que seuls les milieux décrits dans l'invention permettent une conservation des cellules

10 endothéliales lors des étapes de prolifération et de différenciation en tissu adipeux brun/beige. La conservation des cellules endothéliales est d'intérêt, en particulier, pour des applications de transplantation du tissu adipeux brun/beige, permettant une vascularisation

15 post-greffe et donc une viabilité du produit de transplantation. A cet égard, il est également démontré ici que le réseau vasculaire natif, présent dans la composition amplifiée, et éventuellement différenciée, obtenue par le procédé de l'invention, présente des

20 capacités de revascularisation post-greffe chez la souris Nude. En effet, tel que cela apparait en blanc sur la figure 31, 4 semaines après transplantation chez la souris Nude, la composition de l'invention présente un réseau vasculaire fonctionnel.

25

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 Figure 15, la matrice isolée par dissociation contient des cellules en

30 prolifération (Figure 15B), au contraire d'un tissu non dissocié (Figure 15A). Les Figures. 15A et 15B permettent de comparer la prolifération cellulaire dans le tissu non dissocié (Figure 15A) et dans la matrice isolée (Figure

15B). En Figure 15A, le tissu adipeux non dissocié ne montre pas de cellules en prolifération. En Figure 15B, la composition montre des cellules en prolifération. En effet, cette figure fait apparaître, en blanc, les noyaux  
5 des cellules en prolifération.

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  
10 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  
15 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 Figure 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  
20 montré à la Figure 17C, l'expression de ICAM1, est concentrée dans la matrice isolée, ainsi que les cellules de type CD31 à la Figure 17E. Les cellules qui portent l'amplification dans la composition sont les cellules exprimant DPP4 ajoutées.

25 En effet, la Figure 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  
30 pouvoir d'amplification, sont préférentiellement les cellules de type DPP4 ou CD26+.

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 Figure 21A et de type M2 ainsi que cela est montré à la Figure 21B. A la Figure 21A, les macrophages de type M1 sont révélés par le marqueur IL-1b et, à la Figure 21B, les macrophages de type M2 sont révélés par le marqueur MRC1.

Enfin, et ainsi que cela est montré à la Figure 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.

#### EXEMPLE 4 - AMPLIFICATION/DIFFERENTIATION EN ADIPOCYTES BRUNS/BEIGES

La Figure 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 (Figure 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 (Figure 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 (Figure 20B).

5

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 Figure 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 Figure 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 (Figure 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 (Figure 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 (Figure 24, photographie de droite).

10

15

20

25

30

## REVENDEICATIONS

1. Procédé d'obtention in vitro ou ex vivo d'adipocytes  
5 bruns ou beiges du tissu adipeux 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  
10 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  
15 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 ;

20 culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en  
suspension, dans un milieu de prolifération cellulaire des  
cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges du tissu  
adipeux; et

induction d'une différenciation des cellules souches  
25 d'adipocytes bruns ou beiges du tissu adipeux pour obtenir  
des adipocytes bruns ou beiges ;

dans lequel l'extraction de la fraction stroma-vasculaire  
et de la matrice extracellulaire comprenant les étapes  
suivantes :

30 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.

2. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la différenciation des cellules souches du tissu adipeux est induite dans un milieu de différenciation.

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.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape de dissociation mécanique est une étape de dissociation non-enzymatique.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

5 8. 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.

10 9. 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.

15 10. Procédé selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend l'ajout, dans le milieu de différenciation, de la Rosiglitazone et/ou du SB431542.

20 11. 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.

25 12. Matrice extracellulaire extraite selon le procédé selon l'une des revendications 1 à 11, 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.

30 13. Composition comprenant un mélange de la matrice extracellulaire selon la revendication 13 et d'une fraction stroma-vasculaire extraite selon le procédé selon l'une des revendications 1 à 11.

14. Kit comprenant la composition selon la revendication 13, un milieu de prolifération cellulaire comprenant un sérum, un facteur de croissance de fibroblastes et un  
5 facteur ressemblant à l'insuline, et un milieu de différenciation comprenant de la rosiglitazone et/ou du SB431542.
15. Utilisation in vitro de la matrice extracellulaire  
10 selon la revendication 12 pour le criblage et/ou la caractérisation d'actifs pharmacologiques.
16. Utilisation in vitro de la composition selon la revendication 13 pour le criblage et/ou la caractérisation  
15 d'actifs pharmacologiques.
17. Utilisation in vitro du kit selon la revendication 14 pour le criblage et/ou la caractérisation d'actifs  
20 pharmacologiques.
18. Produit comprenant des adipocytes bruns ou beiges obtenu selon le procédé selon l'une des revendications 1 à 11, pour leur utilisation en thérapie cellulaire, ou pour le traitement des désordres métaboliques.  
25
19. Produit comprenant des adipocytes bruns ou beiges obtenu selon le procédé selon l'une des revendications 1 à 11, pour le traitement de l'obésité.
20. Milieu de différenciation pour la différenciation de  
30 cellules souches d'adipocytes bruns ou beiges en adipocytes bruns ou beiges selon le procédé selon l'une des revendications 2 à 11, 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  
5 ressemblant à l'insuline, en facteurs de croissance de  
l'endothélium vasculaire, en acide ascorbique, en  
rosiglitazone, en T3, en insuline, et en SB431542.

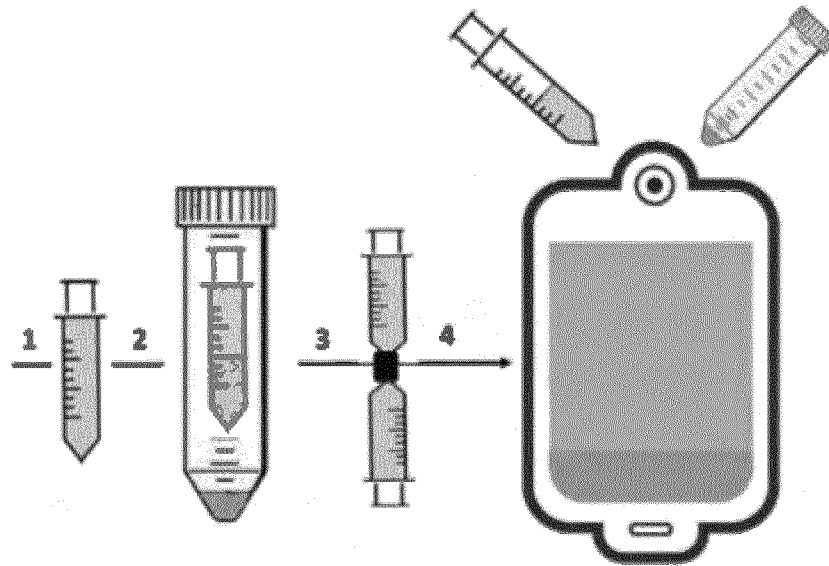


Fig. 1A

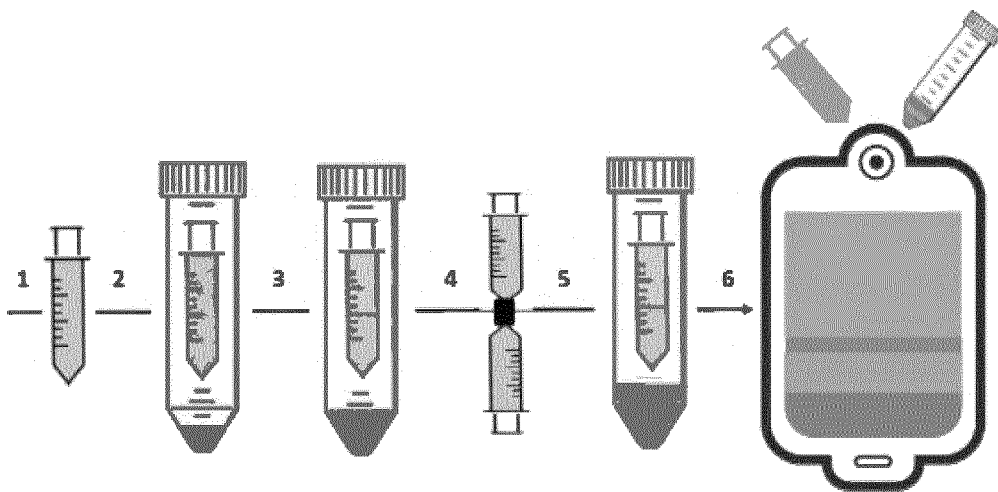


Fig. 1B

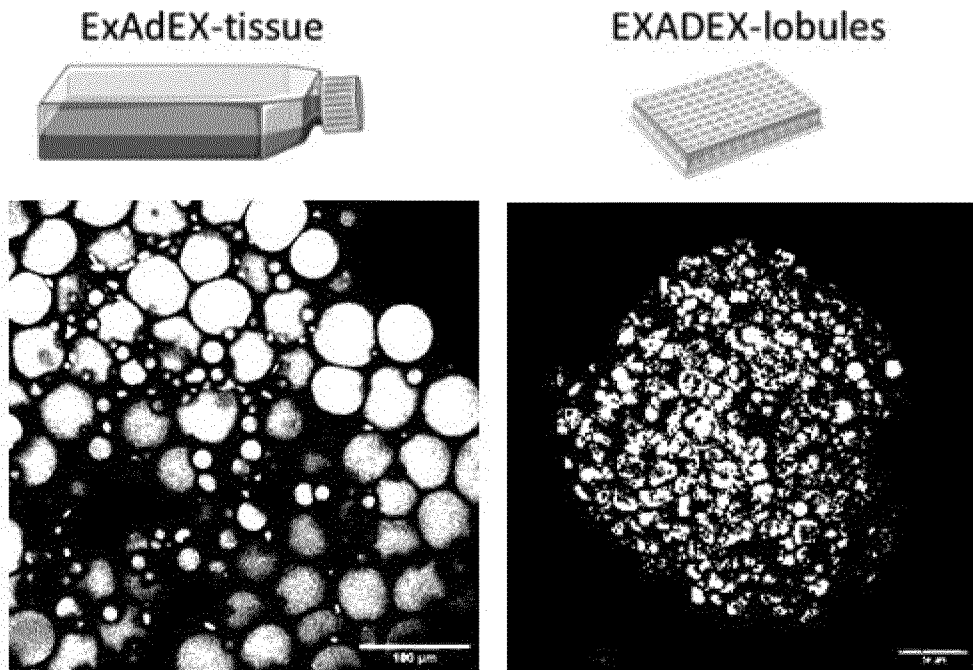


Fig. 1C

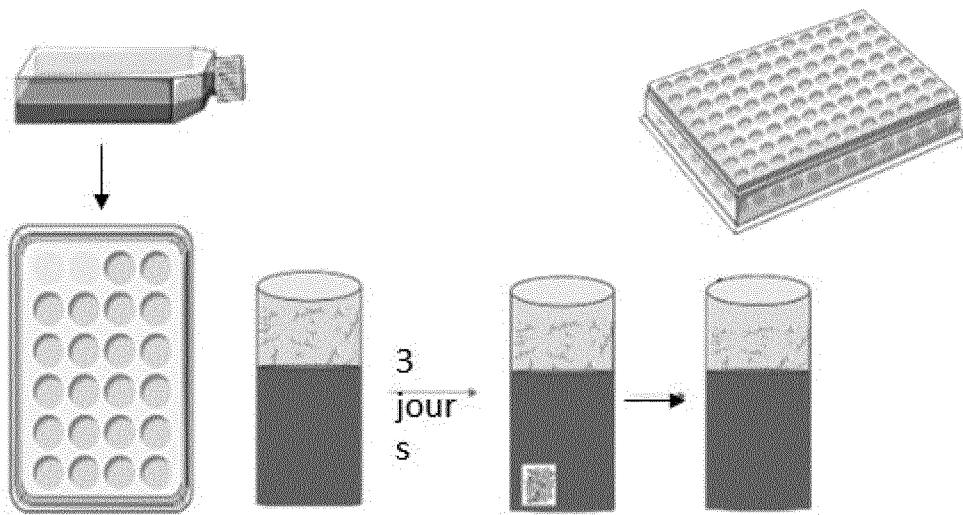


Fig. 1D

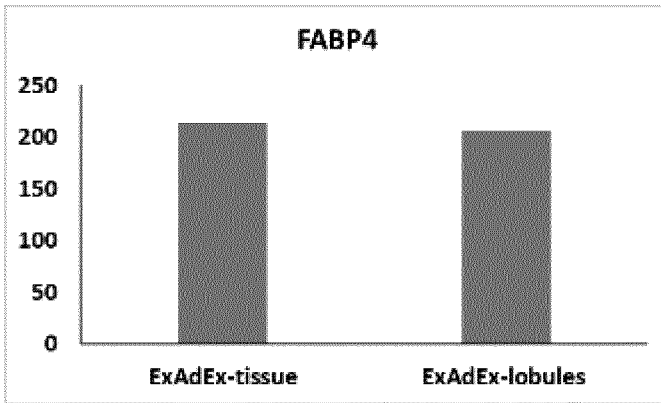


Fig. 2A

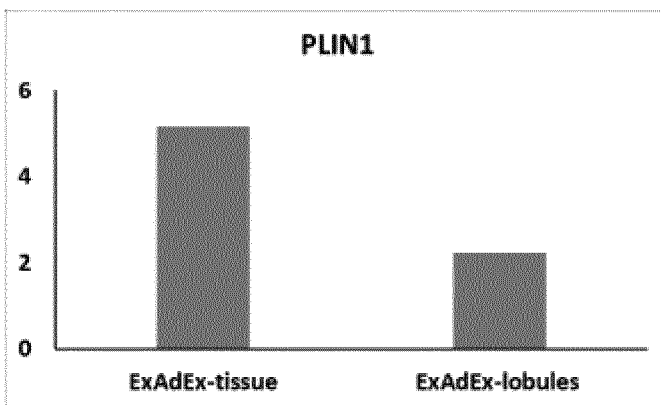


Fig. 2B

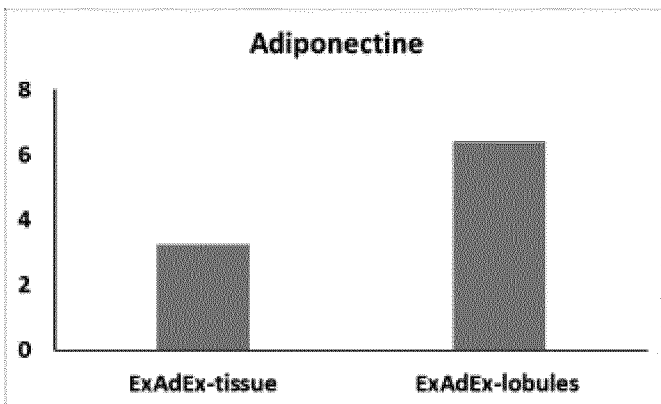


Fig. 2C

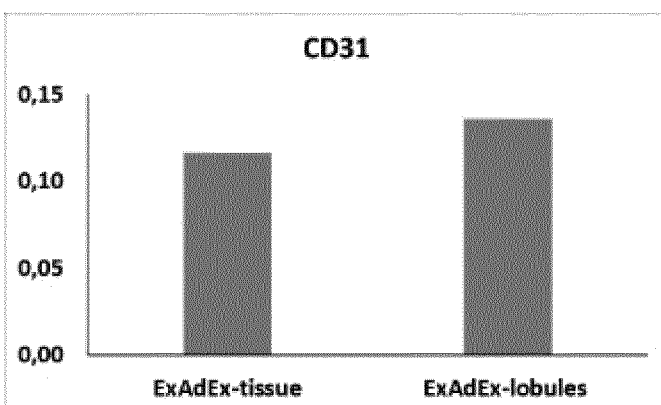


Fig. 2D

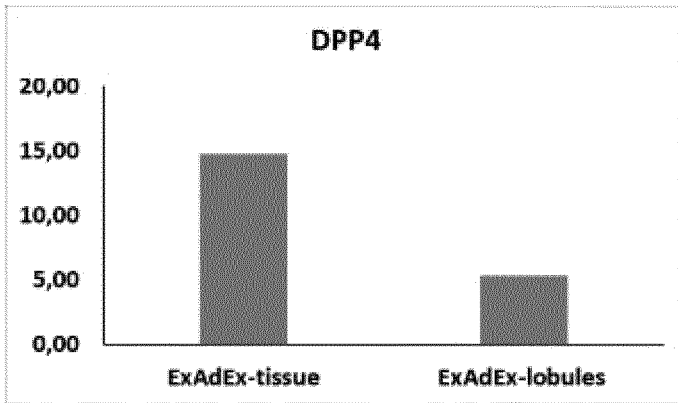


Fig. 2E

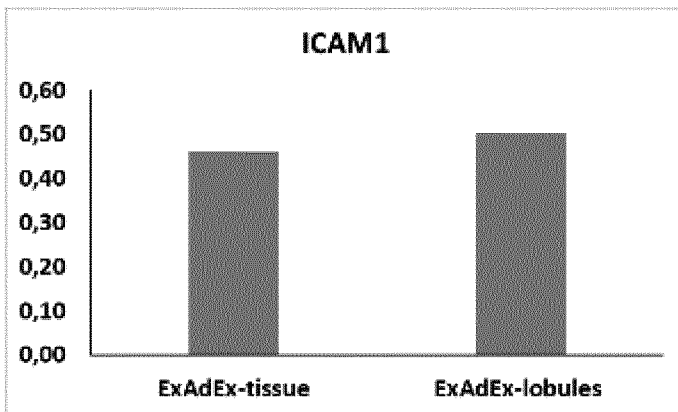


Fig. 2F

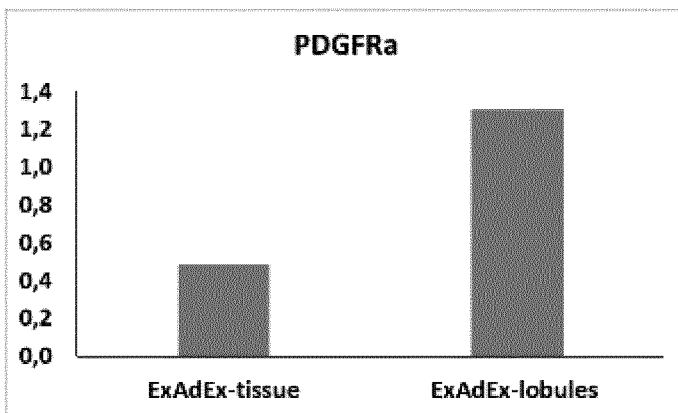


Fig. 2G

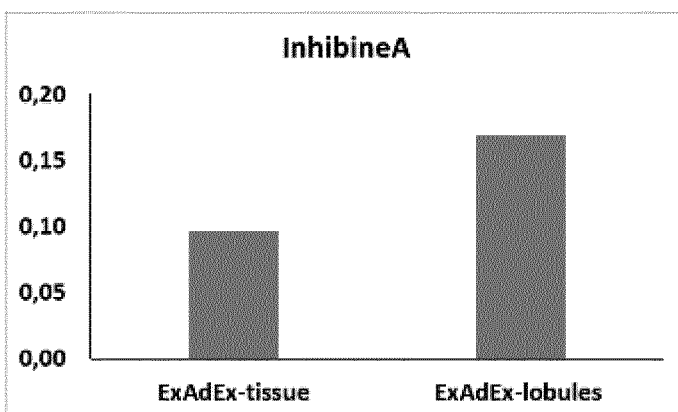


Fig. 2H

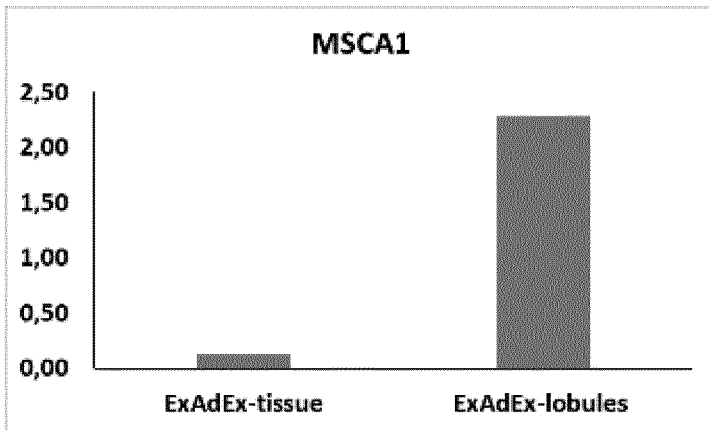


Fig. 2I

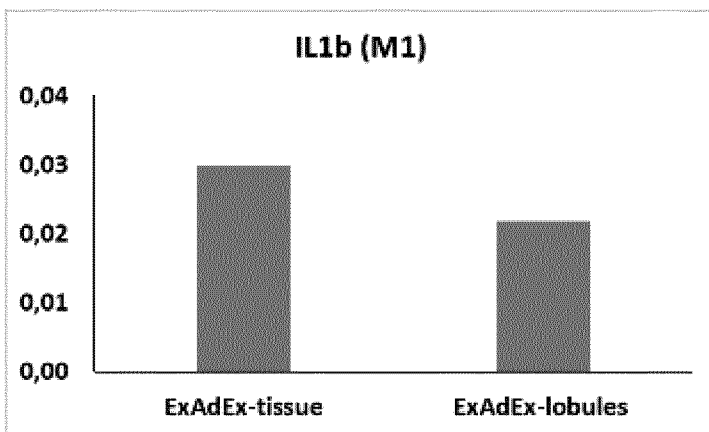


Fig. 2J

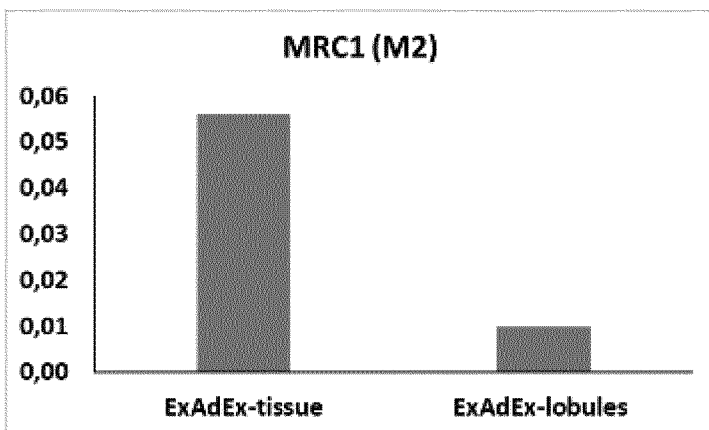


Fig. 2K

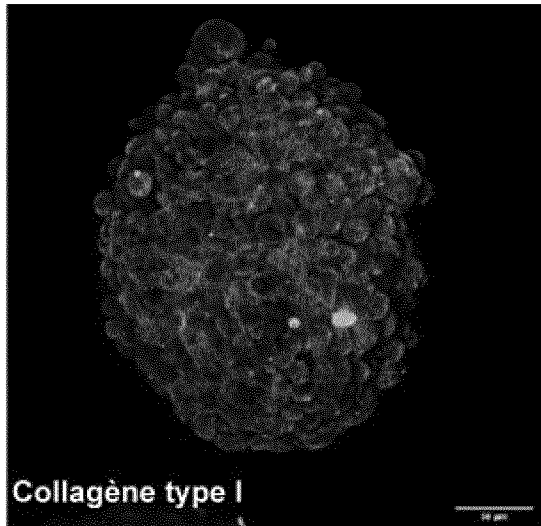


Fig. 3A

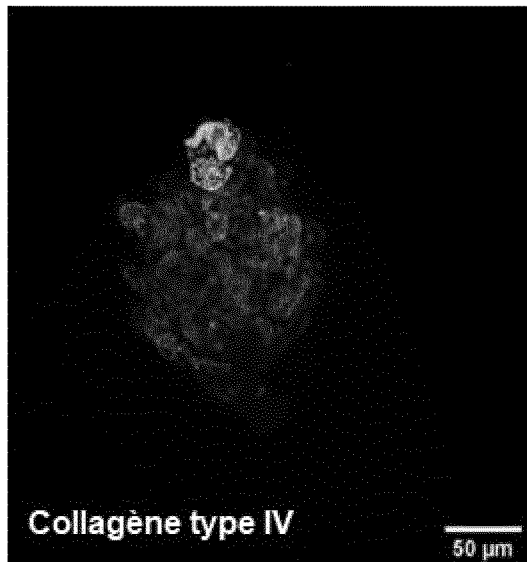


Fig. 3B

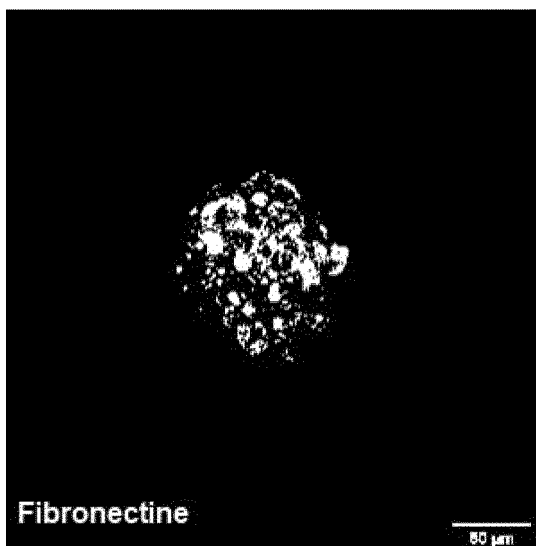


Fig. 3C

7/33

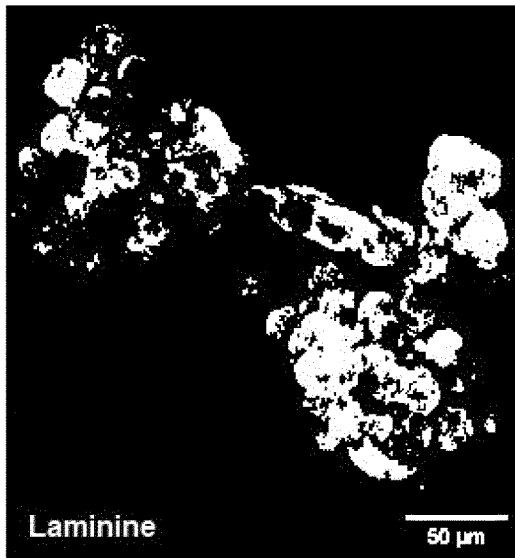


Fig. 3D

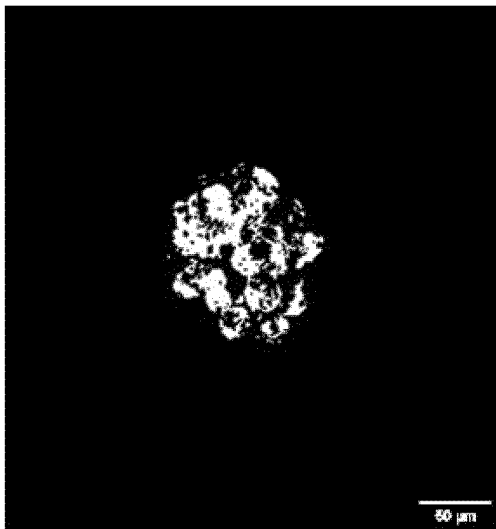


Fig. 3E



Fig. 3F

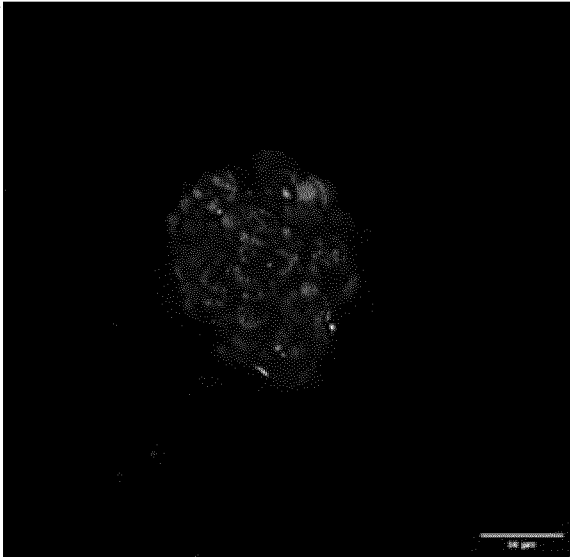


Fig. 3G

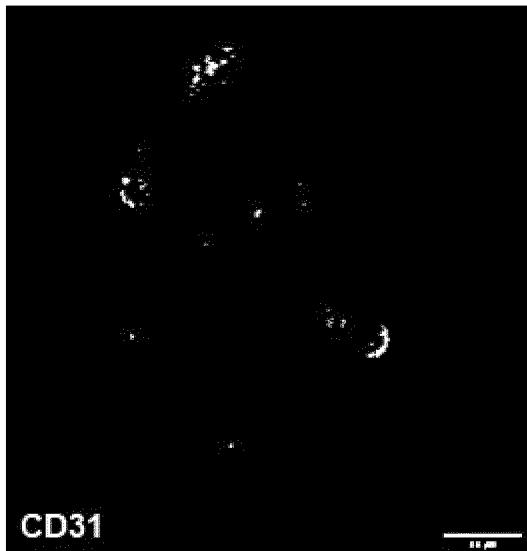


Fig. 3H

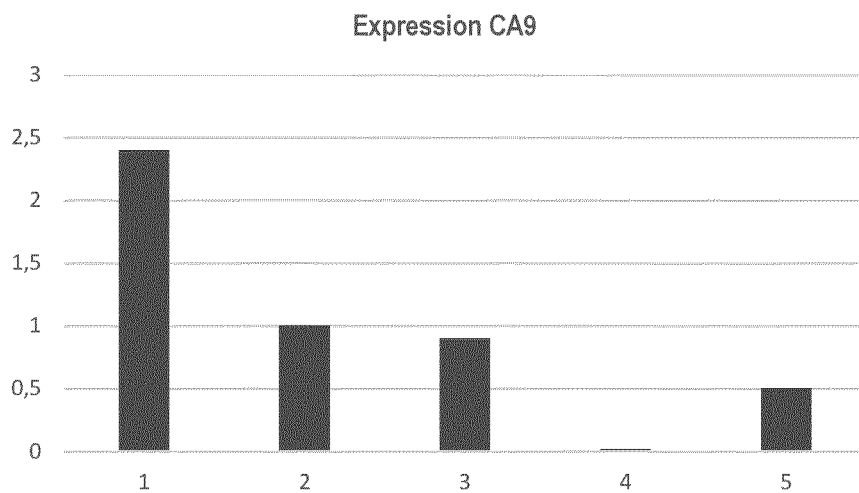


Fig. 4A

9/33

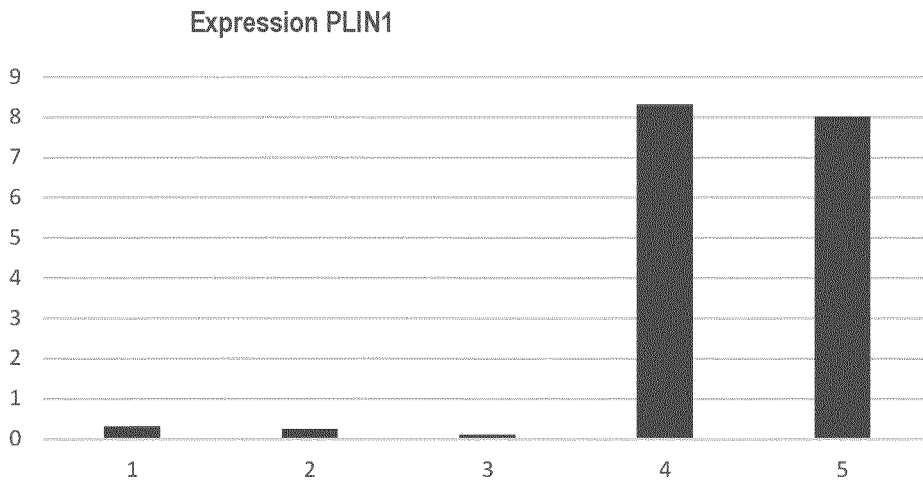


Fig. 4B

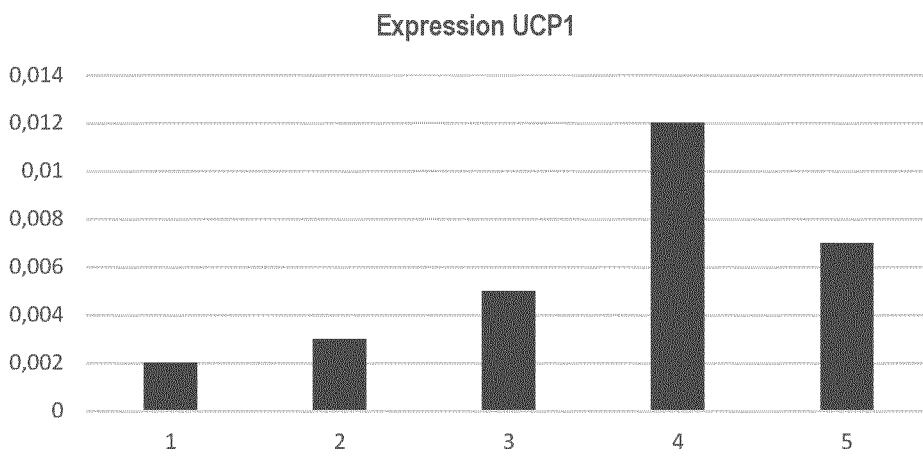


Fig. 4C

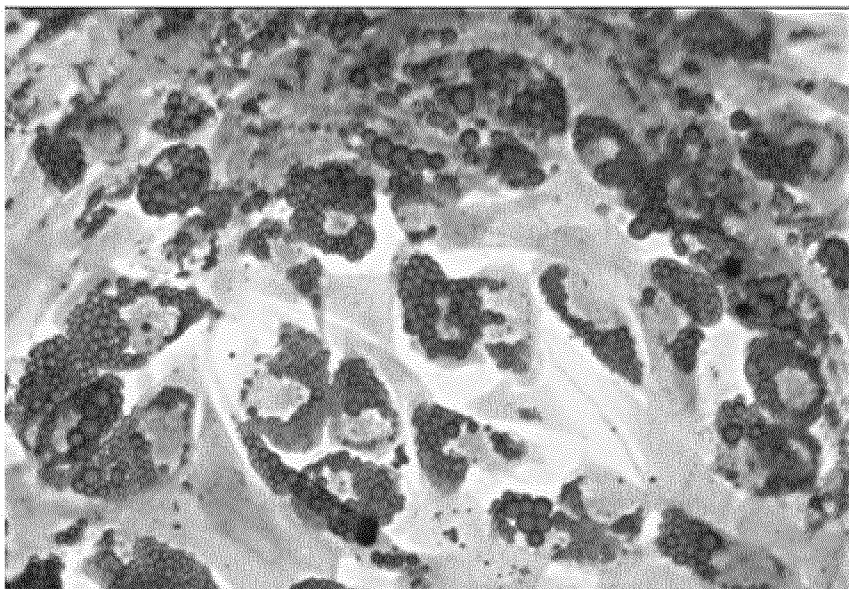


Fig. 5A

10/33

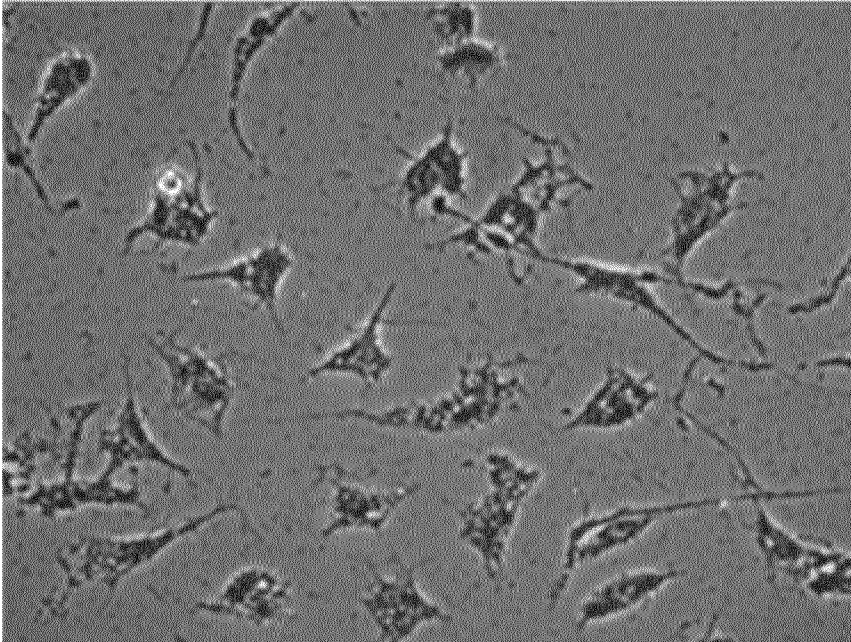


Fig. 5B

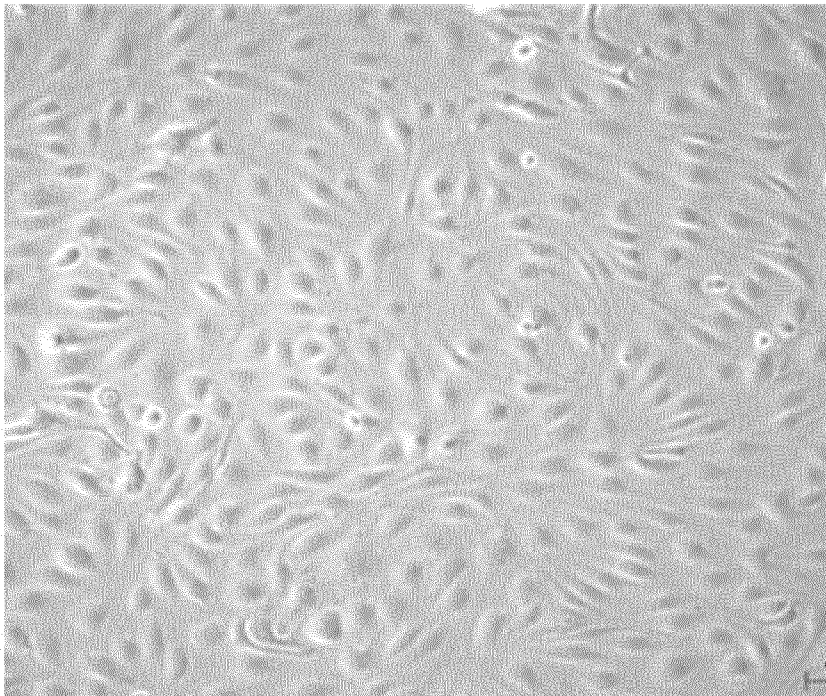


Fig. 5C

11/33

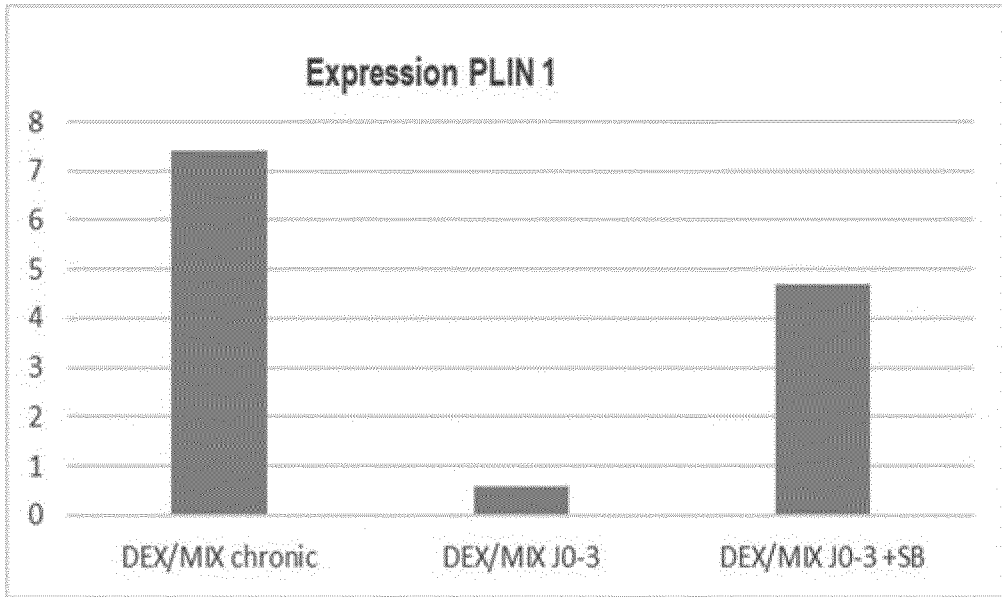


Fig. 6A

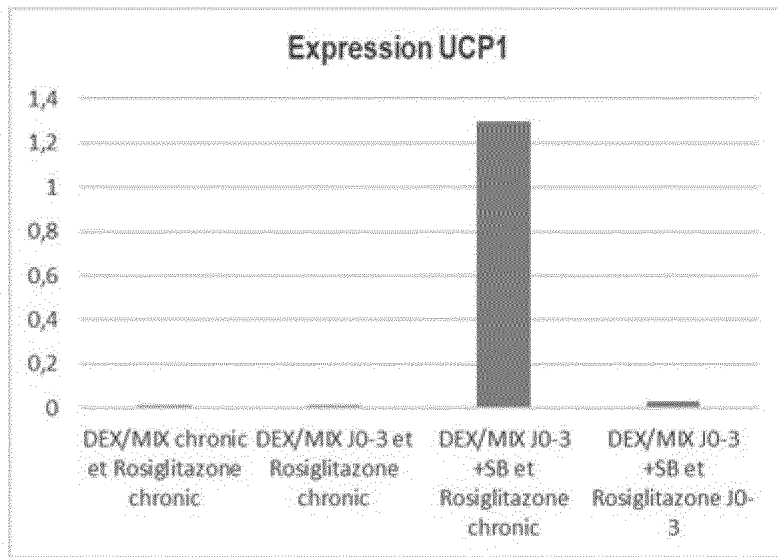


Fig. 6B

12/33

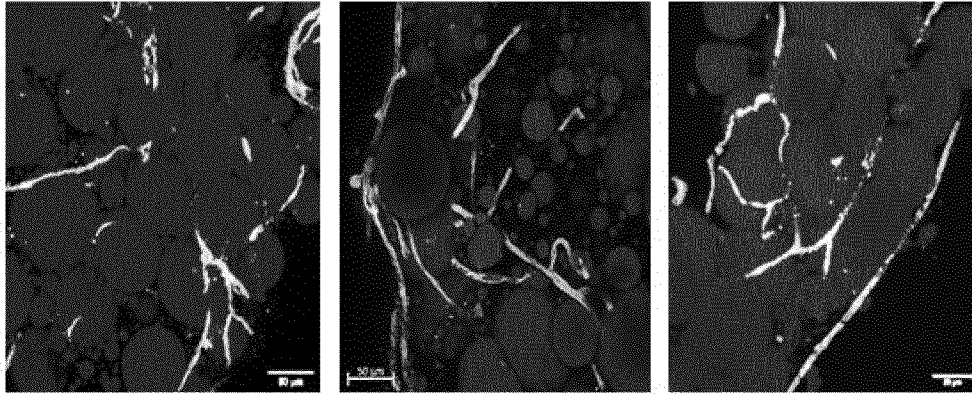


Fig. 7A

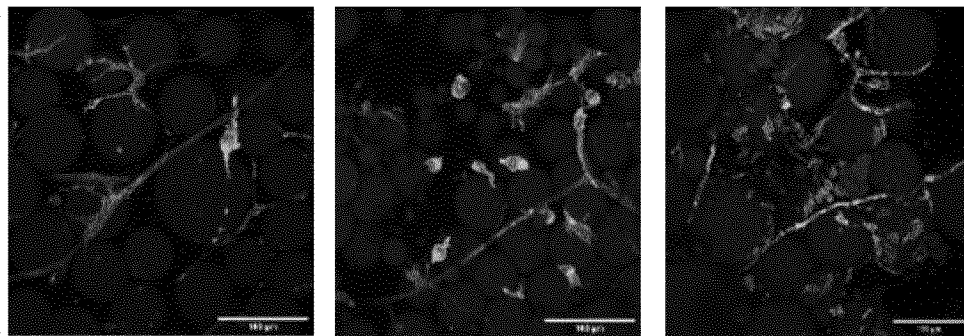


Fig. 7B

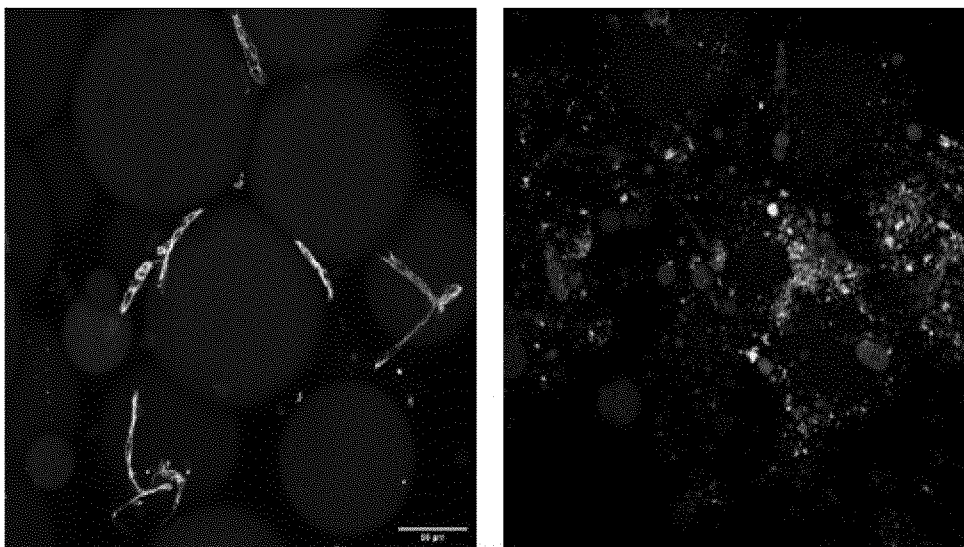


Fig. 7C

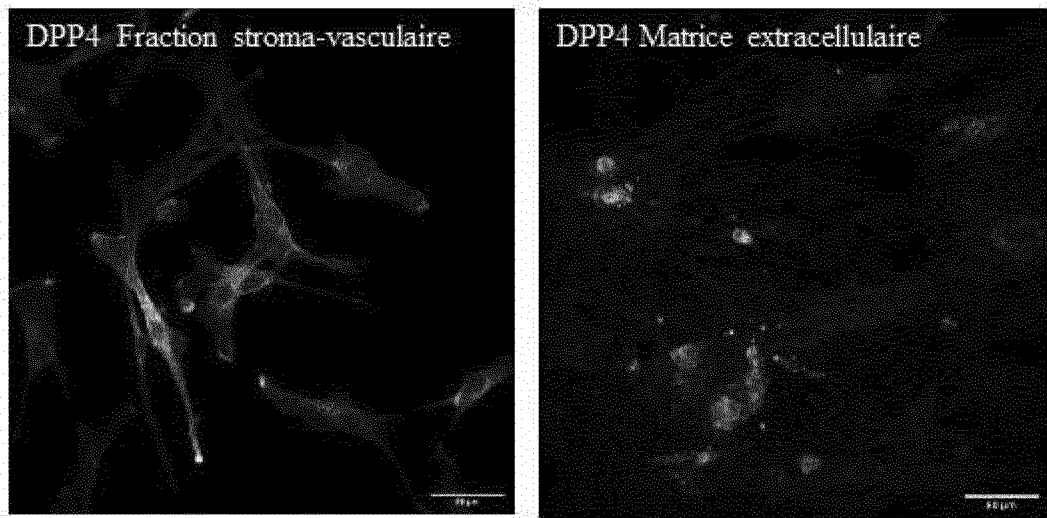


Fig. 8A

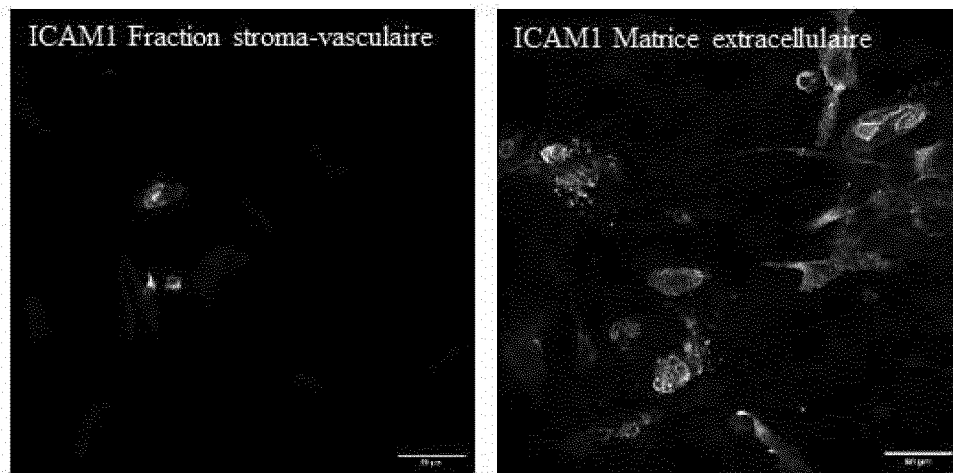


Fig. 8B

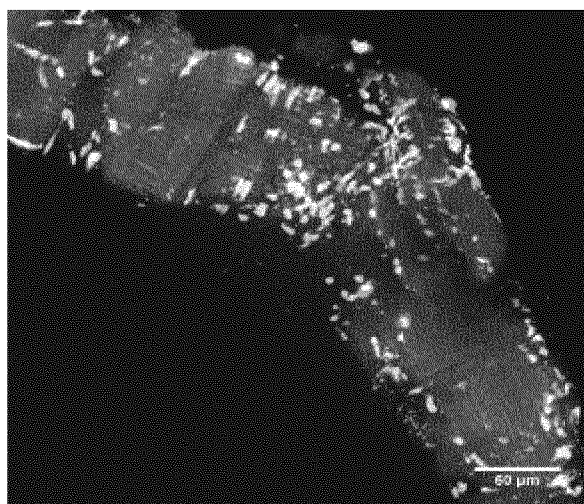


Fig. 9A

14/33

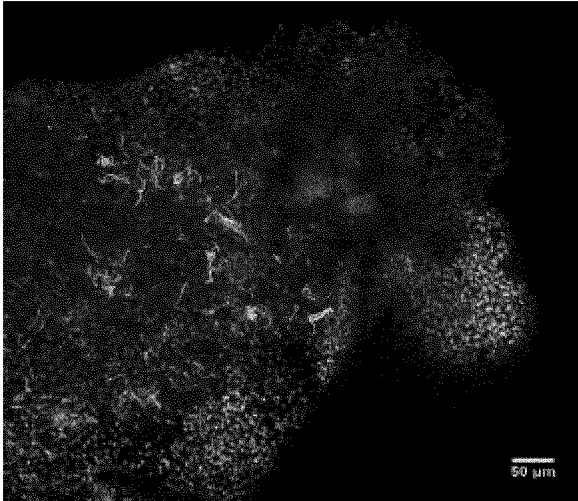


Fig. 9B

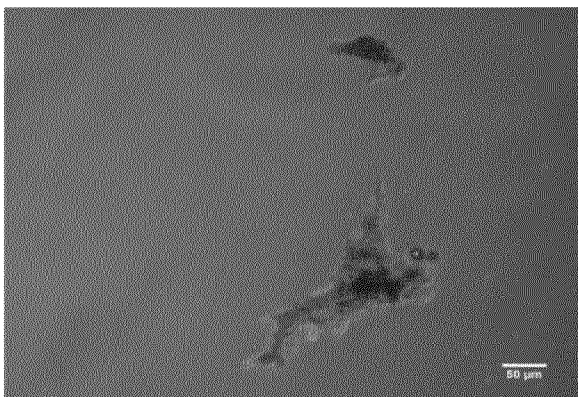


Fig. 9C

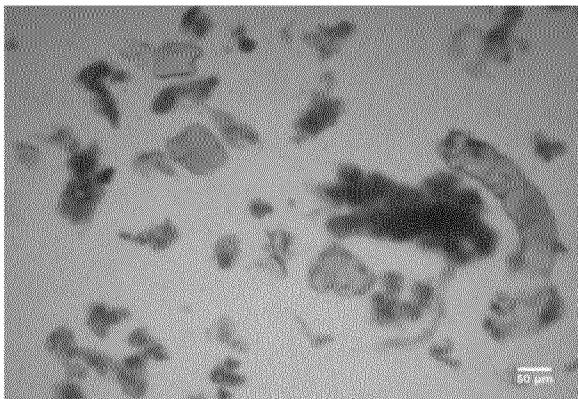


Fig. 9D



Fig. 9E

15/33

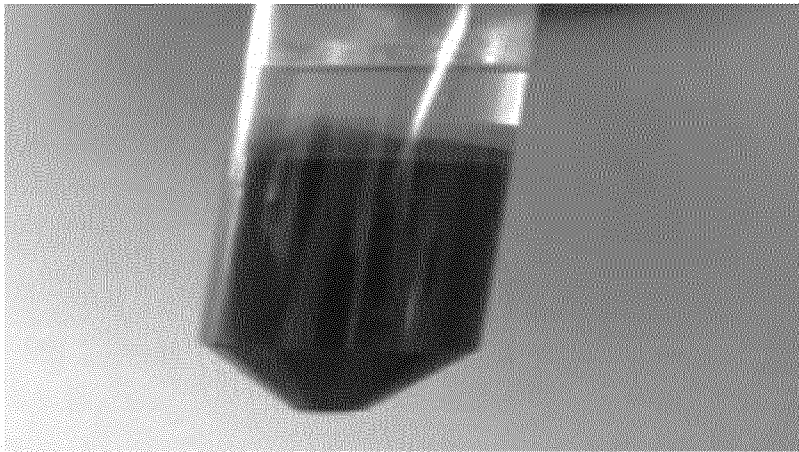


Fig. 10A

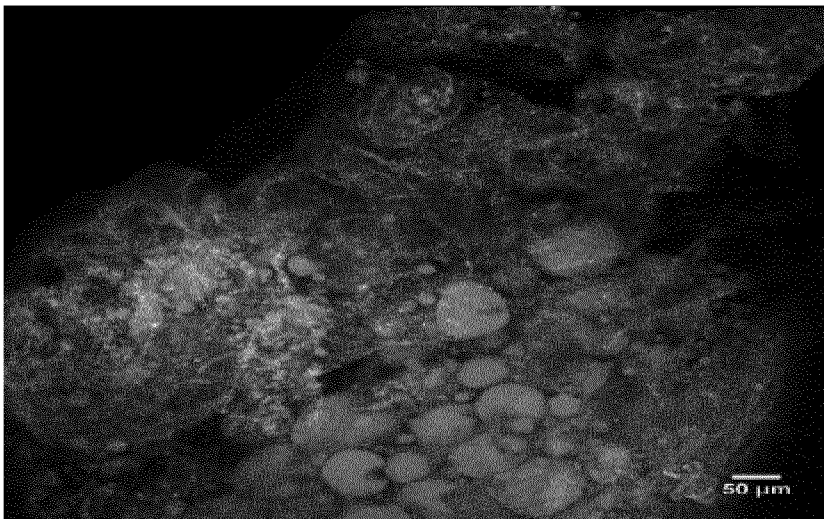


Fig. 10B

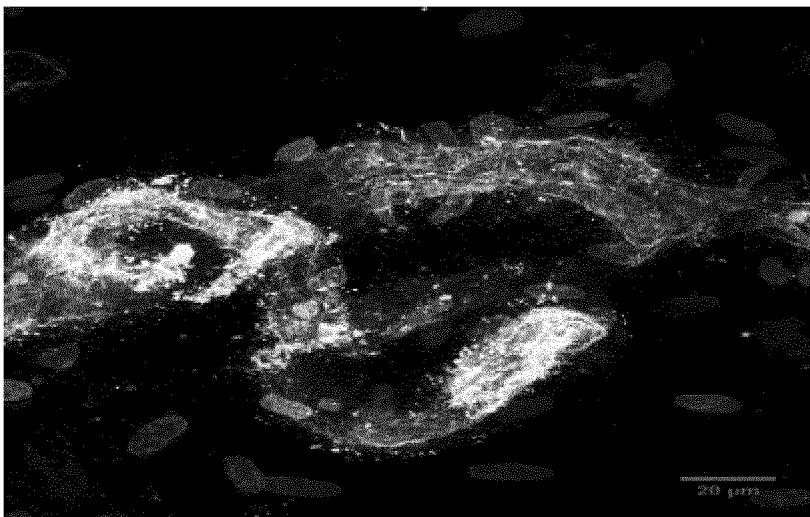


Fig. 10C

16/33

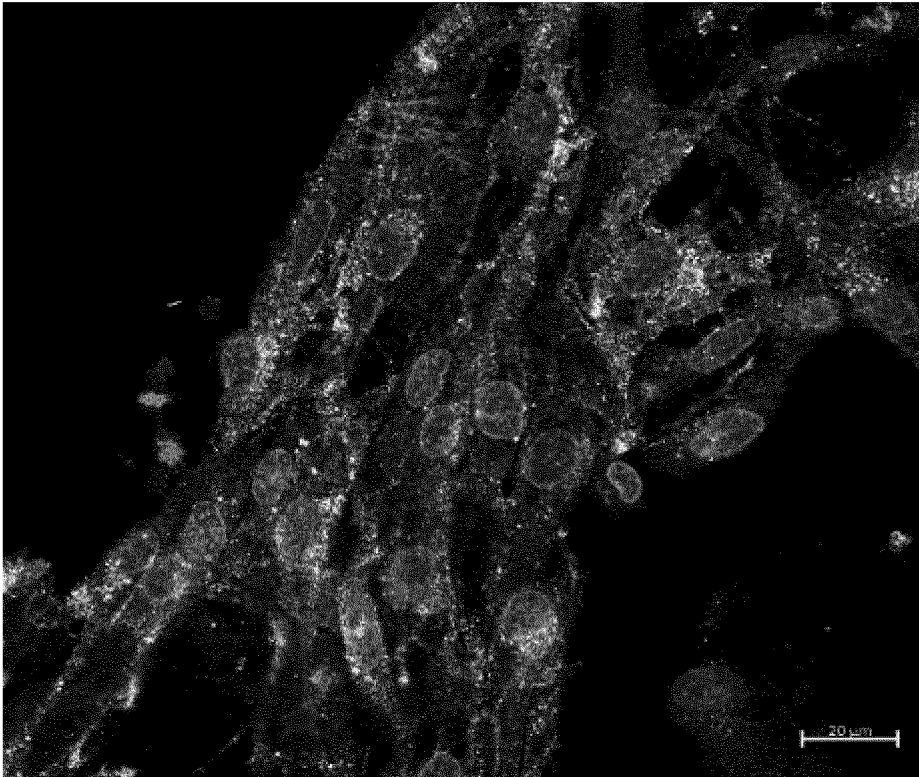


Fig. 10D

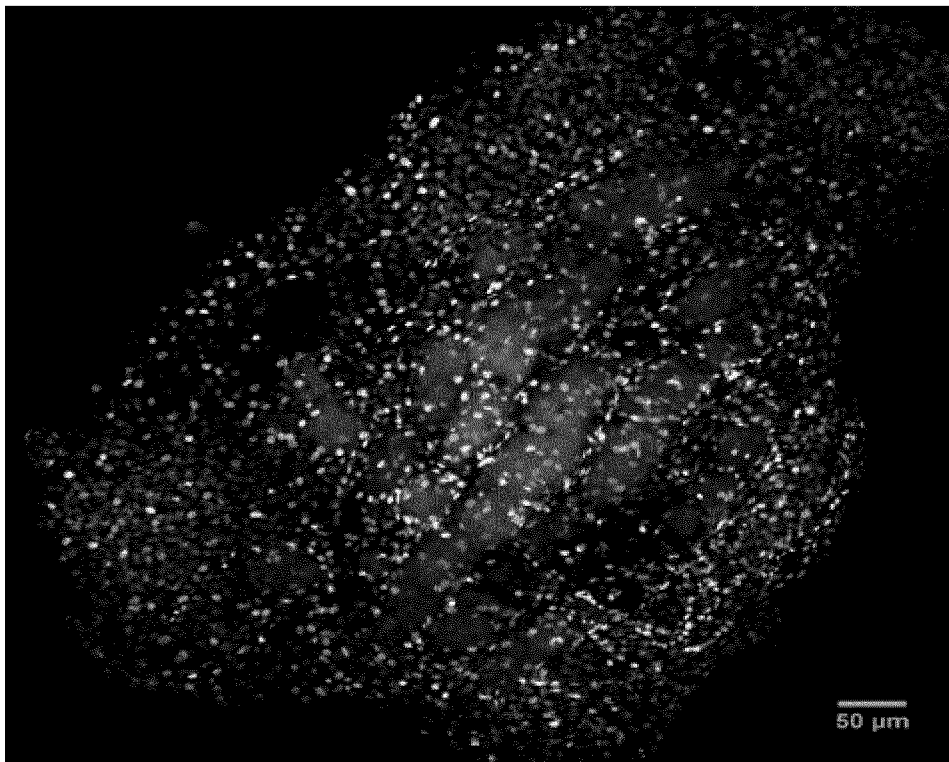


Fig. 11

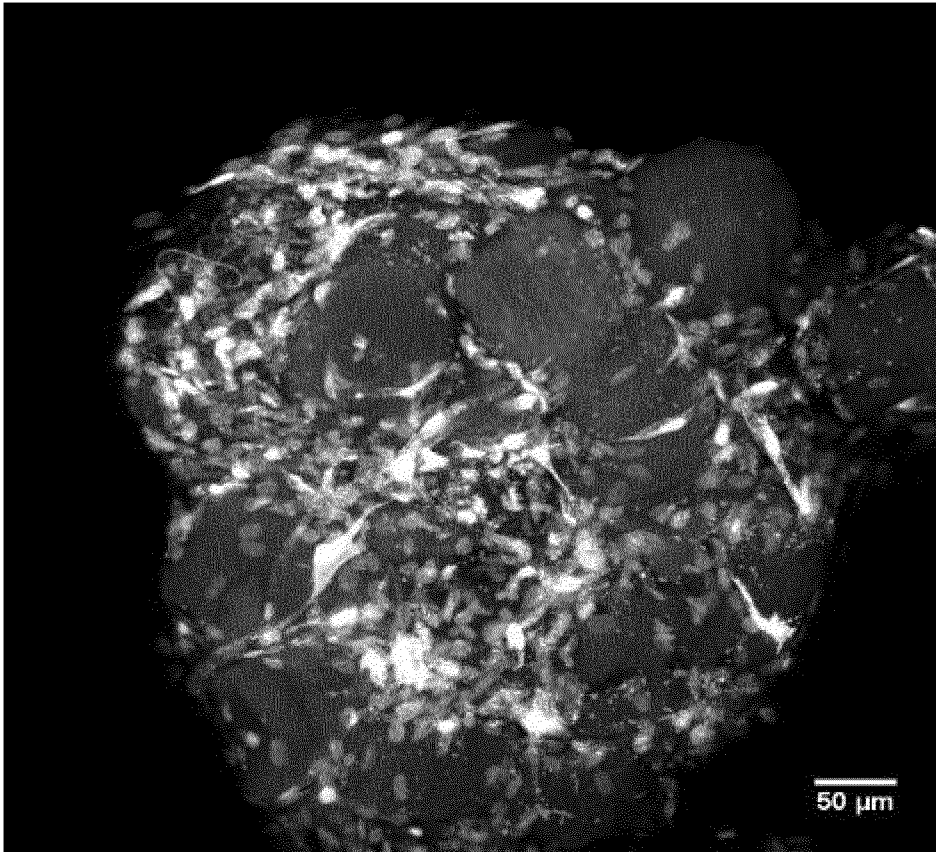


Fig. 12

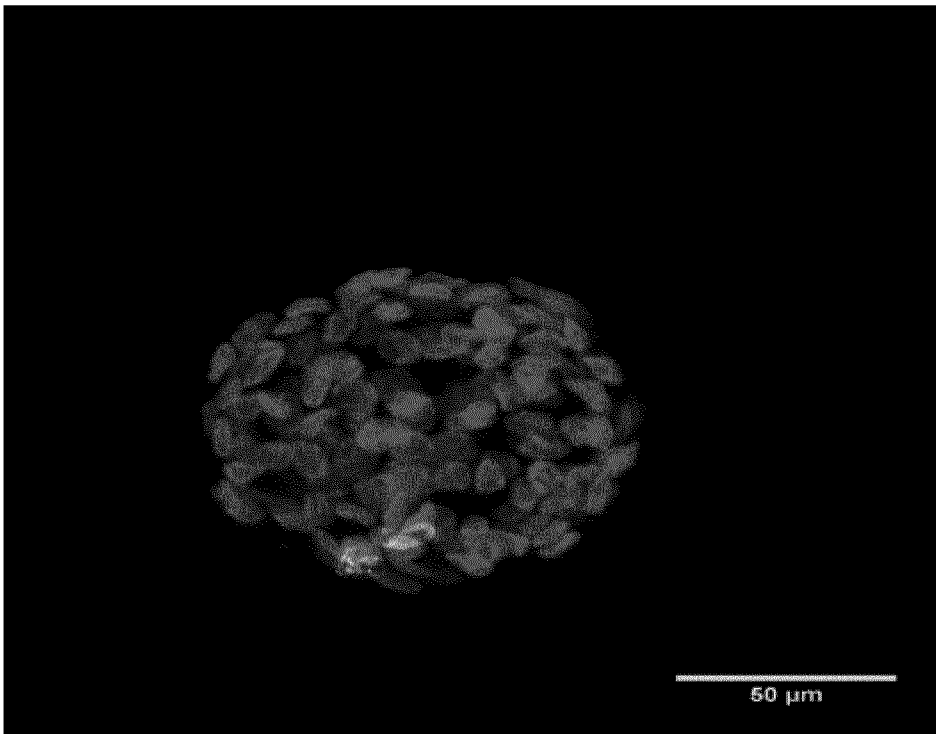


Fig. 13A

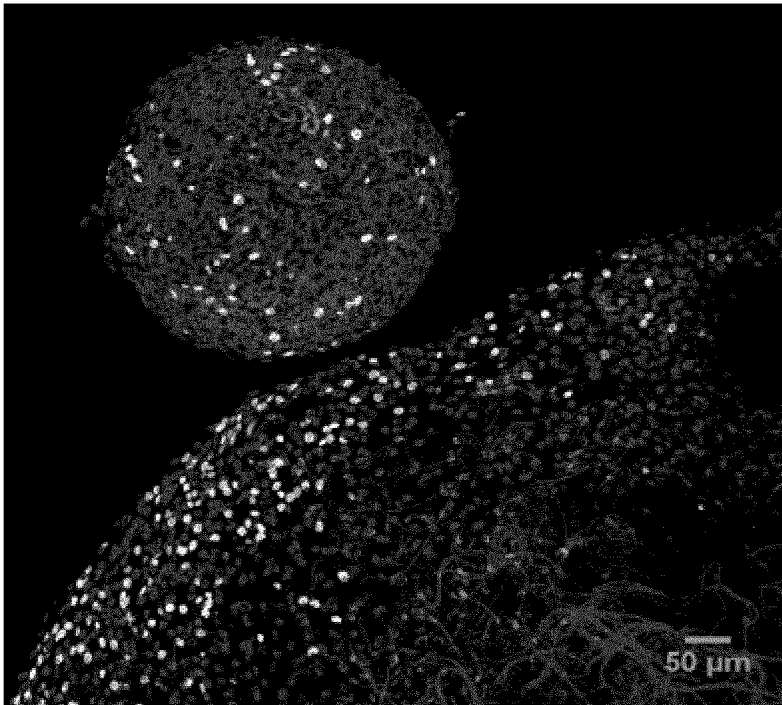


Fig. 13B

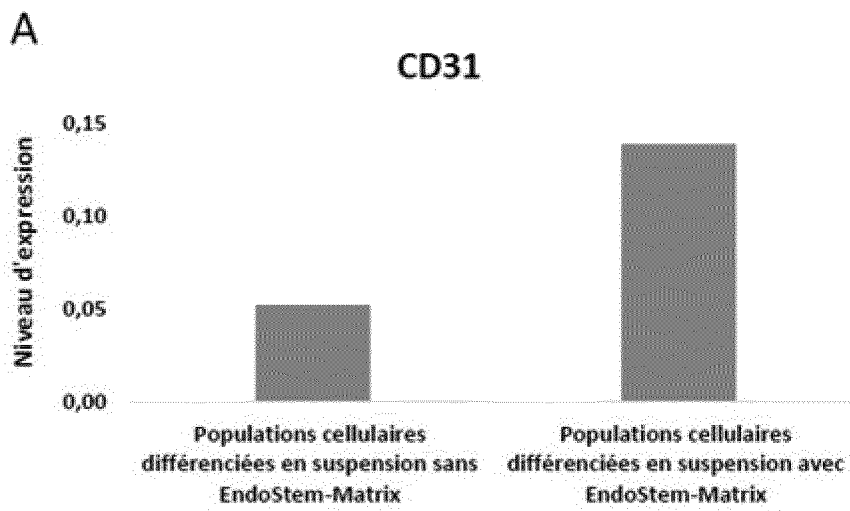


Fig. 14A

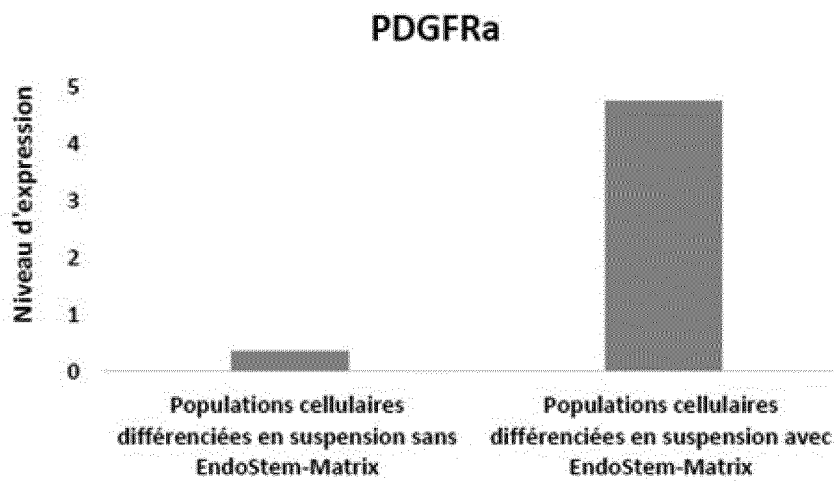


Fig. 14B

19/33

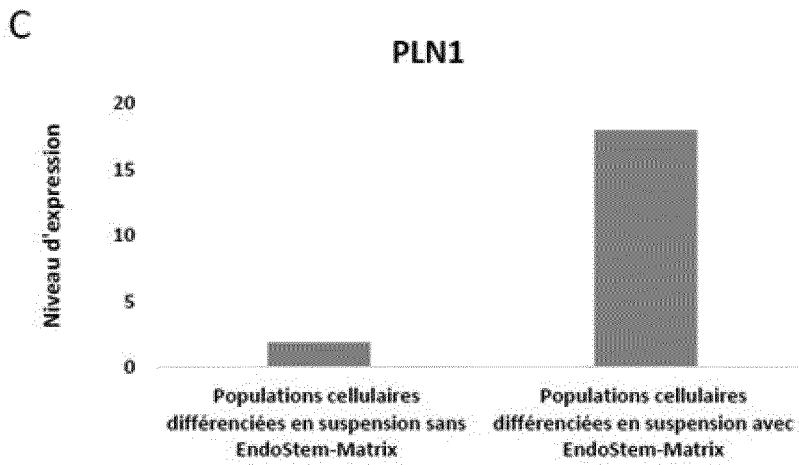


Fig. 14C

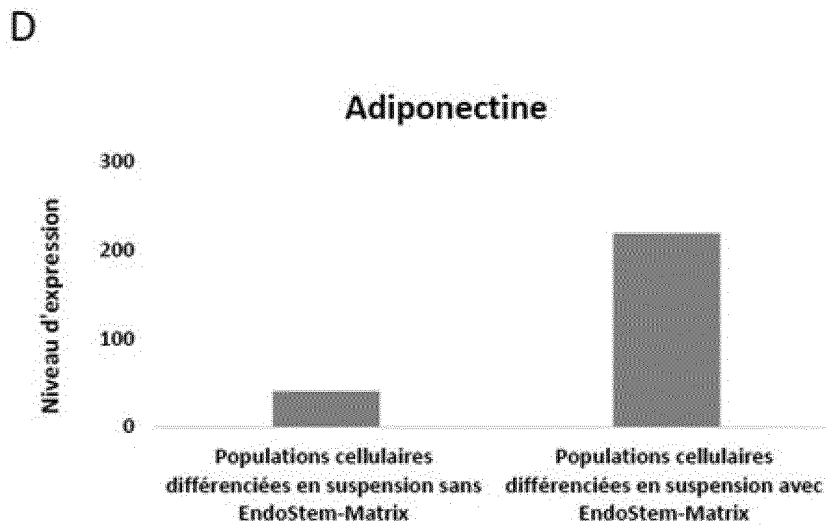


Fig. 14D

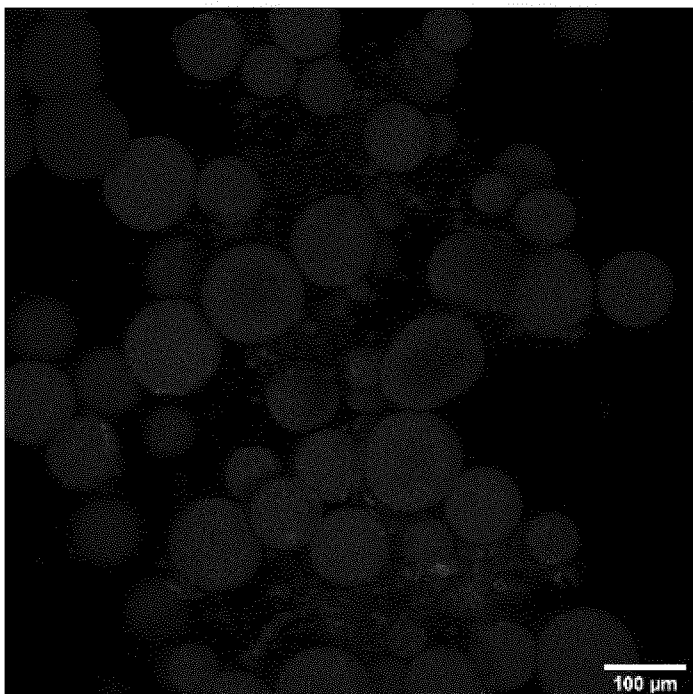


Fig. 15A

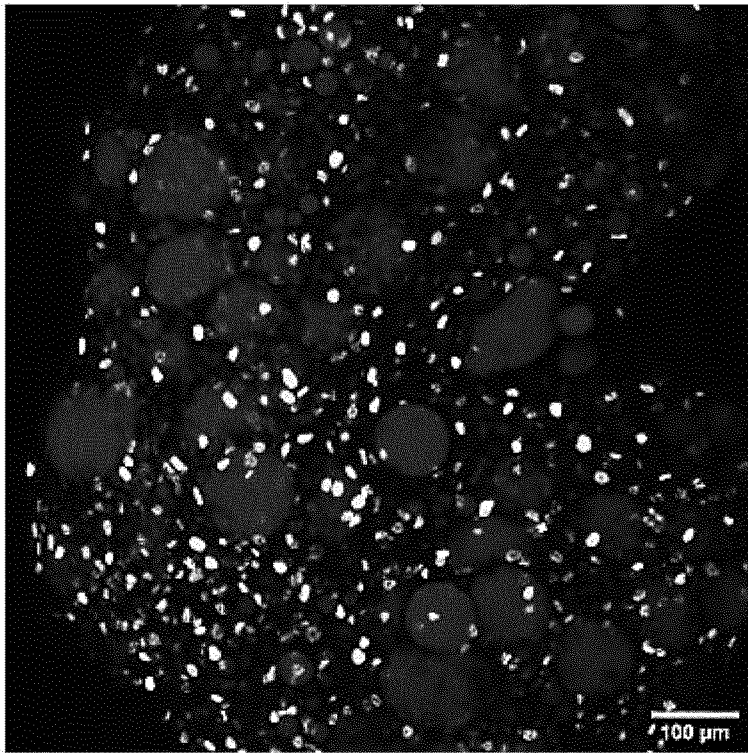


Fig. 15B

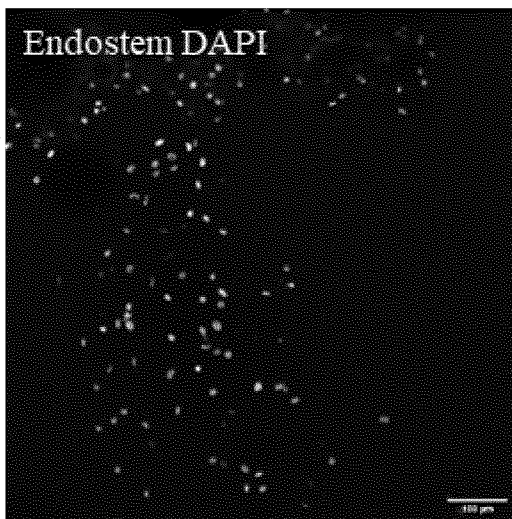


Fig. 16A

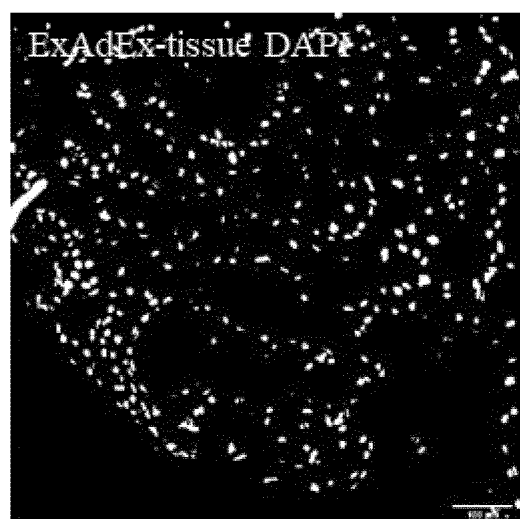


Fig. 16B

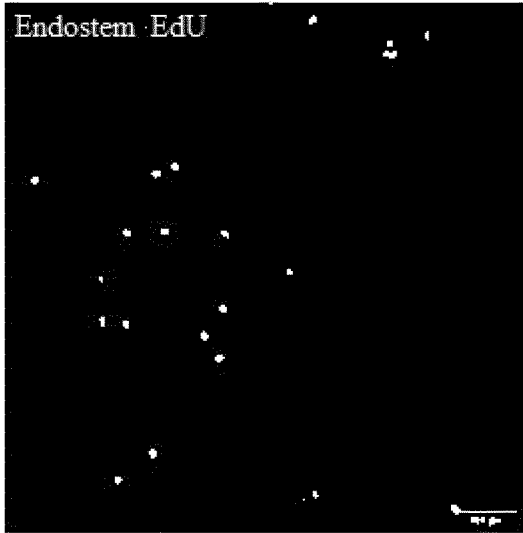


Fig. 16C

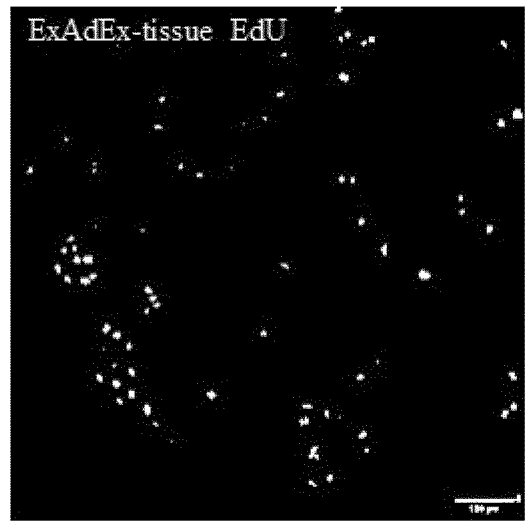


Fig. 16D

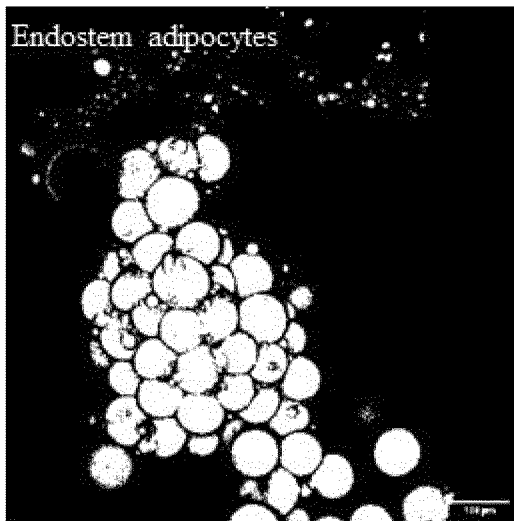


Fig. 16E

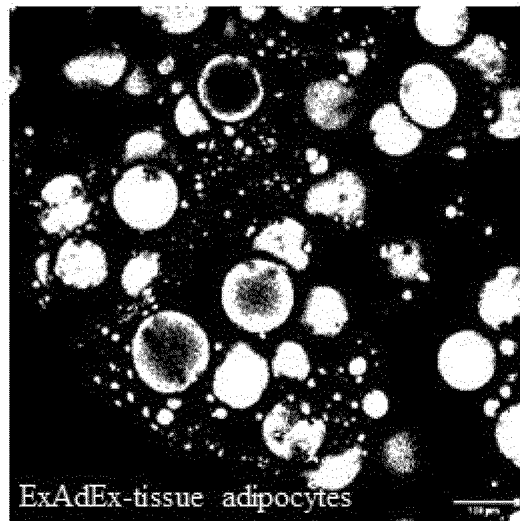


Fig. 16F

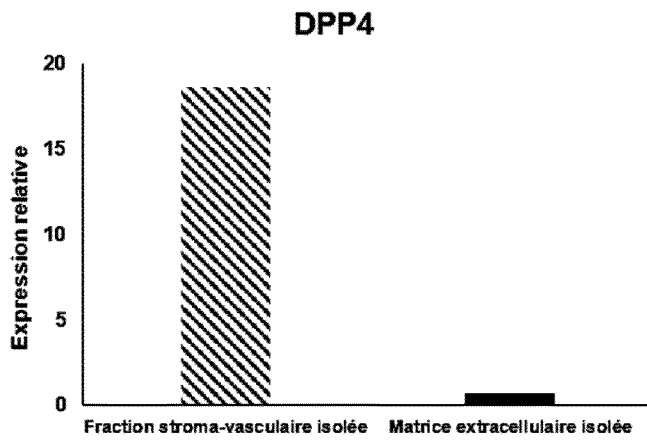


Fig. 17A

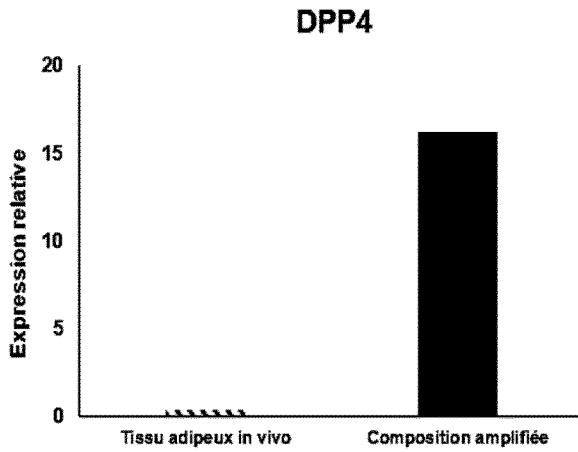


Fig. 17B

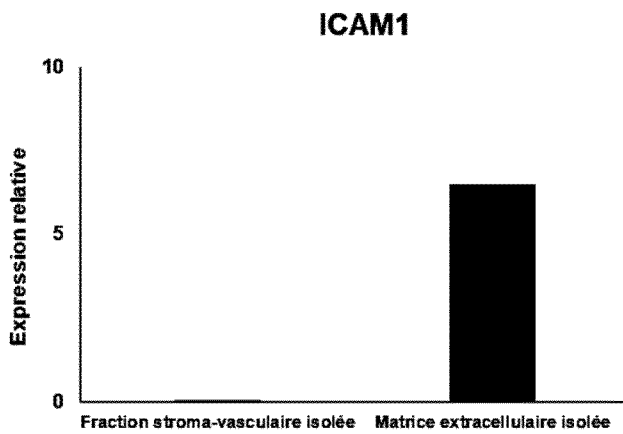


Fig. 17C

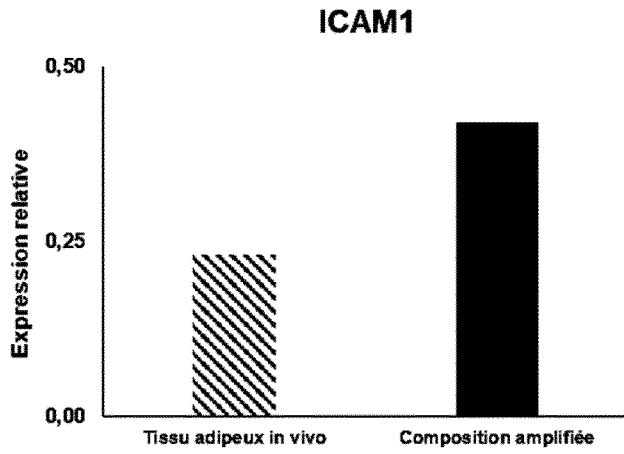


Fig. 17D

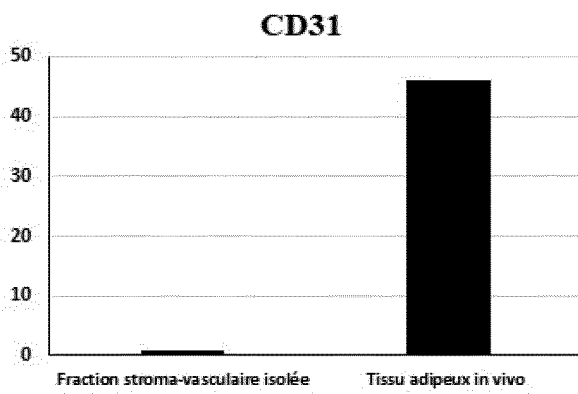


Fig. 17E

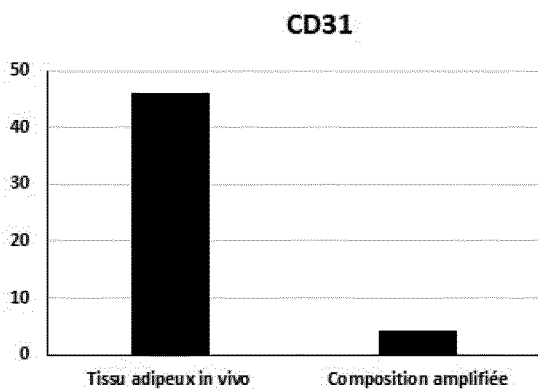


Fig. 17F

24/33

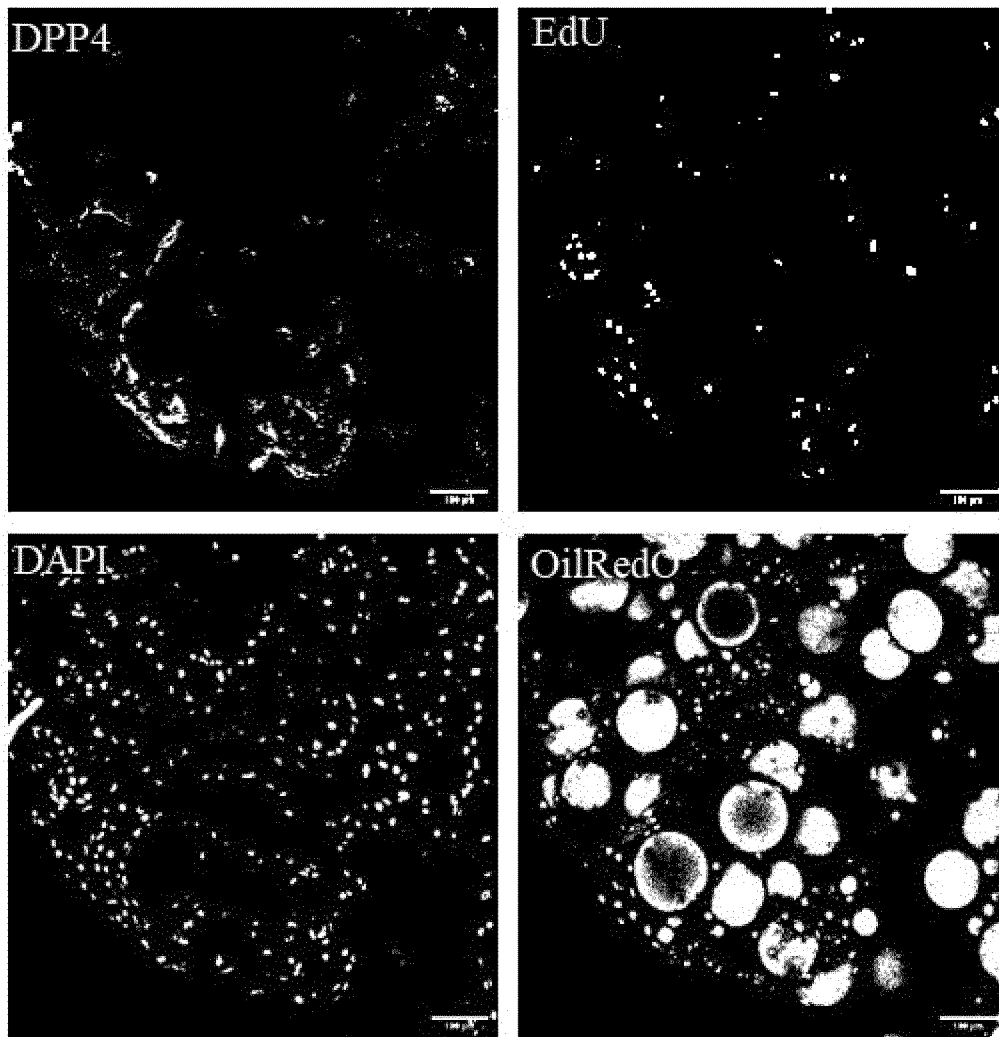


Fig. 18

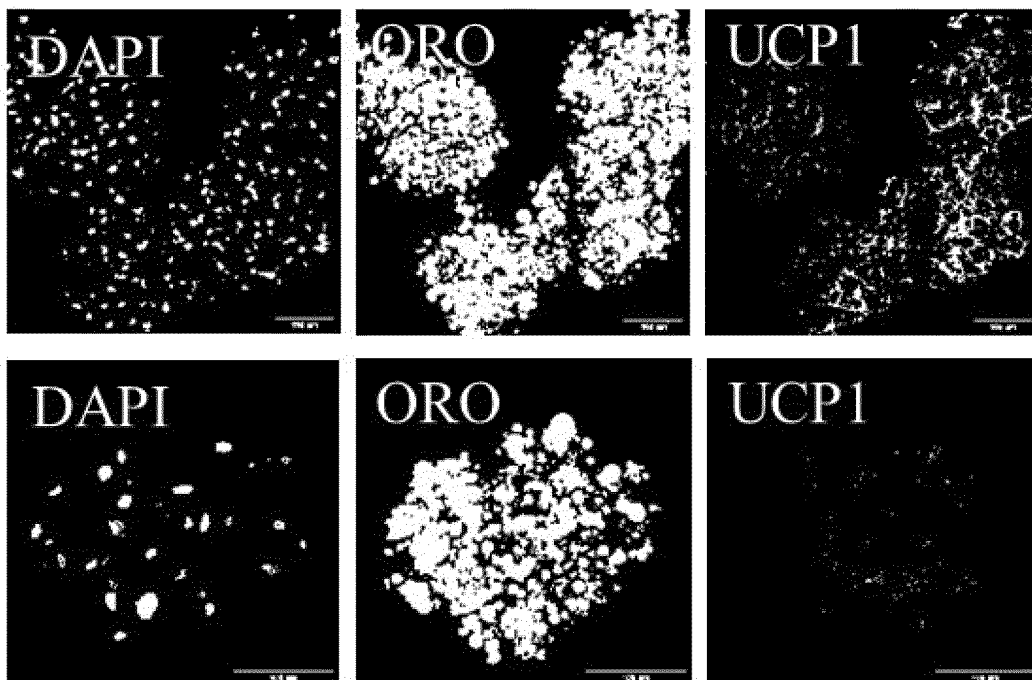


Fig. 19

25/33

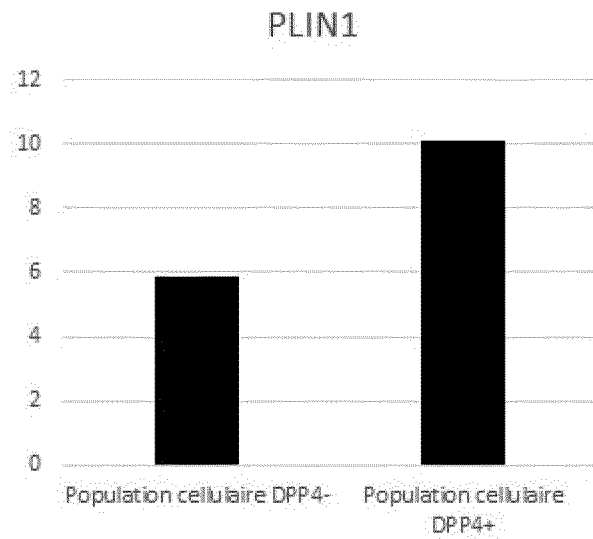


Fig. 20A

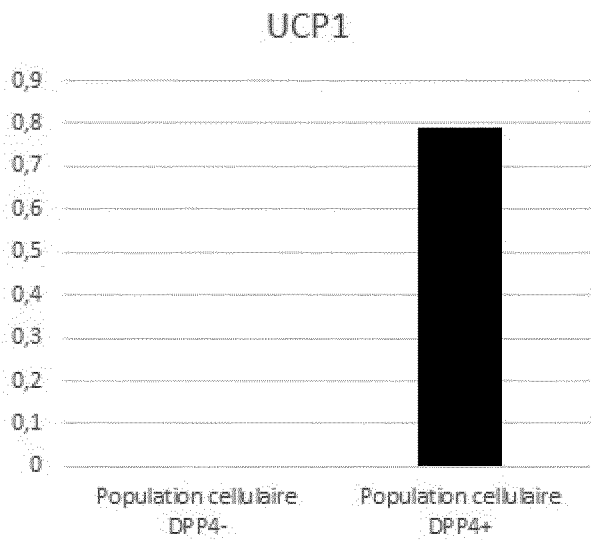


Fig. 20B

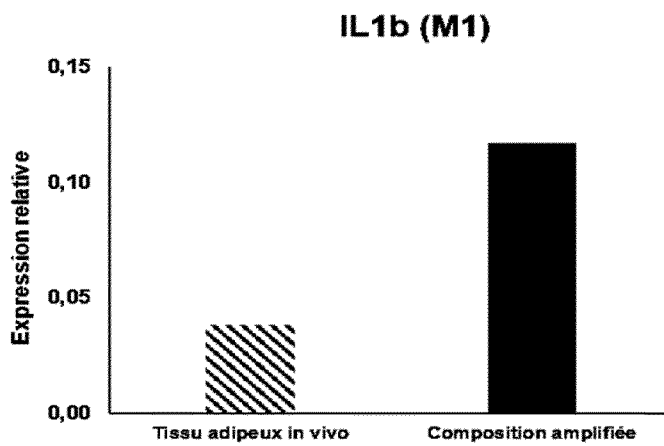


Fig. 21A

26/33

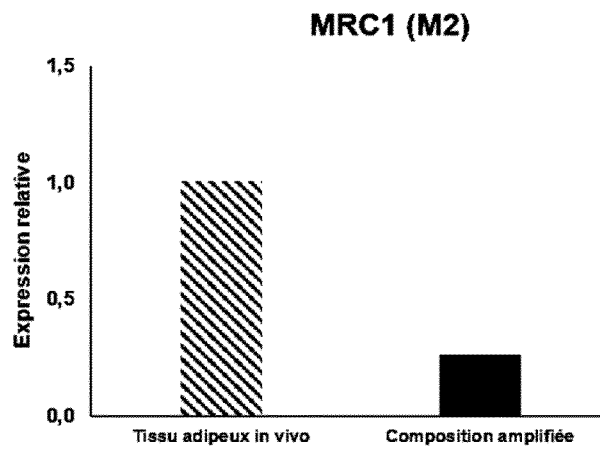


Fig. 21B

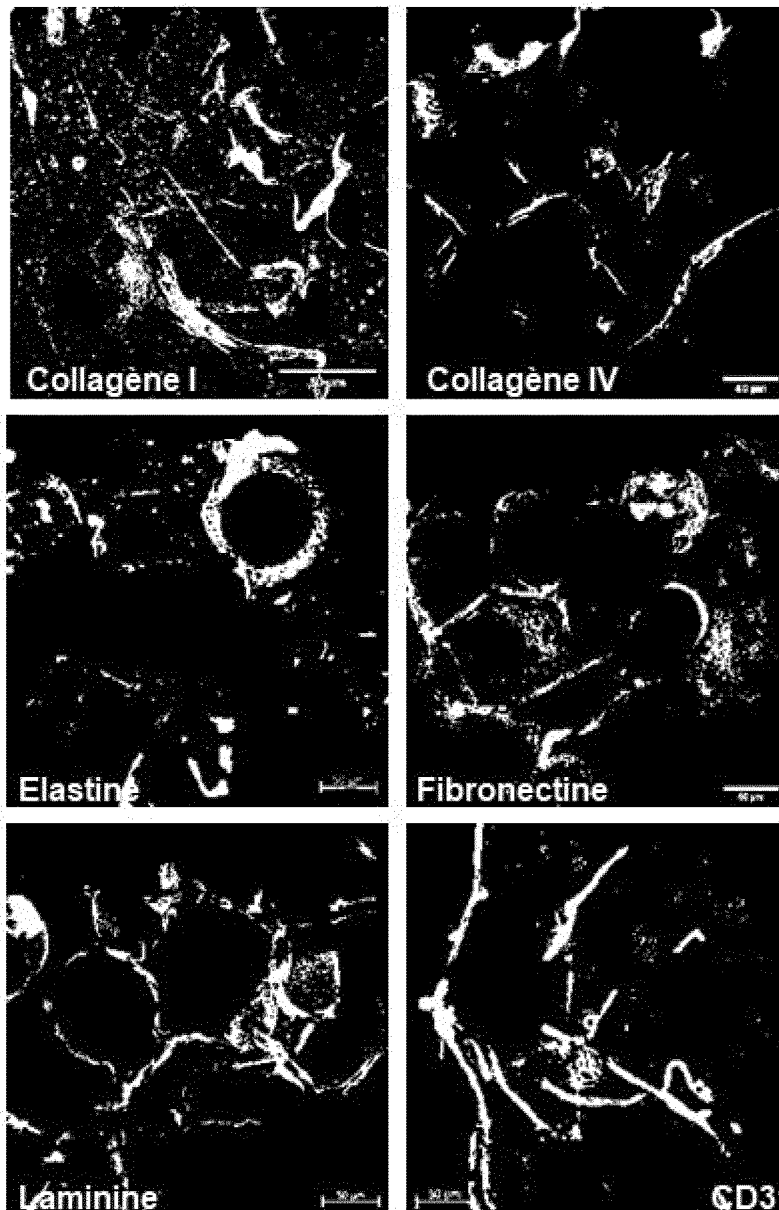


Fig. 22

27/33

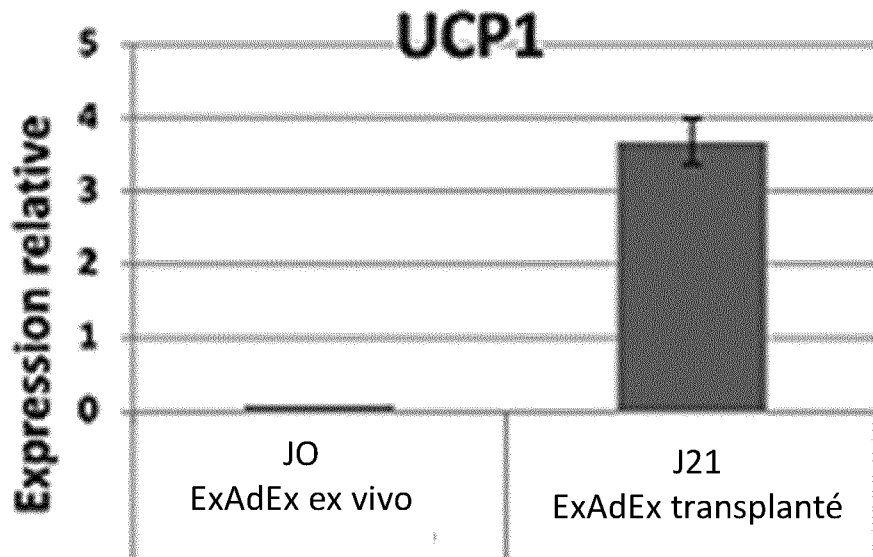


Fig. 23

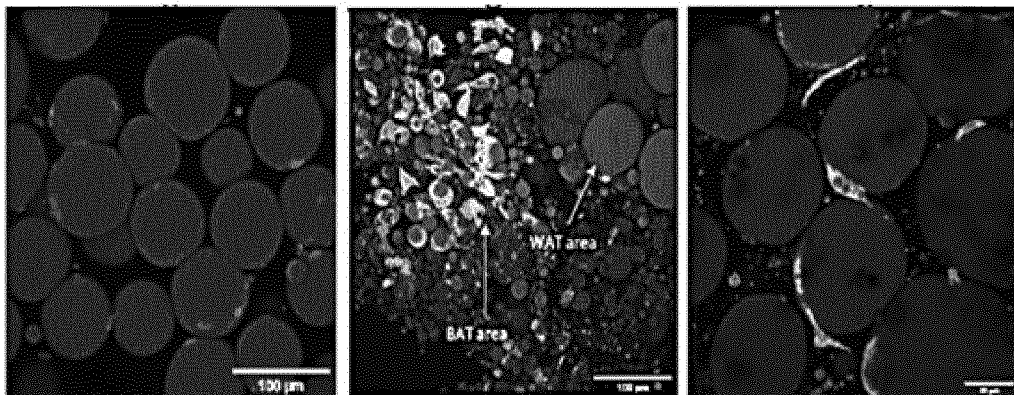


Fig. 24

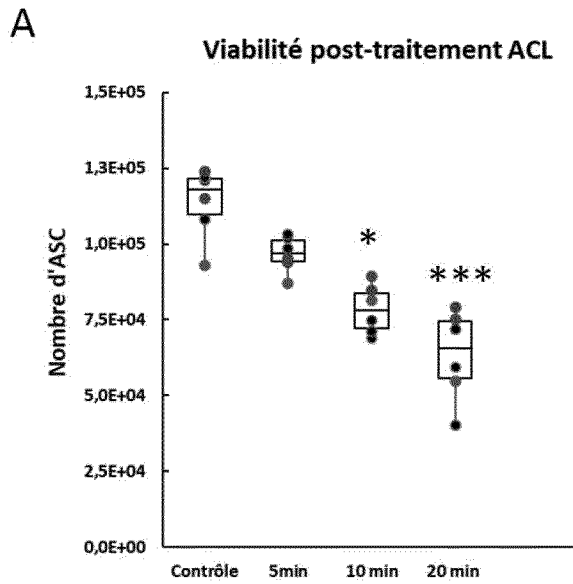


Fig. 25A

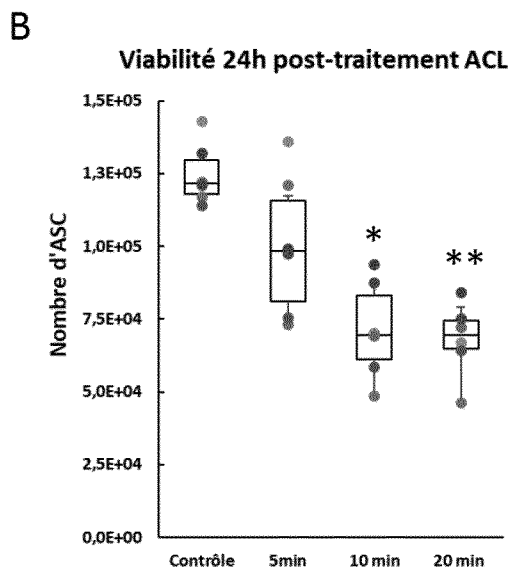


Fig. 25B

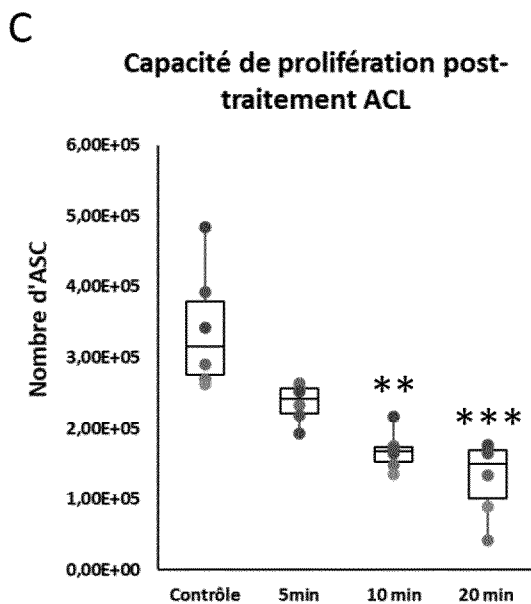


Fig. 25C

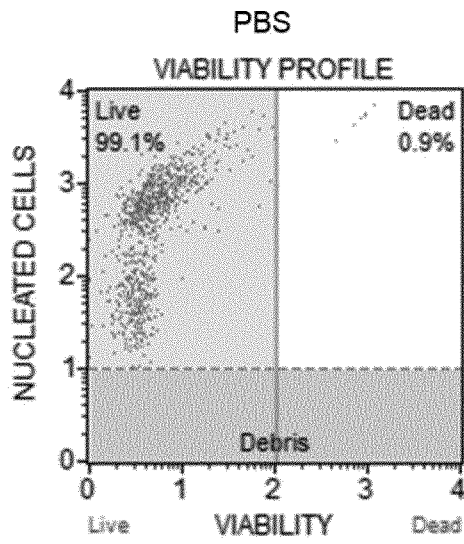


Fig. 26A

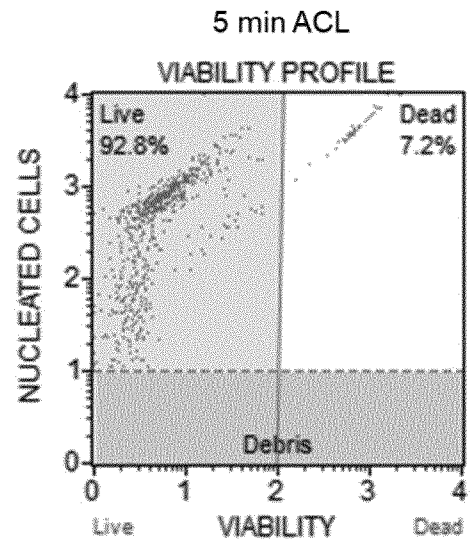


Fig. 26B

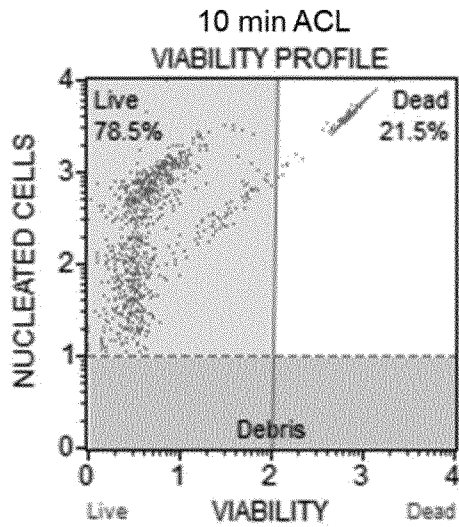


Fig. 26C

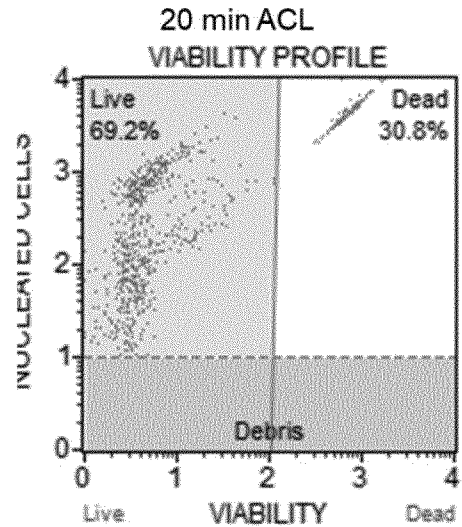


Fig. 26D

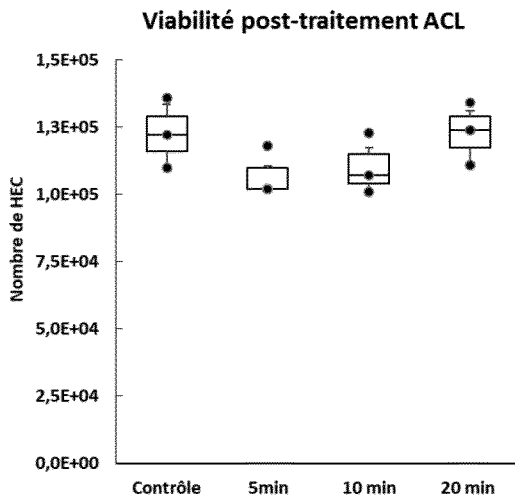


Fig. 27A

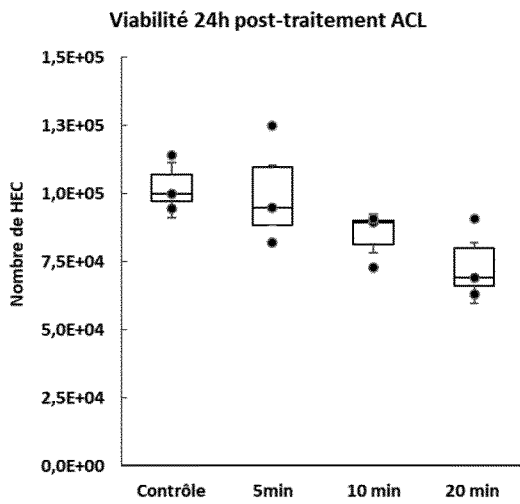


Fig. 27B

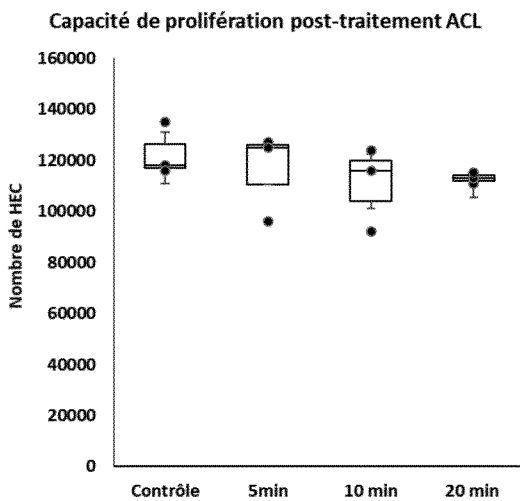


Fig. 27C

**Caractérisation des populations cellulaires en cytométrie en flux du produit amplifié**

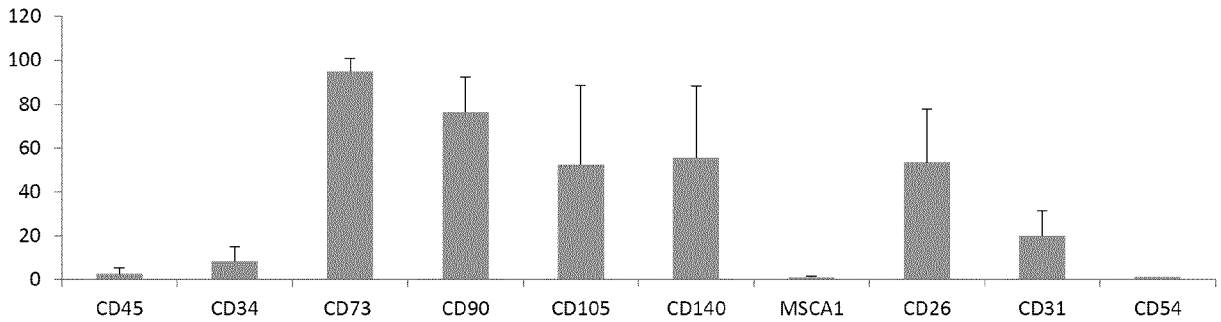


Fig. 28

Caractérisation des populations par cytométrie en flux

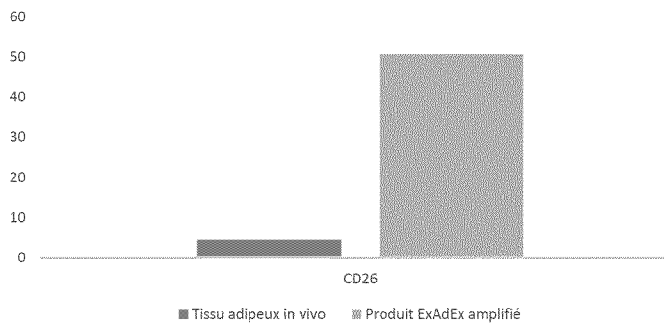


Fig. 29A

Caractérisation des populations par cytométrie en flux

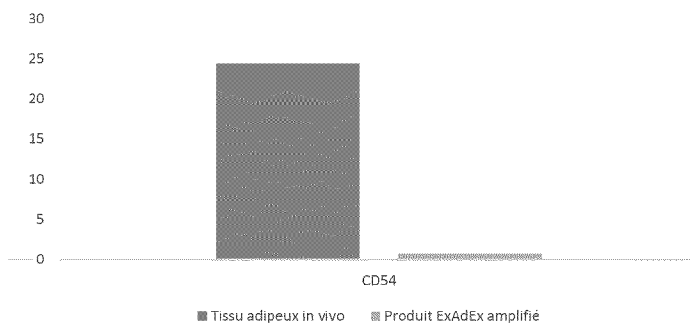


Fig. 29B

Milieu de proliferation ExAdEx

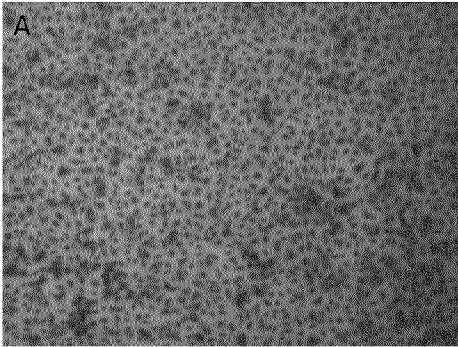


Fig. 30A

Milieu de differentiation ExAdEx

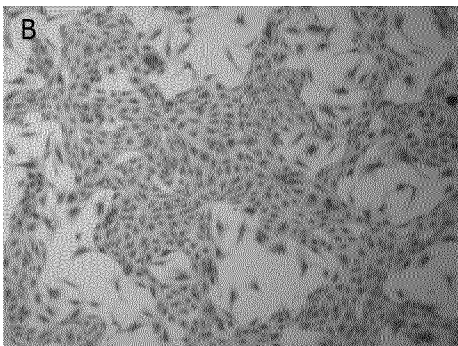


Fig. 30B

Milieu de differentiation standard



Fig. 30C

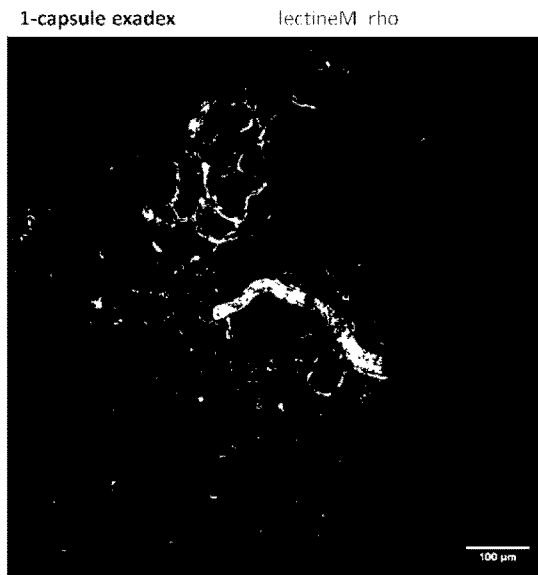


Fig. 31

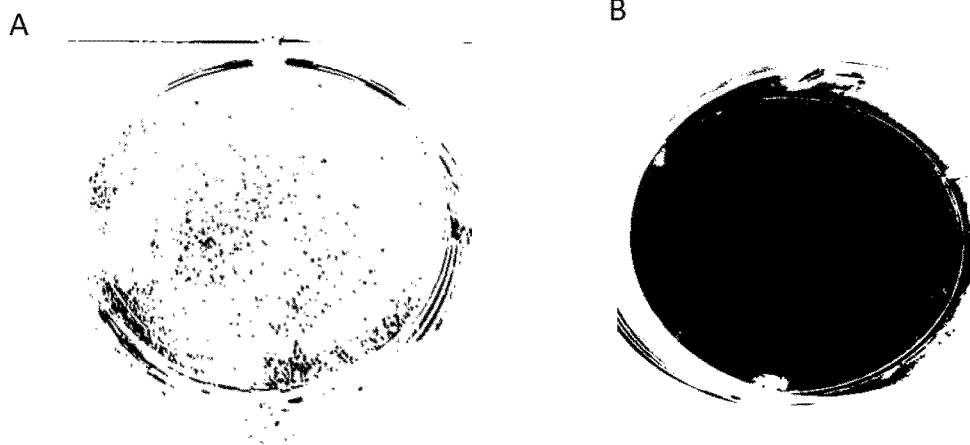


Fig. 32

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/EP2021/069888**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <i>C12N 5/077</i> (2010.01)i; <i>C12N 5/0775</i> (2010.01)i; <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>  Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018216070 A1 (DESCHASEAUX FREDERIC [FR] ET AL) 02 August 2018 (2018-08-02) the whole document paragraph [0116] - paragraph [0117] claims 1-45	18, 19
X	YAO YAO ET AL. "Adipose Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel : A Novel Adipose Tissue-Derived Injectable for Stem Cell Therapy" <i>PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY</i> , US, Vol. 139, No. 4, 01 April 2017 (2017-04-01), pages 867-879 DOI: 10.1097/PRS.0000000000003214 ISSN: 0032-1052, XP055637126	12-14, 17
Y	the whole document page 869; figure 1 page 871 - page 872	15,16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>30 September 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>12 October 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/EP <b>European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands</b> Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer <b>Zuber Perez, C</b>  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/069888

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHOI J S ET AL. "Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering" <i>JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</i> , Vol. 139, No. 1, 01 October 2009 (2009-10-01), pages 2-7, [retrieved on 2009-05-28] DOI: 10.1016/J.JCONREL.2009.05.034 ISSN: 0168-3659, XP026519049	15,16
A	the whole document	1-13
A	CN 109010920 A (SICHUAN NEO LIFE STEM CELL BIOTECH INC) 18 December 2018 (2018-12-18) the whole document claims 1-10	12-19
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" <i>JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE, US</i> , Vol. 11, No. 11, 03 February 2017 (2017-02-03), pages 3220-3235 DOI: 10.1002/term.2213 ISSN: 1932-6254, XP055638160 the whole document	1-20
A	PABLO BORA ET AL. "Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation" <i>STEM CELL RESEARCH &amp; THERAPY</i> , Vol. 8, No. 1, 15 June 2017 (2017-06-15), DOI: 10.1186/s13287-017-0598-y XP055638162 the whole document	1-20
A	DAVID MERRICK ET AL. "Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue" <i>SCIENCE, US</i> , Vol. 364, No. 6438, 25 April 2019 (2019-04-25), page eaav2501 DOI: 10.1126/science.aav2501 ISSN: 0036-8075, XP055679684 the whole document	1-20
A	DAVID MERRICK ET AL. "Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue" <i>SCIENCE, US</i> , Vol. 364, No. 6438, 25 April 2019 (2019-04-25), page eaav2501 DOI: 10.1126/science.aav2501 ISSN: 0036-8075, XP055679681 the whole document page 5, paragraph 2	1-20
X,P	WO 2020144381 A1 (UNIV COTE DAZUR [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR] ET AL.) 16 July 2020 (2020-07-16) the whole document claims 1-18 examples 1-3	1-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/EP2021/069888**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2018216070	A1	02 August 2018	BR	112018000470	A2	11 September 2018
				CA	2991523	A1	19 January 2017
				CN	108350423	A	31 July 2018
				EP	3320086	A1	16 May 2018
				HK	1250379	A1	14 December 2018
				US	2018216070	A1	02 August 2018
				WO	2017009263	A1	19 January 2017
-----							
CN	109010920	A	18 December 2018	NONE			
-----							
WO	2020144381	A1	16 July 2020	CA	3125836	A1	16 July 2020
				FR	3091707	A1	17 July 2020
				WO	2020144381	A1	16 July 2020
-----							

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2021/069888

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N5/077 C12N5/0775 C12N5/071 ADD.				
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB				
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE				
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N				
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche				
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS				
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
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 ----- -/--	18,19		
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents                 </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe                 </td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités:				
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 30 septembre 2021		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 12/10/2021		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Zuber Perez, C		

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	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	12-14,17
Y	le document en entier page 869; figure 1 page 871 - page 872	15,16
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]	15,16
A	le document en entier	1-13
A	----- 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	12-19
A	----- MAROESJKA 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	1-20
	----- -/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>PABLO BORA ET AL: "Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation", STEM CELL RESEARCH &amp; THERAPY, vol. 8, no. 1, 15 juin 2017 (2017-06-15), XP055638162, DOI: 10.1186/s13287-017-0598-y le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-20
A	<p>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</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-20
A	<p>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, XP055679681, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aav2501 le document en entier page 5, alinéa 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-20
X,P	<p>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</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-20

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2021/069888

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
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	
-----				
WO 2020144381	A1	16-07-2020	CA 3125836 A1	16-07-2020
			FR 3091707 A1	17-07-2020
			WO 2020144381 A1	16-07-2020
-----				