

Congrès AIME

Innovations en médecine régénérative en 2023

RÉSUMÉ: Le tissu adipeux est un élément clé de la médecine régénérative et de la chirurgie plastique. Ses applications cliniques sont multiples. Il a initialement été utilisé dans un but volumateur à travers l'utilisation des *lipofillings*, pour contrer les effets du vieillissement par exemple. Les techniques de *lipofilling* ont évolué notamment avec l'utilisation de nouveaux matériels, tels que des canules plus fines.

Plus récemment, il a été découvert que le tissu adipeux est un réservoir de cellules souches multipotentes facilement accessibles par lipoaspiration. C'est sur ce terrain que se développent les traitements d'aujourd'hui et de demain dans le domaine de la médecine régénérative.



T. QUENOT

Service de Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, hôpital Henri-Mondor, CRETEIL.

La chirurgie et la médecine régénérative constituent des domaines d'avenir à travers les produits dérivés du tissu adipeux, qui semblent prometteurs en termes de potentiel d'action grâce aux composés qu'ils détiennent. Le tissu adipeux se trouvant sous la peau contient en grande partie des adipocytes, ainsi qu'une partie vasculaire stromale qui contient elle-même des cellules souches.

La cellule adipocytaire stocke le lipide et on peut la transplanter d'un endroit à un autre, car elle est capable de communiquer avec les cellules environnantes et donc de s'implanter où l'on veut. Le tissu adipeux nous offre alors de nombreuses opportunités thérapeutiques en fonction de ses produits dérivés.

La macrograisse et la micrograisse

À travers l'usage de macrograisse et de micrograisse, les greffes autologues sont devenues la technique standard pour pouvoir avoir une action sur la trophicité cutanée et combler structurellement les défauts des tissus mous dans le cadre

du *lipofilling*, à partir des adipocytes qui sont volumateurs. Parmi ces adipocytes, que ce soit dans les macrograisse ou les micrograisse, se trouvent moins de 10 % des cellules de la fraction stromale vasculaire [1].

Depuis ses débuts dans les années 1990, la technique mise au point par Coleman a évolué. La macrograisse a une taille de 2 à 2,5 mm de diamètre, récoltée avec une canule de 3 mm, tandis que la micrograisse est caractérisée par une taille de 1 mm, récoltée avec une canule de 2,1 à 2,4 mm. L'injection de greffe de tissu adipeux obtenue par la technique modifiée utilise des canules de réinjection de 20, 23 ou 25 G, par rapport à une canule de 17 G pour la technique de Coleman (**fig. 1**). Cette greffe obtenue conserve une structure histologique normale et l'injection par microcanule prolonge l'application de la lipostructure aux couches superficielles de la peau [2].

Il est maintenant possible de prélever et de réinjecter des microparticules de greffe adipocytaire, dont la taille fait environ 0,6 mm et qui contiennent quelques centaines de cellules, et de

Congrès AIME

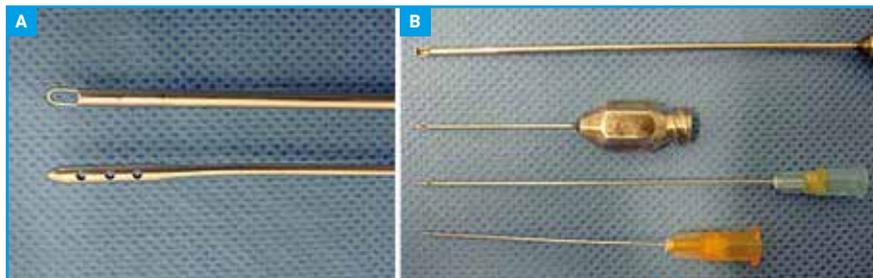


Fig. 1. A: Canule de prélèvement classique vs canule de prélèvement modifiée. **B:** Canule d'injection 17 G vs canules de micro-injection de 20, 23 et 25 G [2].

se rapprocher de la face superficielle de la peau sans aucun risque d'irrégularité. Ce nouveau procédé a été rendu possible grâce à l'évolution du matériel : les canules de prélèvement sont plus petites, de 2 mm de diamètre, les orifices de prélèvement sont inférieurs à 1 mm et les canules de réinjection font 0,8 mm de diamètre avec un orifice de même taille. La micrograisse, avec des lobules inférieurs au millimètre, présente l'intérêt de moins se résorber, d'après les travaux menés par Yoshimura, qui considère que la revascularisation est correcte jusqu'à 300 µm de la surface [3].

Concernant les méthodes de préparation, la décantation ou séparation par gravité est une méthode douce. La filtration lavage est une méthode importante, surtout lorsqu'elle se fait en circuit fermé, car cela permet d'éliminer les contaminants. Enfin, la centrifugation peut être réalisée, mais de manière moins traumatisante, de façon à ne pas abîmer la graisse, soit 1 000 tours/minute pendant maximum 20 secondes. Il apparaît que les greffons préparés par lavage avec filtration en système clos présentent une teneur significativement réduite en cellules sanguines et en lipides libres, et ont une viabilité tissulaire plus élevée avec une présence plus faible de contaminants, par rapport aux greffons préparés par les autres méthodes [4].

Le nanofat

La méthode du nanofat consiste en une liposuction suivie directement après

par une émulsification manuelle du tissu adipocytaire, réalisée mécaniquement par transferts répétés entre deux seringues de 10 cc connectées. Après une trentaine de passages, la graisse prend l'aspect d'une émulsion fluide. Elle sera ensuite filtrée au travers d'un tissu en nylon stérile de 500 µm. Elle peut être ensuite immédiatement réinjectée par une aiguille de 27 G. Le nanofat obtenu ne contient pas d'adipocyte, mais renferme ainsi de la fraction vasculaire stromale qui semble équivalente à celle obtenue par des techniques de digestion enzymatique du tissu adipeux, avec une quantité de cellules souches adipocytaires équivalente et sans différence d'un point de vue quantitatif et qualitatif [5].

Cette technique a été introduite par Tonnard et ses équipes en 2013 [6]. Cette greffe de nanograisse était utilisée pour le traitement et la correction de rides superficielles, de cicatrices et cernes au niveau des paupières inférieures chez certains patients. Les analyses de culture cellulaires réalisées en parallèle montraient une capacité de prolifération et de différenciation égale des cellules souches en comparaison avec la macrograisse et la micrograisse, et les patients présentaient des améliorations remarquables de la qualité de peau 6 mois après les injections. Aucune infection, kyste graisseux, granulome ou autre effet secondaire indésirable n'a été observé. Cliniquement, les nanograisses semblent donc convenir à des fins de rajeunissement et de régénération de la peau.

Le nanofat est une émulsification de tissu adipeux durant laquelle les adipocytes sont cassés manuellement pour récupérer, après filtration, la fraction vasculaire stromale pour s'échapper des contraintes du laboratoire. Il existe actuellement une grande confusion entre nanofat d'un côté et fraction vasculaire stromale et cellules souches adipocytaires de l'autre, qui sont forcément obtenues au laboratoire avec digestion enzymatique et culture cellulaire sous la réglementation du médicament.

La fraction vasculaire stromale

La fraction vasculaire stromale est un produit innovant de thérapie cellulaire issu du tissu adipeux, dont l'intérêt thérapeutique croît depuis une vingtaine d'années en médecine régénérative, mais également dans d'autres disciplines, tant ses propriétés sont multiples.

La fraction vasculaire stromale a été isolée et caractérisée au début des années 2000 par Zuk [7]. Il s'agit du tissu adipeux débarrassé des adipocytes contenant une majorité de cellules d'origine mésodermique ou mésenchymateuses. Ces cellules peuvent se différencier *in vitro* en cellules adipogéniques, chondrogéniques, myogéniques et ostéogéniques en présence de facteurs d'induction spécifiques aux lignées. Cette fraction de lipoaspiration adipocytaire contient donc des cellules multipotentes, qui peuvent représenter une source alternative de cellules souches aux cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (**fig. 2**).

La fraction vasculaire stromale comprend en plus des cellules souches stromales mésenchymateuses, des cellules progénitrices et des cellules d'origine hématopoïétiques, dont les macrophages qui vont sécréter des cytokines.

La fraction vasculaire stromale possède, *via* ses composantes, plusieurs propriétés biologiques d'intérêt :

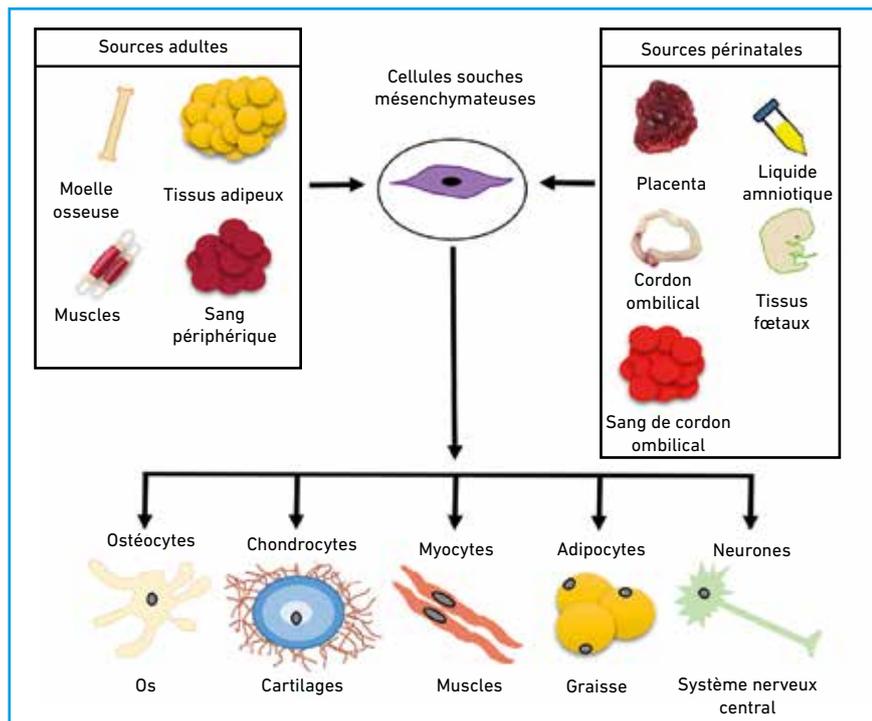


Fig. 2 : Les cellules souches mésenchymateuses : sources et potentiel de différenciation [8].

>>> **La régénération tissulaire**, via la multipotence des cellules souches et l'implication dans les processus de cicatrisation. Les cellules souches dérivées des adipocytes ont la capacité d'adopter le phénotype de myofibroblastes lors de lésions et ont la capacité de sécréter le collagène nécessaire à la formation de la matrice extracellulaire [9]. L'*epidermal growth factor* (EGF) est un facteur de croissance participant à la promotion de la migration et de la prolifération des fibroblastes et des kératinocytes, et contribue ainsi à la fermeture de la plaie. Les cellules de la fraction vasculaire stromale expriment fortement l'EGF [10].

>>> L'angiogenèse.

>>> **L'immunomodulation**, liée en partie aux cellules souches mésenchymateuses qui ont des propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptiques. La présence de lymphocytes T régulateurs au sein de la fraction stromale vasculaire, sécrétant des taux élevés de cytokines immunosuppressives,

participe aussi à cette propriété [11]. De plus, une sous-population de macrophages de phénotype M2 anti-inflammatoires orientés vers la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires (IL4, IL10 et TGF β) et proangiogéniques (dont bFGF et VEGF) a été objectivée au sein du tissu adipeux [12].

>>> **Une propriété antifibrotique**, qui amène à un processus de cicatrisation aboutissant à une cicatrice non hyperplasique, mais aussi à un remodelage d'une cicatrice hypertrophique lorsque la fraction vasculaire stromale est délivrée localement au niveau d'une cicatrice déjà constituée [13].

Les études réalisées pour montrer l'efficacité de l'enrichissement par des cellules souches mésenchymateuses isolées et expansées sur le *lipofilling* mettent en évidence des résultats améliorés, avec des volumes résiduels significativement plus élevés [14]. Ces résultats prometteurs pourraient faire du *lipofilling* une alternative fiable à l'augmentation tissu-

laire majeure, tel qu'on peut le voir dans le domaine de la chirurgie mammaire par exemple [15].

Le mécanisme biologique de ces cellules souches mésenchymateuses ne repose pas uniquement sur cette multipotence, mais aussi sur leur capacité de communication paracrine, qui est à l'origine des propriétés évoquées au-dessus. Le sécrétome de ces cellules peut donc constituer un produit thérapeutique en soi [16].

D'après le règlement européen n° 1394/2007 publié en 2007, la fraction vasculaire stromale répond aux exigences d'un médicament de thérapie innovante sur la base d'une modification substantielle intervenant systématiquement dans le procédé de fabrication de digestion enzymatique du tissu adipo-cytaire, ainsi que d'un usage non homologué dans certaines indications, si l'effet thérapeutique revendiqué est différent des fonctions physiologiques du tissu adipo-cytaire. Sa production doit donc se faire selon les bonnes pratiques de fabrication applicables à l'industrie pharmaceutique, incluant des locaux dédiés.

■ Les mélanges PRP/graisse

Le plasma riche en plaquettes (PRP) utilisé en médecine régénérative est obtenu par centrifugation du sang total du patient. Le plasma est séparé des éléments figurés du sang, et le PRP est obtenu en récupérant la phase plasmatique et les plaquettes, la plupart du temps à l'aide de dispositifs médicaux. Pour rappel historique, c'est Marx, un chirurgien maxillofacial, qui fait état pour la première fois de l'utilisation du PRP en l'utilisant dans un cas de reconstruction mandibulaire [17].

On compte de nombreuses protéines contenues au sein des plaquettes et, parmi ces protéines, se trouvent les facteurs de croissance plaquettaire qui constituent le véritable intérêt du PRP. Certains facteurs de croissance suscitent

Congrès AIME

POINTS FORTS

- Le développement de la microgreffe de tissu adipeux a permis une amélioration notable du volume dans les couches très superficielles de la peau avec une canule de 25 G.
- La fraction vasculaire stromale et les cellules souches mésenchymateuses obtenues par étape d'amplification sont des médicaments de thérapie innovante.
- L'augmentation du taux de plaquettes dans l'association PRP + greffe de tissu adipeux peut entraîner une diminution de la survie du greffon.
- Les exosomes issus des cellules souches adipocytaires sont des thérapies d'avenir.

un intérêt particulier du fait de la participation à la régénération tissulaire, la cicatrisation et l'angiogenèse [18].

Les mélanges PRP/graisse ont été utilisés notamment pour la cicatrisation. Le rationnel scientifique est le suivant : dans les mélanges de PRP se trouvent des plaquettes qui sécrètent des facteurs de croissance et, dans la graisse, se trouvent des cellules souches demandeuses de signaux cellulaires. L'addition de ces deux techniques permettrait alors l'augmentation de la prise de greffe adipeuse. En réalité, l'avancée marketing dans ce domaine est au-delà de la preuve scientifique, même si la recherche avance, et des questions se posent notamment en termes de proportion graisse/PRP, d'activation des plaquettes et de la dose de plaquette nécessaire.

Sur l'animal, on note l'intérêt d'activer préalablement les plaquettes pour pouvoir augmenter la distribution et la prise de greffe [19]. En pratique, en fonction du produit utilisé pour activer les plaquettes et en fonction du moment utilisé, on modifie la forme physique et la viscosité du PRP, ainsi que la cinétique de relargage du facteur de croissance. Selon l'indication souhaitée, il peut donc être plus ou moins intéressant de les activer.

Concernant la dose de plaquette, dans une étude animale, plus on met de plaquettes et plus la résorption du greffon adipeux est rapide et définitive. Cela se confirme en anatomopathologie : plus on augmente les plaquettes et moins on a d'intégrité des greffons, et plus on a d'inflammation, de kystes et de nécroses des greffons. Le seuil de 500 millions de plaquettes par millilitre de mélange graisse/PRP ne doit pas être dépassé [20].

Les études disponibles sur l'association PRP et tissu adipeux montrent des résultats contradictoires, dont certains ne sont pas en faveur d'une amélioration de la survie des greffons adipeux sur des modèles animaux. Un plus grand nombre d'études de bonne qualité est nécessaire, afin de mettre au point un consensus clair sur la méthodologie d'utilisation de ces mélanges.

■ Les exosomes

Les vésicules extracellulaires constituent un moyen de communication paracrine. Il en existe plusieurs types :
 – les vésicules de petite taille, de 50 à 150 nm : exosomes qui viennent de la voie endosomale ;

– les microvésicules qui viennent de la membrane plasmique et mesurent 50 à 500 nm.

La cellule souche adipocytaire du tissu adipeux va sécréter un certain nombre de facteurs qui composent le sécrétome de la cellule. Le sécrétome est composé de cytokines, de facteurs de croissance, de vésicules extracellulaires. Parmi ces vésicules se trouve l'exosome. Les exosomes transportent des substances entre les cellules et permettent leur communication. Une fois absorbées par d'autres cellules, ces vésicules sont capables de programmer les cellules réceptrices et d'influencer leur métabolisme.

Les exosomes de cellules souches contiennent du micro-ARN. Ainsi, les exosomes des cellules souches mésenchymateuses affecteront les cellules environnantes en modifiant le métabolisme d'une cellule réceptrice, de la même manière que le feraient les cellules souches elles-mêmes [21]. Ces exosomes pourraient donc être utilisés à des fins thérapeutiques pour :

- stimuler la prolifération tissulaire ;
- réguler les processus de régénération ;
- augmenter la survie des cellules locales.

Ces vésicules extracellulaires de cellules souches de graisse ont été très étudiées pour leur capacité de transdifférenciation, leur capacité paracrine, leur fort pouvoir immunomodulateur et de régénération. Les vésicules issues de ces cellules souches de graisse sont capables de favoriser la réponse Th2 par rapport à la réponse Th1, ce qui favorise un profil anti-inflammatoire. Ces vésicules sont anti-inflammatoires et immunorégulatrices. Elles sont capables d'activer la croissance fibroblastique, la production de collagène et d'élastine par le micro-ARN et les facteurs de croissance qu'elles contiennent.

Dans la littérature, ces vésicules peuvent avoir un rôle anti-apoptotique, mais certaines preuves restent à apporter.

Elles peuvent agir aussi directement sur l'angiogenèse et ont un potentiel anti-fibrotique, car elles peuvent permettre d'équilibrer le ratio collagène 1/collagène 3. Ces vésicules peuvent moduler l'activité histone acétylase, et ont donc un rôle sur les phénomènes épigénétiques et la compaction de l'ADN.

Leurs avantages par rapport aux cellules souches mésenchymateuses sont qu'elles circulent librement et qu'elles ne s'agglutinent pas en cas d'injection intraveineuse. Les exosomes n'ont *a priori* pas de pouvoir immunogène, ont même la capacité de pouvoir échapper au système immunitaire et peuvent traverser la barrière hématoencéphalique. Les données actuelles n'ont pas mis en évidence de transformation maligne au niveau des tissus sur lesquels ils sont utilisés.

D'un point de vue pratique, ils sont facilement stockables et utilisables sans perte d'activité.

Les exosomes apparaissent donc comme un espoir dans les thérapies régénératives, les traitements anti-âge, le traitement des plaies chroniques et les dermatites notamment. Ces vésicules contiennent entre autres des micro-ARN et modulent le fonctionnement du tissu dans lequel elles sont utilisées. Elles doivent donc être considérées comme des médicaments biologiques. En France, il n'existe pas de médicament utilisable à ce jour.

Actuellement, un intérêt majeur est suscité par les exosomes dans le domaine du dépistage, car ces vésicules peuvent être observées dans les maladies chroniques et dans les cancers et sont à la portée d'une prise de sang.

■ Conclusion

L'utilisation des dérivés du tissu adipeux offre donc de nombreuses possibilités dans le domaine de la chirurgie

esthétique et la médecine régénérative, avec des perspectives enthousiasmantes pour le futur. Les innovations et protocoles à venir pour la prise en charge des patients devront s'appuyer sur des données scientifiques solides.

BIBLIOGRAPHIE

1. YOSHIMURA K, SUGA H, ETO H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med*, 2009;4:265-273.
2. NGUYEN PSA, DESOUCHES C, GAY AM *et al*. Development of micro-injection as an innovative autologous fat graft technique: The use of adipose tissue as dermal filler. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2012;65:1692-1699.
3. ETO H, KATO H, SUGA H *et al*. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast Reconstr Surg*, 2012;129:1081-1092.
4. ZHU M, COHEN SR, HICOK KC *et al*. Comparison of three different fat graft preparation methods: gravity separation, centrifugation, and simultaneous washing with filtration in a closed system. *Plast Reconstr Surg*, 2013;131: 873-880.
5. CHAPUT B, BERTHEUIL N, ESCUBES M *et al*. Mechanically isolated stromal vascular fraction provides a valid and useful collagenase-free alternative technique: a comparative study. *Plast Reconstr Surg*, 2016;138:807-819.
6. TONNARD P, VERPAELE A, PEETERS G *et al*. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg*, 2013;132:1017-1026.
7. ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H *et al*. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001;7:211-228.
8. BROWN C, MCKEE C, BAKSHI S *et al*. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019;13:1738-1755.
9. PAGANELLI A, BENASSI L, ROSSI E *et al*. Extracellular matrix deposition by adipose-derived stem cells and fibroblasts: a comparative study. *Arch Dermatol Res*, 2020;312:295-299.
10. CHAE DS, HAN S, SON M *et al*. Stromal vascular fraction shows robust wound healing through high chemotactic and epithelialization property. *Cytotherapy*, 2017;19:543-554.
11. DYKSTRA JA, FACILE T, PATRICK RJ *et al*. Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the full potential of adipose-derived stromal vascular fraction. *Stem Cells Transl Med*, 2017;6:1096-1108.
12. ETO H, ISHIMINE H, KINOSHITA K *et al*. Characterization of human adipose tissue-resident hematopoietic cell populations reveals a novel macrophage subpopulation with CD34 expression and mesenchymal multipotency. *Stem Cells Dev*, 2013;22:985-997.
13. DOMERGUE S, BONY C, MAUMUS M *et al*. Comparison between stromal vascular fraction and adipose mesenchymal stem cells in remodeling hypertrophic scars. *PLoS One*, 2016;11:e0156161.
14. BOURNE DA, EGRO FM, BLILEY J *et al*. Stem cell therapy enriched fat grafting for the reconstruction of craniofacial deficits. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2023;11:e5056.
15. KÖLLE SFT, FISCHER-NIELSEN A, MATHIASSEN AB *et al*. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2013;382:1113-1120.
16. KAPUR SK, KATZ AJ. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*, 2013;95:2222-2228.
17. MARX RE, CARLSON ER, EICHSTAEDT RM *et al*. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1998;85:638-646.
18. SÁNCHEZ-GONZÁLEZ DJ, MÉNDEZ-BOLAINA E, TREJO-BAHENA NI. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *Int J Pept*, 2012;2012:532519.
19. HERSANT B, BOUHASSIRA J, SIDAHMED-MEZI M *et al*. Should platelet-rich plasma be activated in fat grafts? An animal study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2018;71:681-690.
20. ABELLAN LOPEZ M, BERTRAND B, KOBER F *et al*. The use of higher proportions of platelet-rich plasma to enrich microfat has negative effects: a preclinical study. *Plast Reconstr Surg*, 2020;145:130-140.
21. WANG X, HU S, LI J *et al*. Extruded mesenchymal stem cell nanovesicles are equally potent to natural extracellular vesicles in cardiac repair. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021;13:55767-55779.

L'auteur a déclaré ne pas avoir de liens d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.