



(12) **DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION**

(13) **A1**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2020/01/13
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2020/07/16
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2021/07/06
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2020/050720
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2020/144381
(30) Priorité/Priority: 2019/01/11 (FR1900287)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 5/077* (2010.01),
C12N 5/071 (2010.01), *C12N 5/0775* (2010.01)
(71) Demandeurs/Applicants:
UNIVERSITE COTE D'AZUR, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANT ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS), FR;
CHU DE NICE, FR
(72) Inventeurs/Inventors:
DANI, CHRISTIAN, FR;
DOGLIO, ALAIN, FR;
DANI-DAVESNE, VINCENT, FR;

(54) Titre : PROCEDE D'AMPLIFICATION IN VITRO OU EX VIVO DE CELLULES SOUCHES DU TISSU ADIPEUX HUMAIN
(54) Title: METHOD FOR THE IN VITRO OR EX VIVO AMPLIFICATION OF HUMAN ADIPOSE TISSUE STEM CELLS

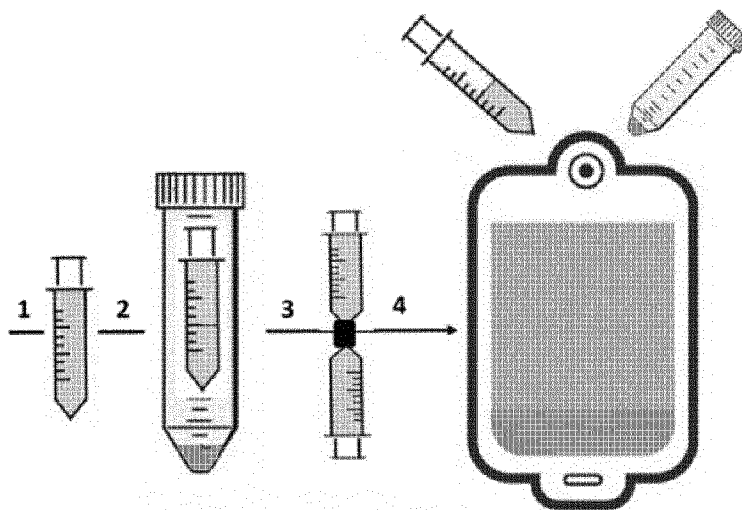


FIG. 1A

(57) **Abrégé/Abstract:**

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

(72) Inventeurs(suite)/Inventors(continued): LETERTRE, PHILIPPE, FR

(74) Agent: BENOIT & COTE INC.

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/144381 A1(43) Date de la publication internationale
16 juillet 2020 (16.07.2020)(51) Classification internationale des brevets :
C12N 5/077 (2010.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2020/050720(22) Date de dépôt international :
13 janvier 2020 (13.01.2020)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1900287 11 janvier 2019 (11.01.2019) FR(71) Déposants : UNIVERSITE COTE D'AZUR [FR/FR] ;
Grand Château, 28 Avenue de Valrose BP2135, 06103
NICE CEDEX 2 (FR). INSTITUT NATIONAL DE**LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE**
[FR/FR] ; 101, rue de Tolbiac, 75013 Paris (FR). **CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
(CNRS)** [FR/FR] ; 3 rue Michel Ange, 75016 PARIS (FR).
CHU DE NICE [FR/FR] ; 4 Avenue Reine Victoria, 06200
Nice (FR).(72) Inventeurs : **DANI, Christian** ; 19 avenue Bellevue, 06100
Nice (FR). **DOGLIO, Alain** ; 3341 Route de l'Abadie,
06730 Saint André de la Roche (FR). **DANI-DAVESNE,
Vincent** ; 45b boulevard Gorbella Résidence Les Jardins de
Gorbella - Bât G, 06100 Nice (FR). **LETERTRE, Philippe**
; 343 chemin du Vieux Pont Le Clos Trastour, 06480 La
Colle sur Loup (FR).(74) Mandataire : **MACQUET, Christophe** ; Arche des Do-
lines, 7 rue Soutrane, 06560 Valbonne (FR).

(54) Title: METHOD FOR THE IN VITRO OR EX VIVO AMPLIFICATION OF HUMAN ADIPOSE TISSUE STEM CELLS

(54) Titre : PROCEDE D'AMPLIFICATION IN VITRO OU EX VIVO DE CELLULES SOUCHES DU TISSU ADIPEUX HUMAIN

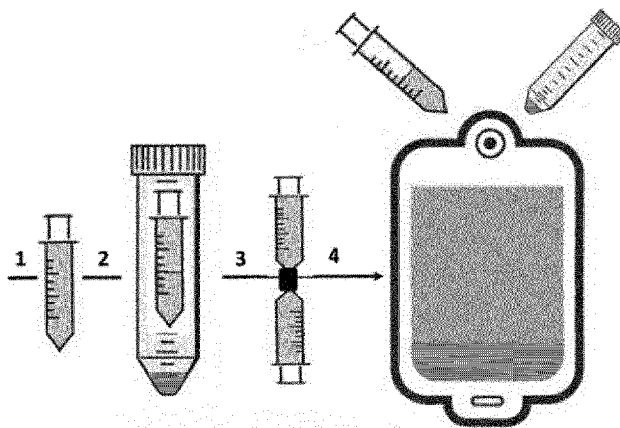


FIG. 1A

(57) **Abstract:** The subject matter of the present invention is a method for *in vitro* or *ex vivo* amplification of human adipose tissue stem cells. This method comprises the following steps: extracting a stromal vascular fraction of a human adipose tissue comprising endothelial cells of the human adipose tissue vascular network and human adipose tissue stem cells, and an extracellular matrix of said human adipose tissue, said extracellular matrix comprising endothelial cells of the human adipose tissue vascular network, human adipose tissue stem cells 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 du tissu adipeux humain. Ce procédé comprend les étapes suivantes: extraction, d'une part, d'une fraction stromavasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain, et d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène; mélange de ladite fraction

WO 2020/144381 A1

WO 2020/144381 A1 

(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, 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.

(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), eurasienn (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).

Publiée:

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

**PROCEDE D'AMPLIFICATION IN VITRO OU EX VIVO DE CELLULES
SOUCHES DU TISSU ADIPEUX HUMAIN**

Domaine technique de l'invention

5 La présente invention concerne un procédé d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules souches du tissu adipeux humain. Elle concerne en outre un procédé d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules différenciées, une matrice extracellulaire, une
10 composition comprenant un mélange d'une matrice extracellulaire et d'une fraction stroma-vasculaire, une utilisation de la matrice extracellulaire ou de la composition comprenant un mélange de la matrice extracellulaire et de la fraction stroma-vasculaire, et
15 des cellules différenciées obtenues selon le procédé de l'invention pour leur utilisation.

Art antérieur

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

30 Le lipofilling est une technique particulière de thérapie cellulaire permettant de transférer des cellules graisseuses, ou adipocytes, d'une zone du corps à une autre afin de remodeler le corps ou le visage.

 A ce jour, seuls les adipocytes présents dans certains sites adipeux sont utilisés pour la thérapie cellulaire et, plus particulièrement, pour le lipofilling. Or, selon

les cas, la quantité d'adipocytes disponible chez un patient peut être limitante. Par exemple, lorsqu'un patient a un indice de masse corporelle trop bas ou a subi une chimiothérapie, il peut ne pas avoir suffisamment de tissu adipeux pour procéder à un lipofilling.

Dans ce contexte, il existe un besoin de réaliser des cultures d'adipocytes autologues et, par suite, de développer des méthodes d'amplification cellulaire permettant l'obtention de quantités importantes d'adipocytes de grade thérapeutique en vue, notamment, d'un lipofilling.

La procédure standard, pour isoler et amplifier les précurseurs d'adipocytes à partir de prélèvements de tissu adipeux, passe par une dissociation enzymatique puis par leur expansion en deux dimensions (2D) par attachement au plastique de boîtes de culture. Cette procédure est coûteuse, longue, et nécessite de nombreuses manipulations qui augmentent les risques de contaminations. De plus, elle entraîne une destruction de la structure tridimensionnelle du tissu, ainsi que la perte de types cellulaires d'intérêts comme les cellules endothéliales qui jouent un rôle essentiel à la fois pour la vascularisation du greffon et la physiologie de l'adipocyte.

La dissociation non-enzymatique du tissu adipeux, le plus souvent basée sur un procédé mécanique, permet d'isoler les précurseurs d'adipocytes. Ce type de dissociation apparaît comme une méthode alternative beaucoup moins coûteuse, plus rapide et qui présente des avantages incontestables pour la fabrication d'un produit conforme aux standards d'une production de grade thérapeutique (exposition réduite à des produits ou contaminants extérieurs). En revanche, les procédés de

dissociation non-enzymatique présentés à ce jour ne sont pas satisfaisants car le nombre de précurseurs d'adipocytes obtenu est faible comparé à la dissociation enzymatique. Cela nécessite alors leur amplification en 2D sur boîte de culture. De plus, les cellules endothéliales, la matrice extracellulaire ainsi que la structure tridimensionnelle du tissu adipeux sont perdues à la fin du processus.

Il a été proposé différentes matrices synthétiques pour y ensemer les précurseurs d'adipocytes et ainsi essayer de reconstituer au mieux la structure du tissu adipeux. La matrice sert également à orienter in vitro les précurseurs d'adipocytes vers un type cellulaire non adipeux (essentiellement osseux ou cartilagineux) avant implantation. Du tissu adipeux décellularisé a également été proposé pour augmenter la différenciation des précurseurs et mieux mimer la structure du tissu adipeux. La fabrication de tous ces types de matrices nécessite de nombreuses étapes faisant intervenir des réactions enzymatiques ou de longs traitements chimiques. De plus, le tissu décellularisé, par définition, perd ces cellules endogènes mais perd également les facteurs d'intérêt thérapeutique qui sont ancrés sur la matrice native, ce qui réduit la valeur clinique de ce type de matrice. Le tissu adipeux non décellularisé et enrichi en précurseurs d'adipocytes (préalablement isolés par dissociation enzymatique) suivi d'une amplification en 2D a été proposé récemment comme matrice pour une meilleure reconstruction osseuse. Le temps pour générer cette matrice biologique est long, nécessite trois semaines de culture in vitro, et ne permet pas l'amplification des précurseurs d'adipocytes. Seul l'intérêt pour la réparation osseuse a été mis en avant par les auteurs.

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

15 **Résumé de l'invention**

Compte tenu de ce qui précède, un problème technique que se propose de résoudre l'invention est d'obtenir *in vitro* ou *ex vivo* une grande quantité de cellules souches du tissu adipeux humain ou de cellules différenciées, de grade thérapeutique.

La solution de l'invention à ce problème technique a pour premier objet, un procédé d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules souches du tissu adipeux humain, comprenant les étapes suivantes : extraction, d'une part, d'une fraction stroma-vasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain et, d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène ; 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.

5 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 et limitant ainsi les manipulations qui augmentent les risques de contaminations.

10 Avantageusement, - l'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation non-enzymatique et, en particulier, l'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation mécanique ; - l'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire comprend les
15 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
20 matrice extracellulaire ; - le collagène de la matrice extracellulaire est du collagène de type I et du collagène de type III ; et - la culture du mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes : transfert dudit mélange de
25 manière stérile dans une poche de culture en suspension comprenant du milieu de culture ; amplification dudit mélange formant des agrégats cellulaires ; et dissociation mécanique desdits agrégats cellulaires.

30 Selon un second objet, l'invention concerne un procédé d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules différenciées 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
5 cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène ; mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire ; culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension,
10 dans un milieu de culture ; et induction d'une différenciation des cellules souches du tissu adipeux pour obtenir des cellules différenciées.

Avantageusement - les cellules différenciées sont des adipocytes ou des ostéoblastes, préférentiellement des
15 adipocytes ; - 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 ; - l'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la
20 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
25 fraction A pour obtenir la matrice extracellulaire ; - le collagène de la matrice extracellulaire est du collagène de type I et du collagène de type III ; et - la culture du mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes :
30 transfert dudit mélange de manière stérile dans une poche de culture en suspension comprenant du milieu de culture ; amplification dudit mélange formant des agrégats

cellulaires ; et dissociation mécanique desdits agrégats cellulaires.

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

Avantageusement - le collagène est du collagène de type I et du collagène de type III ; - la matrice
10 extracellulaire comprend en outre de la fibronectine.

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

Avantageusement - le collagène est du collagène de type I et du collagène de type III ; - la matrice extracellulaire comprend en outre de la fibronectine.

Selon un cinquième objet, l'invention concerne l'utilisation *in vitro* de la matrice extracellulaire telle
25 que définie ci-dessus ou l'utilisation *in vitro* de la composition telle que définie ci-dessus pour le criblage d'actifs pharmacologiques contre l'obésité et les maladies métaboliques associées.
30

Selon un sixième objet, l'invention concerne des cellules différenciées obtenues selon le procédé défini ci-dessus destinées à une utilisation, ou pour leur

utilisation, en thérapie cellulaire, en particulier en chirurgie plastique et réparatrice et, plus particulièrement, pour le lipofilling.

5 **Brève description des figures**

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

10 - 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 ;

15 - 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 ;

20 - la figure 2 représente la population cellulaire C1 en milieu de culture Endothelial Growth Medium supplémenté en facteurs de croissance (EGM+), en suspension, constituée d'une majorité de cellules de type endothéliales ;

25 - la figure 3A montre le marquage immuno-fluorescent CD31+ (marqueur de cellules endothéliales) de la population cellulaire C1 en culture adhérente ;

30 - la figure 3B montre le marquage immuno-fluorescent PDGFRa+ (marqueur de cellules souches adipocytaires) de la population cellulaire C1 en culture adhérente ;

- la figure 4 illustre la population cellulaire C2 en milieu de culture EGM+ en suspension montrant la formation d'un réseau de type capillaire constitué de cellules

endothéliales CD31+ et présence d'agrégats constitués de cellules souches du tissu adipeux PDGFRA+ ;

5 - la figure 5 est une image par microscopie de la population cellulaire C3 en milieu de culture EGM+ en suspension montrant la présence d'agrégats constitués de cellules souches du tissu adipeux PDGFRA+ ;

10 - la figure 6A représente une PCR quantitative des populations cellulaires C2 et C3 permettant de déterminer la proportion relative de cellules endothéliales CD31+ et des cellules souches du tissu adipeux PDGFRA+ ;

- la figure 6B est une image de microscopie à fluorescence montrant la capacité de différenciation adipocytaire des populations cellulaires C2 ; Noyaux (gris foncé) Gouttelettes lipidiques (gris clair) ;

15 - la figure 6C illustre, par une image de microscopie à fluorescence, la capacité de différenciation adipocytaire des populations cellulaires C3 ; Noyaux (gris foncé) Gouttelettes lipidiques (gris clair) ;

20 - la figure 7 caractérise, en microscopie, le type fibreux de la matrice M1 ;

- la figure 8 montre, par microscopie, que la matrice M2 est hétérogène en termes de types matricielles : type fibreux et type riche en collagène ;

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

- la figure 10A montre, par microscopie à fluorescence, que la matrice M2 est de type riche en collagène ; collagène marqué au Picro-Sirius Red (gris clair) et marquage des noyaux (blanc) ;

30 - la figure 10B montre, par microscopie à fluorescence, que la matrice M3 est de type fibreux ; collagène marqué au Picro-Sirius Red (gris clair et fibres blanches) et marquage des noyaux (blanc) ;

- la figure 11A est une photographie du tissu adipeux centrifugé de la fraction A après dissociation mécanique contenant la matrice M4 ;

5 - la figure 11B 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) ;

10 - la figure 11C montre, par l'immunomarquage CD31, les structures capillaires formées par des cellules endothéliales CD31+ (blanc) dans la matrice M4 ; marquage des noyaux (gris foncé) ;

15 - la figure 11D illustre la présence du réseau de cellules souches du tissu adipeux PDGFRa+ (points gris clair) dans la matrice M4 ; marquage des noyaux (gris foncé) ;

20 - la figure 12 montre, par incorporation d'Edu, 5-ethylnyl-2'-deoxyuridine, dans le noyau des cellules en prolifération, que les cellules endogènes, dans la matrice extracellulaire de l'invention sont maintenues en prolifération dans le milieu EGM+ en suspension ; noyaux (gris foncé), cellules en prolifération (blanc) auto-fluorescence de la matrice (gris clair) ;

25 - la figure 13 montre que des cellules souches du tissu adipeux exogènes, mises en coculture avec la matrice extracellulaire de l'invention, forment des structures composées de ces cellules souches du tissu adipeux et des cellules endogènes présentent dans la matrice ; image prise après 3 jours de coculture, noyaux (gris foncé), collagène (gris clair), cellules souches exogènes du tissu adipeux (gris clair/blanc) ;

30 - la figure 14A montre la formation d'un agrégat cellulaire sans prolifération de cellules lors de la

culture cellulaire des cellules souches du tissu adipeux et des cellules endothéliales en suspension sans matrice extracellulaire ; image prise après 10j de co-culture ; noyaux (gris foncé), noyaux de cellules en prolifération (gris très clair) ;

5

- la figure 14B met en évidence une capacité de prolifération des cellules souches du tissu adipeux et des cellules endothéliales mises en co-culture, 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) ;

10

- la figure 15A montre le niveau d'expression du marqueur de cellules endothéliales CD31 dans les populations cellulaires différenciées obtenues par culture, en suspension, avec (droite) et sans (gauche) la matrice extracellulaire de l'invention ;

15

- la figure 15B 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 ;

20

- la figure 15C montre le niveau d'expression du marqueur d'adipocytes matures PLN1 dans les populations cellulaires différenciées obtenues par culture, en suspension, avec (droite) et sans (gauche) la matrice extracellulaire de l'invention ;

25

- la figure 15D 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 ;

30

- la figure 16 représente une image par microscopie à fluorescence de la fraction stroma-vasculaire après amplification et différenciation en présence de la matrice extracellulaire de l'invention ; noyau (gris foncé),
5 adipocyte mature (gris clair), matrice collagénique (gris moyen) ;

- les figures 17A et 17B sont des images qui mettent en évidence l'activation des capacités de prolifération du procédé selon l'invention. En figure 17A, un tissu adipeux non dissocié ne montre pas de cellules en prolifération.
10 En figure 17B, la composition montre des cellules en prolifération, les noyaux des cellules en prolifération étant représentés en blanc sur cette figure ;

- les figures 18A, 18B, 18C et 18D, illustrent l'expression de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), qui est concentrée dans la fraction stroma vasculaire (SVF) isolée, et l'expression de ICAM1, qui est concentrée dans la matrice isolée ;
15

- les figures 19A et 19B illustrent la présence de macrophages de type M1 et de type M2 respectivement, dans la composition amplifiée selon l'invention ; et
20

- la figure 20 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.
25

Description détaillée de l'invention

Le tissu adipeux est fourni pour réaliser l'Invention.

L'invention a pour premier objet, un procédé
30 d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules souches du tissu adipeux humain comprenant les étapes suivantes : extraction , d'une part, d'une fraction stroma-vasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant des cellules

endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain, et d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des
5 cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène ; mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire ; et culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en
10 suspension, dans un milieu de culture. 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
15 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.

Au sens de l'invention, il est entendu par « matrice extracellulaire » une matrice bioactive, c'est à dire une
20 matrice qui comprend différentes protéines du tissu adipeux et des cellules endogènes. Cette matrice extracellulaire permet l'amplification cellulaire en 3D, c'est-à-dire la prolifération des cellules en trois
25 dimensions. La matrice extracellulaire de l'invention est également notée ci-après « EndoStem-Matrix » ou « matrice EndoStem ».

Les protéines de la matrice extracellulaire du tissu adipeux comprennent du collagène. Ce collagène est de type
30 I et de type III. Les protéines de la matrice extracellulaire du tissu adipeux comprennent en outre de la fibronectine.

L'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation non-enzymatique, en particulier l'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation mécanique. La « dissociation mécanique » de l'invention permet de conserver intacte la structure de la matrice extracellulaire tandis qu'une digestion enzymatique fait généralement intervenir de la collagénase qui la détruit. La dissociation mécanique permet ainsi le maintien de la « vasculature » et la micro-structure de la matrice extracellulaire, qui présente en conséquence une organisation semblable à l'organisation du tissu adipeux *in vivo*.

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.

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.

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
5 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.

Dans ce mode de réalisation, l'étape de centrifugation
10 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
15 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.

La culture du mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire comprend
20 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 agrégats cellulaires ; et dissociation mécanique
25 desdits agrégats 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 limiter le nombre de contaminants lors de la culture
30 cellulaire. La dissociation mécanique des agrégats formés au cours de l'amplification ne nécessite pas d'ouverture du système, limitant ainsi l'exposition des produits

cellulaires à une éventuelle contamination de la culture par les éléments de l'environnement.

Dans un mode de réalisation, le milieu de culture, dans la poche de culture en suspension, est un milieu EGM+. Ce milieu de culture comprend le milieu de base pour la prolifération des cellules endothéliales (EGM) enrichi en Epidermal Growth Factor (EGF), Basic Growth Factor (FGF2), Insulin-like Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor 165, acide ascorbique, héparine et hydrocortisone (EGM+). Le milieu EGM+ permet également l'amplification des cellules souches adipocytaires sans altérer leur capacité de différenciation en adipocytes.

Le procédé de l'invention permet une amplification du nombre de cellules souches du tissu adipeux avec un facteur d'amplification supérieur à 10, avantageusement supérieur à 20, en particulier supérieur à 30, de préférence supérieur à 35. Le facteur d'amplification est le rapport entre le nombre de cellules obtenues après culture de la SVF isolée en présence de ladite matrice extracellulaire et le nombre de cellules avant l'invention. Dans un mode de réalisation particulier décrit dans l'exemple 2, le procédé de l'invention présente un facteur d'amplification de 36 en 8 jours.

Selon un second objet, l'invention concerne un procédé d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules différenciées 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 cellules différenciées.

Plus précisément, le procédé d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules différenciées comprend donc les étapes suivantes : extraction, d'une part, d'une fraction

stroma-vasculaire d'un tissu adipeux humain comprenant, des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain et des cellules souches du tissu adipeux humain, et d'autre part, d'une matrice extracellulaire dudit tissu adipeux humain, ladite matrice extracellulaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain et du collagène ; mélange de ladite fraction stroma-vasculaire et de ladite matrice extracellulaire ; culture du mélange obtenu à l'étape précédente, en suspension, dans un milieu de culture ; et induction d'une différenciation des cellules souches du tissu adipeux pour obtenir des cellules différenciées.

Au sens de l'invention, les cellules différenciées sont des adipocytes ou des ostéoblastes. De préférence, les cellules différenciées sont des adipocytes.

Le procédé d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules différenciées comprenant les étapes liées à l'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules souches du tissu adipeux, les précisions données ci-dessus pour le procédé d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules souches du tissu adipeux s'appliquent également pour le procédé d'amplification *in vitro* ou *ex vivo* de cellules différenciées.

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.

5 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
10 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
15 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
20 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 Picro-Sirius Red.

25 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 agrégats cellulaires ; et dissociation mécanique
30 desdits agrégats cellulaires.

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 du tissu adipeux humain, et du collagène.

5 Le collagène est du collagène de type I et du collagène de type III. La matrice extracellulaire comprend en outre de la fibronectine.

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 adipeux humain, 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.

15 Le collagène est du collagène de type I et du collagène de type III. La matrice extracellulaire comprend en outre de la fibronectine.

20 Selon un cinquième objet, l'invention concerne l'utilisation *in vitro* de la matrice extracellulaire telle que définie ci-dessus ou l'utilisation *in vitro* de la composition telle que définie ci-dessus pour le criblage d'actifs pharmacologiques contre l'obésité et les maladies métaboliques associées comme le diabète de type 2 et les maladies cardio-vasculaires.

25 Selon un sixième objet, l'invention concerne des cellules différenciées obtenues selon le procédé défini ci-dessus destinées à une utilisation, ou pour leur utilisation, en thérapie cellulaire, en particulier en chirurgie plastique et réparatrice, et plus particulièrement pour le lipofilling.

30

Dans le cas d'une utilisation en chirurgie plastique et réparatrice, la matrice extracellulaire est une matrice autologue, qui contient, par définition, des cellules propres au patient dont le tissu adipeux est issu.

5 Pour une utilisation pour le lipofilling, les cellules différenciées obtenues par le procédé de l'invention sont des adipocytes.

EXEMPLES

10 Exemple 1. Extraction mécanique

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 (Fig. 1B) :

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

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

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

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 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
10 fraction culotée est conservée.

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

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
20 connecteurs est compris entre 10 et 50.

b) Caractérisation des populations cellulaires obtenues
Le procédé décrit ci-dessus permet d'extraire séquentiellement la fraction stroma-vasculaire en 3 populations cellulaires. Ces populations cellulaires sont
25 caractérisées en particulier par microscopie optique et par microscopie à fluorescence.

- La population cellulaire obtenue lors de l'étape 2, nommée ici C1, est composée d'une majorité de cellules de type endothéliales CD31+ (Fig. 2 et Fig. 3).

30 - La population cellulaire obtenue lors de l'étape 3, nommée ici C2, est composée de cellules de type endothéliales CD31+ formant un réseau de type capillaire lorsque maintenue en 3D et de cellules souches du tissu

adipeux PDGFRa+ (Fig. 4 et Fig. 6A). La population cellulaire C2 a la capacité de se différencier en adipocytes matures (Fig. 6B).

5 - La population cellulaire obtenue lors de l'étape 5, nommée ici C3, est composée d'une majorité de cellules souches du tissu adipeux PDGFRa+ capables de former des sphères en suspension (Fig. 5 et Fig. 6A). La population cellulaire C3 a la capacité de se différencier en adipocytes matures (Fig. 6C).

10 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 (Fig. 7).

15 - La matrice obtenue lors de l'étape 3, nommée ici M2 est de type fibreux et riche en collagène (Fig. 8). Le collagène est révélé par le Picro-Sirius Red (Fig. 10A) qui permet, de plus, de visualiser une structure du collagène en bâtonnets. Cette matrice contient des cellules endogènes.

20 - La matrice obtenue lors de l'étape 5 et isolé dans le tube de collecte, nommée ici M3 est de type fibreux (Fig. 9 et Fig. 10B). Cette matrice contient également des cellules endogènes. Le collagène de la matrice isolée est révélé, à la Fig. 10B, par le Picro-Sirius Red qui colore les fibres de collagène de type I et de type III. La coloration rouge (en nuance de gris à la Fig. 10B) obtenue indique que le collagène reste organisé, à savoir que le collagène présent présente toujours une structure secondaire en hélice α et une structure quaternaire en triple hélice. Il n'est pas dégradé. En effet, le collagène désorganisé se colore en vert par le Picro-Sirius Red.

30 - La matrice obtenue lors de l'étape 5 et contenue dans la seringue, nommée ici M4, est composée d'une majorité

d'adipocytes matures et d'une trame de collagène de type I (Fig. 11B). La matrice M4 est également composée de structures capillaires formées par des cellules endothéliales CD31+ (Fig. 11C) et par un réseau de cellules souches du tissu adipeux PDGFRa+ (Fig. 11D).

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.

Exemple 2. Expansion cellulaire et différenciation

Une méthode d'expansion *ex vivo* de cellules souches 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% CO₂, puis maintenues dans les mêmes conditions, de préférence, avec agitation.
2. Le milieu de prolifération EGM+ est changé à 50% tous les deux jours.
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 μ M Rosiglitazone ; 2 μ M T3 et 2,5 μ g/ml insuline.

Exemple 3. Caractérisation de la capacité d'amplification de la matrice

5

Les matrices extracellulaires dites EndoStem-Matrix de l'invention ont été caractérisées, notamment, par microscopie à fluorescence, en présence de différents marqueurs spécifiques. Des cellules en prolifération ont ainsi été détectées par incorporation, lors de la phase de réplification de l'ADN, de Edu (5-ethylnyl-2'-deoxyuridine) fluorescent dans les matrices EndoStem-Matrix de l'invention, comme illustré sur la figure 12, prouvant que celles-ci sont bioactives. En effet, la figure 12 montre que les cellules endogènes aux matrices sont maintenues en prolifération pendant la phase d'amplification.

10

15

Par ailleurs, la figure 13 met en évidence la présence de cellules souches du tissu adipeux après trois jours de co-culture avec la matrice extracellulaire de l'invention. La matrice extracellulaire permet donc de fournir un support pour la prolifération de la fraction stroma-vasculaire : les cellules souches du tissu adipeux ajoutées peuvent s'attacher à la matrice EndoStem-Matrix, en suspension.

20

25

En référence à la figure 14B, la fraction stroma-vasculaire est amplifiée par sa culture sur l'EndoStem Matrix de l'invention. A l'inverse, en référence à la figure 14A, lorsque la fraction stroma-vasculaire est mise en culture en suspension sans la matrice extracellulaire, des agrégats cellulaires sans prolifération sont observés. La matrice extracellulaire de l'invention a donc la capacité d'amplifier les cellules souches du tissu adipeux ajoutées.

30

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

10 [Table 1]

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

15

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 (Fig. 11A). La matrice M4 illustre une matrice extracellulaire telle que définie dans l'invention.

Le niveau d'expression de différents marqueurs cellulaires (marqueur de cellules endothéliales CD31, marqueur de cellules souches adipocytaires PDGFRa+, et deux marqueurs d'adipocytes matures PLN1 et Adiponectine) a été analysé après culture en suspension de la fraction stroma-vasculaire sur la matrice extracellulaire de l'invention. La figure 15 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 15A) et des cellules souches du tissu adipeux (figure 15B). Cette étude permet également de mettre en évidence la meilleure capacité de différenciation induite par la matrice extracellulaire de l'invention (figure 15C et 15D). 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.

La figure 16 met en évidence la présence de noyaux, d'adipocytes matures et d'une matrice collagénique après amplification et différenciation de la fraction stroma-vasculaire en présence de la matrice extracellulaire de l'invention. Ainsi, la différenciation en présence de la

matrice extracellulaire de l'invention permet de conserver l'organisation structurelle *in vivo* du tissu adipeux.

On notera qu'un tissu adipeux non dissocié, qui peut être assimilé à un explant, reste viable peu de temps ex vivo. Ainsi que cela est montré notamment à la Fig. 12, la
5 matrice isolée par dissociation contient des cellules en prolifération, au contraire d'un tissu non dissocié. Les Figs. 17A et 17B permettent de comparer la prolifération cellulaire dans le tissu non dissocié (Fig. 17A) et dans
10 la matrice isolée (Fig. 17B). En Fig. 17A, le tissu adipeux non dissocié ne montre pas de cellules en prolifération. En Fig. 17B, la composition montre des cellules en prolifération. En effet, cette figure fait apparaître, en blanc, les noyaux des cellules en prolifération.

On notera que les cellules isolées selon l'invention,
15 par centrifugation du liquide des lavages, sont caractérisées moléculairement par le marqueur DPP4. DPP4 est un marqueur qui marque les cellules précurseurs des pré-adipocytes ICAM1, qui ont une grande capacité de prolifération et qui sont localisées dans le réticulum
20 interstitiel du tissu adipeux. Ce sont ces cellules qui ont la capacité de prolifération dans la composition selon l'invention. Il est important de noter que ces cellules sont éliminées à la suite des lavages réalisés selon les
25 procédés de l'art antérieur. Ainsi que cela est montré aux Figs. 18A et 18B, l'expression de DPP4 est concentrée dans la fraction SVF isolée. La matrice en exprime peu. En revanche, et ainsi que cela est montré aux Figs. 18C et
30 18D, l'expression de ICAM1, est concentrée dans la matrice isolée. Les cellules qui portent l'amplification dans la composition sont les cellules exprimant DPP4 ajoutées.

Par ailleurs, on notera que le tissu adipeux *in vivo* contient des macrophages et que la composition amplifiée

selon l'invention maintient la présence de macrophages de type M1, ainsi que cela est montré à la Fig. 19A et de type M2 ainsi que cela est montré à la Fig. 19B. A la Fig. 19A, les macrophages de type M1 sont révélés par le marqueur IL-1b et, à la Fig. 19B, les macrophages de type M2 sont révélés par le marqueur MRC1.

Enfin, et ainsi que cela est montré à la Fig. 20, 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.

15

REVENDICATIONS

1. Procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de
cellules souches du tissu adipeux humain comprenant
les étapes suivantes :

5

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 ;

10

15

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.

20

2. Procédé d'amplification in vitro ou ex vivo de
cellules différenciées comprenant les étapes
suivantes :

25

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 ;

30

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 culture ; et

5 induction d'une différenciation des cellules souches du tissu adipeux pour obtenir des cellules différenciées.

10 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cellules différenciées sont des adipocytes ou des ostéoblastes.

15 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les cellules différenciées sont des adipocytes.

20 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation non-enzymatique.

25 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'extraction de la matrice extracellulaire, qui comprend une étape de dissociation non-enzymatique, ne fait pas intervenir de collagénase.

30 7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'extraction de la matrice extracellulaire comprend une étape de dissociation mécanique.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'extraction de la fraction stroma-vasculaire et de la matrice extracellulaire comprend les étapes suivantes :

centrifugation du tissu adipeux humain pour obtenir au moins deux fractions distinctes, une fraction A comprenant une matrice extracellulaire centrifugée, et la fraction stroma-vasculaire ; et

5 dissociation mécanique de la fraction A pour obtenir la matrice extracellulaire.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le collagène de la matrice extracellulaire est du collagène de type I et du collagène de type III.

10. 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 :

15 transfert dudit mélange de manière stérile dans une poche de culture en suspension comprenant du milieu de culture ;

20 amplification dudit mélange formant des agrégats cellulaires ; et

dissociation mécanique desdits agrégats cellulaires.

25 11. Matrice extracellulaire isolée, comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux humain, des cellules souches du tissu adipeux humain, et du collagène.

30 12. Matrice selon la revendication 11, caractérisée en ce que le collagène est du collagène de type I de type III.

13. Matrice selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre du collagène de type IV et/ou de l'élastine et/ou de la fibronectine et/ou de la laminine.
- 5
14. Composition comprenant un mélange de la matrice extracellulaire selon l'une des revendications 11, 12 ou 13 et d'une fraction stroma-vasculaire, la fraction stroma-vasculaire comprenant des cellules endothéliales du réseau vasculaire du tissu adipeux et des cellules souches du tissu adipeux.
- 10
15. Utilisation *in vitro* ou *ex vivo* de la matrice extracellulaire selon la revendication 11, 12 ou 13 ou de la composition selon la revendication 14 pour le criblage d'actifs pharmacologiques.
- 15
16. Cellules différenciées d'une composition selon la revendication 14, pour leur utilisation en thérapie cellulaire, en particulier en chirurgie plastique et réparatrice, et plus particulièrement pour le lipofilling.
- 20
17. Adipocyte ou ostéoblaste différenciés d'une composition selon la revendication 14, pour leur utilisation en thérapie cellulaire, en particulier en chirurgie plastique et réparatrice, et plus particulièrement pour le lipofilling.
- 25
18. Adipocyte différencié d'une composition selon la revendication 14, pour leur utilisation en thérapie cellulaire, en particulier en chirurgie plastique et
- 30

réparatrice, et plus particulièrement pour le lipofilling.

1/17

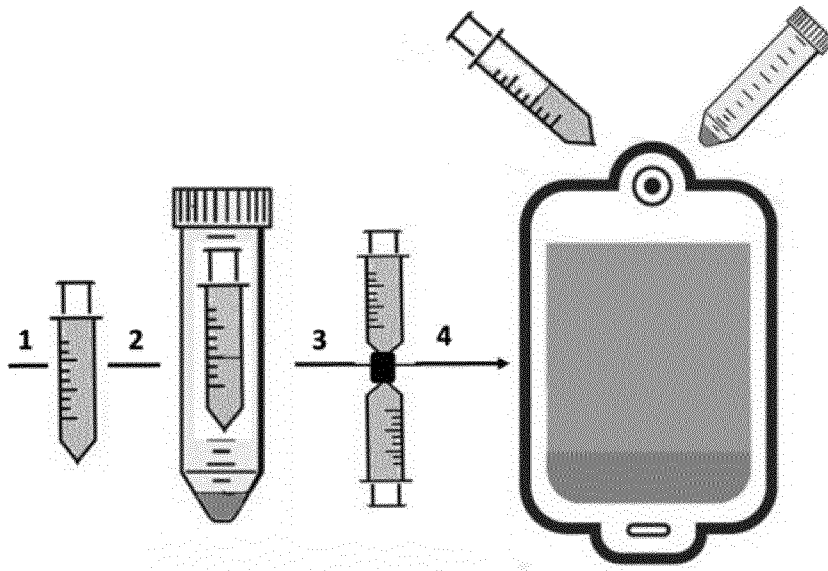


FIG. 1A

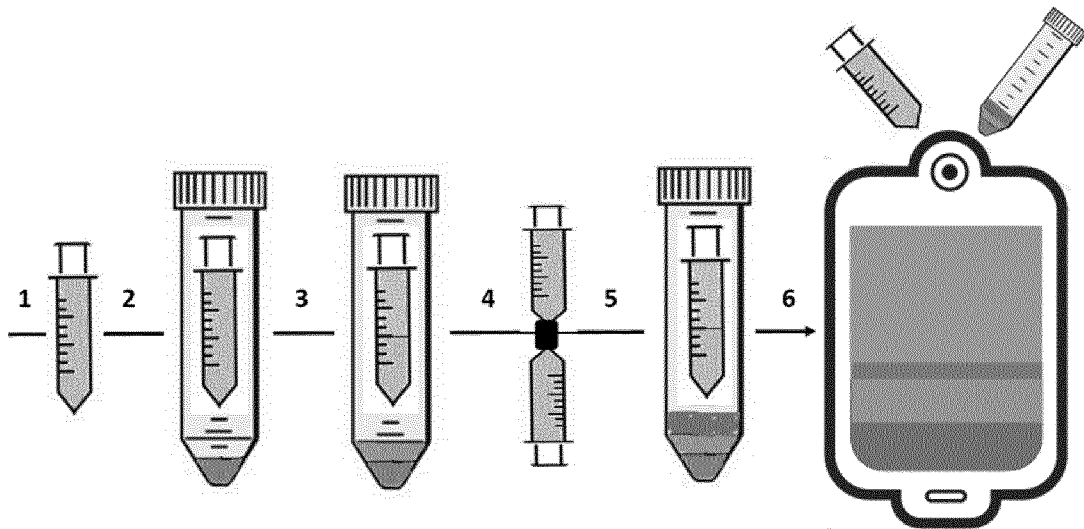


FIG. 1B

2/17

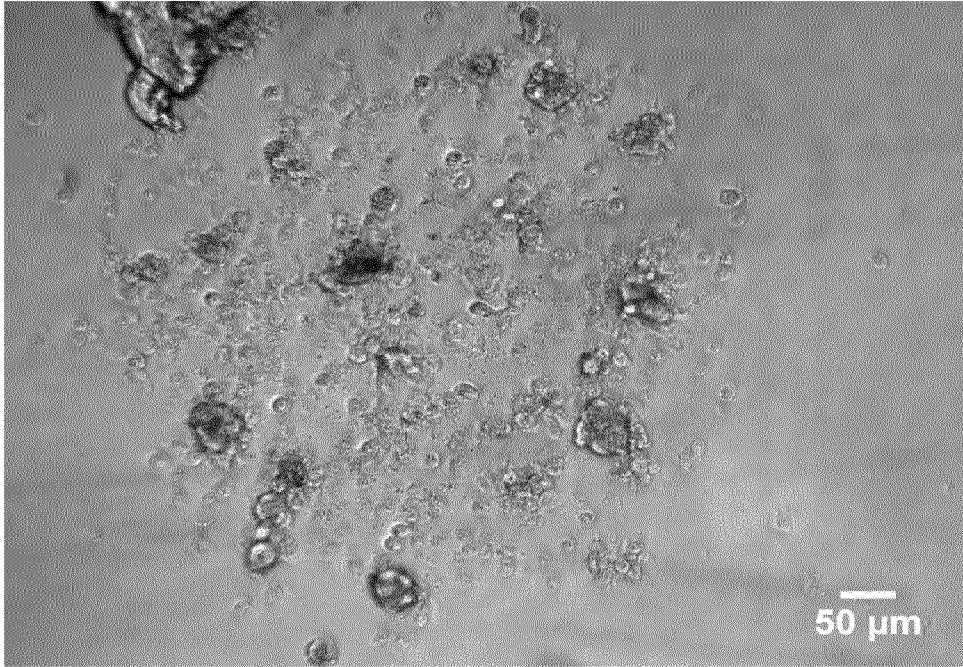


FIG. 2

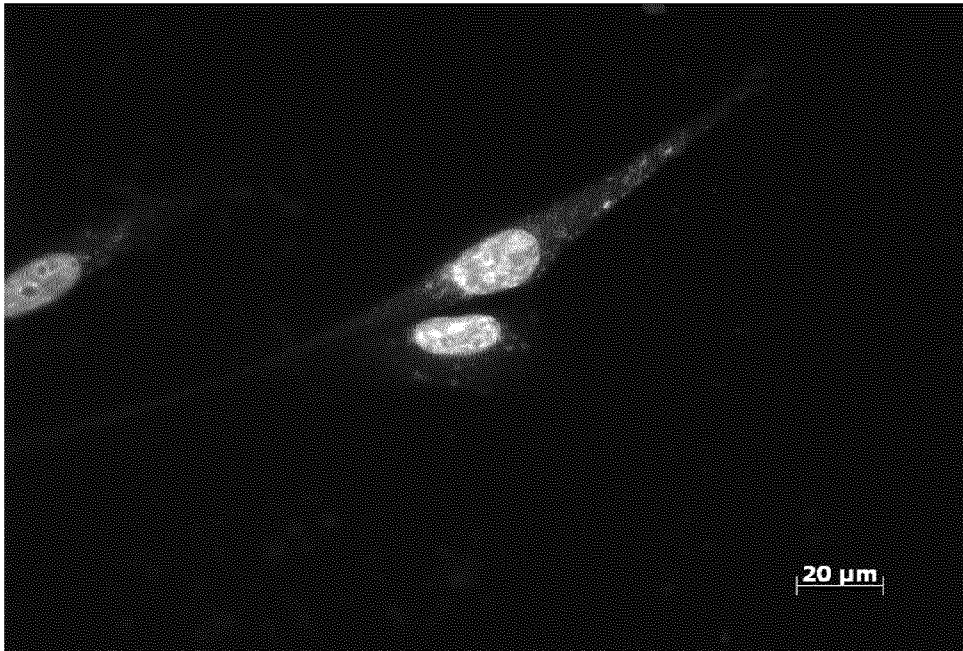


FIG. 3A

3/17

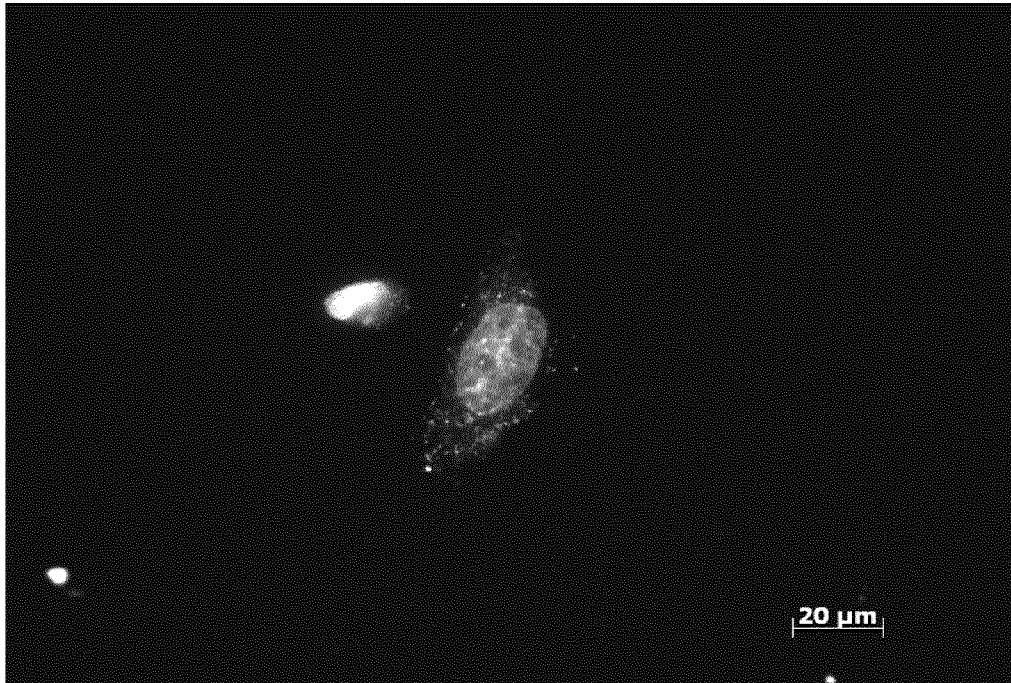


FIG. 3B

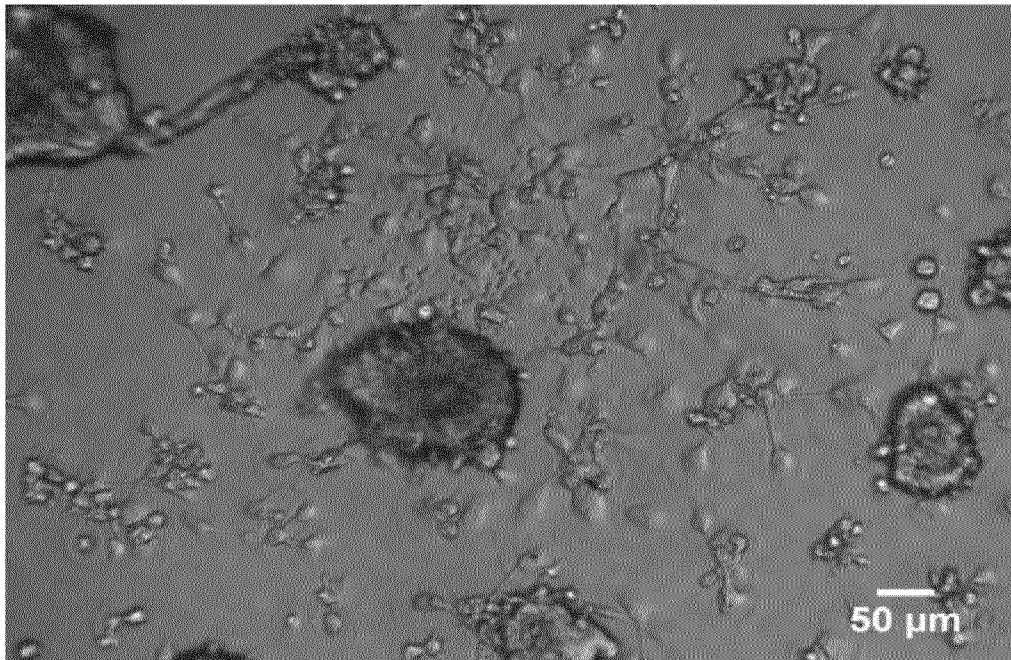


FIG. 4

4/17

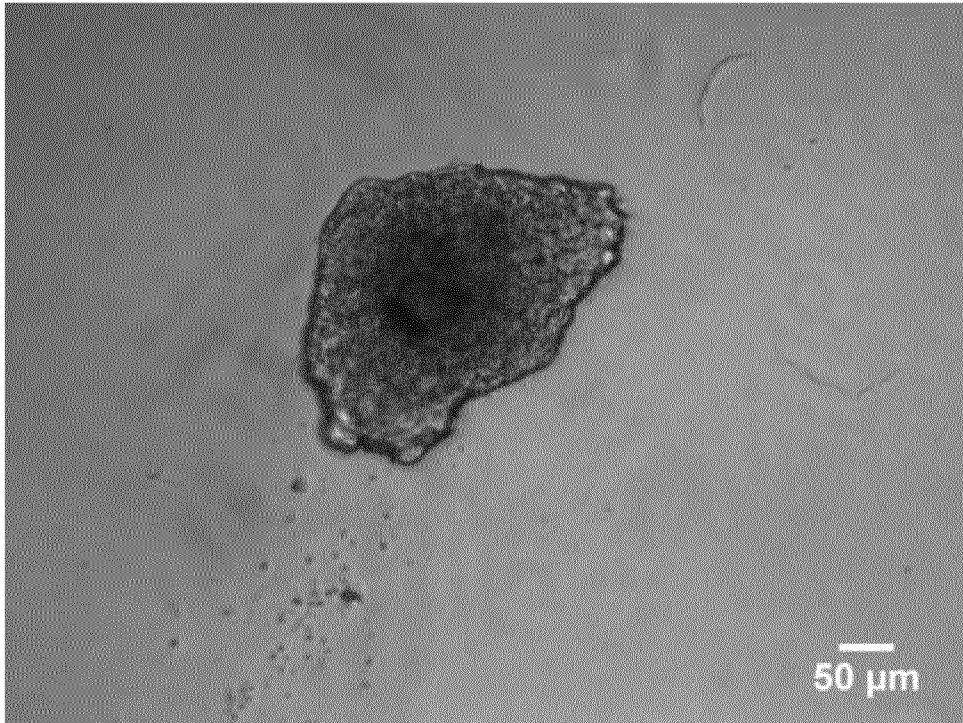


FIG. 5

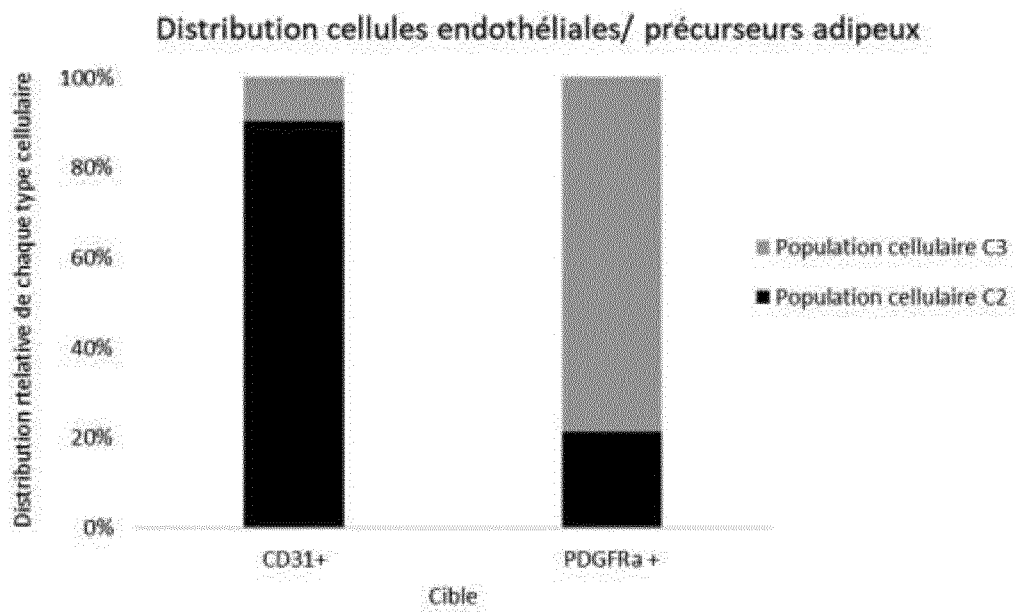


FIG. 6A

5/17

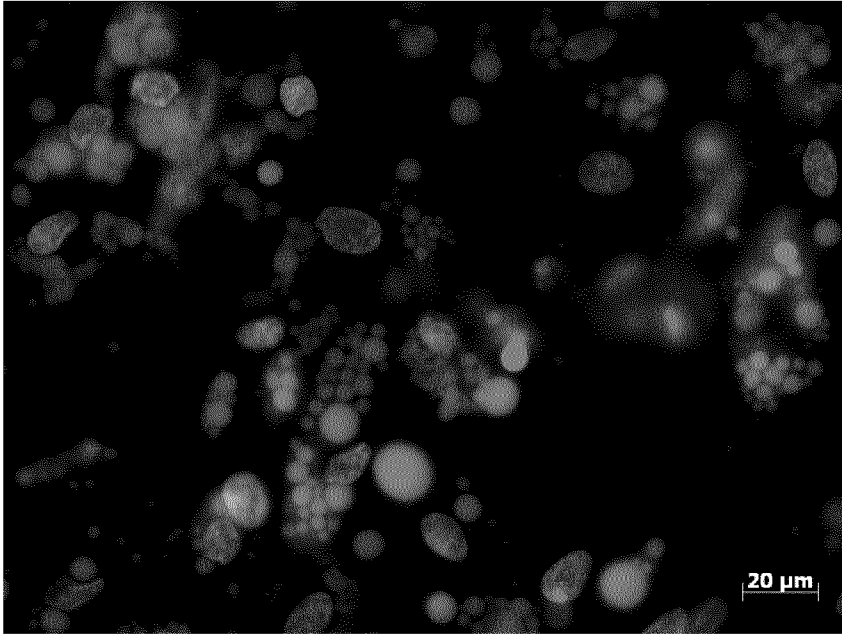


FIG. 6B

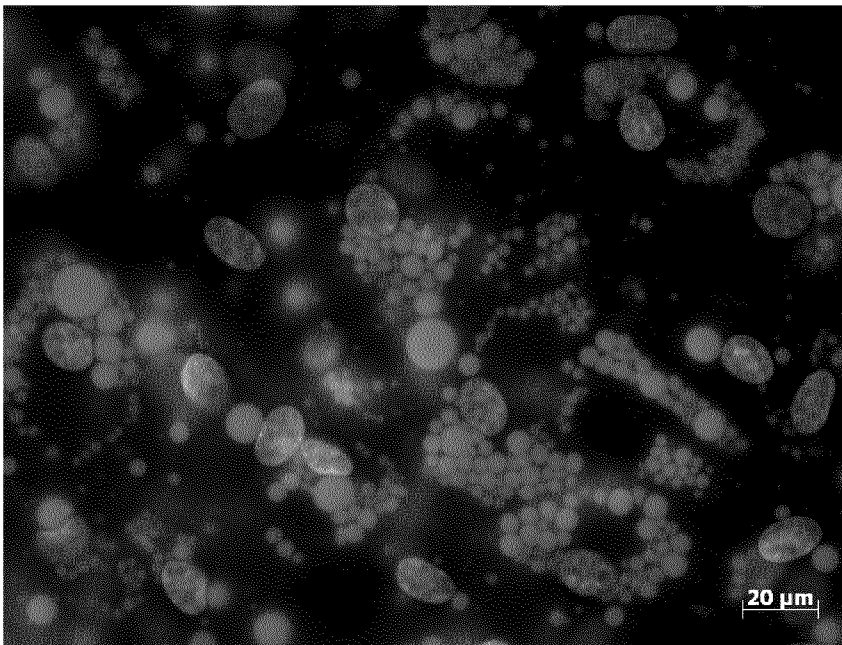


FIG. 6C

6/17

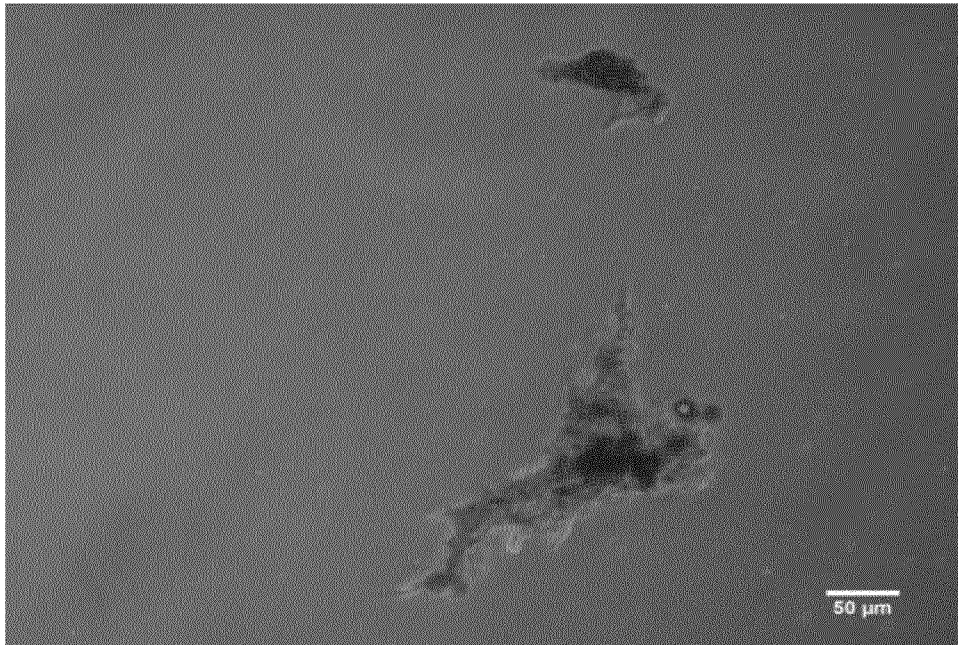


FIG. 7

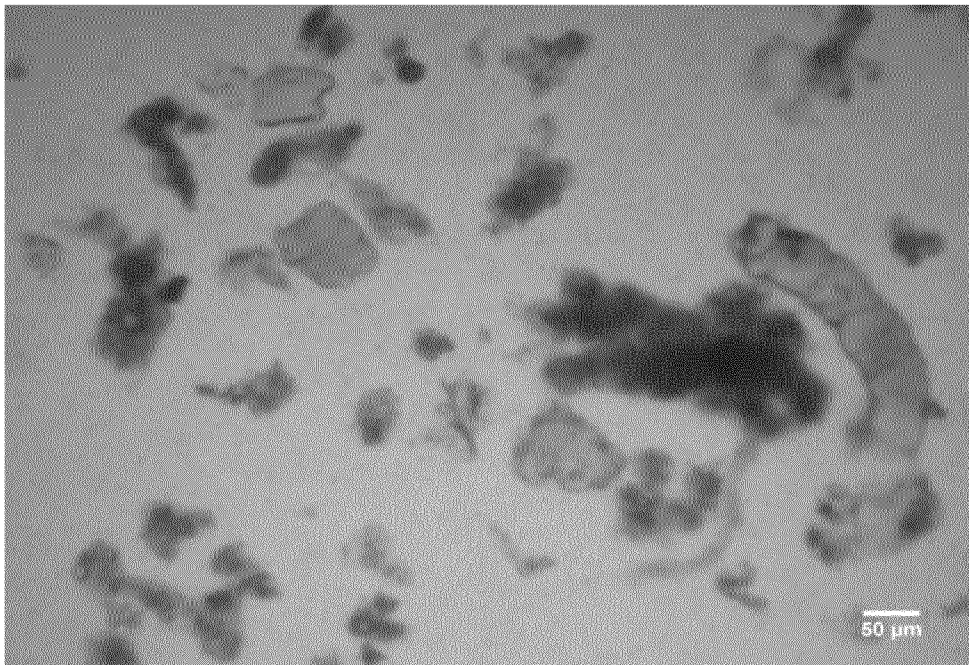


FIG. 8

7/17

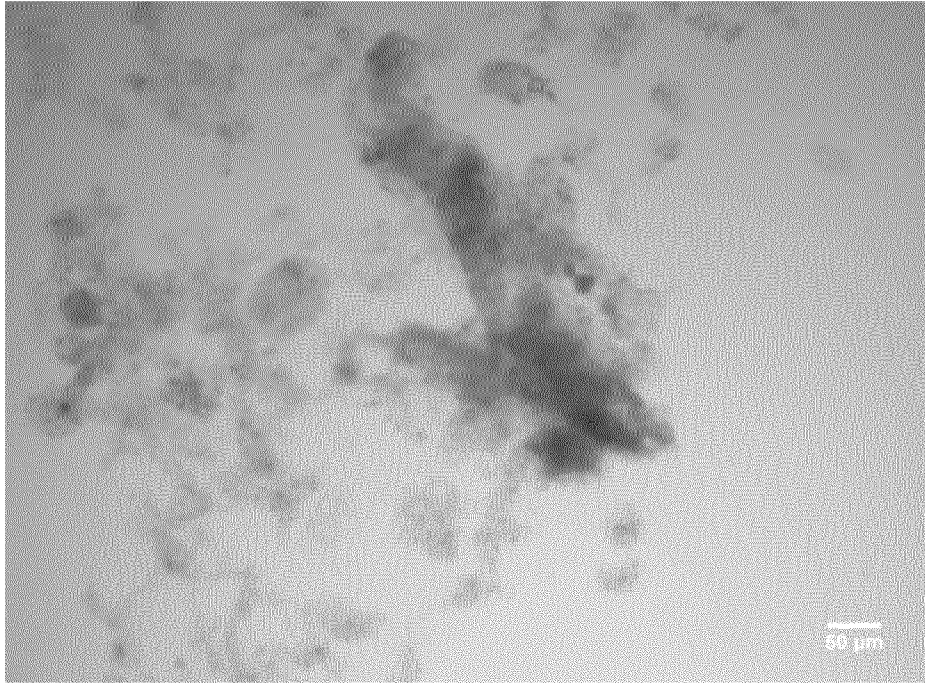


FIG. 9

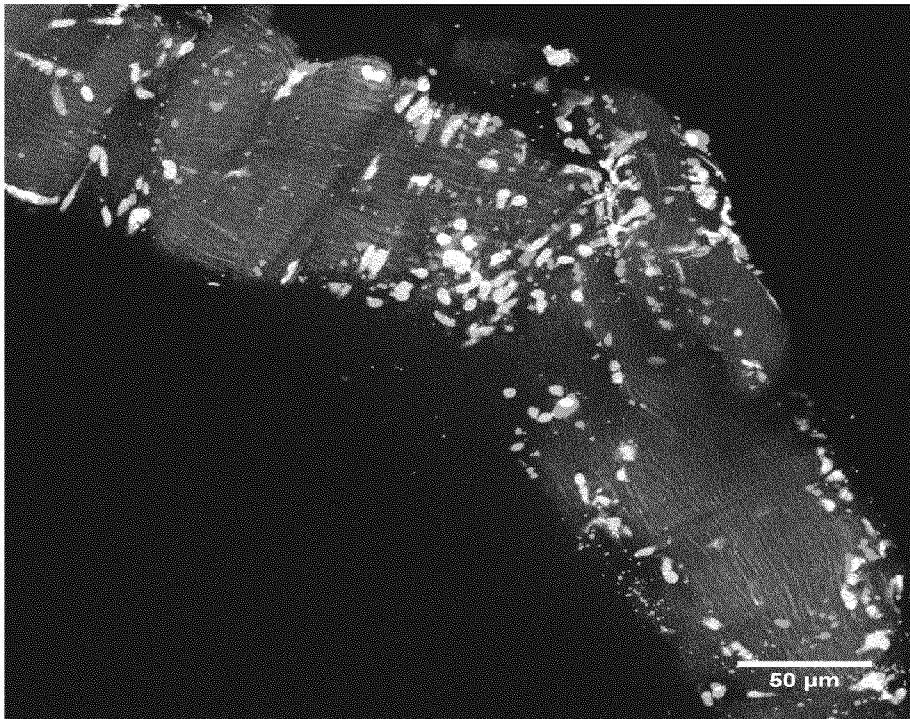


FIG. 10A

8/17

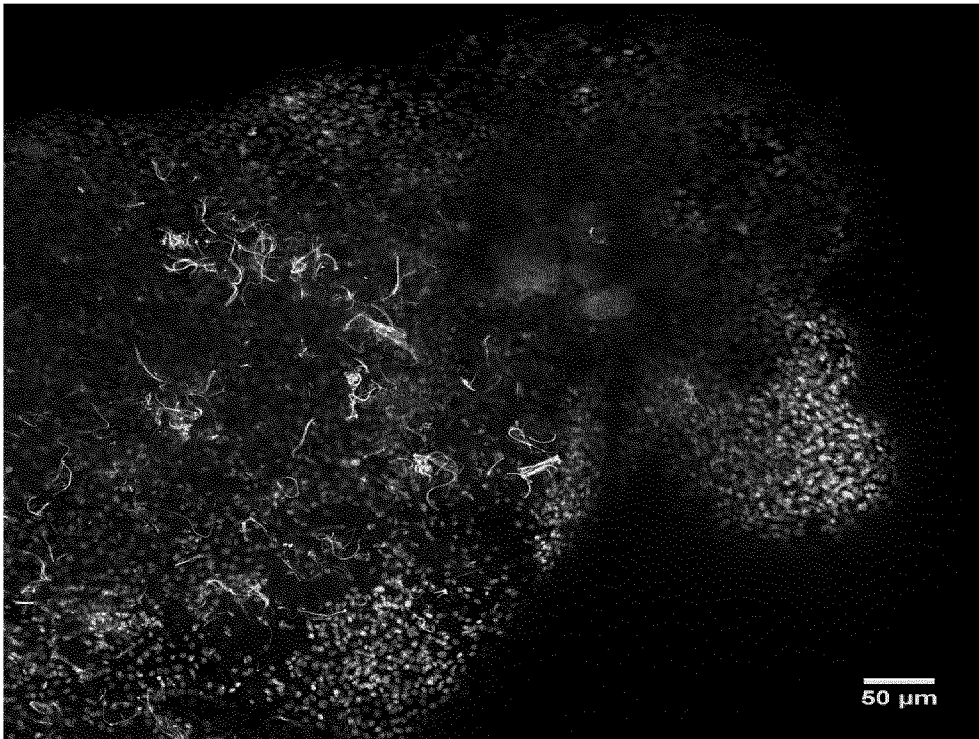


FIG. 10B

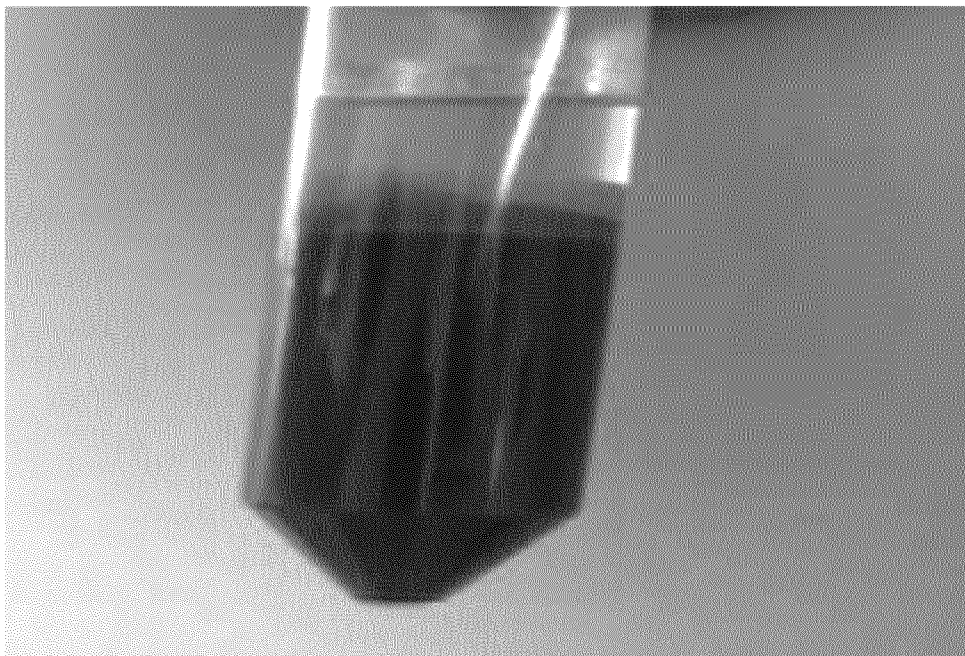


FIG. 11A

9/17

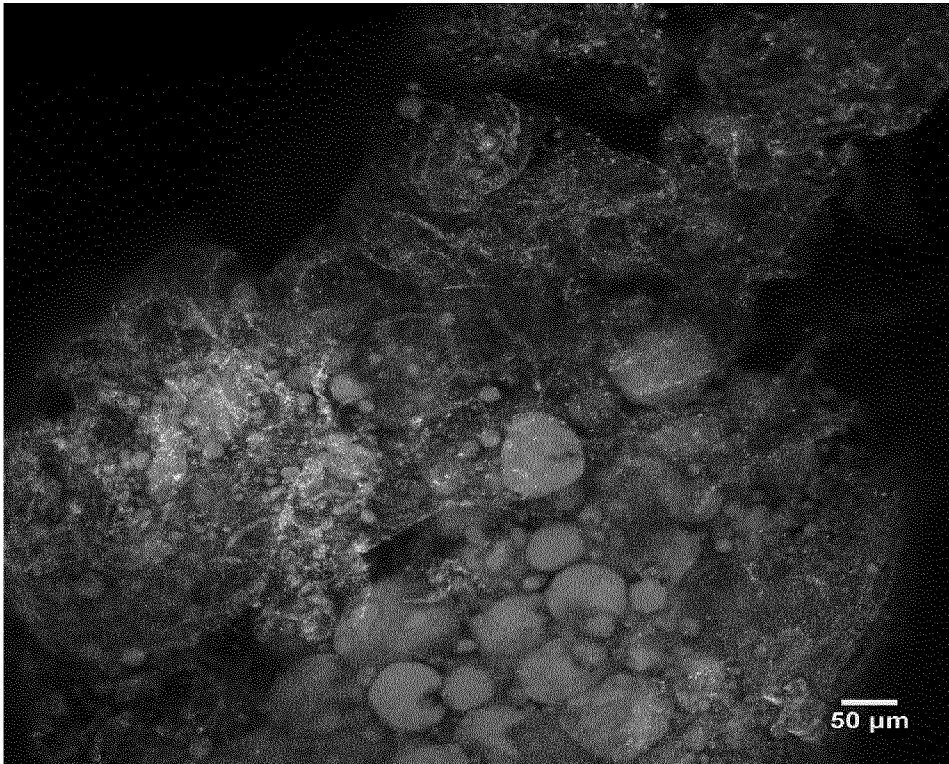


FIG. 11B

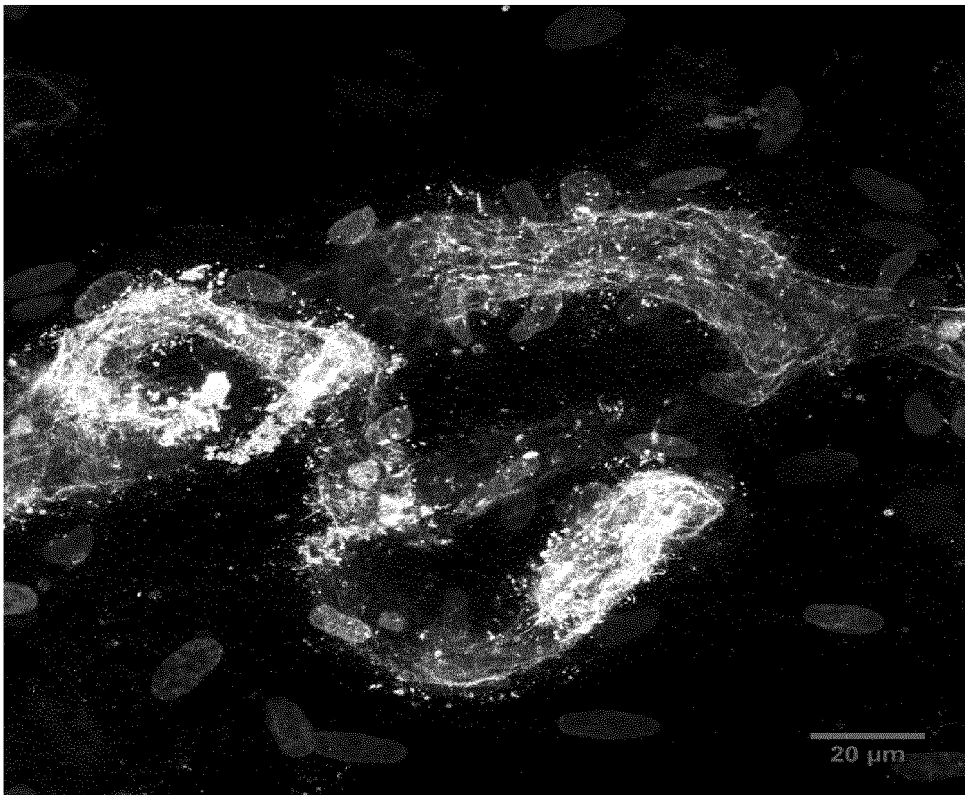


FIG. 11C

10/17

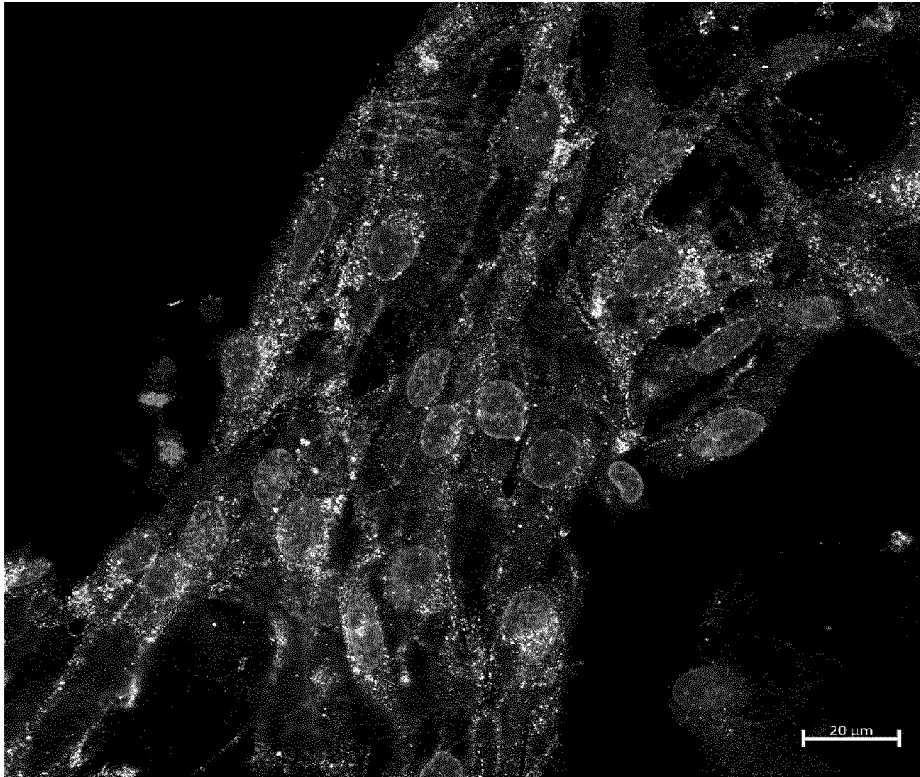


FIG. 11D

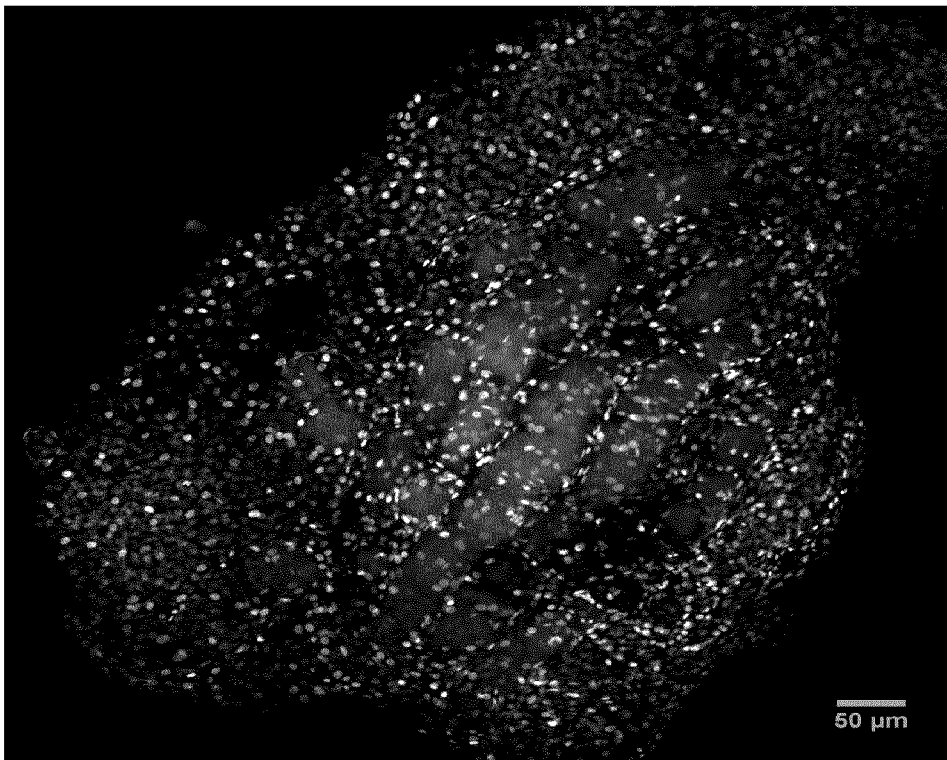


FIG. 12

11/17

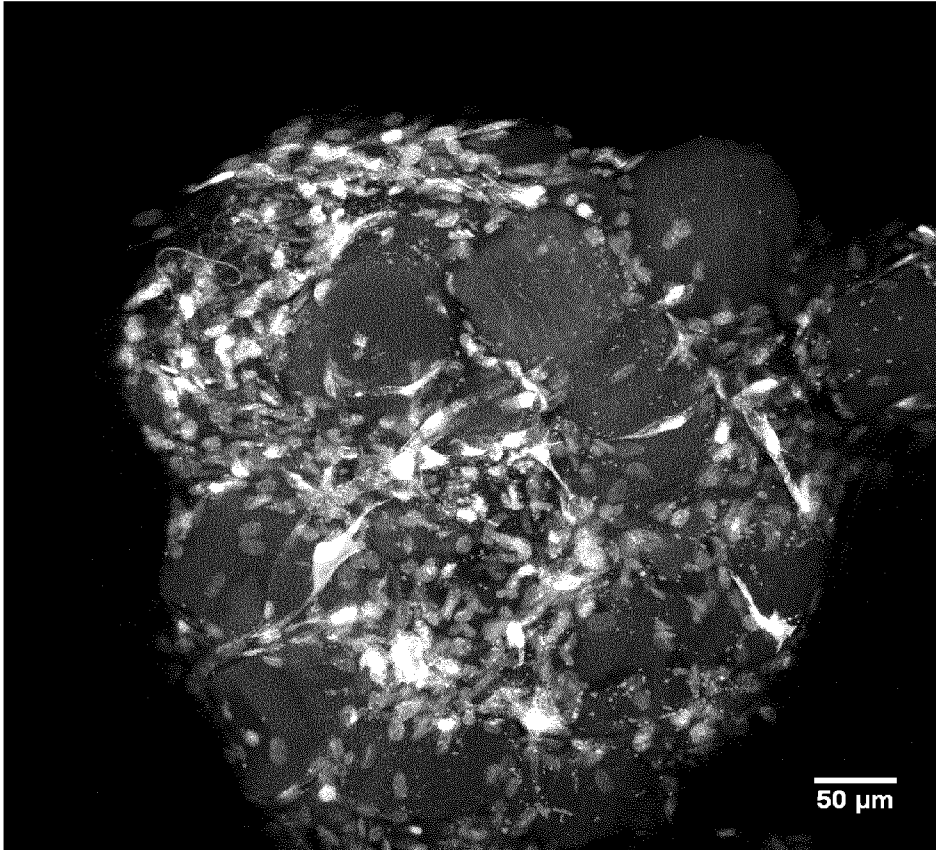


FIG. 13

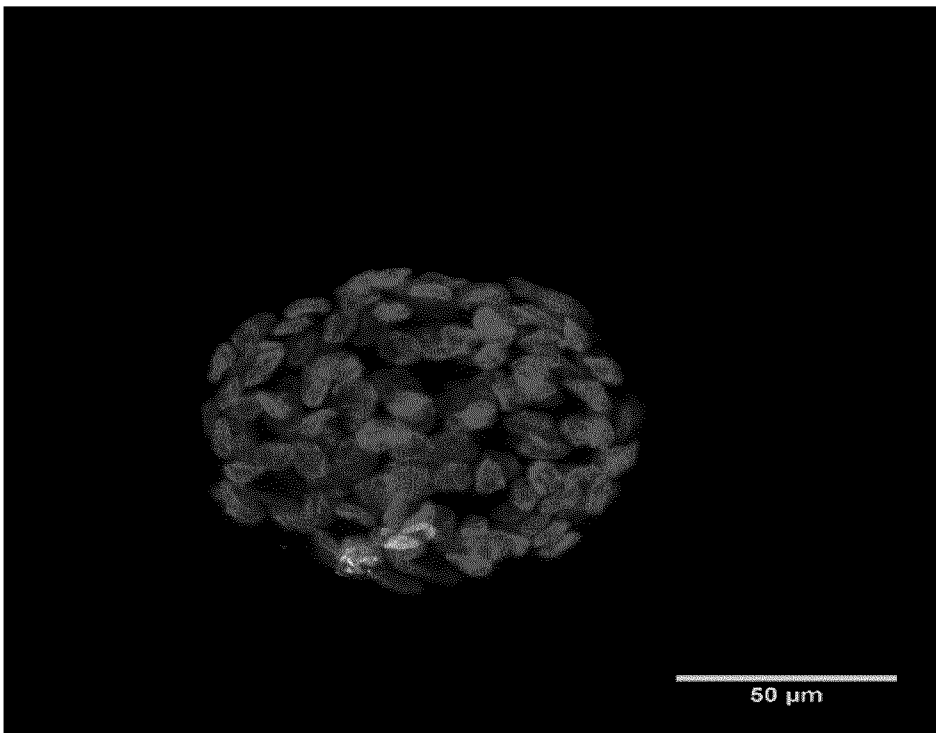


FIG. 14A

12/17

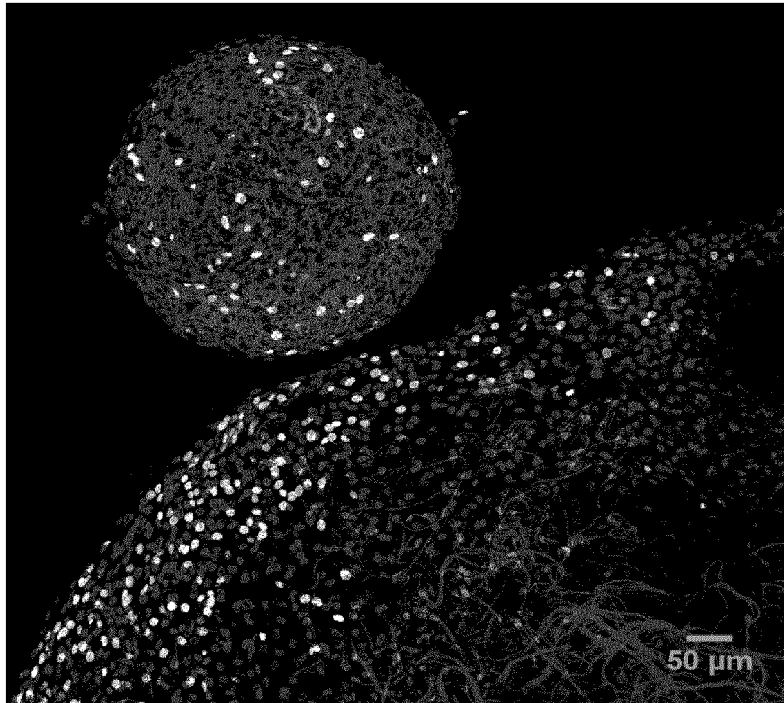


FIG. 14B

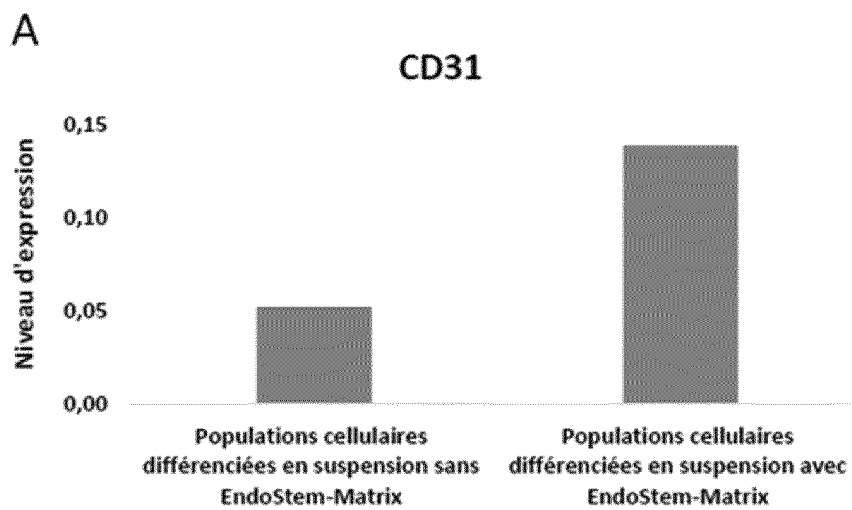


FIG. 15A

13/17

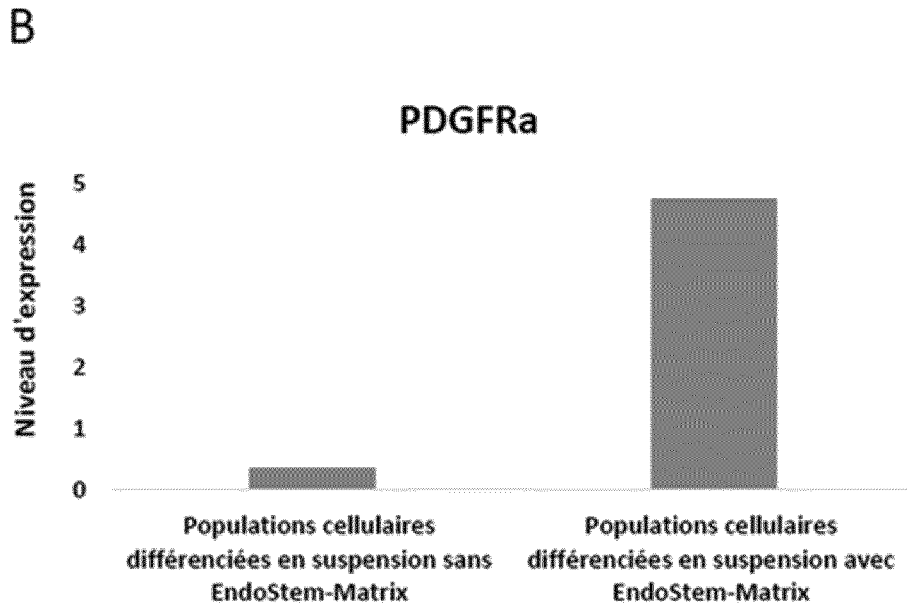


FIG. 15D

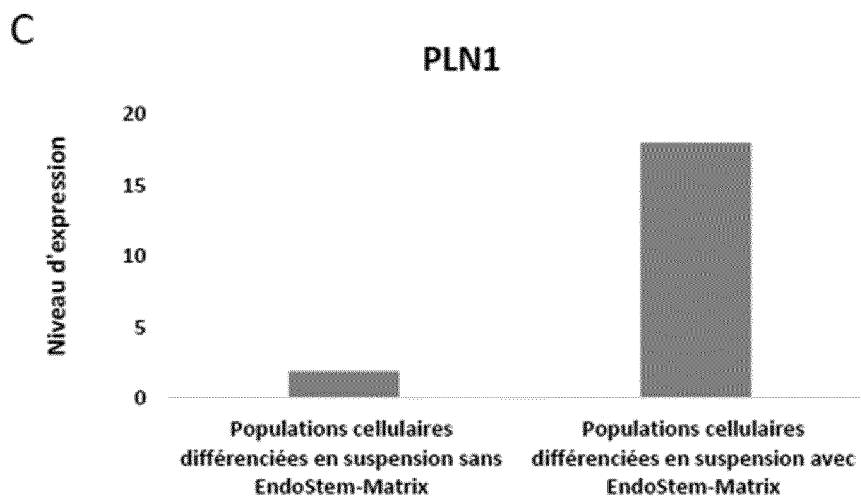


FIG. 15C

14/17

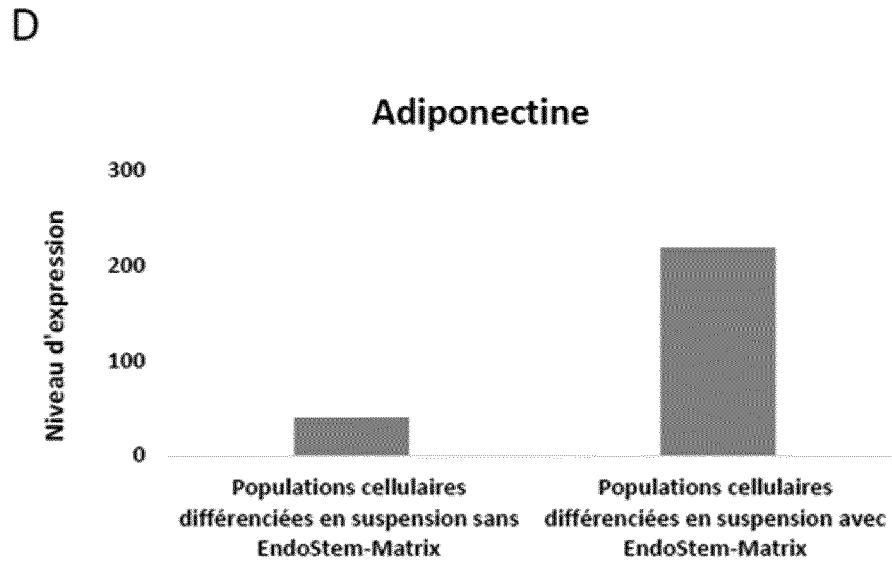


FIG. 15B

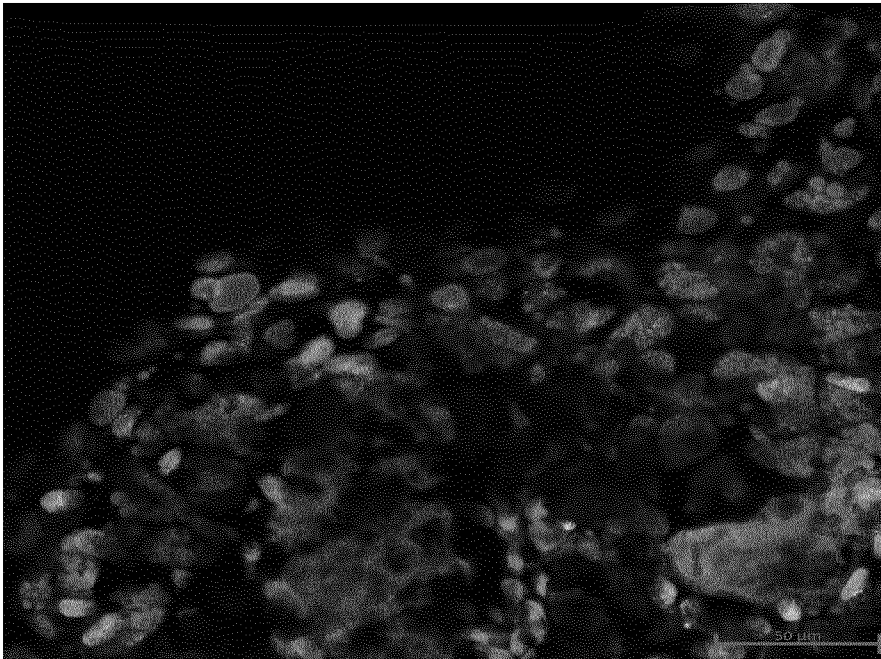


FIG. 16

15/17

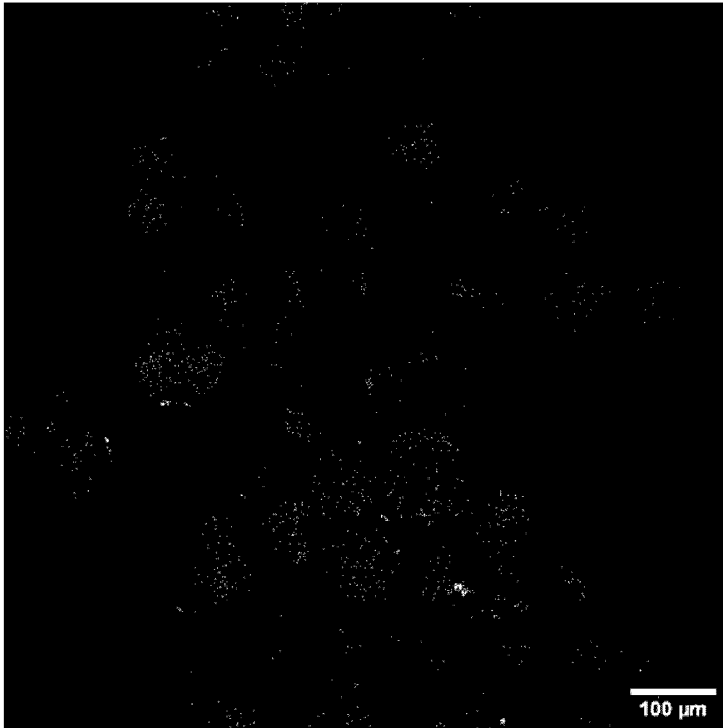


FIG. 17A

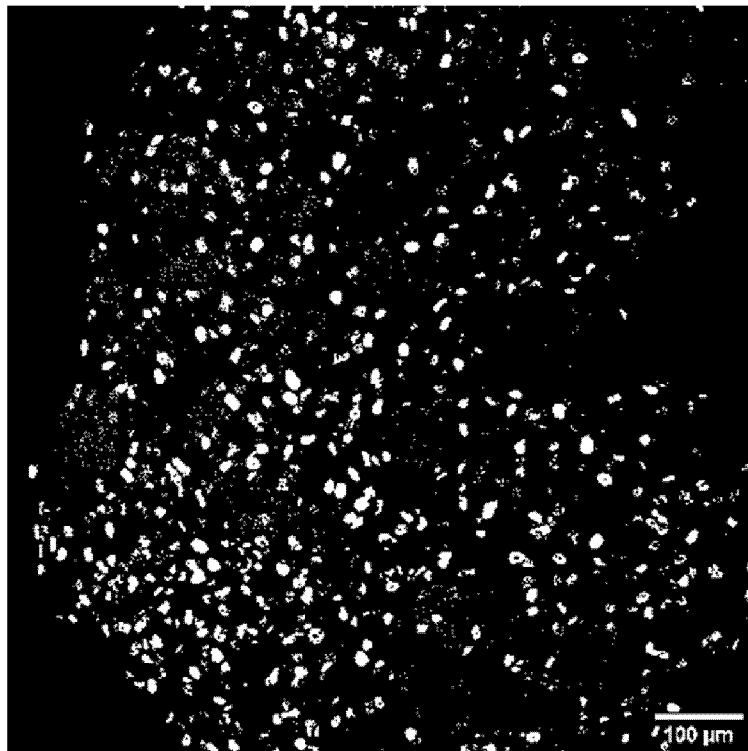


FIG. 17B

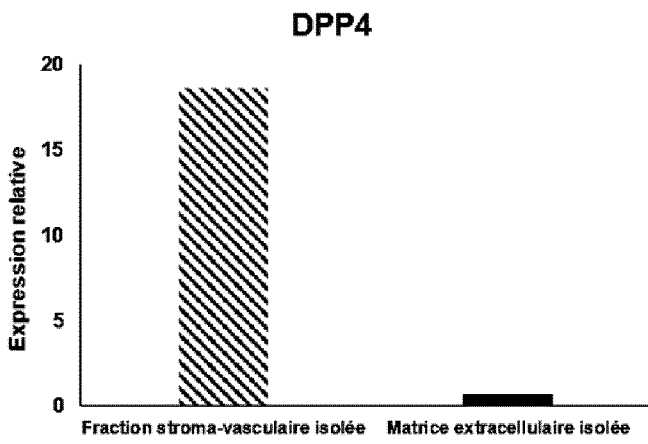


FIG. 18A

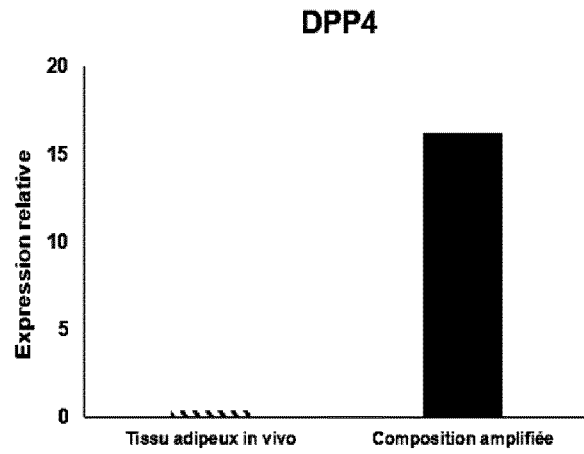


FIG. 18B

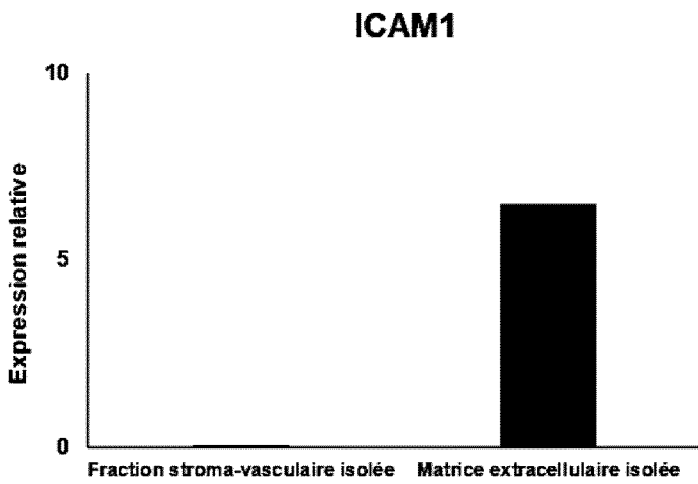


FIG. 18C

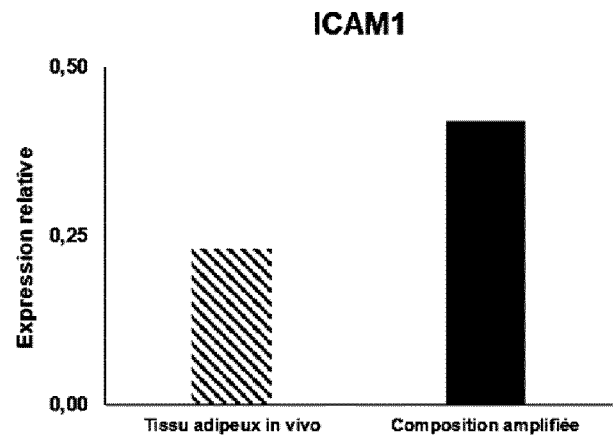


FIG. 18D

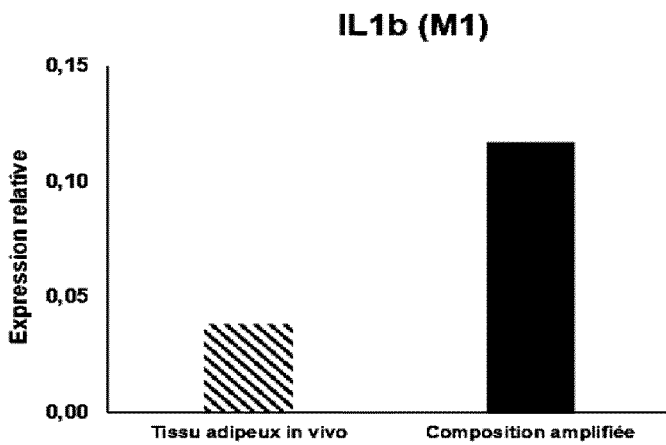


FIG. 19A

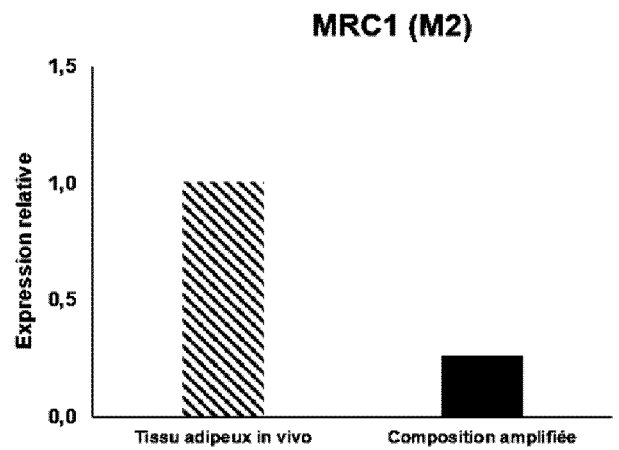


FIG. 19B

17/17

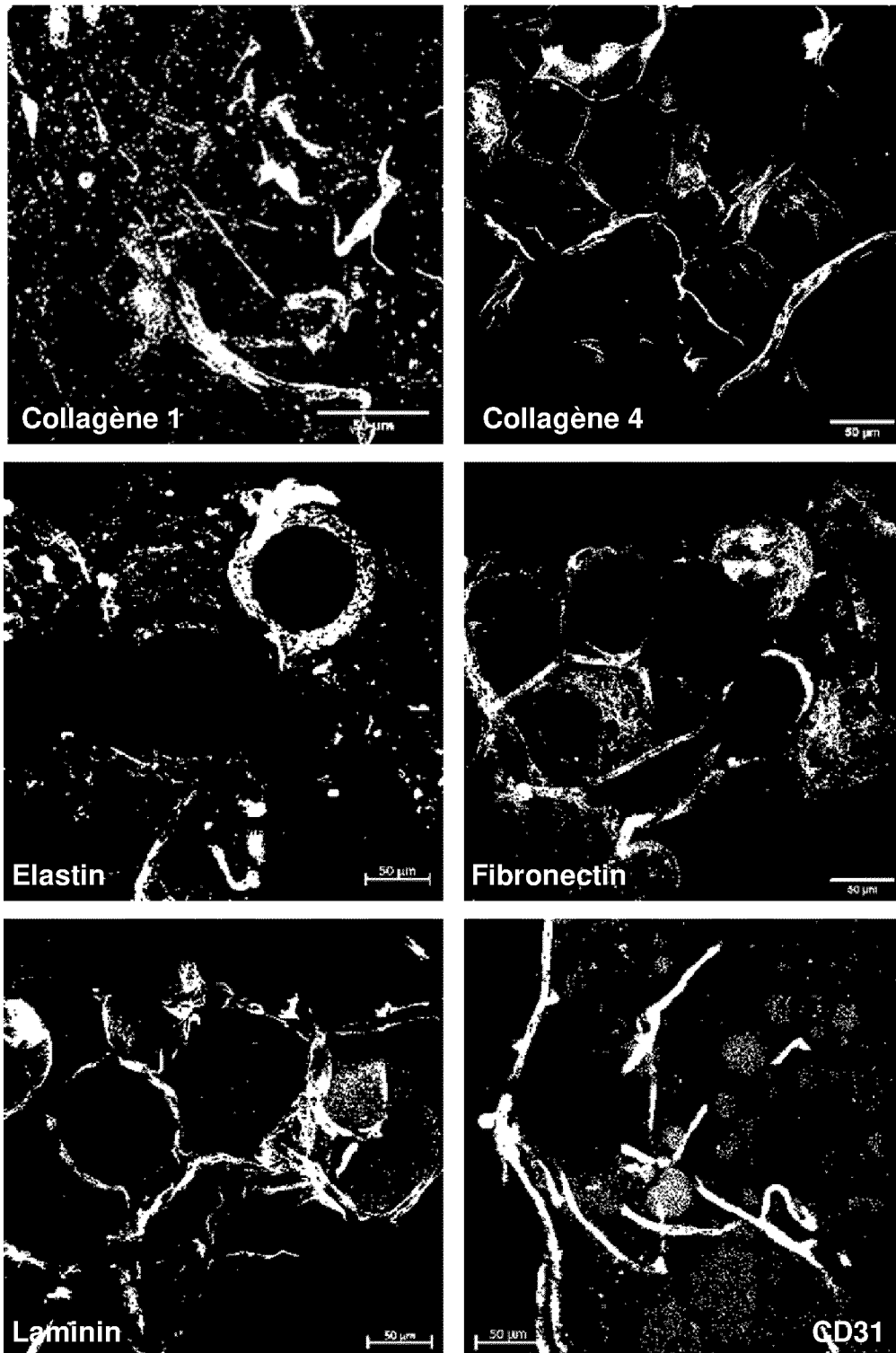


FIG. 20

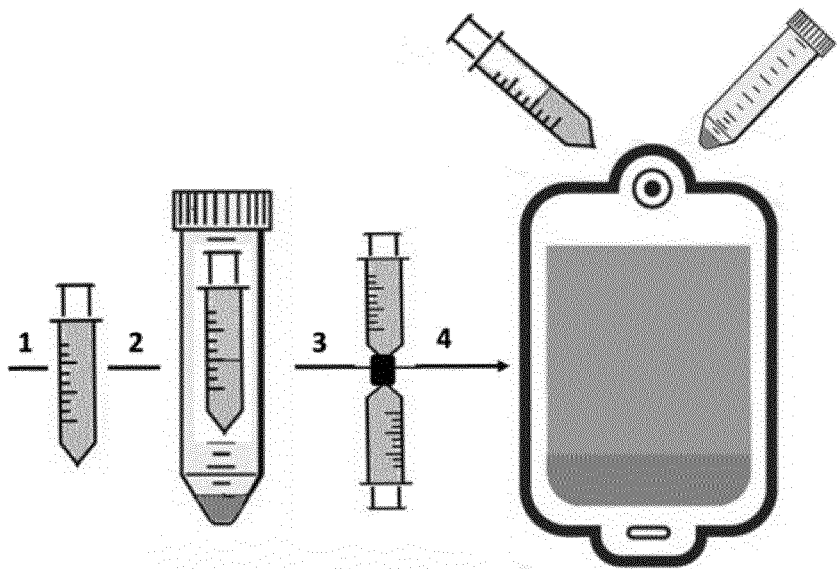


FIG. 1A