



HAL
open science

Développement et validation d'un procédé manuel d'extraction de la Fraction Vasculaire Stromale du tissu adipeux de grade thérapeutique

Pauline François

► **To cite this version:**

Pauline François. Développement et validation d'un procédé manuel d'extraction de la Fraction Vasculaire Stromale du tissu adipeux de grade thérapeutique. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02937696

HAL Id: dumas-02937696

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02937696v1>

Submitted on 14 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le 11 Septembre 2020

Par Pauline FRANÇOIS
Née le 28 Décembre 1992 à Draguignan

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988, tenant lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

Développement et validation
d'un procédé manuel d'extraction
de la Fraction Vasculaire Stromale
du tissu adipeux de grade thérapeutique

----oOo----

JURY :

Président: Madame le Professeur **Florence SABATIER**

Membres : Monsieur le Docteur **Jeremy MAGALON**

Madame le Docteur **Fanny GRIMAUD**

Madame le Docteur **Audrey CRAS**

Monsieur le Docteur **Gianni SOLDATI**

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen : Mme Françoise DIGNAT-GEORGE

Vice-Doyens : M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT

Chargés de Mission : Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI

Conseiller du Doyen : M. Patrice VANELLE

Doyens honoraires : M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE

Professeurs émérites : M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL

Professeurs honoraires : M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI

Chef des Services Administratifs : Mme Florence GAUREL

Chef de Cabinet : Mme Aurélie BELENGUER

Responsable de la Scolarité : Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDER Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien

hospitalier Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-

Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien

titulaire Mme Florence LEANDRO,

Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance

Maladie Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

Remerciements
Aux membres du Jury

À **Madame le Professeur Florence Sabatier**, je vous remercie de me faire le privilège de présider ce jury ainsi que pour ces années à travailler à vos côtés qui m'ont forgé l'esprit.

À **Monsieur le Docteur Jeremy Magalon**, merci d'avoir accepté de diriger ce travail, merci pour les conseils, toujours avisés, et cette vision éclairée qui m'inspire.

À **Madame le Docteur Fanny Grimaud**, un grand merci pour le soutien et l'esprit critique qui nous ont rendus, ce travail et moi, meilleurs.

À **Monsieur le Docteur Gianni Soldati**, je vous adresse toute ma gratitude pour votre implication dans ce jury ainsi que pour les projets collaboratifs qui me passionnent.

À **Madame le Docteur Audrey Cras**, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury et de juger ce travail de thèse, veuillez trouver ici ma reconnaissance.

À ceux qui m'entourent depuis quatre ans

À ceux qui sont là depuis longtemps

À ceux qui sont là depuis toujours

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

- Table des Matières -

Table des Matières 1
Liste des Abréviations 4
Liste des Figures 6
Liste des Tableaux 7

INTRODUCTION 8

Partie 1 : La Fraction Vasculaire Stromale du tissu adipeux : une thérapie cellulaire innovante à potentiel régénératif 10

I) Thérapie Cellulaire et Médecine Régénérative..... 11

A) Classification des Thérapies Cellulaires 11
 1) Les cellules médicaments 11
 2) L'immunothérapie 12
 3) La médecine régénérative..... 12
B) Les Cellules Souches 12
 1) Les CS totipotentes 13
 2) Les CS pluripotentes 13
 3) Les CS multipotentes..... 15
 4) Les CS unipotentes..... 15
 5) Origine des CS 15
C) Exemples d'application..... 16
 1) Greffe de CS Hématopoiétiques..... 16
 2) Photochimiothérapie Extracorporelle 17
 3) Les CAR-T *cells*..... 18

II) Le Tissu Adipeux..... 19

A) Le TA brun 20
B) Le TA blanc..... 20
 1) Protection physique et thermogénèse 21
 2) Métabolisme des lipides 21
 3) Fonction endocrine 21
 4) Fonction angiogénique 21

C) Les adipocytes	22
III) La Fraction Vasculaire Stromale	22
A) Composition de la FVS	23
1) Les cellules CD45+ d'origine hématopoïétique.....	25
2) Les cellules régénératives CD45-.....	26
• Les CS Mésoenchymateuses	26
• Les Cellules Endothéliales et Progéniteurs Endothéliaux	29
• Les Péricytes et Cellules Transitionnelles	32
B) Propriétés de la FVS et Mécanisme d'action.....	32
1) Les propriétés régénératives	32
2) Les propriétés angiogéniques	33
3) Les propriétés immunomodulatrices	34
4) Les propriétés anti-fibrotiques	34
C) Contexte réglementaire : la FVS comme Médicament de Thérapie Innovante :	35
Partie 2 : Méthodes d'Extraction de la FVS : état de l'art	40
I) Principes généraux	41
A) Extraction de la FVS par digestion enzymatique.....	41
1) Le prélèvement de TA	42
2) Le Lavage du TA	44
3) La digestion enzymatique	45
4) Le Lavage de la FVS	46
5) Resuspension de la FVS	47
B) Extraction de la FVS par fragmentation mécanique	47
1) Agitation / Vibration	47
2) Lyse des globules rouge	48
3) Concentration de la FVS par centrifugation	48
C) <i>Cellular FVS vs tissue FVS</i>	48
II) Les Méthodes Manuelles.....	50
A) Méthodes Manuelles de Digestion enzymatique	50
B) Méthodes Manuelles de fragmentation mécanique.....	56
III) Les Automates	58
A) L'automatisation de la digestion enzymatique	58
B) L'automatisation de la fragmentation mécanique	62
C) Les appareils semi-automatiques	64

IV) Limites actuelles	66
Partie 3 : Développement d'un procédé manuel d'extraction de la FVS	68
Article.....	69
Commentaire de l'article.....	96
CONCLUSION	99
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	102
SERMENT DE GALIEN.....	113

- Liste des Abréviations -

FVS : Fraction Vasculaire Stromale

TA : Tissu Adipeux

CSM : Cellules Souches/ Stromales
Mésenchymateuses

PE : Progéniteurs Endothéliaux

CE : Cellules Endothéliales

PR : Péricytes

CT : Cellules Transitionnelles

TC : Thérapie Cellulaire

CSP : Code de la Santé Publique

CS : Cellules Souches

iPS : *Induced Pluripotent Stem cells*

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

UTC : Unité de Thérapie Cellulaire

GSH: *Granulocyte Stimulating Factor*

PCE: Photochimiothérapie Extracorporelle

GvH: *Graft versus Host disease*

CAR: *Chimeric Antigen Receptor*

UCP-1: *Uncoupling Protein-1*

ATP : Adénosine Triphosphate

IMC : Indice de Masse Corporelle

TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*

IL-6: Interleukine-6

TGF β : *Transforming Growth Factor*

VEGF: *Vascular Endothelium Growth Factor*

IFATS: *International Federation for Adipose Therapeutics and Science*

ISCT: *International Society for Cellular Therapy*

CD: *Clusters of Differentiation*

NK: *Natural Killer*

MO: Moelle Osseuse

ASC: *Adipose-derived Stem Cells*

PEC : Progéniteurs Endothéliaux
Circulants

ECFC : *Endothelial colony forming cells*

IL-8 : Interleukine 8

NO: Monoxyde d'azote

EMA: *European Medicines Agency*

MTI : Médicament de Thérapie Innovante

ATMP : *Advanced Therapy Medicinal Product*

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

CAT: *Commitee for Advanced Therapies*

CHMP: *Commitee for Medicinal Products for Human Use*

MTI-PP : Médicament de Thérapie Innovante – Ponctuellement Préparé

RIPH : Recherche Impliquant la Personne Humaine

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

ICH : *International Council for Harmonization*

CNV : Cellules Nuclées Viables

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

RL : Ringer Lactate

PBS, DPBD, DMEM, DPBS, α MEM, Ham's F12, HBSS : Base de Milieu de Culture

GR : Globules Rouges

SAB : Sérum Albumine Bovine

SBF : Sérum Bovin Fœtal

CFU-F: *Colony Forming Units – Fibroblaste*

FDA: *Food and Drug Administration*

KFDA: *Korea Food and Drug Administration*

CE: Communauté Européenne

- Liste des Figures -

Figure 1 : Microscope de Hooke

Figure 2 : Classification des Cellules Souches

Figure 3 : Production des iPS

Figure 4 : Classification des CSH

Figure 5 : Photo d'Emily Whitehead

Figure 6 : Etapes de production des CAR-T *cells*

Figure 7 : Distribution des tissus adipeux brun et blanc

Figure 8 : Stratégie multiparamétrique de cytométrie en flux d'analyse de la distribution des sous-populations de la FVS

Figure 9 : Les CSM : sources et potentiel de différenciation

Figure 10 : Les CSM : propriétés et facteurs paracrines impliqués

Figure 12 : Propriétés et origine des ECFC

Figure 13 : Propriétés angiogéniques de la FVS

Figure 14 : Catégories des MTI

Figure 15 : Principe général de l'extraction par digestion enzymatique de FVS

Figure 16 : Etapes principales d'une extraction de FVS par digestion enzymatique

Figure 17 : Photographie d'une canule de Khouri et d'une canule de Coleman

Figure 18 : Numération cellulaire après sept jours de culture des ASC à partir de différentes zones anatomiques.

Figure 19 : Le dispositif Puregraft®

Figure 20 : Classification des enzymes destinées à la dissociation tissulaire

Figure 21 : *Tissue FVS vs Cellular FVS*

Figure 22 : Automates de digestion enzymatique

Figure 23 : Automates de fragmentation mécanique

Figure 24 : Automates permettant de réaliser une des étapes de la production FVS

Figure 25 : Logigramme du protocole LG

- Liste des Tableaux -

Tableau 1 : Modifications non substantielles

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des méthodes manuelles et enzymatiques

Tableau 3 : Méthodes manuelles d'extraction de la FVS par digestion enzymatique

Tableau 4 : Méthodes manuelles d'extraction de la FVS par fragmentation mécanique

Tableau 5 : Automates permettant l'obtention d'une FVS par digestion enzymatique

Tableau 6 : Automates de fragmentation mécanique du tissu adipeux

Tableau 7 : Automates permettant de réaliser une des étapes de la production de FVS

INTRODUCTION

Depuis plus d'une décennie, la Fraction Vasculaire Stromale (FVS) du Tissu Adipeux (TA) émerge comme un produit de thérapie cellulaire innovant et avantageux car facilement accessible, riche en cellules souches et progéniteurs et vectrice d'activités biologiques multiples. En effet, cette fraction obtenue d'un simple prélèvement de TA, tissu richement vascularisé, regroupe les constituants cellulaires des microvaisseaux désolidarisés sous l'effet de l'enzyme. La FVS contient des Cellules Souches/ Stromales Mésoenchymateuses (CSM), des Progéniteurs Endothéliaux (PE), des Cellules Endothéliales différenciées (CE), des Péricytes (PR) et des Cellules Transitionnelles (CT ; cellules de soutien) mais également des cellules hématopoïétiques : des monocytes/macrophages, des lymphocytes, des polynucléaires neutrophiles. L'ensemble de ces cellules concoure de manière synergique à des effets angiogéniques, trophiques et immunomodulateurs qui expliquent le développement croissant de stratégies de thérapie cellulaire autologues, basées sur la FVS, dans diverses pathologies.

Cette thérapie innovante a vu se développer une automatisation rapide de son procédé d'obtention. A l'heure actuelle, plusieurs compagnies commercialisent des automates venant une production de FVS simple, reproductible, réalisable directement au bloc opératoire. Pourtant les exigences réglementaires européennes n'autorisent pas ce genre de production dans n'importe quelles conditions, ainsi il existe encore des méthodes dites manuelles pour isoler la FVS. La résultante est un manque cruel de standardisation du protocole alors même qu'il est prouvé que la qualité et la composition du produit fini thérapeutique sont très dépendantes des paramètres de prélèvement et de production.

Dans ce travail, nous présenterons d'abord la FVS en tant que nouvelle thérapie cellulaire, son mécanisme d'action et la réglementation applicable à sa production. Nous étudierons ensuite les différents procédés de production recensés dans la littérature. Finalement un procédé d'isolement manuel de la FVS, conforme aux exigences réglementaires, sera présenté sous forme d'article.

**Partie 1 : La Fraction Vasculaire Stromale du Tissu
Adipeux : une thérapie cellulaire innovante à
potentiel régénératif**

I) **Thérapie Cellulaire et Médecine régénérative**

Si l'atome est l'unité de base de la matière dans les domaines de la physique et de la chimie, la cellule est quant à elle l'unité fonctionnelle du vivant. Le terme « cellule » fut pour la première fois énoncé par le scientifique anglais Robert Hooke aux alentours de 1665 dans son ouvrage *Micrographia*. Ce dernier mit en évidence la présence de cellules sur une coupe de liège grâce à un microscope *home-made* (Figure 1). Quelques années plus tard, Antonie van Leeuwenhoek décrit de manière précise des organismes unicellulaires. Cependant, ce n'est qu'en 1838 que le botaniste Matthias Schleiden et le zoologiste Theodor Schwann établissent les prémices de la théorie cellulaire^{1,2}.



Figure 1 : Microscope de Hooke

https://fr.wikipedia.org/wiki/Robert_Hooke

Ces pères de la biologie ne se doutaient probablement pas que des siècles plus tard, les cellules pourraient être greffées pour prévenir, traiter ou atténuer une maladie, ou encore restaurer la fonction d'un tissu lésé. C'est le concept de **Thérapie Cellulaire** (TC). Selon le Code de la Santé Publique (CSP), « la thérapie cellulaire concerne les produits biologiques à effet thérapeutique issus de préparations de cellules vivantes humaines ou animales » (article L.1243-1 du CSP³) et place la TC dans la famille des biothérapies, regroupant les stratégies de soin issues du vivant, au même titre que les vaccins ou la thérapie génique.

Les thérapies cellulaires actuelles peuvent être classées selon trois grands axes en fonction de l'effet recherché.

A) **Classification des Thérapies cellulaires :**

1) Les cellules médicaments :

Ce type de TC vise à implanter chez le patient une **cellule fonctionnelle différenciée** afin de remplacer directement une cellule absente ou produire secondairement une substance manquante. Ainsi la transfusion sanguine peut être considérée comme la première thérapie cellulaire, utilisant des cellules adultes spécialisées : globules rouges et/ou globules blancs et/ou plaquettes.

2) L'immunothérapie :

Les TC à visée d'immunothérapie impliquent le système immunitaire du patient de manière active ou passive et ont pour but une **activité antitumorale**, c'est-à-dire renforcer la réponse immunitaire physiologique contre les cellules cancéreuses, ou une **activité immunomodulatrice**.

3) La médecine régénérative :

La **médecine régénérative** remplace les cellules déficientes ou reconstitue un organe endommagé, c'est une discipline à part entière qui s'applique principalement à deux types de pathologies : les maladies dégénératives et les cas impliquant une destruction des cellules, tissus ou organes.

La thérapie cellulaire en médecine régénérative est associée étroitement à l'existence de cellules souches ou progénitrices.

B) Les Cellules Souches :

Dans les années 1800, une controverse scientifique opposa les partisans de la théorie de la « préformation », selon laquelle l'embryon possède dès les premiers jours de vie des organes complets et intègres qui grandissent, à ceux de « l'épigénèse », qui avance que l'organisme est généré à partir d'une masse « totipotente » (du latin *totus* et *potens* signifiant « tout-puissant, qui a toutes les potentialités ») de cellules indifférenciées qui se spécialisent au cours du temps. Le prix Nobel de 1935 attribué aux expériences chez l'embryon de triton de Spemann et Mangold mit fin à ce débat ; la théorie de l'épigénèse fut alors adoptée par la communauté mondiale^{1,4}.

Le terme de Cellules Souches (CS), apparu dès 1883, regroupe l'ensemble des cellules immatures capables, à la fois, de se différencier en cellules spécialisées au sein d'un environnement particulier et de s'auto-renouveler à l'identique. Ainsi une CS mère a la capacité de donner naissance à une cellule fille indifférenciée identique à la cellule mère et à une cellule plus spécialisée.

Les CS peuvent être classées en quatre catégories en fonction de leur aptitude à produire des cellules différenciées^{5,6}.

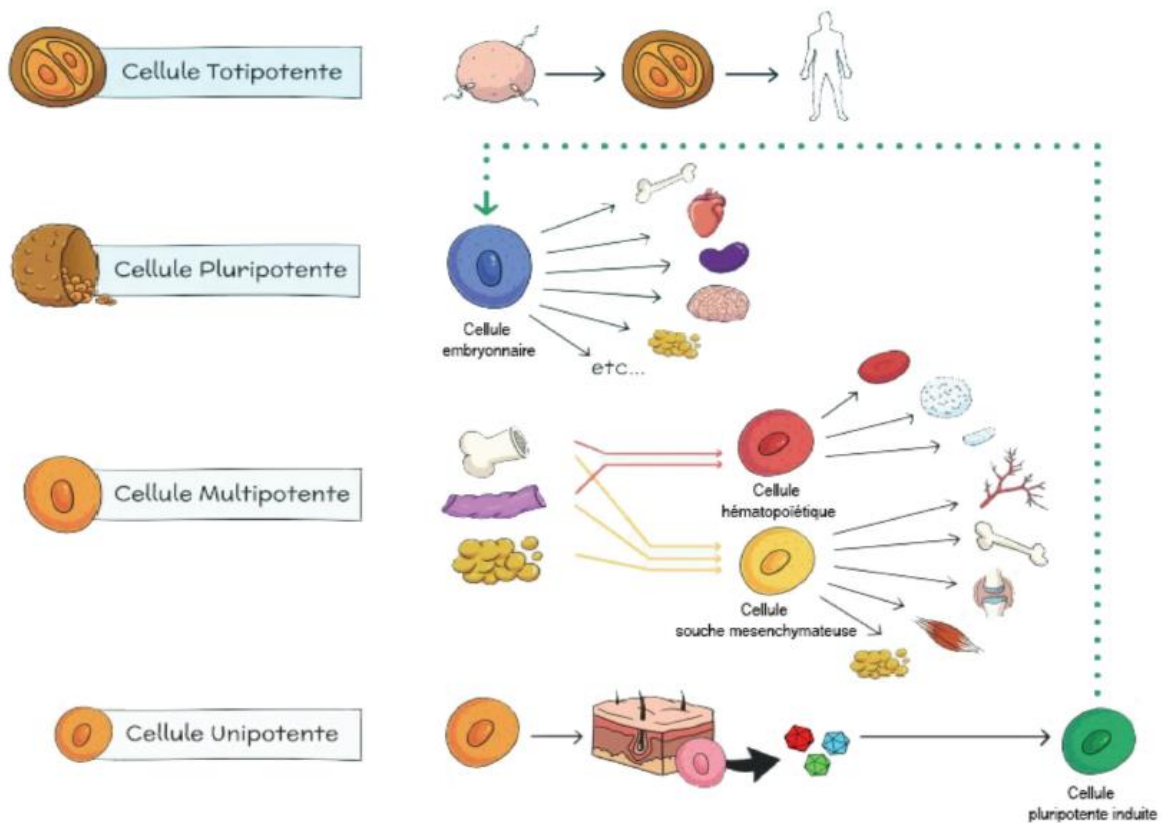


Figure 2 : Classification des Cellules Souches
Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018, Magalon et al.

1) Les CS Totipotentes :

Les CS totipotentes sont capables de se différencier en **tous les types cellulaires embryonnaires et extra embryonnaires** ; elles peuvent développer un organisme entier ou bien générer, par exemple, des cellules du placenta qui ne prendront pas part au développement du fœtus.

Les CS totipotentes sont présentes au sein d'un organisme uniquement du stade zygote au stade Morula, c'est-à-dire les quatre jours suivant la fécondation de l'ovule par le spermatozoïde.

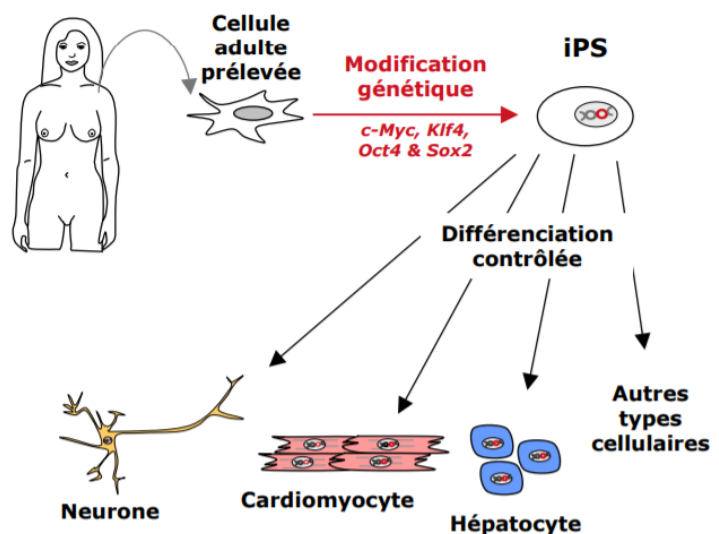
2) Les CS Pluripotentes :

Les CS pluripotentes sont caractérisées par un haut potentiel de multiplication et de différenciation en **tous les types cellulaires de l'organisme, à l'exception des annexes embryonnaires** (qui correspondent au placenta, à l'amnios, à l'allantoïde et à la vésicule ombilicale). Il est possible d'identifier deux catégories de CS pluripotentes.

Tout d'abord les **CS embryonnaires**, dont la découverte est attribuée à James Thomson en 1998⁷, correspondant aux cellules de la masse interne du blastocyste (présent du cinquième au septième jour du développement) et destinées à former les trois feuillets germinatifs de l'embryon : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. Leur utilisation, source de nombreux espoirs en médecine régénérative, fut sujette à un déchaînement de controverses éthiques quant à la destruction d'embryons et la possibilité de clonage. En France, depuis la révision de la loi de bioéthique de 2013⁸, l'obtention de CS embryonnaires est possible à partir d'embryons surnuméraires créés dans le cadre de fécondation *in vitro* et non retenus pour un projet parental, après consentement éclairé du couple. Par ailleurs, il convient de mentionner que ces cellules ont été mises en évidence comme capables de provoquer la formation de tératome chez la souris⁷.

Un autre type de CS pluripotentes sont les **CS pluripotentes induites ou *induced Pluripotent Stem cells* (iPS)** qui ont permis de détourner les questions éthiques consécutives à la nature des CS embryonnaires. En 2006, le japonais Shin'ya Yamanaka poursuit les travaux

du britannique John Gurdon, initiés plusieurs années auparavant, avec l'hypothèse qu'une cellule d'ores et déjà différenciée pourrait être « reprogrammée » en cellule immature. La méthodologie consiste à transférer et faire exprimer à une cellule spécialisée certains facteurs de transcription, des protéines impliquées dans la régulation de l'information génétique, caractéristiques de l'immaturité ou la pluripotence cellulaire (d'ailleurs



« Des cellules pour la santé », Leem et Bionest

exprimés par les CS embryonnaires). C'est le « cocktail » constitué des quatre gènes Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4 qui permet de reprogrammer génétiquement, en 2007, des fibroblastes cutanés humains et qui mena Yamanaka et Gurdon au prix Nobel de médecine en 2012⁹ (Figure 3). La possibilité d'obtenir des CS pluripotentes à partir de simples cellules de peau doit être

pondérée par le risque mutationnel associé à cette technique de manipulation du génome, limitant l'utilisation en clinique.

3) Les CS Multipotentes :

La capacité de différenciation des CS multipotentes est limitée comparée à celle des CS pluripotentes. En effet, une CS multipotente peut donner naissance à **plusieurs types cellulaires déjà engagés**, orientés, dans un lignage particulier. Ces CS sont observées au sein d'un organisme adulte dans la plupart des tissus dont elles assurent l'homéostasie ou le renouvellement¹⁰. Elles comprennent, notamment, les **CS Hématopoïétiques (CSH)**, développées ci-après, ainsi que les **CSM**.

4) Les CS Unipotentes :

Finalement les CS unipotentes possèdent l'aptitude d'engendrer **un seul type cellulaire donné** et participent également au renouvellement tissulaire chez l'adulte. Leur capacité de différenciation relativement restreinte n'autorise pas leur utilisation clinique dans n'importe quelle pathologie. Leur intérêt est tout de même majeur dans la régénération cutanée puisqu'elles permettent l'expansion puis la greffe d'une grande surface de peau à partir d'une petite biopsie, notamment chez les patients Grands Brûlés.

5) Origine des CS :

En pratique, les CS peuvent provenir soit du patient traité, soit d'une autre personne.

Quand le donneur est la même que le receveur, le prélèvement est dit « **autologue** ». Le principal avantage est l'absence totale de réaction immunitaire de la part du patient et donc une grande sécurité, également par rapport au risque infectieux. Par contre, un prélèvement autologue peut être limité par un nombre de cellules préexistantes insuffisant, par voie de conséquence, le délai de production peut être augmenté (le temps de cultiver une quantité assez importante de cellules) et cette catégorie n'autorise pas l'adaptation à grande échelle.

A l'inverse, quand le donneur est une personne différente du receveur, le prélèvement est dit « **allogénique** ». C'est grâce à cette méthode que des bio-banques de cellules qualifiées et prêtes-à-l'emploi sont en mesure d'être constituées. Des cellules allogéniques peuvent potentiellement être reconnues comme étrangères par le système immunitaire du receveur et être rejetées, cette action réactionnelle est prévenue par l'administration d'immunosuppresseurs.

C) Exemples d'application :

Ce chapitre, non loin d'être exhaustif, se propose d'illustrer des applications de TC concrètes, pratiquées dans les Unités de Thérapie Cellulaire (UTC), remarquables par leur importance dans la stratégie thérapeutique ou particulières par leur mécanisme d'action.

1) Greffe de CSH :

Les CSH sont des **CS multipotentes à l'origine des cellules circulantes du sang** (Figure 4) dont elles assurent la production tout au long de la vie d'un individu grâce à l'hématopoïèse, qui se déroule au sein de la Moelle Osseuse (MO).

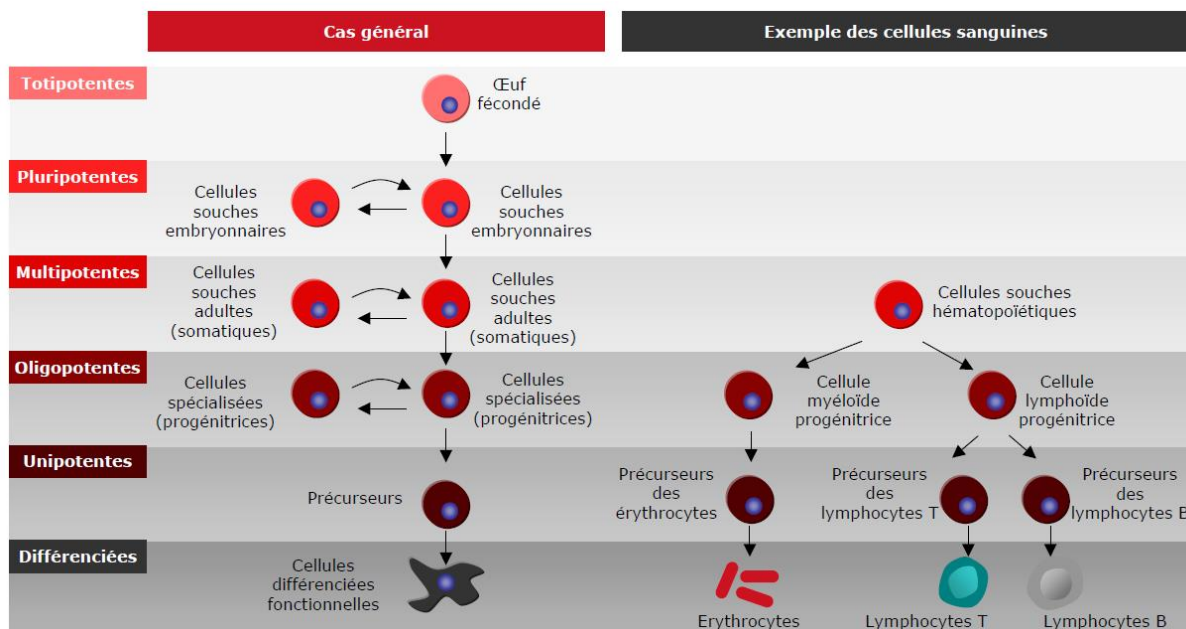


Figure 4 : Classification des CSH
« Des cellules pour la santé », Leem et Bionest

Les CSH sont accessibles par une **ponction de MO** sous anesthésie générale ou bien par un **prélèvement de sang périphérique après mobilisation** grâce à des facteurs de croissance hématopoïétiques comme le *Granulocyte Stimulating Factor* (GSH). Le GSH augmente la concentration de CSH sanguines qui sont ensuite collectées par cytophérèse. La cytophérèse consiste en une circulation extra-sanguine permettant de trier uniquement les cellules mononucléées du sang et de réinjecter les autres. Des CSH sont aussi retrouvées au sein du sang de cordon.

Les **greffes de CSH autologues** ont pour principale indication la réparation des dommages du tissu hématopoïétique, induits par de fortes doses d'agents cytotoxiques en oncologie, soin support à l'intensification thérapeutique. La transplantation de CSH chez des patients recevant une chimiothérapie conduit à une reconstitution hématopoïétique et immune suite à une période d'aplasie, source de complications infectieuses majeures. La greffe de CSH autologue trouve également une place dans l'arsenal thérapeutique des maladies auto-immunes où elle amène à la reconstitution d'un système immunitaire « naïf », après éradication des cellules auto-réactives lors du conditionnement immunosuppresseur.

Les **allogreffes de CSH** requièrent la sélection de donneurs compatibles sur le plan immunologique. L'impact escompté est un effet anti-tumoral, dans le cadre de maladies malignes, médié par les lymphocytes du donneur.

2) Photochimiothérapie Extracorporelle

La **Photochimiothérapie Extracorporelle (PCE)** est un exemple de TC à visée **immunomodulatrice**. Elle est utilisée comme thérapie adjuvante dans quelques pathologies avec dysfonctionnements du système immunitaire.

Les cellules mononucléées du sang périphérique sont collectées par cytophérèse et mises en contact d'un **agent photosensibilisant**, le 8-MéthOxyPsoralen, qui s'intercale entre les brins d'ADN. Les cellules sont ensuite photo-irradiées et réinjectées au patient.

Il existe des systèmes fermés offrant la possibilité de réaliser toutes les étapes en un seul temps grâce à un dispositif médical. Certains systèmes dissociés demandent une manipulation du produit cellulaire en laboratoire ainsi que deux équipements (séparateurs de cellules et irradiateur).

Le mécanisme d'action semble reposer sur une conjonction d'effets : une inhibition de la prolifération des cellules pathologiques, l'induction d'apoptose, la sécrétion par les cellules pré-apoptotiques réinjectées de cytokines activant des lymphocytes régulateurs, impliquant également la participation des cellules dendritiques.

Les principales indications sont le traitement des manifestations cutanées associées aux lymphomes T « épidermotropes » et la maladie du greffon contre l'hôte. Dans la GvH (*Graft versus Host disease*), la PCE permet une diminution des immunosuppresseurs.

3) Les CAR-T *cells* :

Les CAR-T *cells* constituent un tout nouvel outil thérapeutique dans la lutte oncologique faisant appel aux techniques de TC, de thérapie génique et d'immunothérapie. La médiatisation remarquable de cette thérapie innovante est particulièrement portée par une jeune fille, Emily Whitehead, l'une des premières patientes à avoir bénéficié d'un traitement par CAR-T *cells* dans le cadre d'une leucémie aigüe lymphoblastique. Aujourd'hui Emily est en rémission depuis sept ans (Figure 5).



Figure 5 : Photo d'Emily Whitehead, une des premières patientes traitées par CAR-T *cells*

Le concept des CAR-T *cells* consiste en une manipulation du système immunitaire aboutissant à la destruction des cellules tumorales. Les cellules mononucléés sanguines sont collectées par aphérèse. Les lymphocytes sont ensuite sélectionnés, notamment grâce à des tris immunomagnétiques et activés¹¹. Les lymphocytes T sont alors génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur spécifique des cellules tumorales : le CAR ou *Chimeric Antigen Receptor*. Les étapes de production sont illustrées dans la Figure 6. Au sein de l'organisme, la liaison entre le CAR et l'antigène tumoral provoque une cascade de signalisation aboutissant à une réaction immunitaire contre les cellules tumorales. Le système immunitaire reconnaît les cellules tumorales comme des éléments étrangers à détruire. Les voies naturelles de la défense anti-tumorale, impliquant notamment la libération des granules cytolytiques des lymphocytes CD8+, sont mises en œuvre.

Ce type d'approche n'est pas dénué de risques. De nombreux effets indésirables ont été constatés au cours des centaines d'essais cliniques à ce jour référencés, notamment une neurotoxicité sévère et des syndromes de relargages cytokiniques ont été fréquemment observés.

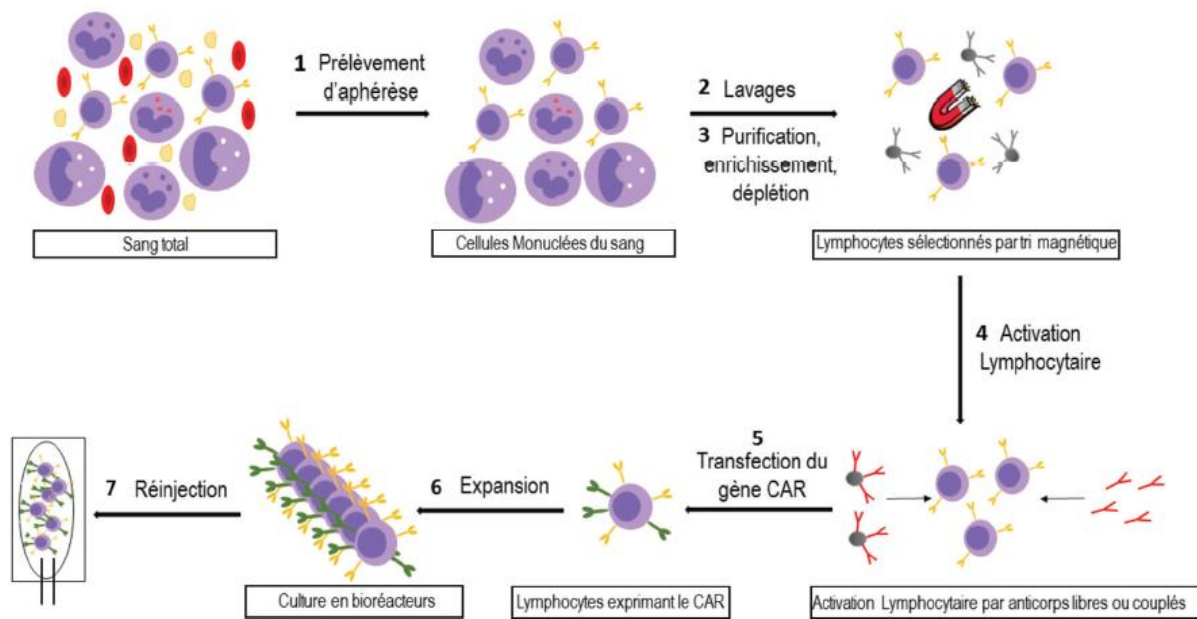


Figure 6 : Etapes de production des CAR-T cells
Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018, Magalon et al.

Ce genre de stratégie a particulièrement montré ses preuves dans les hémopathies à lymphocytes B (leucémie aigüe lymphoblastique, lymphome malin non Hodgkinien), le CD19 étant très spécifique et homogène de cette population lymphocytaire¹². Les deux premiers CAR-T cells commercialisés, Kymriah® et Yescarta® laissent entrevoir un espoir considérable.

II) Le Tissu adipeux

Comme illustré par ces quelques exemples, un prélèvement de sang périphérique par cytophèrese peut permettre l'obtention de matériel intéressant pour une production de TC, que cela soit des CS multipotentes dans le cadre des greffes de CSH, ou de cellules différenciées dans le cadre de traitement par PCE. Nonobstant, comme évoqué plus haut, les CS multipotentes assurent l'**homéostasie tissulaire** au sein d'un organisme adulte. En 2001, Zuk et son équipe mettent en évidence la **présence de CS multipotentes au sein du TA**¹³. Le TA n'est alors plus considéré comme un simple moyen de stockage d'énergie pour les périodes de restriction calorique mais comme un outil d'intérêt thérapeutique.

Il existe deux types de TA au sein de l'organisme humain qui diffèrent notamment d'un point de vue fonctionnel.

A) Le TA brun :

Le TA brun est essentiel à la régulation de la **thermogenèse**, la production de chaleur d'un organisme. En effet, au sein du TA brun, la protéine UCP-1 (*Uncoupling Protein-1*) ou thermogénine, présente en grande quantité dans la membrane interne des mitochondries, court-circuite la production d'ATP (Adénosine Triphosphate) pour libérer l'énergie résiduelle sous forme de chaleur¹⁴.

Le TA brun est très localisé¹⁵, que ce soit chez le fœtus et le nouveau-né, que chez l'adulte où les dépôts sont nichés dans des régions métaboliquement très actives, disposées symétriquement dans le haut du corps, le cou, sous les clavicules et le long de la colonne vertébrale (Figure 7).

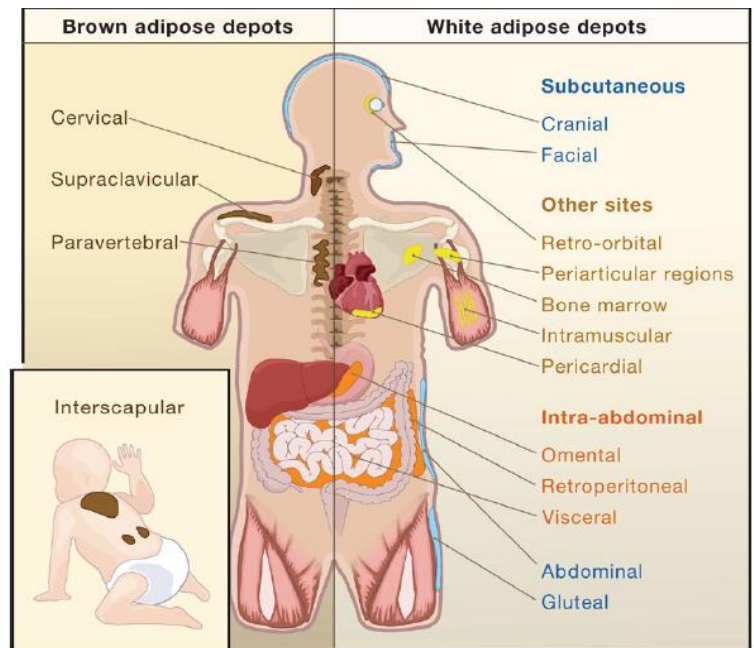


Figure 7 : Distribution des TA brun et blanc
Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source, Gesta et al.

B) Le TA blanc :

Le TA blanc prédomine chez les mammifères. Il représente entre 9 à 18% du poids corporel chez un homme sain et entre 14 et 28% chez une femme saine, c'est-à-dire présentant un Indice de Masse Corporelle (IMC) inférieur à 25¹⁶. Cette proportion peut représenter bien plus chez des personnes en surpoids ou obèses.

Les dépôts de TA blanc sont distribués de manière ubiquitaire, on peut différencier le TA sous-cutané (abdomen, hanches, cuisses, fesses...) du TA viscéral (autour des organes) qui montrent des variations importantes au niveau de leur structure, de leur composition, de leur métabolisme ainsi que de l'impact qu'ils ont sur les organes environnants¹⁵.

Le TA blanc est essentiel chez les mammifères du fait de plusieurs fonctions qu'il supporte.

1) Protection physique et thermogénèse

Le TA brun est à l'origine de la thermogénèse, pourtant le TA blanc va y contribuer grâce à son effet isolant. En effet la conductivité au froid du TA est bien moindre que celle, par exemple, du tissu musculaire. Sa distribution ubiquitaire restreint la déperdition de chaleur, bien que l'adaptation au froid chez l'espèce humaine soit essentiellement attribuée à l'augmentation du métabolisme.

Par ailleurs, le TA offre une protection mécanique aux organes lors de chocs.

2) Métabolisme des lipides :

Les adipocytes du TA sont capables d'emmagasiner l'énergie sous forme de lipides, plus particulièrement de triglycérides à haute densité calorique. Ils sont le siège de deux processus métaboliques importants. Tout d'abord la lipogénèse, faisant suite à la captation des acides gras transportés par les lipoprotéines dans la circulation, ces derniers sont estérifiés sous forme de triglycérides. La lipolyse est quant-à-elle responsable de l'hydrolyse des triglycérides pour mettre à disposition des acides gras et du glycérol aux tissus métaboliquement actifs en période de jeun. Ces processus sont dictés par différents signaux, notamment hormonaux (insuline, glucagon).

3) Fonction endocrine :

Les adipocytes ont acquis au cours des dernières décennies le statut de cellules sécrétrices, capables de communiquer grâce à la libération d'un grand nombre de molécules, c'est la fonction endocrine du TA^{17,18}. L'illustration la plus marquante est la sécrétion de l'hormone de la satiété, la leptine, qui régule la prise alimentaire grâce à un rétrocontrôle hypothalamique en activant la voie anorexigène. Plus généralement, les molécules vectrices de communication du TA sont résumées sous le terme d'adipokines. La TA sécrète également d'autres cytokines comme le facteur de nécrose tumorale α (*Tumor Necrosis Factor α* , ou TNF α) et l'interleukine-6 (IL-6), ainsi que des facteurs de croissance tels que le *Transforming Growth Factor* (TGF β).

4) Fonction angiogénique :

Parmi les nombreuses molécules sécrétées par le TA, certaines d'entre elles ont des propriétés pro-angiogéniques. On peut citer le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (ou *Vascular Endothelium Growth Factor*, VEGF) qui favorise la prolifération, la migration et

la survie des cellules endothéliales, il participe également à la formation des tubules, ou néo-vaisseau natif¹⁸.

C) Les Adipocytes :

Les adipocytes du TA blanc sont des cellules différenciées qui possèdent la machinerie cellulaire nécessaire à l'accumulation des lipides. Leur taille peut varier, de 60 à 100 µm en moyenne, soit plus de cent fois celle d'un globule rouge, à plus de 120 µm chez les personnes obèses¹⁹. L'unique gouttelette lipidique contenue dans l'adipocyte blanc représente jusqu'à 85 à 90 % de sa masse cellulaire, repoussant les autres constituants du cytosol (organelles, noyau) à la périphérie de la cellule. Le tissu adipeux est richement vascularisé²⁰, de sorte que chaque adipocyte est à proximité de capillaires sanguins qui permettent la nutrition ou l'élimination des déchets métaboliques.

Les adipocytes composant le tissu adipeux brun ont une morphologie différente. Ils sont beaucoup plus petits, leur diamètre variant de 30 à 40 µm, contiennent plusieurs gouttelettes lipidiques de tailles variées et ont un cytoplasme relativement abondant. La grande quantité de mitochondries dans les adipocytes bruns est à l'origine de leur couleur brunâtre.

Le TA est un tissu doté d'une grande plasticité, les adipocytes sont capables de profondes modifications métaboliques pour parvenir à la régulation de la balance énergétique de l'organisme. Ainsi, lorsque la balance énergétique est positive, les adipocytes augmentent leur capacité de stockage par hypertrophie (augmentation de leur taille) ou hyperplasie (augmentation du nombre).

Les adipocytes représentent environ un tiers du TA, celui-ci est également composé d'un stroma vascularisé riche en plusieurs populations cellulaires.

III) La Fraction Vasculaire Stromale

Bien que les propriétés adipocytaires soient étonnantes, c'est bien à la **Fraction Vasculaire Stromale (FVS)** que la plupart des propriétés régénératives du TA est attribuée.

Cette fraction cellulaire hétérogène, vectrice d'activités biologiques multiples, montre un grand potentiel thérapeutique.

A) Composition de la FVS :

Une digestion enzymatique, ou bien une dissociation mécanique, d'un prélèvement de TA, suivie d'une centrifugation, permet d'obtenir une suspension cellulaire hétérogène constituant la FVS. Elle est formée à la fois par les **cellules circulantes**, présentes dans les nombreux microvaisseaux irrigant le TA, et à la fois par les **cellules résidant dans la paroi des vaisseaux**. Bien que la composition cellulaire de la FVS varie en fonction du site de prélèvement, de la méthode d'extraction ou à cause d'une variabilité inter-patient²¹, l'IFATS (*International Federation for Adipose Therapeutics and Science*) et l'ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) recommandent des critères de définition basés sur la teneur de quatre sous populations distinctes de cellules nucléées²². Ainsi la FVS est constituée de :

- **25 à 45% de cellules d'origine hématopoïétique** : macrophages, monocytes, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles

- **15 à 30% de Cellules Souches Mésoenchymateuses**

- **10 à 20% de Cellules Endothéliales et Progéniteurs Endothéliaux**

- **3 à 5% de Péricytes**

L'évaluation de la répartition des sous-populations cellulaires de la FVS est permise par la technique d'analyse en **cytométrie en flux**. La cytométrie en flux permet de mesurer, au sein d'une suspension cellulaire ou particulaire, la taille, la forme et la complexité de chaque cellule ou particule. La technologie repose sur le passage une à une des cellules devant un ou plusieurs faisceaux laser. Cela permet également d'identifier les cellules portant un marqueur de surface particulier grâce à la liaison préalable à un anticorps, dirigé contre ce marqueur, couplé à un fluorochrome émettant une longueur d'onde connue et détectable.

Les protéines de surface recherchées pour l'identification des populations cellulaires de la FVS font partie des molécules de la famille des « *Clusters of Differentiation* » (CD). Une

stratégie de multi marquage phénotypique permet de mettre en évidence les différentes cellules composant la FVS ; une des stratégies possibles est détaillée ci-après et illustrée par la Figure 8.

Un aliquot de la suspension cellulaire à analyser est collecté puis mis en incubation avec un mélange, ou *mix*, d'anticorps dirigés contre les CD à identifier ainsi qu'un marqueur nucléaire et un marqueur de viabilité. Le marqueur nucléaire va permettre de mettre en évidence les événements nucléés qui ne sont donc pas des débris cellulaires ou des plaquettes et dont l'identité cellulaire est confirmée. Le marqueur de viabilité permet de donner une estimation de la viabilité cellulaire, elle est le reflet de la qualité du produit biologique fini et assure ainsi l'efficacité potentielle de la thérapie. Finalement parmi les cellules viables différenciées **les cellules exprimant l'antigène CD45 (cellules CD45+) correspondent aux cellules d'origine hématopoïétique, alors que les cellules ne portant pas le CD45 (cellules CD45-) sont les « cellules régénératives ».**

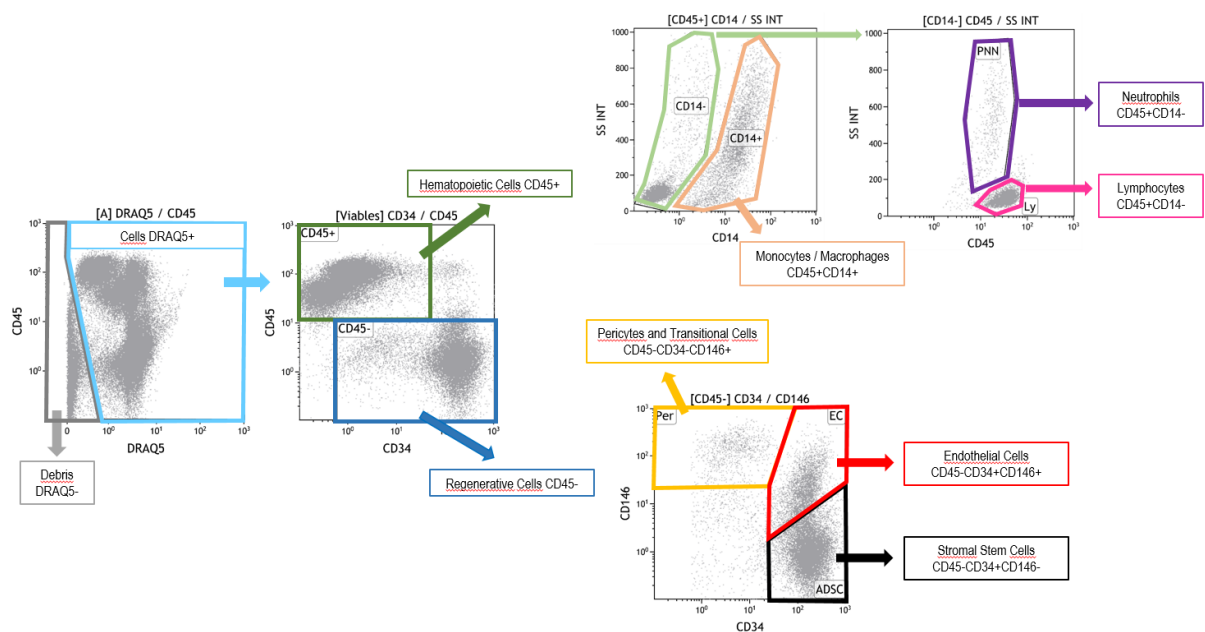


Figure 8 : Stratégie multiparamétrique de cytométrie en flux d'analyse de la distribution des sous-populations de la FVS

Parmi les cellules d'origine hématopoïétique, les monocytes/macrophages sont mis en évidence sur la base du CD14 qu'ils expriment spécifiquement. Les cellules n'exprimant pas le CD14 (CD45+CD14-) sont alors analysées en termes de taille. Les lymphocytes forment une population de petite taille alors que les neutrophiles sont visibles pour des tailles supérieures.

Les événements nucléés CD45⁻ sont séparés sur la base de l'expression ou la non expression des marqueurs CD34 et CD146. Les PR et CT sont discriminés sur le profil d'expression suivant : CD45-CD34-CD146⁺, les cellules endothéliales selon celui-ci : CD45-CD34⁺CD146⁺ ; alors que les CSM respectent celui-là : CD45-CD34⁺CD146⁻.

Il faut noter qu'à l'heure actuelle il n'existe aucune standardisation particulière pour évaluer la répartition des différentes populations cellulaires de la FVS par cytométrie en flux. En effet, le principe est similaire dans toutes les études, mais les anticorps et marqueurs varient, tout comme les fluorochromes auxquels ils sont couplés. Le traitement pré-analytique ne fait pas non plus l'objet d'un consensus. Les comparaisons entre les études sont peu aisées et peu fiables. Enormément d'études se contentent de regarder l'expression d'un marqueur sur la totalité des cellules viables (monomarquage) et n'utilisent pas de stratégie multiparamétrique permettant d'estimer la proportion de chaque population au sein du produit.

Par ailleurs, l'identité de certaines populations n'est pas claire et fait l'objet de controverses (cf. partie III.A.2).

Nous présenterons la composition de la FVS selon l'analyse détaillée ci-dessus.

1) Les cellules CD45⁺ d'origine hématopoïétique :

Les populations leucocytaires de la FVS sont les monocytes/macrophages (11-20%), les lymphocytes (8-16%), et les polynucléaires neutrophiles (3-7%). Elles expriment toutes le marqueur pan-leucocytaire CD45.

Les monocytes/macrophages représentent la population leucocytaire majoritaire au sein de la FVS. Ils expriment le CD14. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes, effectrices de la réponse immunitaire. Ces cellules exercent leurs fonctions anti-infectieuses, anti-tumorales ou allo-immunes via une activité directe (comme la phagocytose) ou en produisant des facteurs solubles (cytokines et chimiokines) capables d'activer les lymphocytes.

Les lymphocytes principalement retrouvés dans la FVS sont des lymphocytes T exprimant le CD3 ainsi que des lymphocytes *Natural Killer* (NK), effecteurs de l'immunité innée, définis par le phénotype CD3-CD56⁺.

Les polynucléaires neutrophiles sont d'autres agents antibactériens exerçant leurs fonctions via la libération du contenu de leurs granules cytoplasmiques. Ceux-ci sont identifiés dans la FVS grâce à leur taille et leur granulosité.

2) Les cellules régénératives CD45-

Sont regroupées sous le terme de « cellules régénératives » les populations dont le mécanisme d'action a été identifié et dont on sait qu'elles contribuent à l'activité biologique de la FVS. Elles comprennent : les CSM, les CE et PE ainsi que les PR et CT.

Les Cellules Souches / Stromales Mésoenchymateuses

Les CSM font partie des CS multipotentes. Leur première observation remonte aux années 1970, l'équipe d'A. Friedenstein a mis en évidence, au sein du stroma de la Moelle Osseuse (MO), la présence de progéniteurs de nature **non hématopoïétique**. Dans la moelle, les CSM sont quantitativement très minoritaires (0.001% des cellules mononuclées). Plus tard il apparaît que les CSM sont retrouvées dans la plupart des tissus dérivés du mésoderme où elles sont actrices du renouvellement tissulaire, notamment dans le **tissu adipeux**¹³, ainsi que dans le placenta et le cordon ombilical et le sang de cordon²³ (Figure 9). Bien que les CSM puissent être isolées à partir de sources diverses, il faut souligner que le **TA est une source particulièrement avantageuse** de CSM. En effet les ASC (*Adipose-derived Stem Cells*) ont démontré les mêmes propriétés que les CSM de MO^{24,25}, sont rencontrées en concentration bien plus importante dans le tissu adipeux que dans la MO (estimée à quarante fois plus²⁶) et surtout sont bien plus facilement accessibles grâce à une lipoaspiration, moins invasive pour le patient qu'un prélèvement de MO. Succinctement, les ASC sont les MSC du TA.

Les CSM présentent la capacité de s'auto-renouveler et également de s'engager dans des lignages cellulaires d'origine mésodermique telle que l'os, le cartilage et le tissu adipeux (Figure 9).

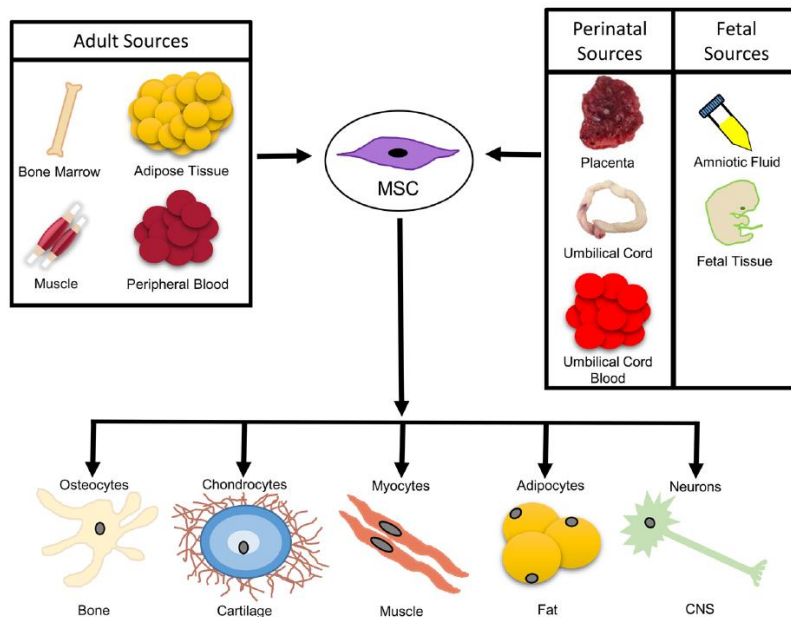


Figure 9 : Les CSM : sources et potentiel de différenciation
Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration, Brown et al

En 2006, dans l'optique d'uniformiser les pratiques et comparer les études, l'ISCT détermine trois critères minimum de définition des CSM²⁵ :

→ L'**adhérence au plastique**, dans des conditions de culture standard

→ Le **phénotype membranaire**, déterminé par cytométrie en flux :

Au moins 95% des cellules positives aux :

- CD105
- CD73
- CD90

Au moins 98% des cellules négatives aux :

- CD45
- CD34
- CD14 ou CD11b
- CD79 α ou CD19
- HLA-DR

→ La capacité de se différencier *in vitro* en cellules du trilineage mésodermique : **ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes.**

La différenciation d'une CSM est réalisable *in vitro* par la mise en contact des cellules avec des milieux de culture spécifiques contenant des facteurs solubles nécessaires à la croissance soit des ostéoblastes, soit des chondroblastes, soit des adipocytes. L'observation microscopique permet d'examiner la nature cellulaire mais la démonstration de la différenciation est objectivée par marquage. La différenciation en ostéoblaste peut être

démontrée par marquage à l'Alizarine rouge qui met en évidence les dépôts calciques. L'identité adipocytaire peut être objectivée par marquage à l'*Oil Red O* qui cible les gouttelettes lipidiques. Finalement, le bleu Alcian marque les chondroblastes.

L'attrait croissant de la médecine régénérative pour les CSM repose bien évidemment sur cette pluripotence, mais pas uniquement puisqu'il a été démontré que le principal mécanisme d'action des CSM est un **processus paracrine**. Les CSM sécrètent tout un panel de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance intéressant sur le plan thérapeutique. L'équipe de Katz répertorie les soixante-huit protéines les plus conservées dans le sécrétome des ASC²⁷. Elles produisent notamment des facteurs pro-angiogéniques, anti-apoptotiques, immunomodulateurs et anti-fibrotiques.

Le potentiel **pro-angiogénique**, la capacité à contribuer à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, des CSM repose sur un double mécanisme. D'une part la capacité de différenciation en cellules endothéliales²⁸ et d'autre part la sécrétion de molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF.

Les principales propriétés et facteurs paracrines des CSM sont illustrés dans la figure 10, extraite de l'article de l'équipe de Lindolfo da Silva Meirelles²⁹.

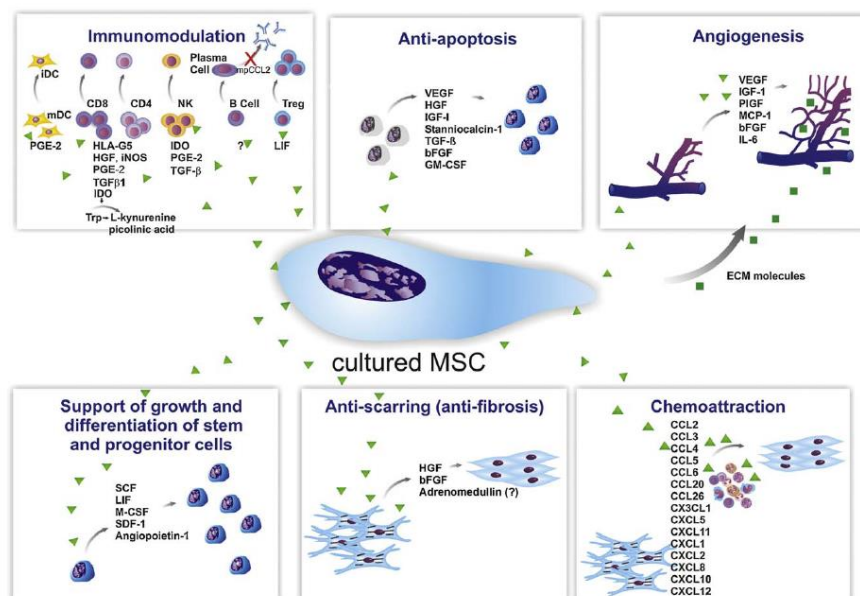


Figure 10 : Les CSM : propriétés et facteurs paracrines impliqués
Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells
Lindolfo da Silva et al

La présence de **progéniteurs endothéliaux** dans la circulation périphérique chez l'adulte, PEC pour Progéniteurs Endothéliaux Circulants, a été observée pour la première fois en 1997 avec les travaux pionniers d'Asahara et coll³⁰. Ces cellules ont été identifiées parmi une fraction de cellules mononucléées co-exprimant l'antigène CD34 et le récepteur 2 du VEGF. Elles présentent une capacité de prolifération et de différenciation endothéliale *in vitro* et une aptitude à promouvoir la néovascularisation *in vivo*³⁰. Divers modèles de transplantation médullaire chez l'animal ont établi que ces cellules, mobilisées à partir de la moelle osseuse, sous l'influence de différentes cytokines ou de facteurs de croissance, sont capables de rejoindre spécifiquement les sites de néovascularisation où elles contribuent significativement à la croissance ou à la réparation endothéliale lors de processus physiologiques ou en réponse à l'ischémie¹⁹. Des travaux précliniques ont établi que l'injection de PEC est capable d'induire le développement de néo-capillaires et de favoriser le rétablissement de la perfusion tissulaire dans différents modèles d'ischémie³¹.

Plus tard la caractérisation des PEC présents dans la circulation sanguine se précise et démontre une grande hétérogénéité. Ainsi, il est possible d'identifier au moins deux sous-populations³².

Une sous-population est qualifiée de **progéniteurs « précoces »**, ou PEC myéloïdes, et se caractérise par :

- Une origine hématopoïétique,
- Un délai rapide d'obtention des colonies en culture,
- Un potentiel de prolifération limité,
- Un phénotype associant marqueurs endothéliaux et marqueurs de monocytes/macrophages.

Ils ont une capacité à promouvoir l'angiogenèse qui dépend essentiellement de leur **activité paracrine**.

A l'inverse, une population dite de **progéniteurs « tardifs »** ou *Endothelial colony forming cells (ECFC)* se distingue par :

- Une origine vasculaire,

- Sa capacité à générer en dix à vingt jours de culture *in vitro* des colonies de cellules adhérentes,
- Un potentiel de prolifération élevé,
- Une capacité de différenciation endothéliale complète et homogène.

Ces cellules correspondent aux **angioblastes « vrais »** en raison d'une capacité spécifique à s'incorporer directement dans les vaisseaux en croissance et à assurer la formation de néovaisseaux fonctionnels *in vivo* ou vasculogénèse³³.

Leur effet relève d'une **contribution directe à la néo-angiogenèse mais également d'une activité paracrine** incluant la production de VEGF et d'interleukine 8 (IL-8), la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et la libération de vésicules extracellulaires chargées en miRNA à activité angiogénique et vasculoprotectrice³⁴.

Les ECFC sont retrouvées en quantité plus importante dans le sang du cordon ombilical que dans le sang périphérique. Il contient des ECFC caractérisées par un haut potentiel de prolifération dans des tests clonogéniques et donnant naissance à des vaisseaux stables et fonctionnels *in vivo*³⁵. De plus, les ECFC de sang de cordon conservent des caractéristiques de cellules souches ou immatures attestées par leur signature transcriptionnelle³⁶ et une plasticité suffisante pour acquérir une spécialisation endothéliale tissu-spécifique en réponse aux stimuli environnementaux³⁷.

Cependant, leur utilisation thérapeutique chez l'homme imposerait une thérapie allogénique dont les conséquences en termes d'allo-immunisation ne sont pas maîtrisées à ce jour. L'utilisation des ECFC du sang périphérique autologue permettrait de s'affranchir de ces barrières immunologiques mais sa faisabilité est compromise par l'extrême rareté des ECFC dans le sang périphérique adulte, évaluée à 0.05-0.2 cellules/ml, ainsi que leur faible potentiel d'expansion *in vitro* lié à un taux de sénescence élevé³⁸.

Ainsi le développement de thérapies cellulaires angiogénique a nécessité d'identifier une source alternative. Dans cette perspective, les données récentes sur l'origine et le réservoir des ECFC sont particulièrement intéressantes. En effet, sur la base d'études menées sur les ECFC de patients atteints de maladies clonales impactant les cellules souches hématopoïétiques, il a été clairement établi que **les ECFC n'appartiennent pas au lignage hématopoïétique**³³, remettant en question leur origine médullaire. A l'inverse, l'existence

d'ECFC résidant dans la paroi vasculaire est confortée par de solides observations. Ingram et son équipe ont identifié environ 20% d'ECFC à haut potentiel de prolifération parmi des CE aortiques en culture suggérant leur présence dans l'intima³⁹. Des précurseurs endothéliaux doués d'activité clonogénique et localisés dans l'adventice et la média des vaisseaux sont également susceptibles de participer au *turn over* de l'endothélium ainsi qu'à la formation à distance de néovaisseaux via leur passage sanguin⁴⁰.

Le réservoir vasculaire des ECFC suggère que le tissu adipeux sous-cutané, facilement accessible en situation autologue et hautement vascularisé, pourrait constituer une source avantageuse pour l'obtention d'ECFC.

Il est donc établi que des PE de type ECFC sont présents au sein de la FVS. Cependant, il est primordial de comprendre que **les cellules CD45-CD34+CD146+ numérées en cytométrie de flux correspondent à la fois à des ECFC et à la fois à des CE matures** constituantes des microvaisseaux du TA et qu'**il est impossible de les distinguer par l'expression d'un marqueur de surface** puisqu'il n'existe à leur actuelle aucun marqueur spécifique des ECFC malgré plusieurs études⁴¹.

Les caractéristiques des ECFC sont résumées dans la Figure 12.

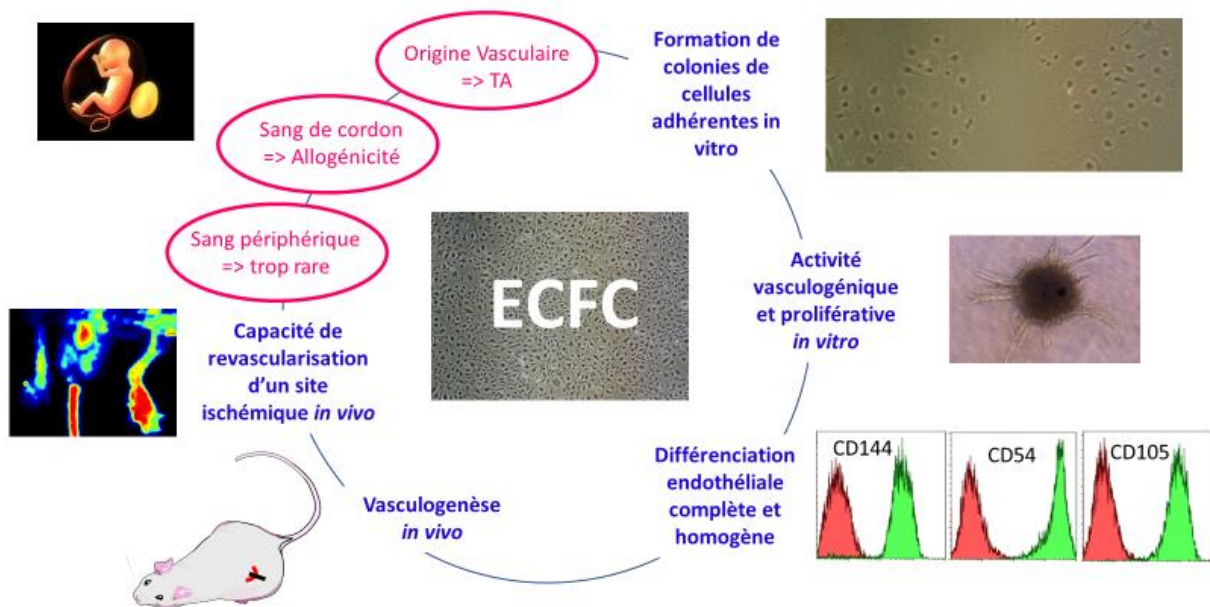


Figure 12 : Propriétés et Origine des ECFC

La dernière population de la FVS est identifiée grâce au phénotype membranaire CD45-CD34+CD146- ainsi qu'une expression au CD90 positive (PR) ou négatives (CT).

« Péricyte » est le terme utilisé pour désigner les cellules murales vasculaires intégrées dans la membrane vasculaire du socle des microvaisseaux sanguins, où ils établissent des contacts privilégiés avec l'endothélium⁴². Ils sont apparentés aux cellules du muscle lisse vasculaire qui entourent les vaisseaux plus grands. Les PR sont des composants structurels des vaisseaux sanguins, régulent la contractilité vasculaire et favorisent la stabilité des vaisseaux sanguins.

Il existe une controverse majeure quant à la nature péricytaire des CSM. En effet, d'après Tallone et al, il s'agirait des mêmes cellules⁴³. Plusieurs études montrent une relation étroite entre ces populations puisqu'elles sont localisées au même niveau périvasculaire et expriment un certain nombre de marqueurs similaires. C'est de ce concept que découle le terme de « cellules transitionnelles », leur phénotype semble transitionnel entre des péricytes et des CSM.

La FVS est donc composée de différents types cellulaires possédant intrinsèquement des propriétés intéressantes sur le point de vue thérapeutique. Toutefois, c'est moins les propriétés individuelles de chaque cellule que **l'action synergique** de celles-ci qui place la FVS comme une thérapie cellulaire particulièrement innovante.

B) Propriétés de la FVS et mécanismes d'actions :

L'utilisation de la FVS en clinique dans diverses pathologies connaît un engouement considérable ces dernières années du fait de la pléiotropie de ces effets biologiques.

1) Les propriétés régénératives :

En raison de leur aptitude naturelle à se différencier en différentes lignées lorsqu'elles sont placées dans un environnement approprié, les CSM font de la FVS une option de choix pour la régénération tissulaire. En dehors de cette multipotence, la FVS peut induire une prolifération des cellules hôte après implantation, une aptitude particulièrement intéressante

dans les processus de cicatrisation lors desquels la FVS stimule la prolifération des fibroblastes⁴⁴.

2) Les propriétés angiogéniques :

Du fait de sa composition, très proche de celle d'un vaisseau sanguin, les propriétés pro-angiogéniques de la FVS sont largement documentées. Une illustration marquante est l'étude de l'équipe de Traktuev qui montre que l'association des PEC et des CSM issus de TA entraîne une plus grande néovascularisation *in vitro* que les PEC ou les CSM isolés⁴⁵.

Les PE ont la capacité de former de nouvelles structures tubulaires. Les CSM sont capables de migrer et s'intégrer pour stabiliser ces néo-vaisseaux.

Les PE et CSM, en plus d'une contribution structurelle à la formation de nouveaux réseaux vasculaires, établissent une véritable communication cellulaire entre elles (ou *cross-talk*)⁴⁶. Le mécanisme principalement connu est le cercle vertueux entre la sécrétion de PDGF-BB et bFGF par les PE, entraînant une augmentation de la migration et la prolifération des CSM dont la résultante globale est une élévation du taux de VEGF. Le VEGF stimule alors l'angiogenèse chez les PE. Par ailleurs, les PR de la FVS coopèrent avec les deux types cellulaires précédemment cités par la stabilisation structurelle du vaisseau. Les propriétés angiogéniques de la FVS sont illustrées par la figure 13.

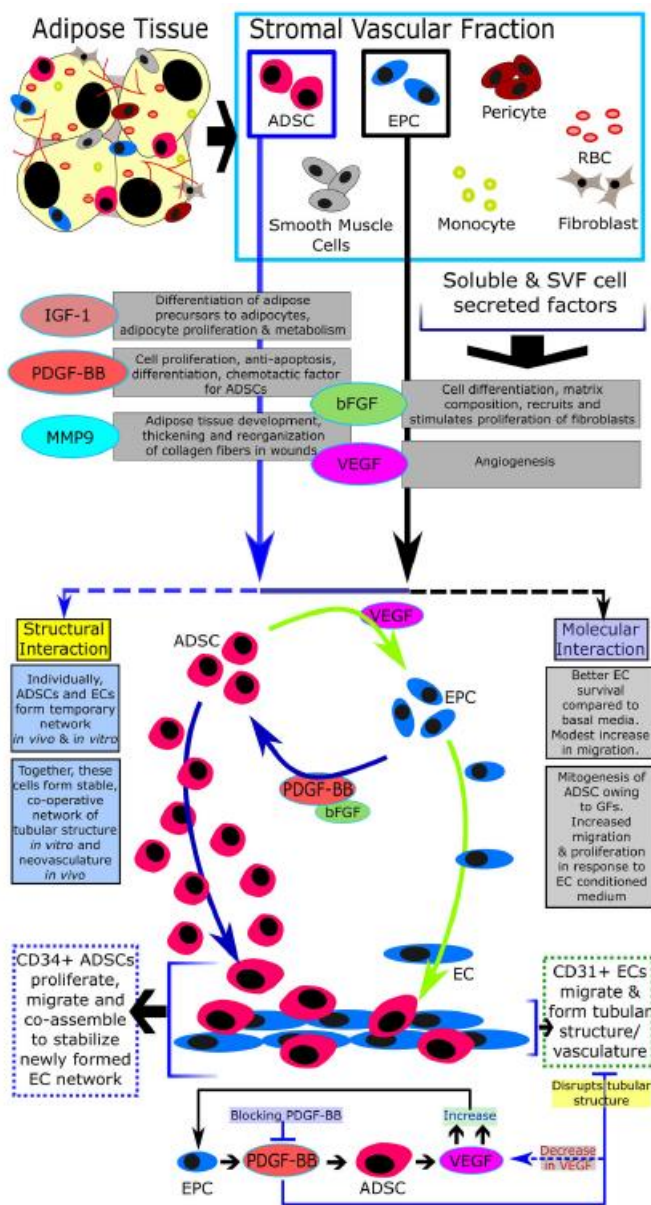


Figure 13 : Propriétés angiogéniques de la FVS
Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation, Bora et al

3) Les propriétés immunomodulatrices :

Les propriétés immunomodulatrices de la FVS sont attribuées à une modulation de l'inflammation et la réponse immunitaire *via* la sécrétion et la suppression de diverses cytokines. Les principales populations cellulaires susceptibles d'être responsables de ces effets sont :

- Les macrophages qui, en condition non pathologique, expriment un phénotype de type M2 anti-inflammatoire⁴⁷ ;
- Les lymphocytes T régulateurs dont la sécrétion de molécules immunosuppressives est connue ;
- Les CSM, dont les propriétés immunomodulatrices consistent, entre autres, à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes.

4) Les propriétés anti-fibrotiques :

Cette propriété anti-fibrosante est relativement peu documentée. Elle est essentiellement associée à la présence de CSM au sein de la FVS, qui ont démontré une capacité de remodelage matricielle par des métallo-protéinases⁴⁸.

C) Contexte réglementaire : la FVS comme Médicament de Thérapie Innovante :

En 2007, l'Agence Européenne du Médicament (EMA pour *European Medicines Agency*), par la publication du règlement européen CE 1394/2007, crée le statut de « médicament » pour certains produits de TC sous le terme de **Médicaments de Thérapie Innovante (MTI)**, ou *Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP)*. Avant cela, les produits de TC étaient exclusivement réglementés par chaque autorité sanitaire nationale dont l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) en France.

Le statut de MTI concerne tous les produits /préparations mettant en jeu un principe actif reposant sur la « cellule » et / ou leurs dérivés. Afin de les distinguer de par leur nature, leur classification a été ainsi définie par l'EMA en quatre sous-catégories (Figure 14) :

- Les Médicaments de thérapie génique
- Les Médicaments de TC
- Les Médicaments issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire
- Les Médicaments combinés de thérapie innovante

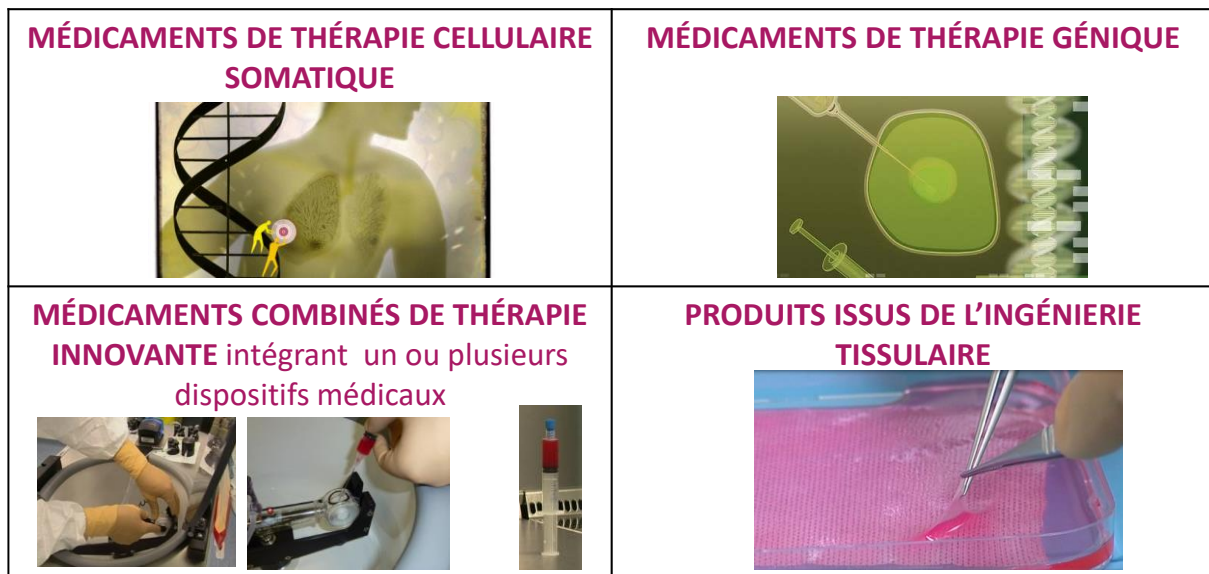


Figure 14 : Catégories des MTI

Les MTI, depuis leur développement précoce jusqu'à leur éventuelle Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) font l'objet d'une procédure européenne centralisée après avis du *Committee for Advanced Therapies (CAT)*, créé spécifiquement et concomitamment à la

publication du règlement CE 1394/2007, et du *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP).

Un produit de TC est considéré comme un MTI lorsque :

- sa production nécessite une « **modification substantielle** » des cellules ou des tissus,
- **et/ou** que ces derniers sont destinés à être administré pour un **usage non homologue**.

Une **modification substantielle** est considérée par l'EMA comme impactant les propriétés biologiques intrinsèques de chaque type cellulaire ou tissu. Dans la mesure où ces MTI sont issus de procédés extrêmement évolutifs aux vues des avancées technologiques de ces dernières années, il apparaît difficile de lister de manière exhaustive l'ensemble des modifications dites « substantielles ». *A contrario*, l'EMA a choisi de lister, dans l'annexe 1 du règlement européen CE 1394/2007, les modifications dites « non substantielles » qui sont rappelées dans le Tableau 1. Il est à noter que dans certains procédés de fabrication complexe, une succession de manipulations non substantielles peuvent aboutir à une modification substantielle entre le prélèvement initial et le produit fini.

Un **usage non homologue** signifie que les cellules ou tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et le donneur (y compris lorsque le donneur est le receveur).

La fabrication d'un MTI devra être réalisée au sein d'un **établissement pharmaceutique autorisé par son autorité sanitaire nationale**.

Modifications non substantielles
- Découpage
- Broyage
- Façonnage
- Centrifugation
- Trempages dans des solutions antibiotiques ou antimicrobiennes
- Stérilisation
- Irradiation
- Séparation, concentration ou purification de cellules
- Filtration
- Lyophilisation
- Congélation
- Cryoconservation
- Vitrification

Tableau 1: Modifications non substantielles
Annexe 1 – CE 1394/2007
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:324:0121:0137:en:PDF>

Plus tard, en France, la loi n°2011-302 du 22 mars 2011, retranscrit l'applicabilité du règlement européen en droit français et introduit nationalement le statut de « **Médicament de Thérapie Innovante – Ponctuellement Préparé (MTI-PP)** » qui autorise une « exemption hospitalière » (*hospital exemption*, comme définit principalement par l'EMA).

Un MTI-PP est un MTI tel que défini précédemment, mais ses modalités de prescription, de fabrication et de distribution sont restreintes à un établissement de soins.

En termes d'autorisation, le MTI-PP :

- est soumis à une **réglementation nationale** et non européenne,
- sa production et son utilisation sont restreintes au sein d'un unique état membre, sauf dérogation dans le cadre de Recherche Impliquant la Personne Humaine (RIPH) stipulée par un décret de 2016⁴⁹;
- est préparé à l'intention d'un malade déterminé pour satisfaire une prescription nominative et sous responsabilité médicale ;
- est administré au sein d'une structure hospitalière.

A ce jour, certains produits de TC ne correspondent pas à la définition d'un MTI, ceux-ci restent considérés comme « Préparations de Thérapie Cellulaire » (PTC). Ces PTC sont soumis à une réglementation nationale et représentent essentiellement des actes de soins courants, largement pratiqués et validés par l'usage.

En termes de vigilances sanitaires, les MTI et MTI-PP sont soumis à la pharmacovigilance alors que les PTC relèvent de la biovigilance.

En Europe, seule une dizaine de MTI ont obtenu une AMM en plus de dix ans. Un exemple d'applicabilité concrète est l'approbation par l'EMA en 2015 de l'Holoclar[®]. Ce MTI a pour indication une déficience en cellules souches limbiques modérées ou sévères causées par brûlures, touchant environ trois personnes pour cent mille dans l'Union Européenne (UE). La substance active de ce produit d'ingénierie tissulaire est constituée de cellules épithéliales cornéennes autologues amplifiées *ex vivo* et contenant des cellules souches. La culture étant la modification substantielle de ce produit. L'Alofisel[®] a également reçu une autorisation de mise sur le marché en 2018. Ces cellules souches allogéniques sont indiquées dans les fistules anales complexes de la maladie de Crohn. Ces traitements innovants demeurent très onéreux (plusieurs centaines de milliers d'euros) et sont de fait restreints à un nombre limité de patients.

Comme tout médicament, les MTI, doivent être produits dans le respect des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) applicables aux médicaments à usage humain, définies dans la directive 2003/94/EC, et spécifiques aux MTI⁵⁰.

Très succinctement, les BPF ont pour objectif de garantir la qualité et la sécurité d'un médicament. Elles développent neuf thématiques sous les chapitres suivants :

- 1) le **système de qualité pharmaceutique** et son amélioration continue ;
- 2) la nécessité d'un **personnel** qualifié et formé avec des fonctions et des responsabilités partagées ;
- 3) l'organisation logique des **locaux** en différentes zones et différents circuits afin de maîtriser la contamination croisée ainsi que la qualité du **matériel** à utiliser ;
- 4) le **système documentaire** adapté à une traçabilité appropriée ;
- 5) la validation, l'évaluation et le contrôle de la **production** ;
- 6) les **contrôles de la qualité** intervenant à toutes les étapes dans le cycle de vie du médicament ;
- 7) les obligations des deux parties lors d'**activités externalisées** ;
- 8) les **réclamations et défauts de qualité ainsi** que les investigations qu'ils entraînent, et les **rappels** ;
- 9) et finalement les **auto-inspections**.

Récemment, la commission européenne a adopté, le 22 Novembre 2017, des **BPF spécifiques aux MTI**, développant les principes et lignes directrices devant être appliquées pour la fabrication des MTI autorisés et / ou expérimentaux (utilisés dans le cadre d'essais cliniques). Ce texte préconise que les MTI-PP doivent être fabriqués selon des normes de qualité équivalentes. Les BPF françaises applicables aux MTI ont été élaborées en adéquation avec le modèle européen et sont, depuis le 6 Mai 2019, retrouvées dans la partie IV du volume 4 des BPF applicables aux médicaments à usage humain. Ces règles et exigences spécifiques aux MTI demeurent très strictes mais laissent aux fabricants la décision de restreindre les mesures de contrôles et / ou de validation du procédé, au regard des bénéfices /risques du MTI considéré et de l'état d'avancement du développement du MTI. Dans ce cas, le fabricant doit justifier et argumenter l'absence de risque du produit et préciser les mesures de surveillance. Dans cette démarche, comme tout fabricant, il peut s'aider de recommandations internationales. Les *International Council for Harmonization* (ICH) sont destinées à donner un guide de bonnes pratiques au-delà des réglementations nationales. Dans ce cadre, les ICH Q5A / Q5E (*Quality*

of Biotechnological Products), Q6 (*Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological / Biological Products*) et Q9 (*Quality Risk Management*) sont particulièrement appropriées.

Les BPF opposables aux MTI déclinent l'applicabilité des BPF à la spécificité des MTI et en spécifient les risques inhérents à leur nature.

La FVS répond aux exigences réglementaires d'un MTI (ou MTI-PP), sur la base :

- d'une modification substantielle, intervenant systématiquement dans le procédé de fabrication de digestion enzymatique du tissu adipeux. La digestion enzymatique a été plus récemment considérée comme modification substantielle détériorant l'intégrité tissulaire⁵¹.
- d'un usage non homologué dans certaines indications, si l'effet thérapeutique revendiqué est différent des fonctions physiologiques du tissu adipeux.

Concernant le positionnement de la commission européenne sur la FVS, le 25 Novembre 2015, le CAT classe la FVS dans la catégorie des MTI lorsqu'elle est indiquée pour soulager des douleurs d'arthrose articulaire sur la base de l'effet thérapeutique recherché dépendant de l'action immunologique du produit⁵².

De même, le 26 Avril 2016, le CAT classe ainsi la FVS utilisée pour le traitement des cicatrices kéloïdes, considérant que ce MTI d'ingénierie tissulaire a subi une modification substantielle permettant l'acquisition de propriétés thérapeutiques mais aussi que l'administration est à visée de régénération-réparation et remplacement de tissu, considérée non homologué⁵³.

Néanmoins, cet avis positif n'est pas systématique puisque le 24 octobre 2018, le CAT indique que la FVS indiquée dans la régénération de la fibrose épithéliale résultant de sclérose de lichen vulvaire ne répond pas au statut de MTI car le procédé ne fait pas intervenir de modification substantielle ni d'usage homologué⁵⁴.

A l'heure actuelle, la FVS n'est pas produite industriellement, celle-ci est surtout fabriquée et évaluée dans divers essais cliniques au sein, essentiellement, de structures académiques.

Partie 2 : Méthodes d'Extraction de la FVS : état de l'art

I) Principes généraux :

Le principe général d'extraction de la FVS est d'éliminer les cellules adipocytaires pour ne conserver que la suspension cellulaire hétérogène composée de cellules régénératives et hématopoïétiques. Deux méthodes s'affrontent pour parvenir à ce but, les méthodes de **digestion enzymatique** et les techniques **d'extraction mécanique**.

A) Extraction de la FVS par digestion enzymatique (*Cellular FVS*) :

La digestion enzymatique de TA pour l'obtention de FVS consiste en la mise en contact du tissu adipeux avec une enzyme capable de casser les liaisons inter-cellulaires et ainsi de désolidariser toutes les cellules du tissu conjonctif, y compris celles des microvaisseaux irrigant le TA. Suite à l'activité enzymatique, une centrifugation permet de séparer la FVS des adipocytes (Figure 15).

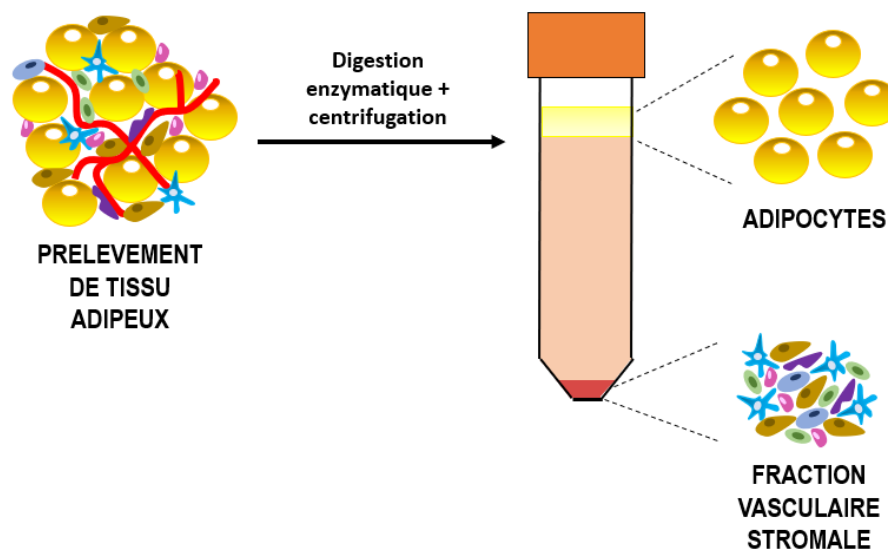


Figure 15 : Principe général de l'extraction par digestion enzymatique de FVS

Toutefois, si le concept général peut apparaître simple de réalisation, la composition de la FVS pouvant être influencée par le site de prélèvement, la méthode d'extraction et la variabilité inter-patient, chaque étape du protocole d'extraction doit être finement maîtrisée. Plus particulièrement, les étapes d'une digestion enzymatique de tissu adipeux, résumées dans la Figure 16, sont ici énumérées :

- Prélèvement de TA
- Lavage du TA
- Digestion enzymatique
- Lavages des cellules de la FVS
- Resuspension de la FVS et si nécessaire concentration ou dilution.

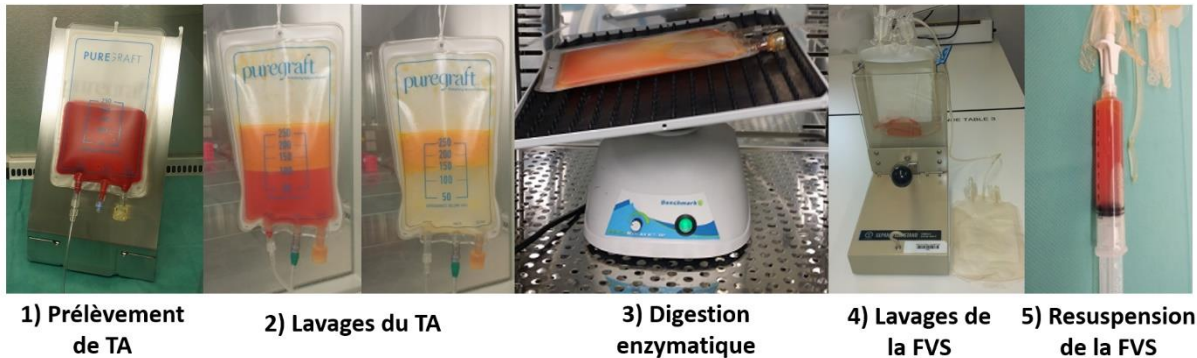


Figure 16 : Etapes principales d'une extraction de FVS par digestion enzymatique

Nous détaillons ci-après les différentes étapes.

1) Le prélèvement de TA :

C'est vers la fin du XIX^{ème} siècle que le TA commence à être utilisé en chirurgie esthétique et reconstructive comme outil de remodelage des formes par action directe sur la couche la plus profonde de la peau, l'hypoderme. L'usage du bistouri pour le prélèvement de TA est remplacé par celui de la canule aspirative permettant l'action chirurgicale via de minuscules incisions cutanées. En 1994, le chirurgien New-Yorkais, Sydney Coleman, formalise les étapes de prélèvement et de réinjection de TA pour limiter le traumatisme des cellules adipeuses.

Ainsi le prélèvement atraumatique de TA à visée de thérapie cellulaire est principalement effectué en utilisant une **canule de Coleman** (canule à bout mousse, de 3 millimètres de diamètre possédant deux orifices terminaux diamétralement opposés à l'extrémité distale de la canule) ou bien une **canule de Khouri** (canule multiperforée par douze trous de douze Gauges), bien que de nombreuses autres canules soient commercialisées (Figure 17).



Figure 17 : Photographie d'une canule de Khouri (à gauche) et d'une canule de Coleman (à droite)

Le prélèvement s'effectue dans les zones anatomiques les plus dotées en TA sous-cutané, classiquement les zones abdominales péri-ombilicales, les régions en regard des trochanters ainsi que la face interne des genoux et des flancs.

Cependant, il a été montré que les caractéristiques de la FVS, et notamment celles des ASC, varient en fonction de la provenance anatomique du TA ainsi que de la méthode de prélèvement⁵⁵. Martina Travnickova et ses collaborateurs publient en 2020 une étude comparative des ASC issues de TA de l'abdomen, de l'intérieur ou l'extérieur de la cuisse, prélevé en appliquant une pression négative nécessaire à l'aspiration graisseuse plus ou moins élevée⁵⁶. Parmi plusieurs résultats intéressants, les ASC issues de la cuisse sont en plus grand nombre après sept jours de culture que les ASC issues de TA abdominal, suggérant que les CS du TA de la cuisse auraient une capacité de prolifération plus élevée (Figure 18, extraite de l'article).

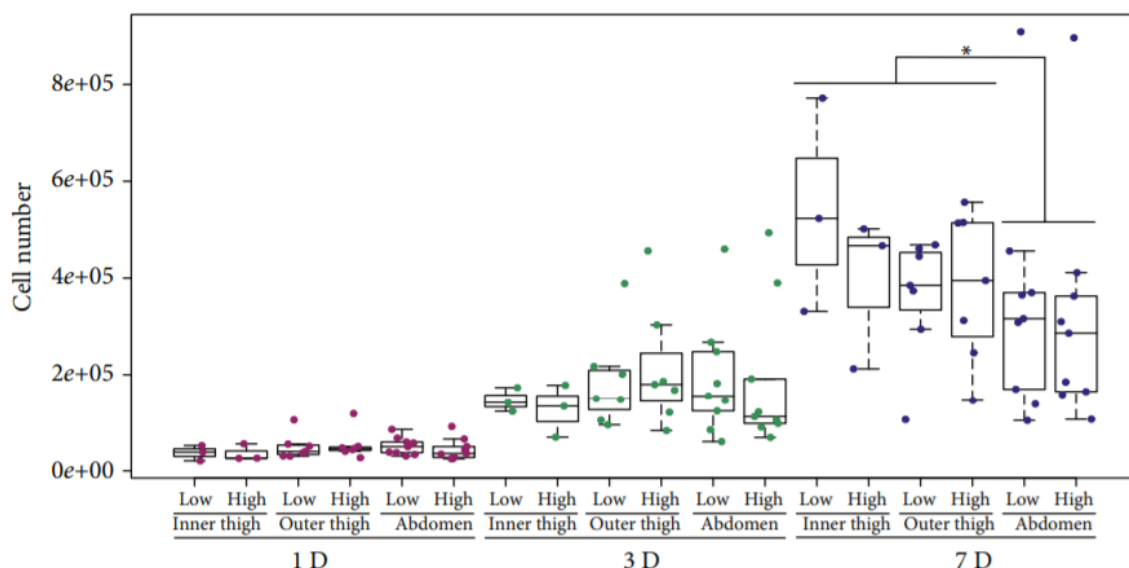


Figure 18 : Numération cellulaire après sept jours de culture des ASC à partir de différentes zones anatomiques.

The Influence of Negative Pressure and of the Harvesting Site on the Characteristics of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells from Lipoaspirates, Martina Travnickova et al

Dans le cas d'un MTI à finalité thérapeutique, le TA vise à être réinjecté ; un **contrôle maximal de la contamination bactérienne** doit être mis en œuvre. Ainsi des protocoles d'asepsie sont mis au point, celui de l'Hôpital de La conception est présenté ci-après. Des douches préopératoires la veille et le matin de l'intervention sont effectuées avec un agent antiseptique. De plus, une asepsie en quatre ou sept temps au bloc opératoire est accomplie au niveau du ou des sites de prélèvement :

- 1^{er} temps : application de Bétadine® scrub
- 2^{ème} temps : rinçage au sérum physiologique stérile
- 3^{ème} temps : temps de séchage
- 4^{ème} temps : application de Bétadine® alcoolique pour la désinfection en quatre temps ou de Bétadine® scrub pour la désinfection en sept temps
- 5^{ème} temps : rinçage au sérum physiologique stérile
- 6^{ème} temps : temps de séchage
- 7^{ème} temps : application de Bétadine® alcoolique

Une anesthésie générale permet d'éviter l'utilisation d'anesthésiques locaux, préjudiciables pour la viabilité des cellules⁵⁷. Par ailleurs, une infiltration des zones prélevées au sérum adrénaliné permet de vasoconstricter les plexus vasculaires sous-cutanés et de diminuer la contamination du prélèvement de TA, principalement due aux GR.

2) Le lavage du TA :

Préalablement à la digestion enzymatique, la grande majorité des protocoles réalise un lavage du tissu adipeux dans le but de **d'éliminer le liquide d'infiltration résultant de l'intervention de lipoaspiration ainsi que les globules rouges et d'autres débris.**

Dans ce contexte, il est intéressant de présenter le **dispositif médical Puregraft®** qui permet de manière simple et stérile de drainer les éléments non pertinents du prélèvement de TA (Figure 19). Il s'agit d'une poche de prélèvement pouvant être directement connectée à une canule ou au système d'aspiration au bloc opératoire et permettant ainsi une collecte de TA en système fermé. A l'intérieur de cette poche est cousu un double filtre dont la porosité ne supporte pas le passage d'un TA intègre. L'introduction dans la poche Puregraft® d'un liquide de lavage est permise par un pore dédié (« *washing* »), puis l'élimination du liquide de lavage

contenant les substances non souhaitées est opérée *via* le pore de drainage (« *drain* ») qui est relié à une poche déchet (« *waist* ») ou non.

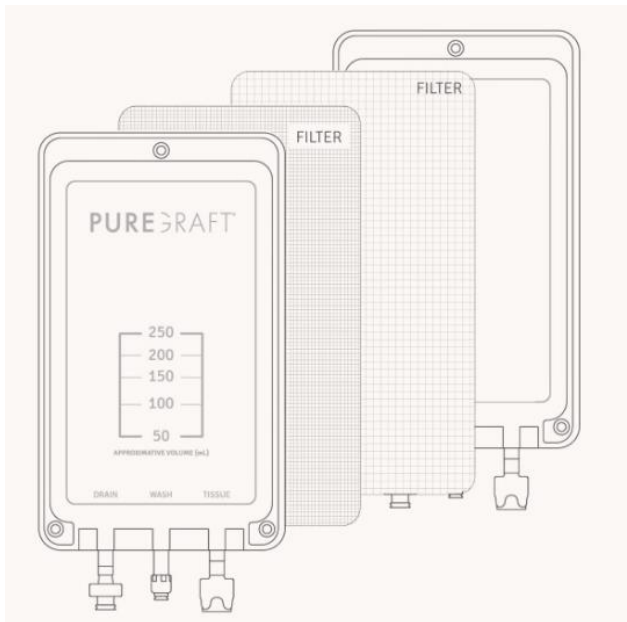


Figure 19 : Le dispositif Puregraft®
<https://puregraft.com/fr/>

La nature du fluide avec lequel le TA est lavé a son importance et ne saurait être choisi arbitrairement. En effet, la mise en contact des cellules avec un réactif peut d'une part affecter la viabilité cellulaire et d'autre part l'activité enzymatique. Par exemple, certaines enzymes, telle que la Collagénase, peuvent nécessiter la présence d'électrolytes pour un fonctionnement optimal (comme le Calcium). Dans ce cadre, souvent le **Ringer Lactate**®, contenant une grande quantité de Calcium, est choisi non seulement pour laver le TA mais aussi pour

le diluer avant la digestion enzymatique.

3) La digestion enzymatique :

L'étape de digestion enzymatique en elle-même soulève plusieurs paramètres importants pour la qualité de la FVS. En effet, comme le montre l'article présenté en partie 3 de ce manuscrit, la nature de l'enzyme, la concentration à laquelle elle est employée ainsi que le temps d'incubation peuvent faire varier la composition et la viabilité de la FVS.

De manière systématique, on peut noter que les enzymes utilisées pour les digestions de TA montrent toutes un fonctionnement optimal à 37°C, ainsi, cette étape du protocole est effectuée dans un incubateur ou un bain-marie. De même, pour garantir l'homogénéisation de l'activité enzymatique, une agitation constante est requise tout au long de ce stade.

Les enzymes utilisées sont des **Collagénases**, capables de désagréger des tissus. Elles sont purifiées généralement à partir de culture de *Clostridium histolyticum*, une bactérie produisant naturellement des enzymes. La Collagénase est une protéase ayant une spécificité pour la liaison entre un acide aminé neutre (X) et la glycine dans la séquence Pro-XGly-Pro (Pro étant la Proline), se retrouvant en haute fréquence dans le collagène. La Collagénase est unique parmi les protéases dans sa capacité à dégrader les fibrilles elliptiques de collagène natif

du tissu conjonctif. Pour la dissociation tissulaire sont utilisées des préparations dites « brutes » de Collagénase contenant d'autres enzymes en quantité moindre (peptidase, protéases, lipases etc...) permettant l'hydrolyse d'autres protéines de la Matrice Extra Cellulaire (MEC) des tissus.

La Collagénase brute présentant une variabilité inter-lot, son activité a donc été corrélée à son efficacité de dissociation des types de tissus spécifiques. Ainsi, Thermo Fisher Scientific et le groupe Gibco préconisent les collagénases de type I pour la dissociation des tissus épithéliaux, surrénaux, pulmonaires et adipeux. Les Collagénases de type II sont classiquement orientées à la digestion d'os, de cartilage, du foie ou encore du cœur. La culture de *Clostridium histolyticum* réalisée sans utilisation de composant animal amène à la production des Collagénases de type A et B, les enzymes secondaires présentes dans la préparation des Collagénases de type A se rapprochant des celles retrouvées dans les Collagénase de type I, et les B du type II. A part les Collagénases brutes, des Collagénases purifiées chromatographiquement sont également disponibles sur le marché et ne contiennent pas d'enzymes annexes. Dans la Figure 20 sont présentées les principales enzymes capables de digérer les tissus en fonction de leur capacité de dissociation.

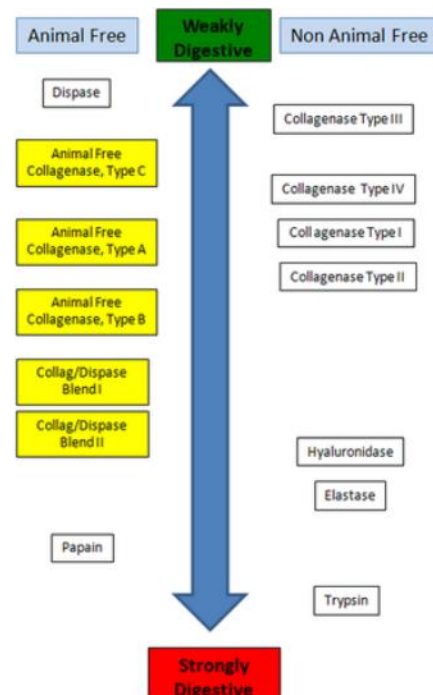


Figure 20 : Classification des enzymes destinées à la dissociation tissulaire

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/scr137?lang=fr®ion=FR>

Les Collagénases sont conditionnées en poudre lyophilisée et nécessitent donc une resuspension dans un milieu approprié.

4) Le lavage de la FVS :

Le lavage de la FVS engendre plusieurs effets sur celle-ci. Tout d'abord, l'inactivation de l'enzyme par dilution avec le liquide lavage de la FVS et retour à température ambiante qui contribue à freiner l'activité enzymatique. Par la suite, un cycle de centrifugation / remise en suspension du culot cellulaire, contenant la FVS, permet de laver la FVS. Ces lavages concourent à éliminer l'enzyme résiduelle de la substance thérapeutique finale et éliminer les éventuels débris. Nous verrons dans l'article présenté en partie 3 de ce manuscrit que la nature

du liquide de lavage ainsi que le nombre de lavages ont un impact majeur sur la qualité du produit fini.

5) Resuspension de la FVS :

La centrifugation ultime permet d'isoler la FVS. Celle-ci est remise en suspension, dans un volume adéquat, afin de procéder à un compte cellulaire qui permet de déterminer (1) le nombre de cellules nucléées totales extraites, (2) le pourcentage de viabilité et d'en déduire le **nombre de Cellules Nuclées Viables (CNV)**. Le nombre de CNV définira la dose thérapeutique.

La numération des cellules peut être effectuée par des compteurs cellulaires. Ces automates ont l'avantage d'être de petite taille, simple et rapide d'utilisation et ne demandent pas de traitement cellulaire considérable. Leur fonctionnement requiert l'usage de petits consommables sous forme de cassettes ainsi que des marqueurs de viabilité (comme par exemple des agents intercalants de l'ADN).

Une fois la numération du produit fini effectuée, la FVS peut être diluée ou concentrée afin d'atteindre une concentration en CNV particulière. La Concentration en CNV/mL et / ou la numération en CNV peuvent constituer des spécifications pharmaceutiques avec une valeur attendue et un seuil d'acceptation.

B) Extraction de la FVS par fragmentation mécanique (*tissue* FVS) :

La FVS peut également être obtenue grâce à des méthodes **uniquement mécanique**, n'utilisant pas d'enzyme. Le principe est de désolidariser les cellules du TA à l'aide d'agitation ou vibrations.

1) Agitation / Vibration :

Afin de désolidariser les cellules et rompre les liaisons cellulaires, le TA est lavé puis agité. L'étape de lavage du TA est très similaire à celle effectuée lors d'une digestion enzymatique de TA et souvent effectuée dans le même temps que l'agitation. Le détachement mécanique des cellules peut s'effectuer selon plusieurs techniques :

- Par utilisation d'un vortex ;

- Par agitation manuelle ;
- Par utilisation d'un agitateur/ vibreur mécanique ;
- Plus rarement grâce à des ondes sonores (sonication/cavitation).

Chaque temps d'agitation, qui peuvent être répétés, est clairement défini afin de permettre une reproductibilité du procédé.

2) Lyse des globules rouges :

Certains protocoles mécaniques incluent une étape de lyse des globules rouges par un réactif à base de chlorure d'ammonium.

3) Concentration de la FVS par centrifugation :

Finalement les cellules sont concentrées par centrifugation.

La « Nanofat », obtenue après lavage du TA, filtration et émulsion par passage successifs entre deux seringues Luer Lock, vise également à réduire la taille des lobules graisseux jusqu'à la taille théorique du nanomètre⁵⁸. Il a été démontré qu'après émulsion, aucun adipocyte viable n'est retrouvé dans la Nanofat alors que les cellules régénératives de la FVS restent intactes et en nombre suffisant^{58,59}. La Nanofat est utilisée pour son potentiel régénératif, malgré tout elle ne peut pas être utilisée à visée de comblement. Cette technique semble se rapprocher de l'extraction mécanique de TA et, à l'heure actuelle, il est parfois difficile de distinguer Nanofat de FVS mécanique⁶⁰⁻⁶².

C) *Cellular FVS vs tissue FVS* :

Si les techniques mécaniques paraissent plus simples de réalisation, il est important de distinguer les produits obtenus à l'issue de chacune des deux techniques, enzymatique ou mécanique, qui demeurent différents. Comme le spécifie van Dongen en 2018⁶³, si les procédures enzymatiques résultent en une réelle dissociation individuelle des cellules et une dégradation de la Matrice Extra Cellulaire (MEC), les procédures mécaniques conservent certaines liaisons cellulaires et donc une communication intercellulaire est préservée, assimilable à des mécanismes intra-tissulaires. C'est pourquoi on peut distinguer la « *tissue* » FVS (tFVS) résultant de fragmentation mécanique du TA, de la « *cellular* » FVS (cFVS) issue des protocoles enzymatiques (Figure 21). La présence de MEC au sein de la tSVF pourrait être

un atout dans le cadre d'utilisation nécessitant une matrice pour la migration ou l'adhésion des cellules, cependant, les techniques mécaniques sont soupçonnées de ne pas libérer toutes les cellules des niches péri vasculaires ce qui aboutirait à des produits moins concentrés en cellules régénératives⁶⁴.

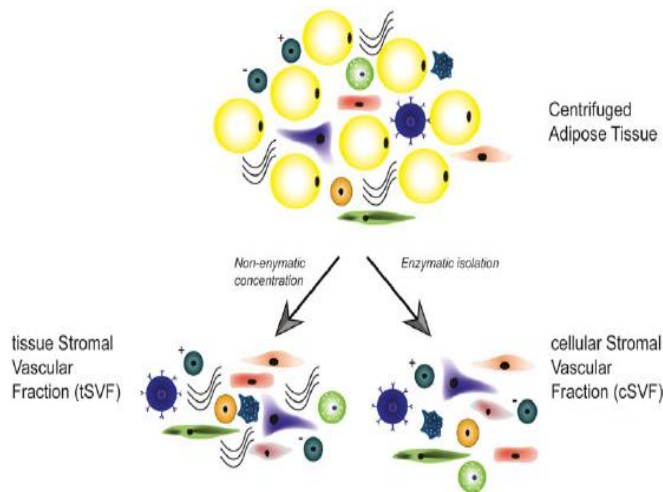


Figure 21: *Tissue FVS vs Cellular FVS*

Extrait de *Comparison of intraoperative procedures for isolation of clinical grade stromal vascular fraction for regenerative purposes : a systematic review*, Joris A. van Dongen et al

Plusieurs auteurs se sont attachés à comparer les protocoles enzymatiques et mécaniques^{63,65-69}, le tableau 2 présente les principaux avantages et inconvénients de chaque méthode.

Techniques enzymatiques	Techniques mécaniques
Suspension cellulaire hétérogène	Présence d'une matrice naturelle
Modification substantielle	Manipulation minimale au point de vue réglementaire
Meilleurs rendements en CNV	
Libération de toutes les cellules des niches péri-vasculaires	Concentration moindre en cellules régénératives, présence importante de cellules du sang périphérique
Plus long à mettre en œuvre	Rapide de mise en œuvre
Plus onéreux	Peu onéreux

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des méthodes manuelles et enzymatiques

II) Les Méthodes Manuelles :

A) Méthodes manuelles de digestion enzymatique :

Les méthodes d'extraction de la FVS, qu'elles soient enzymatiques ou mécaniques, peuvent être réalisées de manière manuelle, c'est-à-dire à l'aide de matériel de base de culture cellulaire sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Le flux d'air laminaire sous le PSM constitue un environnement microbiologique de classe A (le plus « propre ») et peut préserver la qualité microbiologique du produit. Les étapes présentées dans les principes généraux (*cf.* 2.I) sont réalisées successivement. Si la préparation nécessite d'être extraite du flux d'air laminaire, par exemple pour être placées dans un incubateur, celle-ci est enfermée dans un contenant ne permettant pas le passage de l'air extérieur et conservant la qualité microbiologique des cellules.

Dans le Tableau 3 sont présentées différentes méthodes manuelles de digestion enzymatique du TA documentées dans la littérature.

La plupart des prélèvements sont effectués grâce à une canule dont le résultat est un lipoaspirat. Les techniques de prélèvements peuvent différer (manuelle ou automatique)

Réf	Lavages du TA		Enzyme	Paramètres de digestion	Lavages de la FVS			Filtration	Autre	Viabilité	CNV/mL	CFU	Distribution des sous-populations cellulaires (cytométrie de flux)
	N	Milieu			N	Milieu	Centri						
70			Collagenase (resuspendue en KRB +1% SAB)	0,1% à 37°C pendant 45 min	Aucun, simple séparation des phases		5 min - 300g	Non		93,9%	400 000		
71			Collagenase	0,075% à 37°C pendant 30 min	Aucun, simple séparation des phases		10 min - 800g	100µm	Lyse des GR avant filtration		1 310 000		15-40% ASC ; 1-6% PE et CE ; 26-65% CD45+ ; 1-4% PR
72	3 ou 4	PBS	Collagenase type I (resuspendue en PBS + 1% SBF)	0,1% à 37°C pendant 60 min	Aucun, simple séparation des phases		5 min - 300 à 500g	Non		>50.0%	308 000	4%	
73			Collagenase IA					Non			584 000		
74		PBS	Collagenase	0,075% à 37°C pendant 30 min	Aucun, simple séparation des phases		5 min - 400g	100µm			100 000		
75			Collagenase (resuspendue en PBS)	0,15% à 37°C pendant 60 min		PBS	10 min - 190g	Non		>90.0%	160 000	11%	40% ASC ; 25% PE et CE ; 35% CD45+
76		PBS	Collagenase (resuspendue en PBS)	0,075 % à 37°C pendant 30 min			10 min - 800g	100µm		82,4%	701 000		

77			Collagenase type I	0,05% à 37°C pendant 60 min	Aucun, simple séparation des phases		10 min - 650g	Non	"Si nécessaire" lyse des GR 5 min puis centrifugation				19,9% CD45+ ; 13,9% PR
78	2 ou 3	PBS	Collagenase Type I (resuspendue en PBS +1% albumine +1% CaCl2)	0,1% à 37°C pendant 60 min	Aucun, simple séparation des phases		10 min - 1200 rpm	Non					
79		PBS	Collagenase type I (resuspendue en DMEM + 10 mM d'HEPES)	1mg/mL (0,1%) 37°C pendant 30 min		DMEM +10% SBF + 10 mM d'HEPES	10 min - 600g	Non	Lyse des GR puis lavage	65.0%	350 000		
			Trypsine (resuspendue en PBS + 0,2% EDTA)	12.5, 25 or 37.5 µg/mL pendant 30 ou 60 min						80.0%	80 000		
80	2	DPBS	Libérase (resuspendue en DPBS)	0,28U/mL à 37° pendant 45 min	2 lavages après séparation des phases	5% SAH puis DPBS	5 min - 400g	100µm puis 40µm		85,1%	180 890		
65			Collagenase							80-90%	230 000		60% ASC ; 32% CD45+
81			Collagenase	0,2% à 37°C pendant 90 min						74,5%	368 000		

82	3 ou 4	RL	Collagenase (NB4 resuspendue avec RL)	à 37°C pendant 60 min	2 lavages après séparation des phases		20 min - 400g	100µm		96,0%	205 000	0,40%	20% ASC ; 34% PE et CE ; 1,90% PR
83		PBS	Collagenase (NB4, resuspendue en αMEM)	0,4IU/mL à 37°C pendant 45 min	Aucun, simple séparation des phases	αMEM 10% SBF	10 min - 491g	100µm		90,8%			
84	5	PBS	Collagénase (resuspendue en DMEM)	2mg/mL (0,2%) à 37°C pendant 45 min		DMEM +10% SBF + 100U/mL de penicilline +100µg/mL streptomycine.					260 000		10% ASC
21		PBS + 5µg/mL d'amphotéri cine B + 100U/mL de penicilline +100µg/mL streptomyci ne	Collagenase Type I	0,075% à 37°C pendant 30 min	2 lavages après séparation des phases	DMEM / Ham's F12 +10% SBF +5µg/mL d'amphotéricin e B + 100µg/mL de penicilline +100µg/mL streptomycine.	5 min - 170g	100µm				0.9% - 2.4%	
85	3	RL	Collagénase (NB6 + RL)	0,1U/mL à 37°C pendant 45 min		DMEM + GlutaMAX + 10% SBF	5 min - 300g à 20°C	70µm	Lyse des GR 20 min	75,8%	795000	3,0%	

86			Collagenase Type II (resuspendue en DMEM)	1 mg/mL (0,1%) à 37°C pendant 45 min		PBS + 2% SBF		100µm puis 70µm	Lyse des GR pendant 15 min puis nouveau lavage en PBS+ 2% SBF puis filtration 40µm		69 000		
87	3	RL	Collagenase	0,15U/mL à 37°C pendant 60 à 70 min (Plasmatherm)		RL + 10% de sérum albumine humaine + 10% anti-coagulant ACD-A + 2U/mL d'héparine		10 min - 400g à 4°C		82,2%	185400		
88			Collagenase Type I (resuspendue en HBSS)	0,2% à 37°C pendant 60 min ou plus	1 lavage après séparation des phases	MEM + 10% SBF		5 min - 650g	70µm	Lyse des GR puis lavage			

Tableau 3 : Méthodes manuelles d'extraction de la FVS par digestion enzymatique. Ce tableau présente les différents paramètres du protocole de digestion enzymatique de la graisse pour 21 études. Les cases grisées représentent les informations manquantes. Réf : Référence. N : Nombre. Centri : Centrifugation. KRB : Krebs Ringer Buffer. SAB : Sérum Albumine Bovine. GR : Globules Rouges. PBS : *Phosphate-buffered Saline*. SBF : Sérum Bovin Fœtal. CaCl₂ : Chlorure de Calcium. DMEM : *Dulbecco's Modified Eagles Medium*. HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique. EDTA : Éthylènediaminetétraacétique. DPBS : *Dulbecco's Phosphate-buffered Saline*. αMEM: *Minimum Essential Medium*. Ham's F12: *F12 Nutrient Medium*. HBSS: *Hank's balanced Salt Solution*. GlutaMAX. ACD-A : Acid-Citrate-Dextrose.

Les lavages du TA sont peu documentés, neuf études n'explicitent pas la méthode exacte de lavage. Neuf études rapportent laver le TA avec du PBS (dont une avec du PBS enrichi en antibiotiques), trois avec du RL. Le nombre de lavages effectués n'est que très rarement cité, cela peut aller de deux à cinq fois et varier en fonction du prélèvement, c'est-à-dire qu'une souplesse est laissée au manipulateur en fonction de l'aspect visuel du tissu.

Concernant l'étape de digestion enzymatique, la grande majorité des protocoles utilise la Collagénase (20 / 22) mais le type n'est pas spécifié. Lorsqu'il est précisé, en général il s'agit de Collagénase de type I, un article rapporte l'utilisation de Collagénase de type II. Le milieu de resuspension de la Collagénase est relativement consensuel, il est soit composé uniquement d'une base de milieu de culture (PBS, HBSS, DMEM...), soit également enrichi en protéines (albumine, SAB, SBF), en anticoagulant (EDTA), calcium ou tamponné avec de l'HEPES. La concentration à laquelle est utilisée l'enzyme varie de 0.05% à 0.2%. Si la concentration est classiquement exprimée en pourcentage, quelques études la traduisent en mg/mL ou en U/mL. La digestion enzymatique peut durer entre trente et quatre-vingt-dix minutes.

Nombre d'études n'effectuent pas de réels lavages des cellules après digestion mais se contentent de neutraliser l'enzyme et de séparer les phases à l'aide d'une seule centrifugation. Le milieu est généralement une base de milieu de culture (PBS, RL, DMEM...) associée à une macromolécule (albumine, SBF), dont l'effet protecteur des cellules est primordial, parfois supplémenté en antibiotiques. Les centrifugations durent cinq ou dix minutes avec une force centrifuge relative (ou force g) variant de 170g à 800g.

Dix études filtrent la suspension cellulaire après digestion grâce à un filtre de porosité de 100 µm (ou plus rarement 70 µm voire 40 µm). Deux études procèdent à deux filtrations successives.

Quelques études lysent les globules rouges avant d'effectuer un nouveau lavage.

Concernant la caractérisation de la FVS finale obtenue, la viabilité est régulièrement évaluée et sa moyenne au sein des études présentées atteint 78.8% +/- 0.095%. Le nombre de CNV/mL est extrêmement variable avec un minimum de 69 000 CNV/mL et un maximum de 1 310 000 CNV /mL. Le test de CFU-F, évaluant la capacité clonogénique des CSM de la FVS, n'est qu'exceptionnellement opéré sur le produit fini et donne des résultats de 0.9% à 11% de cellules progénitrices. La distribution des sous-populations cellulaires composant la FVS, évaluée par cytométrie de flux, est bien souvent incomplète.

La mise en perspective de ces quelques études démontre une absence de standardisation et de rigueur. Des paramètres essentiels pour la qualité du produit fini ne sont pas documentés ou non définis. La viabilité et le rendement en CNV, théoriquement reflète de la qualité de production, sont délicats à comparer du fait des lacunes ou variabilités méthodologiques. La caractérisation des cellules en elle-même est rarement suffisante. De plus, bien que non détaillées dans le tableau 3, les méthodes d'évaluation du produit fini diffèrent elles-aussi. Par exemple le protocole des CFU-F n'est pas le même et les marqueurs identifiés en cytométrie de flux non plus. Un biais considérable existe dans le compte du rendement puisque certaines études n'explicitent pas s'il s'agit de volume de TA prélevé, déplété en liquide d'infiltration, lavé ou bien le volume de resuspension de la substance active.

B) Méthodes manuelles de fragmentation mécanique :

Le tableau 4 présente différentes méthodes manuelles de fragmentation mécanique du TA documentées dans la littérature.

Les protocoles de fragmentation manuelle mécanique sont constitués d'une à trois étapes. Généralement, une agitation est effectuée dans un premier temps, celle-ci peut s'effectuer par vortex, par agitation manuelle ou par vibration à l'aide d'un agitateur mécanique et parfois répétée deux fois. Une étude rajoute du PBS lors de cette étape d'agitation ce qui contribue à laver le TA. Si les autres techniques réalisent également des lavages, cela n'est pas explicité dans le matériel et méthode.

Dans cinq études, les GR sont ensuite lysés. La lyse s'opère à 37°C ou à température ambiante pendant quinze minutes.

Finalement une étape de centrifugation est réalisée, la durée varie de six à quinze minutes et la force centrifuge relative de 600g à 1280g. Markarian et son équipe exécutent deux centrifugations successives⁷⁹.

Un protocole original se distingue : Amirkhani soumet le TA à un processus de sonication / cavitation avant d'effectuer les étapes « classiques » d'une fragmentation mécanique⁸⁴.

Réf	Agitation du TA	Lyse des Globules Rouges	Centrifugation	Viabilité	CNV/mL	CFU	Distribution des sous-populations cellulaires (cytométrie de flux)
89	Vortex 2 fois, pendant 3 min	Non	Oui				
73	Agitation	15 min à 37°C	15 min - 900g		240 000	5%	
78	Agitation manuelle 2 fois, pendant 1 à 2 min avec PBS	Non	5 min - 1200 rpm				
79		15 min	10 min - 600g	65.0%	25 000		
		15 min	1) 15 min - 800g 2) 10 min - 600g	70.0%	10 000		
		15 min	1) 15 min - 1280g 2) 10 min - 600g	75.0%	15 000		
90	6 min - 6000 vpm		6 min - 1600 rpm		125 000	5%	
65	Non		Haute vitesse	80 - 90%	23 000		6-13 % ASC ; 70-85% CD45+
	Vortex 3 min		Oui	80 - 90%	11 500		
84	10 s dans un blender puis 2 min sous sonication/cavitation suivie d'une centrifugation 10 min - 900g et lyse des GR 5 min avant nouvelle centrifugation 5 min - 400g						

Tableau 4: Méthodes manuelles d'extraction de la FVS par fragmentation mécanique. Ce tableau présente les différents paramètres du protocole de fragmentation mécanique de la TA pour sept études. Les cases grisées représentent les informations manquantes. Réf : Référence.

Concernant la caractérisation du produit fini, la moyenne de viabilité est de 76% +/- 0.09%. Le rendement en CNV est en moyenne plus faible qu'avec une digestion enzymatique : 64 214 CNV/mL +/- 87 532 CNV/mL et démontrant une grande variabilité avec un minimum de 10 000 CNV/mL et un maximum de 240 000 CNV/mL. Les rendements semblent bien moindres après fragmentation mécanique, comparés à une digestion enzymatique. Le test des CFU-F ainsi que l'évaluation de la distribution des sous-populations de cellules par cytométrie de flux ne sont que rarement effectués.

III) Les Automates :

La « simplicité » d'extraction de la FVS a rendu l'automatisation de cette technique possible très tôt dans le développement de cette thérapie innovante. Depuis plusieurs années, un certain nombre d'automates sont disponibles sur le marché et se targuent de produire une FVS de grade thérapeutique en système fermé, c'est-à-dire sans intrusion de l'environnement extérieur et donc de potentielles contaminations. Les automates offrent une reproductibilité indéniable avec l'idée alléchante d'obtenir un produit de haute qualité *at the point of care*, directement au bloc opératoire, simplifiant la chaîne thérapeutique.

Il nous appartient de classer les automates en trois catégories distinctes : ceux permettant une extraction de la FVS par méthode enzymatique, ceux aboutissant à une FVS grâce à une technique mécanique et finalement les automates désignés pour ne réaliser qu'une seule étape du protocole d'extraction et impliquant ainsi l'intervention d'un technicien.

A) L'automatisation de la digestion enzymatique :

Les automates permettant la digestion enzymatique de TA réalisent le lavage du TA, la digestion enzymatique ainsi que le lavage et la concentration des cellules. Les principaux dispositifs ainsi que les études publiées dans lesquels ils ont été utilisés sont répertoriés dans le Tableau 5.

Dispositif	Coût	Normes Légales	Temps de process	Volume de TA	Lavages du TA	Enzyme	Digestion	Lavages FVS	Réf	Viab	CNV/mL	CFU (%)	Distribution des sous-populations cellulaires (cytométrie de flux)
Celution® et Celution® 800CRS de Lorem Vascular www.loremvascular.com	100 000 \$ - 2400 \$	CE	120 min	100 – 350 mL	A l'appréciation de l'automate, entre 2 et 5 lavages en RL	Celase®	20 min	RL	91	93%	240 000	16.0	
									92	87,7%	360 000	1.0	
									93			2,4	
									94	>88.0%		3.7	36% ASC ; 9.8% PE et CE ; 49.1% leucocytes
Icellator® et Icellator® X de Tissuegenesis https://www.tissuegenesis.com/icellator-x/		FDA - ISO 13485	60 min	30-100 mL		Adipase®			76	80,7%	702 000		
									95				28,5% ASC ; 5,9% PE et CE ; 66% CD45+ ; 4,9% PR
GID SVF®1 et GID SVF®2 de GID Group, Inc. http://www.thegidgroup.com/	1000 \$	CE	60-70 min	Max 350 mL	3 en RL	GIDzyme-2®	200 mL du-collagen digestive units-/mL pendant 40 min à 37°C	Aucun, simple séparation des phases, 10 min - 800g en milieu 2,5% de SAH	85	81,47%	425 000	2,7	
									96	83%	719 000		

Q-graft® de Human Med www.humanmed.com			60 min	Max 75 mL	Pas de lavage dans le Q-graft mais normalement réalisé par le Bodyjet®	Avec ou sans Humanase®	45 min à 38°C	RL	97		2 720 000		
HuriCell® de Hurim BioCell, Co., Ltd. http://www.hurimbiocell.com/		ISO 13485 - KFDA	75 min	30 - 200 mL									
Unistation® + Unikit® de NeoGenesis Co., Ltd. http://eng.neogenesis.co.kr/			120 min	Max 800 mL		Collagénase	0,1% pendant 30 min à 37°C	Aucun, simple séparation des phases avec 30mL de NaCl et 5 mL de PPP du patient					
Stempeutron® de Stempeutics Research Pvt. Ltd. http://www.stempeutics.com/stempeutron.html								Séparation de la FVS par filtration	82				

Tableau 5 : Automates permettant l'obtention d'une FVS par digestion enzymatique. Ce tableau présente les différents automates existants pour produire une FVS de façon enzymatique. Les cases grisées représentent les informations manquantes Le coût représente l'achat de l'automate +/- le coût de revient des consommables à usage unique. Les normes légales peuvent conduire à une autorisation d'une agence de santé, l'agrément à une norme particulière ou encore un marquage CE et sont affichées par le fournisseur. Le temps de process est le temps de manipulation depuis l'injection du TA dans l'automate jusqu'à l'obtention des cellules. Le volume de TA est la gamme possiblement techniquable par l'automate. Lorsque les paramètres exacts du protocole automatisé sont connus, ceux-ci sont répertoriés dans les colonnes, volume de TA, lavages du TA, enzyme, digestion et lavages FVS. Finalement si les automates ont été utilisés dans le cadre d'études publiées elles sont citées dans la colonne Réf (Référence) et si une caractérisation des cellules a été réalisée, elle est aussi détaillée. Par commodités, les références incluses concernant le Celution® ne sont pas incluses puisqu'il a été utilisé dans de très nombreuses études⁹⁸⁻¹⁰⁴.

Sept automates sont présentés dans le Tableau 5 et la figure 22 : le Celution[®], l'Icellator[®], le GID SVF[®], le Qgraft[®], le Huricell[®], l'Unistation[®], le Stempeutron[®] et le Multistation[®]. Certains de ces automates ont été améliorés et possèdent donc une version plus élaborée (GID SVF[®]1 a évolué en GID SVF[®]2 par exemple).

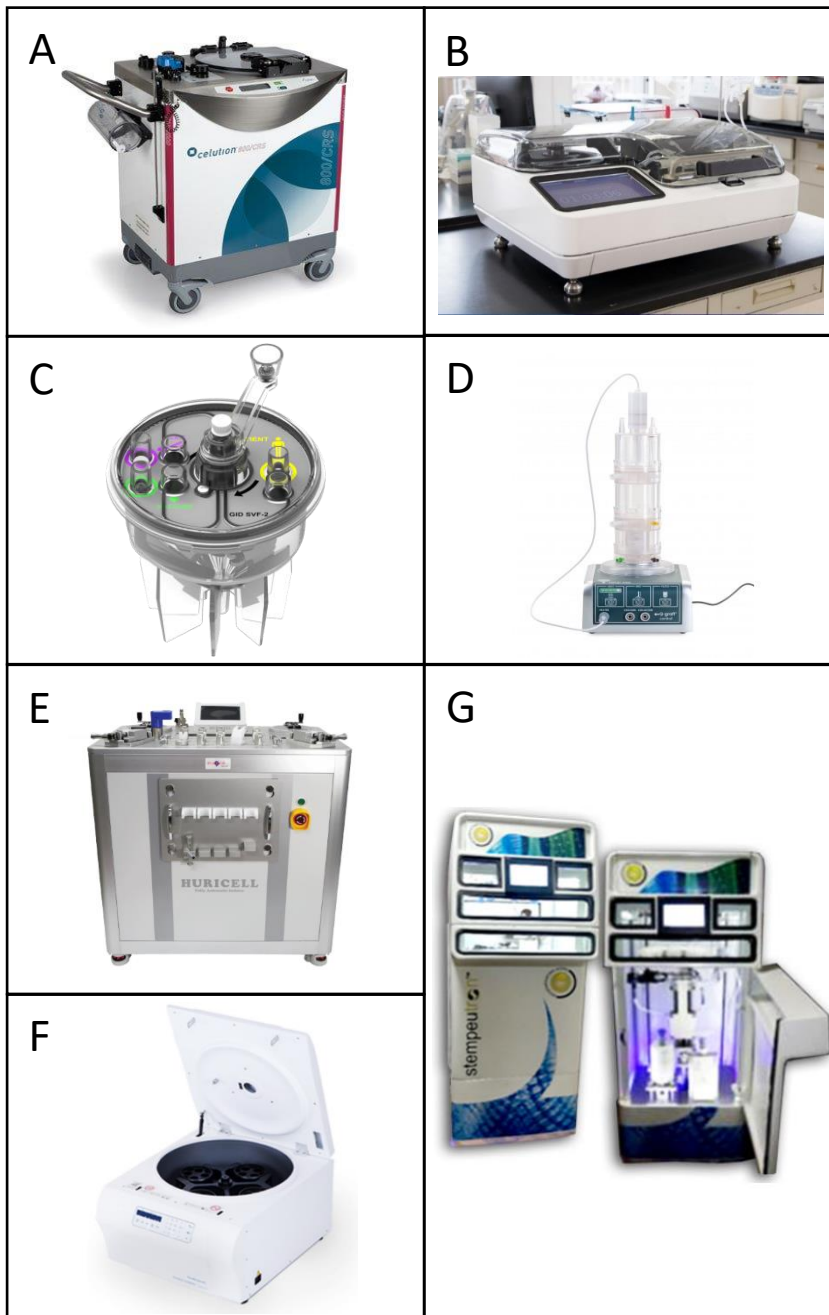


Figure 22: Automates de digestion enzymatique.

- A: Celution[®]
- B: Icellator[®]
- C: GID SVF[®]
- D : Q-graft[®]
- E : Huricell[®]
- F: Unistation[®]
- G: Stempeutron[®]

Le coût de ces automates comprend à la fois le prix du dispositif en lui-même et celui des consommables à usage unique. En effet, chaque production requiert l'utilisation d'un kit stérile. Certaines entreprises, comme NeoGenesis, commercialisent le kit comme un élément à

part entière (Unikit®) alors que d'autres sous-entendent la nécessité de tels matériels. Le coût de revient d'une telle production peut être considéré comme relativement élevé.

Comme mentionné précédemment, un grand nombre d'automates a vu le jour sur le marché concomitamment à l'enthousiasme grandissant apporté à la FVS. Certains ont reçu l'approbation de la *Food and Drug Administration* (FDA) ou celui de la KFDA (*Korea FDA*), d'autres affichent un marquage CE (Communauté Européenne) ou une certification selon la norme ISO 13485 applicables aux dispositifs médicaux.

La production prend entre une et deux heures et le volume de TA initial peut être compris entre 30 et 850 mL en fonction de l'appareil. Cette donnée paraît importante puisque le prélèvement de TA peut être limité selon l'IMC du patient, ou au contraire, si le nombre de cellules à produire nécessite un grand volume de TA, le temps de production doit être doublé si l'automate ne peut pas traiter autant.

Les paramètres et la nature des milieux utilisés ne sont pas toujours détaillés, le RL est souvent utilisé comme milieu de lavage du TA. Les enzymes employées peuvent être un mélange particulier breveté par le fournisseur comme la Celase® pour le Celution®, l'Adipase® pour l'Icellator®, la GIDzyme® pour le GID SVF®, l'Humanase® pour le Qgraft®, ou bien une Collagenase non spécifique. L'isolement des cellules est effectué par centrifugation, excepté pour le Stempeutron® qui les sépare uniquement par filtration.

B) L'automatisation de la fragmentation mécanique :

Les automates permettant la production d'une FVS via fragmentation mécanique sont présentés dans le tableau 6 et la figure 23.

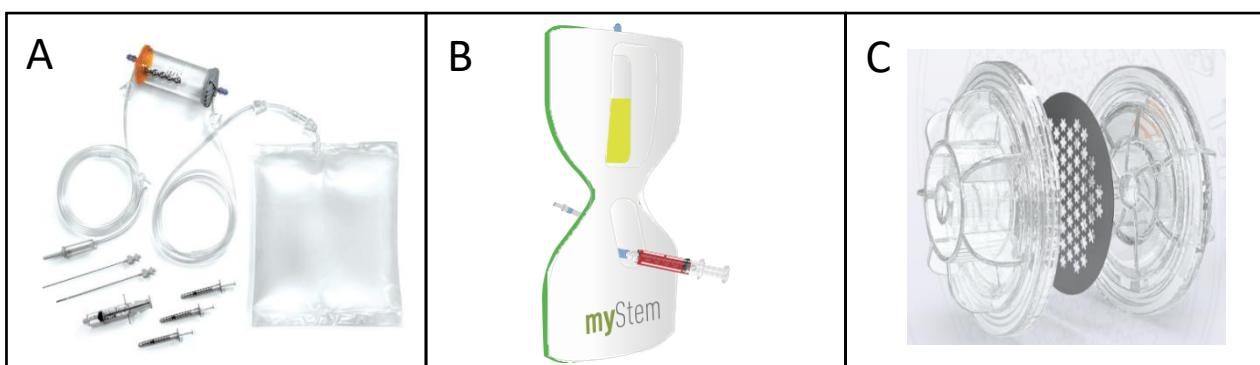


Figure 23 : Automates de fragmentation mécanique du tissu adipeux

- A: Lipogems®
- B: MyStem®
- C: Mycrolyzer®

Dispositif	Coût	Normes	Temps de process	Volume de TA	Mécanisme d'action	Réf	Viabilité	CNV/mL	CFU	Distribution des sous-populations cellulaires (cytométrie de flux)
Lipogems® de Lipogems International S.p.A. http://www.lipogems.eu/			20 min	40 - 130 mL	Réduction progressive de la taille des clusters par passage dans un premier filtre, puis, émulsion grâce à des billes en acier inoxydable et lavage avec du sérum physiologique par agitation manuelle du dispositif, passage dans un deuxième filtre avec drainage de l'huile et les résidus sanguins.	77	100%			9,7% CD45+; 23,2% PR
MyStem® de MyStem LLC https://mystem.eu/arg/			15 min		Séparation du TA et de la partie fluïdique via une poche avec filtre intégré et lavage avec sérum physiologique puis centrifugation.	105				
Microlyzer® de T-Lab https://tlabeurope.com/			30 min		Après une première centrifugation, passage dans 3 filtres de porosité décroissante permettant de réduire la taille des clusters précédant une dernière centrifugation					

Tableau 6 : Automates de fragmentation mécanique du TA. Ce tableau présente les différents automates existants pour produire une FVS de façon mécanique. Les cases grisées représentent les informations manquantes. Le temps de process est le temps de manipulation depuis l'injection du TA dans l'automate jusqu'à l'obtention des cellules. Le volume de TA est le volume possiblement techniqué en une fois grâce à l'automate. Finalement si les automates ont été utilisés dans le cadre d'études publiées elles sont citées dans la colonne Réf (Référence) et si une caractérisation des cellules a été réalisée, elle est aussi détaillée

Les automates mécaniques ont, comme les méthodes manuelles, une rapidité d'exécution comparés aux techniques mécaniques.

Le volume de TA pouvant être traité n'est indiqué que pour un appareil, il est moindre que pour tous les automates enzymatiques.

Concernant le mécanisme d'action, il diffère sensiblement des méthodes mécaniques manuelles puisque celles-ci sont majoritairement basées sur une agitation alors que les trois automates présentés font appel à une séparation des cellules grâce à des filtres permettant de casser les liaisons cellulaires.

C) Les appareils semi-automatiques :

Certains appareils permettent de ne réaliser qu'une seule étape de la production de FVS, ils sont présentés dans le Tableau 7 et la Figure 24.



Figure 24 : Automates permettant de réaliser une des étapes de la production FVS

A: Lipokit®

B: CHA-Station®

C: Sepax®

Deux des trois automates présentés (CHA-station® et Sepax®) ne sont pas dédiés uniquement à la production de la FVS mais peuvent aussi servir dans le cadre de préparation de Plasma Riche en Plaquettes (PRP) ou CSH. Ils sont utiles au lavage du tissu adipeux (Lipokit®) ou au lavage des cellules (CHA-Station® et Sepax®) et à la séparation des cellules. Leur fonctionnement est basé principalement sur une centrifugation intégrée. Le Lipokit® est également constitué de seringues spécifiques permettant la séparation des cellules adipocytaires de manière aisée.

Dispositif	Coût	Temps de Process	Volume de TA	Etapes permises	Réf	Viabilité	CNV/mL	CFU	Distribution des sous-populations cellulaires (cytométrie de flux)
Lipokit® et Lipokit II® de Medi-Khan http://www.medikanint.com/	530\$	110 min	Max 100 mL	Séparation des phases (huile/ adipocytes / portion fluide) grâce au piston-filtre et une centrifugation 3min - 1200 à 2000 g	106				41,7% ASC
					91	72%	35 000	1,70%	
					107				
					93			2,8%	
CHA Station® de PNC International Co., Ltd. https://pncint.en.ec21.com/	710\$	90 min	Max 180 mL	Séparation des cellules (après digestion)	91	87%	5 000	7,8%	
Sepax® de Biosafe Group SA https://www.biosafe.ch	420\$	90 min	Max 300 mL	Lavage des cellules après digestion préalable non comprise	75	>90%	260 000	14%	40% ASC ; 25% PE et CE ; 35% CD45+

Tableau 7 : Automates permettant de réaliser une des étapes de la production de FVS. Les cases grisées représentent les informations manquantes. Le volume de TA est le volume possiblement technique en une fois grâce à l'automate. Les étapes permises par les automates sont explicitées. Finalement si les automates ont été utilisés dans le cadre d'études publiées, qu'elles soient fondamentales, précliniques ou cliniques, elles sont citées dans la colonne Réf (Référence) et si une caractérisation des cellules a été réalisée, elle est aussi détaillée

IV) Limites actuelles :

Parmi cet éventail de protocoles et d'automates pour produire la FVS, comment choisir « la » meilleure méthode ? Sur quel(s) paramètre(s) se baser pour comparer ?

La viabilité ? Celle-ci est rarement déterminée de la même manière entre les études, parfois ce sont des compteurs cellulaires automatiques qui sont employés, parfois le compte est réalisé visuellement grâce à une coloration.

Le rendement en CNV ? Malheureusement peu d'études pensent à expliciter leur manière de le calculer, on ne peut pas se permettre de comparer un rendement calculé en référence au volume total de lipoaspirat prélevé, comprenant les liquides d'infiltrations et les impuretés, à un volume de TA lavé.

Plus qu'à un nombre de cellules, ne faudrait-il pas s'intéresser à l'efficacité du produit fini. Le test de clonogénicité des CFU-F n'est que très rarement exécuté et n'est représentatif que d'un seul contingent de cellules. Plusieurs études valident la capacité de différenciation des CSM en adipocytes, chondrocytes et ostéocytes, mais celles-ci aboutissent toutes à une confirmation de la multipotence des cellules extraites, donc cela ne permet pas non plus d'offrir un moyen de discrimination.

Qu'en est-il de la composition du produit thérapeutique ? L'hypothèse qu'une forte teneur en cellules régénératives puisse garantir l'efficacité clinique, certes simpliste, est commode à aborder, toutefois peu d'études caractérisent exactement la composition de la FVS. Pourtant, on n'imaginerait pas mettre sur le marché un médicament standard sans en connaître l'exacte teneur en substance active, excipients et impuretés. La FVS est dans la très grande majorité des cas utilisée en condition autologue et s'affranchit d'une dangerosité inhérente au médicament classique. Malgré tout, une FVS produite par technique enzymatique est susceptible de contenir une quantité résiduelle de collagénase. Celle-ci n'est dosée que dans un nombre très restreint d'expérimentation¹⁰⁸.

D'un point de vue pratique, il paraît plus accommodant d'utiliser un automate reproductible qui ne nécessite pas l'intervention de ressource humaine. En Europe, il est autorisé de faire appel à des systèmes fermés pour produire des MTI. D'ailleurs la plupart des systèmes précédemment cités se prévalent d'être des systèmes fermés. A mieux y regarder, on s'aperçoit que ce n'est pas toujours vrais. Par exemple, le Celution[®] subit deux infractions de

l'environnement extérieur : l'injection de la Celase® dans le système et la récupération ultime des cellules. Si la réglementation est strictement respectée, il faudrait placer l'appareil sous un flux d'air laminaire.

Effectivement, la réglementation stipule qu'un système fermé peut être utilisé en classe D avec des contrôles environnementaux supplémentaires. Il est mentionné qu'en cas de circonstances exceptionnelles, la production peut même être réalisée directement au bloc opératoire, cette flexibilité ouvre la porte à un futur traitement *at-the-point-of-care*, sous réserve d'automates le permettant réellement. En revanche, lorsque le système est ouvert ou semi-ouvert, la seule possibilité est la production dans une Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC).

Les productions automatisées représentent, par ailleurs, un coût non négligeable qui a été exposé, en partie, précédemment. À cela il faut rajouter de nombreux pôles de dépenses : la maintenance de l'automate et de l'environnement de travail, le personnel, les contrôles qualités...

Dans le but de comprendre l'influence de chaque étape du procédé, ainsi que de se conformer à la réglementation applicable, en respectant un coût maîtrisé, un protocole manuel d'extraction de la FVS a été développé. Il est présenté sous forme d'article soumis dans la partie 3 de ce manuscrit.

Partie 3 : Développement, standardisation et validation d'un procédé manuel d'extraction de la FVS, conforme aux BPF

L'article présenté ici a été soumis à la revue Cells en août 2020.

Type of paper: article

Development and validation of a fully GMP-compliant process for manufacturing stromal vascular fraction: a cost effective alternative to automated methods

Pauline François^{1,2}, Laurent Giraud¹, Julie Veran¹, Baptiste Bertrand³, Chloé Dumoulin¹, Houssein Aboudou¹, Fanny Grimaud¹, Marie Vogtensperger⁴, Mélanie Velier^{2,5}, Laurent Arnaud⁵, Luc Lyonnet⁵, Stéphanie Simoncini², Benjamin Guillet^{2,6}, Françoise Dignat-George^{2,5}, Jeremy Magalon^{1,2,*}, Florence Sabatier^{1,2}

¹ Cell Therapy Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, INSERM CIC BT 1409, Marseille, France

² Aix Marseille Univ, INSERM, INRAE, C2VN, Marseille, France

³ Plastic Surgery Department, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France

⁴ French Military Blood Institute, Clamart, France

⁵ Laboratory of Hematology and Vascular Biology, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France

⁶ CERIMED, Aix Marseille Univ, AP-HM, Marseille, France

* Correspondence : jeremy.magalon@ap-hm.fr; Tel.: +33 4 91 38 14 86

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: The therapeutic use of adipose-derived stromal vascular fraction (SVF), is expanding in multiple pathologies. Various processes have been proposed for manufacturing SVF but they must be revisited based on advanced therapy medicinal product (ATMP) regulations. We report here the development and validation of a fully good manufacturing practices (GMP)-compliant protocol for isolation of SVF. Adipose tissue was collected from healthy volunteers undergoing lipoaspiration. The optimal conditions of collagenase digestion and washing were determined based on measurements of SVF cell viability, yield recovery, and cell subset distribution. Comparability of the SVF obtained using the newly developed manufacturing process (n = 6) and the Celution-based automated method (n = 33), used as a reference, was established using inter-donor analyses. Characteristics of SVF (n = 5) generated using both manufacturing protocols were analyzed for an intra-donor comparison. In addition, these comparisons also included determination of colony-forming unit fibroblast frequency, *in vitro* angiogenic activity, and *in vivo* regenerative effects in a mouse ischemic cutaneous wound model. We successfully developed a process for generation of SVF presenting higher cell viability and yield recovery compared to the Celution device-based protocol. Characteristics of the SVF including phenotype and capacity for angiogenesis, and wound healing promotion, attested to the comparability of the two manufacturing processes. We validated an optimized non-automated process which should allow for a GMP-compliant, more affordable, and reduced-cost strategy to exploit the potential of SVF-based regenerative therapies.

Keywords: stromal vascular fraction; GMP-compliant manufacturing ; cell therapy; wound healing

1. Introduction

Adipose tissue (AT) has long been known for its filling ability, and autologous fat transfer, also called lipofilling, is performed daily to correct soft tissue defects[1,2]. AT is also a major source of multipotent mesenchymal stem/stromal cells (MSCs)[3,4]. These adipose-derived stem/stromal cells (ASCs) are not only used for fat engraftment but are also considered a promising product in the field of cell-based therapies. ASCs can differentiate into various cell types (e.g., smooth muscle cells[5], chondrogenic cells[6], endothelial cells[7,8], adipocytes[9]) and display significant paracrine activity, through the secretion of a large panel of cytokines, chemokines, and growth factors responsible for regenerative and immunomodulatory effects[10–13]. However, the therapeutic use of ASCs requires an *ex vivo* expansion step that takes several weeks[14]. This limitation can be circumvented by using the stromal vascular fraction (SVF), a heterogeneous cell population containing 15–30% ASCs[15] obtained from enzymatic digestion of AT. In addition to ASCs, SVF is composed of endothelial progenitor cells, pericytes, and hematopoietic cells[15]. These different cell subsets recapitulate the composition of AT microvasculature and have been shown to synergistically exert angiogenic, immunomodulatory, and anti-fibrosis effects that could be of interest in several pathologies[16–18] and are now the subject of a large number of clinical studies[19]. Thus, for example, SVF may participate in the treatment of inflammation, fibrosis, and vasculopathy in systemic sclerosis[20,21]. Studies have also used SVF in musculoskeletal disease with long-term positive results in knee osteoarthritis[22] or recalcitrant Achilles tendinopathy compared to control groups[23]. SVF has also been used in more invasive procedures such as intramyocardial injection in patients who underwent chronic ischemic cardiomyopathy with a good safety profile and significant functional improvement [24].

From a regulatory point of view, autologous SVF is considered an advanced therapy medicinal product (ATMP) according to the European Directive No. 1394/2007, as it is prepared using enzymatic digestion (substantial manipulation) and not intended to be used for the same essential function in the recipient and the donor (non-homologous use). Thus, as considered as a drug product, SVF manufacturing must strictly follow good manufacturing practices (GMP) since its development to the marketing authorisation. In other words, appropriate measures and arrangements must be applied to safeguard the quality and the security of the product for their intended use. It included trained personnel, qualified premises and equipment, appropriate documentation, quality of production operations, quality of starting and raw materials, validated quality control and analyticals methods and a qualified person for the batch release. Common steps of SVF manufacturing include AT harvesting and washing, enzymatic digestion, centrifugation, and SVF pellet isolation and washing[25]. However, to date, there is no consensus on the precise conditions attached to each stage of the process, even though variations in SVF production methods could impact the final cell composition. Altogether, this strengthens the need for better standardization of SVF isolation processes and further comparability studies before implementation of an SVF manufacturing process intended for clinical use.

In this context, we aimed to develop an effective GMP-compliant and cost-optimized method to isolate therapeutic SVF. This study details the developpement of the standardized method, the validation of critical production parameters and finally provides *in vitro* and *in vivo* comparability data on the manually isolated SVF with reference to SVF obtained from the most commonly used automated method.

2. Materials and Methods

Donor specifications

AT was obtained as excedent surgical residue from healthy donors undergoing liposuction for aesthetic purposes in the department of plastic surgery, La Conception University Hospital, Marseille, France. The study was conducted in accordance with the declaration of Helsinki and all

subjects provided informed consent for scientific use of the surgical residues through a survey that was validated by the regulatory affairs department of AP-HM hospitals. AT samples were anonymized before transmission to the cell therapy unit.

AT harvesting

AT harvesting was performed by experienced surgeons from the plastic surgery department of La Conception university hospital in an operating room under general anesthesia after a standardized skin aseptic preparation using a Khouri cannula (Khouri Harvester, KOUME, LIPOPLASTY PRODUCTS, Sunrise, FL, USA), a 12-gauge 12-hole multiperforated cannula, through a closed circuit, preventing contamination of the harvested product. Infiltration was performed using a mixture of xylocaine 10 mg / mL and adrenaline 0.05 mg / mL diluted in a saline solution (NaCl; Sodium chloride 0.9% Viaflo, BAXTER). The mean volume of harvested AT was 187.74 mL \pm 68.28 mL. The AT was packaged in a medical device (transfer bag; Easyflex+, MACOPHARMA, Mouvoux, France). Once harvesting was complete, the bag was immediately transported to the cell therapy unit.

Development of the LG SVF isolation process

The developed SVF production process, named the LG process after the name of the person who originally developed it, was conducted in a controlled cleanroom in accordance with GMP guidelines effective for the French hospital exemption for ATMP. Most stages were performed in a sterile, closed fluid circuit in a class B cleanroom, except for open steps requiring grade A laminar airflow. All consumables and materials were marketed for cleanroom use by suppliers and validated by the person in charge of the quality control of the GMP facility.

First, under laminar airflow, the harvested AT contained in a MACO bag (MACOPHARMA) was transferred aseptically into a 250-mL Puregraft bag (BIMINI HEALTH TECHNOLOGIES, Solana Beach, CA, USA) using 60-mL syringes (TERUMO, Tokyo, Japan). AT was washed three times, with a volume of lactate Ringer's solution (RL; Ringer Lactate Viaflo; BAXTER, Deerfield, IL, USA) equivalent to half of the total Puregraft volume, preheated at 37°C, using the Puregraft device, allowing drainage of residual wetting/tumescent solution, red blood cells, and other debris. After discarding the waste bag of the Puregraft device, the sample was then weighed and diluted with RL 1:1 (v/v) at 37°C (A class). The diluted AT was transiently incubated in a 37°C incubator (THERMO ELECTRON CORPORATION, Waltham, MA, USA) for 15 min before the addition of collagenase enzyme (NB6; NORDMARK BIOCHEMICALS, Uetersen, Germany) directly into the Puregraft device (injection performed under laminar airflow), at concentrations of 0.10 or 0.25U/mL for 15, 30, or 45 min at 37°C under constant agitation using an orbital shaker. Collagenase was previously sampled and validated for free germs. The cell suspension was then transferred aseptically into a new medical device (Easyflex+, MACOPHARMA) to allow for cellular concentration by centrifugation (5 min at 400 g) (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA) and filtration using a cell strainer with porosity of 200 μ m (BECTON DICKINSON, Franklin Lakes, NJ, USA) to avoid any remaining debris. The filtration and washes to remove residual enzyme were performed with 2:1 (v/v) RL or saline solution (BAXTER) supplemented with 5% of human serum albumin (HAS; LFB BIOMEDICAMENTS, Courtaboeuf, France) (NaCl 5% HAS). All steps after digestion were aseptically performed in a closed circuit established with subsequent transfers of the cell suspension between transfer bags through sterile connections created using a sterile tubing welder (TSCD; TERUMO BCT, Lakewood, CO, USA). Finally, the active substance was concentrated and resuspended with 10 to 15 mL of RL or NaCl 5% HSA. Figure S1 provides images of the process and GMP-compliant criteria.

Inter-donor comparative analysis between manual and reference protocol

Once the LG protocol was developed and validated, six GMP preparations of SVF were performed and retrospectively compared to batches of SVF (n = 33) previously manufactured using the Celution device (CYTORI THERAPEUTICS, San Diego, CA, USA); the Celution protocol, used here as the reference protocol, is described in several investigational medical product dossiers for clinical

trial authorizations (NCT01813279; NCT02558543; NCT02520843; and NCT02622464). Various biological characteristics of both SVF final products were comparatively assessed and classified as SVF specifications defined for batch release (viability), critical process parameters (recovery yield), and critical quality attributes (cell subset distributions and clonogenic potential) according to the International Conference for Harmonization (ICH; *ICH Q5E Harmonized Tripartite Guideline, Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process*; *ICH Topic Q 6 B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products*; and *ICH Q8 Harmonized Tripartite Guideline, Pharmaceutical Development*). The extraction method for the Celution protocol is provided below.

Celution protocol for SVF isolation

SVF was obtained using the Celution 800/CRS automated processing system (CYTORI THERAPEUTICS) according to the manufacturer's instructions. The collected lipoaspirate was washed with RL (BAXTER) and enzymatically digested with Celase, a GMP cocktail of enzymes provided with consumables (WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION, Lakewood, NJ, USA). The cells were concentrated, washed, aseptically recovered, and resuspended in RL.

Intra-donor comparative analysis between the LG and reference protocols

A comparative analysis between SVF obtained from the LG protocol and the Celution device was also performed according to an intra-donor protocol. AT from the same donor was equally divided in two harvests and SVF extraction was conducted simultaneously with both protocols before analysis of SVF characteristics. Figure 1 summarizes the different development steps in this study.

SUCCESSIVE STEPS OF THE STUDY		Viability	Recovery yield	Cell Subset distribution	Collagenase activity assay	CFU-F	Sterility testing	Angiogenic activity <i>in vitro</i>	Wound healing <i>in vivo</i>				
DEVELOPMENT	Protocol Development	Validation of digestion conditions		<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">0,10U/mL 45°</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">0,25U/mL 15°</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">0,25U/mL 30°</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">0,25U/mL 45°</div> </div>		✓ Fig 2A	✓ Fig 2B	✓ Fig 2C,D	✗	✗	✗	✗	✗
	Validation of washing and resuspension solution		<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: 30px; height: 30px; text-align: center;">RL</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: 30px; height: 30px; text-align: center;">NaCl 5% HAS</div> </div>		✓ Fig 3A	✓ Fig 3B	✓ Fig 3C,D	✗	✗	✗	✗	✗	
	Validation of number of washings		<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 5px; width: 20px; height: 20px; text-align: center;">1</div> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 5px; width: 20px; height: 20px; text-align: center;">2</div> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 5px; width: 20px; height: 20px; text-align: center;">3</div> </div>		✗	✗	✗	✓ Fig 4	✗	✗	✗	✗	
	Inter-donor comparative analysis		<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 40%;">n= 6 SVF obtained using LG protocol</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 40%;">n=33 SVF obtained using Celution device</div> </div>		✓ Tab 2	✓ Tab 2	✓ Tab 2	✗	✓ Tab 2	✓	✗	✗	
VALIDATION	Intra-donor comparison	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid gray; border-radius: 50%; padding: 10px; width: 150px; height: 100px; text-align: center;">Harvesting of 5 AT samples from 5 donors</div> <div style="border: 1px solid gray; border-radius: 50%; padding: 10px; width: 150px; height: 100px; text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 5px; width: 50px; height: 50px; text-align: center; margin: 0 auto;">n= 5 SVF obtained using LG protocol</div> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 5px; width: 50px; height: 50px; text-align: center; margin: 0 auto;">n= 5 SVF obtained using the Celution</div> </div> </div>		✓ Fig 5A	✓ Fig 5B	✓ Fig 5D, E, F, G	✗	✓ Fig 5C	✗	✓ Fig 6	✓ Fig 7		

Figure 1. Development steps of the study. The different steps are presented from the top down according to the development chronology. Parameters evaluated at each step are listed and the resulting figures are indicated. RL: Ringer’s solution. HAS: human serum albumin. SVF: stromal vascular fraction. AT: adipose tissue. Fig: figure; Tab: table. *Cross by kareemov1000 from the Noun Project. Check by kareemovic3000 from the Noun Project.*

Biological characterization of SVF

Concentration of viable nucleated cells (VNCs) and cell viability

The VNCs concentration and cell viability percentage were determined using a NucleoCounter NC-100 (CHEMOMETEC, Allerød, Denmark) in duplicate. Recovery yield was calculated as the number of total VNCs obtained divided by the initial volume of AT, measured after removal of infiltration liquid.

Colony forming unit fibroblast (CFU-F) assay

The clonogenic potential of MSCs present in the SVF was assessed by CFU-F assay as follows: 500 VNCs were seeded into six-well (THERMO FISHER SCIENTIFIC) plates in triplicate in proliferation medium [45% Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium, 45% Ham's-F12, 10% fetal bovine serum (Gibco, THERMO FISHER SCIENTIFIC), GlutaMAX (100×, Gibco, THERMO FISHER SCIENTIFIC) gentamicin (PANPHARMA, Luitré, France), penicillin G (PANPHARMA), and fungizone (BRISTOL-MEYERS SQUIBB, New York, NY, USA)]. The colonies were then grown for 12 to 14 days, depending on the growth rate of the cells, with medium changes 4 days after seeding, then every 2 days. At the end of the assay, the culture dishes were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, CA, USA), fixed with absolute ethanol (COOPER, Melun, France) for 20 min, and stained with Giemsa reagent (SIGMA-ALDRICH, Saint-Quentin-Fallavier, France) before two washes with distilled water. Cell colonies were counted under phase-contrast microscopy (DM IL LED; LEICA MICROSYSTEMS, Wetzlar, Germany). All three culture dishes were counted, and the average and standard deviation were calculated to generate the final frequency percentage value, expressed as the colony-forming efficiency (total number of colonies) divided by the number of cells seeded × 100.

Flow cytometry analysis of SVF cell subsets

Characterization of the SVF cell subpopulations was performed by flow cytometry. Aliquots of 5×10^5 VNCs per tube were suspended in 100 μ L of PBS and stained for 20 min at room temperature in the dark with the DRAQ5 nuclear marker and pre-prepared antibody mixes or corresponding isotype controls in matched concentrations. The monoclonal antibody mix included antibodies against CD90, CD146, CD34 and CD45, respectively, conjugated with the following fluorochromes: FITC, PE, ECD and PC5 (references listed in Table S1). Red blood cells were lysed in NH_4Cl for 10 min before the cells were centrifuged and resuspended in PBS $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -free medium (LIFE TECHNOLOGIES). Then, NucBlue (THERMO FISHER SCIENTIFIC), which allows discrimination of viable and dead cells, was added for 5 min prior to flow cytometry analysis on a NAVIOS instrument (BECKMAN COULTER, Brea, CA, USA). Data files were analyzed using Kaluza software (BECKMAN COULTER) with a multiparameter gating strategy. Briefly, CD45^- regenerative cells were discriminated as $\text{CD34}^- \text{CD146}^+$ pericytes and transitional cells, $\text{CD34}^+ \text{CD146}^+$ endothelial cells (ECs) and $\text{CD34}^+ \text{CD146}^- \text{CD90}^+$ MSCs. The CD45^+ population includes all hematopoietic cells (macrophages, monocytes, lymphocytes and neutrophils).

Collagenase quantification

Washing solutions obtained after all SVF washing steps were collected and sampled to measure the enzyme residual quantity using a collagenase activity assay colorimetric kit (ABCAM, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions and analyzed on an optical density reader (TECAN, Zürich, Switzerland).

Sterility testing (according the European pharmacopoeia, §2.6.27: microbiological examination of cell-based preparations)

The sterility testing method applied to SVF was previously validated according to the ATMP-GMP guidelines §10.4: validation of test methods, by inoculating calibrated commensal bacterial strains of the subcutaneous flora into isolated SVF. Tests were compliant with a detection threshold of 10 units forming-colony.

SVF (150 μ L, corresponding to one percent of final volume) was sampled in Bact/alert culture bottles (aerobic and anaerobic culture vials, each containing 40 mL of medium and absorbent resins). The Bact/alert method (BECTON DICKINSON) uses a computer-controlled incubation/detection system. The media used contained proprietary factors designed to inactivate a wide variety of antibacterial and antifungal agents. Bact/alert culture bottles were incubated at 37°C and 5% CO₂ for a total of 10 days, and automated readings were taken every 10 min (according to the *European Pharmacopoeia - Chapter 2.6.27 Microbiological Examination of cell-based Preparations*). Detection of organisms resulted in an audible alarm and automatic recording of time of detection.

Tube formation assay

SVF samples produced for the intra-donor comparative analysis (n = 2) were loaded at a density of 20,000 cells per well in a μ -slide angiogenesis system (IBIDI, Gräfelfing, Germany) coated with 10 μ l of growth factor-reduced Matrigel (6 mg/mL; CORNING, Corning, NY, USA) previously polymerized for 30 min, and maintained in endothelial cell growth medium (EGM2-MV; LONZA, Walkersville, MD, USA) at 37°C and 5% CO₂. Capillary-like structures were recorded during 96 h using a Leica DMI8 video-imaging inverted microscope equipped with an Incubator I8 (LEICA MICROSYSTEMS) at 5 \times magnification; images were captured using the Leica Application Suite X software (Las X 3.0.2.16120; LEICA MICROSYSTEMS). The network, length of tubes, and nodes were quantified using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) with the Angiogenesis Analyzer plug-in (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/AngiogenesisAnalyzerforImageJ>, G. Carpentier, *ImageJ* News, 20 October 2012). Each experiment was performed in triplicate.

Spheroid based sprouting assay

SVF samples produced for the intra-donor comparative analysis (n = 2) were suspended in culture medium containing 0.2% (wt/vol) carboxymethylcellulose (SIGMA, Munich, Germany), and seeded in non-adherent round-bottom 96-well plates (SARSTEDT, Nümbrecht, Germany), leading to the formation of spheroids with a defined cell number. After 72 h, spheroids were collected and embedded in collagen gel (Collagen I, Rat Tail; CORNING). The spheroid-containing gel was rapidly transferred into pre-warmed Lab-Tek II slides (THERMO FISHER SCIENTIFIC) and allowed to polymerize (30 min), then 100 μ l of EGM2-MV medium was added on the top of the gel. Following 24 h of culture in EGM2-MV medium, spheroids were fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde at room temperature. After washing and permeabilization with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% bovine serum albumin (BSA), for 2 h at 4°C, spheroids were immunolabeled overnight at 4°C with phalloidin coupled with Alexa-647 (THERMO FISHER SCIENTIFIC) (1/100), and nuclei were stained with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1/5000) diluted in PBS containing 1% BSA. After washing, we then captured fluorescent optical image stacks along the z-axis at 20 \times magnification using two lasers in sequential mode under a Leica DMI8 microscope (LEICA MICROSYSTEMS). The Las X software (LEICA MICROSYSTEMS) was used during all image acquisition procedures. Image processing prior to image measurements was performed using Huygens Essential Deconvolution software (SCIENTIFIC VOLUME IMAGING, Hilversum, The Netherlands) using up to 40 iterations of the classical maximum likelihood estimation algorithm, with a theoretical point spread function and automatic background correction. The images were then analyzed using the Sprout Analysis plug-in developed by Eglinger et al.[26] in the Fiji distribution of ImageJ 1.52p (Wayne Rasband) to evaluate the different vascular parameters, such as sprout length and branch points.

In vivo experiments

All experimental procedures were approved by the Region #14 Animal Ethics Committee (reference no. 2015102110259745). A mouse model of cutaneous ischemia was created using 8-week-old female nude Foxn1^{nu} mice. Under general and local anesthesia, the skin and panniculus carnosus muscle of 20 mice were incised in the shape of a square with 3.5-cm sides centered on the mouse back. Vascular subdermal pedicles were dissected, coagulated, and sectioned. The wound edges were fixed with 4-0 polyamide interrupted sutures from either side of a sterile silicone sheet, 0.5-mm thick and 4 cm per side (Folioxane, NOVATECH, La Ciotat, France) with a square hole as its center (3 cm per side). This implant was folded and inserted into the incision surrounding the flap to prevent rapid cutaneous revascularization and healing of the edges of the flap. To improve animal welfare conditions, general analgesia by buprenorphine was administered daily for 1 week postoperatively. Four 6-mm punch excisional wounds were made in the dorsal skin of each mouse, according to Sullivan[27]. Silicone donut-shaped splints fashioned from a 0.5-mm thick sterile silicone sheet (Folioxane, NOVATECH) were fixed to the skin surrounding the wounds with immediate-bonding adhesive and 5-0 nylon sutures (ETHICON, Somerville, NJ, USA), according to Galiano[27]. This cutaneous hypovascularization model was previously validated using three-dimensional computed tomography angiography and laser Doppler flowmetry analyses (data not shown).

Mice were randomly separated into three groups: control group, LG group and Celution group. Each group received subcutaneous injections of SVF obtained from the same donor with the LG or Celution protocol or a control RL injection. Two million VNCs/cm² were injected at the wound edges of the four punch excisional wounds (0.4 mL of SVF for each wound). Wound closure was measured weekly for 28 days using standardized digital photographs (Canon PowerShot G16) and analyzed with ImageJ 1.52p.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 5 (GRAPHPAD SOFTWARE, La Jolla, CA, USA). Quantitative variables are reported as the mean ± standard deviation (SD) or the median 25–75th percentile according to the normality of their distributions, minima and maxima are also provided. Continuous variables were compared using Student's *t*-test or the nonparametric Mann–Whitney *t*-test. One-way analysis of variance (ANOVA) was employed to compare more than two groups. For assessment of wound closure in the mouse model, data are reported for each group as the average percentage of wound healing ± SD from the four wounds in each mouse. Two-way ANOVA was used for the *in vivo* wound healing follow-up. A *p*-value < 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

3. Results*3.1. Development of the LG protocol**3.1.1. Collagenase digestion conditions (time, concentration)*

As shown in Figure 2A, the use of collagenase at concentrations of 0.10 U/mL AT for 45 min or 0.25 U/mL AT for 15 or 30 min at 37°C yielded SVF with median cell viabilities of 70.50%, 71, 50%, and 74.00%, respectively, which are below the 80% threshold, a value approved in several investigational medicinal product dossiers by the French national medicine's safety agency (*cf.* Methods for NCT numbers). The median cell viability of SVF obtained from collagenase digestion at 0.25 U/mL AT for 45 min reached 81%.

Under these conditions, the yield of VNCs/mL AT ranged from 4.00×10^5 to 59.2×10^5 with a median value of 11.2×10^5 VNCs/mL AT (Figure 2B). Median VNCs recovery values were 21.52×10^5 ; 18.07×10^5 ; 36.10×10^5 ; and 14.10×10^5 per mL AT when collagenase digestion was performed under conditions of 0.10 U/mL and 45 min; 0.25 U/mL and 15 min; 0.25 U/mL and 30 min; and 0.25 U/mL and 45 min, respectively.

Flow cytometry analyses of the percentage of CD45⁻ regenerative cells within SVF are shown in Figure 2C. The median proportion of CD45⁻ regenerative cells was the lowest at 43.94% for the 0.25 U/mL and 15 min condition. The median percentage of CD45⁻ regenerative cells for conditions of 0.10 U/mL and 45 min, and 0.25 U/mL and 30 min were 60.10% and 54.71%, respectively. Finally, the highest percentage (62.55%) was obtained under conditions of 0.25 U/mL and 45 min.

Altogether, the 0.25 U/mL and 45 min condition was adopted, as it allows SVF to comply with the usual viability specification with acceptable yields for VNCs and proportion of regenerative cells.

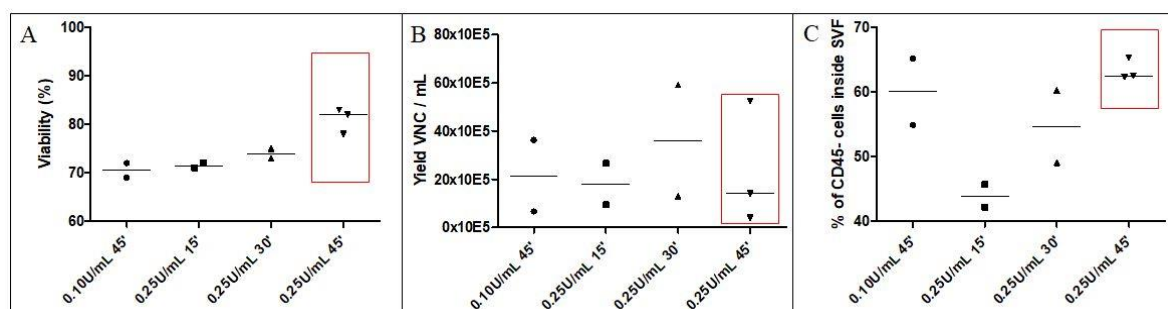


Figure 2. Assessment of several enzyme concentrations and digestion times for enzymatic digestion of AT. Final SVF products obtained with different conditions (0.10 U/mL and 45 min; 0.25 mL and 15 min; 0.25 U/mL and 30 min; and 0.25 U/mL and 45 min) were assessed in terms of viability (A), yield of VNCs per mL AT (B), and cell subset distribution including percentage of CD45⁻ regenerative cells (C). The red frame shows the chosen condition. Experiments were reproduced one to three times according to the available AT volume. SVF: stromal vascular fraction; VNC: viable nucleated cell; ': minutes.

3.1.2. Washing solution and final excipient for SVF cells

The obtained SVF cell suspension was filtered, washed three times, and resuspended in RL ($n = 5$) or NaCl 5% HSA ($n = 5$). The measured cell viability of the finished product was statistically increased in the NaCl 5% HSA group compared to the RL group [median 92.50% (90.10–94.90%) *vs.* 78.90% (72.10–82.50%), $p = 0.01$] (Figure 3A). The amount of VNCs recovered per mL AT did not statistically differ between the two groups (Figure 3B). However, recovery was highly variable in the RL group, ranging from 2.80×10^5 to 52.4×10^5 VNCs/mL AT with a median value of 4.00×10^5 VNCs/mL AT (2.98 – 33.20×10^5 VNCs/mL AT) and a variation coefficient of 139.27%. Conversely, the yield was more repeatable with the NaCl 5% HSA washing solution, with a median value of 4.84×10^5 VNCs/mL AT (2.79 – 11.93×10^5 VNCs/mL AT) and a variation coefficient of 89.9%. Proportions of MSCs (Figure 3C) and ECs (Figure 3D) identified by flow cytometry within the final active substance did not statistically differ between the two groups.

Thus, NaCl 5% HSA was chosen as the main excipient for filtering and washing of the isolated SVF due to the high viability it confers to the cell product and maintains its viability (data not shown).

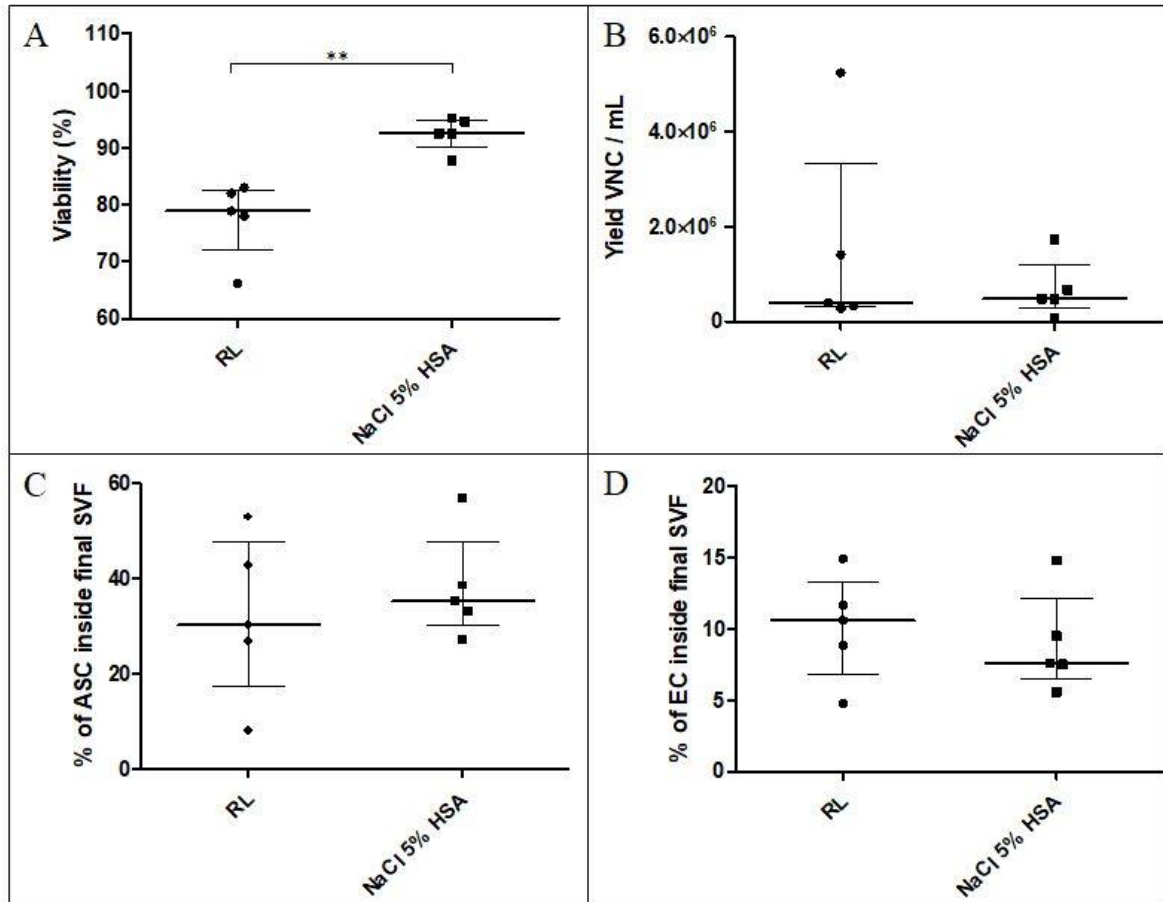


Figure 3. Assessment of two different solutions for filtration, washing, and final resuspension of SVF. The solutions tested were RL and NaCl 5% HSA. Viability (A) was statistically higher for the NaCl 5% HSA group ($p = 0.01$). Yield of VNCs per mL AT (B), percentage of MSCs (C), and ECs (D) were not statistically different. RL: Ringer’s lactate; NaCl 5% HSA: saline solution enriched with HAS; VNCs: viable nucleated cells; MSCs: mesenchymal stem cells; ECs: endothelial cells

3.1.3. Validation of the necessary number of washings

Four independent SVF batches (A–D) were produced using the parameters validated above. After each centrifugation/washing step, the washing supernatants were retained to quantify collagenase concentrations. Analysis of the kinetics of substrate degradation by collagenase over 180 min indicated that collagenase was undetectable when at least two washing steps were applied (Figure 4A). Linear regression based on optical density evolution over time demonstrated that each of the second washing assays provided a slope of the regression line inferior to 0.0005, which reflected that collagenase was non-measurable from this point. Details of each experiment are provided in Figure 4B. The slope of the regression line of substrate degradation by the positive control, corresponding to collagenase at 0.25 U/mL, was equal to -0.0113 , whereas the slope of the negative control was -0.00002 . The slope of the second washing solutions of SVF-A, SVF-B, SVF-C, and SVF-D were -0.00003 , -0.0001 , -0.0001 , and -0.0002 , respectively. This indicates that after digestion, SVF can be washed only twice to permit clinical use with an undetectable residual quantity of collagenase.

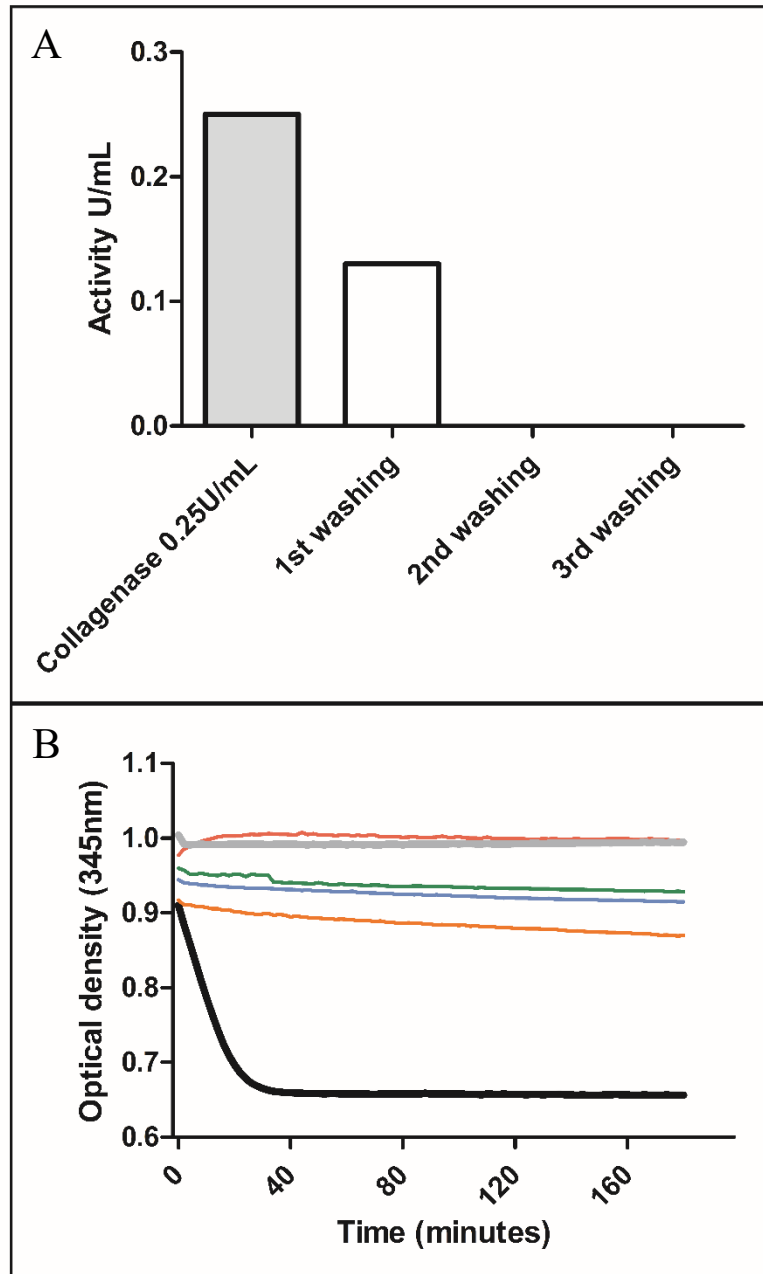


Figure 4. Kinetics of substrate degradation by collagenase. (A) A representative experiment of four enzyme activity assay replications: collagenase was undetectable from the second washing. (B) The optical density reflects degradation of the substrate by collagenase over time. The slope of the regression line was calculated for the second washings of four SVF preparations: SVF-A, SVF-B, SVF-C, and SVF-D, respectively: -0.00003 , -0.0001 , -0.0001 , and -0.0002 ; slope of the positive control: -0.0113 ; slope of the negative control: -0.00002 .

Collectively, these results identify production parameters that allowed us to optimally design the LG protocol and comparatively evaluate it with reference to the Celution-based method. Table 1 summarizes the differences in the SVF manufacturing process using the LG and Celution protocols.

	Celution protocol		LG protocol	
AT harvesting	Using Khouri cannula		Using Khouri cannula	
AT repackaging	Packing in 60-mL Luer Lock syringes			
Device preparation	Tensioning Celution device, settlement of consumables, and seal check			
AT transfer	AT transfer in Celution device		AT transfer in Puregraft device	
Settling and discarding infiltration liquid	Automated	Visual check of discarding infiltration liquid	Discarding infiltration liquid performed using Puregraft device	
Weighing		At least 100 mL of AT needed		
AT washing		From two to five washings with RL and visual check	Three washings using RL	
Weighing		No particular volume required	AT volume between 50 and 250 mL	
Dilution			Two-fold dilution with RL	
Incubation			Incubation of the diluted AT for 15 min at 37°C	
Enzyme preparation	Celase reconstitution		Collagenase thawing (previously reconstituted at 20 U/mL)	
Digestion	Automated	Injection of 5 mL of reconstituted Celase into Celution device	Injection of collagenase at 0,25 U/mL into Puregraft device for 45 min at 37°C under agitation	
Concentration		Visual check of the concentration	Steps performed using aseptic transfer bags through a closed circuit	Cellular concentration by centrifugation (400 g, 5 min)
Filtration				Cell strainer 200-µm porosity
Washings	Automated	With RL		Two washings with NaCl 5% HSA
Collection of SVF	SVF resuspended in RL		SVF resuspended in NaCl 5% HSA	

Table 1. Differences between LG and Celution protocols

3.2. Comparability of LG and Celution-based protocols for SVF manufacturing

3.2.1. Inter-donor comparative analysis of SVF produced using the Celution device or LG standardized protocol

The viability of nucleated cells manufactured with the LG protocol [94.15% (89.83–93.03%)] was significantly higher compared to that acquired from the Celution device [87.30% (84.60–90%), $p < 0.01$]. Similarly, the LG protocol generated a greater number of VNCs/mL AT, with a median value of 4.20×10^5 (3.35 – 10.58×10^5 VNCs/mL AT) *vs.* 2.52×10^5 (1.50 – 3.18×10^5 VNCs/mL AT) in the Celution group ($p < 0.01$). The clonogenic potential of MSCs, assessed via CFU-F assay, did not statistically differ between the two processes ($p = 0.43$). The distribution of various cell subpopulations of SVF from the LG protocol was similar to that of SVF from the reference protocol, as the respective proportions of MSCs, ECs, pericytes, and leukocytes did not statistically differ between the two protocols. The results are summarized in Table 2

3.2.2. Intra-donor comparative analysis of SVF produced using the Celution device or final LG protocol

No significant difference was observed in the specifications of the comparatively analyzed SVF: the median percentage of viability for the LG protocol was 94.50% (88.95–96.05%) *versus* 91.70% (82.95–92.70%) for the reference protocol (Figure 5A). The LG protocol generated a median recovery value of 4.64×10^5 VNCs/mL AT (3.74 – 11.45×10^5 VNCs/mL AT) *vs.* 3.39×10^5 VNCs/mL AT (2.25 – 4.54×10^5 VNCs/mL AT) with the Celution device (Figure 5B). The clonogenic potential of MSCs was 4.10% (2.90–6.05%) for the LG protocol *vs.* 3.70% (3.30–5.50%) for the Celution device (Figure 5C). The cell subset distributions of SVF produced with the LG and Celution protocols were similar: ASCs were the major population with 38.80% (36.85–44.75%) *vs.* 49.00% (40.95–55.15%), whereas ECs represented only 6.80% (5.80–11.10%) *vs.* 8.20% (5.40–12.10%). Pericytes and transitional cells accounted for 11.20% (8.87–18.90%) *vs.* 14.41% (11.65–21.70%). A non-significant difference was observed for leukocytes, with 40.60% (29.00–45.90%) *vs.* 25.20% (20.50–34.00%) for the LG and Celution protocols, respectively. These results showed that SVF manufactured according to the LG process contains similar proportions of regenerative cells compared to the reference. The only slight difference observed concerned leukocytes, which tended to be higher in SVF obtained with the LG protocol.

	Viability		Yield of VNCs (× 1E+05/mL AT)		CFU-F		ASC		EC		Pericytes and transitional cells		Leukocytes (macrophages, neutrophils, and lymphocytes)	
	LG protocol	Celution device	LG protocol	Celution device	LG protocol	Celution device	LG protocol	Celution device	LG protocol	Celution device	LG protocol	Celution device	LG protocol	Celution device
Average	93.05%	87.00%	6.30	2.50	4.05%	4.80%	39.50%	43.99%	8.40%	7.66%	12.70%	10.29%	39.50%	38.06%
Standard deviation	3.50%	4.00%	4.20	1.23	1.70%	1.70%	4.70%	11.49%	2.80%	6.15%	5.20%	7.95%	8.80%	12.45%
Median	94.15%	87.30%	4.20	2.52	3.92%	5.00%	37.90%	44.00%	8.07%	6.00%	10.64%	8.00%	41.25%	37.00%
25% percentile	89.83%	84.60%	3.35	1.50	2.24%	3.42%	36.25%	36.50%	6.25%	5.00%	8.67%	3.00%	29.15%	31.50%
75% percentile	96.03%	90.00%	10.58	3.18	5.97%	5.90%	43.31%	49.50%	10.43%	8.50%	17.45%	14.50%	47.50%	49.00%
Minimum	87.20%	77.60%	3.20	0.77	2.07%	1.30%	34.90%	25.50%	4.90%	2.70%	8.30%	1.00%	28.70%	12.70%
Maximum	96.10%	93.40%	13.20	5.76	6.20%	8.00%	47.70%	81.40%	12.90%	37.10%	21.80%	32.20%	49.90%	63.60%
p-value	0.0037		0.0029		0.4346		0.2837		0.3377		0.2913		0.8303	

Table 2. Inter-donor comparative analysis of SVF produced using the Celution device or LG protocol. Detailed data of the 33 SVF products obtained with the Celution reference protocol and the 6 SVF products obtained with the LG protocol. P.value were obtained after average comparison using a non parametric test.

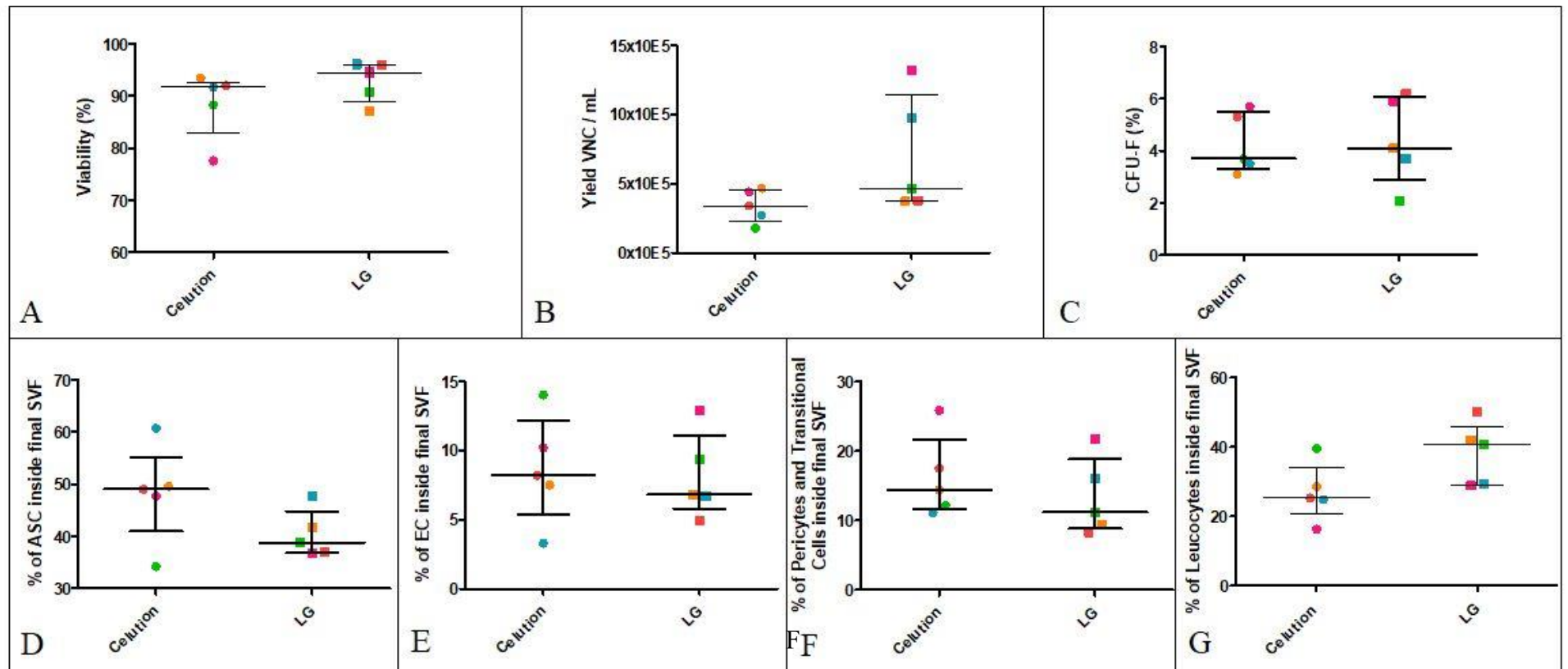


Figure 5. Intra-donor comparative analysis of SVF produced using the Celution device or final LG protocol. Five SVF preparations were produced from five donors with the Celution device or LG protocol. Viability (p -value = 0.3090) (A), yield of VNCs per mL AT (p -value = 0.1256) (B), CFU-F (p -value = 0.7790) (C), % of ASCs (p -value = 0.0722) (D), % of ECs (p -value = 0.7610) (E), % of pericytes and transitional cells (p -value = 0.2874) (F), and % of leucocytes (p -value = 0.0517) (G) were evaluated.

3.2.3. Sterility testing

Samples of SVF (n = 3) produced using the LG protocol were submitted to sterility testing; the results established that no microorganisms were present.

3.2.4. Analysis of the SVF angiogenic capacity in vitro

The angiogenic capacity of SVF manufactured using both protocols was compared. Using the spheroid-based assay, the number of sprouts and total sprout length were equivalent between the LG and Celution-based protocols [80.00 (78.00–82.00) and $1.50 \times 10^5 \mu\text{m}$ ($0.94\text{--}2.06 \times 10^5 \mu\text{m}$) *vs.* 77.50 (72.00–83.00) and $1.31 \times 10^5 \mu\text{m}$ ($1.27\text{--}1.34 \times 10^5 \mu\text{m}$), respectively] (Figure 6A, B). The kinetics of pseudotube formation in Matrigel matrix were also similar between the two groups; network formation started at ~ 48 h post seeding and reached peak values at ~ 96 h (t96). The median total network length at t96 was $6.64 \times 10^4 \mu\text{m}$ for the LG group and $6.96 \times 10^4 \mu\text{m}$ for Celution group (Figure 6E). The number of meshes at t96 was 162.50 for cells obtained with the LG protocol and 181.50 for Celution (Figure 6F). The numbers of nodes were 2051.50 and 2453.00 for SVF produced by the LG and Celution processes, respectively (Figure 6G). Finally, the number of junctions in the LG group was 585.50 *vs.* 688.00 in the Celution group (Figure 6H). These results indicate that SVF products from both manufacturing protocols are comparable in terms of angiogenic potential *in vitro*.

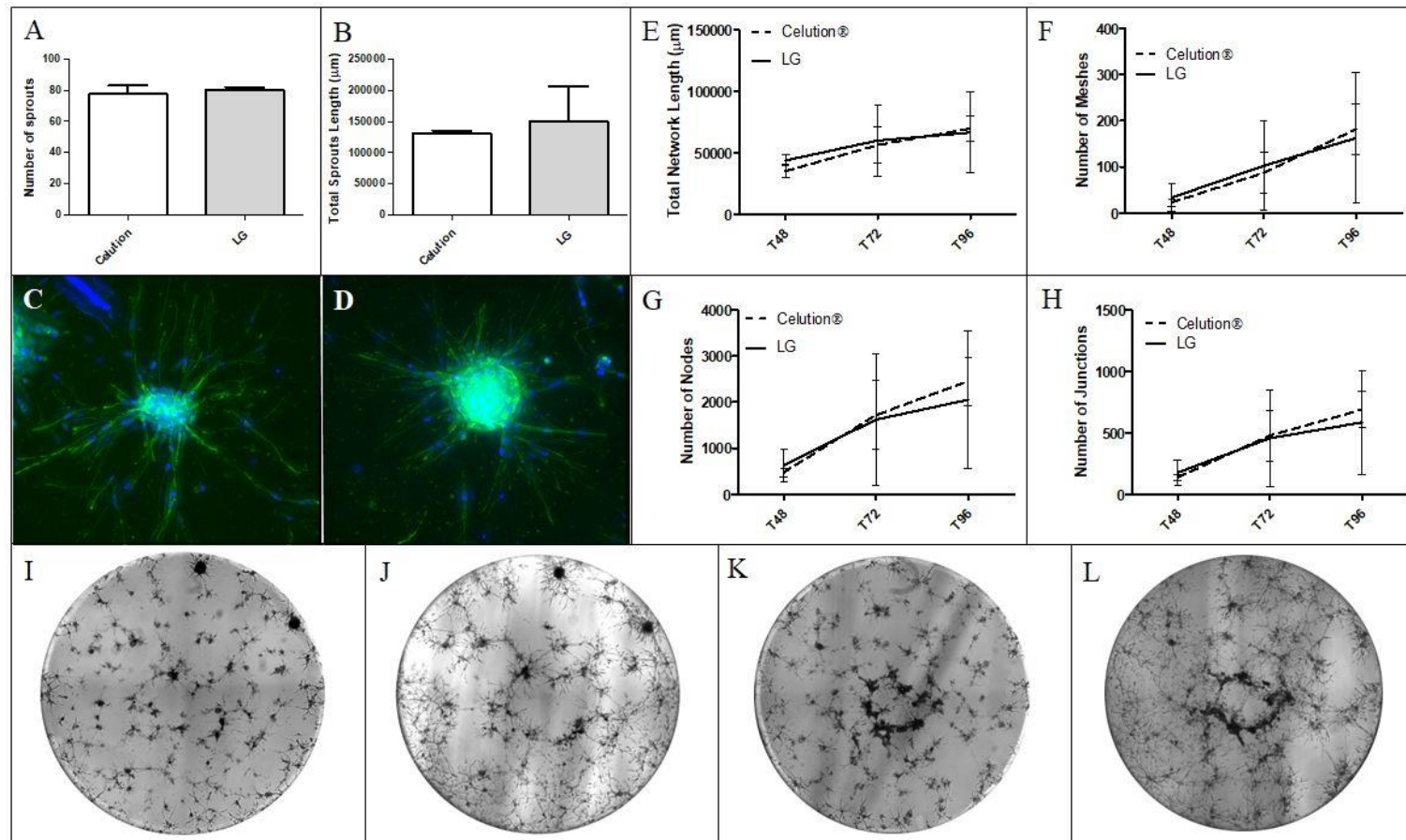


Figure 6. Representative experiment of the spheroid-based assay and pseudotube formation in Matrigel of SVF produced with the LG or reference protocols. SVF was produced from the same AT sample with both processes (n = 2). After 24 h of culture, spheroids were labeled with DAPI (nucleus) and phalloidin (actin cytoskeleton), which allowed measurement of the number of sprouts (A) and total sprout length in μm (B). Representative pictures of one spheroid of the Celution group (C) and the LG group (D) were taken at 20× magnification. Evolution of the network was followed after seeding 20,000 cells per well coated with Matrigel. Several parameters were evaluated: total network length (E), number of meshes (F), number of nodes (G), and number of junctions (H). Representative images of pseudotube formation by Celution SVF at 72 h (I) and 96 h (J) post seeding, and by LG SVF at 72 h (K) and 96 h (L) post seeding were taken at 4× magnification.

3.2.5. Analysis of the angiogenic capacity *in vivo*

SVF produced for the intra-donor comparative analysis was tested for its wound healing ability (LG: n = 1; Celution: n = 1) in a mouse model of subcutaneous ischemia inspired by the Galiano model [27]. Three groups of mice received injections of SVF produced by the LG protocol or Celution device. RL injections were used as a control (Figure 7). Mice that received an injection of SVF healed faster compared to the control group, with an average wound healing at day 7 (D7) of 23.17% (\pm 17.96%) for the LG group ($p > 0.05$) and 25.70% (\pm 19.35%) for the Celution group ($p > 0.05$) vs. 12.99% (\pm 13.39%) for the placebo group. The same conclusion was observed at D14, with an average wound healing of 79.98% (\pm 26.50%) and 87.96% (\pm 21.71%) for mice who received SVF from the LG ($p < 0.05$) or Celution protocol ($p < 0.001$) vs. 61.08% (\pm 33.67%) for placebo. At D21, the percentages of wound healing were 95.56% (\pm 8.20%), 96.80% (\pm 9.41%), and 91.16% (\pm 24.49%) for the control, Celution, and LG groups, respectively; no statistically significant difference was observed. At D28, all wounds were healed.

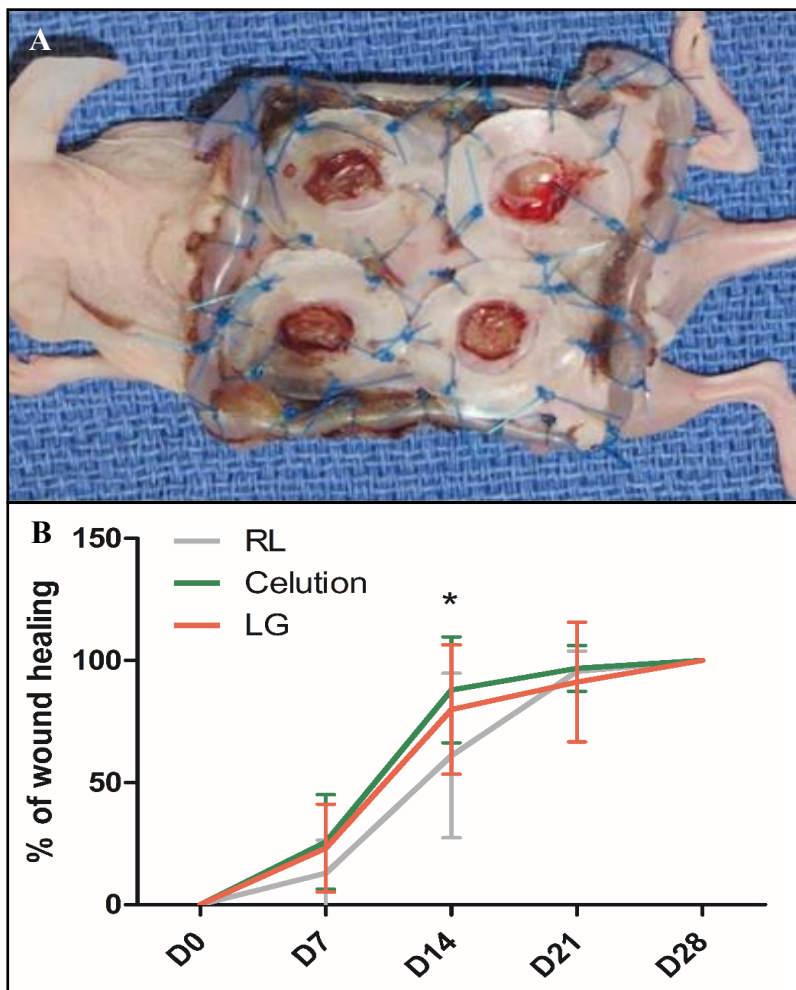


Figure 7. Testing of the angiogenic ability of SVF produced with both protocols in a mouse model of subcutaneous ischemia versus placebo. SVF was produced from the same AT sample (n = 1) with both processes and injected into the wound edges of six mice per group. (A) Representative image of the mouse model of subcutaneous ischemia on day 0 (D0). The control consisted of RL in injections in four mice. Wound healing was quantified at D7, D14, D21, and D28 post-injection by analysis of standardized images. (B) The kinetics of wound healing did not differ between the LG and Celution groups. On D14, wound healing was significantly greater in the LG and Celution groups compared to placebo, with respective p -values < 0.05 and < 0.001 . No difference was observed between the three groups at D7, D21, and D28.

4. Discussion

In this study, we developed and validated a new protocol that allows manufacturing of clinical grade SVF and can be proposed as an attractive alternative to the use of automated medical device-based methods. The risk analysis performed between LG and Celution protocols was in favor of LG protocol for mainly two reasons: a perfect control over the quality of raw materials and the compliance to European regulation (Table S2). Indeed, this protocol fully complies with GMP requirements, as manufacturing under grade A in B cleanroom conditions as soon as there are open steps is required and uses only media and materials suitable for therapeutic use. Furthermore, LG protocol presents the advantage of being minimally invasive by a shorter harvesting procedure due to the minimal quantity of AT needed. Thus, this procedure could be addressed to lower body-mass index patients. We defined each step of the process by evaluating changes in manufacturing parameters that are critical both for regulatory requirements and potential effectiveness of the final medicinal product.

Viability of the nucleated cells recovered after AT enzymatic digestion was chosen to be the only product specification, as that should confirm the quality and ensure the potential efficacy of the final product according to ICH guidelines. The yield of VNCs per mL AT was defined as a critical process parameter as it is the most representative of isolation protocol efficiency. In addition, it may have an impact on the product quality and should be controlled according to ICH guidelines. The applicability of SVF isolation methods is sometimes hampered by the poor availability of large volumes of AT as the starting biological material in patients with a low body mass index such as those presenting with vascular and/or inflammatory chronic disease. The use of a recommended AT volume of ~ 200 mL in the Celution procedure can be viewed as a potential limitation. Optimization of the SVF yield is therefore critical, making monitoring of the digestion temperature one of the most crucial parameters to obtain an effective digestion. Manual methods for SVF isolation allow digestion to be directly run in a 37°C thermostatic chamber. Finally, the cell subset distribution and clonogenic potential of MSCs are considered critical quality attributes according to ICH guidelines. Thus, although the mechanism of action of the SVF is not fully established, and no study to date has reported a link between the cell subset distribution of SVF and its clinical benefit in patients, it has been established that the MSC counterpart plays a prominent role through its paracrine activities and/or multipotent differentiation ability [28]. MSCs from AT have been shown to exert immunomodulatory properties through the secretion of various growth factors and cytokines [29,30] and have also been investigated for their anti-fibrosis effects [31]. Furthermore, the synergistic actions involving different CD45⁻ SVF cells are also crucial for pro-healing and angiogenesis as ECs and pericytes make direct contributions to vessel formation and maturation [32,33] and paracrine support of MSC function [10,34,35]. For these non-exhaustive reasons, it appears essential to guarantee that our final SVF product intended for use in various clinical contexts is composed of a sufficient proportion of regenerative cells and retains significant MSC clonogenic potential to ensure the desired product quality.

Based on these parameters, the selected protocol consists of an AT digestion step with collagenase at 0.25 U/mL AT for 45 min. The best cell viability was achieved by using the highest concentration and longest incubation time for collagenase. Consistently, as reported by Lee and colleagues, SVF viability was shown to decrease with increasing treatment duration but this effect is significant only for a duration equal to or greater than 60 min [36]. The following washing steps were defined using NaCl 5% HSA, allowing for higher SVF viability compared to RL, used in the Celution protocol, and ensuring an undetectable residual quantity of collagenase.

In the second part of our work, we first retrospectively compared the final product manufactured with the LG protocol to a reference process based on use of the Celution automated device, which was the first commercially available device for SVF production following the discovery of multipotent stem cells in AT by Zuk and her team [3]. Interestingly, the viability and recovery yield were significantly higher in the LG protocol compared to biological data from SVF obtained with the Celution device as well as data provided in the different investigational medicinal product

dossiers established for regulatory approval of clinical trials. Furthermore, the quality control methods remained unchanged compared to the reference, and sterility testing showed that the LG protocol produced a sterile end product for all batches manufactured.

More importantly, the robust intra-donor comparison performed on five batches from the same AT harvest and discriminated according to the LG or Celution-based process allowed us to attest the comparability of the two methods. The viability, yield of VNCs per mL AT, CFU-F assay, and cell subset distribution were statistically similar between both cell suspensions. One trend was a higher percentage of leukocytes within SVF obtained with the LG protocol. This could be explained by the automated initial washing step of the AT provided by the Celution device. This automated washing takes into account the level of blood contamination of the initial AT and is supposed to be more effective, as rinsing and washing steps are repeated until the obtention of non-bloody AT. In the LG protocol, the initial washing step is defined by three rounds of washing with RL in 1:1 proportion with AT, leading to an acceptable visual aspect of the AT before digestion. No further development was performed on this initial step as collagenase activity is driven by required electrolytes present in RL.

To our knowledge, our study is the first to implement *in vitro* angiogenesis testing to analyze the comparability of SVF manufacturing methods. The expected added value is to provide functional testing that can be evaluated in the future as a potency assay. Such testing is still not defined and remains challenging in the context of the use of SVF as an experimental ATMP product. Our results showed that the sprouting ability as well as the capacity to self-organize into capillary-like structures in a Matrigel matrix *in vivo* was not different between the two SVF production methods. This observation is in line with the fact that the main cell subsets supporting SVF angiogenic activity were similarly represented in SVF from both processes. This also suggests that the functional paracrine interactions between SVF cells during capillary formation are equivalent regardless of the SVF manufacturing process. Consistently, both SVF products tested in an innovative wound model of cutaneous excision and ischemia in nude mice were able to accelerate wound closure. The pro-healing activity did not significantly differ between SVF obtained from the LG or Celution protocols.

In the few last years, a substantial number of automated and semi-automated devices have been introduced or are currently in development, with a total of 17 devices reported in the review of Oberbauer and colleagues [37]. A large body of articles have reported the biological characteristics of these devices [38–40] and, in some cases, use a manual method as reference [41,42]. However, the described manual protocols are not associated with any development data, leading to a high technical heterogeneity in the different steps of the processes, and consequently, in the biological results. In view of this literature, the LG protocol displays interesting characteristics in terms of viability and cell recovery [43]. As illustrated in Table 3, gathering manufacturing data from 12 studies and 20 SVF preparations, only one study showed higher viability than SVF obtained with the LG protocol, and 14 productions presented lower recovery yields than those achieved with the LG protocol. In addition, the estimated costs for one SVF production using the LG protocol under the ATMP- hospital exemption, including consumables for harvesting and extraction, a Puregraft bag, clinical grade enzymes, staff costs, and facilities management with environmental controls and biological quality controls are approximately US\$ 5000, whereas Aronowitz and colleagues [44] reported that automated devices cost over US\$ 50,000 with a significant burden due to expensive single-use kits that can cost hundreds or thousands of dollars. Furthermore, some of these devices are not fully closed systems, meaning that one of the steps must be performed in an open environment, which is not compatible with full application of GMP guidelines. Indeed, these guidelines prescribe that all open steps are only tolerated if performed under grade A laminar airflow, limiting the use of these devices, which are too cumbersome to be placed under a microbiological safety station.

In conclusion, this study reports for the first time the development of a GMP-compliant process for manual SVF isolation. This process showed satisfactory performance criteria and allows the manufacturing of clinical-grade SVF with angiogenic and pro-healing potency *in vivo* comparable to that obtained with an automated device previously used in clinical trials. Although future studies are required to evaluate the SVF obtained using this validated protocol in clinical settings, our study

offers an easy to implement, cost effective, and standardized technical option that is part of a global strategy aimed at promoting SVF-based cell therapy and favoring patients' access to medical innovations.

Studies	SVF extraction method	Number of batches	Viability (%)	Yield of VNCs ($\times 1E+05/mL$ AT)
[45]	Non-automated	18	93.90	4.00
[46]	Non-automated	44	> 50.00	3.08
[47]	Non-automated	11	>90.00	1.60
	Sepax		>90.00	2.60
[41]	Non-automated	6	82.40	7.01
	Icellator		80.70	7.02
[48]	Celution	5	93.00	2.40
	Lipokit		72.00	0.35
	PNC Multistation		57.00	1.70
	CHA-Station		87.00	0.05
[49]	Celution	31	87.70	3.60
[50]	Non-automated	130	85.05	1.81
[51]	Non-automated	9	80-90	2.30
[52]	GID SVF1	52	83.00	7.19
[53]	Non-automated	11	96.00	2.05
[39]	Non-automated	4	75.80	7.95
	GID SVF1		81.47	4.25
	Non-automated (Puregraft)		77.45	2.50
	Stem.pras with Duografter		69.30	5.35
[54]	Non-automated	19	82.20	1.85

Table 3. Yield recovery and viability from 12 SVF extraction studies. Studies that reported both viability and yield recovery after enzymatic digestion were selected. The reference of the study is provided in the first column. The method of SVF extraction is reported in the second column; if an automated or medical device was used, it is specified. The third column shows the number of batches on which the results were evaluated. The two last columns indicate the percentage of viability and yield recovery per mL of AT. It is important to note that the determination of viability and recovery yield were not conducted by the same method in each study. Comparison with the LG protocol was conducting using the inter-donor comparison value.

5. Patents



STEPS	GMP COMPLIANCE ENDPOINTS
<p>A : Harvesting B : Adipose tissue washing C : Addition of enzyme D : Enzymatic digestion E : Environmental monitoring (air) F and G : Filtration of debris H : SVF washing I : Finished ATMP J : Sterility testing K : Environmental monitoring (surfaces)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Standardized aseptic harvesting method : innovative closed devices, strict skin asepsis protocol, surgeons training • Habilitated staff for aseptic operations • Management of critical aseptic operations : inoculation in class A area previously validated by media process test • Qualification of raw materials and relevant equipment : qualified and cleaned (monitored chamber) • In process air controls of aseptic premises : qualification of classrooms (particles count and microbial load in the air) • Classical operation in a dedicated room to avoid cross-contamination • Management of impurities in the biological product : validation of no residual collagenase • Filled optimized aseptic primary packaging and labelling to maintain stability before batch release • Quality controls on the final product : examples of the sterility testing validation (unavailable before batch release) • In process surface controls of aseptic premises : example of fingerprints on contact plates

Figure S1: Illustration of the LG protocol and GMP compliance inputs.

Specificity	Fluorochrome	Supplier	Reference	Volume
CD90	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Beckman Coulter	IM1839U	10 μ L
CD146	Phycoerythrin (PE)	Beckman Coulter	PN A07483	10 μ L
CD34	Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)	Beckman Coulter	IM2709U	10 μ L
CD45	Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PC5)	Beckman Coulter	A07785	10 μ L
DRAQ5	NA	eBioscience	65-0880-96	10 μ L (diluted 25-fold)
NucBlue	NA	Thermo Fisher Scientific	R37606	5 μ L

Table S1. References for antibodies used in SVF phenotypical characterization. NA : Not applicable.

Risks	Risk management actions		Risk level		Conclusion
	Celution	LG	Celution	LG	
Lack of control over the quality of raw materials (consumables)	- Little control on the supplier - Inspection upon receipt of consumables	- Possibility of auditing supplier - Inspection upon receipt of consumables - Quality control on the enzyme	High risk	Low risk	Lower risk for the LG protocol
Lack of control over the quality of adipose tissue collection	- Enhanced skin asepsis at the sampling site - Sampling performed by experienced senior surgeons		Moderate risk	Moderate risk	Equivalent risk
Lack of quality control of equipment: equipment / device	Annual audit	Annual critical equipment qualification	Moderate risk	Low risk	Lower risk for the LG protocol
Lack of control of the manufacturing process	Enzymatic digestion efficiency		Moderate risk	Low risk	Lower risk for the LG protocol because use of a monitored thermostatic chamber
	Reproducibility data and validation data		Low risk	Moderate risk	Lower risk for the Celution protocol because he experience gained with the Celution process is older and more important in terms of number of batches produced
	Aseptic validations (media process test)		Low risk	Low risk	Equivalent risk
Lack of control over the quality of the active substance and finished product	Comparability data		Low risk	Low risk	Equivalent risk
Lack of control of environmental risk	Use of the device in class B (semi-open system): not compliant	Semi-open phases in class A and closed phases in class B: compliant	High risk	Low risk	Lower risk for the LG protocol

Table S2: Risk analysis between Celution and LG processes. The risk analysis was performed by the person in charge of quality control and validated by the French national medicines' safety agency as part of a comparability study.

This research received no external funding.

The authors declare no conflict of interest.

- [1] Mojallal A, Foyatier J-L. Historique de l'utilisation du tissu adipeux comme produit de comblement en chirurgie plastique. *Ann Chir Plast Esthét* 2004;49:419–25. <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2004.08.004>.
- [2] Clauser L, Zavan B, Galiè M, Di Vittorio L, Gardin C, Bianchi AE. Autologous Fat Transfer for Facial Augmentation: Surgery and Regeneration. *J Craniofac Surg* 2019;30:682–5. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000005257>.
- [3] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–95. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>.
- [4] Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005;54:132–41. <https://doi.org/10.2302/kjm.54.132>.
- [5] Rodriguez LV, Alfonso Z, Zhang R, Leung J, Wu B, Ignarro LJ. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:12167–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604850103>.
- [6] Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Vitro and in Vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:763–9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6270>.
- [7] Shang T, Li S, Zhang Y, Lu L, Cui L, Guo FF. Hypoxia promotes differentiation of adipose-derived stem cells into endothelial cells through demethylation of ephrinB2. *Stem Cell Res Ther* 2019;10. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1233-x>.
- [8] Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives. *Circulation* 2004;109:656–63. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61>.
- [9] Dubey N, Mishra V, Dubey R, Deng Y-H, Tsai F-C, Deng W-P. Revisiting the Advances in Isolation, Characterization and Secretome of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2018;19:2200. <https://doi.org/10.3390/ijms19082200>.
- [10] Kwon HM, Hur S-M, Park K-Y, Kim C-K, Kim Y-M, Kim H-S, et al. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 2014;63:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.06.004>.
- [11] Gneocchi M, Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. In: Gneocchi M, editor. *Mesenchymal Stem Cells*, vol. 1416, New York, NY: Springer New York; 2016, p. 123–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_7.
- [12] L. PK, Kandoi S, Misra R, S. V, K. R, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev* 2019;46:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>.
- [13] Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* 2014;12. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>.
- [14] Ferrin I, Beloqui I, Zabaleta L, Salcedo JM, Trigueros C, Martin AG. Isolation, Culture, and Expansion of Mesenchymal Stem Cells. In: Crook JM, Ludwig TE, editors. *Stem Cell Bank*, vol. 1590, New York, NY: Springer New York; 2017, p. 177–90. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6921-0_13.
- [15] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013;15:641–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>.
- [16] Desando G, Bartolotti I, Martini L, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, Fini M, et al. Regenerative Features of Adipose Tissue for Osteoarthritis Treatment in a Rabbit Model: Enzymatic Digestion Versus Mechanical Disruption. *Int J Mol Sci* 2019;20:2636. <https://doi.org/10.3390/ijms20112636>.
- [17] Choi JS, Chae D-S, Ryu HA, Kim S-W. Transplantation of human adipose tissue derived-SVF enhance liver function through high anti-inflammatory property. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 2019;1864:158526. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158526>.
- [18] Lander EB, Berman MH, See JR. Personal cell therapy for interstitial cystitis with autologous stromal vascular fraction stem cells. *Ther Adv Urol* 2019;11:175628721986859. <https://doi.org/10.1177/1756287219868590>.
- [19] Andia I, Maffulli N, Burgos-Alonso N. Stromal vascular fraction technologies and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther* 2019; 19:1289–305. <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1671970>.

- [20] Magalon J, Velier M, Simoncini S, François P, Bertrand B, Daumas A, et al. Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2019;78:391–8. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214218>.
- [21] Granel B, Daumas A, Jouve E, Harlé J-R, Nguyen P-S, Chabannon C, et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Ann Rheum Dis* 2015;74:2175–82. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205681>.
- [22] Mehranfar S, Abdi Rad I, Mostafavi E, Akbarzadeh A. The use of stromal vascular fraction (SVF), platelet-rich plasma (PRP) and stem cells in the treatment of osteoarthritis: an overview of clinical trials. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol* 2019;47:882–90. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1576710>.
- [23] Usuelli FG, Grassi M, Maccario C, Viganò M, Lanfranchi L, Alfieri Montrasio U, et al. Intratendinous adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) injection provides a safe, efficacious treatment for Achilles tendinopathy: results of a randomized controlled clinical trial at a 6-month follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2018;26:2000–10. <https://doi.org/10.1007/s00167-017-4479-9>.
- [24] Comella K, Parceró J, Bansal H, Perez J, Lopez J, Agrawal A, et al. Effects of the intramyocardial implantation of stromal vascular fraction in patients with chronic ischemic cardiomyopathy. *J Transl Med* 2016;14. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0918-5>.
- [25] Dubey N, Mishra V, Dubey R, Deng Y-H, Tsai F-C, Deng W-P. Revisiting the Advances in Isolation, Characterization and Secretome of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2018;19:2200. <https://doi.org/10.3390/ijms19082200>.
- [26] Eglinger J, Karsjens H, Lammert E. Quantitative assessment of angiogenesis and pericyte coverage in human cell-derived vascular sprouts. *Inflamm Regen* 2017;37. <https://doi.org/10.1186/s41232-016-0033-2>.
- [27] Galiano RD, Michaels VJ, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen* 2004;12:485–92. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x>.
- [28] Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther* 2017;8. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0598-y>.
- [29] Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji H-L, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016;7:e2062–e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>.
- [30] Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *J Clin Med* 2019;8:1025. <https://doi.org/10.3390/jcm8071025>.
- [31] Maria ATJ, Toupet K, Maumus M, Fonteneau G, Le Quellec A, Jorgensen C, et al. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *J Autoimmun* 2016;70:31–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.03.013>.
- [32] Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/Pericyte Interactions. *Circ Res* 2005;97:512–23. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>.
- [33] Sun Y, Chen S, Zhang X, Pei M. Significance of Cellular Cross-Talk in Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue in Neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39:1034–44. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312425>.
- [34] Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, et al. Novel Autologous Cell Therapy in Ischemic Limb Disease Through Growth Factor Secretion by Cultured Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2542–7. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000190701.92007.6d>.
- [35] Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation* 2004;109:1292–8. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1>.
- [36] Lee SJ, Lee CR, Kim KJ, Ryu YH, Kim E, Han YN, et al. Optimal Condition of Isolation from an Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction for the Development of Automated Systems. *Tissue Eng Regen Med* 2020;17:203–8. <https://doi.org/10.1007/s13770-019-00238-3>.
- [37] Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regen* 2015;4:4:7. <https://doi.org/10.1186/s13619-015-0020-0>.
- [38] Domenis R, Lazzaro L, Calabrese S, Mangoni D, Gallelli A, Bourkoula E, et al. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:2. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0536-6>.

- [39] Rodriguez J, Pratta A-S, Abbassi N, Fabre H, Rodriguez F, Debard C, et al. Evaluation of Three Devices for the Isolation of the Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissue and for ASC Culture: A Comparative Study. *Stem Cells Int* 2017;2017:1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/9289213>.
- [40] Gentile P, Scioli MG, Orlandi A, Cervelli V. Breast Reconstruction with Enhanced Stromal Vascular Fraction Fat Grafting: What Is the Best Method? *Plast Reconstr Surg - Glob Open* 2015;3:e406. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000000285>.
- [41] Doi K, Tanaka S, Iida H, Eto H, Kato H, Aoi N, et al. Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automated processing system: bench and bed analysis: SVF from lipoaspirates using automated processing. *J Tissue Eng Regen Med* 2013;7:864–70. <https://doi.org/10.1002/term.1478>.
- [42] Güven S, Karagianni M, Schwalbe M, Schreiner S, Farhadi J, Bula S, et al. Validation of an Automated Procedure to Isolate Human Adipose Tissue-Derived Cells by Using the Sepax® Technology. *Tissue Eng Part C Methods* 2012;18:575–82. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0617>.
- [43] Kim SK. Adipose Stromal Vascular Fraction Isolation: A Head-to-Head Comparison of Four Commercial Cell Separation Systems. *Plast Reconstr Surg* 2014;133:889e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000000188>.
- [44] Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus* 2015;4. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1509-2>.
- [45] Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YDC, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 2004;6:7–14. <https://doi.org/10.1080/14653240310004539>.
- [46] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *STEM CELLS* 2006;24:376–85. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0234>.
- [47] Güven S, Karagianni M, Schwalbe M, Schreiner S, Farhadi J, Bula S, et al. Validation of an Automated Procedure to Isolate Human Adipose Tissue-Derived Cells by Using the Sepax® Technology. *Tissue Eng Part C Methods* 2012;18:575–82. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0617>.
- [48] Aronowitz JA, Ellenhorn JDI. Adipose Stromal Vascular Fraction Isolation: A Head-to-Head Comparison of Four Commercial Cell Separation Systems. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:932e-939e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182a80652>.
- [49] Fraser JK, Hicok KC, Shanahan R, Zhu M, Miller S, Arm DM. The Celution® System: Automated Processing of Adipose-Derived Regenerative Cells in a Functionally Closed System. *Adv Wound Care* 2014;3:38–45. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0408>.
- [50] Minonzio G, Corazza M, Mariotta L, Gola M, Zanzi M, Gandolfi E, et al. Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. *Cryobiology* 2014;69:211–6. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.005>.
- [51] Condé-Green A, Rodriguez RL, Slezak S, Singh DP, Goldberg NH, McLenithan J. Comparison between Stromal Vascular Cells' Isolation with Enzymatic Digestion and Mechanical Processing of Aspirated Adipose Tissue: *Plast Reconstr Surg* 2014;134:54. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000455394.06800.62>.
- [52] Dos-Anjos Vilaboa S, Navarro-Palou M, Llull R. Age influence on stromal vascular fraction cell yield obtained from human lipoaspirates. *Cytotherapy* 2014;16:1092–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.02.007>.
- [53] SundarRaj S, Deshmukh A, Priya N, Krishnan VS, Cherat M, Majumdar AS. Development of a System and Method for Automated Isolation of Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissue Lipoaspirate. *Stem Cells Int* 2015;2015. <https://doi.org/10.1155/2015/109353>.
- [54] Agostini F, Rossi FM, Aldinucci D, Battiston M, Lombardi E, Zanolin S, et al. Improved GMP compliant approach to manipulate lipoaspirates, to cryopreserve stromal vascular fraction, and to expand adipose stem cells in xeno-free media. *Stem Cell Res Ther* 2018;9. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0886-1>.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Commentaire de l'article

L'applicabilité des BPF au procédé manuel d'extraction de la FVS présenté, dénommé LG protocole, a été intégrée dès son développement.

Le management qualité de ce procédé a permis notamment de construire un logigramme de fabrication (*cf.* Figure 25) identifiant principalement :

- Les étapes techniques de la production
- Les contrôles qualité de méthodes analytiques et critères d'acceptation associés de la matière première jusqu'au produit fini
- L'environnement de fabrication requis pour chaque étape selon sa criticité (en termes de classes de propreté microbiologique et particulière de la ZAC dites « A » ou « B » ou « C »)
- la nature et le positionnement au cours du procédé des contrôles microbiologiques environnementaux en cours de procédé ou « *in process* » (empreintes de gants, géloses de surface, impactage et sédimentation d'air)

L'analyse de risques du produit fini et du procédé de fabrication a permis de conclure à un risque globalement faible tant sur le plan clinique (administration locale de la FVS) que sur le plan technique (étapes critiques en système fermé ou maîtrisées par l'environnement). La qualité et la sécurité de chaque lot sont maîtrisées par la réalisation de contrôles qualité dont la conformité conditionne la libération pharmaceutique du lot.

Une attention particulière est portée sur la qualité microbiologique et aéraulique de l'environnement de production maîtrisée par une zone de production, dite ZAC, qui permet le confinement des zones les plus propres grâce à une surpression progressive et une filtration de l'air croissante. Celle-ci fait l'objet de campagnes de surveillances régulières et de qualification en cours de procédé de fabrication devant être conformes en termes de (1) concentrations maximales particulières admissibles au repos ou en activité ; (2) de concentrations de flore admissible. Selon la classe de propreté revendiquée, des règles d'exploitation doivent être strictement respectées pour garantir la conformité dont des règles d'habillement, choix des équipements, habilitation du personnel, choix des matières premières et consommables, bio nettoyage adapté, circuits d'entrée et flux maîtrisé, etc. L'ensemble des modalités d'exploitation d'une ZAC doit intégrer la maîtrise de la contamination.

De plus conformément aux BPF, une validation aseptique initiale de ce procédé a été réalisée grâce à des tests de simulation en présence de milieu de culture microbiologiquement sensible (*media process test*). Cette validation aseptique permet de garantir la sécurité microbiologique de la séquence des étapes réalisées dans un environnement défini et par du personnel formé et habilité.

Ce procédé a été autorisé par l'ANSM en septembre 2019 pour son utilisation thérapeutique dans le cadre de l'essai clinique Adicrohn II (EudraCT : 2019-00194821), essai randomisé en double-aveugle testant l'efficacité d'une co-administration de FVS et micrograisse autologues *versus* placebo dans la fermeture des fistules périanales de la maladie de Crohn.

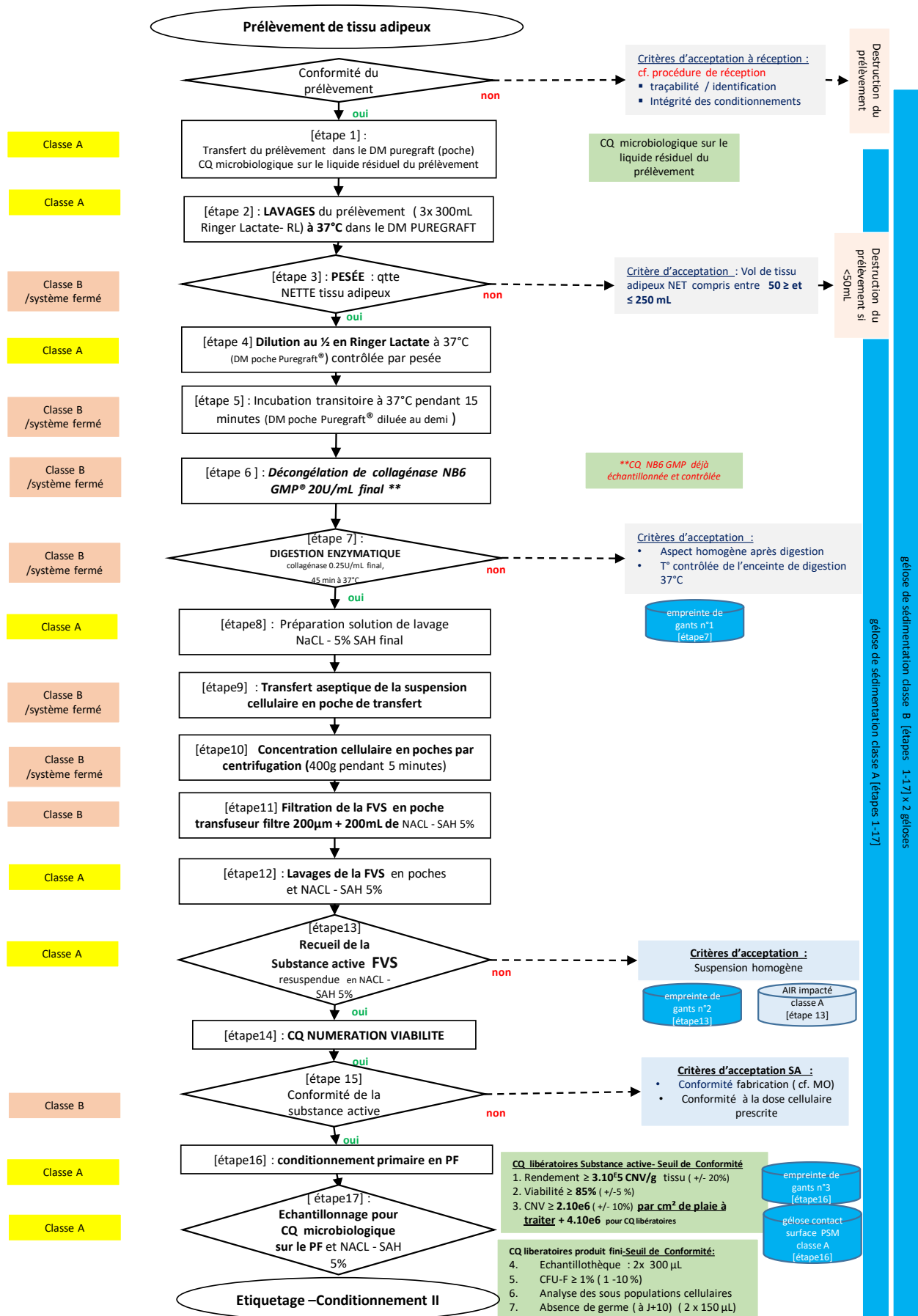


Figure 25 : Logigramme du protocole LG

Conclusions et Perspectives

Régénérer les tissus et reconstituer les organes endommagés, c'est une idée qui prend ses racines aux confins de la mythologie grecque à l'image de l'Hydre de Lerne que combat Hercule pour le deuxième de ses douze travaux, chaque fois qu'une de ses multiples têtes est coupée, plusieurs autres repoussent. Ou encore avec Prométhée condamné par Zeus à être enchaîné au mont Caucase et à voir, chaque jour, un aigle dévorer son foie, celui-ci se régénérant chaque nuit, l'éternelle punition pouvant recommencer. Du plus profond de la mythologie à la filmographie la plus futuriste, la médecine régénérative peuplent les esprits. Bien loin de la science-fiction, cette thérapie est, pourtant, déjà bien réelle.

Parmi les thérapies de médecine régénérative, la FVS connaît un engouement international basé sur son caractère autologue, son accessibilité grâce à un geste peu invasif ainsi que sa richesse en cellules souches et progéniteurs à l'origine de l'effet synergique de ses propriétés thérapeutiques. Bien que l'intégralité des mécanismes d'action de ce produit ne soient pas entièrement élucidés, son procédé d'obtention, ne nécessitant pas d'expansion *in vitro*, fait rapidement l'objet d'une automatisation. Ce type de production permet une reproductibilité certaine ainsi qu'une maîtrise du protocole appréciable et ces dispositifs, employés directement au bloc opératoire, pourraient contribuer à réduire le temps de fabrication.

Pourtant la démocratisation de la production automatisée de FVS tarde. D'une part la production est désormais soumise à l'application d'un référentiel pharmaceutique, les BPF, qui restreint considérablement le contexte d'usage des automates. D'autre part, le coût non négligeable des automates et des consommables à usage unique nécessaires freine leur diffusion. Ainsi, coexistent méthodes manuelles et méthodes automatiques. Le résultat est un manque de standardisation des pratiques alors même que le protocole de fabrication en lui-même influence la qualité du produit fini.

Dans ce contexte, le développement de notre procédé d'extraction de FVS a permis de sélectionner les paramètres permettant d'obtenir une substance active de la meilleure qualité possible, c'est-à-dire composée d'une proportion importante en cellules régénératives, sans impuretés, stérile et présentant un rendement optimal. Le produit obtenu a démontré sa comparabilité par rapport au procédé pris comme référence. Ce protocole respecte scrupuleusement les BPF et pourrait être proposé en alternative d'automates dont l'usage est compliqué à réaliser dans cette conjoncture réglementaire.

Ce projet de thèse s'inscrit dans une démarche très actuelle, illustré par quelques articles récents^{109,110}, de compréhension de l'influence de chaque paramètre, chaque facteur, chaque manipulation sur le produit fini. Cette approche internationale laisse entrevoir la possibilité d'une standardisation globale de la production de FVS. Les défis sont encore nombreux avant d'aboutir à une indication systématique de la FVS en pratique clinique. Un autre point essentiel est la détermination fonctionnelle des propriétés thérapeutiques. Dans l'article, le concept d'un test d'évaluation de l'activité angiogénique de la FVS est introduit. Le but ultime d'une standardisation globale serait d'être en mesure d'évaluer l'efficacité potentielle de la thérapie, et pourquoi pas d'identifier des « répondeurs » avant toute production.

Références Bibliographiques

1. Gerald, M. C., Gerald, G. E. & Bambaggi, J. *Le beau livre de la biologie: de l'origine de la vie à la génomique*. (Dunod, 2015).
2. Müller-Wille, S. Cell Theory, Specificity, and Reproduction, 1837–1870. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **41**, 225–231 (2010).
3. *Code de la santé publique - Article L1243-1. Code de la santé publique vols L1243-1.*
4. Sander, K. & Faessler, P. E. Introducing the Spemann-Mangold organizer: experiments and insights that generated a key concept in developmental biology. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 1–11 (2001).
5. Magalon, J. *et al.* Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018. *Rev. Francoph. Lab.* **2018**, 34–43 (2018).
6. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. & Rybak, Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, (2019).
7. Thomson, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
8. *LOI n° 2013-715 du 6 août 2013 tendant à modifier la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique en autorisant sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires. 2013-715* (2013).
9. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
10. Wagers, A. J. & Weissman, I. L. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* **116**, 639–648 (2004).
11. Singh, H. *et al.* Manufacture of Clinical-Grade CD19-Specific T Cells Stably Expressing Chimeric Antigen Receptor Using Sleeping Beauty System and Artificial Antigen Presenting Cells. *PLoS ONE* **8**, (2013).
12. Hartmann, J., Schüssler-Lenz, M., Bondanza, A. & Buchholz, C. J. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol. Med.* **9**, 1183–1197 (2017).
13. Zuk, P. A. *et al.* Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).

14. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
15. Gesta, S., Tseng, Y.-H. & Kahn, C. R. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* **131**, 242–256 (2007).
16. Hausman, D. B., DiGirolamo, M., Bartness, T. J., Hausman, G. J. & Martin, R. J. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes. Rev.* **2**, 239–254 (2001).
17. Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C. & Lima, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J. Pediatr. (Rio J.)* **0**, (2007).
18. Ailhaud, G. L'adipocyte, cellule sécrétrice et endocrine. *médecine/sciences* **14**, 858 (1998).
19. Hauner, H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol. Behav.* **83**, 653–658 (2004).
20. Lemoine, A. Y., Ledoux, S. & Larger, E. Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thromb. Haemost.* **110**, 661–668 (2013).
21. Bajek, A. *et al.* Does the Harvesting Technique Affect the Properties of Adipose-Derived Stem Cells?-The Comparative Biological Characterization: I NFLUENCE OF H ARVESTING M ETHOD ON P ROPERTIED OF ADSCs. *J. Cell. Biochem.* **118**, 1097–1107 (2017).
22. Bourin, P. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **15**, 641–648 (2013).
23. Brown, C. *et al.* Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **13**, 1738–1755 (2019).
24. Horwitz, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393–395 (2005).
25. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).

26. Strem, B. M. *et al.* Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.* **54**, 132–141 (2005).
27. Kapur, S. K. & Katz, A. J. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie* **95**, 2222–2228 (2013).
28. Planat-Benard, V. *et al.* Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives. *Circulation* **109**, 656–663 (2004).
29. da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T. & Caplan, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 419–427 (2009).
30. Asahara, T. *et al.* Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* **275**, 964–966 (1997).
31. Kawamoto, A., Asahara, T. & Losordo, D. W. Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Cardiovasc. Radiat. Med.* **3**, 221–225 (2002).
32. Zaccone, V. *et al.* Focus on biological identity of endothelial progenitors cells. **17**.
33. Yoder, M. C. *et al.* Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* **109**, 1801–1809 (2007).
34. Tasev, D., Koolwijk, P. & van Hinsbergh, V. W. M. Therapeutic Potential of Human-Derived Endothelial Colony-Forming Cells in Animal Models. *Tissue Eng. Part B Rev.* **22**, 371–382 (2016).
35. Au, P. *et al.* Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood* **111**, 1302–1305 (2008).
36. Guillevic, O. *et al.* A Novel Molecular and Functional Stemness Signature Assessing Human Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cell Immaturity. *PLoS ONE* **11**, (2016).
37. Ponio, J. B.-D. *et al.* Instruction of Circulating Endothelial Progenitors In Vitro towards Specialized Blood-Brain Barrier and Arterial Phenotypes. *PLoS ONE* **9**, (2014).

38. Bertelsen, L. B. *et al.* Are endothelial outgrowth cells a potential source for future re-vascularization therapy? *Exp. Gerontol.* **58**, 132–138 (2014).
39. Mund, J. A., Estes, M. L., Yoder, M. C., Ingram, D. A. & Case, J. Flow Cytometric Identification and Functional Characterization of Immature and Mature Circulating Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1045–1053 (2012).
40. Yoder, M. C. Is Endothelium the Origin of Endothelial Progenitor Cells? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1094–1103 (2010).
41. Schneller, D. *et al.* Cytokine-Like 1 Is a Novel Proangiogenic Factor Secreted by and Mediating Functions of Endothelial Progenitor Cells. *Circ. Res.* **124**, 243–255 (2019).
42. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol. Histopathol.* 909–969 (2009) doi:10.14670/HH-24.909.
43. Tallone, T. *et al.* Adult human adipose tissue contains several types of multipotent cells. *J Cardiovasc. Transl. Res.* **4**, 200–210 (2011).
44. Bi, H. *et al.* Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, (2019).
45. Traktuev, D. O. *et al.* Robust Functional Vascular Network Formation In Vivo by Cooperation of Adipose Progenitor and Endothelial Cells. *Circ. Res.* **104**, 1410–1420 (2009).
46. Kamat, P. *et al.* Adipose tissue and the vascularization of biomaterials: stem cells, microvascular fragments and nanofat—a review. *Cytotherapy* (2020) doi:10.1016/j.jcyt.2020.03.433.
47. Guo, J. *et al.* Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **69**, 180–188 (2016).
48. Wu, Y. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int. Wound J.* **11**, 701–710 (2014).
49. Décret n° 2016-1536 du 15 novembre 2016 relatif aux médicaments de thérapie innovante. 2016-1536 (2016).
50. 2017_11_22_guidelines_gmp_for_atmps.pdf.

51. Reflection paper on classification of advanced therapy medicinal products. 19.
52. scientific-recommendation-classification-advanced-therapy-medicinal-products-sterile-suspension_en.pdf.
53. Scientific recommendation on classification of adv.pdf.
54. Scientific recommendation on classification of advanced therapy medicinal products. 2.
55. Buschmann, J. *et al.* Yield and proliferation rate of adipose-derived stromal cells as a function of age, body mass index and harvest site—increasing the yield by use of adherent and supernatant fractions? *Cytotherapy* **15**, 1098–1105 (2013).
56. Travnickova, M. *et al.* The Influence of Negative Pressure and of the Harvesting Site on the Characteristics of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells from Lipoaspirates. *Stem Cells Int.* **2020**, (2020).
57. Nie, H. *et al.* Effect of Lidocaine on Viability and Gene Expression of Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells: An in vitro Study. *PM&R* **11**, 1218–1227 (2019).
58. Tonnard, P. *et al.* Nanofat Grafting: Basic Research and Clinical Applications. *Plast. Reconstr. Surg.* **132**, 1017–1026 (2013).
59. Osinga, R. *et al.* Effects of Intersyringe Processing on Adipose Tissue and Its Cellular Components: Implications in Autologous Fat Grafting. *Plast. Reconstr. Surg.* **135**, 1618–1628 (2015).
60. Bertheuil, N. *et al.* Adipose mesenchymal stromal cells: Definition, immunomodulatory properties, mechanical isolation and interest for plastic surgery. *Ann. Chir. Plast. Esthét.* (2018) doi:10.1016/j.anplas.2018.07.005.
61. Shaker, R. F., Abdel Aal, A. R. M., El Gazzar, K. M. A., Abu Zahra, F. A. K. & Elshahat, A. In Vitro Comparative Study of Emulsified Fat Grafts. *Eplasty* **20**, e1 (2020).
62. Xiong, S., Yi, C. & Pu, L. L. Q. An Overview of Principles and New Techniques for Facial Fat Grafting. *Clin. Plast. Surg.* **47**, 7–17 (2020).
63. van Dongen, J. A. *et al.* Comparison of intraoperative procedures for isolation of clinical grade stromal vascular fraction for regenerative purposes: a systematic

- review: Intraoperative procedures for stromal vascular fraction isolation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, e261–e274 (2018).
64. Senesi, L. *et al.* Mechanical and Enzymatic Procedures to Isolate the Stromal Vascular Fraction From Adipose Tissue: Preliminary Results. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, (2019).
 65. Condé-Green, A. *et al.* Comparison between Stromal Vascular Cells' Isolation with Enzymatic Digestion and Mechanical Processing of Aspirated Adipose Tissue: *Plast. Reconstr. Surg.* **134**, 54 (2014).
 66. Condé-Green, A. Shift toward Mechanical Isolation of Adipose-derived Stromal Vascular Fraction: Review of Upcoming Techniques. **9** (2016).
 67. Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A. & Hakakian, C. S. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus* **4**, (2015).
 68. Oberbauer, E. *et al.* Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regen.* **4**, 4:7 (2015).
 69. Gentile, P. *et al.* Impact of the Different Preparation Methods to Obtain Human Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells (AD-SVFs) and Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (AD-MSCs): Enzymatic Digestion Versus Mechanical Centrifugation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 70. Aust, L. *et al.* Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* **6**, 7–14 (2004).
 71. Yoshimura, K. *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* **208**, 64–76 (2006).
 72. Mitchell, J. B. *et al.* Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *STEM CELLS* **24**, 376–385 (2006).
 73. Baptista, L. S. *et al.* An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy* **11**, 706–715 (2009).
 74. Suga, H. *et al.* Adipose Tissue Remodeling under Ischemia: Death of Adipocytes and Activation of Stem/Progenitor Cells: *Plast. Reconstr. Surg.* **126**, 1911–1923 (2010).

75. Güven, S. *et al.* Validation of an Automated Procedure to Isolate Human Adipose Tissue-Derived Cells by Using the Sepax® Technology. *Tissue Eng. Part C Methods* **18**, 575–582 (2012).
76. Doi, K. *et al.* Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automated processing system: bench and bed analysis. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **7**, 864–870 (2013).
77. Bianchi, F. *et al.* A New Nonenzymatic Method and Device to Obtain a Fat Tissue Derivative Highly Enriched in Pericyte-Like Elements by Mild Mechanical Forces from Human Lipoaspirates. *Cell Transplant.* **22**, 2063–2077 (2013).
78. Shah, F. S., Wu, X., Dietrich, M., Rood, J. & Gimble, J. M. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytotherapy* **15**, 979–985 (2013).
79. Markarian, C. F. *et al.* Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnol. Lett.* **36**, 693–702 (2014).
80. Minonzio, G. *et al.* Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. *Cryobiology* **69**, 211–216 (2014).
81. Millan, A., Landerholm & Chapman. Comparison between collagenase adipose digestion and Stromacell mechanical dissociation for mesenchymal stem cell separation.
82. SundarRaj, S. *et al.* Development of a System and Method for Automated Isolation of Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissue Lipoaspirate. *Stem Cells Int.* **2015**, (2015).
83. Chaput, B. *et al.* Mechanically Isolated Stromal Vascular Fraction Provides a Valid and Useful Collagenase-Free Alternative Technique: A Comparative Study. *Plast. Reconstr. Surg.* **138**, 807–819 (2016).
84. Amirkhani, M. A., Mohseni, R., Soleimani, M., Shoaie-Hassani, A. & Nilforoushzadeh, M. A. A rapid sonication based method for preparation of stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells from fat tissue. *BioImpacts* **6**, 99–104 (2016).
85. Rodriguez, J. *et al.* Evaluation of Three Devices for the Isolation of the Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissue and for ASC Culture: A Comparative Study. *Stem Cells Int.* **2017**, 1–14 (2017).

86. Vezzani, B. *et al.* Higher Pericyte Content and Secretory Activity of Microfragmented Human Adipose Tissue Compared to Enzymatically Derived Stromal Vascular Fraction: Microfragmented Adipose Tissue Secretory Activity. *STEM CELLS Transl. Med.* **7**, 876–886 (2018).
87. Agostini, F. *et al.* Improved GMP compliant approach to manipulate lipoaspirates, to cryopreserve stromal vascular fraction, and to expand adipose stem cells in xeno-free media. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, (2018).
88. El-Habta, R., Sloniecka, M., Kingham, P. J. & Backman, L. J. The adipose tissue stromal vascular fraction secretome enhances the proliferation but inhibits the differentiation of myoblasts. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, (2018).
89. Romanov, Yu. A., Darevskaya, A. N., Merzlikina, N. V. & Buravkova, L. B. Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue: Isolation, Characterization, and Differentiation Potentialities. *Bull. Exp. Biol. Med.* **140**, 138–143 (2005).
90. Rapisio, E., Caruana, G., Bonomini, S. & Libondi, G. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plast. Reconstr. Surg.* **133**, 1406–1409 (2014).
91. Aronowitz, J. A. & Ellenhorn, J. D. I. Adipose Stromal Vascular Fraction Isolation: A Head-to-Head Comparison of Four Commercial Cell Separation Systems. *Plast. Reconstr. Surg.* **132**, 932e–939e (2013).
92. Fraser, J. K. *et al.* The Celution[®] System: Automated Processing of Adipose-Derived Regenerative Cells in a Functionally Closed System. *Adv. Wound Care* **3**, 38–45 (2014).
93. Domenis, R. *et al.* Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 2 (2015).
94. Granel, B. *et al.* Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 2175–2182 (2015).
95. Zimmerlin, L. *et al.* Human Adipose Stromal Vascular Cell Delivery in a Fibrin Spray. *Cytherapy* **15**, 102–108 (2013).

96. Dos-Anjos Vilaboa, S., Navarro-Palou, M. & Llull, R. Age influence on stromal vascular fraction cell yield obtained from human lipoaspirates. *Cytotherapy* **16**, 1092–1097 (2014).
97. Song, J. I., Volz, S., Liadaki, M. E., Mailänder, P. & Kalousis, K. Stem cells therapy: the future in the management of systemic sclerosis? A case report. *Hell. J. Nucl. Med.* **20 Suppl**, 164 (2017).
98. Lin, R.-Z. *et al.* Human white adipose tissue vasculature contains endothelial colony-forming cells with robust in vivo vasculogenic potential. *Angiogenesis* **16**, 735–744 (2013).
99. Marino, G. *et al.* Therapy with autologous adipose-derived regenerative cells for the care of chronic ulcer of lower limbs in patients with peripheral arterial disease. *J. Surg. Res.* **185**, 36–44 (2013).
100. Onoi, Y. *et al.* Second-look arthroscopic findings of cartilage and meniscus repair after injection of adipose-derived regenerative cells in knee osteoarthritis: Report of two cases. *Regen. Ther.* **11**, 212–216 (2019).
101. Yokota, N., Yamakawa, M., Shirata, T., Kimura, T. & Kaneshima, H. Clinical results following intra-articular injection of adipose-derived stromal vascular fraction cells in patients with osteoarthritis of the knee. *Regen. Ther.* **6**, 108–112 (2017).
102. Peltoniemi, H. H. *et al.* Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS* **66**, 1494–1503 (2013).
103. Choi, J. Y., Kim, T. H., Yang, J. D., Suh, J. S. & Kwon, T. G. Adipose-Derived Regenerative Cell Injection Therapy for Postprostatectomy Incontinence: A Phase I Clinical Study. *Yonsei Med. J.* **57**, 1152–1158 (2016).
104. Mizushima, T. *et al.* A clinical trial of autologous adipose-derived regenerative cell transplantation for a postoperative enterocutaneous fistula. *Surg. Today* **46**, 835–842 (2016).
105. Cicione, C. *et al.* In Vitro Validation of a Closed Device Enabling the Purification of the Fluid Portion of Liposuction Aspirates: *Plast. Reconstr. Surg.* **137**, 1157–1167 (2016).
106. Wang, L. *et al.* [Cell-assisted lipotransfer for breast augmentation: a report of 18 patients]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi Zhonghua Zhengxing Waikexue Zazhi Chin. J. Plast. Surg.* **28**, 1–6 (2012).

107. Ohashi, M., Yamakawa, M., Chiba, A., Nagano, H. & Nakai, H. Our Experience with 131 Cases of Simultaneous Breast Implant Exchange with Fat (SIEF). *Plast. Reconstr. Surg. - Glob. Open* **4**, 1 (2016).
108. *Evaluation de trois dispositifs d'extraction de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux.* (2016).
109. Li, Z. *et al.* The cell yields and biological characteristics of stromal/stem cells from lipoaspirate with different digestion loading ratio. *Cytotechnology* **72**, 203–215 (2020).
110. Lee, S. J. *et al.* Optimal Condition of Isolation from an Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction for the Development of Automated Systems. *Tissue Eng. Regen. Med.* **17**, 203–208 (2020).

Serment de Galien

*Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre
des pharmaciens et de mes condisciples :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de
leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec
conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les
règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade
et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes
connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes
criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes
promesses.*

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque