



**HAL**  
open science

**Thérapies à partir du tissu adipeux : de la chirurgie esthétique et reconstructrice à la thérapie cellulaire.  
Application à la régénération des tendons chez les chevaux**

Anne-Claire Girard

► **To cite this version:**

Anne-Claire Girard. Thérapies à partir du tissu adipeux : de la chirurgie esthétique et reconstructrice à la thérapie cellulaire. Application à la régénération des tendons chez les chevaux. Médecine vétérinaire et santé animale. Université de la Réunion, 2012. Français. NNT : 2012LARE0034 . tel-01199939

**HAL Id: tel-01199939**

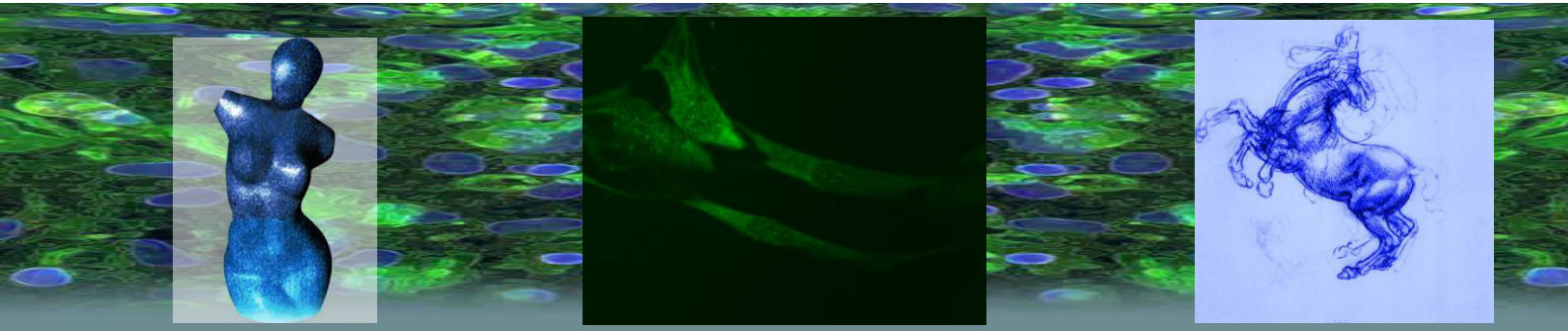
**<https://theses.hal.science/tel-01199939>**

Submitted on 16 Sep 2015

**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.

# **THERAPIES A PARTIR DU TISSU ADIPEUX**



## **DE LA CHIRURGIE ESTHETIQUE ET RECONSTRUCTRICE A LA THERAPIE CELLULAIRE**

**Application à la régénération des tendons chez les chevaux**

**Anne-Claire GIRARD**





**Université de La Réunion**

**THESE**

**Présentée pour obtenir le titre de  
Docteur en Sciences de l'Université de La Réunion  
Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire**

**Par**

**Anne-Claire GIRARD**

**THERAPIES A PARTIR DU TISSU ADIPEUX :  
DE LA CHIRURGIE ESTHETIQUE ET RECONSTRUCTRICE A LA  
THERAPIE CELLULAIRE**

**Application à la régénération des tendons chez les chevaux**

**Soutenue publiquement le 12 Décembre 2012**

<b>Pr. René YIOU</b> , CHU Henri Mondor, Créteil	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Jérôme GUICHEUX</b> , INSERM U791, Université de Nantes	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Gérard LE FUR</b> , ancien directeur général de Sanofi Aventis. Membre de l'Académie des sciences	<b>Examineur</b>
<b>Pr. Christian LEFEBVRE-D'HELLEN COURT</b> , GEICO - EA 4516, Université de la Réunion	<b>Directeur</b>
<b>Dr. Franck FESTY</b> , Stemcis (Réunion, France)	<b>Encadrant</b>



## AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de la société TENO'sculpt, filiale du groupe STEMCIIS dirigé par les Drs. Franck Festy et Régis Roche, et en partenariat avec le Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO) de l'Université de la Réunion, sous la direction du Pr. Christian Lefebvre d'Hellencourt.

Cette thèse pluridisciplinaire présente trois univers à première vue bien distincts : la chirurgie esthétique, la thérapie cellulaire et le traitement des tendinopathies équinés. Pourtant, les apparences sont parfois trompeuses et ce manuscrit va montrer que, grâce au tissu adipeux, ces trois univers ne sont pas si éloignés l'un de l'autre. Au-delà de l'organe, le tissu adipeux est en effet devenu un véritable outil thérapeutique. J'invite ainsi tout lecteur à découvrir une nouvelle facette de ce tissu jusque là peu apprécié...

La richesse de cette thèse, reflétée par la multitude des thèmes abordés, est basée sur l'étroite collaboration entre scientifiques de milieux différents : biologistes, chirurgiens et vétérinaires. La Science est faite pour des échanges et atteint son apogée lorsque des esprits d'horizons différents se mêlent les uns aux autres.

Je tiens ainsi à remercier tous les acteurs de ce long travail :

A Franck Festy et Régis Roche, qui m'ont permis de réaliser cette chevauchée fantastique.

Au GEICO et à son directeur, Christian Lefebvre d'Hellencourt, pour avoir accepté d'être mon laboratoire d'accueil à l'Université de la Réunion.

A Laurence Hoareau, pour son expérience, son humilité et son amitié. Toutes ces qualités ont permis un précieux soutien tout au long de ce travail.

Aux docteurs vétérinaires Bertrand Malivert, Thibaut Losfelt et Simon Géhin, pour nous avoir donné leur confiance et sans qui l'étude chez le cheval n'aurait pu être possible.

Aux chirurgiens plasticiens Pierre Delarue, Olivier Hulard, José Gonçalves, et David Valenti, qui nous offrent la matière première pour réaliser toutes nos études sur le tissu adipeux et les cellules souches qu'il contient.

Au Pr. René Yiou, au Dr. Jérôme Guicheux et au Dr. Gérard Le Fur, membres du jury, pour avoir accepté de porter un regard critique sur ce travail.

A Karima, Ravi, Manoj et Sophie, pour l'amitié et l'entre-aide apportée lors de nos longues journées et nuits passées ensemble au laboratoire.

A Arnaud, qui a accepté de me suivre dans cette folle aventure et m'a soutenue ces trois longues années au rythme de sa musique.

Enfin, je dédie ce travail de thèse à mes parents qui ont toujours soutenu mes choix et m'ont apporté tout leur amour.

## RESUME

Malgré le rôle crucial que joue l'obésité dans la genèse des maladies métaboliques, le tissu adipeux s'est révélé être un véritable outil thérapeutique.

Utilisée depuis plus d'un siècle en chirurgie esthétique, la greffe autologue de tissu adipeux, ou lipofilling, est une technique sûre permettant le comblement des tissus mous. Cependant, bien que la technique ait connue de nettes améliorations au cours du temps, les chirurgiens font toujours face à une résorption du greffon qui oblige dans la majorité des cas à planifier plusieurs autres interventions afin que le résultat esthétique soit en adéquation avec les attentes du patient. Le procédé MICROFILL<sup>®</sup> a été développé dans le but d'augmenter le taux de prise de greffe en favorisant la survie cellulaire au sein du greffon. Cette dernière est optimisée par :

- un prélèvement et une réinjection de lobules adipeux de petite taille permettant de diminuer l'ischémie et la mauvaise nutrition des cellules
- une élimination des éléments délétères (anesthésiques, cytokines inflammatoires) par un protocole de lavages et centrifugations non traumatique.

D'autre part, au cours de ces dernières années, le tissu adipeux s'est révélé posséder un pouvoir thérapeutique plus important par l'hébergement de cellules souches mésenchymateuses au fort potentiel. Ces cellules sont présentes en grande quantité et facilement accessibles à partir d'une simple lipoaspiration. Cependant, la lipoaspiration implique bien souvent l'usage d'un anesthésique local et d'un vasoconstricteur qui peuvent nuire aux cellules. Nos études ont en effet montré que la lidocaïne, un anesthésique couramment utilisé, est cytotoxique pour les cellules souches du tissu adipeux, ayant pour effets l'inhibition de la prolifération cellulaire (arrêt du cycle cellulaire en phase G0-G1) et la nécrose des cellules. En revanche, une manipulation appropriée du tissu adipeux, se rapprochant du protocole MICROFILL<sup>®</sup>, permet de diminuer la mortalité cellulaire.

L'effet délétère de la lidocaïne semble lié à l'apparition d'une vacuolisation cytoplasmique dont la nature est à ce jour non élucidée. De plus, la lidocaïne induit également un processus d'autophagie, dont les mécanismes moléculaires d'induction sont eux aussi inconnus et dont la finalité physiologique serait le maintien en vie de la cellule malgré le stress provoqué.

Les conclusions de ces études mènent à certaines recommandations à suivre quant à l'usage de la lidocaïne en vue de la réinjection extemporanée de cellules souches adipeuses chez un patient. Aussi, dans le but de traiter les tendinopathies équinées, ces études ont permis d'optimiser le protocole de prélèvement du tissu adipeux chez le cheval ainsi que le protocole d'extraction des cellules souches du tissu adipeux.

Cette thèse a finalement permis de développer un kit à usage vétérinaire permettant de traiter les tendinopathies équinées. Ce nouveau procédé de thérapie cellulaire a été testé chez des chevaux et s'est avéré très prometteur, permettant la régénération de la structure tendineuse et un retour au travail rapide des chevaux.

**Mots clés :** tissu adipeux, cellules souches, transfert de graisse autologue, médecine régénérative, tendinopathies équinées, lipoaspiration tumescence, lidocaïne, vacuolisation, autophagie

## ABSTRACT

Despite the dark side of obesity in the pathogenesis of metabolic diseases, adipose tissue has been shown to be a good therapeutic tool.

First, autologous fat grafting, also named lipofilling, has been used for over a century and represents a safe technique for soft tissue filling. However, although the technique has seen marked improvements over time, surgeons are still facing graft resorption that often requires overcorrection of the treated area or other interventions so that the aesthetic result is in line with expectations of the patient. Thus, MICROFILL<sup>®</sup> process has been developed in order to increase the rate of engraftment by promoting cell survival within the graft. The latter is enhanced by:

- sampling and reinjection of small fat lobules in order to reduce ischemia and poor nutrition of the cells
- elimination of deleterious elements (anesthetics, inflammatory cytokines) by a non-traumatic protocol involving soft centrifugations and washings.

Furthermore, in recent years, adipose tissue has been found to have a greater therapeutic power by hosting mesenchymal stem cells with great potential. These adipose stem cells (ASCs) are present in large quantities and can be easily obtained from a simple liposuction. However, liposuction procedure often involves the use of a local anesthetic and a vasoconstrictor that can harm cells. Our studies have shown that lidocaine, an anesthetic commonly used, exerts cytotoxic effects on adipose stem cells, inhibiting cell proliferation (cell cycle arrest in G0-G1 phase) and inducing necrosis. Nonetheless, appropriate handling of adipose tissue, quite similarly to MICROFILL<sup>®</sup> protocol, reduces cell death. The deleterious effects of lidocaine appear to be related to the occurrence of cytoplasmic vacuolization whose nature is so far unclear. In addition, lidocaine also induces a process of autophagy, including molecular mechanisms of induction also unknown and whose physiological purpose could be cell survival despite the stress.

The findings of these studies lead to some recommendations to follow regarding the use of lidocaine for the extemporaneous reinjection of ASCs in a patient. Also, in order to treat equine tendinopathy, these studies have been used to optimize adipose tissue harvest by liposuction on horses and the protocol of extraction of ASCs.

Finally, this thesis has allowed developing a kit for veterinary use to treat equine tendinopathy. This new method of cell therapy has been tested in horses and has shown very promising results for tendon regeneration, knowing that treated horses could rapidly return to work.

**Keywords:** adipose tissue, stem cells, lipofilling, regenerative medicine, equine tendinopathy, tumescent liposuction, lidocaine, vacuolization, autophagy



## SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES .....	12
LISTE DES TABLEAUX.....	14
LISTE DES ABREVIATIONS .....	15
VALORISATIONS DES TRAVAUX.....	19
INTRODUCTION.....	21
1. LE TISSU ADIPEUX ET SON UTILISATION EN CHIRURGIE ESTHETIQUE ET RECONSTRUCTRICE.....	25
1.1. Le tissu adipeux.....	27
1.1.1. Description générale .....	27
1.1.2. Le tissu adipeux blanc.....	27
1.1.2.1. Localisation dans l'organisme .....	27
1.1.2.2. Les constituants du tissu adipeux .....	28
1.1.2.3. La différenciation en adipocytes matures .....	30
1.1.3. Rôle, fonction.....	32
1.1.3.1. Fonctions métaboliques et stockage .....	32
1.1.3.2. Tissu adipeux : organe sécrétoire et endocrine.....	33
1.2. Le transfert de graisse autologue ou « lipofilling ».....	35
1.2.1. Les applications .....	35
1.2.2. Historique.....	38
1.2.2.1. L'époque « à ciel ouvert » (1889-1977) .....	39
1.2.2.2. L'époque « non purifiée » (1977-1994) .....	41
1.2.2.3. L'époque « purifiée, atraumatique » (1994).....	42
1.2.2.4. Description de la technique .....	43
1.2.2.5. Procédure de lipoaspiration .....	43
1.2.2.6. Préparation du tissu adipeux.....	46
1.2.2.7. Réinjection.....	48
1.2.3. Problématiques associées à la prise de greffe .....	49

1.2.3.1.	Suites opératoires « normales » .....	49
1.2.3.2.	Complications de la greffe de graisse .....	50
1.2.4.	Développement des protocoles en faveur de la survie du greffon .....	51
1.2.4.1.	Principales innovations .....	52
1.2.4.2.	Microfill® : une innovation en faveur de la survie du greffon .....	55
1.2.4.3.	Intérêt des cellules souches du tissu adipeux dans le lipofilling .....	67
2.	POTENTIEL DES CELLULES SOUCHES ADULTES DU TISSU ADIPEUX EN THERAPIE CELLULAIRE .....	69
2.1.	Généralités sur les cellules souches .....	71
2.1.1.	Les différents types de cellules souches .....	72
2.1.2.	Origine des cellules souches .....	75
2.1.2.1.	Les cellules souches embryonnaires et fœtales .....	75
2.1.2.2.	Les cellules souches adultes .....	76
2.1.2.2.1.	Les cellules souches hématopoïétiques .....	77
2.1.2.2.2.	Les cellules souches mésenchymateuses adultes.....	78
2.2.	Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux.....	84
2.2.1.	Méthodes d'obtention .....	84
2.2.2.	Caractéristiques et propriétés .....	87
2.2.2.1.	Caractérisation phénotypique .....	88
2.2.2.2.	Potentiel de différenciation des ASCs <i>in vitro</i> .....	90
2.2.2.3.	Sécrétions et effets paracrines .....	92
2.2.2.4.	Caractère immunomodulateur .....	93
2.3.	Potentiel thérapeutique des ASCs .....	94
2.3.1.	Aperçu du potentiel des ASCs en médecine vétérinaire .....	94
2.3.2.	Essais cliniques chez l'homme .....	97
2.4.	Réglementation en vigueur.....	101
2.4.1.	Loi de bioéthique .....	101

2.4.2.	Cadre législatif pour la manipulation des cellules souches mésenchymateuses adultes destinées à la thérapie .....	103
2.4.3.	Implication de la communauté scientifique dans la régulation des activités de thérapie cellulaire .....	105
2.5.	Les avantages des cellules souches du tissu adipeux .....	107
2.6.	Problématique : la survie cellulaire .....	112
2.6.1.	Les facteurs de survie cellulaire pour l'implantation de cellules.....	112
2.6.1.1.	La communication entre les cellules .....	112
2.6.1.2.	Reconstitution d'une « niche » et « homing » .....	113
2.6.2.	Protection des cellules contre les agressions liées au prélèvement et à la purification des cellules.....	118
2.7.	L'autophagie : mécanisme de survie cellulaire ? .....	131
2.7.1.	L'autophagie : définition et description .....	131
2.7.2.	Fonctionnalité .....	135
2.7.3.	Méthodes d'objectivation.....	137
2.7.4.	Mise en évidence de l'autophagie dans les ADSCs traitées à la lidocaïne .....	139
3.	DE LA CELLULE AU TISSU: APPLICATION A LA REGENERATION DES TENDONS CHEZ LES CHEVAUX .....	155
3.1.	Le tendon : structure et fonction .....	158
3.1.1.	Organisation générale .....	158
3.1.1.1.	Ultrastructure .....	158
3.1.1.2.	Vascularisation et innervation .....	159
3.1.1.3.	Composante cellulaire .....	160
3.1.2.	Composition macromoléculaire du tendon .....	161
3.1.3.	Fonction .....	165
3.2.	Les tendinopathies équinés et leur traitement .....	167
3.2.1.	Physiopathologie.....	167

3.2.1.1.	Définition.....	167
3.2.1.2.	Anatomie .....	169
3.2.1.3.	Etiologie.....	173
3.2.1.4.	Processus de cicatrisation naturelle .....	175
3.2.2.	Traitements des tendinopathies .....	177
3.2.2.1.	Les traitements classiques .....	177
3.2.2.2.	Les thérapies cellulaires.....	182
3.3.	Utilisation des cellules souches du tissu adipeux pour traiter les tendinites du cheval 184	
3.3.1.	Optimisation des protocoles chez le cheval en faveur de la survie des cellules ..	185
3.3.1.1.	Prélèvement du tissu adipeux par lipoaspiration .....	185
3.3.1.1.1.	Zone de prélèvement .....	186
3.3.1.1.2.	Procédure de lipoaspiration .....	187
3.3.1.2.	Purification extemporanée de la fraction stromale vasculaire.....	188
3.4.	Efficacité des cellules souches du tissu adipeux pour traiter les tendinites du cheval : étude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	189
3.4.1.	Introduction.....	189
3.4.2.	Matériels et méthodes .....	190
3.4.3.	Résultats.....	193
3.4.4.	Discussion.....	198
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....		201
REFERENCES.....		207
GLOSSAIRE.....		225
ANNEXES .....		233

### *Note au lecteur*

*Un glossaire situé à la fin du manuscrit répertorie les termes signalés par un astérisque.*

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les trois Grâces (1639), de Peter Paul Rubens (1577-1640).....	25
Figure 2 : Distribution du tissu adipeux blanc dans le corps .....	28
Figure 3 : Composition du tissu adipeux blanc. ....	30
Figure 4 : Différenciation adipocytaire .....	32
Figure 5 : Zones du visage pouvant être indiquées dans le lipofilling .....	36
Figure 6 : Zones habituelles de liposuction .....	44
Figure 7 : Lipoaspiration. ....	45
Figure 8 : Seringue de lipoaspirat après centrifugation.....	47
Figure 9 : Augmentation mammaire avec le système BRAVA® en complément de l'injection de graisse .....	54
Figure 10 : Kit Microfill® .....	56
Figure 11 : Cellules souches humaines du tissu adipeux en culture. ....	69
Figure 12 : Les canadiens Till et McCulloch, réputés pour leurs travaux d'avant-garde sur les cellules souches. ....	71
Figure 13 : Les deux principales propriétés des cellules souches : auto-renouvellement et différenciation .....	72
Figure 14 : Hiérarchie des cellules souches en fonction du potentiel de différenciation.....	74
Figure 15 : Origines des cellules souches, de la formation du zygote à l'adulte .....	75
Figure 16 : Hématopoïèse .....	77
Figure 17 : Sources de cellules souches mésenchymateuses adultes dans l'organisme .....	79
Figure 18 : Propriétés des cellules souches mésenchymateuses .....	80
Figure 19 : Tissu adipeux après digestion et centrifugation (a) et cellules de la SVF fraîchement isolées observées en microscopie optique (b) .....	85
Figure 20 : Composants cellulaires du tissu adipeux .....	86
Figure 21 : Exemples des différentes utilisations potentielles des cellules souches en thérapie cellulaire humaine .....	97
Figure 22 : Répartition mondiale des essais cliniques impliquant (a) des cellules souches mésenchymateuses et (b) des cellules souches du tissu adipeux.....	98
Figure 23 : Ordre chronologique des différentes étapes pour obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM).....	105
Figure 24 : Exemple de système clos pour la culture des CSM (CellStack™).....	106
Figure 25 : Niche de cellules souches .....	114

Figure 26 : Principe des PAMs .....	116
Figure 27 : Les principales formes d'autophagie.....	132
Figure 28 : Modèle simplifié de la régulation de l'autophagie .....	134
Figure 29 : Schéma récapitulatif des effets de la lidocaïne sur les cellules souches dérivées du tissu adipeux.....	153
Figure 30 : Etude du cheval (vers 1490), par Leonard de Vinci (1452-1519). .....	155
Figure 31 : Composition fibrillaire du tendon.....	159
Figure 32 : Composition de la matrice extracellulaire d'un tendon normal .....	161
Figure 33 : Tuméfaction d'un membre antérieur atteint de tendinite du tendon du fléchisseur superficiel du doigt.....	168
Figure 34 : Comparaison entre l'homme et le cheval. ....	170
Figure 35 : Anatomie de l'extrémité distale du membre antérieur du cheval, vue latérale gauche.....	171
Figure 36 : Biomécanique des tendons fléchisseurs du doigt et du suspenseur du boulet.....	174
Figure 37 : Coupes histologiques de tendon sain (a) et de tendon lésé (b). ....	176
Figure 38 : Stratégie de TENO'sculpt. ....	183
Figure 39 : Sites anatomiques correspondant à des dépôts de tissu adipeux sous-cutané chez le cheval .....	186
Figure 40 : Procédure de lipoaspiration chez le cheval.....	188
Figure 41 : Morphologie des ADSCs (a) et des ténocytes (b) de cheval en culture .....	194
Figure 42 : Comparaison de l'expression relative des gènes des ténocytes et des ADSCs ...	195
Figure 43 : Images ultrasons des examens échographiques du cheval C1 .....	197

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principales adipokines et leurs effets biologiques .....	34
Tableau 2 : Volume de graisse recommandé pour la réinjection, en fonction de la zone .....	49
Tableau 3 : Marqueurs phénotypiques des CSM .....	81
Tableau 4 : Principaux marqueurs phénotypiques exprimés ou non à la surface des cellules souches du tissu adipeux .....	89
Tableau 5 : Etudes cliniques réalisées en France avec des cellules souches mésenchymateuses .....	100
Tableau 6 : Principaux modulateurs pharmacologiques de l'autophagie couramment utilisés .....	139
Tableau 7 : Récapitulatif des principaux traitements classiques des tendinopathies chez le cheval. ....	181
Tableau 8 : Thérapies cellulaires commercialisées. ....	184
Tableau 9 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour la qPCR.....	192
Tableau 10 : Descriptif des chevaux traités et de leur pathologie.....	193

## LISTE DES ABREVIATIONS

### **-A-**

ABM	Agence de la Biomédecine
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease protein
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADSC	Adipose-Derived Stem Cell
AFSSaPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARN	Acide RiboNucléique
ASC	Adipose Stem Cell
Atg	Autophagy-related gene

### **-B-**

Bcl	Beclin
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BGN	Biglycane
BMP	Bone Morphogenic Protein
BPL	Bonne Pratique de Laboratoire
BSA	Bovine Serum Albumin

### **-C-**

CD	Cluster de Différenciation
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
COL	Collagène
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CS	Cellule Souche
CSE	Cellule Souche Embryonnaire (ESC en anglais)
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CSM	Cellule Souche Mésenchymateuse (MSC en anglais)



**-D-**

DCN Décorine

**-E-**

EGF Epidermal Growth Factor  
ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
EMA European Medicines Agency

**-F-**

FDA Food and Drug Administration  
FITC Fluorescein Isothiocyanate  
FMOD Fibromoduline

**-G-**

GAG GlycosAminoGlycane  
GDF-5 Growth and Differentiation Factor-5  
GM-CSF Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor  
GVHD Graft Versus Host Disease

**-H-**

HGF Hepatocyte Growth Factor  
HLA Human Leucocyte Antigen

**-I-**

IFN $\gamma$  Interféron gamma  
IGF-1 Insuline-like Growth Factor-1  
IL Interleukin  
IP Iodure de Propidium  
iPS induced Pluripotent Stem cell (cellule souche pluripotente induite)  
ISCT International Society for Cell Therapy  
ISSCR International Society for Stem Cell Research

**-L-**

LAMP Lysosomal-Associated Membrane Protein

LC3 microtubule-associated protein Light Chain 3  
LSB Ligament Suspenseur du Boulet

**-M-**

3-MA 3-MéthylAdenine  
MCP-1 Monocyte Chemoattractant Protein-1  
MEC Matrice extracellulaire  
MMP Matrix Metalloproteinase  
mRNA messenger Ribonucleic Acid  
MSC Mesenchymal Stem Cell  
mTOR mammalian Target Of Rapamycin

**-N-**

NGF Nerve Growth Factor  
NIH National Institutes of Health  
NK Natural Killer

**-O-**

Oct4 Octamer-binding transcription factor 4

**-P-**

PAM Pharmacologically Active Microcarriers  
PBS Phosphate Buffered Saline  
PCD Programmed Cell Death  
PDGF Platelet-Derived Growth Factor  
PE Phycoérythrine  
PG Protéoglycane  
PGE2 Prostaglandine E2  
PI3K Phosphatidylinositol 3-Kinase  
PRP Platelet-Rich Plasma

**-Q-**

qPCR quantitative Polymerase Chain Reaction

**-R-**

RT Reverse Transcription

**-S-**

SCX Scleraxis

SLRP Small Leucin-Rich Proteoglycan

SoFCPRE Société Française de Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique

SVF Stromal Vascular Fraction

**-T-**

TFPD Tendon du muscle Fléchisseur Profond du Doigt

TFSD Tendon du muscle Fléchisseur Superficiel du Doigt

TGF $\beta$  Transforming Growth Factor beta

TIMP Tissue Inhibitor of Metalloprotease

TNF $\alpha$  Tumor Necrosis Factor alpha

TNMD Ténomoduline

**-V-**

V-ATPase Vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase

Vps Vacuolar protein sorting

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

## VALORISATIONS DES TRAVAUX

### Articles

Hoareau L, Bencharif K, **Girard AC**, Gence L, Delarue P, Hulard O, Festy F and Roche R (2012) Effect of centrifugation and washing on adipose graft viability: a new method to improve graft efficiency. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*.

**Girard AC**, Atlan M, Bencharif K, Gunasekaran M, Delarue P, Hulard O, Lefebvre-d'Hellencourt C, Roche R, Hoareau L, Festy F (2012) New insight in lidocaine and adrenaline effects on human adipose stem cells. *Aesthetic Plast Surg*.

**Girard AC**, Gunasekaran M, Denizot M, Neyret A, Bencharif K, Delarue P, Hulard O, Roche R, Lefebvre-d'Hellencourt C, Hoareau L, Festy F (2012) Lidocaine effects on human adipose stem cells: a phantom menace? (*en cours de finalisation*)

**Girard AC**, Atlan M, Mirbeau S, Gence L, Delarue P, Hulard O, Roche R, Hoareau L, Festy F (2012) Lidocaine versus ropivacaine: impact on fat grafting. (*en cours de finalisation*)

### Présentations orales lors de congrès (orateur en gras)

**Girard AC**, Loyher PL, Bencharif K, Balat M, Lefebvre-d'Hellencourt C, Delarue P, Hulard O, Roche R, Hoareau L, Festy F (2011) Lidocaine: an attractive local anesthetic for lipoaspiration procedure in stem cells regenerative medicine. Presented at: International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS); November, 2011; Miami

Hoareau L, Bencharif K, Gence L, Girard AC, Delarue P, Hulard O, Festy F, **Roche R** (2012) Washing or centrifugating the fat? SICAAAMS 2012, Geneva.

Girard AC, **Atlan M**, Mirbeau S, Gence L, Delarue P, Hulard O, Roche R, Hoareau L, Festy F (2012) Influence de la lidocaïne et de la ropivacaine sur le tissu adipeux et les cellules souches adipocytaires. SoFCPRE 2012, Paris.



# **INTRODUCTION**



D'abord connu pour son rôle dans la thermorégulation et comme principal lieu de stockage des graisses, le tissu adipeux est de nos jours le principal et malheureux reflet des maladies métaboliques qui ont émergé au cours du XX<sup>ème</sup> siècle. Alors que la prévalence de l'obésité augmente dans le monde entier, constituant un des plus graves problèmes de santé publique, les découvertes récentes ont montré que le tissu adipeux n'était pas un simple tissu de stockage passif mais un organe regorgeant de fonctions insoupçonnées et renfermant des cellules souches aux pouvoirs incroyables. D'où l'utilité du tissu adipeux...

Parmi ses multiples facettes, le tissu adipeux s'est révélé être d'une grande utilité en chirurgie esthétique et reconstructrice. La greffe de tissu adipeux est en effet utilisée depuis plus d'un siècle et s'est avérée être un excellent outil pour combler les tissus mous. La technique de transfert de graisse autologue, ou « lipofilling », est de plus en plus employée et de nouveaux procédés voient le jour pour améliorer la prise de greffe et favoriser la survie du greffon. Cette utilisation a permis de mettre en évidence d'autres propriétés du tissu adipeux, en particulier sa capacité de régénération tissulaire. En effet, depuis quelques années, un nouvel aspect a été mis en exergue : la présence de cellules capables de se différencier en divers types cellulaires, et plus explicitement, une capacité de ces cellules à régénérer des tissus.

Ainsi, la découverte récente de cellules souches au sein du tissu adipeux a ouvert la voie sur de nouveaux et nombreux axes de recherche dans le monde entier, et a ainsi ouvert la voie pour une course effrénée visant de nouvelles solutions de thérapie cellulaire, chez l'homme comme chez l'animal.

Chez l'animal, outre les modèles d'étude utilisés pour la recherche (en vue de thérapie humaine), les essais se sont principalement tournés vers le traitement des pathologies de l'appareil locomoteur (tendinopathies, arthropathies). Les chiens et les chevaux sont finalement les premiers à pouvoir bénéficier de ces nouvelles thérapies pour traiter ce type de trouble.

Chez l'homme, le potentiel extraordinaire de ces cellules souches est tel que les études cliniques se multiplient et les pathologies visées sont variées.

Ne serions-nous finalement pas en présence d'un Docteur Jekyll et Mister Hyde au sein de notre propre corps (Dani and Casteilla 2006) ? Sans pour autant définir un « bon » et un « mauvais » tissu adipeux, conduisant ou non à des dysfonctions métaboliques, oublions le côté obscur et considérons tout simplement le tissu adipeux comme un bon Dr Jekyll



d'origine, soit une source inépuisable et extraordinaire de cellules souches à capacité presque illimitée.

La régénération tissulaire n'est plus dans le domaine de la science-fiction mais est bel et bien réel.

Au travers de l'histoire, des expériences passées et actuelles, le regard sur le tissu adipeux a évolué de jour en jour, faisant émerger un certain optimisme.

Voici donc l'histoire optimiste du tissu adipeux et des ses nombreuses potentialités en médecine esthétique et régénérative.

# **1. LE TISSU ADIPEUX ET SON UTILISATION EN CHIRURGIE ESTHETIQUE ET RECONSTRUCTRICE**



**Figure 1 : Les trois Grâces (1639), de Peter Paul Rubens (1577-1640)**

*« Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. »*

*Aristote - Extrait de la Métaphysique*

## **1.1. Le tissu adipeux**

### **1.1.1. Description générale**

On distingue deux types de tissu adipeux : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc.

Le tissu adipeux brun, source de chaleur, est abondant chez les mammifères hibernants. Il est également présent chez l'homme, essentiellement chez le nouveau-né et en moindre quantité chez l'adulte. Il est constitué d'adipocytes bruns contenant un noyau central et un cytoplasme avec de nombreuses vacuoles lipidiques et mitochondries qui participent au catabolisme oxydatif des acides gras pour produire de la chaleur (Koppen and Kalkhoven 2010).

Le tissu adipeux blanc est quant à lui la principale réserve énergétique de l'organisme. Il représente 10 à 20 % du poids d'un adulte normal (Peterson, Czerwinski et al. 2003), voir 15 à 30 % chez la femme (Tarnus and Bourdon 2006). Sa cellule caractéristique est l'adipocyte blanc, contenant une unique vacuole lipidique.

### **1.1.2. Le tissu adipeux blanc**

#### **1.1.2.1. Localisation dans l'organisme**

Les adipocytes blancs sont principalement regroupés pour former le tissu adipeux blanc, mais on les retrouve également de façon isolée dans la moelle osseuse et dans les tissus conjonctifs lâches.

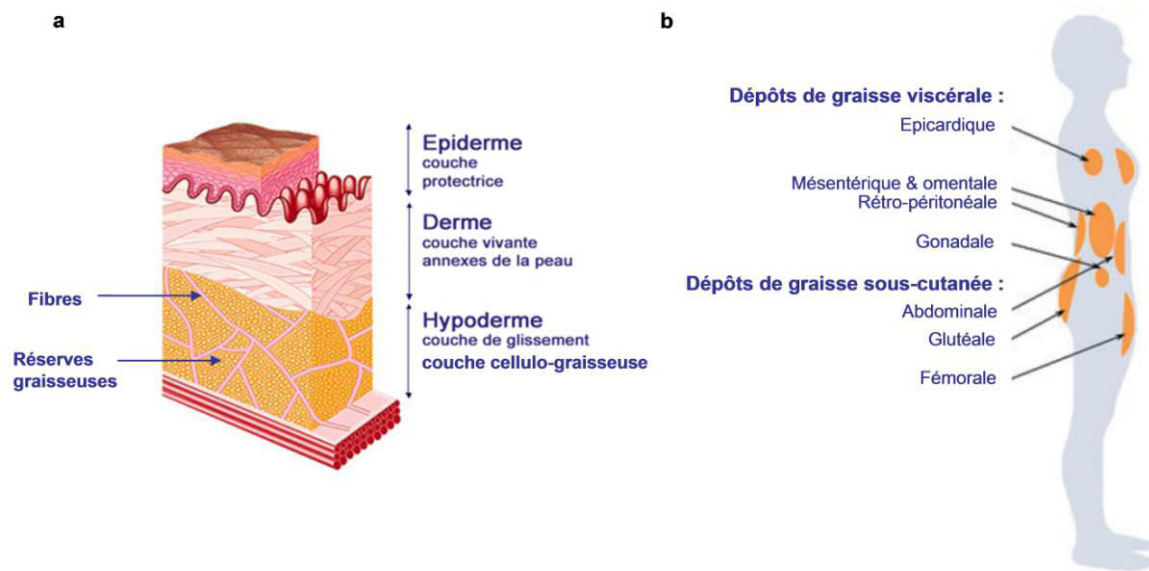
Le tissu adipeux blanc est localisé principalement dans :

- l'hypoderme, couche profonde de la peau, constituant ainsi le tissu adipeux sous-cutané (Figure 2a) ;
- les régions profondes, au niveau du mésentère, de l'épiploon, des régions rétro-péritonéales, constituant ainsi le tissu adipeux viscéral (Figure 2b) ;

Le tissu adipeux sous-cutané parcourt évidemment tout le corps, mais des dépôts de graisse sont distribués préférentiellement dans certaines régions, notamment au niveau abdominal, glutéal et fémoral (Figure 2b). Ces dépôts de graisse sous-cutanée sont plus ou moins importants suivant le genre : une femme aura tendance à accumuler du tissu adipeux au

niveau des hanches, des cuisses et des fesses tandis qu'un homme prendra essentiellement au niveau de l'abdomen. On distingue d'ailleurs une obésité gynoïde et une obésité androïde selon la localisation de la graisse en excès, chez les deux sexes. L'âge, l'environnement et l'alimentation sont également des facteurs influençant la répartition du tissu adipeux (Wajchenberg 2000).

C'est le tissu adipeux blanc sous-cutané qui intéresse la chirurgie esthétique et réparatrice ainsi que la médecine régénérative. C'est en effet ce tissu qui est prélevé dans les opérations de remodelage de la silhouette par lipoaspiration et pour le transfert de graisse, et c'est également ce tissu qui est utilisé en thérapie cellulaire en raison de sa facilité d'obtention.



**Figure 2 : Distribution du tissu adipeux blanc dans le corps.** (a) Schéma représentatif des trois couches constituant la peau. Le tissu adipeux sous-cutané, riche en réserves de graisse, constitue l'hypoderme. (b) Principaux dépôts de graisse dans le corps humain (schéma traduit de (Wronska, 2012 #468))

### 1.1.2.2. Les constituants du tissu adipeux

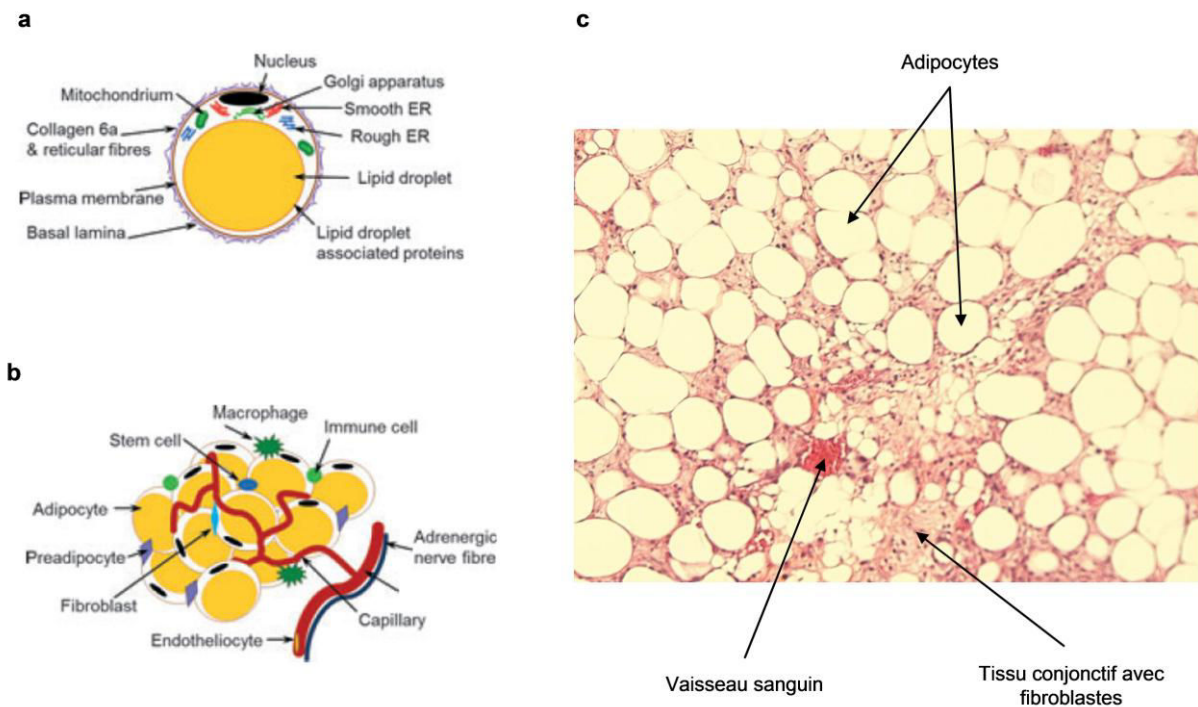
Le tissu adipeux blanc est composé de différents types de cellules :

- les adipocytes matures,
- les cellules de la fraction stromale vasculaire (« Stromal vascular fraction », SVF), comprenant des précurseurs adipocytaires, des cellules souches mésenchymateuses (« Adipose-derived Stem Cells, ADSC), des cellules endothéliales, des leucocytes (lymphocytes, granulocytes et éventuellement des macrophages) (figure 3).

Dans le tissu adipeux blanc, l'adipocyte mature est une cellule très particulière : plus ou moins sphérique, d'une centaine de microns de diamètre, avec un cytoplasme original constitué dans sa majeure partie par une inclusion lipidique ou gouttelette lipidique. Cette gouttelette lipidique renferme des triglycérides et est entourée par une mince couronne cytoplasmique qui contient les constituants normaux d'une cellule, c'est-à-dire noyau, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique et mitochondries. La membrane cytoplasmique repose sur une fine membrane basale (réticuline) (Figure 3a).

Les adipocytes se tassent les uns aux autres pour former des lobules séparés par des cloisons conjonctives. Mais les adipocytes ne sont pas les seuls constituants cellulaires du tissu adipeux. Ces cloisons conjonctives, constituées en partie de fibres de collagène, contiennent en effet des fibroblastes et d'éventuels macrophages (Figure 3c). Cette trame conjonctive s'étend jusqu'au derme et au fascia (Kishi, Imanishi et al. 2010). Comme tout tissu, le tissu adipeux est également vascularisé et innervé : il est traversé par des capillaires sanguins et des fibres nerveuses amyéliniques (fibres sympathiques noradrénergiques) qui passent entre les adipocytes.

De plus, des découvertes récentes ont montré l'existence de cellules souches mésenchymateuses au sein du tissu adipeux. Ces cellules sont multipotentes\*, étant capables de se différencier en adipocytes, mais étant également capables d'engendrer d'autres types cellulaires (cellules de muscles, de tendon, d'os,..) (Zuk, Zhu et al. 2001). Du fait de leur fort potentiel de différenciation, ces cellules font l'objet d'une attention particulière et commencent à être exploitées en médecine régénérative. Nous y reviendrons par la suite.



**Figure 3 : Composition du tissu adipeux blanc.** (a) Adipocyte mature. (b) Constituants cellulaires du tissu adipeux (d'après (Wronska, 2012 #468)). (c) Coupe histologique de tissu adipeux blanc humain. Les adipocytes matures sont entourées de tissu conjonctif composé de cellules fibroblastiques mononuclées.

### 1.1.2.3. La différenciation en adipocytes matures

Les adipocytes étant un haut lieu de réserves énergétiques, le tissu adipeux est doté d'une particularité extraordinaire : celle de pouvoir produire de nouveaux adipocytes matures lorsque le corps en a besoin, et ce, à l'infini. Cette hyperplasie est bien sûr l'un des phénomènes en cause dans le développement de l'obésité.

Les adipocytes sont issus des cellules souches mésenchymateuses contenues dans le tissu adipeux. D'un point de vue morphologique, l'adipogenèse est en premier lieu caractérisée par le changement de forme des cellules souches. De type fibroblastique, elles s'arrondissent jusqu'à atteindre la morphologie adipocytaire caractéristique du tissu adipeux blanc (Figure 4). Ceci est accompagné par un remodelage de la matrice extracellulaire ainsi que par des changements dans la cellule, notamment au niveau du cytosquelette (Gregoire, Smas et al. 1998; Lee, Wu et al. 2010).

La différenciation adipocytaire s'effectue en deux étapes. La première étape consiste à engager les cellules dans le lignage adipocytaire. Cette phase dite de détermination conduit à

la formation d'adipoblastes. Ces cellules perdraient alors leur caractère multipotent et seraient alors vouées à devenir des adipocytes. Ces étapes sont entrecoupées par des étapes de multiplication cellulaire (expansion clonale), afin de favoriser un pool suffisant de préadipocytes, et par des arrêts de prolifération (arrêt du cycle cellulaire en phase G1) nécessaires à la différenciation des cellules. Les préadipocytes deviennent alors des adipocytes immatures, accumulant des triglycérides. Puis la phase terminale de différenciation donne lieu à des adipocytes matures contenant une unique vacuole lipidique (Figure 4).

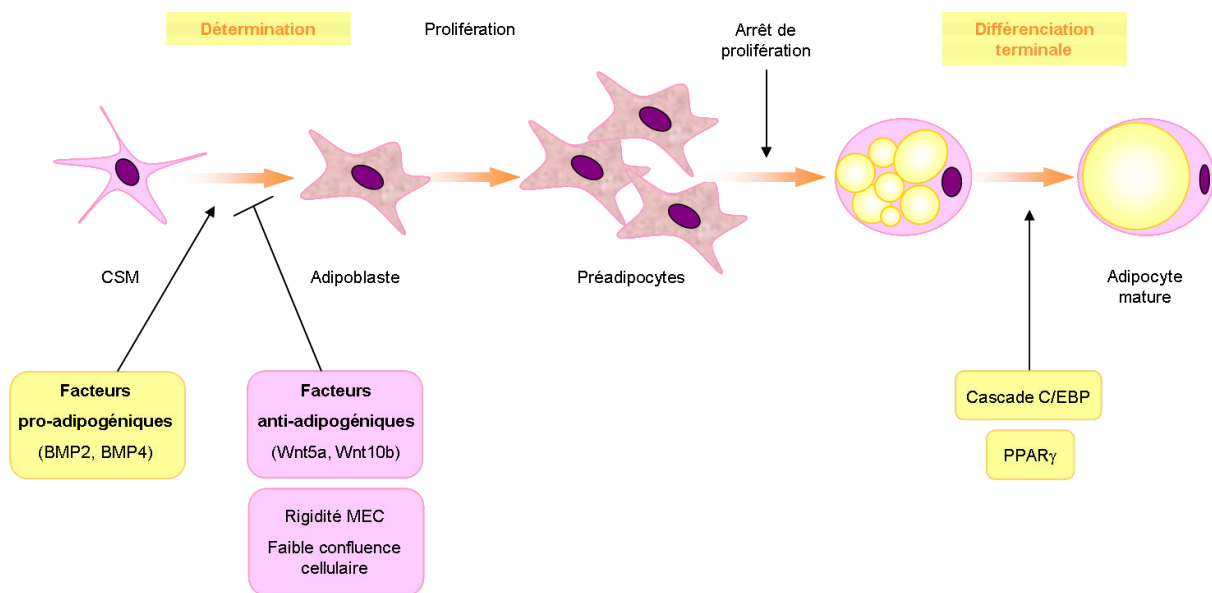
Dès l'initiation de l'adipogenèse, les cellules accumulent de petites gouttelettes lipidiques dans la région périnucléaire et font l'objet de modifications au niveau de la morphologie cellulaire et de l'activité transcriptionnelle. En fin de compte, ces petites gouttelettes lipidiques se gorgent de lipides, s'élargissent et finissent par fusionner pour former une unique vacuole lipidique. Le cytoplasme et le noyau de ces cellules arrondies sont pressés par l'énorme gouttelette lipidique dans une zone étroite juste en dessous de la membrane plasmique.

L'adipogenèse est finement régulée par le contrôle de facteurs pro- et anti-adipogéniques (Rosen and MacDougald 2006; Henry, Bensley et al. 2012). Le principal effecteur intracellulaire de la différenciation adipocytaire est le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (« peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$  »). Lorsque ce récepteur est activé, suite à la fixation d'un ligand au niveau des cellules fibroblastiques, le programme complet de différenciation décrit ci-dessus est stimulé. Ceci entraîne alors les changements morphologiques de la cellule, l'accumulation de lipides et l'expression des gènes caractéristiques des adipocytes.

Les facteurs de transcription de la famille C/EBP (« CCAAT/ enhancer-binding proteins ») jouent également un rôle critique dans cette différenciation, stimulant l'expression de nombreux gènes adipocytaires. Plus récemment, d'autres facteurs impliqués dans ce processus de différenciation ont été identifiés, comme les facteurs de la famille KLF (« Krüppel-like factors ») ou le facteur de transcription KROX20 (Rosen and MacDougald 2006).

Tout ceci s'effectue en aval d'une cascade de signalisation complexe ayant pour origine des facteurs extracellulaires pro-adipogéniques, parmi lesquels, certains membres de la famille des BMP (« bone morphogenetic protein ») (Rosen and Spiegelman 2006). A l'opposé, des facteurs anti-adipogéniques, tels certains membres de la famille Wnt, sont capables d'inhiber cette cascade de signalisation (Figure 4).





**Figure 4 : Différenciation adipocytaire.** La différenciation des adipocytes blancs dépend de facteurs pro et anti-adipogéniques. Elle débute par une étape de détermination au cours de laquelle la cellule est engagée dans le lignage adipocytaire. Certaines BMPs (BMP2 et BMP4) ont été identifiées comme des facteurs pro-adipogéniques. A l'inverse, des facteurs anti-adipogéniques vont inhiber la différenciation, parmi lesquels des membres de la famille Wnt. Les pré-adipocytes vont accumuler des triglycérides sous forme de petites gouttelettes lipidiques qui vont grossir puis fusionner pour former une unique vacuole lipidique. La cellule s'arrondit alors pour former un adipocyte mature.

### 1.1.3. Rôle, fonction

Le tissu adipeux est d'abord connu pour :

- sa fonction de réserve énergétique,
- son rôle de soutien et de protection mécanique (« coussinets » palmaires et plantaires),
- son rôle d'isolant permettant de diminuer la déperdition thermique, le tissu adipeux sous-cutané participant à la protection contre le froid.

#### 1.1.3.1. Fonctions métaboliques et stockage

Le tissu adipeux est en premier lieu un organe de stockage des lipides. Il constitue la principale réserve d'énergie du corps, les acides gras étant le principal combustible d'un homme adulte. Les acides gras stockés dans le tissu adipeux sont ainsi libérés dans la

circulation sanguine lorsque les autres cellules du corps en ont besoin. D'un point de vue plus métabolique, l'adipocyte est capable de capter le glucose et les acides gras circulant dans les lipoprotéines plasmatiques pour synthétiser des triglycérides qu'il stocke dans sa gouttelette lipidique. Puis lorsque l'organisme a besoin d'énergie, l'adipocyte procède à la lipolyse, c'est-à-dire à l'hydrolyse des triglycérides, libérant ainsi des acides gras et du glycérol, alors disponibles pour les tissus et organes périphériques (Wronska and Kmiec 2012).

Mais le tissu adipeux a des fonctions plus variées...

### **1.1.3.2. Tissu adipeux : organe sécrétoire et endocrine**

Outre les fonctions métaboliques, d'autres fonctions insoupçonnées ont été mises en évidence depuis une vingtaine d'années. En effet, le tissu adipeux est maintenant considéré comme un véritable organe endocrine où l'adipocyte est au cœur de ce système, participant à la régulation de l'homéostasie énergétique de l'organisme (Rosen and Spiegelman 2006; Henry, Bensley et al. 2012).

Ce nouveau paradigme est né avec la découverte de la leptine, produit du gène *obese* (*ob*) (Zhang, Proenca et al. 1994). Cette hormone à activité pléiotropique est sécrétée par les adipocytes matures et joue un rôle endocrine crucial sur l'hypothalamus, permettant de réguler la prise alimentaire en contrôlant la sensation de satiété, et permettant de réguler la balance énergétique. Le tissu adipeux est donc en relation étroite avec le système nerveux central.

Les adipocytes sont également étroitement liés les uns aux autres, produisant des facteurs paracrines et autocrines agissant cette fois sur la prolifération des précurseurs adipocytaires et leur différenciation en adipocytes matures, ainsi que sur la vascularisation locale du tissu.

L'adipocyte est ainsi capable de sécréter un large éventail de molécules de nature protéique ou lipidique, qui agissent de façon endocrine, paracrine ou autocrine (Tableau 1).

Un certain nombre de cytokines ou adipokines sécrétées interviennent dans l'inflammation et la réponse inflammatoire. C'est le cas par exemple de l'adiponectine, du TNF $\alpha$  (« Tumor Necrosis Factor-alpha »), des interleukines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, de MCP-1 (« Monocyte Chemoattractant Protein-1 »), du VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor »), de PAI-1 (« Plasminogen Activator Inhibitor-1 ») (Trayhurn 2005).

Cytokines		Effets biologiques
Adipokines	Leptine	Signal de satiété et dépense énergétique
	Adiponectine	Augmente la sensibilité à l'insuline et anti-inflammatoire
	Résistine	Diminue la sensibilité à l'insuline
	Visfatine	Activité semblable à l'insuline
	VEGF	Stimule la prolifération vasculaire et l'angiogenèse
	Angiotensinogène	Régule la pression artérielle
Cytokines pro-inflammatoires	TNF $\alpha$	Augmente la lipolyse et diminue la sensibilité à l'insuline
	IL-1 $\beta$	Pro-inflammatoire
	IL-6	Augmente la lipolyse et diminue la sensibilité à l'insuline
	MCP-1	Chémokine, recrute les monocytes et les macrophages
Cytokines anti-inflammatoires	IL-4	Réduisent l'inflammation et accélèrent la réparation tissulaire
	IL-13	
Protéines phagiques	PAI-1	Bloque la fibrinolyse, hémostase vasculaire
	CRP	Se lie aux microbes et assiste l'immunité innée

**Tableau 1 : Les principales adipokines et leurs effets biologiques.** Adapté et traduit de (Shiffman 2010). VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor ; TNF $\alpha$  Tumor Necrosis Factor alpha ; IL-1 $\beta$ , Interleukin-1 beta ; IL-6 Interleukin-6 ; MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1 ; IL-4, Interleukin-4 ; IL-13, Interleukin-13 ; PAI-1, Plasminogen Activator Inhibitor 1 ; CRP, C-Reactive Protein

Les adipokines sont finalement impliquées dans d'importants processus biologiques incluant la régulation de la balance énergétique, la prolifération et la différenciation adipocytaire, l'angiogenèse, les réponses immunes, mais aussi la reproduction, la coagulation sanguine et la régulation de la pression sanguine.

Depuis la découverte de toutes ces fonctions, un rôle beaucoup plus complexe et dynamique du tissu adipeux blanc a donc vu le jour.

Mais un autre rôle a été attribué au tissu adipeux : outre son rôle sur le plan physiologique, le tissu adipeux tient également un rôle artificiel en chirurgie, étant utilisé comme produit de comblement en chirurgie esthétique et reconstructrice.

## **1.2. Le transfert de graisse autologue ou « lipofilling »**

Tel que son nom l'indique, la chirurgie esthétique a pour but d'améliorer l'image que nous percevons de nous-mêmes et que nous véhiculons aux autres. Les critères de beauté ont évolué au fil des siècles et on est maintenant bien loin de l'époque où il était bon d'être « bien en chair », plantureux, comme au 19<sup>ème</sup> siècle ou même avant (Figure 1). Le canon de beauté est maintenant représenté par la maigreur, l'aspect filiforme. Mais alors que ce critère esthétique est ancré dans l'inconscient collectif, il est peut-être encore bon d'avoir un peu de gras...

Contenant de nombreuses cellules et étant facilement accessible, le tissu adipeux sous-cutané est un tissu de prédilection pour la chirurgie esthétique et reconstructrice.

Le tissu adipeux s'est révélé être un bon produit de comblement. Il est maintenant couramment utilisé pour combler les tissus mous et redonner du volume. Cette technique est appelée transfert de graisse autologue ou « fat grafting » ou encore, « lipofilling ».

### **1.2.1. Les applications**

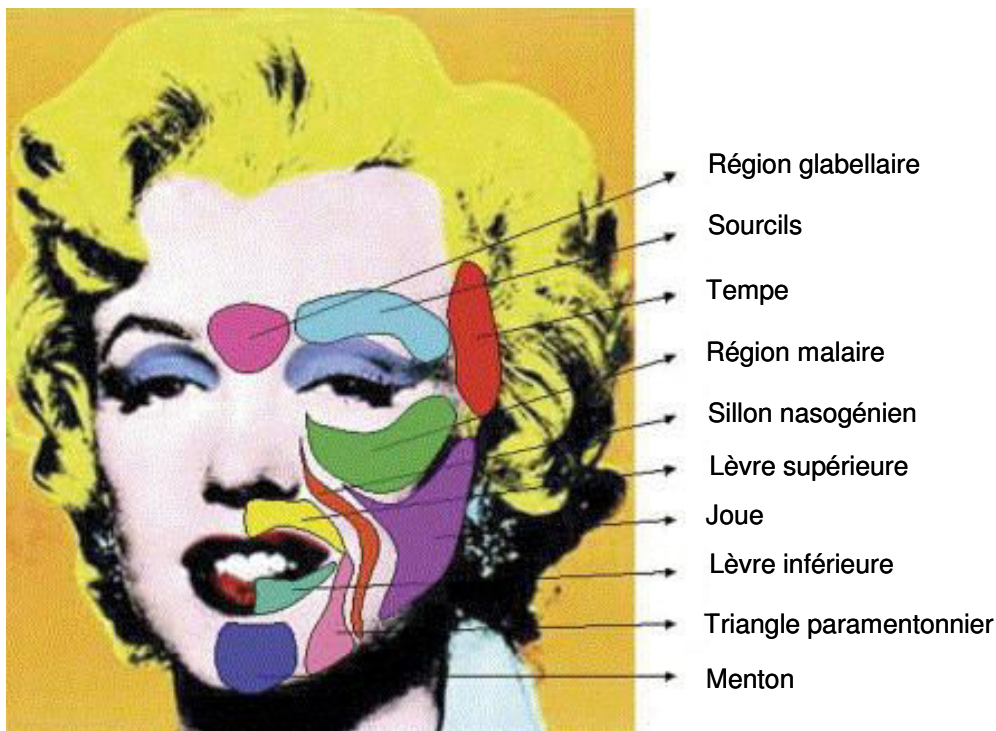
Le lipofilling a récemment gagné en popularité, particulièrement grâce au développement de la technique de lipoaspiration et également grâce à l'abondance et la disponibilité du tissu adipeux sous-cutané dans le corps humain.

Il est utilisé pour la correction de défauts des tissus mous ainsi que pour le rajeunissement du visage et le remodelage du corps. Les applications sont donc assez nombreuses.

On peut distinguer les indications esthétiques et les reconstructions suite à des modifications d'origine pathologique.

Dans les indications esthétiques, la greffe de graisse est indiquée pour toute perte de volume due au vieillissement. Le vieillissement est en effet marqué par une diminution de la tonicité de la peau, des muscles, des fascias et des ligaments (ptôse des téguments) ainsi que par une atrophie des tissus entraînant des modifications volumétriques et des irrégularités de contour. Le lipofilling va donc permettre le rajeunissement facial par le comblement des rides et des zones ptosées (Coleman 2006) (Figure 5), mais peut s'adresser à d'autres régions comme le rajeunissement des mains (Coleman 2002). Le lipofilling est également indiqué pour corriger

les cicatrices d'acné, redonner du volume aux lèvres, pour l'augmentation et le remodelage des fesses, les dépressions trochantériennes et glutéales, l'augmentation mammaire, le remodelage des cuisses et des jambes (augmentation des mollets et des chevilles), les séquelles de lipoaspiration ou de rhinoplastie, ainsi que pour redonner du volume au niveau des organes génitaux masculin et féminin.



**Figure 5 : Zones du visage pouvant être indiquées dans le lipofilling.** Reproduit de (Foyatier, Mojallal et al. 2004).

D'un point de vue purement esthétique, bien que les femmes soient les premières à bénéficier de cette technique pour répondre aux critères actuels de beauté, de plus en plus d'hommes se prêtent également au jeu de la « beauté et de la jeunesse », et s'intéressent à leur tour aux bénéfices que peut leur apporter cette technique. Globalement, les hommes peuvent faire appel au « fat grafting » pour les mêmes applications que chez la femme.

Les applications ne sont pas seulement esthétiques. Diverses malformations d'origine pathologique peuvent en effet bénéficier de la greffe de graisse. Elle peut être utilisée en chirurgie reconstructrice pour corriger les malformations congénitales ou acquises, parmi lesquelles les dépressions de la face dues au syndrome de Parry-Romberg, le syndrome de

Poland pour la poitrine, la microsomie hémifaciale... Peuvent également être corrigés : les défauts suite à des traumatismes ou des accidents (brûlures, morsures, défiguration, cicatrices prononcées...), la lipoatrophie faciale due à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la sclérodermie, et toute autre irrégularité de contour et asymétrie dues à une carence des tissus mous. Les malformations de cause iatrogène sont également concernées, comme les séquelles et cicatrices de chirurgie, les dégâts occasionnés par les chirurgies tumorales, les séquelles de radiothérapies et chimiothérapies (Tabit, Slack et al. 2012).

Dans le domaine du traitement oncologique par la chirurgie, la greffe de graisse peut être utilisée pour la reconstruction mammaire après exérèse partielle ou totale du sein. Cette utilisation est cependant sujette à controverse en raison des risques mal connus de nouvelle tumorigenèse pouvant être induite ou stimulée par le par le tissu adipeux greffé. Des études récentes supportent en effet l'idée que les adipocytes peuvent se différencier au contact de cellules cancéreuses au niveau du sein et contribuer ainsi à la tumorigenèse (Tan, Buache et al. 2011). Par principe de précaution, certains préfèrent utiliser des implants mammaires. Cependant, de plus en plus de chirurgiens emploient la greffe de graisse après mastectomie (Gurunluoglu, Gurunluoglu et al. 2011; Petit, Lohsiriwat et al. 2011), grâce à des séries d'expériences comme celles d'Illouz qui permet de documenter une certaine innocuité. Illouz et Sterodimas rapportèrent en effet 25 ans d'augmentation mammaire esthétique et reconstructrice avec 820 femmes opérées, soit pour une asymétrie après mastectomie ou reconstruction mammaire, soit pour une asymétrie congénitale, ou soit pour une augmentation mammaire bilatérale (Illouz and Sterodimas 2009). Le chirurgien français Delay est devenu un spécialiste du domaine, ayant rapporté également de nombreux cas d'injection de graisse dans les seins (880 cas sur 10 ans) et ayant publié de nombreux travaux à ce sujet (Delay, Garson et al. 2009). Suite à un nombre grandissant d'études, la Société Française de Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique (SoFCPRE) a émis des recommandations quant à cette pratique :

- lors d'une mastectomie totale, un examen préclinique minutieux doit être réalisé, comprenant notamment une échographie et éventuellement une biopsie ;
- lors de reconstruction mammaire partielle après tumorectomie, le transfert de graisse dans le sein ne peut être réalisé qu'après 3 ans de surveillance clinique et radiologique (surveillance des récidives)

- lors de reconstruction mammaire pour cause de malformations congénitales ou à visée esthétique, un examen radiologique est également préconisé, et la patiente ne doit pas présenter de risque de développer un cancer du sein ;
- un bilan d'imagerie médicale est également recommandé un an après l'intervention.

Ces dernières années, la greffe de tissu adipeux a élargi ses champs d'application. Par exemple, elle a été utilisée pour le rajeunissement des mains, la correction d'atrophies, la correction des déformations au niveau des membres inférieurs et des hanches, mais aussi pour traiter l'incontinence fécale (Shafik 1995), ou encore pour traiter les cordes vocales endommagées (Coulombeau, Perouse et al. 2001; Umeno, Shirouzu et al. 2005). Le lipofilling peut aussi être indiqué en complément d'un autre acte chirurgical, notamment en complément d'un lifting facial (Foyatier, Mojallal et al. 2004) ou d'une liposculpture (Ali 2011).

Les applications sont maintenant de plus en plus variées car le lipofilling a fait naître un véritable engouement auprès des patients. Ces derniers sont de plus en plus attirés par cette technique qui utilise un produit d'origine naturelle (leur propre graisse), contrairement aux injections de substances étrangères (type acide hyaluronique) et aux prothèses. Le lipofilling n'engage aucun problème de rejet puisque la graisse provient du même individu et ne nécessite pas d'autres interventions comme pour les prothèses, qui ont une durée de vie limitée dans l'organisme et doivent être remplacées à peu près tous les 10 ans.

Face à cet engouement, les chirurgiens recherchent des moyens pour augmenter l'efficacité de cette méthode et s'intéressent notamment aux cellules souches mésenchymateuses contenues dans le tissu adipeux, qui pourraient permettre d'améliorer la prise de greffe et la survie du greffon. Ces cellules possèdent en effet de nombreuses propriétés dont celle de produire des facteurs trophiques, très avantageux pour la reconstruction tissulaire (Trojahn Kollé, Oliveri et al. 2012). Mais nous y reviendrons par la suite, le deuxième chapitre de ce manuscrit étant entièrement consacré à ces cellules.

### **1.2.2. Historique**

Le transfert de graisse autologue remonte à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. En 1889, Van der Meulen s'aidera de graisse pour traiter une hernie diaphragmatique. Mais l'histoire du « fat grafting » commence réellement en 1893 avec Gustav Adolf Neuber, un chirurgien allemand qui fut le

premier à utiliser des greffes de graisse chez l'homme (Neuber, 1893). Ce pionnier traita un homme de 20 ans en utilisant la graisse pour combler une dépression des tissus mous au niveau du visage, due à une ostéite tubéreuse. Il attachait de l'importance à la taille des greffons, ayant pour idée que les petits greffons graisseux avaient une meilleure chance de survivre, ceux-ci étant vascularisés plus facilement et plus rapidement. A l'inverse, il déclara que de gros greffons ne pouvaient pas donner de bons résultats. Pour traiter le jeune homme, il préconisa ainsi l'utilisation de multiples petits fragments de tissu adipeux, dont la taille ne dépassait pas celle d'une amande.

Les idées et les techniques évoluèrent ensuite considérablement au cours du siècle dernier. Depuis les premières utilisations de graisse, trois grandes périodes ont marqué cette évolution (Billings and May 1989; Mojallal and Foyatier 2004):

- l'époque « à ciel ouvert » (1889-1977), avant la lipoaspiration, durant laquelle le tissu adipeux était prélevé par excision chirurgicale ;
- l'époque appelée « non purifiée » (1977-1994) après la découverte de la lipoaspiration ;
- l'époque dite « purifiée, atraumatique » (1994), faisant suite aux travaux de Coleman.

#### **1.2.2.1. L'époque « à ciel ouvert » (1889-1977)**

L'époque « à ciel ouvert » (1889-1977) correspond aux premières autogreffes de tissu adipeux. Bien que des idées émergent, la technique n'en est qu'à ces balbutiements. De nombreuses questions se posent : Comment récupérer la graisse ? En quelle quantité ? De petits fragments de graisse sont-ils préférables ? Comment peuvent survivre les greffons ? Quelles sont toutes les applications possibles du transfert de graisse ? Etc.

Les chirurgiens tâtonnent, expérimentant de nouvelles techniques pour récupérer des fragments plus ou moins gros de tissu adipeux et les greffer. Peu après Neuber, Czerny rapporte en 1895 le premier cas de reconstruction mammaire en utilisant un volumineux lipome pour combler une tumorectomie mammaire. En 1910, Lexer rapporte son expérience personnelle d'utilisation de la graisse en chirurgie esthétique. Il propose des actes essentiellement au niveau du visage, avec l'augmentation des régions malaires et géniennes, ainsi que le comblement des rides et des sillons pour lutter contre les effets de l'âge. Plus tard,



il va également opérer une patiente atteinte du syndrome de Romberg. En 1911, Bruning tente de développer une méthode originale pour corriger une rhinoplastie en injectant sous la peau des petits fragments de graisse à l'aide d'une seringue. Malgré une idée intéressante, sa méthode ne sera pas satisfaisante en raison de la résorption progressive des greffons.

Dans le but cette fois de modifier l'apparence pour tromper l'ennemi, des transferts de graisse sont réalisés chez des espions alliés durant la seconde guerre mondiale.

La technique ne se limite pas à la reconstruction faciale : après Czerny, d'autres chirurgiens s'attellent à la reconstruction mammaire, et parmi eux, Lexer (1931), May (1941), Bames (1953) et Schrocher (1957). Les indications se sont élargies et la greffe de tissu adipeux a progressivement intéressé d'autres parties du corps.

Malgré certains échecs liés à la résorption de la graisse, les résultats encouragent les chirurgiens à poursuivre leurs recherches de nouveaux procédés. Au vu des premiers résultats, les pionniers commencent à s'intéresser de près à la survie des greffons. Suite à ses opérations, Lexer conclut d'ailleurs que le tissu graisseux doit être manipulé avec précaution, que ce soit lors du prélèvement ou lors de la réimplantation.

L'étude plus approfondie du tissu adipeux et de sa physiologie est alors nécessaire pour améliorer les résultats. En 1948, Wertheimer et Shapiro décrivent une découverte majeure, rapportant que la graisse se développe à partir de cellules primitives ressemblant aux fibroblastes des tissus conjonctifs (Wertheimer and Shapiro 1948).

Parallèlement à l'étude du tissu adipeux, les travaux sur la survie des greffons se multiplient. En 1950, Peer remarqua que les greffons perdaient environ 50 % de masse et de volume après un an. Il postula la théorie de la survie cellulaire, théorie selon laquelle les adipocytes greffés survivent et continuent leur cycle de développement au niveau du site receveur (PEER 1950). Ceci s'explique par le fait que la vascularisation du greffon se fait par anastomose et néovascularisation, ce dont dépendra sa survie. Mais ce processus ne survient que 4 jours après la transplantation. Avant cela, deux éléments sont préjudiciables au greffon : l'ischémie et/ou le phénomène inflammatoire. En effet, les adipocytes connaissent au préalable une phase d'ischémie et sont également vulnérables à l'afflux des cellules macrophages, des histiocytes et des polynucléaires qui interviennent pour nettoyer les débris. De plus, la néovascularisation débute à la périphérie : le centre du greffon subit une ischémie prolongée et sa revascularisation dépendra une fois de plus de la taille des fragments (ceux de petite taille ayant évidemment plus de chance).

Cette théorie sera vérifiée et prônée par de nombreux chirurgiens (Shiffman 2010) (Shiffman 2010). Ceci n'explique pourtant pas la fonte des greffons pouvant être observées plusieurs mois après...

Les phénomènes d'ischémie aiguë, qui ont lieu les premiers jours, n'expliquent pas la mort à plusieurs mois, ce qui présage des phénomènes encore plus complexes impliquant des mécanismes cellulaires encore non élucidés. Ces phénomènes font en effet appel à l'homéostasie tissulaire, à l'activité biologique des cellules, au remaniement tissulaire, etc. Les cellules souches du tissu adipeux (ASCs, « adipose stem cells ») y sont peut-être pour quelque chose : étant capables de se différencier en adipocytes matures, on peut imaginer que la mort des ASCs empêche le renouvellement des adipocytes (adipogenèse) au sein du greffon, ce qui pourrait en partie expliquer pourquoi le volume perdu n'est pas comblé.

#### **1.2.2.2. L'époque « non purifiée » (1977-1994)**

Alors que le prélèvement de la graisse se faisait par exérèse, voir curetage, il faut attendre 1974 pour voir la création d'une technique révolutionnaire : la lipoaspiration.

En 1974, Fischer et Fisher conçoivent la technique de lipoaspiration. Plus tard, en 1977, les médecins français Illouz et Fournier développent la procédure et l'introduisent en clinique. Ils utilisent alors des canules à bout émoussé. Cette nouvelle technique de « tunneling » va permettre de collecter la graisse sans avoir à pratiquer une large incision. Cette technique va ensuite être exportée aux Etats-Unis : des chirurgiens fortement intéressés traversèrent l'Atlantique pour venir se former à Paris sous la tutelle des pionniers. Dans les années 80, la lipoaspiration devient alors extrêmement populaire aux Etats-Unis et une société savante du nom de « American Society of Lipo-Suction » voit le jour en 1982 (Sumrall 1987). Puis Klein, un dermatologue de Californie, inventa la lipoaspiration tumescence qui consiste à infiltrer au niveau de la zone de prélèvement un anesthésique local et un vasoconstricteur dilués dans un grand volume de liquide (type sérum physiologique) (Wolkenstein, Klein et al. 1987). Cette technique permit aux patients de bénéficier d'une lipoaspiration totalement sous anesthésie locale, ce qui évite les risques liés à une anesthésie générale et favorise un temps de récupération court. Cela permettait également d'utiliser des canules beaucoup plus petites et de pratiquer des lipoaspirations superficielles, à seulement 3 à 4 mm de profondeur sous-cutanée (Sterodimas, Boriani et al. 2012). Les patients n'avaient plus à craindre les

saignements excessifs et les dépressions cutanées indésirables. De plus, la lipoaspiration par canulation ne semblait pas endommager les adipocytes. Alors vers le milieu des années 80, les chirurgiens plasticiens commencèrent à transplanter ou injecter de la graisse obtenue par lipoaspiration (Illouz 1986; Bircoll 1987). En 1989, Fournier met en place une méthode d'injection de graisse non purifiée qu'il nomme « liposculpture ».

Grâce à cette nouvelle technique, les chirurgiens vont pouvoir s'intéresser de plus près à la qualité du tissu qu'ils souhaitent réinjecter pour optimiser leur résultat.

### **1.2.2.3. L'époque « purifiée, atraumatique » (1994)**

En 1994, un siècle après les toutes premières greffes de graisse, S.R. Coleman rentre à son tour dans l'histoire du « fat grafting » en s'attaquant cette fois à la préparation du tissu adipeux. La technique de lipoaspiration étant bien maîtrisée et reconnue à travers le monde, Coleman crée une procédure permettant la purification du tissu adipeux avant sa réinjection (Coleman 1995; Coleman 1997; Coleman 1998). A partir des méthodes et des résultats de ses prédécesseurs, il met en place un protocole dont le principe repose sur le caractère atraumatique de la manipulation du tissu adipeux. Il codifie rigoureusement les étapes de sa technique, de la lipoaspiration à la réinjection, en passant par une étape intermédiaire de purification du tissu. Cette étape consiste à centrifuger le lipoaspirat de façon à débarrasser le tissu adipeux du liquide ayant servi pour l'infiltration (contenant anesthésique et adrénaline). La technique, qu'il nomme « Lipostructure », sera peu après introduite en France par le Pr Magalon qui rapportera des arguments en faveur de l'utilisation de cette technique (Jauffret, Champsaur et al. 2001).

La technique de Coleman est depuis utilisée dans le monde entier et est devenue une référence internationale. Mais malgré les avancées majeures faites par Coleman, la technique n'est encore pas parfaite puisque la tenue du greffon n'est pas optimale. Ainsi, au fil du temps, certains tentent d'affiner ce protocole afin d'optimiser d'avantage la survie cellulaire et d'améliorer encore les résultats esthétiques. L'histoire du « fat grafting » n'est donc pas encore à sa fin...

#### **1.2.2.4. Description de la technique**

Selon le nombre de sites donneurs nécessaires et la quantité de graisse à transférer, l'intervention aura une durée plus ou moins longue (en moyenne d'1h à 4h).

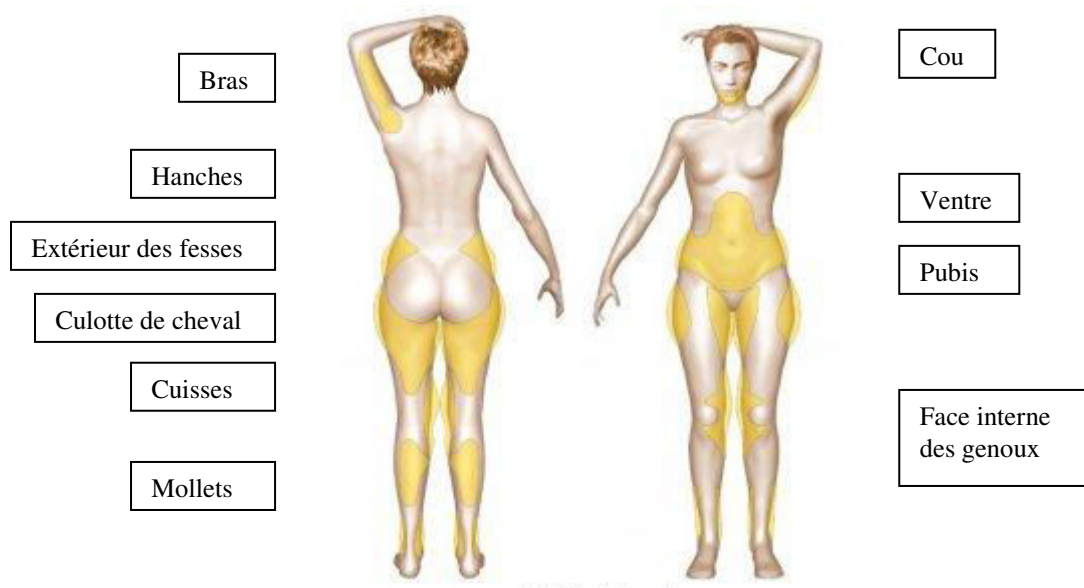
De la lipoaspiration à la réinjection, la procédure entière peut se faire, soit sous anesthésie générale, soit sous anesthésie locale. Le chirurgien doit discuter des ces options avec le patient. Le choix se fait en fonction des éventuels antécédents du patient, ainsi que du volume de la zone à corriger. Pour une reconstruction mammaire par exemple, il sera préférable d'opter pour une anesthésie générale en raison de la durée d'intervention, assez longue (4h), et de la complexité de l'opération. Cette opération nécessite de prélever un volume important de graisse et plusieurs sites anatomiques peuvent donc être concernés (fesses, hanches, abdomen, face interne des genoux, et bien sûr les seins en tant que site receveur). Cependant, il ne faut pas oublier que la sécurité des patients est l'aspect le plus important de toutes les chirurgies. Aussi, la technique de lipoaspiration tumescente a représenté une avancée majeure qui permet aux patients de ne pas avoir à subir d'anesthésie générale, c'est-à-dire une anesthésie lourde pouvant entraîner des complications et présentant des risques non négligeables pour le patient. Mais l'anesthésie due à l'infiltration tumescente peut également venir en complément d'une anesthésie générale, notamment dans le cas de lipoaspiration importante, et permet dans ce cas un réveil moins douloureux pour le patient, tout en évitant également des saignements trop abondants au cours de la procédure.

Sur les bases de la technique de Coleman, voici une description des différentes étapes qui mènent au « fat grafting ».

#### **1.2.2.5. Procédure de lipoaspiration**

La première étape essentielle est évidemment le prélèvement du tissu adipeux sous-cutané. Depuis sa mise au point en 1977, la lipoaspiration s'est avérée être la méthode de choix pour effectuer ce prélèvement. De plus, la technique tumescente a révolutionné la lipoaspiration en éliminant à la fois les risques liés à l'anesthésie générale et les saignements, tout en apportant un certain confort au patient.

Le prélèvement du tissu adipeux est effectué à partir d'une micro-incision, cachée généralement dans les plis naturels pour accentuer le caractère esthétique. La région de prélèvement est choisie en fonction des réserves de graisse, là où elles sont en excès, et en fonction du volume requis pour la réinjection (figure 6). Il s'agit le plus souvent de la région abdominale, de la région trochantérienne, ou de la face interne des genoux. Chez les patients très minces, toutes les zones du tissu adipeux peuvent être touchées.



**Figure 6 : Zones habituelles de liposuction**

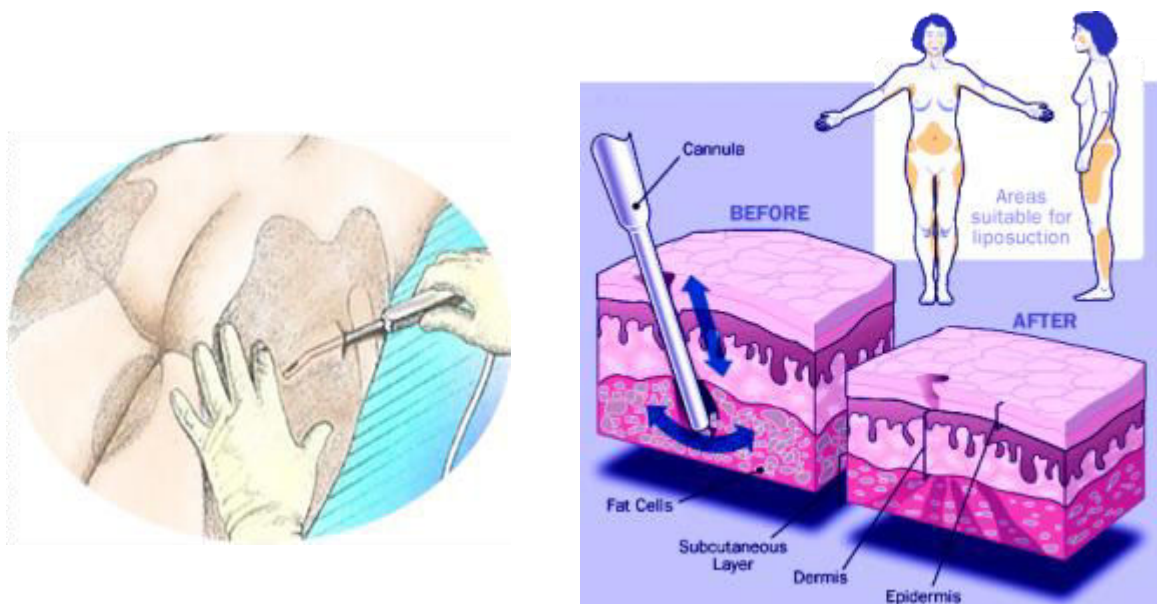
L'infiltration est l'étape préliminaire à la lipoaspiration. Suite à une micro-incision au niveau du point d'entrée de la canule, le chirurgien infiltre la zone à prélever au moyen d'une canule à embout émoussé de faible diamètre et disposant de petits orifices latéraux à l'extrémité, laissant passer le liquide d'infiltration (type canule de Klein). Ce liquide d'infiltration consiste en un grand volume de sérum physiologique (ou de Ringer Lactate) dans lequel peuvent être rajoutés un vasoconstricteur et éventuellement un anesthésique local, fortement dilués. L'anesthésique local le plus couramment utilisé est la lidocaïne, quant au vasoconstricteur, il s'agit de l'adrénaline ou d'un analogue pharmacologique, qui était d'ailleurs déjà utilisée avant le développement de la lipoaspiration tumescence par Klein. Le tissu adipeux sous-cutané étant richement vascularisé, l'utilisation des agonistes alpha-adrénergiques permet d'éviter les saignements et est aussi connue pour accentuer les effets de la lidocaïne en diminuant la perfusion de l'organe par la vasoconstriction (Bernards and Kopacz 1999).

Suivant son contenu, l'infiltration permet d'une part, d'anesthésier la zone de prélèvement et d'éviter les saignements, mais elle permet aussi de préparer le « terrain » de lipoaspiration en décollant les tissus.

Suite à l'infiltration, le prélèvement du tissu adipeux peut alors débuter (Figure 7). Sur les bases du protocole courant de Coleman, ce prélèvement est effectué à l'aide d'une canule d'aspiration spécifique de 3 mm de diamètre, longue de 15 cm, à bout mousse et avec doubles orifices assez larges pour permettre le passage d'amas de lobules adipeux. Cette canule est montée sur une seringue vissée (LuerLock) de 10 mL dans laquelle le vide est créé manuellement. Lors du prélèvement, le chirurgien réalise de multiples tunnels au passage de la canule de façon à diminuer le traumatisme et l'hémorragie.

Bien que la technique de Coleman soit bien reconnue, tous ne suivent pas à la lettre ses indications. Nombreux sont ceux qui adoptent leur propre technique en fonction des cas qu'ils rencontrent.

Différents types de canules existent de longueur et diamètre différents, adaptés selon la zone à prélever. Des seringues de 50 mL peuvent également être utilisées mais la dépression utilisée est souvent supérieure. La dépression peut être également créée de façon automatique à l'aide de machines permettant d'aspirer la graisse.



**Figure 7 : Lipoaspiration.**

### 1.2.2.6. Préparation du tissu adipeux

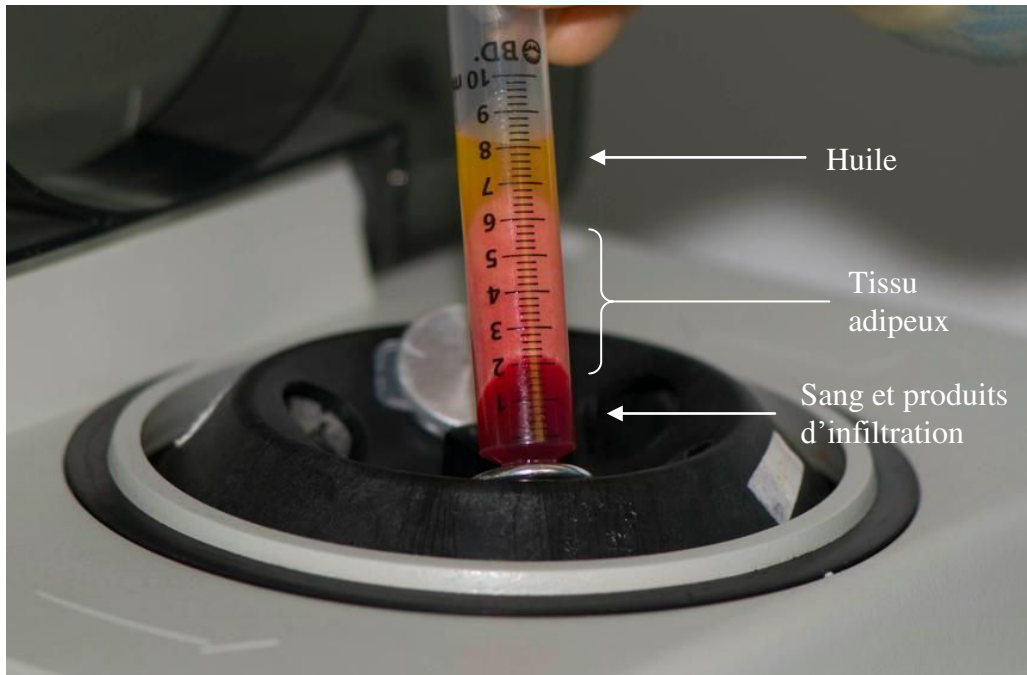
Là encore, le manque de standardisation donne lieu à une grande variabilité dans les méthodes utilisées.

Initialement, l'idée de Coleman est de séparer les cellules graisseuses intactes, qui seront greffées, des autres éléments qui ne sont pas greffables. Toutes les méthodes utilisées à l'heure actuelle convergent vers cette idée, même si certaines sont nettement plus efficaces que d'autres.

Dans le protocole de Coleman, les seringues de 10 mL issues de la lipoaspiration sont obturées à l'aide de bouchons « Coleman LuerLock Caps ». Une fois les seringues remplies le piston est retiré et elles sont entreposées dans un rack stérile. Puis les seringues sont introduites dans une centrifugeuse et une centrifugation de 3 minutes à une vitesse de 1800 g est effectuée (Coleman 1998).

À l'issue de cette centrifugation, le lipoaspirat contenu dans la seringue est séparé en trois phases distinctes (figure 8) :

- au-dessus, le surnageant huileux représente la partie la moins dense, constitué de triglycérides issus des adipocytes abîmés ayant éclaté et libéré leur gouttelette lipidique. Cette partie est éliminée ;
- la partie intermédiaire comprend les adipocytes à greffer ;
- la partie inférieure contient essentiellement les produits sanguins et les débris d'origine hématique avec le reste du produit d'infiltration. Cette partie est également éliminée.



**Figure 8 : Seringue de lipoaspirat après centrifugation.** Le tissu adipeux à greffer est compacté dans la partie intermédiaire, débarrassé en partie du liquide d'infiltration et de l'huile.

D'autres protocoles sont utilisés. Certains préfèrent laisser le tissu simplement décanter au lieu de le centrifuger, d'autres vont utiliser des temps et vitesse de centrifugation différents, d'autres encore vont rajouter des lavages du tissu entrecoupés de décantation ou de centrifugation.



### 1.2.2.7. Réinjection

Selon la méthode de Coleman, la réinjection du tissu graisseux se fait à l'aide de canules fines dont le diamètre est de l'ordre de 1,2 mm, à partir d'incisions de 1 mm.

Lorsque le tissu adipeux doit être greffé au niveau de la face ou de petites zones, la graisse obtenue après purification est transférée des seringues de 10 mL dans des seringues de 1 mL à l'aide d'un robinet à deux ou trois voies. De même que pendant tout le processus opératoire, ce geste requiert une totale asepsie et doit se faire à l'abri de l'air. Ce geste doit également être délicat, en évitant toute pression sur les seringues de façon à ne pas abîmer les adipocytes. Le transfert dans des seringues plus petites ne s'applique pas toujours pour les gros volumes de graisse à réinjecter, comme dans le sein.

Comme pour les canules d'infiltration et de prélèvement, les canules utilisées pour la réinjection sont émoussées afin d'éviter les hématomes au niveau du site receveur et tout traumatisme supplémentaire. Des canules de réinjection de 17-18 gauges (soit 1,2 mm de diamètre extérieur) avec forme et longueur variables ont été conçues par Coleman. Ces canules sont conçues de manière à ne pas endommager les adipocytes (canule et orifice de taille suffisante). Mais certains utilisent d'autres canules ou des aiguilles de 14 à 25 gauges, selon la méthode de purification du tissu effectuée au préalable (Sommer and Sattler 2000).

Une fois que le tissu est prêt pour la réinjection, le chirurgien introduit la canule jusqu'au bout par l'incision qu'il a effectué au préalable, puis la graisse est injectée par mouvement rétrograde de la canule.

Le chirurgien procède ainsi à l'injection de microparticules de graisse, le but étant de déposer les plus petites quantités possibles à chaque passage. Pour cela, l'injection se fait dans différents plans et dans des directions multiples et divergentes, formant ainsi un treillis tridimensionnel dans le tissu à greffer. Chacune des seringues doit permettre d'effectuer des dépôts dans plusieurs tunnels. Il est important de réaliser une multitude de tunnels qui se croisent et tous les plans doivent être greffés, en commençant en profondeur. Le but de ce procédé est d'augmenter la surface de contact entre les lobules implantés et les tissus receveurs, et donc d'améliorer la survie des cellules adipeuses greffées.

Les quantités de graisse injectées vont dépendre de la zone (Hernandez-Perez 1998) (Tableau 2). Prenant en compte la résorption de la greffe, beaucoup préfèrent réinjecter 30 à 50 % de graisse en plus du volume nécessaire à une correction optimale (Sommer and Sattler 2000).

<b>Zones de réinjection</b>	<b>Volume de graisse recommandé</b>
Région malaire, lèvres, joues, menton	10-20 mL
Seins, chez la femme	150-300 mL par côté
Fesses	100-150 mL par côté (en direction du muscle grand glutéal)
Organes génitaux externes masculins	60-80 mL
Organes génitaux externes féminins	120 mL en 3 points (pubis et lèvres)
Dos des mains	20-30 mL par côté
Mollets	60-100 mL par côté

**Tableau 2 : Volume de graisse recommandé pour la réinjection, en fonction de la zone.** Données d'après (Hernandez-Perez 1998).

Le concept que Coleman a échafaudé est tout à fait original puisqu'il prend en compte l'importance de la survie du tissu adipeux lors de chaque étape, du prélèvement à la réinjection. Ce concept a fait ses preuves lors de nombreuses interventions. Cependant, certaines problématiques restent associées à la prise de greffe et la survie du greffon...

### **1.2.3. Problématiques associées à la prise de greffe**

Ces 20 dernières années ont vu un engouement croissant pour l'utilisation de greffe autologue de tissu adipeux pour traiter les défauts de volume et de contour en chirurgie esthétique et reconstructrice. La greffe de tissu adipeux est devenue pratique courante, étant notamment une bonne alternative face aux produits de synthèse et aux prothèses. Elle est ainsi considérée comme sûre et les patients traités sont globalement satisfaits. Cependant, malgré le protocole standardisé établi par Coleman, les procédures divergent d'un chirurgien à l'autre, car en terme d'efficacité clinique, l'inconvénient majeur de cette technique reste les taux de résorption imprévisibles et les effets indésirables ultérieurs décrits ci-après (Coleman 2004).

#### **1.2.3.1. Suites opératoires « normales »**

Suite à l'opération, il est normal de ressentir des douleurs qui sont généralement peu importantes. Celles-ci se feront sentir progressivement si le patient a reçu une anesthésie

locale. L'anesthésie locale permet au patient une récupération physique rapide du fait du caractère léger et superficiel de l'intervention. Cependant, une certaine fatigue peut être ressentie en cas de prélèvement d'un volume important de graisse.

Concernant les atteintes physiques visibles, des œdèmes (gonflement des tissus) peuvent apparaître et se résorberont dans la quinzaine de jours qui suit l'intervention. Au niveau des zones de réinjection, des ecchymoses (bleus) apparaissent dans les premières heures mais se résorbent 10 à 20 jours après l'intervention.

### **1.2.3.2. Complications de la greffe de graisse**

Irrégularités de contour, bosses, ecchymoses prolongées et asymétries dues à l'imprévisibilité de la prise greffe, font partie des effets indésirables.

Le risque d'infection n'est pas à négliger et la stérilité doit être maintenue tout au long de la procédure, même si peu de cas d'infection sont rapportés dans la littérature.

Les complications les plus fréquentes au niveau du site receveur sont la résorption partielle du greffon et la formation de kystes, et sur le site donneur, l'apparition d'hématomes. La formation de kystes est due à la mauvaise tenue du greffon (nécrose) et peut être atténuée grâce à l'injection de petits lobules de graisse (Johnson, 1987).

Les taux de résorption d'une greffe de tissu adipeux sont quant à eux très variables, allant de 20 à 80 %, et sont certainement dus à une ischémie et à un manque de néovascularisation. Cette résorption imprévisible dépend du site d'injection et peut engendrer des défauts de sous ou de sur-correction (selon le volume réinjecté et le taux de résorption) qui devront alors faire l'objet d'une nouvelle intervention pour parfaire le résultat (Kaufman, Miller et al. 2007).

Les sur-corrections peuvent provoquer une compression excessive des tissus conduisant à une nécrose de la graisse injectée et de la peau, avec la formation de sinus disgracieux.

D'autres conséquences plus délétères ont été rapportées. En 1988, Teimourian rapporta le cas d'un patient souffrant de douleurs et de la perte de la vue suite à la réinjection de graisse au niveau des lignes de froncement des sourcils (ou lignes glabellaires). Ceci était probablement dû à un embolisme des particules de graisse provoquant une thrombose au niveau de l'artère rétinienne centrale. Les réinjections au niveau de la région glabellaire présentent en effet des

risques non négligeables (Coleman 2004). D'autres cas similaires ont d'ailleurs été rapportés et le chirurgien se doit de prévenir le patient des risques encourus.

Si les injections excessives de graisse peuvent provoquer une compression des vaisseaux, conduisant à une nécrose des tissus, elles peuvent aussi atteindre les fibres nerveuses et provoquer une neuropraxie (compression du nerf avec atteinte de la gaine de myéline) ou une axonotmésis (rupture des axones). Le pronostic est assez bon et une récupération complète se fait avec le temps. Les volumes de réinjection doivent ainsi être raisonnables et l'idéal est d'éviter l'emploi d'aiguilles et de préférer des canules à bout mousse pour éviter une injection dans une artère ou encore, une neurotmésis (section ou rupture complète du nerf) provoquant alors, selon la gravité, une paralysie temporaire ou complète du territoire innervé (Shiffman 2010).

Des cas de calcification ont également été rapportés, essentiellement dans les augmentations mammaires. Il est alors difficile de faire la distinction entre ces calcifications et d'éventuelles micro-tumeurs que seul un radiologue expérimenté peut distinguer. L'injection de graisse au niveau de la poitrine doit être effectuée très prudemment (cf. recommandations de la SoFCPRE).

Kystes et calcifications peuvent conduire à une ossification, surtout dans le cas d'anomalie hormonale.

Finalement, toutes ces complications sont en partie dues à la nécrose des cellules adipeuses.

#### **1.2.4. Développement des protocoles en faveur de la survie du greffon**

L'histoire de la greffe de graisse a montré que la survie cellulaire est un enjeu essentiel.

Malgré l'évolution de la technique de transfert de graisse depuis Neuber (1893), la résorption des greffons est une problématique majeure qui subsiste. De la lipoaspiration à la réinjection, le but est d'éviter tout acte traumatisant pour la graisse.

De nombreux protocoles de manipulation du tissu adipeux ont été investigués de façon à trouver les meilleures techniques qui contribuent à la survie cellulaire (Kaufman, Bradley et al. 2007).

Jusque là, la première solution trouvée pour contrer la résorption du greffon était de procéder à la réinjection de volumes 30 à 50 % plus importants dans le site receveur pour compenser la fonte du greffon, et donc de meilleurs résultats. Mais cette solution n'est pas pérenne étant donné les risques de sur-correction pouvant conduire à la compression des artères, des nerfs, ainsi qu'à la nécrose du greffon et des tissus.

De plus les taux de survie du greffon varient considérablement en fonction de la méthode de prélèvement, de la manipulation du tissu adipeux, de la méthode de réinjection, du site d'injection et de la vascularisation du site receveur, pouvant donc conduire si le taux de résorption est faible à un résultat non conforme à l'attente du patient (Sommer and Sattler 2000).

Même si la plupart des chirurgiens se basent sur les découvertes antérieures et la technique de Coleman, d'autres protocoles font surface et chacun adopte sa propre méthodologie en fonction de ses habitudes et des résultats qu'il obtient. Malgré le manque de standardisation, ceci n'est pas complètement négatif puisque de nouvelles procédures intéressantes voient le jour. L'expérimentation est ainsi toujours présente mais loin des balbutiements, basée sur une réelle expertise scientifique. Le développement des moyens d'analyse modernes y a contribué, notamment avec l'imagerie médicale et les méthodes d'analyse biologique et biochimique dont on dispose à l'heure actuelle.

#### **1.2.4.1. Principales innovations**

Coleman a beaucoup influencé les chirurgiens, et pour de bonnes raisons : sa technique repose maintenant sur des principes fondamentaux consistant à prélever le tissu de façon la moins traumatique possible, à purifier le tissu adipeux, et à le réinjecter à l'aide d'une fine canule.

Les études se sont multipliées, comparant les différentes méthodes de prélèvement (seringue, machine, effet de la dépression) (Sommer and Sattler 2000), ou bien les différents protocoles de purification du tissu adipeux (Smith, Adams et al. 2006). D'autres études se concentrent sur la réinjection et l'utilisation de canules encore plus fines (Nguyen, Desouches et al. 2012).

D'autres procédés ont été testés et certaines innovations ont émergé.

Certains chirurgiens ont réalisé des greffes de graisse avec l'ajout d'un milieu de transfert contenant des substances telles que l'insuline ou le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), ceci afin d'améliorer la survie des adipocytes greffés (Hong, Lee et al. 2010).

Avec l'évolution des nouvelles technologies, ces additifs pourraient maintenant être administrés au moyen de matériaux issus de la bioingénierie. Une des stratégies ainsi développée consiste à délivrer des facteurs adipogéniques encapsulés dans des microsphères polymériques de PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid) (Yuksel, Weinfeld et al. 2000; Rubin, DeFail et al. 2009; Marra 2011). Ces facteurs (insuline et dexaméthasone, facteurs de croissance) sont lentement libérés au sein de la greffe de graisse, améliorant la vascularisation et stimulant la rétention du greffon. De cette façon, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) peut également être encapsulé dans ces microsphères pour être ensuite relargué et ainsi aider la vascularisation du greffon (Chung, Marra et al. 2012).

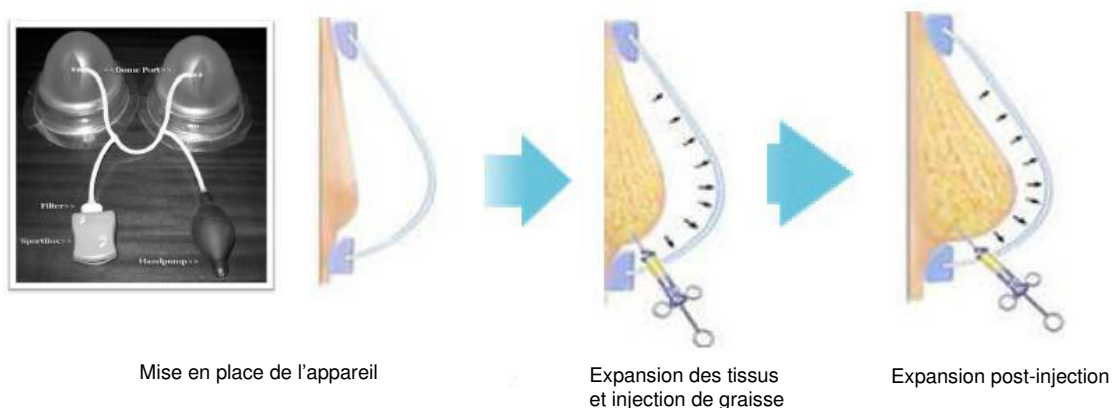
Il s'agit là de stratégies intéressantes mais l'efficacité de l'insuline seule n'est pas sûre (Nguyen, Pasyk et al. 1990) et le fait d'administrer des facteurs de croissance ou toute autre substance est souvent associé à des contraintes réglementaires et budgétaires supplémentaires. En effet, il ne s'agit plus de simple greffe autologue mais de greffe associée à un traitement médicamenteux. De plus, même si ces nouvelles stratégies voient le jour, des compléments d'étude sont nécessaires pour prouver l'innocuité d'un tel traitement et permettre une application chez l'homme. En particulier dans le domaine de la cancérogenèse, sachant que des craintes sont déjà présentes en injectant du tissu seul, l'ajout de facteurs de croissance est d'autant plus subversif.

Afin d'apporter des facteurs de croissance de manière autologue, certains ont pensé à utiliser du plasma riche en plaquettes ou PRP (Platelet-Rich Plasma) en complément de la greffe de graisse (Nakamura, Ishihara et al. 2010; Pires Fraga, Nishio et al. 2010; Oh, Cheon et al. 2011). Le PRP est un concentré de plaquettes (environ 5 fois supérieur à la normale) obtenu par centrifugation du sang du patient. Les plaquettes sont bien connues pour leur rôle dans la cicatrisation des plaies. Le PRP contient des facteurs de croissance et est notamment riche en PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et TGF $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor-beta 1).

Cependant, cette méthode est controversée et certains auteurs rapportent des résultats peu satisfaisants, chez l'animal comme chez l'homme (Por, Yeow et al. 2009; Salgarello, Visconti et al. 2011).

Des recherches sont en cours sur l'utilisation d'autres matériaux issus de la bioingénierie. Ces recherches visent la plupart du temps à apporter un support (« scaffold ») ou une matrice aux cellules du tissu adipeux. C'est ainsi que des polymères sont développés afin de protéger les adipocytes et augmenter la survie du greffon (Medina, Nguyen et al. 2011), de même que des matrices acellulaires de tissu adipeux (Wu, Nahas et al. 2012).

Pour les gros volumes, notamment pour les réinjections dans le sein, il est d'autant plus nécessaire de trouver de nouveaux procédés pour éviter les nécroses au sein du greffon, puisque les gros volumes injectés ont plus de chance de se résorber, étant moins facilement revascularisés. Certains combinent le fat grafting avec le système BRAVA<sup>®</sup> (Figure 9). La technique, développée par Khouri (Khouri, Eisenmann-Klein et al. 2012), consiste en une « pré-expansion » des tissus avant injection d'un gros volume de graisse (possibilité de réinjecter 300 cc), le but étant d'obtenir une matrice favorable à la greffe en créant une succion tridimensionnelle des tissus. Khouri rapporte des augmentations mammaires plus importantes, avec un meilleur rendu visuel, des taux plus élevés de survie des greffons, et peu de complications. Ce système est cependant très contraignant pour les patientes qui doivent le supporter au moins 11 h par jour, jusqu'à 4 semaines avant l'injection de la graisse et 6 à 8 semaines après. D'autres études indépendantes sont nécessaires pour prouver l'efficacité de cette technique (Freshwater 2012).



**Figure 9 : Augmentation mammaire avec le système BRAVA<sup>®</sup> en complément de l'injection de graisse**

Dans le but de remédier à la résorption du greffon et d'assurer sa survie, de nouvelles techniques ont vu le jour au cours de ces dernières années. Les procédures de manipulation du tissu adipeux se sont affinées pour permettre une meilleure stabilité du greffon.

Mais avant de s'attacher à des méthodes trop complexes, n'est-il pas préférable de se concentrer sur des moyens simples pour maximiser la survie cellulaire ? Etant donné qu'il n'existe jusqu'à présent aucun consensus sur la manipulation du tissu adipeux de A à Z, il est encore intéressant d'affiner la technique de Coleman dont les bases sont essentielles, y compris pour tout nouveau procédé révolutionnaire.

#### **1.2.4.2. Microfill® : une innovation en faveur de la survie du greffon**

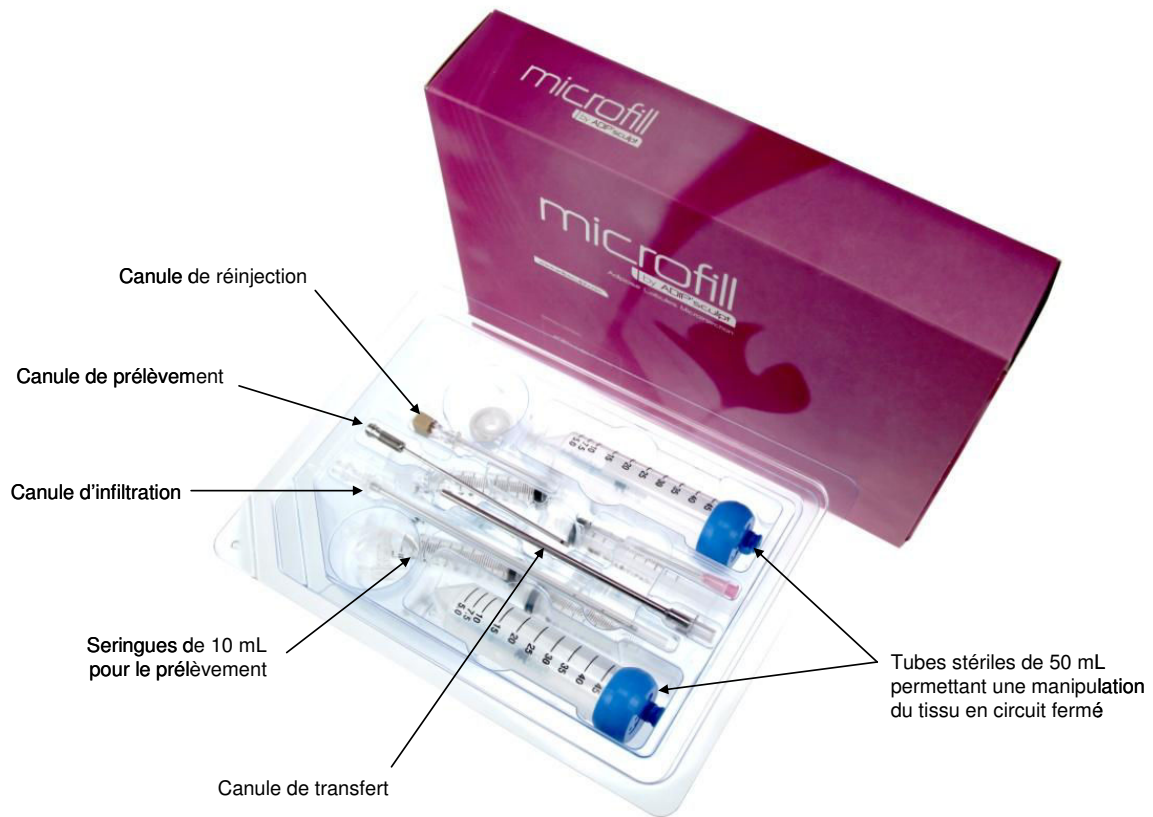
La société Adip'sculpt a élaboré un dispositif médical permettant d'améliorer significativement le lipofilling. Ce dispositif, appelé MICROFILL®, permet une augmentation de volume naturelle et ne fait intervenir aucune substance étrangère. Le dispositif (Figure 10) est à usage unique et permet une manipulation du tissu adipeux en circuit fermé, c'est-à-dire sans aucun contact avec l'extérieur. Le risque d'infection est ainsi fortement réduit et le tissu adipeux ne risque pas d'être endommagé au contact de l'air.

Le protocole MICROFILL® (cf. Annexe 1) répond aux critères cités dans les paragraphes précédents, favorisant la prise de greffe et la survie cellulaire. Contrairement aux nombreux autres protocoles, une attention particulière est portée à chaque étape de la procédure de transfert de graisse, du prélèvement à la réinjection, en passant évidemment par une purification optimisée du tissu adipeux.

L'ensemble de la procédure est optimisée de façon à être la moins traumatique possible. Pour cela, la lipoaspiration est réalisée de manière fine, avec une canule spécifique qui permet de préserver l'intégrité du tissu et de limiter le traumatisme tissulaire. Le prélèvement permet aussi d'obtenir une préparation de lobules adipeux de petite taille. Ceci permet une réinjection à l'aide d'une canule de faible diamètre (0,9 mm contre 1,2 mm pour la technique de Coleman) et permet ainsi de fortement limiter les séquelles postopératoires, telles que les œdèmes et les ecchymoses (généralement faible œdème pendant 2 à 3 jours au lieu de 2 semaines). L'injection se fait en effet de manière douce et la taille des canules permet de faire en sorte qu'elle soit quasi-indolore.



Un protocole strict a ainsi été développé en respectant l'intégrité et la viabilité du tissu adipeux, permettant d'obtenir une très bonne efficacité de greffe. La résorption du tissu dans les mois qui suivent l'injection est faible et prévisible. Il n'est donc généralement pas nécessaire de procéder à de nouvelles réinjections avant plusieurs années.



**Figure 10 : Kit Microfill®.** Dispositif médical à usage unique comprenant tous les outils nécessaires au prélèvement, à la purification et à la réinjection de tissu adipeux.

Parmi les études conduites par la société Adip'sculpt, la procédure de purification du tissu adipeux a été investiguée afin de valider le protocole MICROFILL®.

Les effets de la centrifugation et des lavages sont présentés dans l'article suivant « **EFFECT OF CENTRIFUGATION AND WASHING ON ADIPOSE GRAFT VIABILITY: A NEW METHOD TO IMPROVE GRAFT EFFICIENCY** » (Hoareau *et al.* 2012).

Dans cette étude nous avons commencé par déterminer l'effet de la durée et de la vitesse de centrifugation sur le tissu adipeux en mesurant le volume de liquide interstitiel ainsi que la viabilité cellulaire. A partir de ces résultats, nous avons mis en place un protocole de lavage et de compression douce du tissu adipeux destiné à la réinjection. Ce protocole est alors comparé avec deux méthodes habituellement utilisées : la décantation (sans lavage ni centrifugation) et la purification selon le protocole de Coleman (sans lavage, avec une centrifugation forte). Après l'injection du tissu adipeux purifié chez des souris immunodéficientes, l'inflammation créée par la greffe est évaluée dès 24 h, par dosage sanguin de cytokines inflammatoires, et le succès de la prise de greffe est évalué un mois après, en examinant la structure des tissus et en quantifiant les lacunes d'huile au sein du greffon.

Il est à noter que dans cette étude, le prélèvement a été réalisé de façon non traumatique selon le procédé MICROFILL®. Le tissu adipeux a été prélevé manuellement, à l'aide de seringues Luer-lock de 10 mL, après infiltration d'une solution tumescence (40 mL lidocaïne 2 % + adrénaline 1 mg/L pour 1 L de Ringer Lactate). La dépression créée pour l'aspiration est faible (moins de 2 mL dans la seringue). Cette dépression est créée par retrait progressif du piston. La procédure de lipoaspiration est réalisée avec une canule de 2 mm de diamètre disposant d'un unique trou de 3,4 mm<sup>2</sup> de surface (réf. CF201090 INEX, France). La réinjection est quant à elle effectuée au moyen d'une canule de 1,6 mm de diamètre (réf. CF151090 INEX, France).

**EFFECT OF CENTRIFUGATION AND WASHING ON ADIPOSE GRAFT  
VIABILITY: A NEW METHOD TO IMPROVE GRAFT EFFICIENCY**

**Laurence Hoareau<sup>a\*</sup>, Karima Bencharif<sup>a</sup>, Anne-Claire Girard<sup>a</sup>, Lydie Gence<sup>a</sup>, Pierre  
Delarue<sup>b</sup>, Olivier Hulard<sup>c</sup>, Franck Festy<sup>aΔ</sup> and Regis Roche<sup>aΔ</sup>**

**J Plast Reconstr Aesthet Surg (2012)**

<sup>a</sup>ADIP'sculpt company, Reunion Island, France

<sup>b</sup>Delarue cosmetic surgery office, Clinifutur, Reunion island, France

<sup>c</sup>Hulard cosmetic surgery office, Clinifutur, Reunion island, France

<sup>Δ</sup>These authors have equally contributed to this work.



ELSEVIER



## Effect of centrifugation and washing on adipose graft viability: A new method to improve graft efficiency

Laurence Hoareau<sup>a,\*</sup>, Karima Bencharif<sup>a</sup>, Anne-Claire Girard<sup>a</sup>,  
Lydie Gence<sup>a</sup>, Pierre Delarue<sup>b</sup>, Olivier Hulard<sup>c</sup>, Franck Festy<sup>a,d</sup>,  
Regis Roche<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> ADIP<sup>sculpt</sup> Company, 2 rue Maxime Rivière, plateforme CYROI, 97 490 Sainte-Clotilde, Reunion Island, France

<sup>b</sup> Delarue Cosmetic Surgery Office, Clinifutur, Reunion Island, France

<sup>c</sup> Hulard Cosmetic Surgery Office, Clinifutur, Reunion Island, France

Received 19 July 2012; accepted 23 December 2012

### KEYWORDS

Adipose tissue graft;  
Centrifugation;  
Viability;  
Mice grafting

**Summary** *Background:* Adipose tissue grafting is a promising method in the field of surgical filling. We studied the effect of centrifugation on fat grafts, and we propose an optimised protocol for the improvement of adipose tissue viability.

*Methods:* Adipose tissue was subjected to different centrifugations, and the volumes of interstitial liquid and oil released were measured to choose the optimal condition. Tissue from this condition was then compared to tissue obtained from two traditional techniques: strong centrifugation (commonly 3 min at 3000 rpm/900 g), and decantation, by injecting into immunodeficient mice. The cytokine interleukin-6 (IL-6) and chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were assayed 24 h post-injection, and after 1 month of grafting the state of the lipografts was evaluated through macroscopic and histological analysis, with oil gap area measurement.

*Results:* Strong centrifugation (900 g, 1800 g) is deleterious for adipose tissue because it leads to until threefold more adipocyte death compared to low centrifugation (100 g, 400 g). In addition, mice injected with strong centrifuged and non-centrifuged adipose tissue have higher rates of blood IL-6 and MCP-1, compared to those grafted with soft centrifuged fat. Moreover, extensive lipid vacuoles were detectable on histological sections of the non-centrifuged lipografts, whereas lipografts from soft centrifugation contain a higher amount of connective tissue containing collagen fibres.

*Conclusion:* It is necessary to wash and centrifuge adipose tissue before reinjection in order to remove infiltration liquid and associated toxic molecules, which in the long term are

\* Corresponding author. Tel.: +262 262 938 840; fax: +33 176 620 708.

E-mail address: laurence.hoareau@adipsulpt.com (L. Hoareau).

<sup>d</sup> Franck Festy and Regis Roche have equally contributed to this work.

deleterious for the graft. However, strong centrifugation is not recommended since it leads very quickly to greater adipocyte death. Thus, soft centrifugation (400 g/1 min), preceded by washings, seems to be the most appropriate protocol for the reinjection of adipose tissue. © 2013 British Association of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

The technique of re-injecting fat obtained by lipoaspiration in order to correct volume deficiencies was first described at the end of the 19th century by F. Neuber.<sup>1</sup> More recently, SR. Coleman revived interest in "lipofilling", by publishing his technique: the "lipostructure."<sup>2</sup> Although this method gives more reproducible and stable results, the disadvantages of the technique persist; namely the reduction in graft size in the months following the operation,<sup>3</sup> necessitating an over-correction of the volumes to be treated, and the pronounced post-operative effects (bruising, oedemas). Surgeons have therefore sought to improve Coleman's technique in order to improve graft success.

Thus, although numerous studies have been carried out, a standard procedure has not yet been adopted by all practitioners and today there is still no agreement on the best method for handling adipose tissue in order to improve graft success. In all of the techniques used, however, there seem to be two parameters that strongly influence the quality of injected adipose tissue: centrifugation and washing, which are used or not depending upon the practitioner.

In this study, we began by determining the effect that speed and centrifugation time has on the volume of interstitial liquid present in adipose tissue, as well as on adipocyte viability. From these results, we put in place a washing and soft compression protocol for the re-injection of the tissue. Lastly, we compared this protocol with two methods usually employed in filler surgery: decantation (without washing or centrifugation) and centrifugation according to the lipostructure protocol (without washing, and with strong centrifugation). After injection of adipose tissue in immunodeficient mice, graft success was evaluated by blood inflammation dosage, and by examining the tissue structure and quantifying the oil lacuna.

## Material and methods

### Patients

Subcutaneous tissue samples of human white fat were obtained from nine normal weight or slightly overweight human subjects undergoing liposuction for cosmetic reasons. Patients were exclusively female, with body mass index (BMI) =  $23.1 \pm 1.9$  kg/m<sup>2</sup>, and age =  $43 \pm 9$  years. Apart from oral contraception, the subjects were not receiving treatment with prescribed medication at the time of liposuction. Surgery was performed under local anaesthesia, and for some patients, also under general anaesthesia. The study was approved by the Ile de la Réunion ethics committee for the protection of persons undergoing biomedical research.

### Adipose tissue harvesting protocol

The fat tissue was harvested by a surgeon with a syringe technique (manually), after infiltration of a tumescence solution (40 ml lidocaine 2% + adrenalin 1 mg l<sup>-1</sup> for 1 L Ringer Lactate) for local anaesthesia. Liposuction procedures were performed with a 2-mm diameter single hole aspiration cannula, hole surface 3.4 mm<sup>2</sup> (ref CF201090 INEX, France). Aspiration was performed with 10-ml Luer-lock syringes by creating a light negative pressure (<2 ml in the syringe) by slowly withdrawing the plunger in a gradual manner.

### Liquid and oil measurement after centrifugation

After harvesting, 50 ml of adipose tissue was centrifuged (centrifuge LMC-3000, Biosan, Latvia) at different speeds and times: no centrifugation, 100 g/1 s, 100 g/1 min, 400 g/1 min, 900 g/1 min, 900 g/3 min, 1800 g/10 min. The remaining subnatant volume of liquid and supernatant volume of oil were measured after centrifugation and reported as a percentage of the initial tissue volume.

### Adipose tissue manipulation protocols

The 10 mL syringes were placed vertically and left to settle for 2 min to remove the infiltration mixture. Decantation protocol: syringes were allowed to settle for a further 2 min. High-speed centrifugation protocol: syringes were spun at 900 g for 3 min (centrifuge IEC, Medispin). Soft centrifugation protocol: 25 ml of the harvested fat tissue was transferred into a 50 ml centrifuge tube, and rinsed/centrifuged twice with 25 ml of Ringer Lactate (100 g for 1 s; centrifuge LMC-3000, Biosan, Latvia), followed by a last wash with a soft centrifugation (400 g for 1 min).

### Injection of prepared adipose tissue in severe combined immunodeficiency Beige mice

For the three protocols, after removing the subnatant liquid, and the supernatant oil, the tissue was then transferred into 1-ml syringes, and injected into 8 weeks old ( $\pm 1$  week) female severe combined immunodeficiency (SCID) Beige mice (Charles River Laboratories, Lyon, France). The protocol was carried out at the animal laboratory of CYROI, Reunion Island (approval n°974001 issued by the Veterinary Services of Reunion Island) and approved by the CYROI Ethics Committee for Animal Welfare. For each adipose tissue sample, 18 mice (six per condition) were injected dorsolaterally with 1 ml per side (2 ml of tissue per mouse) while withdrawing the 1.6-mm diameter cannula (ref.

CF151090 INEX, France). Adipose tissue taken from two patients was used for the injection of 36 mice. Blood and lipografts were taken from these 36 mice.

### Histological sections and staining of lipografts

Mice were sacrificed 1 month after injection, dissected and photographs of human lipografts were taken before their removal. Lipografts were preserved in formol to be paraffin-embedded. Five micrometre tissue sections were then prepared, followed by haematoxylin/erythrosin/saffron (HES) and Masson trichrome (Groat's haematoxylin/Ponceau red/light green) stainings and photographed with an inverted microscope, magnification  $\times 40$  and  $\times 100$ . From sections, area measurement was done with the NIS-Elements software, magnification  $\times 1.2$ . All grafts and sections analysed were done by blinded observers.

### Blood sampling

Retro-orbital blood sampling in ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) was performed at 24 h after tissue grafting. Samples were immediately centrifuged at 9000 rpm for 5 min to isolate plasma, and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

### Quantification of serum interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 by ELISA

Plasma samples were assayed for mouse interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) contents with Ready-SET-Go ELISA kits (Cliniscience, Montrouge, France), according to the manufacturer's instructions. ELISA sensitivity:  $4\text{ pg ml}^{-1}$  for IL-6;  $15\text{ pg ml}^{-1}$  for MCP-1.

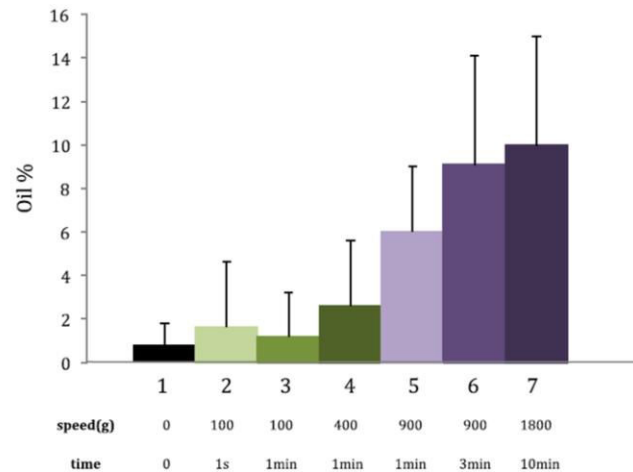
### Statistical analysis

All values were measured as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software. Differences were tested for significance, compared to the soft centrifugation condition, by the one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett post-test;  $P < 0.05$  (\*) or  $P < 0.01$  (\*\*) or  $P < 0.001$  (\*\*\*)

## Results

### Adipose tissue viability after centrifugation

In order to directly determine the extent of adipocyte death caused by centrifugation, we measured the volume of oil released from adipose tissue after various centrifugations. Figure 1 shows the percentage of oil released from adipose tissue for each of the centrifugation conditions: the more strongly the tissue was centrifuged (from 100 g to 1800 g), the more oil was released (from 2% to 10%). The oil released came mainly from adipocyte death, demonstrating that strong centrifugation, from 900 g, was deleterious for adipose tissue (conditions 5/6/7). Soft centrifugation, up to 400 g, did not cause adipocyte death (conditions 2/3/4),



**Figure 1** Oil released from adipose tissue after centrifugation. After harvesting, tissue was centrifuged according to the following protocols: 1. Decantation/2 min, 2. 100 g/1 sec, 3. 100 g/1 min, 4. 400 g/1 min, 5. 900 g/1 min, 6. 900 g/3 min, 7. 1800 g/10 min. The initial volume of tissue was measured before centrifugation, and the volume of oil obtained after centrifugation was also measured. The graph shows the mean percentage  $\pm$  SD of oil volume obtained for an initial volume of adipose tissue, in 3 different patients.

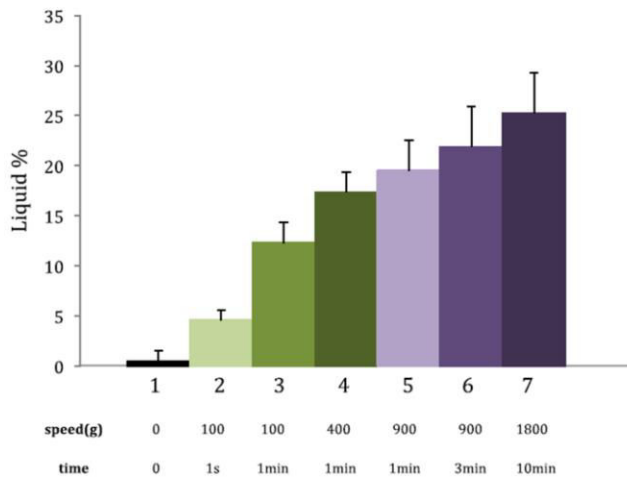
since the percentage of oil was equivalent to that of non-centrifuged adipose tissue ( $<3\%$ , condition 1).

### Liquid released from adipose tissue after centrifugation

Figure 2 shows the percentage of interstitial liquid extracted from adipose tissue after various centrifugations. This graph demonstrates that the more the tissue was centrifuged at a higher speed, the more it was possible to extract liquid. This was true for soft centrifugation between 100 g and 400 g, where it was possible respectively to extract 12% and 17% liquid after centrifugation for 1 min (conditions 3 and 4). However, compared to 400 g (17%), centrifugation at 900 g (condition 5, 1 min), or even longer (condition 6, 3 min) resulted in the extraction of more interstitial liquid from the adipose tissue, but the difference was not significant (20% and 22%, respectively). The volume of liquid extracted from adipose tissue reached a maximum of about 25% with condition 7 (1800 g/10 min), which probably represents the total volume of interstitial liquid inside adipose tissue.

### Macroscopic appearance of the grafts

One month after injection, the grafts were well integrated, irrespective of the protocol used (Figure 2: left for soft centrifugation – 400 g/1 min, middle for decantation, and right for high centrifugation – 900 g/3 min). Grafts were surrounded with mouse connective tissue and were vascularised (Figure 3). However, the grafts derived from the decantation protocol were distinctly different from the other conditions in that they displayed a much greater quantity of macroscopically visible oil. It was not possible



**Figure 2** Liquid released from adipose tissue after centrifugation. After harvesting, tissue was centrifuged according to the following protocols: 1. Decantation/2 min, 2. 100 g/1 sec, 3. 100 g/1 min, 4. 400 g/1 min, 5. 900 g/1 min, 6. 900 g/3 min, 7. 1800 g/10 min. The initial volume of tissue was measured before centrifugation, and the volume of liquid released from tissue after centrifugation was also measured. The graph shows the mean percentage  $\pm$  SD of liquid volume obtained for an initial volume of adipose tissue, in 3 different patients.

to distinguish the two other methods upon their macroscopic appearance.

### Histological structure of the lipografts

In the sections from the strong centrifugation protocol (Figure 4, right panel), adipocytes were highly packed, compared to the normal shape found with the soft centrifugation protocol (Figure 4, left panel). Furthermore, grafts from the soft centrifugation protocol contained more connective tissue between and around adipocytes (Figure 4, left panel) than grafts resulting from other methods. This connective tissue contained many cells, identified by haematoxylin staining with several nuclei apparent on each section that was examined. These cells

were inside a network partially composed of collagen fibres, as demonstrated by the green colour from the Masson trichrome staining (Figure 6).

From those sections (Figure 5), the area measurement revealed that decantation sections contained more than 20% oil, compared to 10% for the soft and high centrifugation protocols. This result confirmed the oily macroscopic appearance of the graft and the several large oil lacunas observed in sections from the decantation protocol (Figure 4, middle panel).

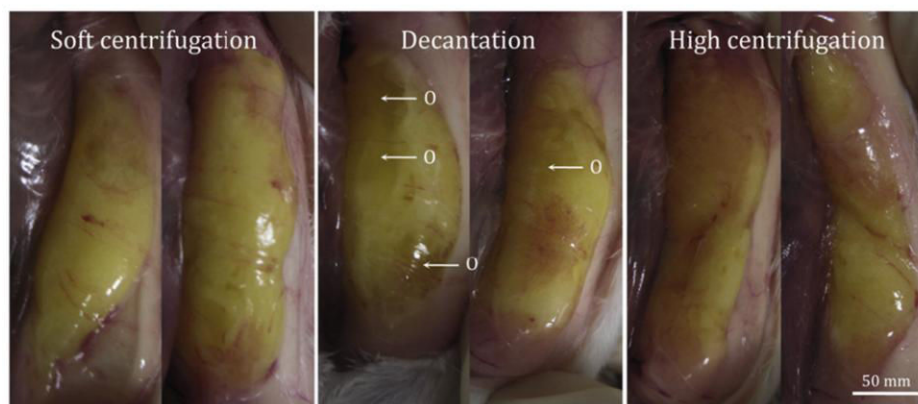
### Serum IL-6 and MCP-1 after adipose tissue grafting in SCID Beige mice

Twenty-four hours after injection, mice with high centrifugated lipografts showed more inflammation than those with soft centrifugated lipografts: fivefold more for serum IL-6 (Figure 7, left panel) and around twofold more for serum MCP-1 (Figure 7, right panel). Mice with decanted lipografts showed no more IL-6 (around  $600 \text{ pg ml}^{-1}$ ), while the rate of MCP-1 was twofold higher than mice with soft centrifugated lipografts. One week after grafting, levels of IL-6 and MCP-1 were the same between the three conditions, which corresponds to the levels of control mice (data not shown).

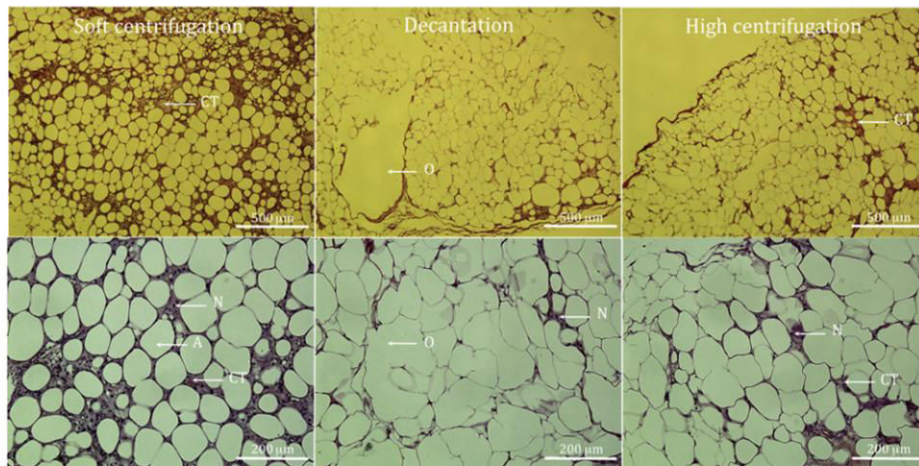
### Discussion

Grafting of autologous adipose tissue is potentially a promising future method for cosmetic reconstruction and body volume augmentation. Indeed, this method remains simple and atraumatic and only leads very seldom to postoperative complications, unlike fillers (injectable collagen, hyaluronic acid, etc.).<sup>4-6</sup> However, numerous publications have demonstrated that techniques used for aspiration, handling and injection of adipose tissue clearly influence, graft success.<sup>7-9</sup>

The aim of this study was to optimise adipose tissue-handling conditions in order to increase post-injection tissue survival. In fact, in order not to damage adipose tissue, samples were collected with a fine-bore cannula<sup>10</sup> (2 mm in diameter) and with minimal depression of the



**Figure 3** Macroscopic appearance of the lipografts. One month after injection of 1 mL of prepared adipose tissue per side, mice were killed and dissected. Pictures show lipografts from soft centrifugation (400 g/1 min, left panel), decantation (middle panel) and high centrifugation (900 g/3 min, right panel) protocols. O: oil lacuna. Pictures are representative of 6 different mice, in 2 different experiments.

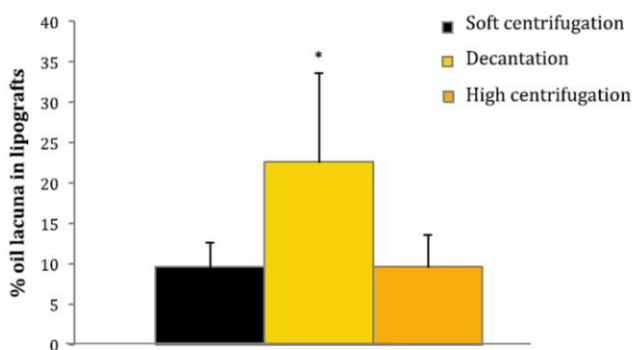


**Figure 4** Histological structure of the lipografts. Soft centrifugation (400 g/1 min, left panel), decantation (middle panel) and hard centrifugation (900 g/3 min, right panel) 1 month-lipografts were paraffin-embedded and 5  $\mu\text{m}$  sections were prepared and stained with HES. Pictures were taken with an inverted microscope,  $\times 40$  magnification (upper line) and  $\times 100$  (lower line). CT: connective tissue; A: adipocyte; O: oil lacuna; N: nucleus. Pictures are representative from 5 sections taken from 6 different mice, in 2 different experiments.

aspiration syringe plunger,<sup>11</sup> which corresponds to around 108 mmHg (2 ml in a 10-ml syringe).<sup>12</sup> According to some studies, this was the best way to prevent adipose tissue trauma, compared to liposuction machines.<sup>13</sup>

We initially sought to determine the parameters required for the optimum centrifugation of adipose tissue for lipofilling. Certain studies do not recommend strong centrifugation since this causes adipocyte and even mesenchymal stem cell death,<sup>14,15</sup> whereas other studies do not observe any impact of centrifugation on adipose tissue viability<sup>16</sup> and even recommend centrifugation at low speeds to increase adipocytes' survival.<sup>17</sup> These studies are however not easily comparable, because the speeds and times of centrifugation differ.

We centrifuged adipose tissue for variable times and speeds in order to determine the condition that was most



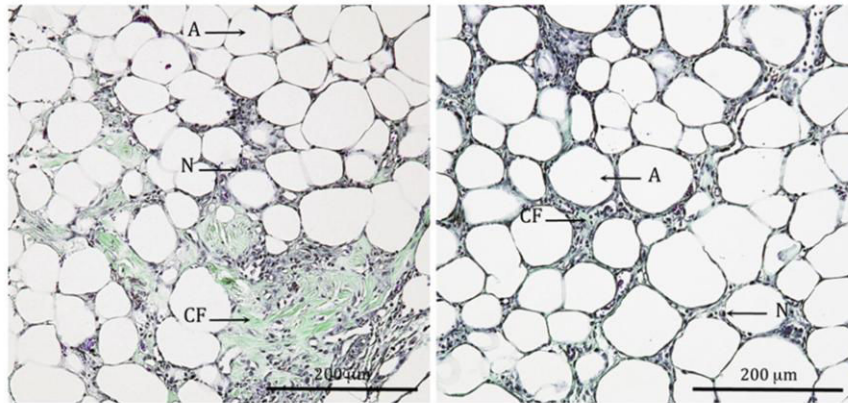
**Figure 5** Oil lacunas area in lipograft sections. From one experiment and for each condition, 2 sections per lipograft were done. A total of 6 subsections of  $12,4 \pm 1,9 \text{ mm}^2$  were analysed per condition. The graph shows the mean percentage  $\pm$  SD of oil lacuna area obtained per subsection for soft centrifugation, decantation and high centrifugation protocol.

adapted for two crucial factors: tissue viability (by quantification of the volume of oil, resulting from adipocyte death, Figure 1) and tissue compactness (by quantification of the volume of extracted interstitial liquid, Figure 2). Thus, low-speed centrifugation (up to 400 g) had no effect on oil release (<3%, as the control), whereas at speeds above 400 g, centrifugation irremediably led to adipocyte death, as demonstrated by the significant increase in oil release (threefold more at 900 g). However, centrifugation is recommended insofar as it allows a better volume adjustment of injected adipose tissue, because of the interstitial liquid removal. Compression of adipose tissue sample prevents graft resorption and therefore avoids over-correction or successive reinjections.<sup>18</sup> Thus, we confirmed that most of the residual liquid was removed at 400 g,<sup>19</sup> even for 1 min, and we arrived at the same conclusion as Lack, that 400 g for 1 min seemed to be the best protocol specifically recommended for facial lipoaugmentation.<sup>13</sup> This centrifugation represents the best compromise between tissue viability and volume of liquid remaining within injected tissue. Moreover, at 400 g, the number and the viability of mesenchymal cells are preserved.<sup>20</sup>

In the literature, results from graft-washing studies are also contradictory. Indeed, a certain work demonstrates that washings lead to better graft quality,<sup>21</sup> in particular as a result of the increase in the viability of mesenchymal stem cells within washed adipose tissue.<sup>14</sup> Other studies demonstrate that washing has no effect upon cell viability, as measured by weight and histological analysis of the grafts.<sup>7,16</sup>

However, it is obvious that the volume of the interstitial liquid is higher when the adipose tissue is not washed or centrifuged. This residual liquid contains lidocaine, adrenalin (depending on infiltration procedures) and inflammatory molecules (from blood components), recognised to be toxic for adipose tissue, but also and mainly for mesenchymal stem cells,<sup>22,23</sup> which increase graft survival and integration by taking part in neovascularisation.<sup>24</sup> Thus, in





**Figure 6** Connective tissue identification. 1 month after injection, lipografts from soft centrifugation (400 g/1 min, left panel) were paraffin-embedded and 5 µm sections were prepared and stained with Masson trichrome. Pictures were taken with an inverted microscope, ×100 magnification. CF: collagen fibres, A: adipocyte; N: nucleus. Pictures are representative from 5 sections taken from 6 different mice, in 1 experiment.

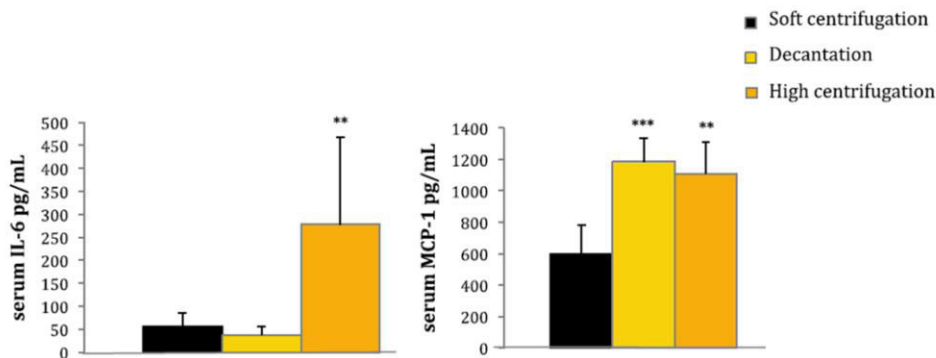
order to eliminate most of these deleterious elements, we decided to carry out two rapid washings (100 g/1 s, completely atraumatic for tissue, Figure 1) before a last washing and centrifugation at 400 g/1 min.

In addition, after having determined the most appropriate protocol for adipose tissue handling, we went on to compare this protocol with two techniques that are currently mostly used: the lipostructure (900 g/3 min) and the decantation, as 25% of the experts do not resort to centrifugation.<sup>25</sup> Thus, we objectivated graft success by injecting adipose tissue obtained with the three techniques into SCID Beige mice.

We observed that injection of strongly centrifuged adipose tissue is deleterious to the host, since it led to widespread inflammation in the model used: IL-6 and MCP-1 plasma levels are higher 24 h post-injection (Figure 7). These molecules are known to start, maintain and increase inflammation.<sup>26</sup> By transposing these results in humans, it is more likely that this will result in localised inflammation at the injection site, which would not promote engraftment.<sup>27</sup> This inflammation is probably most problematic because of the increased levels of MCP-1, which could lead to

macrophage infiltration inside the graft and in the long term lead to tissue necrosis. However, 1 week after injection, rates return to normal (data not shown), indicating that this inflammation is only transient. In terms of decantation technique, it also led to higher levels of MCP-1, whereas levels of IL-6 were similar to those of control mice (data not shown). It is likely, since no centrifugation was performed for this condition, that inflammation was due to the persistence of toxic molecules (from infiltration and blood) that could not be removed without centrifugation or washing.

In the same way, after 1 month, lipografts from strong or soft centrifugation protocols were large in volume with little resorption, good integration and very little oil, whereas lipografts from the decantation technique appeared smaller, with a much greater quantity of oil (Figure 3). In histological sections, numerous gaps were visible which correspond to oil resulting from adipose cell death (Figure 4), which was twofold higher for this condition (Figure 5). We believe that this very poor graft success was first of all due to the 25% interstitial liquid (Figure 2), which spread and caused resorption, and second to the



**Figure 7** Serum IL-6 and MCP-1 24 h after adipose tissue grafting in SCID Beige mice. 24 h after grafting 2 mL/mice of soft centrifugation-, decantation- and high centrifugation-prepared adipose tissue, mice blood was collected and mouse IL-6 (left panel) and MCP-1 (right panel) were assayed from plasma by ELISA. The graphs show the mean ± SD of the results from 2 patients,  $n = 6$  for each condition, for each patient.

same toxic molecules contained in this persistent liquid. Anaesthetics (as lidocaine) could act directly over time on adipocytes, and/or indirectly through their noxious action on adipose tissue stromal cells.<sup>22,23</sup>

Certain authors affirm however that washing can have harmful effects. In particular, Chajchir et al. have stated that washing removes fibrin content in lipoaspirate, which is necessary for fat graft adherence.<sup>18</sup> We cannot confirm this hypothesis with our results; however, we can assume that the presence of collagen fibres is correlated to lipo-graft success (Figure 6). On the one hand, collagens might structure the graft, and they could also mediate the migration of other vascular stem cells.<sup>28</sup> Cells from connective tissue probably synthesise these fibres, as type 1 and type 3 collagens<sup>29,30</sup> (and personal data), and they are able to reorganise themselves in order to promote neo-vascularisation.<sup>31</sup> As there was much connective tissue and many stromal cells in lipografts from soft centrifugation protocol, it looks like there were more collagen fibres. The probability of blood vessels being present within this network might be therefore higher.

Our results agree with those of Conde-Green et al., who show that brief washing and low-speed centrifugation leads to the elimination of contaminants resulting in a more effective graft, whilst preserving the integrity of adipocytes and mesenchymal stem cells.<sup>14</sup> In fact, our results showed that centrifugation at 400 g was sufficient to extract the most of the liquid found in harvested adipose tissue. Moreover, a centrifugation at 900 g was not justified insofar as it did not result in greater interstitial liquid extraction, but it led to adipocyte death.

Thus, the soft centrifugation protocol (with three washings) that we propose represents an optimisation of the techniques that are usually employed: the strong centrifugation used in lipostructure protocols and the decantation method. The reduction in adipose cell death leads to improved graft success, which makes this the method of choice for facial filling and rejuvenation.

## Funding source

This work was funded by the ADIP'sculpt company.

## Conflict of interest

There is no potential conflict of interest.

## Acknowledgement

We would like to thank the patients who agreed to donate their adipose tissue, without which this study could not have been conducted, as well as the personnel of the Clinifutur group clinics: Saint-Vincent (Saint-Denis, Réunion) and the Orchidées (Le Port, Réunion). We would also like to thank the personnel of the Gonçalves/Delarue cosmetic surgery clinic (Saint-Denis, Réunion) for their services, and Dr Rivière and his team from the service of pathological anatomy from the University Hospital (Saint-Denis, Réunion).

## References

1. Neuber F. Fettransplantation, Bericht  ber die Verhandlungen der deutschen Gesellschaft f r Chirurgie. *Zentralbl Chir* 1893; 22:66.
2. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg* 1997;24(2):347–67.
3. Coleman SR. Problems, complications and postprocedure care. In: Coleman SR, editor. *Structural fat grafting*. St. Louis: Quality Medical Publishing; 2004. p. 75–102.
4. Nettare K, Maas C. Facial filler and neurotoxin complications. *Facial Plast Surg* 2012;28(3):288–93.
5. Sachdev M, Anantheswar Y, Ashok B, et al. Facial granulomas secondary to injection of semi-permanent cosmetic dermal filler containing acrylic hydrogel particles. *J Cutan Aesthet Surg* 2010;3(3):162–6.
6. Grunbaum LD, Bogdan Allemann I, Dayan S, et al. The risk of alar necrosis associated with dermal filler injection. *Dermatol Surg* 2009;35(s2):1635–40.
7. Smith P, Adams Jr WP, Lipschitz AH, et al. Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte survival. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(6): 1836–44.
8. Kaufman MR, Miller TA, Huang C, et al. Autologous fat transfer for facial recontouring: is there a science behind the art? *Plast Reconstr Surg* 2007;119(7):2287–96.
9. Ramon Y, Shoshani O, Peled IJ, et al. Enhancing the take of injected adipose tissue by a simple method for concentrating fat cells. *Plast Reconstr Surg* 2005;115(1):197–201.
10. 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;1–8. XX.
11. Ould-Ali D, Achard V, Hautier A et al.. Mechanical factors influencing fat cell transplants quality. Presented at: Int Federation for Adipose Therapeutics and Science; October, 2010; Dallas.
12. Herold C, Utz P, Pflaum M, et al. Negative pressure of manual liposuction with Coleman technique is highly dependent on the position of plunger of the syringe. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012;65(7):983–4.
13. Lack EB. The art of facial lipoaugmentation. In: Shiffman MA, editor. *Autologous fat transfer*. Springer; 2010. p. 79–86.
14. Condé-Green A, de Amorim NF, Pitanguy I. Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: a comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63(8): 1375–81.
15. Xie Y, Zheng D, Li Q, et al. The effect of centrifugation on viability of fat grafts: an evaluation with the glucose transport test. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63(3):482–7.
16. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA. In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:391.
17. Boschert MT, Beckert BW, Puckett CL, Concannon MJ. Analysis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109(2):761–5.
18. Chajchir A, Benzaquen I, Wexler E, et al. Fat injection. *Aesthetic Plast Surg* 1990;14(2):127–36.
19. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, et al. Influences of centrifugation on cells and tissues liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg* 2008;121(3):1033–41.
20. Gali  M, Pignatti M, Scambi I, et al. Comparison of different centrifugation protocols for the best yield of adipose-derived stromal cells from lipoaspirates. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122(6):233e–5e.

21. Khater R, Atanassova P, Anastassov Y, Pellerin P, Martinot-Duquennoy V. Clinical and experimental study of autologous fat grafting after processing by centrifugation and serum lavage. *Aesthetic Plast Surg* 2009;**33**(1):37–43.
22. Keck M, Zeyda M, Gollinger K, et al. Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation into adipocytes. *Plast Reconstr Surg* 2010;**126**(5):1500–5.
23. Girard AC, Atlan M, Bencharif K, et al. New insights in lidocaine and adrenalin effects on human adipose stem cells. *Aesthetic Plast Surg* 2012 [Epub ahead of print].
24. Zhu M, Zhou Z, Chen Y, et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg* 2010;**64**(2):222–8.
25. Kaufman MR, Bradley JP, Dickinson B, et al. Autologous fat transfer national consensus survey: trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. *Plast Reconstr Surg* 2007;**119**(1):323–31.
26. Cavaillon JM. Contribution of cytokines to inflammatory mechanisms. *Pathol Biol* 1993;**41**(8 Pt 2):799–811.
27. Minn KW, Minn KH, Chang H, et al. Effects of fat preparation methods on the viabilities of autologous fat grafts. *Aesthetic Plast Surg* 2010;**34**(5):626–31.
28. Mauney J, Olsen BR, Volloch V. Matrix remodeling as stem cell recruitment event: a novel in vitro model for homing of human bone marrow stromal cells to the site of injury shows crucial role of extracellular collagen matrix. *Matrix Biol* 2010;**29**(8):657–63.
29. Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, et al. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol Lett* 2011;**33**(6):1257–64.
30. Colazzo F, Sarathchandra P, Smolenski RT, et al. Extracellular matrix production by adipose-derived stem cells: implications for heart valve tissue engineering. *Biomaterials* 2011;**32**(1):119–27.
31. Koh YJ, Koh BI, Kim H, et al. Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;**31**(5):1141–50.

Ces travaux montrent qu'il est préférable de laver et centrifuger le tissu adipeux avant la réinjection dans le but d'enlever le liquide d'infiltration ayant servi lors de la lipoaspiration. Ce liquide est en effet associé à des molécules toxiques (anesthésique, vasoconstricteur) qui peuvent être délétères pour le greffon à long terme. Toutefois, la centrifugation forte n'est pas recommandée car elle conduit très rapidement à la mort cellulaire, représentée par la présence d'huile dans les greffons. Ainsi, une centrifugation douce (400 g/1 min), précédée de deux lavages entrecoupés de centrifugations (100 g/1 sec), semble être le protocole le plus approprié pour la réinjection de tissu adipeux. Les lavages permettent d'éliminer les molécules toxiques et la centrifugation finale de 1 min permet de tasser le tissu en vue de la réinjection. Il s'agit finalement d'un compromis entre les différentes méthodes couramment utilisées : compromis entre, d'une part, la méthode de Coleman qui permet d'éliminer le plus d'infiltration par une forte centrifugation, mais qui est délétère pour la viabilité cellulaire, et à l'opposé, la décantation non traumatique pour les cellules, mais qui ne permet pas d'éliminer le liquide d'infiltration.

De plus, comme le montrent les coupes histologiques, ce protocole favorise la présence de cellules stromales et d'une importante trame conjonctive au sein du greffon. Ces cellules sont en effet capables de synthétiser des fibres de collagène et pourraient participer à la néovascularisation du greffon, et donc à sa survie.

En conclusion, le simple protocole que nous proposons a été optimisé pour favoriser la viabilité du tissu adipeux, préservant l'intégrité des adipocytes et des cellules souches adipeuses.

Une innovation simple mais efficace, tels sont les termes qui pourraient finalement caractériser MICROFILL®.

#### **1.2.4.3. Intérêt des cellules souches du tissu adipeux dans le lipofilling**

Toujours dans l'intérêt d'améliorer les résultats de lipofilling, de nouveaux protocoles innovants ont fait surface à partir des cellules issues de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux. Une des approches qui s'est développée consiste à enrichir la greffe avec des cellules souches dérivées du tissu adipeux. Cette technique appelée « cell assisted lipotransfer (CAL)»

permettrait d'augmenter la survie et la qualité du greffon probablement grâce à la sécrétion paracrine des cellules ou grâce à leur différenciation (Matsumoto, Sato et al. 2006; Yoshimura, Sato et al. 2008; Yoshimura, Sato et al. 2008).

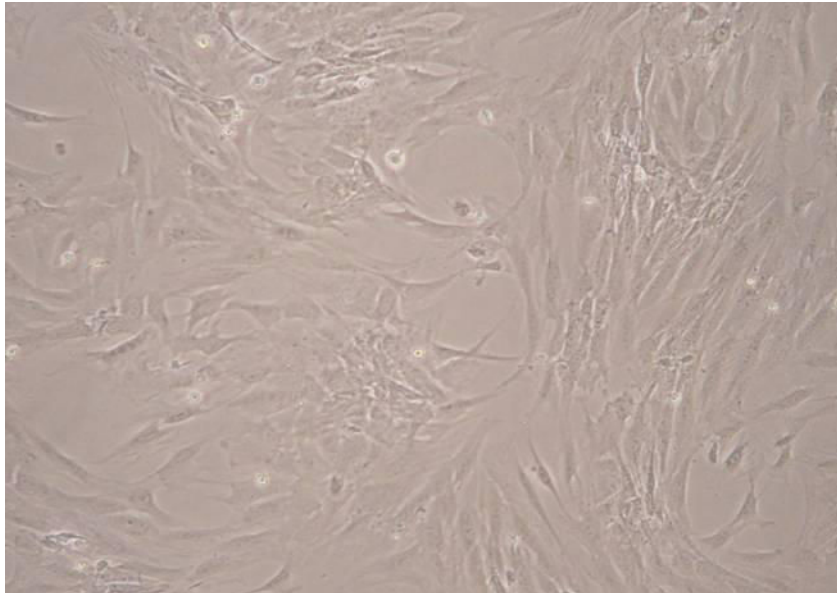
Ainsi, la survie du greffon adipeux ne consiste pas seulement en la survie des adipocytes, mais concerne la survie de l'ensemble des composants cellulaires du greffon. Même si les adipocytes représentent la majeure partie du volume, de nombreuses autres cellules sont présentes dans la fraction stromale vasculaire, comprenant entre autre les précurseurs adipocytaires et des cellules souches mésenchymateuses.

Récemment, un intérêt grandissant pour ces cellules est né en chirurgie reconstructrice et esthétique. Comme nous le verrons par la suite, les propriétés biologiques connues des cellules souches adipeuses suggèrent un rôle important de ces cellules dans la prise de greffe, la revascularisation et la survie du greffon (Philips, Marra et al. 2012; Trojahn Kollé, Oliveri et al. 2012).

En effet, de nombreux chirurgiens ont remarqué que la graisse transplantée est plus qu'un simple produit de comblement puisqu'elle améliore également les tissus environnants (Coleman 2006). La greffe de graisse permet non seulement l'amélioration de la qualité de la peau et des cicatrices, mais aussi une amélioration remarquable de la qualité des tissus suite aux dégâts d'irradiation, à une ulcération chronique, à une contracture capsulaire du sein, ou encore dans les cordes vocales endommagées.

Il existe également une théorie selon laquelle les cellules précurseurs adipocytaires se différencient en adipocytes matures pour participer à la survie de la greffe (Doornaert, Declercq et al. 2012).

## **2. POTENTIEL DES CELLULES SOUCHES ADULTES DU TISSU ADIPEUX EN THERAPIE CELLULAIRE**



**Figure 11 : Cellules souches humaines du tissu adipeux en culture.**

*« La clef de toutes les sciences est sans contredit le point d'interrogation ; nous devons la plupart des grandes découvertes au comment ? Et la sagesse dans la vie consiste peut-être à se demander, à tout propos, pourquoi ? »*

*Honoré de Balzac*

## 2.1. Généralités sur les cellules souches

James Till et Ernest McCulloch (Figure 12) sont considérés comme les « pères de la recherche sur les cellules souches », ayant prouvé l'existence de ces cellules en injectant des cellules de moelle osseuse dans des souris irradiées (Till and Mc 1961). Avec la contribution de Becker et Siminovitch, ils ont défini les deux principales caractéristiques de ces cellules : la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules plus spécialisées (Becker, Mc et al. 1963; Siminovitch, McCulloch et al. 1963; Till and Mc 1963) (Figure 13). Cette découverte a révolutionné la recherche en biologie cellulaire et est le point de départ pour de nombreuses études chez l'homme et chez l'animal. Des greffes de moelle osseuse sont utilisées depuis les années 1950. Depuis le développement des biotechnologies dans les années 1980-1990, la recherche sur les cellules souches ne cesse de progresser, offrant des perspectives thérapeutiques incroyables.

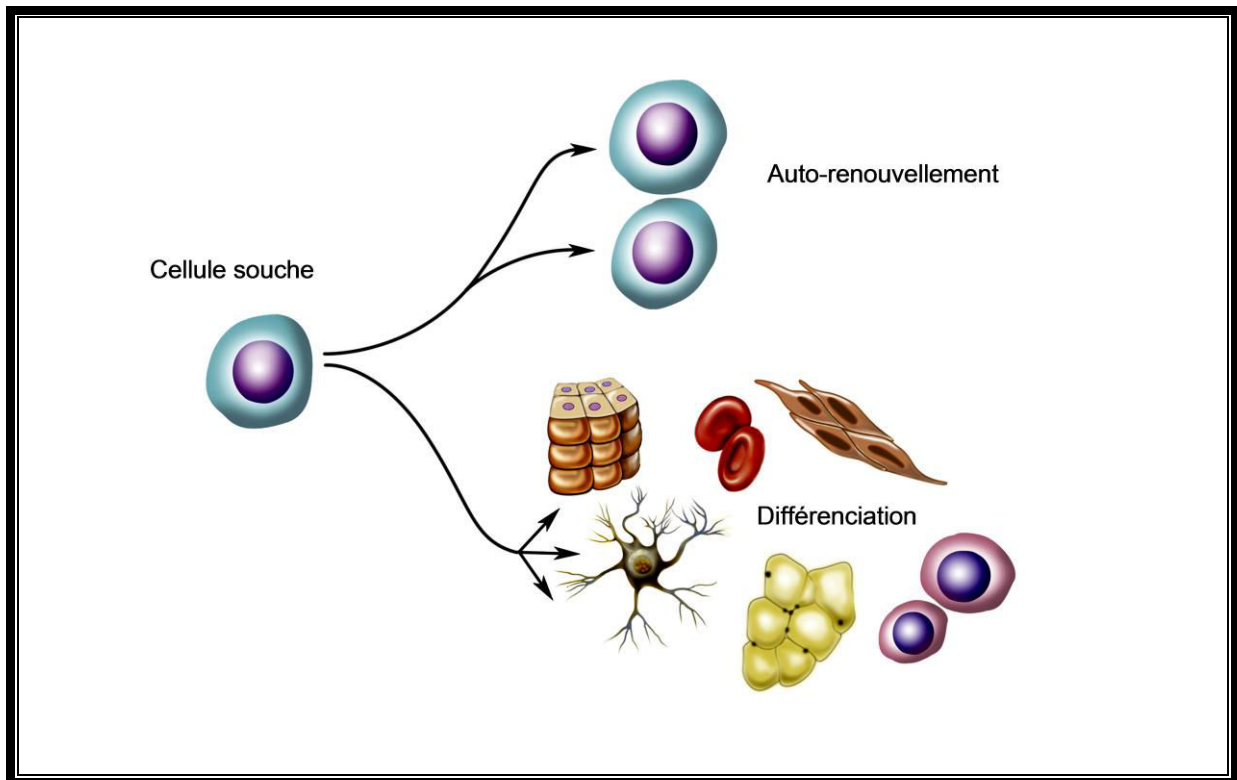


**Figure 12 : Les canadiens Till et McCulloch, réputés pour leurs travaux d'avant-garde sur les cellules souches.**

Que sont donc les cellules souches ? Où peut-on les trouver ? Quel est leur potentiel thérapeutique ? Pourquoi intéressent-elles tant la communauté scientifique ?

Pour comprendre, voici un survol des différents types de cellules souches qui surprennent par leurs potentiels incroyables.





**Figure 13 : Les deux principales propriétés des cellules souches : auto-renouvellement et différenciation** (source <http://www.nationalacademies.org/stemcells>).

### 2.1.1. Les différents types de cellules souches

Les cellules souches ont le remarquable potentiel de pouvoir se développer en de nombreux types cellulaires différents, dès le début de la vie. Par ailleurs, les cellules souches servent de système de réparation interne dans de nombreux tissus et se divisent presque sans limite pour réapprovisionner le pool de cellules souches. Quand une cellule souche se divise, chaque nouvelle cellule a le potentiel de rester une cellule souche ou de devenir un autre type de cellule avec une fonction plus spécialisée, telle une cellule musculaire, une cellule de tendon, un globule rouge, ou une cellule de cerveau.

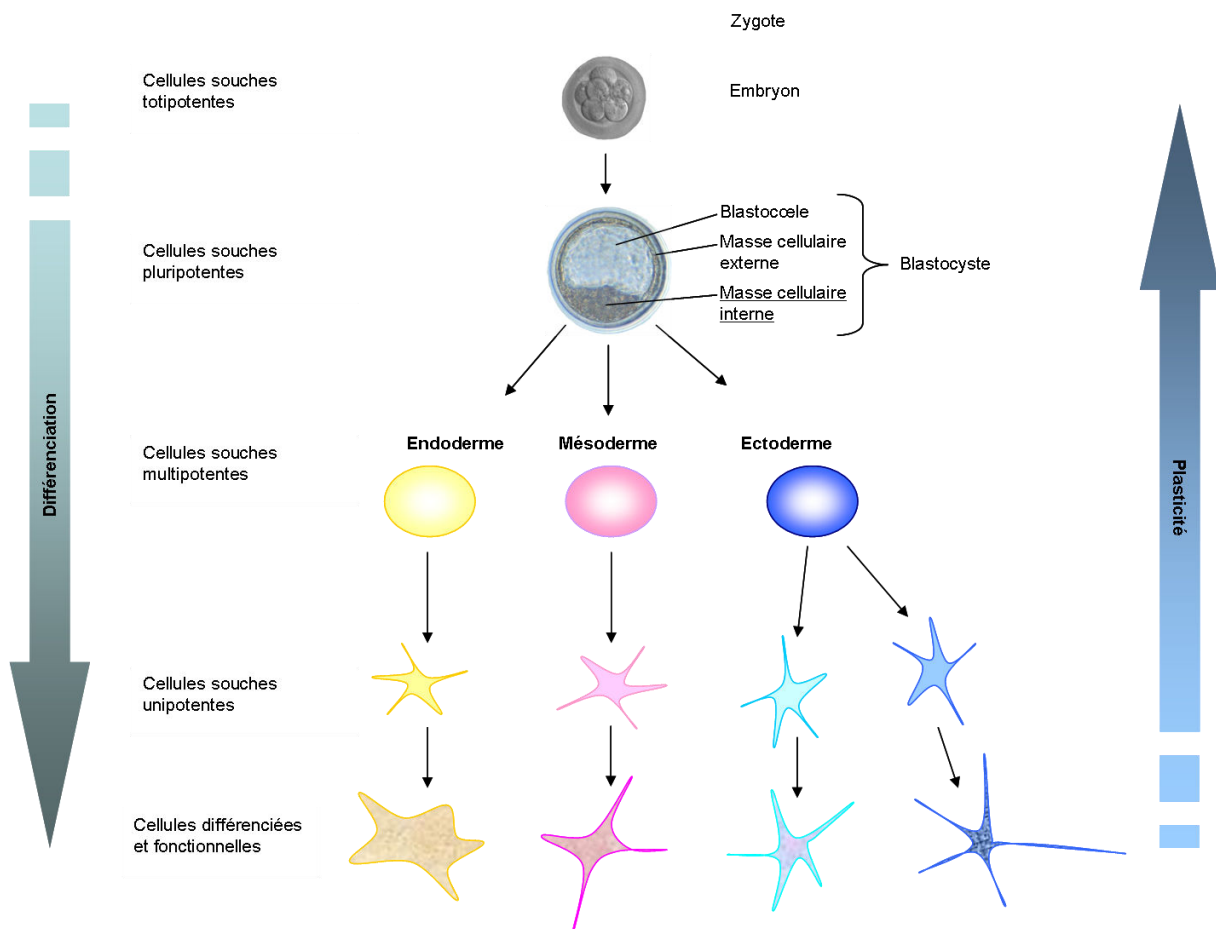
Les cellules souches peuvent être classées en quatre catégories, selon leur potentiel de différenciation (Figure 14) :

- Les cellules souches totipotentes ont le plus fort pouvoir de différenciation, capables de donner lieu à n'importe quel type cellulaire et ainsi constituer tous les tissus et organes du corps pour finalement former un organisme entier. Ces cellules ne sont

présentes qu'aux tous premiers stades de la vie embryonnaire, jusqu'à la formation de l'embryon à 8 cellules. En plus de pouvoir engendrer toutes les cellules du corps, les cellules totipotentes peuvent donner des cellules participant à la formation des annexes extra-embryonnaires, comme le placenta.

- Les cellules souches pluripotentes sont présentes 5 à 7 jours après la fécondation de l'œuf, au stade blastocyste. Elles représentent la masse cellulaire interne du blastocyste et peuvent donner toutes les cellules du corps (Figures 14 et 15) (Thomson and Marshall 1998). Ces cellules souches embryonnaires (CSE ou ESC en anglais, pour embryonic stem cells) intéressent les chercheurs ; elles peuvent être mises en culture dans le cadre de recherches scientifiques contrôlées, mais leur utilisation est controversée et est régulée en France par la loi de bioéthique. Dernièrement, des cellules somatiques différenciées ont été reprogrammées pour acquérir ce caractère pluripotent tant convoité : les cellules souches pluripotentes induites (ou iPS) (Takahashi and Yamanaka 2006; Yu, Vodyanik et al. 2007). Ces travaux ont été reconnus internationalement et récompensés par l'attribution du prix Nobel de physiologie et médecine 2012 à Sir John B. Gurdon et Shinya Yamanaka. D'autres cellules auraient également ce caractère pluripotent : les cellules de carcinome embryonnaire, les cellules souches de l'épiblaste ou encore les cellules embryonnaires germinales (Kieffer, Kuntz et al. 2010)
  
- Les cellules souches multipotentes peuvent donner lieu à un large éventail de types cellulaires. Elles remplacent les cellules malades ou âgées, fonctionnant ainsi pour reconstituer les cellules du corps tout au long de la vie d'un individu. Ces cellules apparaissent avec le fœtus et sont présentes chez l'adulte, constituant les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Leur capacité de différenciation est moindre, étant déjà engagées dans un lignage spécifique (ectodermique, endodermique ou mésodermique). Contrairement aux cellules souches embryonnaires, ces cellules ne soulèvent pas de questions éthiques et font ainsi l'objet d'un nombre croissant d'études. Même si logiquement, elles ne peuvent pas régénérer un organisme entier, leur potentiel est tout à fait incroyable et offre de belles perspectives thérapeutiques.

- Les cellules souches unipotentes, situées dans les tissus adultes, ont le plus faible potentiel de différenciation. Une cellule unipotente aurait la capacité de donner un seul type cellulaire, quoique cela paraisse de moins en moins évident en raison des études qui se multiplient prouvant la multipotence chez de nombreux types de cellules. Les cellules unipotentes proviennent de cellules multipotentes en train de se différencier dans un lignage spécifique pour donner des cellules progénitrices, comme les préadipocytes. Cependant, les nouveaux phénomènes biologiques tels que la dédifférenciation et la trans-différenciation laissent penser qu'il est peu probable que des cellules puissent être totalement unipotentes. En outre, en dépit de leur potentiel de différenciation limitée, les cellules unipotentes ont-elles aussi la propriété importante d'auto-renouvellement et jouissent encore d'un vaste potentiel thérapeutique pour traiter les blessures et les maladies. La greffe de peau pour les grands brûlés est un exemple d'utilisation de ces cellules.



**Figure 14 : Hiérarchie des cellules souches en fonction du potentiel de différenciation.**

## 2.1.2. Origine des cellules souches

Les cellules souches représentent une grande variété de cellules de différentes origines. Elles peuvent être issues de l'embryon, du fœtus, ou de tissus adultes (Figure 15).

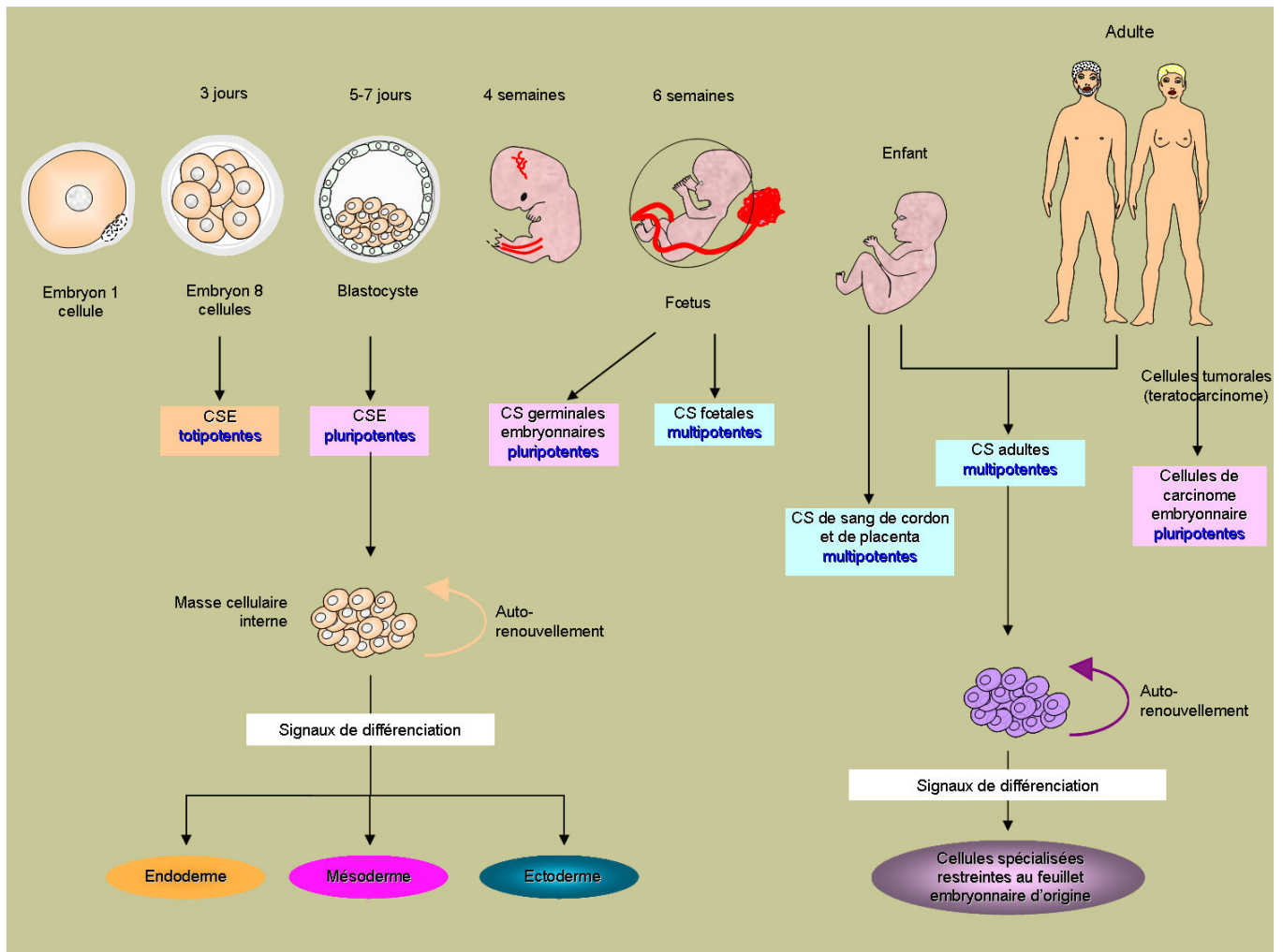


Figure 15 : Origines des cellules souches, de la formation du zygote à l'adulte. CS, Cellule Souche ; CSE, Cellule Souche Embryonnaire.

### 2.1.2.1. Les cellules souches embryonnaires et fœtales

Avec plus de 200 types cellulaires différents dans l'organisme, une véritable cascade de multiplications cellulaires et de différenciations a lieu dès la formation du zygote. Les cellules

souches embryonnaires (Csete, Schwab et al.) et fœtales participent ainsi à la formation des tissus et des organes.

Les cellules souches embryonnaires pluripotentes, qui sont dérivées de la masse cellulaire interne d'embryons au stade blastocyste, ont la capacité unique de s'auto-renouveler indéfiniment ainsi que la capacité de se différencier dans les trois feuillets embryonnaires (ectodermique, endodermique et mésodermique), donnant lieu aux différents types de cellules du corps humain (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Thomson and Marshall 1998). Les trois feuillets embryonnaires vont être dérivés de ces cellules qui vont ainsi donner l'épithélium intestinal (endoderme) ; le cartilage, les os, le muscle lisse et les muscles striés (mésoderme) ; l'épithélium neural, les ganglions embryonnaires, et l'épithélium squameux stratifié (ectoderme).

Les CSE pluripotentes n'étant présentes qu'au stade blastocyste, ce sont ensuite les cellules souches fœtales qui vont prendre le relais pour assurer l'organogenèse et l'acquisition des fonctions spécialisées (Figure 15). Ces cellules sont multipotentes.

Les CSE humaines peuvent constituer une source potentielle de cellules pour la thérapie cellulaire et/ou la découverte de médicaments, mais certaines limites restent à surmonter pour une utilisation clinique, comme le rejet immunitaire et les questions éthiques entourant l'utilisation d'embryons humains comme source de CSE (Bradley, Bolton et al. 2002). Les cellules souches provenant de sources non embryonnaires (cellules souches adultes) fournissent une alternative moins controversée et techniquement plus facile dans les futures applications de thérapie cellulaire (Moore, Mills et al. 2006).

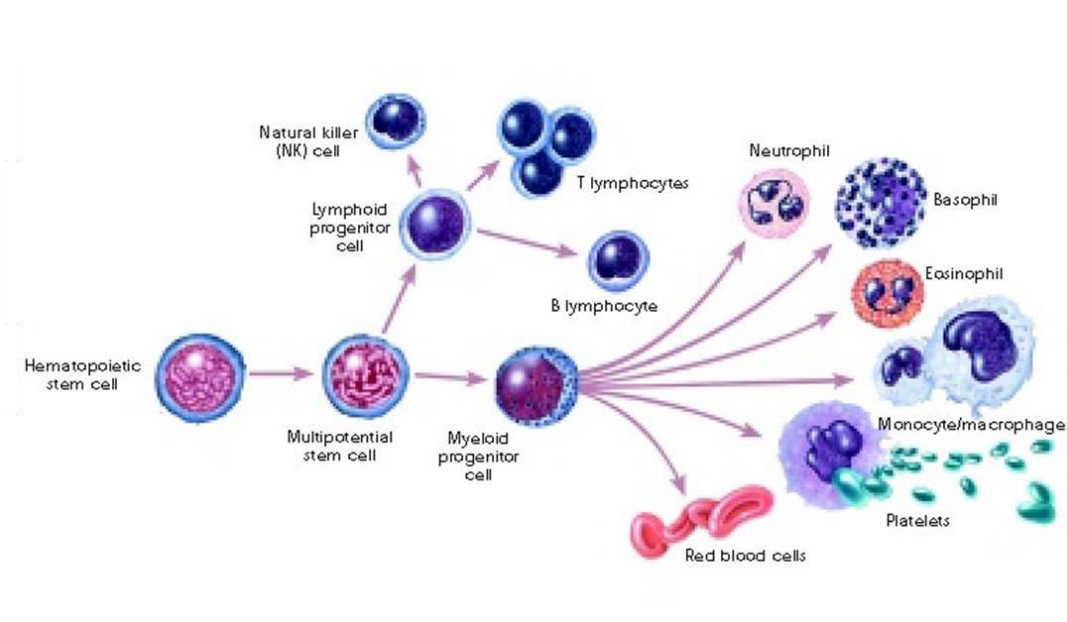
#### **2.1.2.2. Les cellules souches adultes**

L'organisme adulte dispose lui aussi de réservoirs de cellules souches qui agissent en quelque sorte comme des « fontaines de jouvence ». Les cellules souches adultes assurent le renouvellement, la régénération et la réparation des tissus, afin d'assurer l'homéostasie des fonctions physiologiques. Cependant, ces cellules subissent elles aussi l'effet de l'âge, leur nombre et leur fonction diminuant avec le temps.

Les premières cellules souches adultes identifiées sont celles découvertes par Till et McCulloch (Till and Mc 1963). Il s'agit de cellules souches sanguines issues de la moelle osseuse, permettant de donner tous les éléments figurés du sang, comme décrit ci-après. Peu après, Friedenstein *et al.* démontrent que la moelle osseuse ne contient pas seulement des cellules souches hématopoïétiques (Friedenstein, Petrakova et al. 1968; Friedenstein, Gorskaja et al. 1976). En plaçant l'ensemble des cellules de la moelle osseuse dans des boîtes de culture en plastique, avec un milieu supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal, les chercheurs s'aperçoivent qu'une petite population de cellules adhère au plastique, à raison d'une cellule nucléée sur 10000. L'équipe de Friedenstein met alors en évidence les cellules souches mésenchymateuses.

#### 2.1.2.2.1. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont multipotentes, permettant le renouvellement de toutes les cellules du sang (hématopoïèse). Elles assurent à la fois le maintien d'un pool constant de CSH multipotentes (auto-renouvellement), et la différenciation en progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes, qui eux-mêmes donneront des cellules plus spécialisées (érythrocytes, leucocytes et plaquettes) (Figure 16).



**Figure 16 : Hématopoïèse.** Les CSH sont capables de se différencier pour donner toutes les cellules du sang. Schéma modifié à partir de (Cecil, Goldman et al. 2008).

Chez l'homme adulte, l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse, qui constitue donc la niche principale des CSH. Le sternum, les os iliaques et la tête du fémur sont des sites clés de ponction de la moelle osseuse à partir de laquelle les CSH sont extraites. Les CSH peuvent être isolées en fonction des molécules présentes à la surface des cellules (caractérisation phénotypique). Parmi ces molécules de surface, la présence du marqueur phénotypique CD34 (glycoprotéine ayant des fonctions dans l'adhérence et la migration systémique) est indispensable pour pouvoir purifier une population de CSH ; un autre marqueur spécifique, CD133 (glycoprotéine), permet également d'identifier les CSH (Wognum, Eaves et al. 2003). Les CSH peuvent également se retrouver dans le sang périphérique, mais sont alors très rares dans des conditions physiologiques normales (moins de 0,1 % des leucocytes circulant expriment le marqueur CD34) (Mohty and Ho 2011).

Le sang de cordon ombilical est apparu comme une source alternative de CSH pouvant être utilisée pour le traitement des leucémies et d'autres troubles sanguins prolifératifs (Weissman and Shizuru 2008). Ces cellules souches peuvent être récupérées juste après la naissance et être stockées dans des banques de cellules souches (Bochtler, Maiers et al. 2011). Elles présentent l'avantage d'être faiblement immunogènes en raison de l'immaturité du système immunitaire du tissu fœtal (Wu, Michejda et al. 1999). Ceci permet de les utiliser pour des greffes allogéniques\* (donneur différent du receveur).

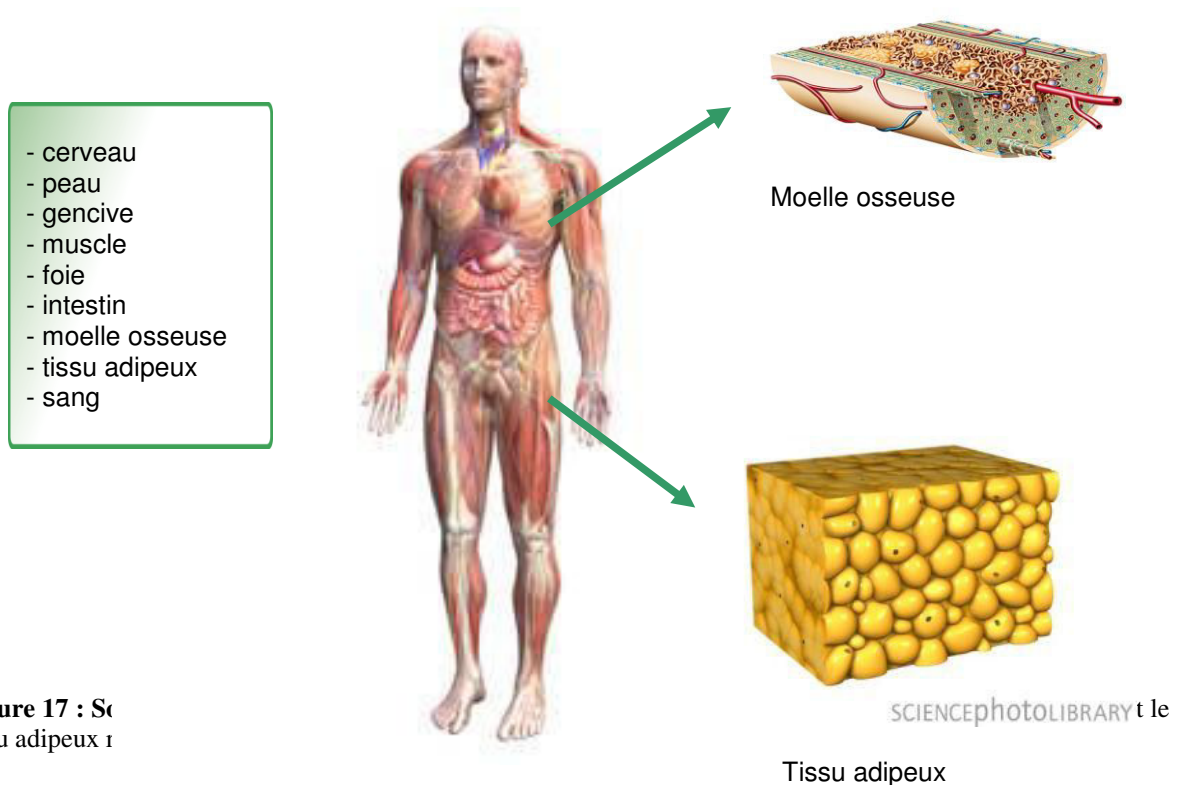
En clinique, les CSH sont utilisées en autogreffe ou en allogreffe, essentiellement comme support de traitement dans les hémopathies malignes (leucémies, lymphomes, myélomes) : les CSH sont injectées suite à une chimiothérapie par exemple, afin de restaurer la fonction hématopoïétique. Les CSH peuvent également permettre de restaurer un système hématopoïétique dans le cas de déficit immunitaire grave inné ou acquis (Dicke, Schaefer et al. 1973; Shizuru, Negrin et al. 2005).

#### 2.1.2.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses adultes

Bien que Friedenstein ait mis en évidence l'existence de cellules souches non hématopoïétiques, c'est Caplan qui a figé le terme « cellules souches mésenchymateuses » (CSM) en 1991 (Caplan 1991). Les CSM sont des cellules multipotentes qui, comme toute cellule souche, sont des cellules non spécialisées, capables de s'auto-renouveler et de se différencier en un certain nombre de types cellulaires d'origine mésodermique, notamment en

ostéocytes, adipocytes, chondrocytes, myocytes et ténocytes (Figure 18) (Pittenger, Mackay et al. 1999).

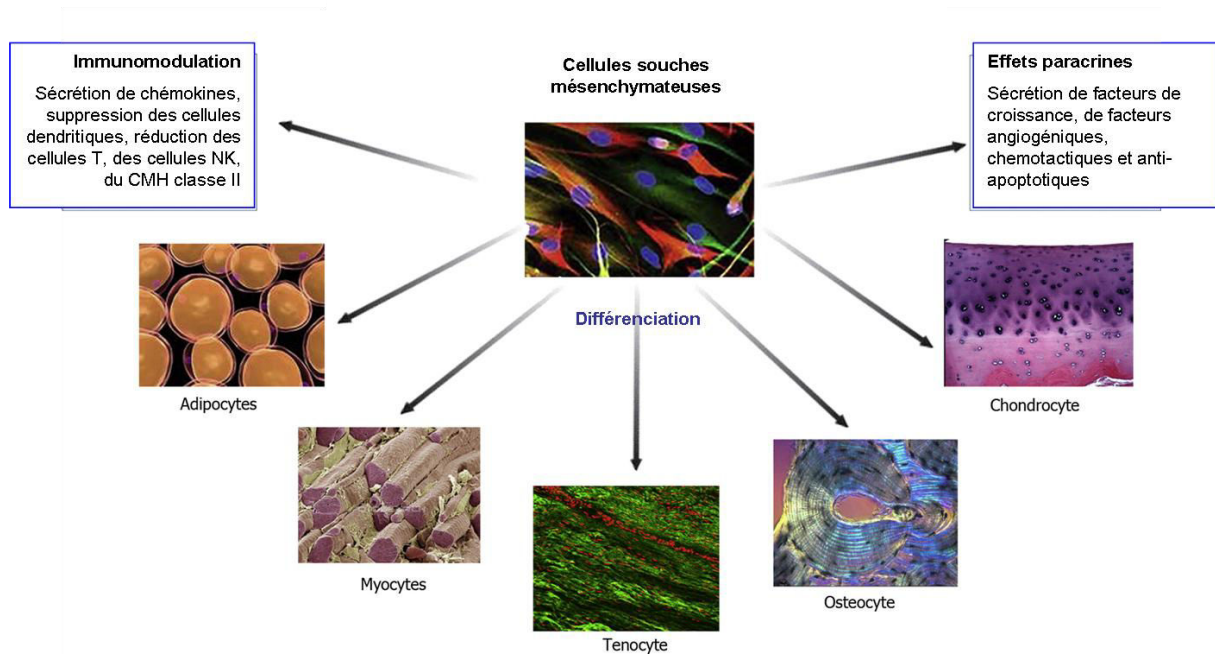
En fait, tous les tissus du corps contiennent des cellules souches (Figure 17) : la moelle osseuse, le sang, le tissu adipeux, mais aussi la peau, les gencives, les muscles, le foie, l'intestin, et même le cerveau (da Silva Meirelles, Chagastelles et al. 2006).



**Figure 17 :** Sources of adult stem cells in the human body.

Chaque organe et chaque tissu disposent ainsi d'un pool de cellules progénitrices capables de proliférer et de se différencier lorsque cela est nécessaire, assurant ainsi le maintien et la régénération tissulaire après lésion (homéostasie tissulaire). Même si tous les tissus et tous les organes contiennent des cellules souches adultes, celles-ci sont souvent rares et difficiles à purifier. Une biopsie de foie pour récupérer des cellules souches est par exemple assez délicate puisque cet organe est difficilement accessible, et l'idée peut faire peur aux patients, sans compter le fait qu'on ne pourrait prélever qu'un petit fragment. Certaines sources de cellules souches adultes sont néanmoins plus importantes que d'autres : tel est le cas de la moelle osseuse et du tissu adipeux (Figure 17).





**Figure 18 : Propriétés des cellules souches mésenchymateuses.** Schéma adapté de (Nixon, Watts et al. 2012).

✓ Caractérisation phénotypique des CSM :

Quant à la caractérisation des CSM, de nombreuses études sont publiées, comme celle présentée dans le Tableau 3, mais les auteurs utilisent différentes méthodes d'isolation et d'expansion des cellules, et également différentes approches pour caractériser les cellules. Notamment, des cellules fraîchement extraites n'auront pas le même profil que des cellules en culture. Il n'est donc pas évident d'avoir une idée bien précise et de comparer les résultats de chaque étude.

Pour cela, le « Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee » de l'ISCT (« International Society for Cellular Therapy ») propose des critères minimaux pour définir les CSM humaines (Dominici, Le Blanc et al. 2006) :

- Tout d'abord, les CSM doivent pouvoir adhérer aux boîtes de culture en plastique dans des conditions de culture standard.
- Deuxièmement, les CSM doivent exprimer les marqueurs de surface cellulaire suivants : CD105 (endogline), CD73 et CD90. Mais les molécules de surface CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79alpha, et HLA-DR (CMH classe II) doivent être absentes.

- Troisièmement, les CSM doivent pouvoir se différencier *in vitro* en ostéoblastes, en adipocytes et en chondroblastes.

Bien que le but de l'ISCT fût d'établir des critères de base pour faciliter l'échange de données entre chercheurs, des modifications seront certainement nécessaires au vu des avancées sur les différents types de CSM. Les CSM dérivées du tissu adipeux présentent en effet certains caractères qui leur sont propres et sont quelque peu différents des CSM issues de la moelle osseuse. Le marqueur CD34 est entre autre présent dans les CSM du tissu adipeux alors qu'il est absent dans les CSM de la moelle osseuse, ce qui permet d'ailleurs de faire la distinction avec les cellules souches hématopoïétiques au sein de ce tissu.

Marqueurs hématopoïétiques		Facteurs de croissance et cytokines	
CD1a (T6)	Neg	CD25 (Interleukin-2R)	Neg
CD14 (Lipopolysaccharide receptor)	Neg	CD71 (Transferrin receptor)	Pos
CD34	Neg	CD114 (Granulocyte-colony stimulating factor receptor)	Neg
CD45 (Leukocyte common antigen)	Neg	CD117 (Stem cell factor receptor)	Neg
CD133 (AC133)	Neg	CDw119 (Interferon $\gamma$ R)	Pos
<b>Molécules d'adhésion</b>		CD120 a & b (Tumor Necrosis factor- $\alpha$ 1&2 R)	Pos
CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)	Neg	CD121 a & b (Interleukin-1R a&b chain)	Pos
CD44 (Hyaluronate receptor)	Pos	CD123 (Interleukin-3R)	Pos
CD50 (Intercellular adhesion molecule 3)	Pos	CD124 (Interleukin-4R)	Pos
CD54 (Intercellular adhesion molecule 1)	Pos	CD126 (Interleukin-6R)	Pos
CD56 (Neural cell adhesion molecule)	Pos	CD127 (Interleukin-7R)	Pos
CD58 (Lymphocyte function-associated antigen 3)	Pos	CD140a (Platelet derived growth factor receptor)	Pos
CD62E (E-selectin)	Neg	FGFR (Fibroblast growth factor receptor)	Pos
CD62L (L-selectin)	Pos	CD271 (Low affinity nerve growth factor receptor)	Pos
CD62P (P-selectin)	Neg	<b>Autres marqueurs</b>	
CD102 (intercellular adhesion molecule 2)	Pos	CD3 (CD3 complex)	Neg
CD106 (Vascular cell adhesion molecule-1)	Pos	CD9 (Tetraspannin)	Pos
CD144 (Calherin 5)	Neg	CD13 (Aminopeptidase N)	Pos
CD166 (Activated leukocyte cell adhesion molecule)	Pos	CD19 (B-lymphocyte Surface Antigen B4)	Neg
<b>Intégrines</b>		CD73 (Ecto-5'-nucleotidase)	Pos
CD11a (Lymphocyte function-associated antigen-1 $\alpha$ )	Neg	CD80 (B7-1)	Neg
CD11b (Macrophage-1 antigen)	Neg	CD83 (HB15a)	Neg
CD11c (Complement receptor type 4 a chain)	Neg	CD86 (B7-2)	Neg
CD18 (Lymphocyte function-associated antigen-1 $\beta$ )	Neg	CD90 (Thy-1 glycoprotein)	Pos
CD29 (Very late antigen $\beta$ )	Pos	CD105 (Endoglin)	Pos
CD49a (Very late antigen a1)	Pos	CD146 (MUC18, Mel-CAM, 5-endo)	Pos
CD49b (Very late antigen a2)	Pos	CD157 (BP-3 or Bone Marrow Stromal cell antigen-1)	Pos
CD49c (Very late antigen a3)	Pos	SH3 (Src homology 3)	Pos
CD49d (Very late antigen a4)	Neg	D7-FIB	Pos
CD49e (Very late antigen a5)	Pos	STRO-1	Pos
CD49f (Very late antigen a6)	Pos	HLA-A,B,C	Pos
CD51 (Vitronectin R a chain)	Neg	SSEA-3,4	Pos
CD61 (Vitronectin R $\beta$ chain)	Pos		
CD104 ( $\beta_4$ integrin)	Pos		

Tableau 3 : Marqueurs phénotypiques des CSM, d'après (Pountos, Corscadden et al. 2007).

✓ Autres propriétés :

Les CSM peuvent être isolées à partir de nombreux tissus conjonctifs, mais les tissus adultes les plus communément utilisés sont la moelle osseuse et le tissu adipeux. Puis, implantées au sein d'une lésion, les CSM peuvent se différencier vers une lignée cellulaire cible, mais elles peuvent également exercer d'autres effets, étant susceptibles d'entraîner une modulation de l'activité trophique via des sécrétions paracrines et autocrines (Caplan and Dennis 2006; Bonfield, Nolan Koloze et al. 2010). Les CSM sont en effet capables de sécréter des facteurs de croissance ainsi que des facteurs angiogéniques, chimiotactiques et anti-apoptotiques. Les CSM ont également des propriétés immunosuppressives par le biais de molécules solubles inductibles qui inhibent les effecteurs de l'immunité (immunomodulation). Elles sont notamment capables de supprimer les cellules dendritiques, de réduire les cellules T et les cellules NK (« natural killer ») (Figure 18) (Yi and Song 2012). De plus, les CSM sont entre autre caractérisées par l'absence d'immunogénicité, n'exprimant pas les antigènes CMH de classe II. Les propriétés d'immunomodulation des CSM sont très intéressantes pour les greffes allogéniques et le traitement de maladies immunes telles que la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD, « graft versus host disease »). Toutes ces propriétés seront détaillées pour les cellules souches du tissu adipeux.

Enfin, grâce à leurs forts potentiels, les CSM sont testées pour de nombreuses applications (Yi and Song 2012) :

- en tant que véhicules pour la thérapie génique ;
- pour l'amélioration des greffes de cellules souches hématopoïétiques ;
- pour le traitement des maladies immunes telles que la GVHD, la polyarthrite rhumatoïde, l'encéphalomyélite, la pancréatite aiguë, la sclérose en plaques, ou la septicémie ;
- et évidemment en régénération tissulaire : pour les os, le cartilage, les muscles, les tendons, et même pour le tissu nerveux, quoique la compréhension de la régénération nerveuse reste floue étant donné que les cellules nerveuses ont une autre origine embryonnaire (ectoderme) ; en fait, bien que des CSM puissent exprimer certains marqueurs phénotypiques neuronaux, il n'est pas évident de recréer *in vitro* un

neurone fonctionnel ; en revanche, la réinjection *in vivo* a montré un réel bénéfice, certainement grâce à l'apport de facteurs de croissance et la différenciation en astrocyte ; cela dit, certains travaux *in vitro* montrent également la génération d'un potentiel d'action au sein des CSM différenciées (Fox et al. 2010).

A partir de cet aperçu sur les CSM, voyons maintenant plus en détail les CSM du tissu adipeux.

## **2.2. Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux**

Le tissu adipeux, et en particulier le tissu adipeux sous-cutané, est probablement la source la plus abondante et la plus facilement accessible de cellules souches adultes, et est donc une source très prometteuse pour une utilisation dans la réparation et la régénération tissulaire.

La découverte de cellules souches mésenchymateuses au sein du tissu adipeux est récente. Même si des cellules du stroma vasculaire et des précurseurs adipocytaires ont été isolés bien avant (Rodbell 1964; Dixon-Shanies, Rudick et al. 1975), Zuk *et al.* (2001) furent les premiers à rapporter l'existence de cellules souches dans le tissu adipeux en démontrant leur potentiel de différenciation (Zuk, Zhu et al. 2001) et en prouvant la présence de caractéristiques typiques des cellules souches (Zuk, Zhu et al. 2002). Les chercheurs isolèrent les cellules souches à partir de tissu adipeux humain obtenu par lipoaspiration et plus exactement, à partir d'une fraction spécifique appelée fraction stromale vasculaire (SVF, « stromal vascular fraction »). Ils démontrèrent que ces cellules pouvaient donner de multiples lignées, capables de donner différents types de tissus (os, cartilage, muscle...).

### **2.2.1. Méthodes d'obtention**

Pour une approche thérapeutique, l'idéal est d'isoler les cellules avec un minimum de préjudice pour le patient, et de façon à obtenir un grand nombre de cellules, capables de proliférer et de se différencier dans une large gamme de lignées cellulaires.

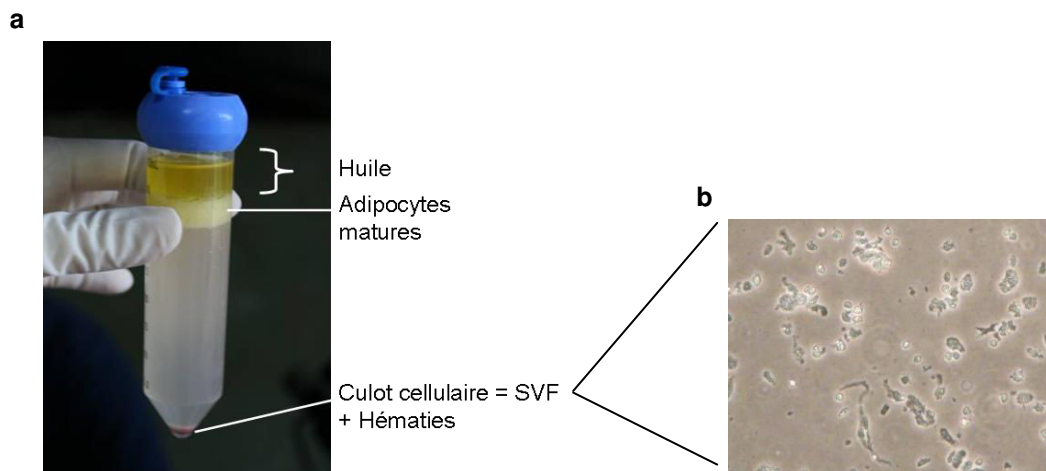
Le tissu adipeux peut être obtenu par lipoaspiration ou dermolipéctomie (exérèse chirurgicale). Comme on l'a vu au chapitre précédent, la lipoaspiration est une procédure peu invasive, bien tolérée et sûre, qui permet d'obtenir de grandes quantités de tissu, et pouvant se pratiquer sous anesthésie locale.

Des tests sur le mode de prélèvement ont montré que l'exérèse et la lipoaspiration tumescence donnent de bons rendements cellulaires, mais la lipoaspiration assistée au laser semble néanmoins à éviter (Oedayrajsingh-Varma, van Ham et al. 2006). Ce type de lipoaspiration consiste à introduire sous la peau une fibre souple émettrice de deux faisceaux lasers qui vont

provoquer la lipolyse (destruction des cellules graisseuses) et une contraction tissulaire (resserrement progressif de la peau).

Les cellules obtenues par lipoaspiration ont été caractérisées et cette méthode de prélèvement a été validée (Yoshimura, Shigeura et al. 2006). Les sites de prélèvement peuvent être multiples, comme pour le transfert de graisse autologue. L'abdomen semble préférable pour obtenir un meilleur rendement, mais peu de différence a pu être notée sur la qualité des cellules selon le site de prélèvement (Jurgens, Oedayrajsingh-Varma et al. 2008).

Une fois le tissu adipeux prélevé, la purification des cellules nécessite de passer par une étape de digestion enzymatique du tissu afin de libérer les cellules de la riche matrice fibreuse du tissu adipeux. Cette digestion se fait grâce à un cocktail de protéases contenant au moins une collagénase qui va permettre de digérer les fibres de collagènes sur lesquelles les cellules sont accrochées pour finalement mettre les cellules en suspension. Puis une étape de centrifugation permet de séparer les cellules de la SVF des adipocytes matures. Le culot cellulaire obtenu après centrifugation comprend la SVF (Figure 19).

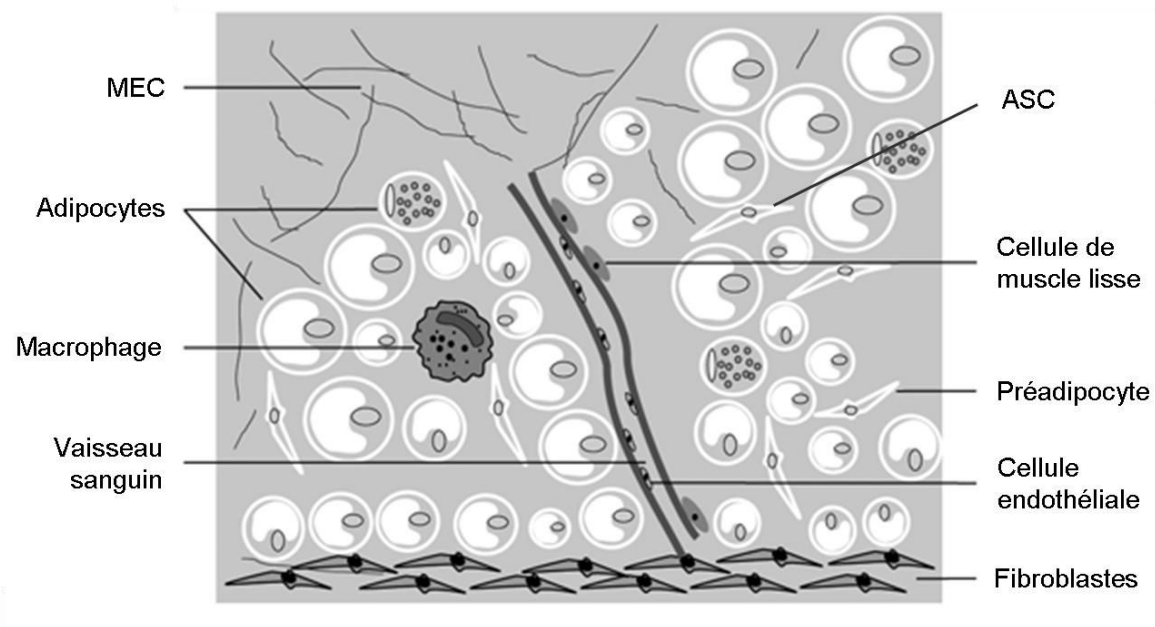


**Figure 19 : Tissu adipeux après digestion et centrifugation (a) et cellules de la SVF fraîchement isolées observées en microscopie optique (b).** La SVF comprend une population très hétérogène de cellules difficilement caractérisables par simple observation microscopique. Une fois en culture, les ASCs adhérentes vont prendre une forme fibroblastique.

Mais comme pour le transfert de graisse autologue en chirurgie esthétique, les méthodes d'obtention des cellules souches adipeuses (ASCs, « Adipose Stem Cells ») divergent d'un auteur à l'autre (Sanz-Ruiz, Santos et al. 2008). Il n'y a pas vraiment de protocole standard. Certains vont par exemple laver le tissu une ou plusieurs fois, avant et/ou après la digestion, et

il existe différents protocoles de centrifugation, plus ou moins forte (Galie, Pignatti et al. 2008). Une étape de filtration peut également être ajoutée pour éliminer les fibres. De plus, les globules rouges pouvant perturber les expériences et analyses ultérieures, il est possible de les éliminer en utilisant une solution hypotonique de lyse (qui va les faire éclater) ou en séparant les cellules par centrifugation sur un gradient de Ficoll® (gradient de densité) (Al Battah, De Kock et al. 2011).

Mais rappelons que la SVF est très hétérogène, étant composée de nombreuses cellules, dont les ASCs, mais aussi des précurseurs adipocytaires, des progéniteurs endothéliaux, des cellules endothéliales, des cellules de muscle lisse, des péricytes, des leucocytes, des mastocytes, voir des macrophages (Oedayrajsingh-Varma, van Ham et al. 2006; Prunet-Marcassus, Cousin et al. 2006) (Figure 20).



**Figure 20 : Composants cellulaires du tissu adipeux.** La fraction stromale vasculaire, ou SVF, comprend toutes les cellules du tissu adipeux sauf les adipocytes. Schéma modifié à partir de (Schaffler, Scholmerich et al. 2005).

Ainsi, selon la stratégie adoptée, la SVF peut être mise en culture afin de sélectionner la population de cellules adhérentes, supposées être les cellules souches mésenchymateuses. Les cellules ainsi dérivées du tissu adipeux sont appelées ADSCs (« adipose-derived stem cells »). Un autre moyen de sélectionner les cellules consiste à les marquer au moyen d'anticorps ciblés contre les marqueurs de surface cellulaire souhaités et de les trier ainsi en cytométrie de

flux ou à l'aide de billes magnétiques sur lesquelles les anticorps sont fixés (Ishimura, Yamamoto et al. 2008; Griesche, Luttmann et al. 2010; Rada, Reis et al. 2011).

Cependant, le choix de la procédure d'isolement des ASCs dépend du type de cellule différenciée que l'on souhaite finalement obtenir. Les cellules sélectionnées en culture après prolifération n'auront pas forcément le même phénotype qu'à l'origine, selon la durée de culture, le nombre de passages, et ne pourront peut-être pas se différencier dans tous les types cellulaires souhaités.

Ainsi, la SVF peut également être utilisée telle quelle, maintenue dans son contexte cellulaire d'origine. Contrairement aux autres types de cellules souches, ceci est possible en raison de la grande quantité de cellules obtenues juste après digestion et centrifugation du tissu adipeux (on peut facilement obtenir plusieurs millions de cellules selon la quantité de tissu à partir de 25 mL seulement de tissu adipeux) (Jurgens, Oedayrajsingh-Varma et al. 2008; Mizuno 2009). L'utilisation extemporanée de la SVF implique une différenciation post-injection, et non une différenciation pré-injection comme pour les cellules mises en culture. Comme nous le verrons par suite, les cellules de la SVF vont interagir avec l'environnement dans lequel elles vont se retrouver et ce nouvel environnement va influencer leur différenciation.

### **2.2.2. Caractéristiques et propriétés**

Les cellules souches du tissu adipeux sont devenues très populaires, de plus en plus utilisées en recherche et en clinique (avec de plus en plus d'essais cliniques ; voir Tableau 5). Avec leur potentiel de différenciation dans le lignage mésodermique ainsi que leur potentiel possible dans les lignages ectodermique et endodermique, les ASCs pourraient éventuellement représenter une alternative aux cellules souches embryonnaires pluripotentes, à la fois pour la recherche au laboratoire et pour l'utilisation en clinique (Zuk 2010). De nouvelles applications passionnantes sont sur le point d'émerger.

Les ASCs possèdent en effet des capacités de différenciation multiples, pouvant donner des adipocytes, des ostéoblastes, des chondrocytes, des myocytes. Mais plus surprenant encore, ces cellules d'origine mésodermique seraient capables d'engendrer des cellules nerveuses, qui viennent pourtant d'une autre origine embryonnaire (feuillet ectodermique) (Gimble and Guilak 2003). Les ASCs participent également à l'angiogenèse, permettant le soutien ou la



réparation vasculaire dans les membres ischémiques (Planat-Benard, Silvestre et al. 2004) et pourraient aussi donner des cardiomyocytes (Planat-Benard, Menard et al. 2004). Ces cellules peuvent servir à d'autres titres, tels que dans le soutien de l'hématopoïèse et dans le transfert de gènes (cellules utilisées comme véhicules) (Locke, Ussher et al. 2011).

Le potentiel des ASCs à se différencier dans des lignées de cellules non mésodermiques est d'autant plus excitant. Le potentiel de différenciation en cellules ecto- ou endodermiques font des ASCs des cellules presque pluripotentes (Baer and Geiger 2012). Les ASCs ont ainsi un fort potentiel pour la réparation et la régénération des tissus endommagés.

Cependant, les études de ce type peuvent soulever certaines critiques car même si les ASCs peuvent exprimer certains marqueurs phénotypiques de cellules neurales par exemple, recréer *in vitro* un neurone fonctionnel est une autre paire de manche. Les bénéfices observés lors de réinjections *in vivo* sont certainement dus à l'apport de facteurs de croissance et la différenciation des ASCs en cellules gliales (type astrocytes), assurant le maintien de l'homéostasie et jouant un rôle de soutien et de protection au système nerveux.

Les ASCs présentent finalement des propriétés assez similaires aux cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BMSCs, « bone marrow mesenchymal stem cells »), mais présentent tout de même des caractéristiques qui leur sont propres.

### **2.2.2.1. Caractérisation phénotypique**

Le caractère phénotypique des cellules souches mésenchymateuses a fait l'objet de nombreuses études. Cependant, comme pour l'ensemble des CSM, la caractérisation des ASCs reste difficile en raison de l'absence de marqueur cellulaire spécifique et unique. Certains marqueurs utilisés pour caractériser les CSM ont été mis en évidence sur les ASCs (Gronthos, Franklin et al. 2001) toutefois, les ASCs diffèrent des BMSCs décrites précédemment. En effet, les ASCs expriment l'antigène CD34 mais pas l'antigène CD106, contrairement aux BMSCs (Puissant, Barreau et al. 2005; Mitchell, McIntosh et al. 2006).

Différentes études montrent en effet que les ASCs appartiennent à une population de cellules positives pour le marqueur CD34 mais négatives pour les marqueurs hématopoïétiques (CD14, CD45) et endothéliaux (CD31) (Planat-Benard, Silvestre et al. 2004; Boquest, Shahdadfar et al. 2005). Cependant, d'autres groupes penchent pour l'existence de deux sous-populations au sein des ASCs : l'une CD34<sup>+</sup> et l'autre CD34<sup>-</sup> (Yanez, Lamana et al. 2006).

Pour les ADSCs en culture, malgré les discordances, toutes les études s'accordent sur les marqueurs suivants, comme pour les BMSCs : CD73+, CD90+, CD105+, CD45- et CD14- (De Ugarte, Morizono et al. 2003; Mitchell, McIntosh et al. 2006; Yoshimura, Shigeura et al. 2006).

Alors que la plupart des caractérisations phénotypiques concerne des ADSCs en culture, qui peuvent avoir subi plusieurs passages, certains se sont intéressés au caractère natif des cellules de la SVF (Festy, Hoareau et al. 2005; Yoshimura, Shigeura et al. 2006; Varma, Breuls et al. 2007; Maumus, Peyrafitte et al. 2011).

Les cellules en culture perdent en effet leur caractère d'origine et évoluent en fonction du nouvel environnement dans lequel elles se retrouvent (boite en plastique, milieu de culture supplémenté par du sérum de vœu fœtal, facteurs de croissance éventuels, etc.). Il a été ainsi montré en cytométrie de flux que les ASCs natifs sont CD34+ mais l'expression de ce marqueur diminue fortement *in vitro* quand les cellules prolifèrent. De plus, le phénotype des cellules ne semble pas être fonction de leur localisation puisque ces cellules natives seraient éparpillées dans toute la fraction stromale vasculaire (et pas uniquement autour des vaisseaux) et n'exprimeraient pas les marqueurs de péricytes (NG2 et CD140b) (Maumus, Peyrafitte et al. 2011).

Ainsi, selon les différentes études et les différentes stratégies d'isolation et de caractérisation des ASCs, le Tableau 4 ci-après présente les principaux marqueurs permettant d'identifier ces cellules. Les expériences de cytométrie de flux menées dans notre propre laboratoire, sur l'ensemble des cellules de la SVF fraîchement extraite, confirment en partie ces données.

Marqueurs fortement exprimés	Marqueurs peu ou pas exprimés	Marqueurs à expression controversée
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD13</li> <li>• CD29</li> <li>• CD44</li> <li>• CD73</li> <li>• CD90</li> <li>• CD105</li> <li>• CD166</li> <li>• CMH I</li> </ul>	<p>Marqueurs hématopoïétiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CD14</li> <li>• CD31 (molécule d'adhésion endothéliale)</li> <li>• CD45</li> <li>• CD133</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD9</li> <li>• CD34</li> <li>• CD49d</li> <li>• CD106</li> <li>• CD146</li> <li>• STRO-1</li> </ul>

**Tableau 4 : Principaux marqueurs phénotypiques exprimés ou non à la surface des cellules souches du tissu adipeux.** Données issues de différentes études chez l'homme. Les marqueurs dont l'expression est modérée sont sujets à controverse selon les auteurs.

L'ensemble de ces études ont été entreprises chez l'homme en raison de la disponibilité des anticorps dirigés contre les différents marqueurs de surface cellulaire. Ces études commencent à être menées chez l'animal, notamment le chien (Vieira, Brandalise et al. 2010; Kisiel, McDuffee et al. 2012) et le cheval (de Mattos Carvalho, Alves et al. 2009), mais demeurent très limitées en raison du manque d'anticorps. Il existe effectivement peu d'anticorps spécifiques propres à certaines espèces, comme le cheval. Certains ont malgré tout tenté de tester des anticorps humains pour voir s'ils croisent avec une autre espèce. Aussi, des sociétés commencent à concevoir des anticorps pour diverses espèces animales, mais l'utilisation de ces produits reste peu fréquente et donc très coûteuse. Pour contrer ce manque, un autre moyen consiste à analyser l'expression des gènes codant pour ces marqueurs de surface cellulaire par PCR quantitative (Raabe, Shell et al. 2011).

#### **2.2.2.2. Potentiel de différenciation des ASCs *in vitro***

En plus de les caractériser d'un point de vue phénotypique, les ASCs peuvent être identifiées *in vitro* grâce à leur propriété de différenciation. Ce procédé est d'ailleurs couramment utilisé à l'heure actuelle pour identifier les ASCs chez d'autres espèces, comme le cheval, puisqu'il n'existe pas de marqueurs antigéniques spécifiques (Vidal, Kilroy et al. 2007; Mambelli, Santos et al. 2009). Différents cocktails de différenciation (ou milieux de culture « sélectifs ») ont été optimisés pour induire la différenciation des CSM, et donc des ASCs en culture. Voici les milieux de sélection les plus utilisés pour prouver le caractère multipotent des cellules :

Pour induire la différenciation en adipocytes, les ASCs doivent être incubés avec des stéroïdes (pour promouvoir la différenciation terminale), avec un inducteur de l'AMP cyclique et avec des acides gras. Ainsi, en présence de dexaméthasone (glucocorticoïde), d'insuline, d'IBMX (isobutyl methyl xanthine), et d'indométacine, ceci provoque une accumulation de vacuoles lipidiques à l'intérieur des cellules. Ces vacuoles peuvent fusionner pour former une unique gouttelette lipidique (cf. chapitre 1). Pour identifier les cellules différenciées, il est possible de suivre l'expression de PPAR  $\gamma$ 2 (peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$ 2), de la lipoprotéine lipase, et de la protéine liant les acides gras aP2 (« fatty acid-binding protein aP2 »). Les vacuoles lipidiques peuvent être facilement visualisées après coloration au « Red oil » (Pittenger, Mackay et al. 1999; Zuk, Zhu et al. 2001).

La méthode classique de différenciation des ASCs en ostéoblastes consiste à incuber pendant 2 à 3 semaines une monocouche de cellules confluentes avec de l'acide ascorbique (vitamine C), du  $\beta$ -glycerophosphate, et du dexaméthasone. Les cellules forment alors des agrégats ou nodules et l'expression de la phosphatase alcaline ainsi que l'accumulation de calcium augmentent avec le temps (Pittenger, Mackay et al. 1999; Zuk, Zhu et al. 2001). Ces nodules osseux peuvent être marqués par des colorants spécifiques utilisés en histologie (rouge alizarin et coloration von Kossa).

Quant à la différenciation en chondrocytes, une technique spéciale peut être utilisée, consistant à centrifuger les ASCs pour former une micromasse (équivalent au culot cellulaire) qui est ensuite cultivée en présence de TGF $\beta$  (« transforming growth factor  $\beta$  ») (Zuk, Zhu et al. 2001). Une fois les cellules différenciées, une analyse histologique avec coloration au bleu de toluidine permet de montrer une matrice extracellulaire abondante de glycosaminoglycanes. Les cellules peuvent également produire du collagène de type II, typique du cartilage articulaire.

Zuk et al. (2001) ont également différencié les ASCs en myoblastes, en utilisant du dexaméthasone et de l'hydrocortisone. La différenciation est effective lorsque les cellules sont multi-nucléées et expriment le facteur de transcription spécifique MyoD1 et la myosine.

Avec l'avancée des recherches, d'autres cocktails de différenciation ont pu être créés et d'autres molécules ont permis de faire différencier les ASCs *in vitro* en ténocytes, en cellules neuronales, en cellules endothéliales ou en cardiomyocytes (Planat-Benard, Menard et al. 2004; Planat-Benard, Silvestre et al. 2004; Locke, Feisst et al. 2011; Baer and Geiger 2012).

Cependant, ces études *in vitro* ne reflètent peut-être pas totalement la réalité. Les cellules obtenues grâce à ces milieux de différenciation expriment certains phénotypes de certains types cellulaires, mais qu'en est-il réellement ? Bien que des marqueurs spécifiques de cellules spécialisées soient synthétisés, ce n'est pas sûr que tout le programme génétique soit exprimé car cela est difficile à montrer.

### 2.2.2.3. Sécrétions et effets paracrines

A l'instar des autres populations de cellules souches, on a d'abord pensé que le principal potentiel des ASCs était étroitement lié à leur capacité de différenciation. Cela est en partie vrai, mais depuis quelques temps, un nombre croissant d'articles rapporte les effets trophiques des ASCs sur la protection, la survie et la différenciation des cellules et tissus endogènes (Salgado, Reis et al. 2010). Ces effets trophiques ont d'ailleurs été observés suite au transfert de graisse autologue en chirurgie esthétique et réparatrice (Coleman 2006).

Lorsqu'elles sont administrées au niveau d'un tissu lésé ou malade, les ASCs pourraient sécréter des cytokines des facteurs de croissance qui stimuleraient la régénération tissulaire de façon paracrine (Gimble, Katz et al. 2007). Les ASCs seraient capables de moduler la « niche de cellules souches » au niveau du tissu receveur en stimulant le recrutement des cellules souches endogènes et en favorisant leur différenciation dans le lignage requis pour la réparation du tissu lésé. De la même façon, les ASCs pourraient fournir des antioxydants (Kim, Park et al. 2008), des pièges de radicaux libres, et des protéines chaperonnes (protéines de choc thermique ou « heat shock protein ») au niveau d'un tissu en ischémie. De ce fait, les substances toxiques rejetées localement pourraient être en partie neutralisées, favorisant ainsi la survie cellulaire (Gimble, Katz et al. 2007).

De nombreuses molécules ont été identifiées dans le « secrétome\* » des ASCs, parmi lesquelles HGF (« hepatocyte growth factor »), GM-CSF (« granulocyte-macrophage colony stimulating factor »), des interleukines (IL-6, 7, 8 et 11), TNF $\alpha$  (« tumor necrosis factor-alpha »), VEGF (« vascular endothelial growth factor »), BDNF (« brain derived neurotrophic factor »), NGF (« nerve growth factor »), et des adipokines (Salgado, Reis et al. 2010). Ces molécules se sont révélées être d'une grande importance pour la médecine régénérative, notamment pour leur action sur le système immunitaire (Cui, Yin et al. 2007), pour la régénération du système nerveux (Yoo, Kim et al. 2008; Lopatina, Kalinina et al. 2011), la vascularisation (Moon, Kim et al. 2006), et pour les possibilités en régénération cardiaque (Rehman, Traktuev et al. 2004).

Le facteur de croissance VEGF est l'une des molécules sécrétées les plus étudiées, participant à l'angiogenèse dans bon nombre de cas, de la guérison des plaies (Lee, Xia et al. 2009) à la néovascularisation de membres ischémiques (Moon, Kim et al. 2006). Le facteur bFGF est également très convoité par la communauté scientifique, impliqué lui aussi, et souvent avec

VEGF, dans la régénération tissulaire (Lee, Xia et al. 2009). Ces deux facteurs peuvent être sécrétés naturellement dans des conditions d'hypoxie, mais peuvent être également induits grâce à des facteurs exogènes (ajout en culture de GDF-5, TNF $\alpha$ , bFGF, EGF, ou d'ascorbate). Il est à noter que les conditions d'hypoxie sont en fait les conditions réelles auxquelles les ASCs doivent faire face lorsqu'elles sont extraites de leur niche pour aller repeupler un autre environnement. C'est tout à fait le cas lors de transfert de graisse autologue et lors de réinjections de cellules souches en médecine régénérative. Ceci permet de mieux comprendre comment les ASCs peuvent exercer un réel effet bénéfique sur la zone réinjectée (cette fameuse activité trophique), notamment lors de la greffe de graisse.

L'activité paracrine des ASCs leur permet également d'exercer des effets anti-apoptotiques (cytoprotection). Via la sécrétion de nombreux facteurs de croissance, dont VEGF (angiogénique), IGF-1, et HGF, les ASCs sont en effet capables de réduire de façon considérable l'apoptose au niveau des cellules résidant au sein du tissu lésé (Rehman, Traktuev et al. 2004; Sadat, Gehmert et al. 2007; Gehmert, Sadat et al. 2008; Kim, Park et al. 2008).

#### **2.2.2.4. Caractère immunomodulateur**

En plus d'exercer une activité trophique, les ASCs sont capables d'immunomodulation. Cet effet est étroitement lié à leur « secrétome » (facteurs solubles sécrétés).

Comme les CSM issues de la moelle osseuse (BMSCs), les ASCs possèdent en effet des propriétés immunosuppressives qui ont été montrées *in vitro* (Puissant, Barreau et al. 2005), mais également *in vivo* (Yanez, Lamana et al. 2006).

Les ASCs sont capables de supprimer la réaction lymphocytaire mixte associée aux réactions allogéniques (Puissant, Barreau et al. 2005) : *in vitro*, les ADSCs ne génèrent pas de réaction allogénique liée aux lymphocytes incompatibles et suppriment la prolifération lymphocytaire (cellules T) en réponse aux mitogènes et aux allo-antigènes. Les ADSCs inhibent aussi la sécrétion de cytokines inflammatoires par les lymphocytes T, comme TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  et IL-12 (Yanez, Lamana et al. 2006).

De plus, comme les BMSCs, les ADSCs n'expriment pas de marqueur CMH-II, ni les différentes molécules co-stimulatrices de la réponse lymphocytaire (CD40, CD80 et CD86).

Malgré le manque de compréhension qui persiste pour expliquer ce phénomène, cette capacité immunosuppressive des ASCs semble indépendante d'IL10, de TGF $\beta$  et de HGF (Puissant, Barreau et al. 2005). Cependant, la prostaglandine E2 (PGE2), un facteur soluble sécrété par les ASCs, semblerait jouer un rôle important dans l'inhibition de la réaction lymphocytaire mixte (Cui, Yin et al. 2007; Yanez, Oviedo et al. 2010).

En outre, l'activité immunosuppressive des ASCs inhibe la différenciation des cellules dendritiques sous la dépendance de l'IL-6 et diminue l'expression des marqueurs CMH-II et des molécules co-stimulatrices CD40 et CD86 sur les cellules dendritiques matures (Djouad, Charbonnier et al. 2007; Ivanova-Todorova, Bochev et al. 2009). Certaines cellules dendritiques représentent la dernière étape de la différenciation des monocytes du sang et déclenchent la réponse immunitaire « adaptative » dont les principaux acteurs sont les lymphocytes T et B, dirigés contre les antigènes du « non-soi ».

Tout ceci renforce une fois de plus le potentiel thérapeutique des ASCs qui pourraient entre autre permettre des greffes allogéniques en évitant toute réaction immunitaire comme la GVHD, qui représente la complication la plus fréquente associée à la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (Yanez, Lamana et al. 2006). Des études chez l'homme ont confirmé ce potentiel immunomodulateur (Fang, Song et al. 2006; Fang, Song et al. 2009). Les xénogreffes pourraient également trouver leur avantage en médecine vétérinaire (Lin, Lin et al. 2012).

### **2.3. Potentiel thérapeutique des ASCs**

Grâce à leur fort potentiel, les ASCs offrent de nombreuses possibilités thérapeutiques, et les domaines d'application sont de plus en plus variés. Un nombre croissant d'études *in vivo* prouve d'ailleurs l'efficacité thérapeutique des ASCs.

#### **2.3.1. Aperçu du potentiel des ASCs en médecine vétérinaire**

La recherche sur les cellules souches a débuté chez l'animal avant de venir jusqu'à l'homme. Rappelons d'ailleurs que Till et McCulloch utilisaient des souris pour découvrir les propriétés

des cellules souches mésenchymateuses. Les animaux servent depuis toujours comme modèles d'étude. De plus, il est plus rassurant de montrer l'efficacité thérapeutique chez les animaux pour offrir un maximum de protection aux sujets humains qui s'inscrivent dans les premiers essais cliniques (Fiester, Scholer et al. 2004).

Mais pour une fois, l'expérimentation animale ne sert pas seulement aux êtres humains puisque les nouvelles thérapies cellulaires offrent des possibilités multiples à la médecine vétérinaire.

Dans le secteur vétérinaire, la majorité des études est concentrée sur le traitement des pathologies de l'appareil locomoteur. Le cheval fait d'ailleurs l'objet d'avancées majeures dans ce champ d'applications (Richardson, Dudhia et al. 2007).

Avant les ASCs, ce sont les BMSCs qui ont d'abord été utilisées pour traiter, chez le Cheval, la desmite du ligament suspenseur du boulet (Herthel, 2001) et la tendinopathie du fléchisseur superficiel du doigt (Smith, Korda et al. 2003). Les tendinopathies constituent ainsi la première indication pour ces thérapies cellulaires.

La greffe autologue d'ASCs est utilisée par les vétérinaires depuis 2003 pour traiter les lésions tendineuses et ligamentaires ainsi que les arthropathies (Black, Gaynor et al. 2007). Ce type de traitement est d'ailleurs commercialisé depuis cette date par la société américaine Vet-Stem qui aurait traité plusieurs milliers d'animaux (Chevaux, Chiens et Chats) (<https://www.vet-stem.com>).

Comme nous le verrons dans le troisième chapitre, l'efficacité des ASCs a été montrée dans le traitement des tendinites chez le Cheval, notamment dans un modèle de tendinite induite à la collagénase (Nixon, Dahlgren et al. 2008). Les ASCs se sont également révélées bénéfiques chez le Chien, dans le traitement de l'ostéoarthrite chronique de l'articulation coxo-fémorale (Black, Gaynor et al. 2007) puis de l'ostéoarthrite du coude (Black, Gaynor et al. 2008; Guercio, Di Marco et al. 2012). L'ostéoarthrite est une maladie dégénérative des articulations avec des épisodes inflammatoires intermittents dont souffrent plus de 20 % des Chiens. Cette pathologie est aussi l'une des plus fréquentes chez le Cheval mais des compléments d'études sont nécessaires pour prouver l'efficacité des ASCs *in vivo* (Frisbie, Kisiday et al. 2009). Néanmoins, il est intéressant de noter que le Cheval représente le modèle le plus proche de l'Homme pour ce type de trouble, ceci en raison de la finesse de son cartilage articulaire au niveau du grasset, qui se rapproche de la finesse du cartilage situé dans le genou de l'Homme (Koch and Betts 2007). En termes de ressemblance avec le cartilage du genou humain, viennent ensuite la chèvre, le mouton, le chien, puis le lapin (Frisbie, Kisiday et al. 2009).



Les ASCs intéressent également les vétérinaires pour la réparation osseuse (Ribitsch, Burk et al. 2010). Les fractures représentent en effet un inconvénient majeur étant donné qu'il n'est pas toujours évident d'immobiliser un animal, d'autant plus lorsqu'il s'agit de gros animaux, ayant du mal à trouver leur équilibre et à supporter leur poids sans leurs quatre membres.

Le chien est ainsi utilisé comme modèle pour la régénération osseuse (traitement des pertes de substance osseuse). Des ASCs canines ont même été modifiées génétiquement pour exprimer BMP-2, un facteur de croissance reconnu comme facteur de différenciation ostéogénique (Li, Dai et al. 2007).

Comme chez l'Homme, outre les troubles orthopédiques, d'autres maladies qui sont parfois spécifiques à certaines espèces pourraient être traitées, comme l'inflammation de l'intestin, le diabète (Chien et Chat), les maladies rénales (notamment chez le Chat), les maladies du foie, les maladies immunes, ou encore les maladies cardiaques, les lésions de la moelle épinière (Chien et Chat) et les troubles neurologiques (Ryu, Lim et al. 2009; Lim, Boozer et al. 2010; Ribitsch, Burk et al. 2010; Gattegno-Ho, Argyle et al. 2012).

Le chien a par exemple constitué un modèle d'étude des cardiopathies ischémiques humaines (Memon, Sawa et al. 2005). Même si ce type de trouble reste limité chez les mammifères non humains, ces études utilisant des cellules souches mésenchymateuses pourraient être malgré tout profitables pour traiter d'autres maladies cardiaques comme la cardiomyopathie dilatée canine\*.

Les propriétaires d'animaux voient ainsi de plus en plus d'espoir en ces nouvelles thérapies utilisant les cellules souches puisqu'elles offrent une possibilité de traitement réellement efficace là où d'autres échouent, et moins coûteuse en comparaison avec les traitements actuels qui doivent être bien souvent répétés.

Aussi, l'expérience acquise dans le traitement des animaux fournit des informations précieuses pour la médecine humaine et sert de précurseur pour l'utilisation de cellules souches en médecine humaine.

### 2.3.2. Essais cliniques chez l'homme

L'innocuité et l'efficacité des cellules souches en thérapie cellulaire sont actuellement en cours d'évaluation dans de nombreux essais cliniques.

La majeure partie des essais cliniques en cours implique les cellules souches sanguines du cordon ombilical ou les cellules souches dérivées de la moelle osseuse, et concerne majoritairement le traitement de maladies du sang (ischémie ou maladie proliférative) ou du système immunitaire (Trounson, Thakar et al. 2011). Mais les essais cliniques se multiplient, notamment avec les cellules souches dérivées du tissu adipeux, et les champs d'application s'élargissent.

Les cellules souches ont évidemment un fort potentiel thérapeutique (Figure 21). L'efficacité des ASCs est étudiée dans de nombreux cas, tels que dans le traitement du diabète de type I ou II, de la cirrhose du foie, des fistules, des maladies cardio-vasculaires, de l'ischémie des membres, de la sclérose amyotrophique latérale, des lipodystrophies, de la GVHD, de maladies immunes (arthrite rhumatoïde, maladie de Crohn, colite ulcéreuse), de la sclérose en plaques, et également dans l'augmentation des tissus mous en chirurgie esthétique et dans la réparation osseuse (Lindroos, Suuronen et al. 2011).

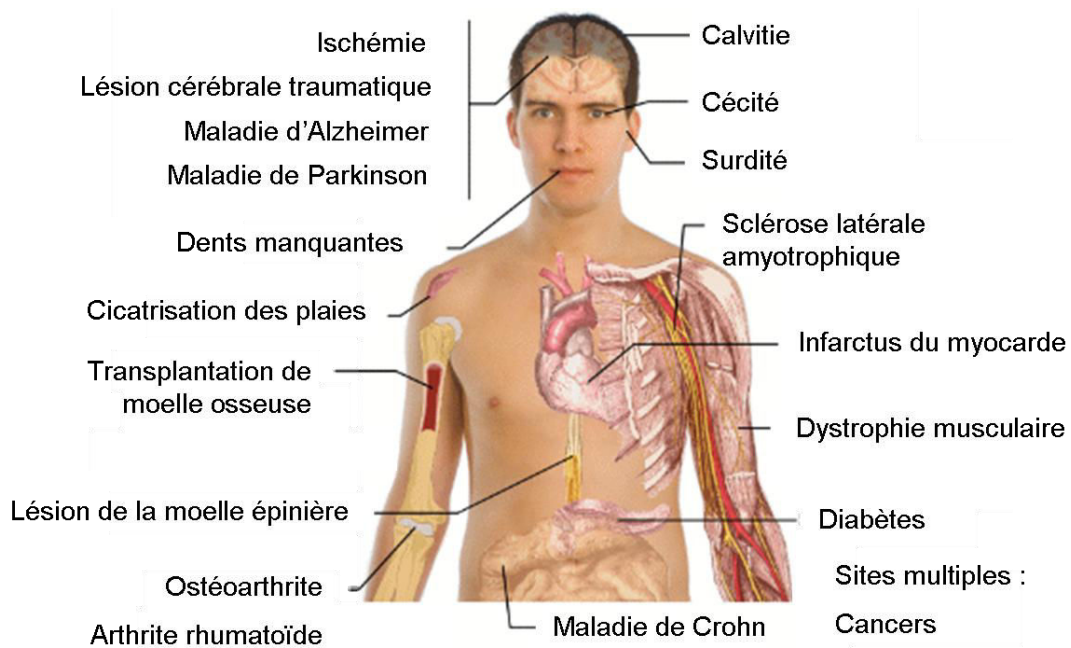


Figure 21 : Exemples des différentes utilisations potentielles des cellules souches en thérapie cellulaire humaine (adapté de <http://worldstemcells.com>)

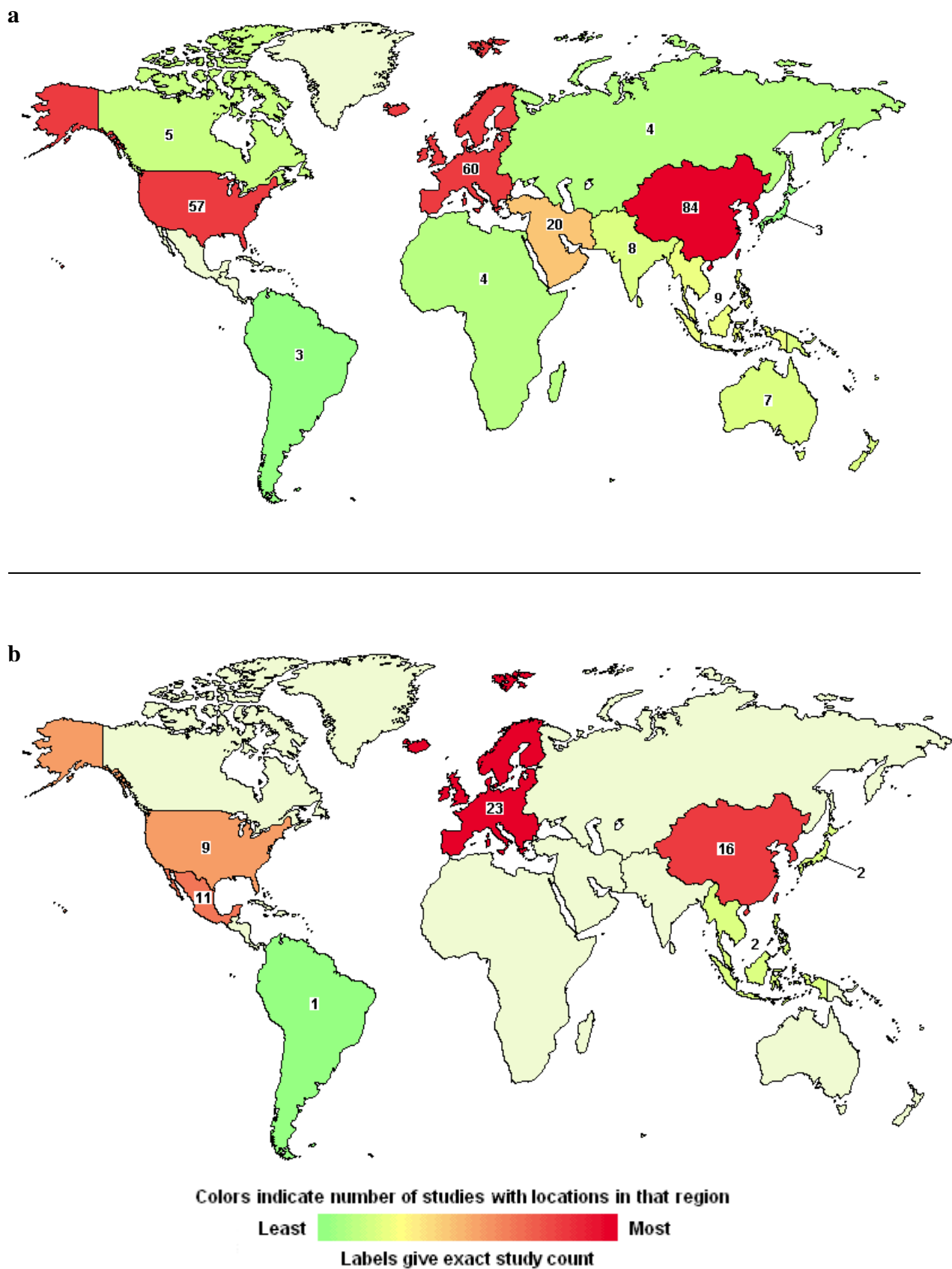


Figure 22 : Répartition mondiale des essais cliniques impliquant (a) des cellules souches mésenchymateuses et (b) des cellules souches du tissu adipeux (d'après sources NIH, « ClinicalTrials.gov »)

L'institution américaine s'occupant de la santé publique (NIH, « National Institutes of Health ») met à disposition un site internet sur lequel sont référencés les essais cliniques dans le monde entier (<http://clinicaltrials.gov/>). Selon le critère de recherche choisi dans la base de données gouvernementale, 249 études cliniques sont répertoriées avec le terme « adult mesenchymal stem cells » et 257 études cliniques avec le terme « mesenchymal stem cells » parmi lesquelles 241 études interventionnelles (données actualisées en août 2012).

Le nombre d'essais cliniques ne fait qu'augmenter de façon considérable. En effet, si l'on considère l'étude de Trounson de 2011, rapportant 123 études cliniques utilisant les CSM, cela voudrait dire que ce nombre a doublé en un an.

Les études cliniques utilisant plus spécifiquement les cellules souches du tissu adipeux ont elles aussi considérablement augmenté : alors qu'il n'y en avait que 9 en décembre 2009, puis 18 en mai 2010 (Lindroos, Suuronen et al. 2011), on en compte maintenant 78 en août 2012, dont 66 études interventionnelles.

Dans cette course folle de recherche de nouvelles solutions thérapeutiques à partir des CSM, l'Asie de l'Est (79 études interventionnelles dont 54 en Chine), l'Europe (58 études interventionnelles), suivie de près par les Etats-Unis (50 études interventionnelles), sont en tête de liste (Figure 22a). L'Europe en revanche compte le plus grand nombre d'essais cliniques avec les ASCs, suivie par l'Asie de l'Est, le Mexique et les Etats-Unis (Figure 22b).

Parmi les 257 études cliniques utilisant les CSM, 9 sont réalisées en France, dont 3 avec les cellules souches du tissu adipeux (Tableau 5). Ces 3 essais cliniques référencés pour la France sont en phase de recrutement. Alors que l'un d'entre eux vise à expliquer l'obésité morbide (« Vieillissement accéléré des cellules du tissu adipeux viscéral chez les obèses morbides: Implication dans les pathologies associées à l'obésité »), les deux autres utilisent les ASCs pour traiter l'ischémie des membres (« ACELLDream ») et l'ostéoarthrite du genou (« ADIPOA »).

Titre de l'étude	Pathologie / Etude	Auteurs	Type d'étude	Etat	Greffe	Cellules	Injection	Lieu
<b>Intravenous Stem Cells After Ischemic Stroke (ISIS)</b>	Accident vasculaire cérébral	Olivier Detante (CHU Grenoble, CEA, INSERM)	Phase II	Recrutement	Autologue	BMSCs	Intraveineuse	Grenoble
<b>Mesenchymal Stem Cells: Alterations in Genome (MESSAGE)</b>	Etude des altérations génétiques induites par la culture cellulaire	Patricia Lemarchand (CHU Nantes)	-	Achevée	-	BMSCs	non	Nantes
<b>Mesenchymal Stem Cells and Myocardial Ischemia (MESAMI)</b>	Cardiomyopathie ischémique chronique	Jérôme Roncalli (CHU Toulouse)	Phase I / II	Recrutement	Autologue	MSCs (Étienne-Steiner, Girard et al.)	Intracardiaque	Toulouse
<b>Transplantation of Bone Marrow Stem Cells Stimulated by Proteins Scaffold to Heal Defects Articular Cartilage of the Knee</b>	Ostéoarthrite du genou	Michel Assor (Université de Marseille)	Phase 0	Recrutement	Autologue	BMSCs (fraîches + matrice de collagène + PRP)	Genou	Marseille
<b>Intracavernous Bone Marrow Stem-cell Injection for Post Prostatectomy Erectile Dysfunction (INSTIN)</b>	Dysfonction érectile après prostatectomie	René Yiou, Hélène Rouard, Philippe Lecorvoisier (CHU Mondor, INSERM)	Phase I / II	Recrutement	Autologue	BMSCs	Intra-caverneuse	Créteil
<b>Percutaneous Autologous Bone-marrow Grafting for Open Tibial Shaft Fracture (IMOCA)</b>	Fracture ouverte du tibia	Philippe Rosset (CHU Tours)	randomisée multicentrique	Recrutement / en cours	Autologue	BMSCs	Percutanée (1 mois post-chirurgie)	Tours, France
<b>ADIPOA - Clinical Study</b>	Ostéoarthrite du genou	Christian Jorgensen (CHU Montpellier)	Phase I bicentrique	Recrutement	Autologue	ASCs	Intra-articulaire (2, 10 ou 50.10 <sup>6</sup> ASCs)	Montpellier, Allemagne
<b>ACELLDream for Adipose Cell Derived Regenerative Endothelial Angiogenic Medicine</b>	Maladie vasculaire périphérique grave, membre ischémique	Alessandra Bura-Rivière, Louis Casteilla (CHU Toulouse, UMR 5241 UPS/CNRS)	Phase I / II	Recrutement	Autologue	ASCs (Étienne-Steiner, Girard et al.)	Intra-musculaire (100.10 <sup>6</sup> ASCs)	Toulouse
<b>Accelerated Aging of the Cells of Visceral Adipose Tissue in Morbid Obese Subjects (SENAPID)</b>	Obésité morbide, étude de la pathogénicité associée à la croissance excessive du tissu adipeux viscéral	Séverine Ledoux (Hôpital Louis Mourier, INSERM)	Observation	Recrutement	-	ASCs	non	Colombes

**Tableau 5 : Etudes cliniques réalisées en France avec des cellules souches mésenchymateuses** (d'après sources NIH, « ClinicalTrials.gov »). Abréviations : CHU, Centre Hospitalier Universitaire ; CEA, Commissariat à l'Énergie Atomique ; INSERM, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale ; PRP, Platelet-Rich Plasma.

Ainsi, en raison de leurs nombreux potentiels, l'utilisation des ASCs a rapidement avancé dans les essais cliniques pour le traitement d'un large éventail de pathologies. Comme les thérapies cellulaires sont de plus en plus fréquentes, les bonnes pratiques de laboratoire sont nécessaires. Le traitement des cellules en laboratoire implique un risque accru de complications et d'effets secondaires potentiellement néfastes pour le receveur. Par conséquent, la sécurité, la reproductibilité et la qualité de la manipulation des cellules doivent être examinés soigneusement avant leur utilisation intensive dans des applications cliniques.

## **2.4. Réglementation en vigueur**

Avant de pouvoir entreprendre des essais cliniques, les chercheurs doivent répondre à certains critères dictés par la législation du pays ou de la communauté auxquels ils sont rattachés.

### **2.4.1. Loi de bioéthique**

Les cellules souches ont suscité beaucoup d'intérêt de la communauté scientifique, mais aussi des populations et des gouvernements qui ont émis leur opinion et mis en place des moyens de réguler certaines recherches. Ceci a commencé avec les cellules souches embryonnaires (Csete, Schwab et al.).

Les CSE ont longtemps fait l'objet d'un intense débat qui soulève des questions complexes tant morales que juridiques, éthiques et politiques. Alors que l'embryon dispose d'un statut juridique mal défini, il était nécessaire de prévoir un encadrement strict de la recherche sur les CSE humaines.

Ceci a finalement conduit à la création de l'agence de la biomédecine (ABM). Créée avec la loi de bioéthique de 2004 et sous la tutelle du Ministère de la Santé, l'ABM s'est substituée à l'établissement français des greffes, exerçant des actions dans les domaines liés au prélèvement d'organes, de tissus et de cellules, ainsi que dans les domaines liés à la procréation, à l'embryon et à la génétique humaine.

Jusqu'en 2004, la législation française interdisait l'utilisation des embryons surnuméraires y compris pour la recherche. L'établissement de lignées de cellules souches à partir d'embryons ou de fœtus issus d'avortements naturels ou provoqués était cependant autorisé.

Ce n'est qu'en juillet 2004 que le Parlement autorise les chercheurs à utiliser des embryons surnuméraires ne faisant plus l'objet d'un projet parental. L'ABM permet la recherche sur les cellules ES dans un cadre très réglementé, pour une période probatoire de cinq ans, et sous des conditions draconiennes, notamment la condition que les deux parents aient donné leur accord et seulement si ces recherches sont « susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs ». D'autres pays d'Europe disposaient déjà de ce droit (Belgique, Danemark, Finlande, Grèce, Hollande, Suède et Grande-Bretagne) ce qui a permis un certain essor de ces pays dans ce domaine en pleine évolution.

Aux Etats-Unis, la situation est également très complexe et diffère selon si les recherches sont financées par des fonds publics ou privés, si elles sont menées sous l'égide d'institutions fédérales ou locales, et également selon le gouvernement élu.

La loi relative à la bioéthique a été révisée en 2011 (loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011). Elle encadre principalement les recherches sur les cellules souches embryonnaires (Csete, Schwab et al.), maintenant la permission sous réserve de certaines conditions, ainsi que les recherches sur les cellules souches hématopoïétiques. L'utilisation des cellules souches hématopoïétiques provenant du sang placentaire est d'ailleurs réglementée de façon précise.

Alors que les recherches sur les cellules souches embryonnaires font toujours débat et sont sous le joug de règles draconiennes des plus contraignantes, les cellules souches adultes représentent une belle alternative (Moore, Mills et al. 2006). À ce jour, la recherche sur les cellules souches adultes a débouché sur un plus grand nombre d'essais cliniques et de traitements comparé à la recherche sur les CSE. Ceci s'explique en partie parce que les cellules souches adultes se sont révélées plus faciles à obtenir et à manipuler en laboratoire, mais aussi parce que la stigmatisation associée à la recherche sur les embryons a dissuadé les investigateurs.

Cependant, comme pour l'autorisation de toute thérapie, l'utilisation des cellules souches adultes chez l'homme fait elle aussi l'objet d'un encadrement rigoureux et doit faire ses preuves avant d'obtenir l'approbation des autorités compétentes (l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ou ANSM, en France ; la Food and Drug Administration ou FDA, aux Etats-Unis).

## **2.4.2. Cadre législatif pour la manipulation des cellules souches mésenchymateuses adultes destinées à la thérapie**

Les cellules souches adultes sont loin des débats controversés typiques des cellules souches embryonnaires et ne sont donc pas soumises à une législation aussi stricte. Ceci permet de les étudier assez librement.

Dans le cadre de la recherche fondamentale ou clinique, ces cellules peuvent d'ailleurs être aisément obtenues d'un point de vue légal : elles peuvent notamment être issues de « déchets opératoires », prélevées au cours d'une intervention chirurgicale pratiquée dans l'intérêt de la personne ou lors d'un accouchement (*Articles L. 1235-2 et L. 1245-2 du Code de la Santé*). Le patient doit cependant être informé et un simple régime de « non opposition » suffit pour l'utilisation du matériel biologique ainsi obtenu. Ce statut réglementaire est évidemment applicable aux cellules souches issues du tissu adipeux.

Cependant, c'est leur application qui peut être soumise à des contrôles stricts.

Les produits cellulaires adultes, définis comme des « produits cellulaires à finalité thérapeutique », peuvent répondre à deux statuts réglementaires. Selon le code de la santé, ces produits sont :

- soit considérés comme des médicaments de thérapie cellulaire, s'ils sont d'origine pharmaceutique ou fabriqués industriellement, devant donc répondre à l'ensemble des dispositions législatives et réglementaires qui s'appliquent aux médicaments (pharmacovigilance) ;
- soit des préparations de thérapie cellulaire (non fabriquées industriellement), encadrées par une législation adaptée (biovigilance).

Un dispositif législatif strict a été mis en place par la loi de bioéthique dans le but d'encadrer l'utilisation thérapeutique des produits issus du corps humain. Avant de pouvoir être utilisées, les préparations de thérapie cellulaire doivent obligatoirement être autorisées par l'ANSM, qui évalue les procédés de préparation et de conservation ainsi que les indications thérapeutiques avant de donner son aval (*article L. 1243-5*). Mais pour obtenir une autorisation, l'ANSM doit aussi recueillir au préalable l'avis de l'Agence de la biomédecine (ABM). De la même façon, toute demande d'essai clinique passe par l'ANSM et l'instigateur de cet essai a le devoir de notifier tout effet ou événement indésirable grave lié à l'essai clinique (cf. Annexe 2). Avant mai 2012, c'était l'Afssaps (Agence française de sécurité



sanitaire des produits de santé) qui contrôlait ces activités, puis l'Afssaps a été remplacée par l'ANSM qui reprend donc les activités d'évaluation et d'inspection des produits de santé.

Pour assurer la protection des patients, la législation impose ainsi une validation de l'aspect sécuritaire de ces produits lorsqu'ils sont administrés à usage thérapeutique. Les conditions du don ou du prélèvement sont encadrées, de même que les étapes de préparation de ces produits, étapes plus ou moins complexes pouvant introduire des risques d'infection. Parmi les méthodes de préparation du « produit » de thérapie cellulaire, on peut citer la manipulation du tissu et des cellules, qui doit se faire de façon très rigoureuse, et l'éventuel passage par la culture cellulaire nécessite un encadrement strict (contrôle qualité), les conditions de culture faisant appel à des facteurs de croissance ou d'autres produits d'origine biologique (cf. Annexe 2).

La biovigilance consiste ainsi en une veille sanitaire sur l'ensemble des étapes de la chaîne, du prélèvement à la greffe, jusqu'au suivi médical des patients, donneurs vivants et/ou receveurs.

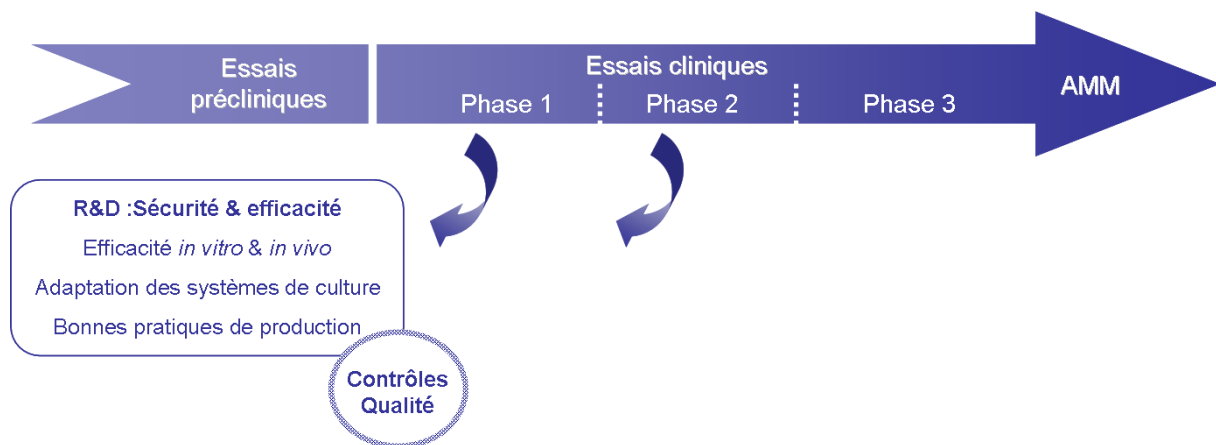
Alors que les premiers textes de la législation française datent de 1996, la réglementation européenne est plus récente (directives de 2004 et règlement N°1394/2007/CE sur les « Médicaments de Thérapie Innovante » de 2007) et impose de revoir certains termes. Les « préparations de thérapies cellulaires » changent de statut pour devenir des « médicaments de thérapie innovante ». Dans un désir de la Commission européenne et de l'EMA (European Medicines Agency) d'harmoniser les « médicaments de la thérapie cellulaire », la réglementation et les régimes d'autorisation vont être voués à évoluer en France. Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) pour la manipulation des cellules et/ou des tissus évoluent d'ailleurs vers les bonnes pratiques de fabrication (BPF) applicables aux médicaments.

La réglementation relative aux applications thérapeutiques chez l'animal est en revanche plus souple, ce qui facilite le développement de produits à usage vétérinaire.

Il n'en est pas forcément de même aux Etats-Unis où la FDA (Food and Drug Administration) régule plus strictement les thérapies chez l'animal (Harman et al. 2011).

### 2.4.3. Implication de la communauté scientifique dans la régulation des activités de thérapie cellulaire

Finalement, comme pour tout produit à usage thérapeutique, les CSM doivent passer par différentes étapes pour prouver leur efficacité et leur innocuité : des études précliniques (*in vitro* et *in vivo*, chez l'animal) aux études cliniques (phase I, II et III) (Gimble, Guilak et al. 2010) (Figure 23).



**Figure 23 : Ordre chronologique des différentes étapes pour obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM).**

En l'absence de réel consensus, la communauté scientifique a voulu élaborer des lignes directrices internationales (« guidelines ») que les gouvernements commencent d'ailleurs à reprendre.

L'ISSCR (« International society for stem cell research ») joue d'ailleurs un rôle de régulation et a déjà publié des codes de bonne conduite à l'attention de la communauté scientifique et des médias. Cette société internationale de recherche sur les cellules souches a été fondée en 2002 dans le but de promouvoir et favoriser les échanges ainsi que la diffusion des informations relatives aux cellules souches. L'ISSCR a notamment publié des lignes de conduite pour la recherche sur les cellules souches embryonnaires (Dickens 2008) et pour les applications cliniques (Hyun, Lindvall et al. 2008).

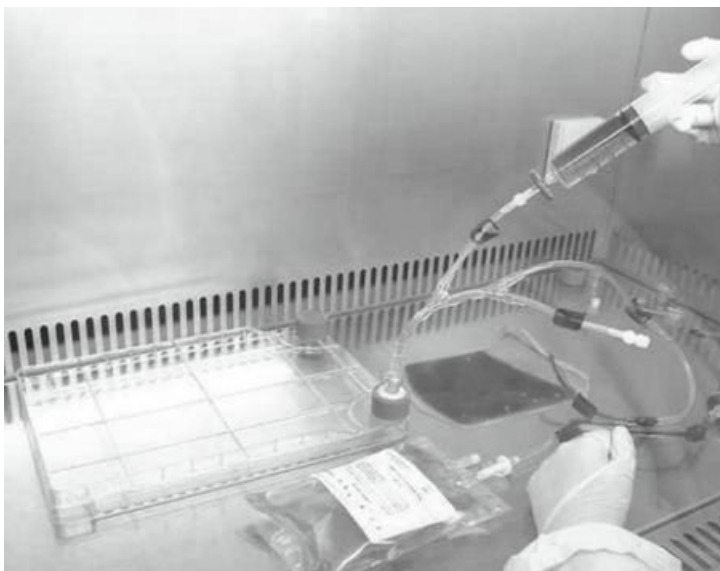
Bonnes pratiques de fabrication, contrôles qualité (notamment concernant le risque bactériologique) et traçabilité sont requis pour assurer une production saine des cellules

souches adultes et donc assurer la sécurité des patients (Bourin, Peyrafitte et al. 2011; Gimble, Bunnell et al. 2011; Sensebe, Bourin et al. 2011).

Pour la culture cellulaire, des systèmes de culture clos (Figure 24) et des bioréacteurs doivent être utilisés et pour la thérapie humaine, les produits d'origine humaine sont à préférer des produits d'origine animale pour éviter l'ajout de protéines xénogéniques\* (Bourin, Peyrafitte et al. 2011; Sensebe, Bourin et al. 2011). Le laboratoire de production doit avoir un équipement aux normes (ISO 14644-2 et 14698), avec par exemple une hotte à flux laminaire spécifique (classe ISO 5) et la pièce où a lieu la culture doit disposer d'un système de filtres à particules afin de maintenir un taux de particules le plus bas possible ainsi qu'un système de conditionnement de l'air permettant d'instaurer une pression positive et d'éviter ainsi l'entrée de particules (Bourin, Peyrafitte et al. 2011).

Pour répondre à ces critères, des outils innovants sont conçus pour l'utilisation clinique.

Des entités commerciales développent des systèmes fermés pour la thérapie utilisant les cellules souches adipeuses autologues, tel que le système Cytori Celution™ (Lin, Matsubara et al. 2008) et la plateforme Tissue Genesis' TGI 1000™, qui sont actuellement soumis à des essais cliniques.



**Figure 24 : Exemple de système clos pour la culture des CSM (CellStack™).** Image reproduite de (Bourin, Peyrafitte et al. 2011).

En France, les sociétés souhaitant finalement distribuer ces « produits de thérapie annexe » doivent ainsi fournir un dossier comprenant toutes les informations sur l'origine de la matière première, la fabrication, la preuve de l'efficacité, les résultats des études de toxicité, la traçabilité et les contrôles de qualité en vue d'obtenir une autorisation de l'organisme de réglementation (cf. Annexe 2).

En fin de compte, même si les procédures sont compliquées à mettre en place, les gouvernements prêtent de plus en plus d'attention à ces nouvelles solutions de thérapie, ce qui est très encourageant malgré les contraintes que cela impose.

Les dernières sessions de l'Assemblée Nationale du Parlement français (du 8 juillet 2010 et postérieures) ont en effet statué sur l'état des lieux de la recherche sur les cellules souches en France : le gouvernement souhaite d'avantage considérer ce domaine de recherche et susciter de nouveaux appels à projets via l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) qui doit accroître son soutien aux recherches sur les cellules souches. Les collaborations étrangères ont également été encouragées.

## **2.5. Les avantages des cellules souches du tissu adipeux**

Voici finalement un récapitulatif des nombreux avantages qu'offrent les cellules souches du tissu adipeux, en comparaison aux autres types de cellules souches.

Le tissu adipeux dispose en effet de nombreux atouts et semble être une source très avantageuse de cellules souches sur de nombreux points, tant sur le cadre législatif, éthique, que sur leur potentiel thérapeutique.

### **→ Aucun problème d'éthique**

Comme leurs homologues (cellules souches adultes, CSM), les cellules souches du tissu adipeux (ASCs) ne soulèvent aucun problème d'éthique, contrairement aux cellules souches embryonnaires.

### → **Abondance du tissu adipeux blanc**

Comme on a pu le voir dans le premier chapitre, le tissu adipeux blanc sous-cutané est très abondant dans l'organisme, représentant 10 à 20 % du poids corporel chez l'homme adulte.

### → **Facilité d'obtention**

Les dépôts adipeux sous-cutanés sont omniprésents et facilement accessibles (De Ugarte, Morizono et al. 2003) permettant des prélèvements de grandes quantités de tissu adipeux avec une procédure peu invasive, par lipoaspiration. La lipoaspiration est une procédure bien tolérée et sûre, utilisée depuis de nombreuses années, mais aussi moins coûteuse et moins invasive que la ponction de moelle osseuse (Baer and Geiger 2012).

Contrairement à la moelle osseuse, dont le prélèvement est douloureux, délicat, pouvant même être risqué, donc peu souhaité par les patients, le tissu adipeux est quant à lui régulièrement abandonné comme déchet opératoire. Ceci facilite la multiplication des études sur les ASCs : avec les actes de lipoaspiration qui se multiplient en chirurgie esthétique, il est bien plus facile d'obtenir du « gras » que de la moelle pour poursuivre les recherches en cours.

De plus, dans le but cette fois d'une application thérapeutique, la procédure de lipoaspiration ne présente pas de risque majeur (Hanke, Bernstein et al. 1995; Housman, Lawrence et al. 2002). On peut même dire qu'elle présente un avantage pour le patient car, contrairement à la ponction de moelle osseuse, le prélèvement de « gras » peut être souhaité par de nombreux patients qui cherchent à améliorer leur image et/ou leur santé. A noter cependant que pour une simple procédure de thérapie cellulaire (non combinée à une lipoaspiration de chirurgie esthétique), le volume de tissu prélevé tourne aux alentours de 20 à 100 mL, donc sans influence notable sur la plastie de la personne.

### → **Le tissu adipeux est une source abondante et quasi inépuisable de cellules souches**

En plus des facilités d'obtention du tissu adipeux par simple lipoaspiration, le tissu adipeux est également bien plus riche en cellules souches dérivées que ne l'est la moelle osseuse.

Les CSM dérivées de la moelle osseuse sont plus difficiles à obtenir et demandent une phase de mise en culture et de prolifération car elles sont peu nombreuses.

De plus, alors que le nombre et la fonctionnalité des cellules souches adultes déclinent chez les personnes âgées, le tissu adipeux fait en quelque sorte exception puisque, même si le

nombre d'ASCs diminue avec l'âge, le tissu adipeux offre malgré tout un pool toujours important tout au long de la vie.

En terme de chiffres, le tissu adipeux contient des centaines de milliers de cellules souches mésenchymateuses dans chaque gramme de graisse (Sen, Lea-Currie et al. 2001), tandis que les BMSCs ne constituent que 0,0001 à 0,01% de toutes les cellules nucléées de la moelle osseuse (Caplan 1994; Pittenger, Mackay et al. 1999; Baer and Geiger 2012).

D'après (Mizuno 2009), 1 g de tissu adipeux peut donner 5000 cellules souches, ce qui est 500 fois supérieur à la quantité de cellules souches dans 1 g de moelle osseuse.

**→ L'abondance des ASCs n'oblige pas la culture des cellules (coûteuse) et permet une réinjection extemporanée, directement après purification**

Même si de nombreuses études sont réalisées à partir de cellules souches en culture, le passage non obligatoire par cette phase de prolifération cellulaire est très intéressant et présente un avantage financier non négligeable. En effet, la pratique courante de la culture des cellules est longue, coûteuse, et nécessite l'intégration des bonnes pratiques de laboratoire et de production, en plus des bonnes pratiques médicales, pour permettre la réinjection aux patients.

De plus, la culture peut influencer sur les caractéristiques fonctionnelles des ASCs. Comme décrit précédemment, les ASCs en culture ne présentent pas les mêmes caractéristiques qu'au départ, et on observe notamment un changement dans l'expression des molécules d'adhésion pendant la culture. Ceci peut alors influencer leur potentiel de « homing », c'est-à-dire leur potentiel à s'établir au niveau du site de lésion tissulaire (Rombouts and Ploemacher 2003).

Cependant, il est vrai que la mise en culture permet d'injecter une population plus homogène, que l'on peut manipuler ou différencier comme on souhaite avant la réinjection.

Mais plus grave encore, bien que les données à ce sujet ne soient pas encore bien établies, la culture cellulaire pourrait peut-être introduire des instabilités chromosomiques et entraîner des transformations malignes (carcinomes), selon la durée de culture et le nombre de passages effectués (Rosland, Svendsen et al. 2009). Ainsi, contrairement aux BMSCs moins nombreuses, le nombre élevé de cellules souches disponibles dans le tissu adipeux présente un avantage certain puisqu'il permet de diminuer de façon considérable l'éventuel risque tumorigène (Tarte, Gaillard et al. 2010). En effet, plus il y a de cellules au départ, moins la

culture sera longue. Cependant, ces instabilités génétiques sont encore remises en question à l'heure actuelle car les données *in vitro* et les méthodes utilisées ne permettent pas d'établir une réelle transformation maligne (Wang, Han et al. 2012). Finalement, seules des études *in vivo* pourraient trancher.

Pour la pratique clinique, il paraît donc très avantageux et beaucoup plus simple d'utiliser les cellules de la SVF fraîchement extraites, puisqu'elles peuvent être récoltées au cours de la procédure opératoire et réinjectées extemporanément au patient, sans la nécessité d'effectuer une expansion *in vitro*. Le tissu adipeux étant une source abondante de cellules souches, une telle approche est tout à fait réalisable.

Mais la SVF comprend une population hétérogène de cellules et on peut se demander si l'injection de l'ensemble de ces cellules n'est pas risquée...

Dans la perspective de maintenir la sécurité pour le patient, l'injection extemporanée de l'ensemble des cellules de la SVF, sans passer par une phase de prolifération, semble finalement relativement bénigne. Cette stratégie présente l'avantage suivant : grâce au transfert de graisse autologue utilisé en chirurgie esthétique depuis plus d'un siècle, on dispose maintenant d'un certain recul quant à l'innocuité de l'injection de l'ensemble de ces cellules.

Cependant, il ne faut pas oublier que cette hétérogénéité cellulaire varie d'une part, en fonction du patient, et d'autre part, en fonction des paramètres extérieurs, c'est-à-dire du protocole utilisé pour extraire les cellules. Or différents protocoles de purification et de digestion sont utilisés au sein de la communauté scientifique, et ces protocoles donnent des sous-populations cellulaires différentes dans la SVF, ce qui est d'ailleurs reflété dans les articles puisque le phénotypage diffère entre les auteurs.

De plus, comme nous le verrons dans le sous-chapitre suivant, la digestion du tissu adipeux par la collagénase peut être délétère pour les cellules. De ce fait, des protocoles de manipulation des cellules de la SVF doivent être mis en place afin de permettre d'éliminer la collagénase. Des lavages et centrifugations post-digestion du culot cellulaire permettent de se débarrasser des enzymes et de leurs effets nocifs.

**→ Les ASCs ont toutes les capacités requises à la régénération des tissus**

Les ASCs ont montré toutes les caractéristiques des CSM d'un point de vue fonctionnalité, que ce soit au niveau de leur potentiel de différenciation, de leur activité paracrine, de leur propriété immunosuppressive, ou encore de leur potentiel thérapeutique... (Puissant, Barreau et al. 2005).

De plus en plus d'études comparent les ASCs et les BMSCs et, malgré les controverses (essentiellement dues à des conditions de purification des cellules et de culture différentes), de plus en plus de conclusions sont en faveur des ASCs (Rada, Reis et al. 2009).

Les ASCs ont par exemple montré une meilleure capacité de néo-vascularisation en comparaison avec les BMSCs (Kim, Kim et al. 2007) et semblent notamment être une meilleure source pour traiter l'ischémie et les accidents vasculaires cérébraux (Ikegame, Yamashita et al. 2011).

Concernant leur potentiel immunomodulateur, les ASCs semblent également être supérieurs à leurs homologues de la moelle osseuse (Ivanova-Todorova, Bochev et al. 2009).

En conclusion, ces nombreux avantages sommairement décrits ici font des cellules souches du tissu adipeux les nouveaux standards en or (« gold standards ») pour les thérapies cellulaires.



## **2.6. Problématique : la survie cellulaire**

Que ce soit pour assurer une bonne qualité du greffon après lipofilling, ou que ce soit pour la réussite du traitement d'une lésion par injection de cellules souches, l'essentiel est de maximiser la survie cellulaire. Or les cellules subissent différentes agressions tout au long du processus, de la lipoaspiration à la réinjection. Elles sont en effet sorties de leur environnement naturel, de leur « niche », et sont plus ou moins malmenées au cours des différentes étapes.

### **2.6.1. Les facteurs de survie cellulaire pour l'implantation de cellules**

#### **2.6.1.1. La communication entre les cellules**

Pour croître, proliférer, mais aussi survivre, les cellules ont un réel besoin de communication. Naturellement, une cellule normale ne survit que si cela est nécessaire et il en est de même pour qu'elle se divise. Le principe est le suivant : la division ne sera enclenchée qu'après stimulation par des signaux issus des cellules voisines et seulement si l'organisme en a besoin (besoin d'un plus grand nombre de cellules pour la réparation tissulaire par exemple) (Alberts 2002). En l'absence de ces signaux, les cellules souches restent en état de quiescence\*, bloquées en phase G0 du cycle cellulaire.

Les signaux issus des autres cellules peuvent constituer de véritables facteurs de survie sans lesquels la mort programmée pourrait être activée par la cellule, mourant ainsi par apoptose\* (Raff 1992). Parmi les facteurs de survie, les mitogènes et les facteurs de croissance stimulent la cellule en se fixant sur des récepteurs cellulaires de surface pour activer des voies de signalisation intracellulaires conduisant à la croissance, la prolifération et la survie. Ces voies de signalisation sont étroitement liées à l'inhibition de l'apoptose (famille Bcl2 couramment impliquée) (Alberts 2002). Rappelons d'ailleurs que les ASCs sont capables de sécréter des facteurs antiapoptotiques (facteurs de croissance comme GM-CSF, VEGF, HGF, bFGF et TGFβ) (Rehman, Traktuev et al. 2004).

En plus d'avoir des effets sur les autres cellules (effets paracrines) via la sécrétion de cytokines, de chimiokines\* et de facteurs de croissance, les cellules souches adultes comme les ASCs sont capables de fusionner partiellement avec les cellules somatiques\* dans lesquelles elles transfèrent mitochondries et ADN mitochondrial (Spees, Olson et al. 2006). Ce transfert mitochondrial permet notamment de rétablir la respiration aérobie dans les cellules somatiques endommagées (notamment des cardiomyocytes), mais aurait aussi un rôle dans la régénération tissulaire, participant à la reprogrammation des cellules somatiques (Acquistapace, Bru et al. 2011). Selon des hypothèses, cette reprogrammation somatique après fusion partielle pourrait être le fruit d'une modulation de l'activité transcriptionnelle due, soit à des facteurs provenant des cellules souches, soit à une signalisation rétrograde (des mitochondries au noyau).

Des transferts d'organites\* entre CSM et cellules rénales ont d'ailleurs été observés et permettraient de rétablir la fonction rénale (Plotnikov, Khryapenkova et al. 2010). Ces interactions entre cellules souches et cellules somatiques, au niveau du tissu receveur à traiter, sont très importantes puisqu'elles favorisent la régénération tissulaire. Ainsi, le contact entre les cellules est important car d'une part, il permet aux cellules souches implantées de se différencier dans le lignage correspondant au tissu à traiter, et d'autre part, il permet de restaurer les fonctions cellulaires dans les cellules endommagées.

Mais l'interaction entre les cellules ne suffit pas : les cellules interagissent également avec leur environnement.

#### **2.6.1.2. Reconstitution d'une « niche » et « homing »**

Les cellules ont un réel besoin de s'ancrer et de communiquer avec leur environnement. Les ASCs sont en effet des cellules adhérentes qui ne peuvent proliférer et survivre que si elles s'attachent à un support.

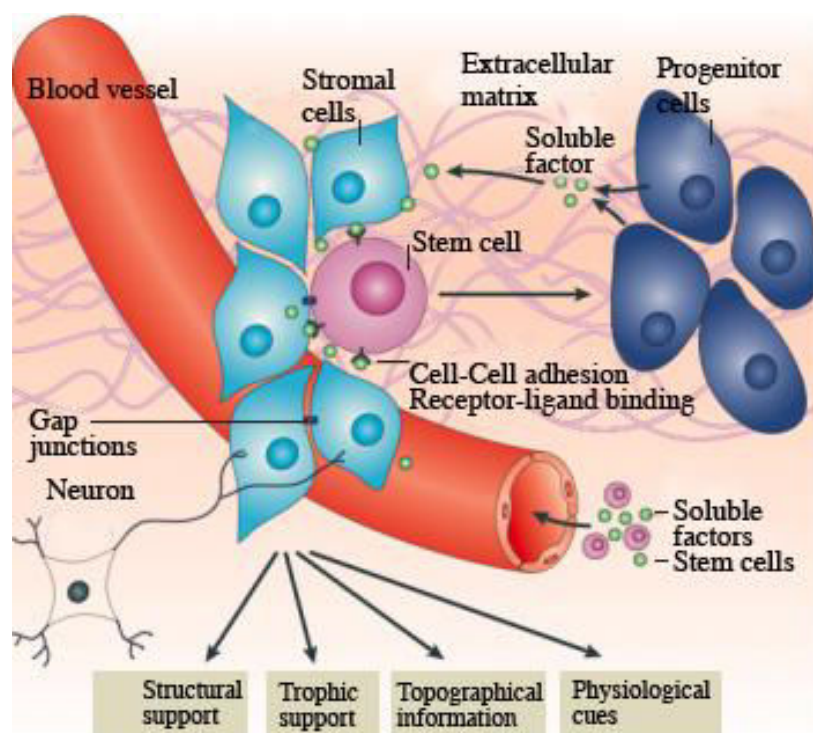
Or les ASCs subissent plusieurs « attaques » avant même d'être réinjectées. Elles sont d'abord extraites de leur propre environnement, ou « niche », puis elles sont malmenées dans le processus de purification cellulaire, notamment au contact de la collagénase. En effet, dès la digestion du tissu adipeux pour récupérer la SVF, les cellules se retrouvent sans matrice, seules, isolées, et en quelque sorte « flottantes », en suspension. Puis elles subissent une nouvelle contrainte lorsqu'elles sont réinjectées dans un nouvel environnement, différent de

leur environnement d'origine, dans lequel on leur demande de survivre et d'être métaboliquement actives pour régénérer un tissu.

La notion de « niche » est un concept récent qui a permis de décrire ces microenvironnements cellulaires (Scadden 2006; Ema and Suda 2012).

Les niches cellulaires sont des compartiments fonctionnels au sein des tissus qui contrôlent le nombre de cellules en fournissant des signaux qui régulent l'auto-renouvellement des cellules, la différenciation et la quiescence\* (Scadden 2006). Ces signaux peuvent être transmis via un contact cellulaire direct, ou via des facteurs de croissance et des cytokines, ou via des composants de la matrice extracellulaire (MEC).

Les niches de cellules souches sont des microenvironnements dynamiques et complexes. Elles procurent un ensemble de signaux physiques et chimiques qui participent à la régénération tissulaire (Figure 25).



**Figure 25 : Niche de cellules souches.** Le microenvironnement dans lequel sont situées les cellules souches constitue une « niche ». Les cellules interagissent avec les éléments de leur microenvironnement composé de différentes cellules, de vaisseaux sanguins, de facteurs solubles (image de [www.articell.eu](http://www.articell.eu)).

Ces niches de cellules souches sont de plus en plus étudiées (notamment au niveau de la peau, de la moelle osseuse, de l'épithélium intestinal) pour permettre de mieux comprendre

l'ensemble des signaux nécessaires à la régénération tissulaire. Par exemple, des études suggèrent que les stratégies utilisant des cellules souches pour l'ingénierie cutanée doivent tenir compte des caractéristiques complexes moléculaires et biologiques de ces niches (gradients physico-chimiques, composants de la matrice extracellulaire, cellules résidentes). Des systèmes innovateurs de biomatériaux reproduisant ces microenvironnements pourraient faciliter la réparation et la régénération de la peau par le biais des cellules progénitrices (Wong, Levi et al. 2012).

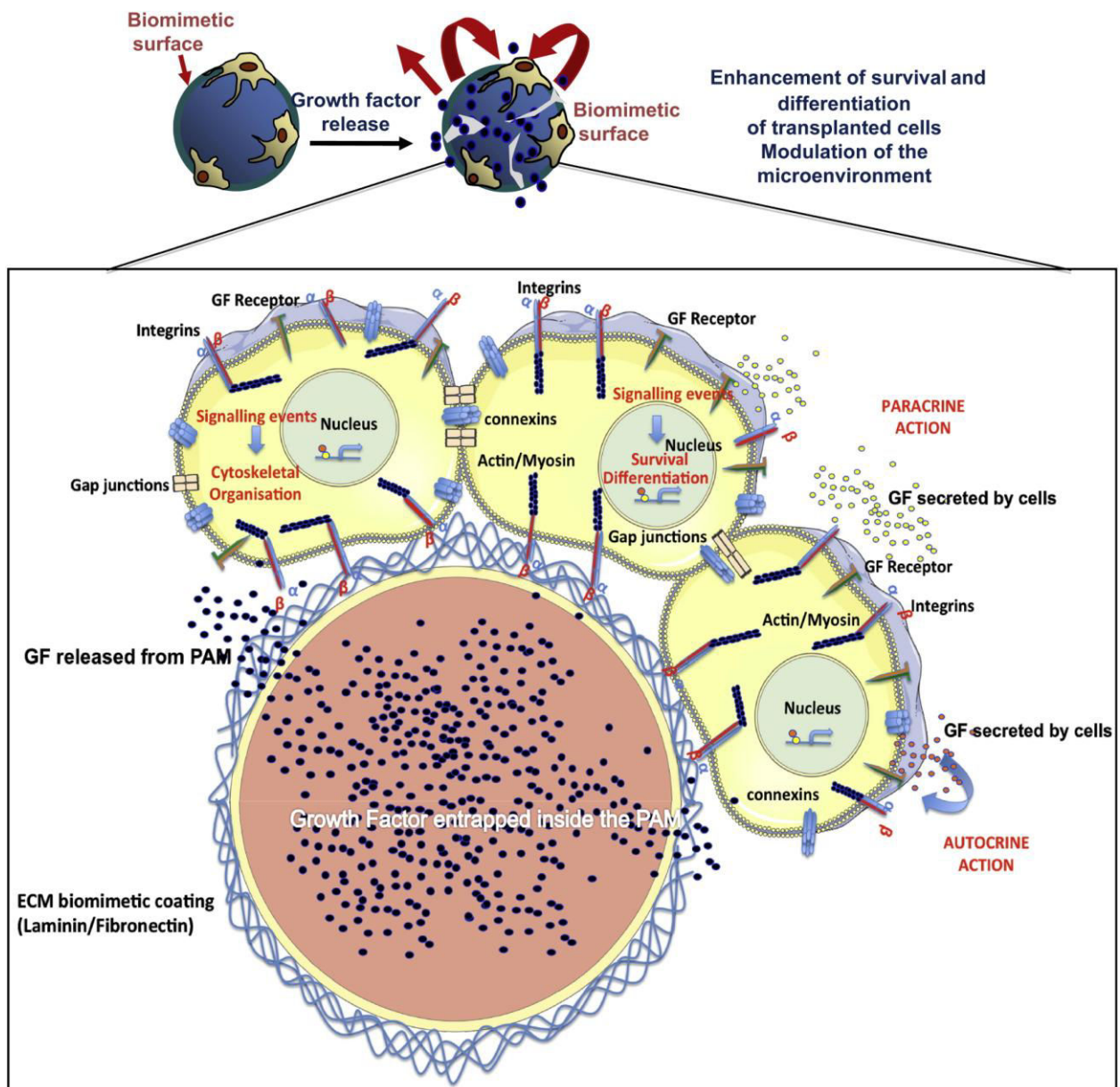
Le but étant d'améliorer la réponse, la migration et la prolifération cellulaire, les cellules souches doivent s'adapter aux changements environnementaux. Mais l'adaptation des cellules souches réinjectées dans un nouvel environnement constitue un véritable challenge.

Il est dans les pensées que les cellules souches ne peuvent pas survivre et fonctionner correctement en l'absence d'un substrat adéquat, de facteurs de croissance et de cellules de soutien. De nouvelles stratégies de bio-ingénierie consistent ainsi à reconstituer des « niches » indispensables au bon fonctionnement des cellules souches.

Ces nouvelles stratégies tentent de recréer les éléments constitutifs essentiels (cellules, matrice, facteurs de croissance et échafaudages ou « scaffolds ») à l'aide de biomatériaux (hydrogel, matrices, microparticules, polymères) (Merceron, Vinatier et al. 2008; Kuo, Marturano et al. 2010; Lampe and Heilshorn 2012). Le but de ces stratégies est de créer des substituts d'ingénierie qui interagissent avec les cellules à l'échelle moléculaire et permettent de déclencher des modifications de la matrice extracellulaire et de favoriser la régénération de tissus lésés.

A titre d'exemple, des biomatériaux et des « bio-facteurs » sont testés pour la réparation du cartilage articulaire en combinaison avec les cellules souches du tissu adipeux (Merceron, Vinatier et al. 2008; Vinatier, Mrugala et al. 2009; Merceron, Portron et al. 2012).

Les PAMs (« pharmacologically active microcarriers ») représentent un autre exemple de biomatériaux intéressants pour l'ingénierie tissulaire (Karam, Muscari et al. 2012). Ces microparticules polymériques offrent un support aux cellules souches qui peuvent s'y fixer. De plus, ces polymères sont biodégradables et peuvent contenir un facteur spécifiquement favorable à la régénération d'un tissu, tel un facteur de croissance comme VEGF (Musilli, Karam et al. 2012), ou un facteur de différenciation comme TGF $\beta$  (Bouffi, Thomas et al. 2010) (Figure 26).



**Figure 26 : Principe des PAMs.** Ces microparticules sont entourées par un revêtement mimant la matrice extracellulaire (laminine ou fibronectine), permettant aux cellules souches de se fixer via des molécules d'adhésion cellulaire, les intégrines, qui sont reliées aux filaments d'actine et de myosine, lesquels permettent l'organisation du cytosquelette. Les cellules se retrouvent alors en contact les unes aux autres, pouvant ainsi communiquer entre elles (jonctions intercellulaires type « gap junctions », connexines). En plus des facteurs de croissance sécrétés par les cellules elles-mêmes, des facteurs de croissance et de différenciation peuvent être empaquetés à l'intérieur des PAMs et libérés lors de leur biodégradation, favorisant ainsi la survie des cellules et leur différenciation. Abréviations : PAM, « pharmacologically active microcarrier » ; ECM, « extracellular matrix » ; GF, « growth factor ». Reproduit de (Karam, Muscari et al. 2012).

Mais alors qu'il paraît nécessaire de recréer un environnement propice, nous verrons dans le troisième chapitre que les ASCs semblent capables de synthétiser des éléments de MEC favorables à la régénération des tendons.

Outre leur fonction dans l'auto-renouvellement et dans la différenciation des cellules (balance entre quiescence, prolifération et différenciation), les niches ont également un rôle dans l'ancrage (ou l'adhésion) et la migration des CSM.

D'une part, les contacts cellule-cellule et cellule-MEC sont indispensables. Les jonctions intercellulaires sont formées par des protéines transmembranaires, les cadhérines, et l'ancrage des cellules à la MEC (membrane basale) est assuré par des intégrines (Raymond, Deugnier et al. 2009).

D'autre part, les CSM, dont les ASCs, sont en effet capables de migrer vers le site de lésion et de s'y installer. Ce phénomène est appelé « homing » (« domiciliation ») et représente encore une autre capacité des cellules souches qui répondent et s'adaptent à leur environnement, pour finalement se sentir « comme chez elles ».

De nombreuses études ont montré que les CSM sont capables de migrer vers un site de lésion via la circulation sanguine, en réponse à des signaux régulés positivement (« up-régulés ») dans des conditions pathologiques (Chamberlain, Fox et al. 2007; Augello, Kurth et al. 2010). Les cytokines chimio-attractantes (les chimiokines) et leurs récepteurs sont impliqués dans le recrutement des cellules souches au niveau du tissu lésé.

Mais ce phénomène est encore mal compris et il reste des questions en suspens, notamment concernant la diapédèse\* à travers la couche de cellules endothéliales : comment les CSM font-elles pour passer dans la circulation sanguine et retraverser pour arriver au site de lésion ? Pour expliquer cela, certains se sont basés sur la migration des leucocytes dans la circulation sanguine pour atteindre un site d'inflammation : ceux-ci « roulent » sur la paroi vasculaire (phénomène de « rolling » le long de l'endothélium), guidés par des chimiokines à la surface des cellules endothéliales, puis passent entre ces cellules pour sortir des vaisseaux sanguins (Chamberlain, Fox et al. 2007).

Parmi les chimiokines probablement impliquées dans la migration des ASCs, le couple SDF-1 (« Stromal cell-Derived Factor-1 ») et son récepteur CXCR4 (« C-X-C chemokine receptor type 4 ») est connu pour jouer un rôle crucial dans la migration et le « homing » des cellules

souches de la moelle osseuse. L'expression de SDF-1 est augmentée dans les sites de lésion et sert de facteur chimiotactique puissant, permettant le recrutement des CSM qui expriment le récepteur CXCR4 (Bobis-Wozowicz, Miekus et al. 2011).

Des études portant sur l'infusion systémique (injection intraveineuse) de BMSCs ont d'ailleurs montré que ces cellules ciblent le tissu lésé (tissu ischémique) via SDF-1 et CXCR4 (Bobis-Wozowicz, Miekus et al. 2011). D'autres cellules expriment ce type de récepteur à leur surface, comme les cellules souches rénales qui expriment les récepteurs CXCR4 et CXCR7 (Mazzeinghi, Ronconi et al. 2008).

Les ASCs ont également fait l'objet d'études pour vérifier leur potentiel de migration. Alors que de nombreuses études ont rapporté l'efficacité de l'injection systémique de BMSCs, ces cellules étant notamment capables de migrer via la circulation sanguine vers une zone du cœur ayant subi un infarctus (Saito, Kuang et al. 2002), les ASCs ont elles aussi montré leur potentiel lorsqu'elles sont administrées de manière systémique. Une étude récente montre par exemple la capacité des ASCs à cibler le tissu endommagé de la muqueuse nasale lorsqu'elles sont injectées en intraveineuse dans un modèle animal de rhinite allergique (Cho, Park et al. 2009).

En fonction de divers facteurs de croissance et de chimiokines, les ASCs ont en effet révélées leur capacité à migrer et expriment divers récepteurs aux chimiokines, dont CCR1 (« C-C chemokine receptor type 1 »), CCR7, CXCR4, CXCR5, CXCR6, ainsi que des récepteurs aux facteurs de croissance EGF, FGF, TGF- $\beta$ , TNF $\alpha$ , et PDGF (Baek, Kang et al. 2011).

En « jouant » sur ces différentes molécules, une modulation *in vitro* de cette capacité de « homing » pourrait favoriser le potentiel thérapeutique des ASCs injectés en intraveineuse, en stimulant leur migration vers le site de lésion (Wagner, Kean et al. 2009).

### **2.6.2. Protection des cellules contre les agressions liées au prélèvement et à la purification des cellules**

Au vu de ce large aperçu sur les cellules souches, en particulier les cellules souches du tissu adipeux, on peut mieux comprendre comment les greffes de tissu adipeux peuvent être bénéfiques en chirurgie esthétique.

Les ASCs tiennent un rôle majeur dans la régénération tissulaire, et il en est certainement de même en chirurgie esthétique où un nouveau concept émerge, considérant un rôle important des ASCs dans la survie du greffon. Bien que cela n'ait pas encore fait l'objet de preuve

tangible, de plus en plus d'études s'intéressent aux cellules souches contenues dans le tissu adipeux, dans le contexte de la chirurgie esthétique (Yoshimura, Eto et al. 2011).

Dans le cadre des transferts de graisse autologue, rappelons que le tissu adipeux est en effet une niche de cellules souches qui exercent des effets trophiques, interagissant avec leur microenvironnement et favorisant la régénération tissulaire. De plus, les ASCs participent à la néovascularisation et à la différenciation adipocytaire, favorisant ainsi la survie des greffes de tissu adipeux (Yoshimura, Eto et al. 2011).

Pour toutes ces raisons, il est indispensable d'assurer la survie de ces cellules lors des procédés de purification du tissu adipeux, en vue de leur réinjection.

De nombreuses controverses sur la méthode de prélèvement du tissu adipeux, sa manipulation, son utilisation ainsi que la survie cellulaire et l'efficacité thérapeutique subsistent encore aujourd'hui.

En complément de notre précédente étude sur le procédé MICROFILL<sup>®</sup> (Hoareau *et al.* 2012), nous nous sommes intéressés aux drogues utilisées lors du prélèvement du tissu adipeux par lipoaspiration.

Rappelons en effet qu'une solution tumescence est généralement utilisée pour faciliter le prélèvement, fournissant une anesthésie locale et une vasoconstriction pour éviter les saignements. Dans l'intérêt d'assurer la survie cellulaire, nous nous sommes donc intéressés à ces molécules et avons vérifié leur impact sur les cellules souches du tissu adipeux.

Parmi les anesthésiques locaux, le plus couramment utilisé est la lidocaïne. Cet anesthésique est en effet efficace assez rapidement et pour une courte durée d'action, suffisant donc pour une lipoaspiration. L'adrénaline est un vasoconstricteur également très utilisé, permettant en plus d'augmenter l'efficacité de la lidocaïne (cf. chapitre 1). Les effets de ces deux molécules, seules ou combinées, a ainsi été analysé dans l'article suivant : « **NEW INSIGHT IN LIDOCAINE AND ADRENALINE EFFECTS ON HUMAN ADIPOSE STEM CELLS** » (Girard *et al.*, 2012).

La cytotoxicité et l'inflammation ont été étudiées après traitement des ADSCs en culture primaire. Aucun passage n'a été effectué et les cellules sont traitées 4 jours seulement après leur mise en culture. Différentes concentrations cliniques de lidocaïne ont été testées, en complément ou non d'adrénaline.



**NEW INSIGHT IN LIDOCAINE AND ADRENALINE EFFECTS ON HUMAN  
ADIPOSE STEM CELLS**

**Anne-Claire Girard<sup>a◇\*</sup>, Michael Atlan<sup>b\*</sup>, Karima Bencharif<sup>a◇</sup>, Manoj kumar  
Gunasekaran<sup>◇</sup>, Pierre Delarue<sup>c</sup>, Olivier Hulard<sup>d</sup>, Christian Lefebvre-d'Hellencourt<sup>◇</sup>,  
Regis Roche<sup>a◇</sup>, Laurence Hoareau<sup>a◇\*</sup>, Franck Festy<sup>a◇\*</sup>**

**Aesthetic Plast Surg (2012)**

<sup>a</sup>ADIP'sculpt company, Reunion Island, France

<sup>◇</sup>Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO), Plateforme CYROI,  
Université de la Réunion, France

<sup>b</sup>Centre hospitalier Général de Pontoise/René Dubos, Inserm 698, France.

<sup>c</sup>Delarue cosmetic surgery office, Clinifutur, Reunion island, France

<sup>d</sup>Hulard cosmetic surgery office, Clinifutur, Reunion island, France

\*ACG and MA, LH and FF contributed equally to this work.

# New Insights into Lidocaine and Adrenaline Effects on Human Adipose Stem Cells

Anne-Claire Girard · Michael Atlan · Karima Bencharif · Manoj Kumar Gunasekaran · Pierre Delarue · Olivier Hulard · Christian Lefebvre-d'Hellencourt · Regis Roche · Laurence Hoareau · Franck Festy



Received: 22 June 2012 / Accepted: 20 August 2012  
© Springer Science+Business Media New York and International Society of Aesthetic Plastic Surgery 2012

## Abstract

**Background** Adipose stem cells have gained great interest in plastic and reconstructive surgery with their ability to improve engraftment after fat transfer for soft tissue filling. It is therefore essential to know the effect of the drugs commonly used during the lipoaspiration procedure, such as lidocaine and adrenaline. Indeed, these drugs are infiltrated at the fat donor site for local anesthesia and for reduction of bleeding. This study analyzed the effects of these drugs on the viability of adipose-derived stem cells and on their inflammatory status.

**Methods** Adipose-derived stem cells from lipoaspirates were grown in culture before being treated with different clinical doses of lidocaine at different times of exposure (1–24 h), and with adrenaline (1 µg/mL). Cytotoxicity was measured by lactate dehydrogenase assay and by flow cytometry with annexin V/propidium iodide staining. In parallel, the secretion of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was tested by enzyme-linked immunoassay.

**Results** Lidocaine affected cell viability after 24 h, even when the cells were exposed for only 1 or 2 h. Apoptosis was not involved in lidocaine cytotoxicity. Regarding inflammation, no TNF $\alpha$  was produced, and lidocaine decreased the levels of IL-6 and MCP-1 in a dose-dependent manner. In contrast, adrenaline did not influence cell viability or cytokine secretions.

**Conclusions** Adipose tissue should be handled appropriately to remove lidocaine and adrenaline, with such procedures as washing and centrifugation. This study provides new insights into the use of lidocaine and adrenaline for fat transfer or stem cell isolation from lipoaspirates.

**Level of Evidence II** This journal requires that authors assign a level of evidence to each article. For a full description of these Evidence-Based Medicine ratings, please refer to the Table of Contents or the online Instructions to Authors [www.springer.com/00266](http://www.springer.com/00266).

Anne-Claire Girard, Michael Atlan, Laurence Hoareau, Franck Festy contributed equally to this work.

A.-C. Girard (✉) · K. Bencharif · R. Roche · L. Hoareau · F. Festy  
ADIP<sup>3</sup>sculpt, Plateforme CYROI, 2 rue Maxime Rivière,  
Sainte Clotilde 97490, Reunion Island, France  
e-mail: ac.girard@adipsculpt.com

A.-C. Girard · K. Bencharif · M. K. Gunasekaran · C. Lefebvre-d'Hellencourt · R. Roche · L. Hoareau · F. Festy  
Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO), Plateforme CYROI, Université de la Réunion, Saint-Denis de la Réunion, France

M. Atlan  
Centre Hospitalier Général de Pontoise/René Dubos, Inserm 698, France

P. Delarue  
Clinique Saint Vincent, Groupe Clinifutur, Reunion Island, France

O. Hulard  
Clinique Les Orchidées, Groupe Clinifutur, Reunion Island, France

**Keywords** Adipose stem cells · Adrenaline · Fat grafting · Lidocaine · Lipoaspiration

## Introduction

For many years, adipose tissue has been used in autologous fat grafting for soft tissue filling. Fat grafting represents a

method of choice for various clinical applications such as facial rejuvenation and reconstruction, scar correction, breast augmentation and reconstruction, and treatment after radiation therapy [1]. Moreover, adipose tissue provides a great source of stem cells, which have been shown to have powerful potential for regenerative medicine [2, 3].

In recent years, a growing interest in adipose stem cells has emerged in plastic and reconstructive surgery. Indeed, surgeons attach increasing importance to the presence of these stem cells in fat grafts [4–6], and they even endeavor to enrich lipotransfers with adipose stem cells [7–9]. Adipose stem cells are reported to play an important role in the take and survival of fat grafts, allowing neovascularization and modulating the local inflammatory response [10, 11].

For all these reasons, it is important to focus on the way to harvest adipose tissue, and this report focuses particular attention on the procedure of infiltration before liposuction, which conditions the status of stem cells.

Lidocaine and adrenaline are commonly used during liposuction. They are infiltrated in a tumescent solution at the fat donor site to ensure the patient's comfort. As findings have already shown, lidocaine is a good local anesthetic compared with others [12]. Initially, this drug was known to inhibit sodium voltage-dependent channels in nerve cells [13], thus preventing nervous signal conduction and avoiding peri- and postoperative pain for patients undergoing local anesthesia. On the other hand, adrenaline is used to reduce bleeding during liposuction, producing vasoconstriction in subcutaneous fat, which also contributes to prolonging lidocaine action by decreasing its clearance [14].

The effects of the two aforementioned molecules, alone or combined, are not well known, especially concerning adipose stem cells. It has already been reported that lidocaine can impair cell growth and affect cell viability in various cell types, including human fibroblasts [15], chondrocytes [16, 17] and myoblast cells [12]. Only a few studies have tried to highlight the effect of these drugs on the viability of adipose tissue, and the results are controversial [18–21]. Moreover, apoptosis is suggested to be one of the mechanisms underlying lidocaine-induced cytotoxicity [22], but the results also remain controversial [23].

In addition, it seems that inflammation also is able to influence engraftment [24]. Tissue inflammation could be deleterious for the graft, considering that inflamed cells can secrete proinflammatory cytokines that contribute to macrophage infiltration, which could finally lead to graft damage [24].

It is therefore essential to know the effect of these two drugs, widely used by medical practitioners, on the viability and the inflammatory status of stem cells. Thus, this study analyzed the effect of these two drugs on adipose stem cell viability and on their inflammatory status.

## Materials and Methods

### Origin of Adipose Tissue Samples

Subcutaneous (abdominal, buttocks, hips, and thighs) tissue samples of human white fat were obtained from normal weight or slightly overweight human subjects (females ages 34–59 years, mean age 45 years, with a mean body mass index of 23.6 kg/m<sup>2</sup>) treated with liposuction for cosmetic reasons while under general anesthesia. Except for oral contraception, the subjects were not receiving treatment with prescribed medication at the time of liposuction.

All the experiments were performed with samples obtained from at least three different patients, and each sample was tested in six replicates. The study was approved by the Ile de la Réunion ethics committee for the protection of individuals participating in biomedical research.

### Purification of the Stromal Vascular Fraction and Cell Culture

The total procedure has already been described [25]. Briefly, tissue samples obtained by liposuction were digested for 1 h at 37 °C with collagenase (NB4; Serva, Heidelberg, Germany). Digested tissue then was centrifuged at 900 g for 4 min, and the cell pellet (stromal vascular fraction) was washed three times, then filtered through Steriflip 100 µm (Millipore, Molsheim, France).

After centrifugation, cells were resuspended in M199 medium (PAN Biotech, Aidenbach, Germany). Cell number and viability were assessed by Trypan blue dye exclusion (Trypan solution 0.4 %; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The isolated cells had already been analyzed by flow cytometry to assess the phenotypic characteristics of the adipose stem cells [26].

Approximately 300,000 cells/cm<sup>2</sup> were plated in 24-well plates with M199 containing L-glutamine, glucose (2 g/L), amphotericin B (10 mg/mL), streptomycin (0.4 mg/mL), and penicillin (400 U/mL) (PAN Biotech) with 20 % fetal bovine serum (FBS) (PAN Biotech). The cells then were cultured for proliferation in medium with 10 % FBS at 37 °C in 5 % carbon dioxide before the experiments.

### Drug Treatment

Adipose-derived stem cells (ADSCs) were kept only in primary culture without any passage, and when they reached 80 % confluence (after 4 days of culture), the cells were treated with different clinical concentrations of lidocaine together with the same culture medium [1.7 mmol

(0.4 mg/mL), 3.4 mmol (0.8 mg/mL), 6.8 mmol (1.6 mg/mL)] and for different times of exposure (1, 2, 4, 12, and 24 h). The same conditions were used in combination with adrenaline at 1 µg/mL (1:1,000,000), and adrenaline alone also was tested. Nontreated cells were used as the control cells for each time of exposure.

For experiments involving drug washout (after 1 and 2 h of treatment), the medium containing lidocaine, adrenaline, or both was removed, and the cells were rinsed twice, then incubated with fresh culture medium for 24 h. The control cells also were rinsed and incubated with fresh medium. The pH (~8) of each treatment medium had been verified to ensure that the only parameters capable of variation were the concentration of the drugs and the time of treatment. No significant difference in terms of pH could be noted.

#### Microscopic Observations

The ADSCs were observed under phase contrast microscopy (Nikon Eclipse TS100), and photomicrographs were taken using a digital camera (Nikon Coolpix P5100) to highlight cell density changes (Nikon, Champigny sur Marne, France).

#### Detection of Cytotoxicity by Lactate Dehydrogenase Assay

Lactate dehydrogenase (LDH) is a cytosolic enzyme released in culture media when the cell membrane is damaged and thus is a good indicator of cytotoxicity. The release of LDH in the media was measured using the LDH Cytotoxicity Assay Kit from ScienCell (Cliniscience, Montrouge, France) according to the manufacturer's instructions. Enzymatic measurements of LDH release were spectrophotometrically performed at 490 nm. As a positive control for death, 1 % TritonX-100 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used. Absorbance values then were correlated with the number of viable cells to quantify cytotoxicity.

#### Flow Cytometry Analysis with Annexin V and Propidium Iodide Staining

After treatment, cells were collected ( $\sim 5 \times 10^5$  cells) and incubated for 15 min with 10 µL of annexin V-FITC in 100 µL of binding buffer from the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit Plus (BioVision, Cliniscience, Montrouge, France) and for 5 min with 2.5 µg/mL of propidium iodide (Santa Cruz; Cliniscience). Stained cells were analyzed by flow cytometry using FC-500 and MXP software (Beckman Coulter, Villepinte, France). The collected data then were analyzed with FlowJo software, version 7.6.5, for Microsoft (TreeStar, San Carlos, CA).

#### Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and Monocyte Chemotactic Protein Secretion by Enzyme-Linked Immunoassay

After lidocaine and adrenaline treatments, media from ADSCs were assayed for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) content with Ready-SET-Go human enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits (eBioscience; Cliniscience) according to the manufacturer's instructions. The ELISA sensitivity was 4 pg/mL for TNF $\alpha$ , 2 pg/mL for IL-6, and 7 pg/mL for MCP-1. The ratio of cytokine secretion was determined by the quantity of cytokine from each condition related to that from negative control subjects.

#### Statistical Analysis

Data were analyzed via Student's *t* test for two-group comparisons (ELISA) or by an analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's *t* test for comparisons of multiple doses or times (JMP; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Statistical significance was set at a *p* value lower than 0.05. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

## Results

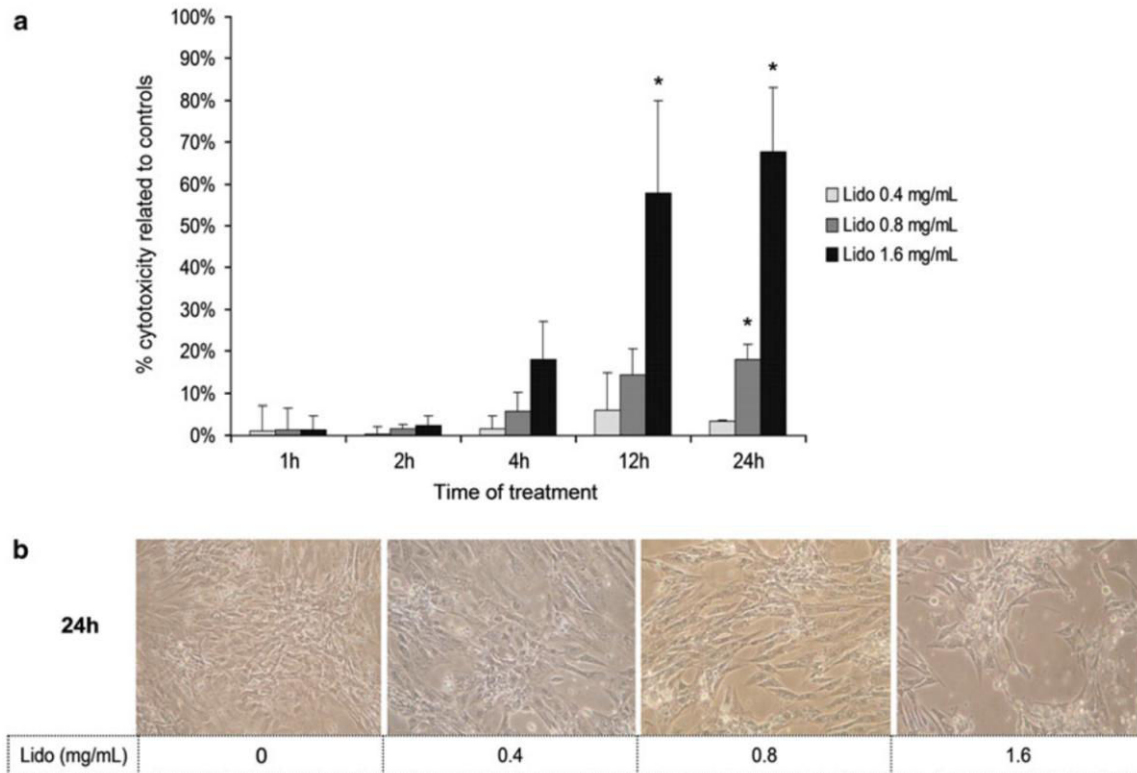
#### Effect of Lidocaine on Adipose Stem Cell Viability

Lidocaine treatment was followed by LDH assays to measure cytotoxicity. After 1 and 2 h of treatment, lidocaine did not affect cell viability (Fig. 1a). Cytotoxicity started to increase after 4 h of treatment, but the results were not significant (Fig. 1a). At 12 and 24 h of treatment, cytotoxicity increased with the increasing dose of lidocaine, up to 70 % for the highest dose (1.6 mg/mL) at 24 h. Thus, lidocaine induced cytotoxicity in a dose- and time-dependent manner but not for short exposures (<2 h).

This is consistent with microscopic observations showing that cell density changes depend on the dose of lidocaine and the time of exposure. Indeed, whereas control cells grew vigorously, ADSCs rounded with the highest concentration of lidocaine (1.6 mg/mL) and lost their adherence to the plastic plates after an increased time of exposure. Finally, cell density was markedly lower at 24 h of treatment (Fig. 1b).

#### Effect of Adrenaline on Adipose Stem Cell Viability

At 24 h of lidocaine treatment, cells were co-treated with adrenaline at 1 µg/mL. Figure 2 shows that adrenaline alone was not deleterious for the cells after 24 h of treatment because the level of cytotoxicity was the same as the



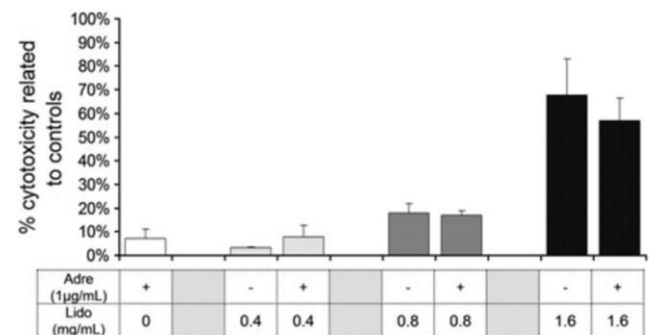
**Fig. 1** Cytotoxicity measurement of adipose-derived stem cells (ADSCs) after lidocaine treatment. The ADSCs were treated with different concentrations of lidocaine (Lido) up to 24 h after treatment. **a** Cytotoxicity determined by lactate dehydrogenase (LDH) assay. A blank (no treatment control) and a positive control of death (treatment with 1 % Triton X-100) were included in all the assays. Cell death is

shown relative to that of the untreated sample (0 %) and the positive control condition (set to 100 %). The graph shows the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the results from four patients ( $n = 6$  for each condition for each patient). \* $P < 0.05$  versus control cells. **b** Representative photos of nontreated ADSCs versus ADSCs treated with lidocaine after 24 h (magnification  $\times 100$ )

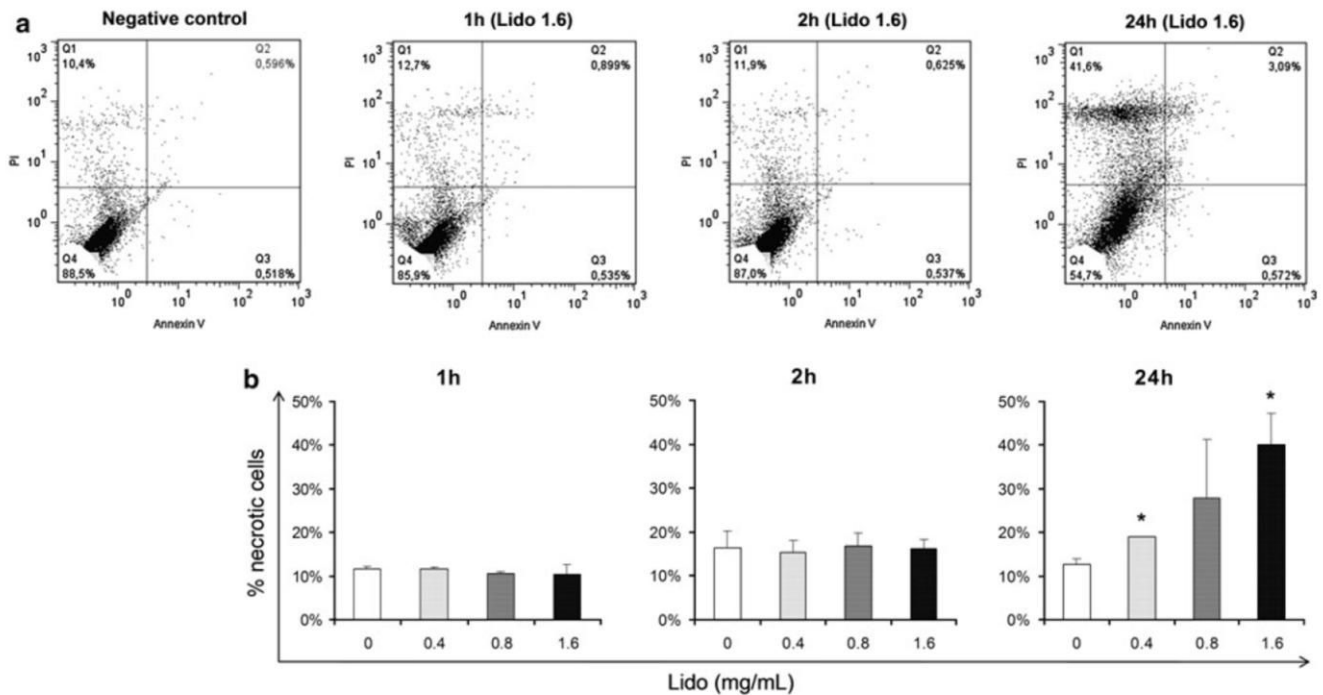
basal level related to nontreated cells (data not shown). Moreover, when combined with lidocaine, adrenaline also did not affect cell viability, whatever the lidocaine dose used (Fig. 2). Indeed, the results did not differ from those obtained with lidocaine alone (Fig. 2). Thus, we can conclude that only lidocaine had a harmful effect on ADSCs after extended exposure.

**Apoptosis Analysis with Annexin V and Propidium Iodide Staining**

We next investigated whether lidocaine could induce apoptosis. Flow cytometry analysis showed very low levels of annexin V positive staining corresponding with basal apoptosis ( $\sim 1\%$ ) (Fig. 3a). No significant differences were shown between lidocaine-treated cells and nontreated cells, even after longer exposure (24 h). Moreover, we could not detect any increase in propidium iodide staining between treated and nontreated cells for the first 2 h after treatment, which confirmed the LDH results.



**Fig. 2** Cytotoxicity after 24 h of treatments with or without adrenaline. ADSCs were treated for 24 h with adrenaline 1  $\mu$ g/mL alone (Adre) or in association with different concentrations of lidocaine (Lido). The previous results of cytotoxicity induced by lidocaine alone after 24 h are reported to compare the conditions Lido and Adre + Lido. A blank (no treatment control) and a positive control of death (treatment with 1 % Triton X-100) were included in all LDH assays. Cell death is shown relative to that of the untreated sample (0 %) and the positive control condition (set to 100 %). The graph shows the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the results for three patients ( $n = 6$  for each condition for each patient)



**Fig. 3** Annexin V/propidium iodide (PI) staining after treatment. ADSCs were treated with different concentrations of lidocaine (Lido) and adrenaline for 1, 2, and 24 h before being subjected to annexinV/PI staining. **a** Typical dot plots of one in three independent experiments (from 3 patients) showing lidocaine treatment (1.6 mg/mL). Quadrants Q1, Q2, Q3, and Q4 correspond to necrotic cells, late apoptotic cells, early apoptotic cells, and viable cells,

respectively. No statistical significance was detected in the comparison of lidocaine alone and lidocaine with adrenaline. **b** Summary of annexin V-negative and PI-positive staining (necrotic cells) corresponding to each period of lidocaine treatment. The graph shows the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the results for three patients. \* $P < 0.05$  versus control cells

However, propidium iodide staining increased significantly at 24 h of treatment and with increasing doses of lidocaine (Fig. 3). Thus, lidocaine could induce necrosis but no early or late apoptosis. Treatments with adrenaline alone or combined with lidocaine led to the same results: Adrenaline did not influence annexin V or propidium iodide staining (data not shown).

#### Time of Cytotoxicity Induction after Treatments

Figures 1 and 3 showed no cytotoxic effect of lidocaine with short exposure (1–2 h). Nevertheless, cytotoxicity might be delayed by complex mechanisms that occur within the cells, which could be shown a long time after drug exposure. To be sure that lidocaine or adrenaline did not induce a delayed cytotoxic effect, cells were treated for 1 or 2 h, then washed and cultured for an additional period of 24 h before being tested for cytotoxicity.

As shown in Fig. 4a, cell death did not exceed 3 %, except at the highest lidocaine concentration, which led to about 10 % cytotoxicity. These data were much lower compared with 24-h treatment results but were higher than the results obtained directly after 1–2 h of exposure.

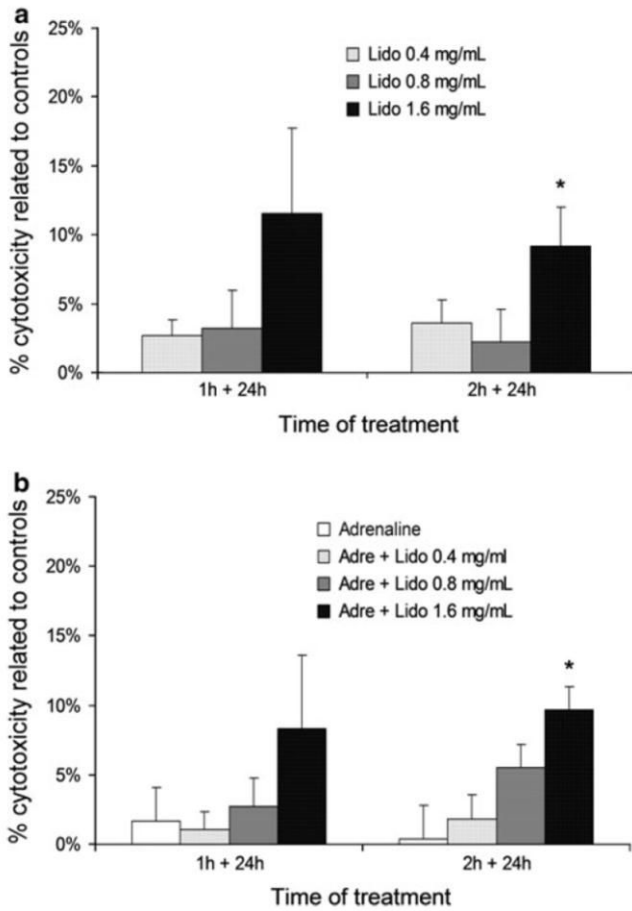
In the same way, we could not detect any cytotoxic effect of adrenaline (<5 %), even when it was combined

with the highest dose of lidocaine. Indeed, we could reach the same rate of cell death (8–10 %) as with lidocaine alone (Fig. 4b). Finally, washout experiments demonstrated that lidocaine could affect ADSCs even after 1- or 2-h treatments, especially at a high concentration.

#### Study of Inflammation

To determine whether lidocaine and adrenaline could promote inflammation, the proinflammatory cytokines (IL-6, TNF $\alpha$ , and MCP-1) were quantified in the media by ELISA after 1–2 h of treatment, times for which no cytotoxicity were measured. Regarding TNF $\alpha$ , whatever the dose of lidocaine, whether combined with adrenaline or not, and whatever the time of exposure, we could not detect any secretion in either treated or nontreated cells (data not shown).

Concerning IL-6, levels of secretion decreased in cells treated with lidocaine (Fig. 5a), from 20 % with the lowest dose of lidocaine (0.4 mg/mL) to as much as 30 % with the highest dose (1.6 mg/mL) after 1 h, and even more after 2 h, with the decrease reaching 50 % compared with control cells. When combined with adrenaline, the lidocaine had the same effect. This decrease did not seem to persist after longer exposure (24 h, data not shown).



**Fig. 4** Washout experiments after treatments. Cytotoxicity was determined by LDH assay. **a** Washout experiment after lidocaine treatment. The cells were washed after treatment for 1 and 2 h with different concentrations of lidocaine (0.4, 0.8, and 1.6 mg/mL). **b** Washout experiment after adrenaline treatments. The cells were washed after treatment with adrenaline 1 µg/mL alone or in association with the same different concentrations of lidocaine. The times 1 + 24 h and 2 + 24 h represent the washout experiments after 1- and 2-h treatments. The graph shows the mean ± standard error of the mean (SEM) of the results for three patients ( $n = 6$  for each condition for each patient). \* $P < 0.05$  versus control cells

We obtained the same pattern with MCP-1 levels, as shown in Fig. 5b, with significantly decreased secretion in lidocaine-treated cells (from 20 % for the lowest dose to 40 % for the highest dose, for both 1 and 2 h of treatment), whereas adrenaline still did not have any influence on the secretion of this cytokine. From this result, we conclude that lidocaine was able to decrease IL-6 and MCP-1 secretion in a dose-dependent manner, whereas adrenaline did not affect this effect.

**Discussion**

Only a few studies exist on the conditions of adipose tissue collection, and it is important to know the best way to proceed when adipose tissue is aimed at reconstructive or

regenerative medicine to preserve adipose stem cells and thus to improve the viability and the quality of the grafts. The tumescent technique for lipoaspiration is widely used, but the concentration of the drugs infiltrated at the fat donor site may vary between surgeons.

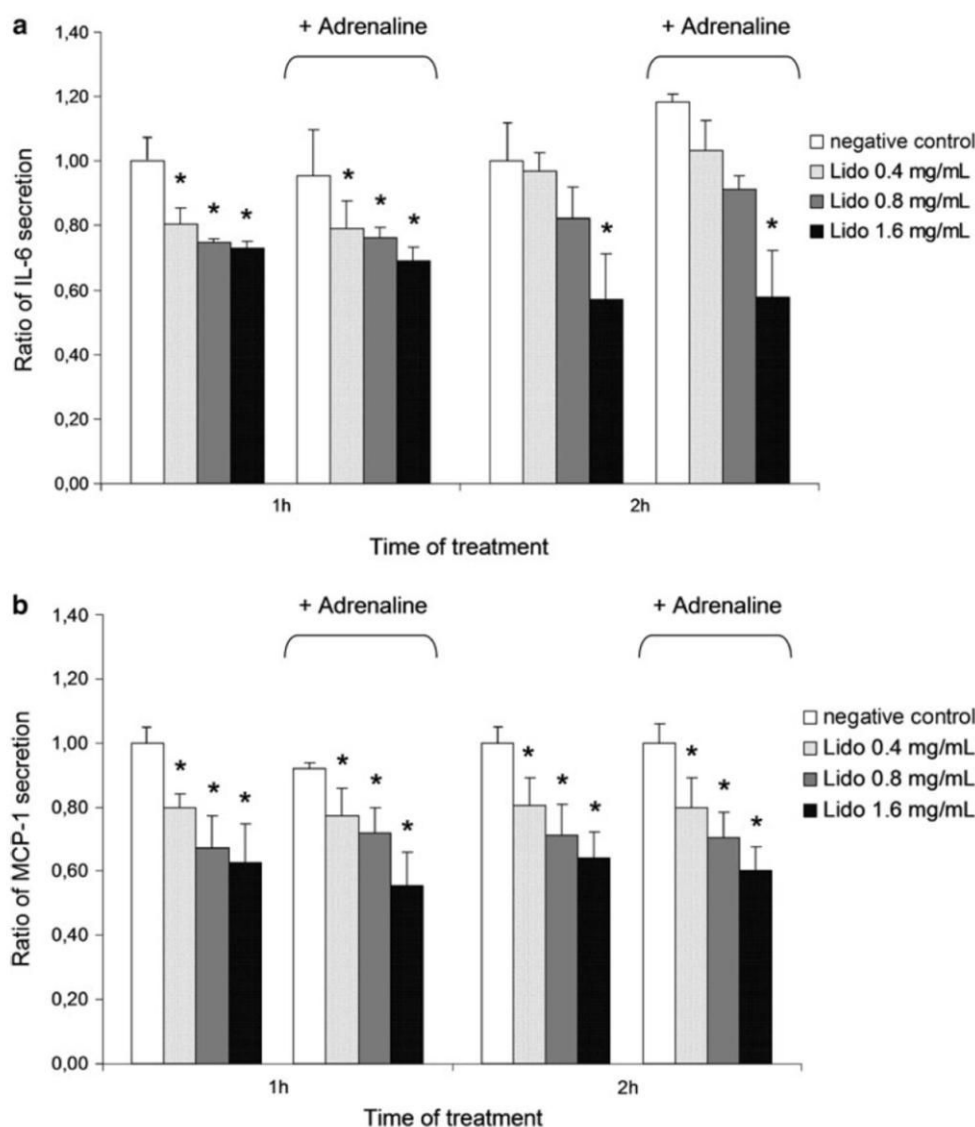
This study confirmed that lidocaine is an attractive local anesthetic for the lipoaspiration procedure before autologous fat grafting or stem cell therapy [27]. Indeed, consistent with our previous results [27], lidocaine caused cytotoxicity but not apoptosis in a time- and dose-dependent manner but did not directly affect ADSC viability at low concentrations or for short exposures (<2 h), even when combined with 1 µg/mL of adrenaline.

Studies by Keck et al. [20, 21] drew the same conclusion regarding lidocaine-induced cytotoxicity, and we also reinforce their idea because lidocaine does not convincingly seem to induce apoptosis in adipose stem cells [23]. However, these authors found that lidocaine influenced cell death in preadipocytes after only 30 min of treatment. The difference with our results regarding the time of exposure may reside in the protocol of the treatment, which included much higher drug concentrations. Indeed, compared with those we used in our study, they used doses 6-fold higher (comparing their lidocaine 1 % with our 1.6 mg/mL) to 50-fold higher (comparing their lidocaine 2 % with our 0.4 mg/mL).

Another major issue raised in this study concerns the steps of washing adipose tissue before its use. Washing seems to be good for improving cell survival, but even with just 1 h of lidocaine exposure, we could see deleterious effects after 24 h, which is not insignificant. The washing step greatly reduced the rate of death, but we cannot exclude the delayed effect with just 1 h of exposure. It is therefore better to minimize the contact of the cells with drugs. This result supports earlier findings, including the study of Moore et al. [28], in which lidocaine could alter adipocyte metabolism and growth in isolated adipocytes, whereas the cells finally were able to regain their function after being washed. Moreover, knowing that the grafts can be injected into a recipient site that also is under local anesthesia, it should be better to remove most of the residual drugs present in lipoaspirates to avoid drug accumulation inside the grafts as well as deleterious effects.

Thus, in the context of autologous fat grafting, one simple method for rescuing adipose stem cells from cell death could be washing. This step also could include steps of centrifugation to improve drug removal from the tissue. On the contrary, we have already demonstrated in an other study that decantation leads to the worst results in terms of grafting because tissue decantation may increase the time of exposure to drugs present in lipoaspirates [29].

Shoshani et al. [19] showed similar results when they centrifuged tissue before injection in nude mice. Indeed,



**Fig. 5** Ratio of interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) secretion by enzyme-linked assay (ELISA). The ELISA assays were performed to quantify **a** IL-6 and **b** MCP-1 in culture media after 1 and 2 h of lidocaine and adrenaline treatment. A blank (no treatment control) was included in all the assays. The ratio

of IL-6 or MCP-1 secretion was determined by the quantity of IL-6 or MCP-1 from each condition related to that from negative control conditions. The graphs show the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the results for three patients ( $n = 6$  for each condition for each patient). \* $P < 0.05$  versus control cells

they concluded that lidocaine and adrenaline did not have any influence on the take of fat grafts or adipocyte viability after lipotransfer in nude mice.

In accordance with our study, this centrifugation step may be essential to preserve the cells. Moreover, it already has been reported that appropriate centrifugation could enhance graft take by concentrating adipose stem cells in the adipose portion [30], and the widely used Coleman technique agrees with this idea [31].

Regarding inflammation, as previously described [32–34], lidocaine seems to have antiinflammatory properties. Indeed, we did not observe any secretion of  $\text{TNF}\alpha$ , so lidocaine and adrenaline did not induce inflammation with the concentrations tested.

Our data also demonstrated that lidocaine could significantly decrease IL-6 and MCP-1 secretion in the first 2 h of treatment. Because we did not detect any cytotoxic effect during these 2 h, it seems that lidocaine has a beneficial effect on the inflammatory process in ADSCs. Moreover, MCP-1 is involved in the recruitment and activation of peripheral blood monocytes, a key event during inflammation. This decrease of MCP-1 production may prevent the attraction of inflammatory cells to the inflamed area and thus may prevent tissue damage.

These findings should be considered. They are very interesting both for the patient, who can have fewer post-operative constraints such as edema, and for adipose tissue itself, which is in a way “maltreated” during lipoaspiration,



being easily inflamed. However, caution in the use of lidocaine is required because its antiinflammatory property is susceptible to increased infection in the case of gross bacterial contamination [32].

Concerning adrenaline, we have clearly shown that adrenaline has no effect at the concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Only lidocaine is involved in cytotoxicity and in inflammatory cytokine levels.

Finally, we must take into account all the aspects of this study to find a good compromise for the use of these drugs during infiltration performed before lipoaspiration. On one hand, several studies, including ours, show that lidocaine seems to exert antiinflammatory action on ADSCs with increasing doses, but on the other hand, cytotoxicity also increased gradually in a dose- and time-dependent manner. We therefore recommend that the lidocaine dose of 0.8 mg/mL not be exceeded. It also might be possible to use a lower dose of lidocaine for tumescent lipoaspiration because it is reported that the use of a high dose is unnecessary [35]. Moreover, to ensure the best efficiency, the time between tissue sampling and tissue or cell preparation should be minimized because we noted a delayed deleterious effect even after 1 h of exposure.

In conclusion, according to our results and our previous findings [29], it seems interesting to wash and centrifuge adipose tissue before fat injection or stem cell extraction. Obviously, these findings have implications for adipose stem cell harvest and also should be applied in regenerative medicine when adipose stem cells from lipoaspirates are used for tissue repair.

**Acknowledgments** This work has been financially supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, and by the University of Reunion Island. We are grateful to plastic surgeons Delarue P. and Hulard O. who took part in this study and allowed the collection of subcutaneous adipose tissue samples, to the group Clinifutur, to the entire team of the Biochemistry Department of the Félix Guyon Hospital, Reunion island, and to the French Ministry of National Education and Research and the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) for their financial support. Finally, we thank all the patients who consented to the collection of tissue samples and thus made this study possible.

## References

- Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA (2010) Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther* 1:19
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–228
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279–4295
- Coleman SR (2006) Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg* 118:108S–120S
- Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH (2006) Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 118:121S–128S
- Tabit CJ, Slack GC, Fan K, Wan DC, Bradley JP (2011) Fat grafting versus adipose-derived stem cell therapy: distinguishing indications, techniques, and outcomes. *Aesthetic Plast Surg* 36(3):704–713
- Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, Aiba-Kojima E, Iizuka F, Inoue K, Suga H, Yoshimura K (2006) Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 12:3375–3382
- Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K (2007) Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: Supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 32:48–55
- Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Harii K (2010) Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J* 16:169–175
- Zhu M, Zhou Z, Chen Y, Schreiber R, Ransom JT, Fraser JK, Hedrick MH, Pinkernell K, Kuo HC (2010) Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg* 64:222–228
- Tiryaki T, Findikli N, Tiryaki D (2011) Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: a preliminary report. *Aesthetic Plast Surg* 35: 965–971
- Maurice JM, Gan Y, Ma Fx, Chang YC, Hibner M, Huang Y (2010) Bupivacaine causes cytotoxicity in mouse C2C12 myoblast cells: involvement of ERK and Akt signaling pathways. *Acta Pharmacol Sinica* 31:493–500
- Cummins TR (2007) Setting up for the block: the mechanism underlying lidocaine's use-dependent inhibition of sodium channels. *J Physiol* 582(Pt 1):11
- Bernards CM, Kopacz DJ (1999) Effect of epinephrine on lidocaine clearance in vivo: a microdialysis study in humans. *Anesthesiology* 91:962–968
- Fedder C, Beck-Schimmer B, Aguirre J, Hasler M, Roth-Z'graggen B, Umer M, Kalberer S, Schlicker A, Votta-Velis G, Bonvini JM, Graetz K, Borgeat A (2010) In vitro exposure of human fibroblasts to local anaesthetics impairs cell growth. *Clin Exp Immunol* 162:280–288
- Grishko V, Xu M, Wilson G, Pearsall AW (2010) Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am* Vol 92:609–618
- Jacobs TF, Vansintjan PS, Roels N, Herregods SS, Verbruggen G, Herregods LL, Almqvist KF (2011) The effect of lidocaine on the viability of cultivated mature human cartilage cells: an in vitro study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19:1206–1213
- Large V, Reynisdottir S, Eleborg L, van Harmelen V, Strommer L, Arner P (1997) Lipolysis in human fat cells obtained under local and general anesthesia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21:78–82
- Shoshani O, Berger J, Fodor L, Ramon Y, Shupak A, Kehat I, Gilhar A, Ullmann Y (2005) The effect of lidocaine and adrenaline on the viability of injected adipose tissue: an experimental study in nude mice. *J Drugs Dermatol* 4:311–316
- Keck M, Janke J, Ueberreiter K (2009) Viability of preadipocytes in vitro: the influence of local anesthetics and pH. *Dermatol Surg* 35:1251–1257

21. Keck M, Zeyda M, Gollinger K, Burjak S, Kamolz LP, Frey M, Stulnig TM (2010) Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation into adipocytes. *Plast Reconstr Surg* 126:1500–1505
22. Boselli E, Duflo F, Debon R, Allaouchiche B, Chassard D, Thomas L, Portoukalian J (2003) The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine (table of contents). *Anesth Analg* 96:755–756
23. Keck M, Zeyda M, Burjak S, Kamolz LP, Selig H, Stulnig TM, Frey M (2012) Coenzyme q10 does not enhance preadipocyte viability in an in vitro lipotransfer model. *Aesthetic Plast Surg* 36:453–457
24. Bartynski J, Marion MS, Wang TD (1990) Histopathologic evaluation of adipose autografts in a rabbit ear model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 102:314–321
25. Murumalla R, Bencharif K, Gence L, Bhattacharya A, Tallet F, Gonthier MP, Petrosino S, di Marzo V, Cesari M, Hoareau L, Roche R (2011) Effect of the cannabinoid receptor-1 antagonist SR141716A on human adipocyte inflammatory profile and differentiation. *J Inflamm Lond* 8:33
26. Festy F, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Pequin AM, Gonthier MP, Munstun A, Hoarau JJ, Cesari M, Roche R (2005) Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes. *Histochem Cell Biol* 124:113–121
27. Girard AC, Loyher PL, Bencharif K, Balat M, Lefebvre d'Helencourt C, Delarue P, Hulard O, Roche R, Hoareau L, Festy F (2011) Lidocaine: an attractive local anesthetic for lipoaspiration procedure in stem cells regenerative medicine. Paper presented at the 2011 annual meeting of the international federation for adipose therapeutics and science, Miami Beach
28. Moore JH Jr, Kolaczynski JW, Morales LM, Considine RV, Pietrzkowski Z, Noto PF, Caro JF (1995) Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic Plast Surg* 19:335–339
29. Hoareau L, Bencharif K, Gence L, Girard AC, Delarue P, Hulard O, Festy F, Roche R (2012) Washing or centrifugating the fat? SICAAAMS 2012, Geneva
30. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, Yoshimura K (2008) Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg* 121:1033–1041 discussion 1042–1033
31. Coleman SR (1997) Facial recontouring with liposuction. *Clin Plast Surg* 24:347–367
32. Hollmann MW, Durieux ME (2000) Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology* 93:858–875
33. Li CY, Tsai CS, Hsu PC, Chueh SH, Wong CS, Ho ST (2003) Lidocaine attenuates monocyte chemoattractant protein-1 production and chemotaxis in human monocytes: possible mechanisms for its effect on inflammation. *Anesth Analg* 97:1312–1316
34. Wang HL, Zhang WH, Lei WF, Zhou CQ, Ye T (2011) The inhibitory effect of lidocaine on the release of high-mobility group box 1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Anesth Analg* 112:839–844
35. Boni R (2010) Tumescent liposuction: efficacy of a lower lidocaine dose (400 mg/l). *Dermatology* 220:223–225

Cette étude montre que la lidocaïne affecte la viabilité des ADSCs. Le lavage des cellules diminue significativement cette cytotoxicité, mais ne suffit pas non plus à l'éliminer complètement. En effet, malgré les lavages, les cellules traitées à la lidocaïne seulement 1h ou 2h montrent quand même des niveaux de mort cellulaire supérieurs (jusqu'à 10%) en comparaison avec les cellules non traitées. L'apoptose n'est pas impliquée dans ce phénomène.

Concernant l'inflammation, les taux de sécrétion dosés de TNF $\alpha$  ne sont pas détectables. Par contre, la lidocaïne diminue les taux sécrétoires d'IL-6 et de MCP-1. Ces cytokines étant connues pour leur activité pro-inflammatoire, MCP-1 participant notamment au recrutement des macrophages, on peut donc en conclure que la lidocaïne aurait un effet anti-inflammatoire. Cependant, nous ne sommes pas à l'abri que cette diminution soit liée à une diminution globale donc non spécifique de l'activité sécrétoire générale des cellules. Le dosage d'une protéine sécrétée de manière constitutive permettra de répondre à cette question (ceci est en cours d'investigation).

De son côté, l'adrénaline n'influence ni la viabilité cellulaire, ni la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires testées, même lorsqu'elle est combinée à la lidocaïne.

Afin de favoriser la survie cellulaire, un protocole de manipulation appropriée du tissu adipeux est donc recommandé de façon à éliminer la lidocaïne et l'adrénaline. Une fois le tissu prélevé par lipoaspiration, des étapes de lavages et de centrifugations douces peuvent aider à préserver les cellules (Hoareau *et al.* 2012). Cette étude fournit ainsi de nouvelles perspectives pour l'utilisation de la lidocaïne et de l'adrénaline dans le transfert de graisse ou pour l'isolement des cellules souches à partir de lipoaspirations.

En conclusion de cette étude, il est important de prendre en compte l'effet délétère que peuvent avoir les anesthésiques locaux sur les cellules souches du tissu adipeux. Ces anesthésiques peuvent en effet porter préjudice à la prise de greffe de tissu adipeux en chirurgie esthétique, ainsi qu'à la survie des cellules souches réinjectées dans le cadre de médecine régénérative.

Dans l'un ou l'autre cas de figure, la survie cellulaire est un enjeu primordial pour assurer de bons résultats thérapeutiques. Pour toutes leurs propriétés, comme leur activité trophique, les ASCs sont l'élément clé de la reconstruction ou régénération tissulaire.

Des études *in vivo* ont été menées sur un modèle murin afin de vérifier ces résultats sur la prise de greffe et la qualité du greffon lors de transfert de graisse autologue.

Aussi, il nous a paru intéressant de rechercher comment la lidocaïne pouvait affecter la viabilité cellulaire : quel mécanisme peut bien faire pencher la balance en faveur de la mort ou de la survie ?

Nous avons montré que l'apoptose n'était pas impliquée. Un autre phénomène a en revanche particulièrement attiré notre attention : la lidocaïne induit une vacuolation massive au sein des cellules.

Notre regard s'est alors porté sur un phénomène naturel connu pour assurer l'homéostasie cellulaire : l'autophagie.

## **2.7. L'autophagie : mécanisme de survie cellulaire ?**

### **2.7.1. L'autophagie : définition et description**

Dans les années 1960, peu après la découverte des lysosomes (1955), Christian De Duve met en évidence l'autophagie, une forme de dégradation lysosomale qu'il caractérise morphologiquement (De Duve and Wattiaux 1966; Klionsky 2007).

Désignant littéralement une forme d'auto-cannibalisme (du grec, « se manger soi-même »), l'autophagie est un mécanisme de dégradation intracellulaire qui permet de recycler le matériel cytoplasmique et d'éliminer les organites obsolètes (Yang and Klionsky 2010).

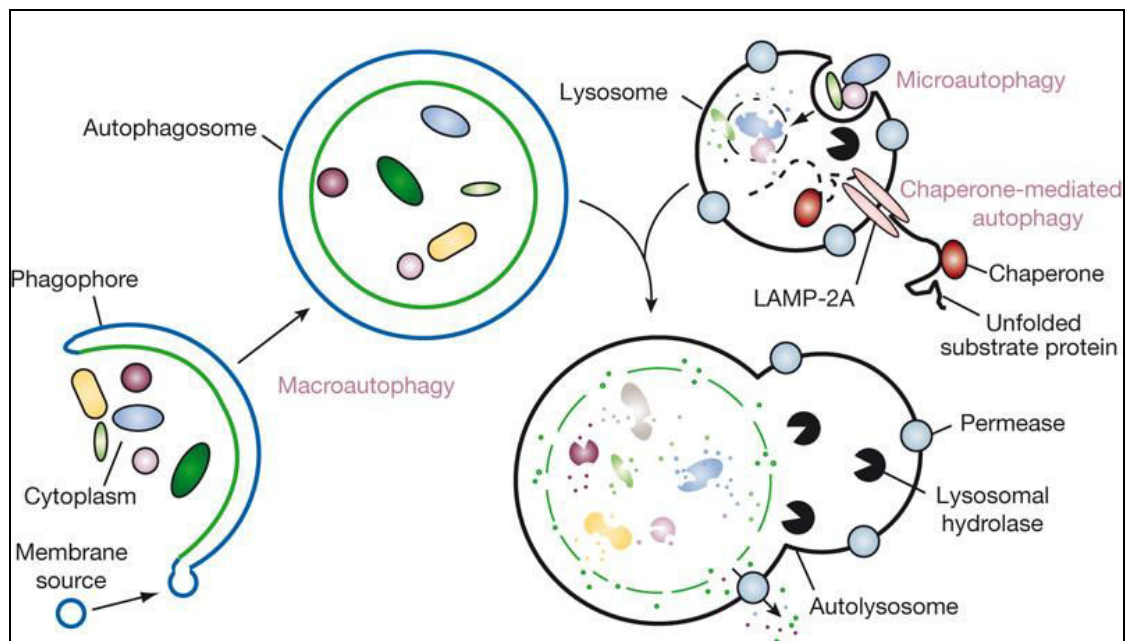
Plusieurs formes d'autophagie ont été décrites, lesquelles partagent le même destin de dégradation lysosomale mais impliquant un mécanisme différent (Yang and Klionsky 2010).

Les trois principales sont (Figure 27) :

- la macroautophagie, où des organites (comme des mitochondries) et des constituants du cytoplasme sont séquestrés dans une vésicule à double membrane, appelée autophagosome. Par la suite, l'autophagosome fusionne avec un endosome et/ou un lysosome, formant ainsi un autolysosome ou autophagolysosome. Cette dernière étape expose le contenu séquestré aux hydrolases lysosomales pour permettre sa dégradation. Les molécules qui en résultent traversent alors la membrane via des perméases et rejoignent le cytosol pour être réutilisées.

- la microautophagie, qui implique cette fois une absorption directe des constituants cytoplasmiques par le lysosome.
- l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes, qui permet la translocation directe dans le lysosome de protéines solubles, déroulées.

Dans le cadre de cette thèse, l'accent est mis sur la macroautophagie, ci-après dénommée autophagie.



**Figure 27 : Les principales formes d'autophagie.** Au cours de la **macroautophagie**, une double membrane se forme à partir de membranes existantes, constituant le phagophore, qui va encercler du contenu cytoplasmique. Le phagophore va subir une élongation pour former un autophagosome dans lequel la cargaison est séquestrée. L'autophagosome va alors fusionner avec un lysosome (ou un endosome), formant un autolysosome dans lequel le contenu séquestré est dégradé via des hydrolases lysosomales. Les molécules issues de cette dégradation peuvent alors traverser la membrane lysosomale via des perméases pour retourner dans le cytosol où elles seront réutilisées par la cellule. La **microautophagie** se réfère quant à elle à une séquestration directe dans le lysosome de composants cytoplasmiques qui entrent par invagination de la membrane lysosomale. **L'autophagie médiée par des protéines chaperonne** implique la translocation de protéines dans le lysosome via des protéines chaperonnes (hsp70) et via une glycoprotéine transmembranaire LAMP-2A (lysosomal-associated membrane protein type 2A). Reproduit de (Mizushima, Levine et al. 2008).

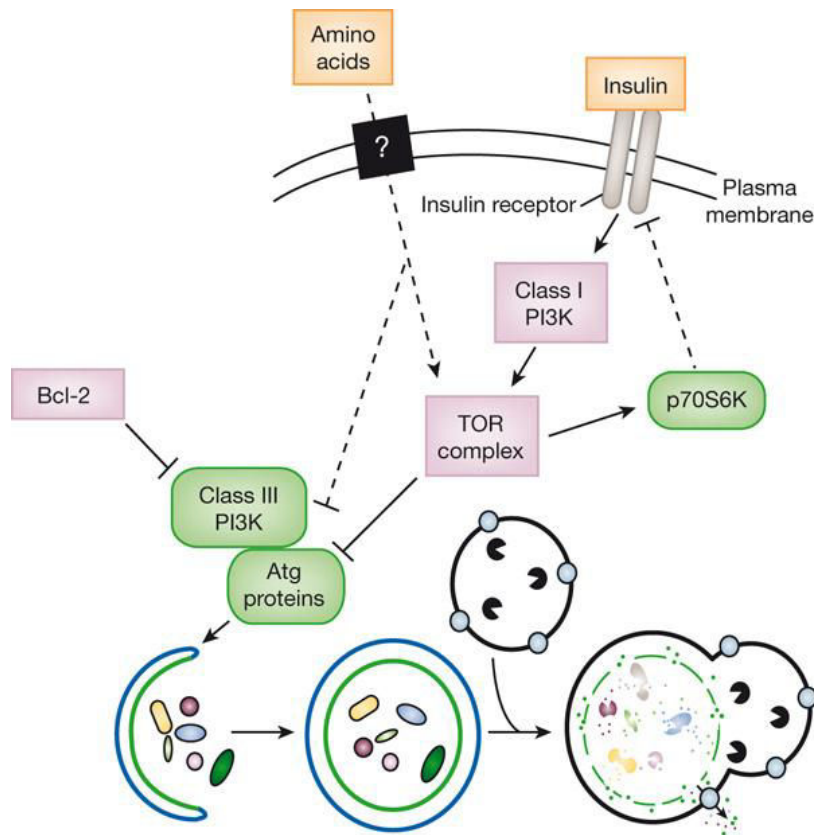
Première étape de l'autophagie, la séquestration peut être soit non spécifique, impliquant des contenus cytoplasmiques variés, ou soit sélective, en ciblant des cargaisons spécifiques telles que certains organites (par exemple des mitochondries, désignant alors une mitophagie) ou des microbes envahissants (Mizushima, Levine et al. 2008). Cette étape est caractérisée par la formation d'une double membrane qui va venir englober les constituants indésirables ou des macromolécules de longue vie : c'est le phagophore. L'origine de cette double membrane, riche en lipide et pauvre en protéine, n'est pas encore clairement établie : elle pourrait provenir initialement du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi (Juhász and Neufeld 2006; Mizushima 2007). La double-membrane représentant le phagophore va progressivement s'allonger pour encercler complètement les constituants à digérer, formant ainsi une vacuole appelée autophagosome (Figure 27).

De nombreux gènes associés à l'autophagie (*atg*, « autophagy-related gene ») ont été mis en évidence chez la levure. L'autophagie étant un mécanisme très conservé, ces gènes retrouvent leurs homologues chez les mammifères. Ces gènes sont impliqués dans la formation du phagophore et de l'autophagosome. Ces gènes donnent lieu à la formation de complexes protéiques fonctionnels parmi lesquels (Meley, Pattingre et al. 2006; Xie and Klionsky 2007; Yang and Klionsky 2010) :

- le complexe sérine-thréonine kinase Atg1, Atg13 et Atg17, qui agit en aval de la protéine kinase mTOR ;
- le complexe Atg6 (ou bécline 1 chez les mammifères), Atg14, Vps34, Vps15 (« vacuolar protein sorting »), permettant la formation de l'autophagosome (complexe PI3K classe III) ;
- le complexe de conjugaison Atg5/Atg12 ainsi que Atg8 (ou LC3 chez les mammifères) qui subit un clivage et une lipidation avec la phosphatidyléthanolamine, permettant l'élongation de la double-membrane ;
- le complexe Atg2, Atg9, Atg18, système de recyclage.

L'autophagie est régulée à différents niveaux. Deux voies de signalisation connectées englobant la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) de classe III et la cible mammalienne de la rapamycine (mTOR, « mammalian target of rapamycin ») jouent un rôle majeur dans cette régulation. L'autophagie requiert la voie de signalisation PI3K (classe III), mais est régulée négativement par mTOR (Figure 28). Ainsi, des inhibiteurs de la PI3K agissent comme

inhibiteurs de l'autophagie, tandis que les inhibiteurs de mTOR agissent comme inducteurs de l'autophagie (Tableau 6).



**Figure 28 : Modèle simplifié de la régulation de l'autophagie.** L'autophagie est active à un niveau basal dans la plupart des cellules de l'organisme, mais elle peut aussi être stimulée en réponse à des signaux de stress, comme en cas de pénurie de nutriments (acides aminés, glucose, acides gras). Une PI3K de classe III est nécessaire à l'activation de l'autophagie et au recrutement des protéines Atg pour la formation du phagophore et de l'autophagosome. A l'inverse, nutriments et facteurs de croissance (activation des récepteurs à insuline) vont activer la voie PI3K classe I/TOR qui va inhiber l'autophagie. L'activité de TOR est probablement régulée par des boucles de rétrocontrôle. Par exemple, la kinase p70S6 est un substrat de TOR qui pourrait limiter son activité, assurant ainsi la maintenance d'un niveau basal de l'autophagie, indispensable à l'homéostasie. Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 inhibent également l'autophagie, en empêchant l'association de bécline 1 (Atg6) avec la PI3K de classe III.

Les protéines en mauve et en vert sont respectivement inhibitrices et activatrices. Les pointillés désignent des régulations envisageables. Reproduit de (Mizushima, Levine et al. 2008).

Mais l'autophagie est un mécanisme encore loin d'être totalement élucidé. Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'autophagie sont complexes, incluant entre autre celles de l'insuline, mais incluant aussi d'autres voies indépendantes de mTOR (Meijer and Codogno 2006). Par exemple, des études ont montré que les céramides (sphingolipides) peuvent activer l'autophagie en sur-régulant bécline 1 et en inhibant la protéine kinase B (PKB), également appelée Akt (Scarlati, Bauvy et al. 2004).

### 2.7.2. Fonctionnalité

L'identification des gènes *atg* a permis de mieux comprendre les bases moléculaires de l'autophagie ainsi que son rôle dans la physiologie ou les maladies.

Au premier regard, il paraît facile d'assimiler l'autophagie à un phénomène délétère. Alors que l'autophagie a été assimilée à un type de mort cellulaire programmée autre que l'apoptose (PCD type II, « programmed cell death type II ») (Bursch, Hochegger et al. 2000), de plus en plus d'études remettent en question cette idée et placent l'autophagie au centre d'un mécanisme complexe permettant d'assurer avant tout la survie cellulaire. La mort secondaire à l'autophagie pourrait être finalement la conséquence d'une tentative infructueuse des cellules à s'adapter à une condition de stress (Galluzzi, Morselli et al. 2008).

L'autophagie fait partie des mécanismes naturels permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire. Son niveau basal est assez bas mais augmente rapidement sous certaines conditions. Par exemple, l'autophagie a souvent été décrite lors de carence nutritionnelle où elle joue un rôle dans la survie cellulaire, permettant de produire de l'énergie et des composants essentiels à la survie (acides aminés) à partir de la dégradation des constituants intracellulaires (Galluzzi, Morselli et al. 2008). D'autres formes de stress peuvent induire l'autophagie (comme certaines drogues, l'hypoxie,...), mais ce phénomène a également été observé dans bien d'autres situations, n'ayant pas forcément pour origine un stimulus de stress. L'autophagie est notamment très importante dans la différenciation cellulaire, ainsi que dans le vieillissement (Yang and Klionsky 2010).

L'autophagie est très importante dans le développement des mammifères et joue un rôle crucial dans la différenciation des cellules souches : les états de quiescence, de prolifération et de différenciation sont entre autre régulés par l'autophagie (Cecconi and Levine 2008; Phadwal, Watson et al. 2012).

Des dysfonctionnements de ce mécanisme cellulaire inhibent la différenciation des cellules, ce qui a d'ailleurs été montré dans la différenciation adipocytaire : il a été montré *in vitro* qu'un dysfonctionnement de l'autophagie inhibe l'accumulation de triglycérides et la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures (Singh, Xiang et al. 2009). Des études *in vivo* chez la souris ont confirmé le rôle de l'autophagie dans l'adipogenèse : la délétion du gène *atg7* exerce un effet anti-obésité, diminuant la masse adipeuse ainsi que les



taux plasmatiques d'acides gras, de cholestérol et de triglycérides. Ces études montrent également une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Zhang, Goldman et al. 2009).

L'autophagie intéresse ainsi de plus en plus les recherches dans le domaine de l'obésité, et du diabète de type II, devenant une nouvelle cible thérapeutique (Lavallard, Meijer et al. 2012).

L'autophagie aurait aussi potentiellement un rôle pivot dans la régulation de l'inflammation : d'une part l'autophagie peut être régulée par certaines cytokines, comme TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$  (activateurs de l'autophagie), ou IL-4, IL-10, IL-13 (inhibiteurs de l'autophagie) ; d'autre part l'autophagie peut réguler elle-même la synthèse et la sécrétion de cytokines (comme IL-1, IL-18, TNF- $\alpha$ ) (Harris 2011). La régulation de l'inflammation par l'autophagie a récemment été mise en évidence dans les adipocytes (Yoshizaki, Kusunoki et al. 2012).

L'autophagie est également impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies.

Défectueuse, elle peut contribuer au développement de certaines maladies humaines telles que le cancer (Edinger and Thompson 2003), les maladies neuro-dégénératives, les troubles musculaires et l'infection par des agents pathogènes (Levine and Kroemer 2008; Mizushima, Levine et al. 2008).

L'autophagie est entre autre très étudiée dans les cancers, représentant une nouvelle approche potentielle dans les traitements anti-cancéreux (Kroemer and Jaattela 2005; Kondo and Kondo 2006) (Livesey, Tang et al. 2009). Une des stratégies anti-cancéreuses consiste à inhiber l'autophagie car celle-ci permet aux cellules tumorales de survivre aux conditions de stress et donc de résister à la chimiothérapie. Mais l'autophagie peut aussi contribuer à la mort des cellules tumorales et d'autres stratégies consisteraient au contraire à l'induire (Amaravadi and Thompson 2007).

Les études entre mort et survie sont une fois de plus controversées et mettent en évidence la complexité de l'autophagie.

L'autophagie tient également un rôle important lors d'infections microbiennes ou virales, et de façon plus générale, dans l'immunité innée et adaptative (Mizushima, Levine et al. 2008).

Le nombre croissant d'études fait émerger bien d'autres rôles, comme par exemple : dans la fonction rénale (Huber, Edelstein et al. 2012), dans les maladies cardiovasculaires (Martinet, Knaapen et al. 2007; Nemchenko, Chiong et al. 2011), dans l'ostéoporose (Hocking, Whitehouse et al. 2012), dans le développement de l'ostéoarthrite (Lotz and Carames 2011).

Enfin, la perte du mécanisme d'autophagie a été impliquée dans le vieillissement. Le « turnover » des constituants cellulaires étant de moins en moins assuré, la balance entre biosynthèse et dégradation n'est plus en équilibre et les produits néfastes devant être dégradés s'accumulent (Mizushima, Levine et al. 2008). Cette accumulation délétère concerne notamment les cartilages articulaires et explique en partie la dégénérescence observée lors d'ostéoarthrite, l'autophagie étant importante pour l'homéostasie du cartilage articulaire (Lotz and Carames 2011).

### **2.7.3. Méthodes d'objectivation**

Avec la recrudescence des études sur l'autophagie, différentes méthodes ont été mises en place pour objectiver l'autophagie. Cependant, toutes ces méthodes ne sont pas forcément spécifiques de l'autophagie et la mise en évidence de ce phénomène a nécessité d'établir certaines lignes directrices (Klionsky, Abdalla et al. 2012).

Une première méthode pour visualiser l'autophagie est le marquage de protéines spécifiques de l'autophagie en immunofluorescence.

La protéine LC3 (« microtubule-associated protein light chain 3 »), homologue de la protéine Atg8 chez la levure, joue un rôle essentiel dans l'autophagie. C'est une protéine naturellement présente dans le cytoplasme (forme LC3-I, de 18 kDa), mais après clivage et lipodation avec la phosphatidyléthanolamine, les protéines LC3 (forme LC3-II, de 16 kDa) s'associent au phagophore et peuvent être utilisées comme marqueur de membranes autophagiques. La détection de ces protéines grâce à un anticorps anti-LC3 permet ainsi de visualiser en immunofluorescence les doubles-membranes autophagosomiales. En microscopie à fluorescence ou confocale, ces doubles membranes apparaîtront de façon ponctuelle dans les cellules autophagiques, tandis que la fluorescence reste uniforme lorsque LC3 est dans sa forme primaire. Les deux formes de LC3 étant de masse différente, il est également possible de les révéler en Western-blot.

D'autres marqueurs de l'autophagie ont été mis au point pour faciliter d'avantages la visualisation, parmi lesquels l'acridine orange et la monodansylcadavérine. L'autophagie étant un mécanisme de dégradation lysosomale (hydrolases acides), ces marqueurs vont plus particulièrement aller cibler des différences de pH dans des vésicules cytoplasmiques.

Cependant, ces marqueurs ne sont absolument pas spécifiques de l'autophagie et demandent donc une certaine prudence quant à l'interprétation des résultats. Il est vivement recommandé d'utiliser d'autres méthodes en complément afin de vérifier la fiabilité des résultats.

Une autre méthode microscopique plus fine et plus sûre peut être utilisée : la microscopie électronique. La morphologie de l'autophagie a été suffisamment étudiée pour permettre son identification sans aucun marquage. En fait, il s'agit là de la méthode la plus sûre pour vérifier et garantir la présence de phagophores ou d'autophagosomes dans des cellules, permettant d'identifier les doubles-membranes autophagosomiales ainsi que leur contenu.

Afin de pouvoir déceler les mécanismes et les voies de signalisation mis en jeu, il est très utile de disposer d'outils permettant de moduler l'activité autophagique. Même si de plus en plus d'outils ont été développés ces 15 dernières années, l'un des plus gros problèmes dans la recherche actuelle sur l'autophagie reste l'absence d'inhibiteurs et d'activateurs spécifiques. La prudence est alors de mise lors de l'interprétation des résultats après l'utilisation de ces traitements pharmacologiques. Étant donné le manque de spécificité des inhibiteurs de l'autophagie actuellement disponibles, il est recommandé de ne pas tirer de conclusions trop hâtives sur les fonctions de l'autophagie (Mizushima, Yoshimori et al. 2010).

Parmi ces modulateurs de l'autophagie, il existe des inhibiteurs du mécanisme en amont, qui vont cibler la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), ou en aval, qui vont cette fois inhiber la formation des autophagolysosomes (Tableau 6). Ce mode d'inhibition en aval permet notamment d'analyser l'activité autophagique au sein des cellules : par exemple, lors d'autophagie massive, l'inhibition de la fusion avec le lysosome va empêcher la dégradation des vacuoles autophagiques qui vont alors s'accumuler et il en résultera une augmentation des marqueurs d'autophagosomes comme LC3.

En plus des approches pharmacologiques pour moduler l'autophagie, il existe aussi des approches génétiques visant à inactiver des gènes clés de l'autophagie, notamment par « knock-out » ou « knock-down » de différents gènes *atg*. La combinaison des études pharmacologiques avec des approches génétiques permettrait d'inhiber plus spécifiquement la voie de l'autophagie (Mizushima, Yoshimori et al. 2010).

	Produit	Mécanisme d'action
<b>Inhibiteurs</b>	3-Méthyladenine	Inhibe la PI3K de classe III
	Wortmannin	Inhibe la PI3K
	LY-294,002	Inhibe la PI3K
	Bafilomycin A1	Inhibe la V-ATPase (vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase) conduisant à l'inhibition de la fusion autophagosome-lysosome
	Chloroquine	Augmente le pH lysosomal conduisant à une inhibition de la fusion autophagosome-lysosome
<b>Activateurs</b>	Rapamycine	Inhibe mTOR ("mammalian target of rapamycin")
	Tamoxifen	Augmente le taux intracellulaire de céramide

**Tableau 6 : Principaux modulateurs pharmacologiques de l'autophagie couramment utilisés.**

L'autophagie est finalement un mécanisme complexe, encore mal connu, qui présente de multiples facettes. Qu'en est-il pour les cellules souches dérivées du tissu adipeux ? L'autophagie est-elle activée après exposition à la lidocaïne ? Favorise-t-elle la survie cellulaire ?

#### **2.7.4. Mise en évidence de l'autophagie dans les ADSCs traitées à la lidocaïne**

Dans notre première étude sur les effets de la lidocaïne sur les ADSCs, nous avons conclu à un effet délétère de cet anesthésique local sur les cellules. Mais la mort cellulaire observée ne touchait qu'une partie des cellules tandis que les cellules survivantes étaient marquées par une vacuolation cytoplasmique massive. Nous nous sommes donc intéressés à ce phénomène, lequel a déjà été observé dans d'autres types de cellules après traitement par différents anesthésiques locaux, dont la lidocaïne (Morissette 2004; Bawolak, Morissette et al. 2010).

Alors que différentes techniques permettent de caractériser l'autophagie, nous avons choisi d'utiliser l'immunofluorescence (marquage LC3) et de conforter nos résultats par la microscopie électronique.

De plus, nous avons repris l'analyse de la cytotoxicité induite par la lidocaïne et avons réalisé en parallèle une analyse du cycle cellulaire grâce à un marquage au BrdU et à l'IP.

**LIDOCAINE EFFECTS ON HUMAN ADIPOSE STEM CELLS:  
THE PHANTOM MENACE?**

**Anne-Claire Girard<sup>a◇</sup>, Manoj kumar Gunasekaran<sup>◇</sup>, Mélanie Denizot<sup>b</sup>, Aymeric Neyret<sup>c</sup>,  
Karima Bencharif<sup>sa◇</sup>, Pierre Delarue<sup>d</sup>, Olivier Hulard<sup>o</sup>, Christian Lefebvre-  
d'Hellencourt<sup>◇</sup>, Regis Roche<sup>a◇</sup>, Laurence Hoareau<sup>a◇\*</sup>, Franck Festy<sup>a◇\*</sup>**

**(En cours de finalisation)**

<sup>a</sup>STEMCIS company, Plateforme CYROI, Ile de la Réunion, France

<sup>◇</sup>Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO), Plateforme CYROI,  
Université de la Réunion, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Biologie-Virologie, CHR Felix Guyon, Ile de la Réunion, France

<sup>c</sup>CPBS/CEMIPAI UMR 5236, CNRS, Université de Montpellier 1-2, France

<sup>d</sup>Delarue cosmetic surgery office, Clinifutur, Reunion Island, France

<sup>o</sup>Hulard cosmetic surgery office, Clinifutur, Reunion Island, France

\*LH and FF contributed equally to this work.

## ABSTRACT

**Background:** Adipose tissue is a reliable source of mesenchymal stem cells which can be easily obtained from lipoaspirates. However, lipoaspiration procedure often involves a local anaesthesia at the fat donor site that is commonly carried by lidocaine. While controversial studies have described the effect of this drug, there was a need for further research to clearly identify the impact of lidocaine on adipose-derived stem cells. In this study, investigations were focused not only on lidocaine-induced toxicity, but also on cell cycle and on autophagy within adipose-derived stem cell.

**Methods:** Adipose-derived stem cells (ADSCs) from lipoaspirates were grown in culture before being treated with different clinical doses of lidocaine, for different times of exposure (from 1h to 24h). On the one hand, cytotoxicity was measured by flow cytometry with annexin V/propidium iodide staining and cell cycle analysis was performed in parallel, using BrdU. On the other hand, autophagy was investigated by immunofluorescence staining and electron microscope.

**Results:** Lidocaine affected cell viability, particularly after 24h, but apoptosis was not involved in this cytotoxicity. In parallel, lidocaine led to a sudden cell cycle arrest in G0-G1 phase. Regarding cell morphology, lidocaine induced a massive vacuolation in the cytoplasm and autophagy was detected by immunostaining. Electron microscope could confirm the presence of phagophores in early treatment (2h), and the presence of autophagosomes in late treatment (24h). Inhibition of autophagy increased lidocaine-cytotoxic effect.

**Conclusions:** Lidocaine clearly impairs ADSC viability and growth. Therefore, appropriate handling of adipose tissue should be done in order to remove lidocaine and avoid its deleterious effects. However, ADSCs seem able to adapt in response to this drug, involving autophagy as a cytoprotective mechanism against lidocaine attack.

**Keywords:** adipose stem cells, lidocaine, vacuolation, autophagy, regenerative medicine

### Disclosure:

The authors have no commercial associations or financial disclosures that might pose or create a conflict of interest with any of the information or products mentioned in this article. This work has been financially supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie.

## Introduction

Adipose tissue is known to offer a promising source of adult stem cells for regenerative medicine. Indeed, adipose stem cells meet all the criteria that are required to be used for stem cell therapy: they can be easily and safely isolated from lipoaspirates in abundant quantities, they have the ability of self-renewal, and they can differentiate in multiple cell lineages (Zuk, Zhu et al. 2001; Zuk, Zhu et al. 2002; Gimble and Guilak 2003). Adipose tissue can be easily collected by lipoaspiration, but during lipoaspiration procedure, lidocaine, a local anesthetic, is commonly infiltrated as a tumescent solution at the fat donor site in order to assure patient's comfort, limiting peri- and post-operative pain. Lidocaine is known to inhibit sodium influx in nerve cells, preventing depolarization and signal conduction (Cummins 2007). This drug is widely used and has been investigated for years but many questions remain unanswered, especially concerning its effects and mechanism of action on other cell types. It is postulated that the drug can pass through the plasma membrane by simple diffusion before blocking an intracellular site of voltage-dependent sodium channels in nerve cells (Cummins 2007). What is the effect in other cells? Several studies have tried to elucidate this issue but results depend on the cell type and the conditions tested. Indeed, local anesthetics have been shown to exert a variety of effects on non-neuronal cells, independently of the inhibition of sodium conductance. Some studies date back to some time, showing cell shape changes, cytotoxic effects, apoptosis induction... Among all the studies on lidocaine effects, lidocaine has recently been shown to inhibit cell proliferation in cultured bone marrow stem cells (Lucchinetti, Awad et al. 2012) and to induce massive cytoplasmic vacuolization (Morissette 2004). Vacuolization has often been observed in cultured mammalian cells and has been described as a dramatic phenomena that appears during environmental stress conditions, among which weak bases (including lidocaine) are well-known inducers (Henics and Wheatley 1999). Morissette *et al.* have then referred the massive vacuolization to autophagy (Morissette 2004; Bawolak, Morissette et al. 2010).

Autophagy is a self-eating mechanism in eukaryotic cells that leads to lysosomal degradation of intracellular contents, including damaged organelles and soluble unfolded proteins. Macroautophagy (herein referred to as autophagy) is a type of autophagy where cytoplasmic contents are engulfed in a double-membrane called phagophore, which elongates in order to form a complete vesicle sequestering the unwanted contents: the autophagosome. Degradation occurs after fusion between the autophagosome and a lysosome or an endosome, forming an

autolysosome where the cargo and the inner membrane are degraded by lysosomal hydrolases (Yang and Klionsky 2010).

Autophagy is above all a mechanism that allows maintaining homeostasis as it participates to the turnover of cytoplasm content, but it also plays a significant role in health and is rapidly activated under stress conditions in order to provide nutrients to the cell and to assure its survival (Mizushima, Levine et al. 2008). Although this is confusing, autophagy has also been related to a type of programmed cell death, different from apoptosis (Bursch, Karwan et al. 2008; Galluzzi, Vicencio et al. 2008). The balance between cell survival and cell death is quite controversial and the complex molecular pathways are still being deciphering.

While previous studies in our lab have shown cytotoxic effect on cultured adipose stem cells (Girard *et al.*, 2012), in the present study, we have explored different mechanisms which could be involved in cellular response to lidocaine. From cytotoxicity and cell cycle analysis to vacuolization and autophagy induction, we describe here further insights in order to highlight the effects of lidocaine on human adipose stem cells.

## Materials and methods

### Origin of adipose tissue samples

Subcutaneous (abdominal, buttocks, hips and thighs) tissue samples of human white fat were obtained from normal weight or slightly overweight women (mean body mass index = 23.1 kg/m<sup>2</sup>) undergoing liposuction, performed under general anesthesia, for cosmetic reasons (aged between 34 and 51 years, mean 41 years). Apart from oral contraception, the subjects were not receiving treatment with prescribed medication at the time of liposuction. Each experiment was performed from at least 3 samples obtained from different patients. The study was approved by the Ile de la Réunion ethics committee for the protection of persons undergoing biomedical research.

### Purification of Stromal Vascular Fraction and cell culture

Adipose tissue samples obtained by liposuction were processed as already described in Girard *et al.* (2012). Briefly, tissue was digested for 1 hour at 37°C with collagenase (NB4, SERVA, Germany). Digested tissue was then centrifuged at 900 g for 4 min and the cell pellet (SVF, Stromal Vascular Fraction) was washed three times and filtered through Steriflip 100 µm (Millipore, France). After centrifugation, cells were resuspended in 199 medium (PAN Biotech, France). Cell number and viability were assessed by Trypan blue dye exclusion (Trypan solution 0.4 % from Sigma-

Aldrich, France). The isolated cells have already been analyzed by flow cytometry to assess the phenotypic characteristics of adipose stem cells (Festy, Hoareau et al. 2005). Around 300,000/cm<sup>2</sup> cells were plated in 6- or 24-well plates, or on glass coverslips, with M199 containing L-glutamine, glucose (2 g/L), amphotericin B (10 mg/mL), streptomycin (0.4 mg/mL) and penicillin (400 U/mL) (PAN Biotech, France), with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (PAN Biotech, France). Cells were then cultured for proliferation in medium with 10% FBS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> prior to the experiments.

### **Drug treatment**

Adipose-derived stem cells (ADSCs) were kept only in primary culture, without any passage, and when they reached 80 % confluence (after 4 to 7 days), cells were treated with different clinical concentrations of lidocaine along with the same culture medium: 1.7 mM (0.4 mg/mL), 3.4 mM (0.8 mg/mL), 6.8 mM (1.6 mg/mL) and for different times of exposure (1h, 2h, 4h, 12h and 24h). Non-treated cells were used as control for each time of exposure. No significant difference between pH could be noticed between treatment media.

For drug washout experiments, the media containing lidocaine were removed and the cells were rinsed and incubated with fresh culture medium. The control cells were also rinsed and incubated with fresh medium.

### **Cytotoxicity and apoptosis by flow cytometry analysis**

After treatment, the cells were collected (approximately 5x10<sup>5</sup> cells) and incubated for 15 min with 10 µL of Annexin V-FITC in 100 µL Binding Buffer from the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit Plus (BioVision, Cliniscience, Montrouge, France) and for 5 min with 2.5 µg/mL propidium iodide (PI) (Santa Cruz, Cliniscience, Montrouge, France). The stained cells were analysed by flow cytometry using FC-500 and MXP software (Beckman Coulter). The collected data were then analyzed with FlowJo software version 10 for Microsoft (TreeStar, San Carlos, CA).

### **Cell cycle assay with BrdU incorporation and flow cytometry analysis**

For bromodeoxyuridine (BrdU) labeling, cells were incubated with 10 µM BrdU (BD Pharmingen, Cliniscience, Montrouge, France) in cell culture medium. The optimal incubation time with BrdU was first determined in order to analyze the cells in the logarithmic phase of cell proliferation.

After pulsing cells for the appropriate time with BrdU (15 min), cells were collected and centrifuged 4 min at 900 g. The cells were permeabilized with ice cold ethanol 70%. Then, the cells were washed

with PBS containing 0.5 % BSA and centrifuged at 900 g for 4 min. The pellet was resuspended in a denaturing solution composed by 2M HCL and washed with PBS-BSA 0.5 %. After 10 min of centrifugation, 0.1 M sodium borate pH 8.5 was added to neutralize any residual acid. At last, the cells were washed before being incubated for 45 min at 37°C with a FITC mouse anti-BrdU (BD Pharmingen) in PBS containing 0.5 % Tween®-20 and 0.5 % BSA. Propidium iodide was added to a final concentration of 10 µg/mL and the cells were incubated for 15 min at room temperature. The cells were analyzed by flow cytometry using FC-500 (Beckman Coulter), exciting at 488 nm and measuring the BrdU FITC-linked fluorescence through a 514 nm bandpass filter and the PI fluorescence through a 600 nm wavelength filter. Data were then analyzed with FlowJo software version 10 for Microsoft (TreeStar, San Carlos, CA).

### **Immunofluorescence staining**

ADSCs grown on glass coverslips were fixed and permeabilized at different times post treatment by immersion in frozen ethanol for 5 min and conserved at - 20°C. PBS-BSA 1% was used for saturation. Coverslips were incubated in primary antibodies (1/200), namely anti-LC3B or anti-cleaved-caspase3 (Sigma), in PBS-BSA 1% and then with secondary antibody (anti-Rabbit) conjugated to Alexa488 (1/1000). Nucleus morphology was revealed by DAPI staining (final concentration 100 ng/ml). Coverslips were mounted in Vectashield H-1000 (Vectorlabs, Clinisciences).

### **Microscopic techniques**

To highlight cell morphology changes, ADSCs were first observed under phase contrast microscopy (Nikon Eclipse TS100) and photomicrographs were taken using a digital camera (Nikon Coolpix P5100). For immunostained cells, fluorescence was observed using a Nikon Eclipse 80i microscope. Images were obtained using the Hamamatsu Orca-ER camera system and the imaging software NIS-Element BR.

For electron microscopy analysis, ADSCs were processed for thin-layer electron microscopy as follows: 2 h and 24 h post-treatment, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M Sorensen buffer (pH 7.4) for 1 h at room temperature. Cells were then post-fixed with 2% osmium tetroxide, washed in cacodylate buffer containing 0.5% tannic acid, and embedded in epon (Embed-812, Electron Microscopy Sciences Inc.). Sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Hitachi H7100 transmission electron microscope.



### Statistical analysis

Statistical analysis was performed by either a Student's t-test for two group comparisons or by an ANOVA followed by a Dunnett's t-test for comparisons of multiple doses or times (JMP™, SAS Institute Inc., Cary, NC). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### Cell viability and apoptosis

After lidocaine treatment, flow cytometry analysis with annexin V and PI staining was performed to assess cytotoxicity. Regarding apoptosis, very low levels of annexin V-positive staining were detected which corresponded to basal apoptosis (around 3%), Figure 1A. Small differences shown between control cells and lidocaine-treated cells were not significant, even after long exposure (24h). Moreover, PI staining did not show any cytotoxic effect for the first two hours of treatment but PI staining significantly increased after longer exposure, up to 50% for the highest dose at 24h (Figure 1B).

In parallel, DAPI staining showed non-treated- and treated-ADSCs with normal nuclei (no condensation or fragmentation) and no more active caspase-3 was detected in treated cells (just basal apoptosis), Figure 1C. Therefore, fluorescent imaging confirmed that no apoptosis was induced after lidocaine treatment.

### Cell cycle analysis

The hypothetical influence of lidocaine on cell cycle was tested by BrdU incorporation. First, ADSCs were pulsed for different lengths of time to determine the appropriate incubation time with BrdU. All DNA had incorporated BrdU when BrdU incubation times exceeded 15 min whereas the different phases of the cell cycles, including S phase, could be distinguished with 15 min of BrdU incubation (Figure 2A, negative control). The control and treated cells were then tested for this time. Flow cytometry analysis revealed that cell cycle was not impaired after 30 min of treatment (data not shown) but as soon as 1 h, the highest dose of lidocaine significantly decreased the proportion of S phase until a total cell cycle arrest in G0-G1 at 12h, for all the patients tested (should be noted that, depending on the patient tested, direct cell cycle arrest could be observed from 2h). Identically, all doses of lidocaine could lead to cell cycle arrest in G0-G1 by 12h-treatments (Figure 2B). For these conditions, the proportion of G0-G1 phase increased, showing an accumulation of cells in that phase.

### Lidocaine-induced vacuolization and reversibility

When ADSCs were treated with lidocaine in a time- and dose-dependent manner, a massive and rapid cell vacuolization appeared inside cytoplasm. Indeed, vacuolization occurred as soon as 1 hour of treatment, even with the lowest dose of lidocaine (0.4 mg/mL). Microscopic observations (Figure 3A) showed that the vacuoles seemed to first appear at the perinuclear site before occupying most of the cytoplasm and in the later treatment (24 h), vacuoles enlarged as if small vacuoles had fused (data not shown). After negative lipid droplet staining (by Nile Red) of the vacuolated cells (data not shown), we confirmed that the cells did not accumulated lipid droplets as shown in differentiated adipocytes. Moreover, when the media containing lidocaine were removed from the cell cultures and after washing, this vacuolation could be reversed (Figure 3B).

### Lidocaine induced autophagy in ADSCs

LC3 is a constitutive protein naturally present in the cytoplasm that is cleaved and lipidated for the formation of membrane-bound autophagosomes (Kabeya, Mizushima et al. 2000). The original form of LC3 results in a homogenous diffuse distribution in the cytoplasm whereas modification of LC3 (form II) is known to result in punctuated staining which has been suggested to be a hallmark of autophagy. Thus, we used this autophagy marker to assess the presence of autophagic membranes within ADSCs. Immunostaining for LC3 and fluorescent microscopy showed a diffuse localization throughout the cytoplasm of control cells whereas the LC3-II form was abundant in lidocaine-treated cells (Figure 4). We could also notice slightly punctuated nuclei in non-treated cells but this disappeared in lidocaine-treated cells after 2 hours of treatment. Moreover, after drug washout experiments, fluorescence returned to that observed in control cells: no (or attenuated) LC3-II but diffuse LC3 and some punctae in nuclei (Figure 4).

### Autophagosome formation in lidocaine-treated ADSCs

To confirm that lidocaine could trigger autophagy in ADSCs, we performed an ultrastructure analysis of non treated- and treated-ADSCs using transmission electron microscopy. To facilitate the visualization of autophagic structures, we stimulated the cells with the highest dose of lidocaine (1.6 mg/mL) and we investigated two opposite times of treatment, 2h and 24h. While no basal autophagy could be visualized in control cells (data not shown), electron micrographs show the presence of double-membranes starting to engulf cytoplasmic contents (phagophores) in the short treatment (Figure 5A), but no entire autophagic vesicles could be detected in the analyzed sections.

However, after 24h-treatment, some autophagosomes were clearly visible, engulfing membranes and membrane-bound cytoplasmic structures (Figure 5B).

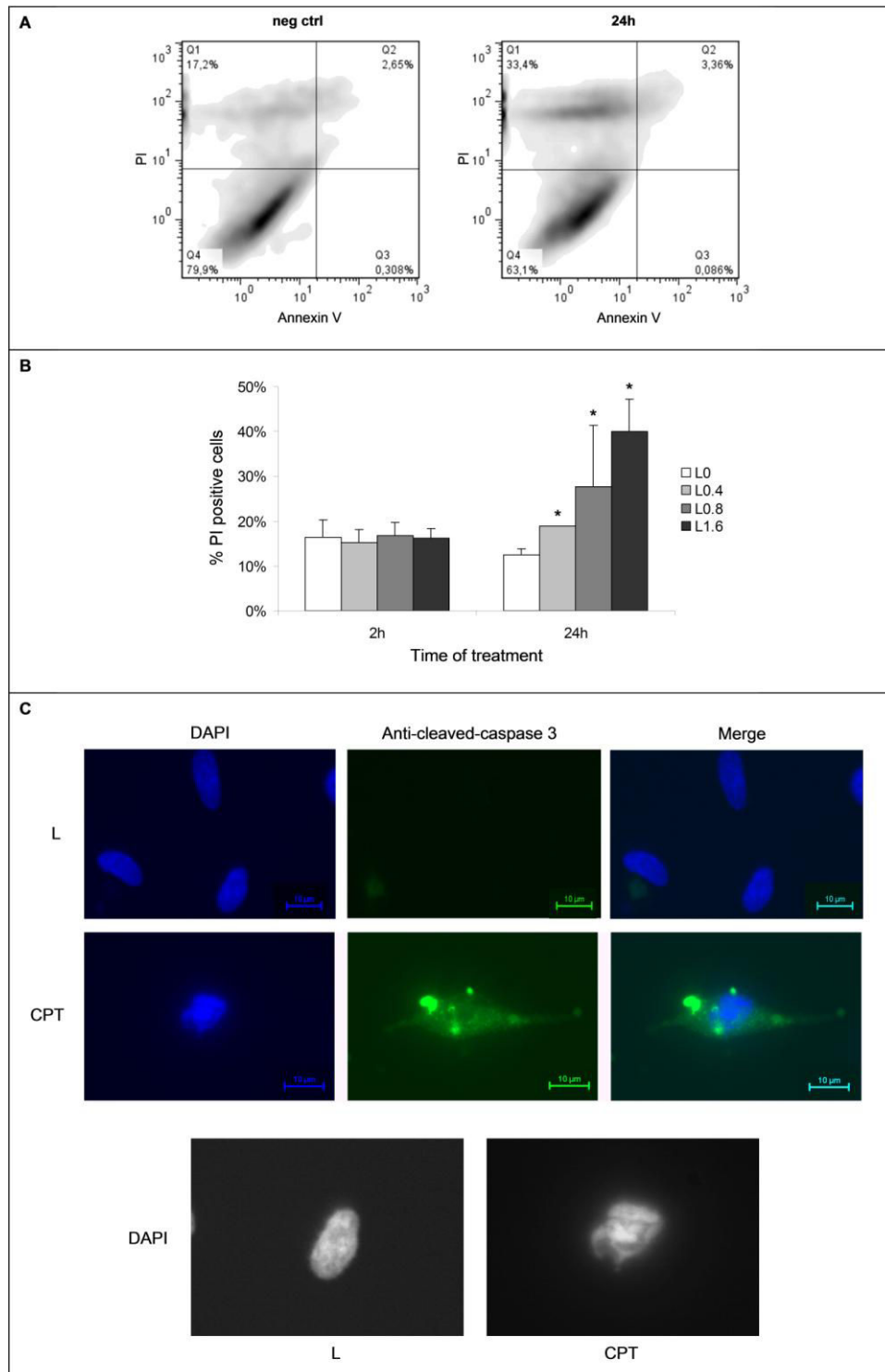
Interestingly, the large vacuoles which were visible at optic and fluorescent microscopes were like “empty” and membraneless (Figure 5A).

#### **Acknowledgements**

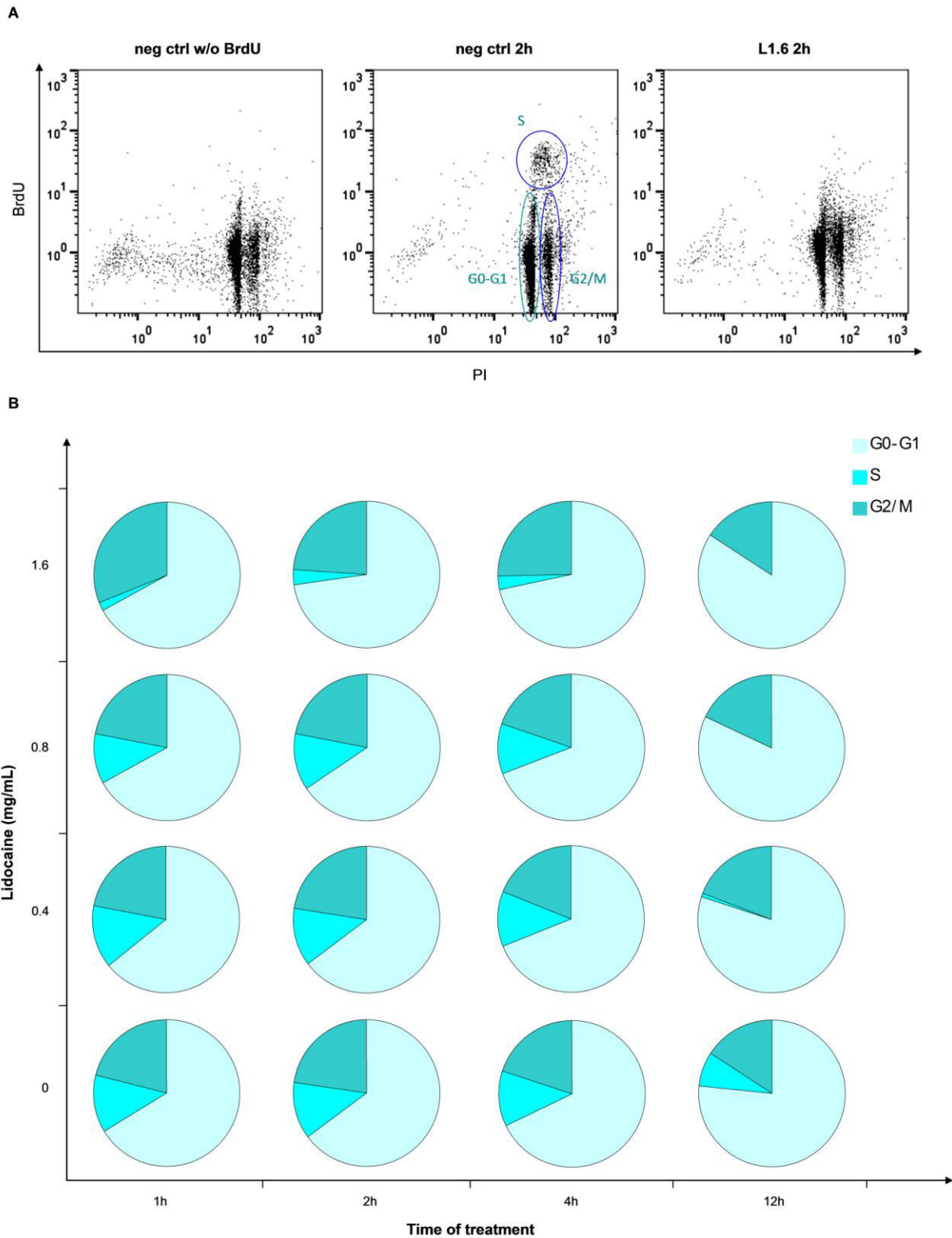
We are grateful to the Ministry of National Education and Research for the financial support, to Prof. Philippe Gasque and his group of research for scientific advice. Finally, we would like to thank all patients who consented to the collection of tissue samples, and thus made this study possible.

#### **Conflict of interest**

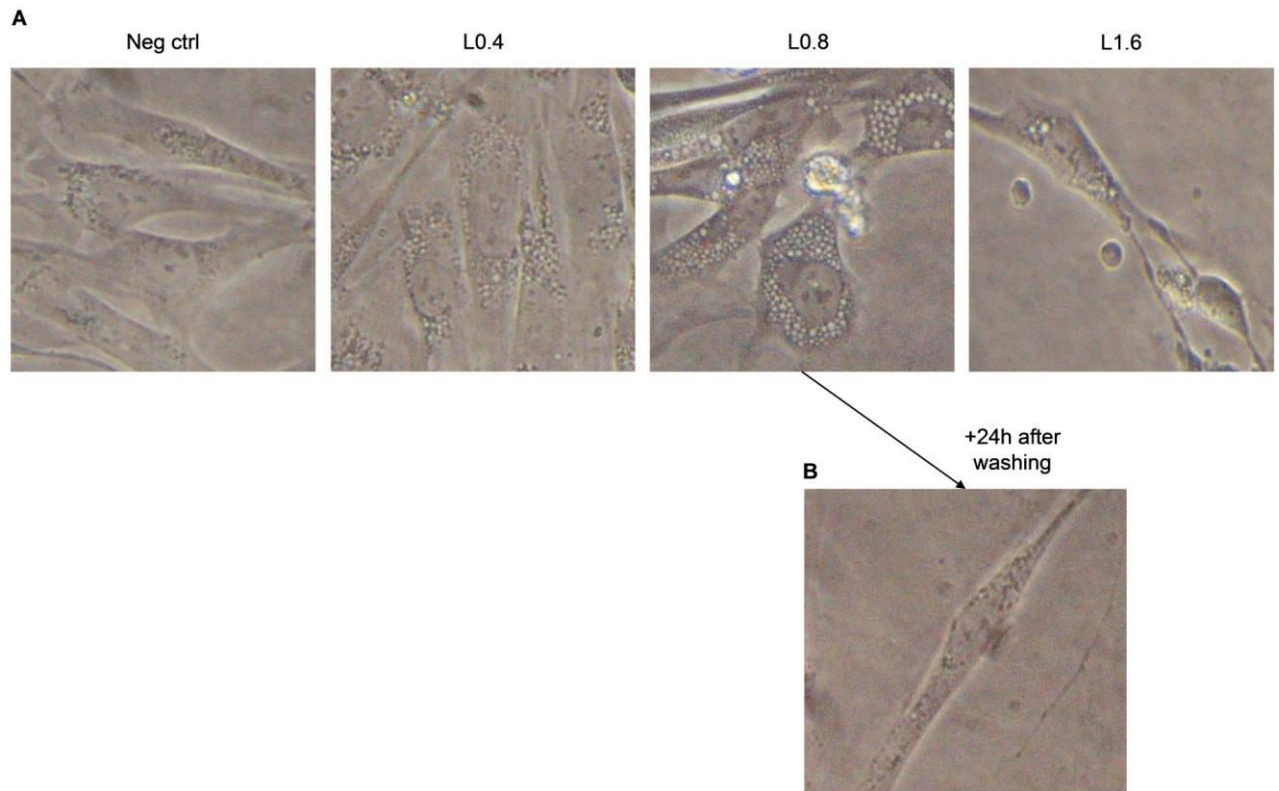
No potential conflict of interest relevant to this article was reported.



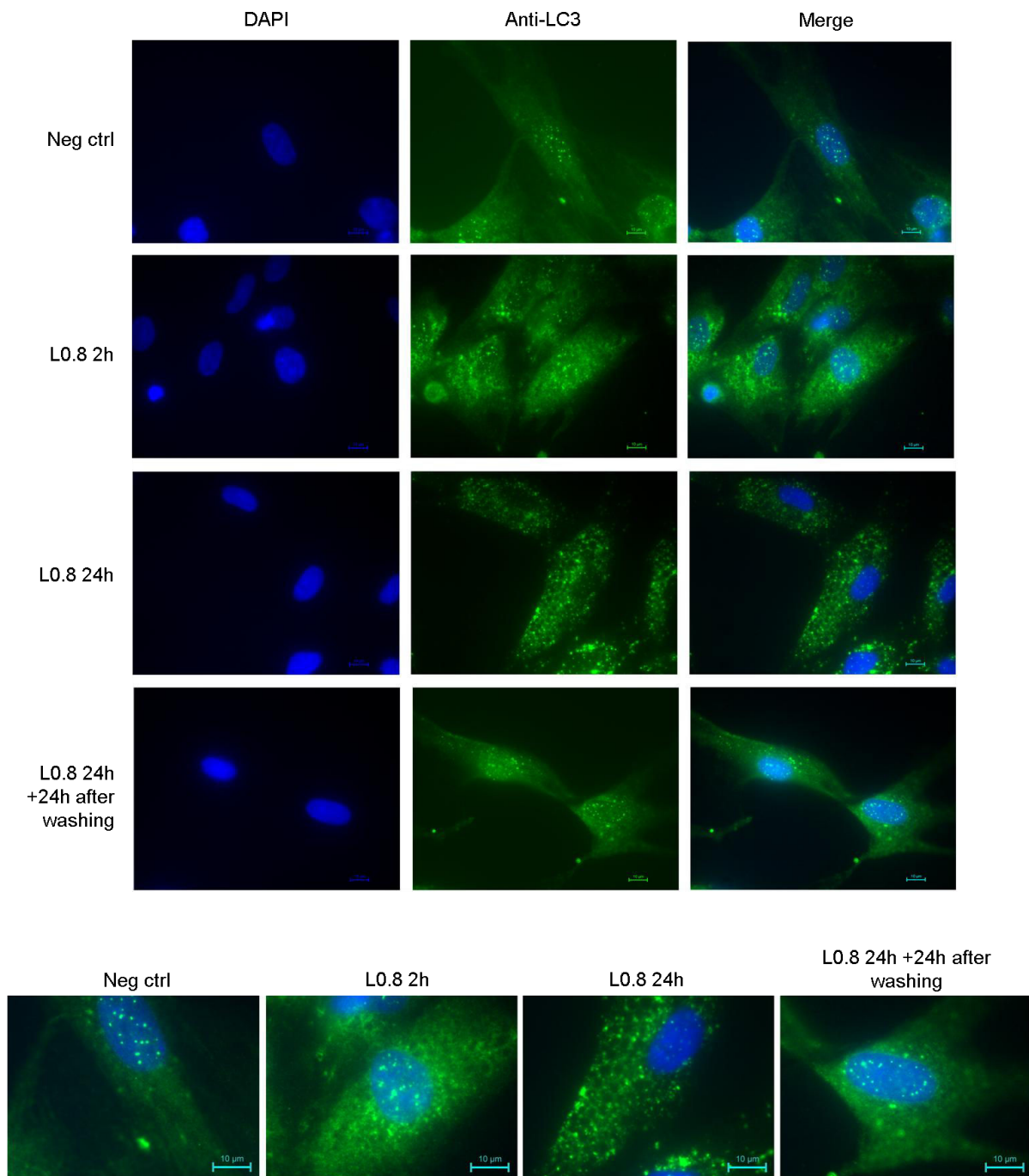
**Figure 1: Cytotoxicity and apoptosis analysis.** ADSCs were treated with different concentrations of lidocaine (L) 2h and 24h before being subjected to annexin V/PI staining or to fluorescent microscopy. **(A)** Representative density plots of one out of three independent experiments (from 3 patients), showing negative control (neg ctrl) and lidocaine treatment (1.6 mg/mL for 24h). Quadrants Q1, Q2, Q3 and Q4 correspond to necrotic cells, late apoptotic cells, early apoptotic cells and viable cells, respectively. **(B)** Rate of PI-positive cells after 2h and 24h of treatment. The graph shows the mean  $\pm$ SEM of the results from 3 patients. \* $P < 0.05$  versus control cells. **(C)** ADSCs cultured on coverslips were tested for caspase-3 activity and nuclei were stained with DAPI. Representative fluorescent microscopy pictures are presented. The upper panel shows cells treated with 1.6 mg/mL lidocaine (L) for 6h in comparison to cells treated with 2  $\mu$ M camptothecin (CPT) that has been used as positive control for apoptosis. The lower panel shows an enlarged image of one representative nucleus for each condition.



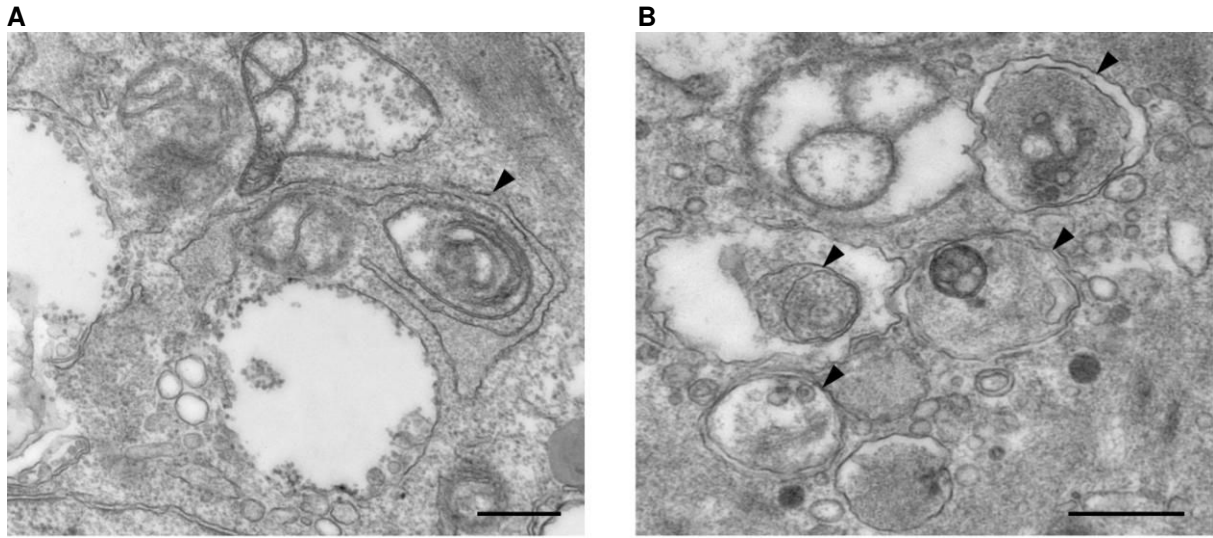
**Figure 2: Cell cycle analysis by BrdU incorporation and propidium iodide staining.** (A) Representative dot plots. The corresponding phases of the cell cycle, namely G0-G1, S and G2/M, are presented in negative control (neg ctrl). (B) Graph showing the proportion of the different phases of cell cycle, depending on the dose of lidocaine and the time of treatment. Results were obtained from 4 patients and all differences shown for 12h-treatments or for the dose of 1.6 mg/mL were statistically significant ( $P < 0.05$  versus controls).



**Figure 3: ADSC vacuolization after lidocaine treatment.** (A) Phase contrast microscopy images after 4h-treatment with different doses of lidocaine. (B) Reversibility effect after washout experiment. Magnification x400.



**Figure 4: Detection of autophagy in ADSCs with LC3 immunostaining.** ADSCs cultured on glass coverslips were treated with lidocaine as indicated and analyzed by fluorescence microscopy to determine LC3 distribution within the cells. Nuclei were stained with DAPI. A polyclonal antibody directed against LC3 and a secondary antibody conjugated to Alex Fluor 488 were used to detect LC3. The punctuated form of LC3 has been used as an autophagic marker. The upper panel shows the images associated to each fluorescence staining and the lower panel shows an enlarged region for each condition presented. Scale bares represent 10  $\mu$ m.



**Figure 5: Autophagosome formation in ADSCs treated with lidocaine.** Electron micrographs of ADSCs treated with 1.6 mg/mL lidocaine for 2h (A) and 24h (B). The black arrows indicate a phagophore engulfing membranes and cytoplasmic contents (A) and double-membrane bound autophagosomes (B). Scale bars represent 500 nm.

## Discussion et perspectives

La première partie de cette étude rappelle nos précédents résultats quant à l'effet cytotoxique de la lidocaïne sur les ADSCs (Girard *et al.*, 2012), sans pour autant impliquer l'apoptose (confirmé par la visualisation des noyaux non apoptotiques en microscopie à fluorescence ainsi qu'en microscopie électronique). Mais de nouvelles données sont mises en exergue : l'arrêt du cycle cellulaire, la vacuolation massive et l'autophagie (Figure 29). Sans pour autant conclure sur un éventuel lien entre ces phénomènes, de nombreuses hypothèses ont émergé à la vue des résultats.

D'une part, la lidocaïne impacte sur la prolifération des ADSCs en inhibant la réplication de l'ADN, comme constaté par un arrêt quasi brutal du cycle cellulaire en phase G0-G1. Cette inhibition de la prolifération cellulaire a récemment été mise en évidence dans des BMSCs de souris (Lucchinetti, Awad *et al.* 2012). La première hypothèse soulevée est donc la suivante : la lidocaïne pourrait agir sur le point de contrôle du cycle cellulaire permettant le passage en phase S, à savoir le complexe cycline E/CDK2. De futures expériences tenteront de vérifier cela.

D'autre part, la lidocaïne induit une vacuolation massive au sein du cytoplasme des ADSCs. Cette vacuolation semble correspondre à certaines réponses au stress décrites dans la littérature (Hiruma and Kawakami 2011) et pourrait être à l'origine de la mort cellulaire observée, tant elle est importante : ces larges vacuoles occupent presque l'ensemble du cytoplasme, ne laissant plus beaucoup d'espace aux organites vitaux pour la cellule.

Puis le dernier mécanisme mis en évidence est l'autophagie. A première vue, l'autophagie pourrait également être responsable de la mort cellulaire. Or ce mécanisme n'apparaît que secondairement à la vacuolation. De plus, bien que les images fluorescentes montrent un fort marquage pour la forme LC3-II (dès 2h de traitement), ce qui pourrait supposer une autophagie massive, la microscopie électronique ne montre que de rares phagophores à 2h et seulement quelques autophagosomes formés à 24h. En parallèle, les larges vacuoles visibles en microscopie optique et fluorescente apparaissent en microscopie électronique comme des structures vides (ou éventuellement quelques « débris » cytoplasmiques à l'intérieur) et sans membrane. L'origine de ces vacuoles reste inconnue, mais leur formation suite à l'exposition de cellules à des bases faibles (comme la lidocaïne) a déjà été étudiée (Henics and Wheatley



1999; Hiruma and Kawakami 2011). Ces vacuoles seraient susceptibles d'être des substances liquides séreuses cloisonnées dans le cytoplasme.

Dans ce contexte, l'autophagie pourrait être déclenchée dans le but de restaurer l'homéostasie cellulaire.

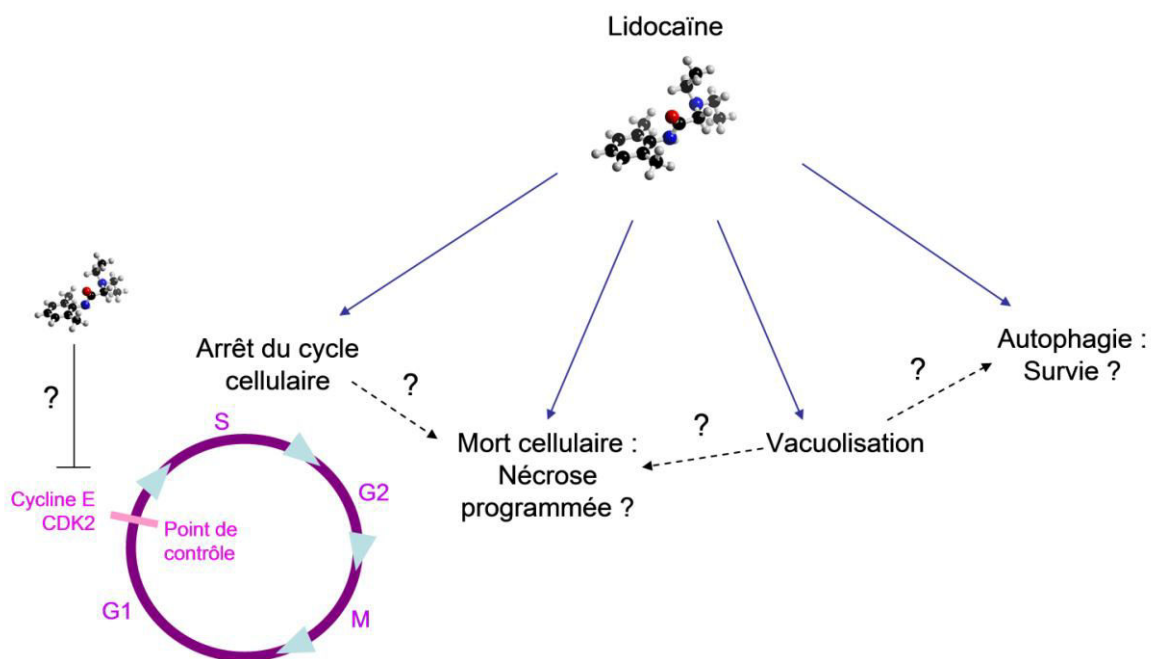
Pour conclure sur la finalité de l'autophagie, bonne ou mauvaise, l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine nous a permis d'observer une augmentation de la cytotoxicité induite par la lidocaïne lors d'une étude préliminaire (non présentée), ce qui conforte notre idée sur le rôle de l'autophagie dans la survie cellulaire. De plus amples investigations sur un plus grand nombre d'échantillons sont néanmoins nécessaires pour affirmer ce résultat. De même, l'inhibition de la fusion entre autophagosomes et lysosomes pourraient permettre de réellement savoir s'il s'agit d'une autophagie massive, comme suggéré par l'équipe canadienne au vu de la vacuolation massive (Bawolak, Morissette et al. 2010), ou si les vacuoles observées apparaissent indépendamment de l'autophagie. Par exemple, l'utilisation de la bafilomycine A1 permettrait de vérifier l'accumulation d'autophagosomes dans les cellules et de conclure ou non à une autophagie massive. De plus, la bafilomycine A1 inhibant la V-ATPase, son utilisation devrait inhiber la vacuolation massive constatée (Morissette 2004; Bawolak, Morissette et al. 2010) et un nouveau test de cytotoxicité permettrait de conclure sur l'origine de la mort (vacuolation et/ou autophagie). Si l'autophagie massive n'est pas concernée, ceci pourrait alors rejoindre l'idée de Hiruma *et al.* (Hiruma and Kawakami 2011) au sujet de la formation de vacuoles dépourvues de membrane (contenu séreux) autour de composants acides. Le mécanisme de formation de ces vacuoles n'est en revanche pas encore élucidé.

Les différents évènements décrits dans cet article décrivent une réponse complexe des ADSCs face à la lidocaïne. L'étude des voies de signalisation impliquées pourrait permettre de mettre en évidence l'enchaînement chronologique de ces évènements ainsi que d'éventuelles corrélations. Cela dit, tous ces évènements, à savoir la mort cellulaire programmée, la prolifération cellulaire et l'autophagie, partagent des voies de signalisation communes qui ne facilitent donc pas la tâche.

Finalement, face à la lidocaïne, la réponse adaptative des ADSCs passe par l'autophagie, ce qui conforte nos idées lors des précédentes études, au sujet des recommandations de laver le tissu adipeux avant son utilisation en lipofilling ou avant purification de la SVF (Hoareau *et*

*al.*, 2012 ; Girard *et al.*, 2012). En effet, nous avons montré que les ADSCs présentaient malgré tout un taux de mort cellulaire 24h après les étapes de lavages, bien qu'amoindri comparé à un traitement continu de 24h sans lavage. Ainsi, même si les cellules peuvent encore subir les effets délétères de la lidocaïne après lavages, on peut imaginer que la quantité restante de lidocaïne (nettement moindre) peut être « supportée » grâce au mécanisme de survie enclenché, à savoir l'autophagie.

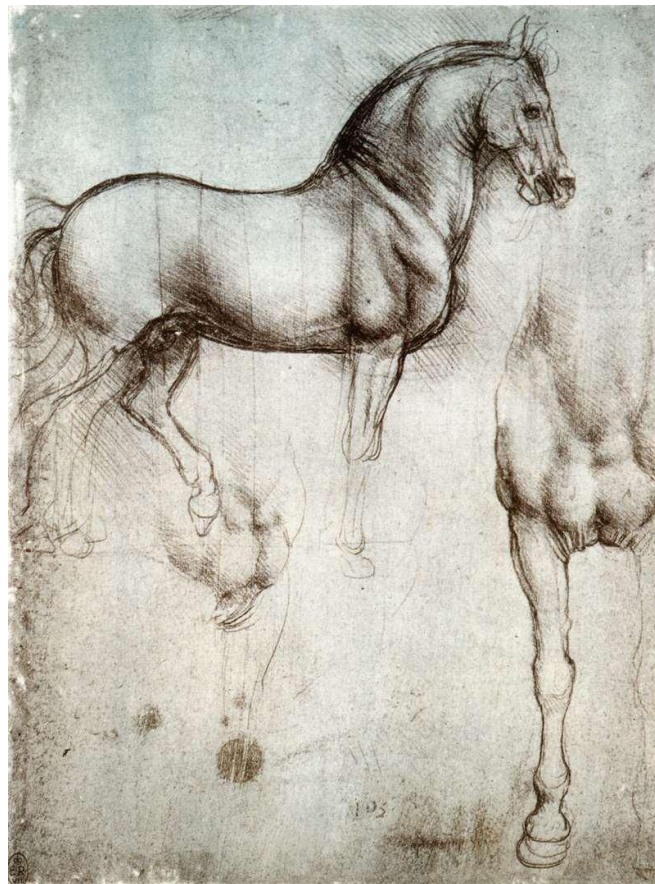
Dans le but de favoriser la survie cellulaire, cette étude est donc à prendre en considération dans le cadre de la médecine régénérative à partir des cellules de la SVF, notamment dans le cas de réinjection extemporanée, comme ce sera le cas dans le prochain chapitre, pour la régénération des tendons chez les chevaux.



**Figure 29 : Schéma récapitulatif des effets de la lidocaïne sur les cellules souches dérivées du tissu adipeux.** Les flèches en pointillés représentent les liens hypothétiques de cause à effet que nous avons supposés et qui feront l'objet de plus amples investigations. L'impact de la lidocaïne sur le point de restriction permettant le passage en phase S fera également l'objet d'études approfondies.



### **3. DE LA CELLULE AU TISSU: APPLICATION A LA REGENERATION DES TENDONS CHEZ LES CHEVAUX**



**Figure 30 : Etude du cheval (vers 1490), par Leonard de Vinci (1452-1519).**

*« Très loin, au plus profond du secret de notre âme, un cheval caracole... un cheval, le cheval! Symbole de force déferlante, de la puissance du mouvement, de l'action. »*

*David Herbert Lawrence*

Le cheval est considéré comme « la plus belle conquête de l'homme ». Domesticé il y a peut-être 9000 ans, cet imposant et noble animal a été utilisé par l'homme au travers des âges. Ayant servi au transport, au commerce, à l'agriculture, à la chasse, mais aussi au combat, le cheval a marqué l'histoire et l'évolution de l'humanité. Les encyclopédies, l'art (Figure 30), ainsi que les mythes et légendes lui rendent hommage depuis des siècles.

Maintenant monté en équitation de loisir ou de compétition, le cheval reste néanmoins un compagnon encore indispensable pour le transport et l'agriculture dans certaines régions du globe. Les concours hippiques ont également fait de cet animal un véritable athlète sportif, au même titre que l'homme.

De nombreuses disciplines équestres font l'objet de compétitions à plus ou moins haut niveau : saut d'obstacle, dressage, cross, endurance, attelage, équitation western (épreuves de reining par exemple), horse-ball, polo, etc., sans oublier les courses hippiques.

Ainsi, tout comme l'homme, le cheval de sport est lui aussi souvent atteint par les pathologies de l'appareil locomoteur. Parmi les pathologies les plus fréquentes, les atteintes ligamentaires, articulaires et les tendinopathies\* représentent les bêtes noires des cavaliers et propriétaires. Ces pathologies occasionnent des boiteries plus ou moins graves, pouvant persister dans le temps, obligeant une mise au repos du cheval pour une durée souvent longue, parfois indéfinie, voir une retraite anticipée.

Alors que la médecine vétérinaire évolue et qu'il devient important de trouver des solutions de thérapie pour ce noble animal, les cellules souches offrent de belles perspectives ces dernières années. En effet, les techniques jusque là utilisées pour traiter les tendinopathies sont médiocres et ne permettent pas de régénérer le tissu tendineux comme il l'était à l'origine, d'où l'espoir de la thérapie régénérative utilisant les cellules souches.

Comme on l'a vu dans le précédent chapitre, la multipotence, les effets paracrines et les propriétés immuno-modulatrices des cellules souches mésenchymateuses, et plus précisément des cellules souches adipeuses, font de ces cellules des candidates idéales pour l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative.

Le traitement des tendinites du cheval représente ainsi un bon exemple d'application...

## **3.1. Le tendon : structure et fonction**

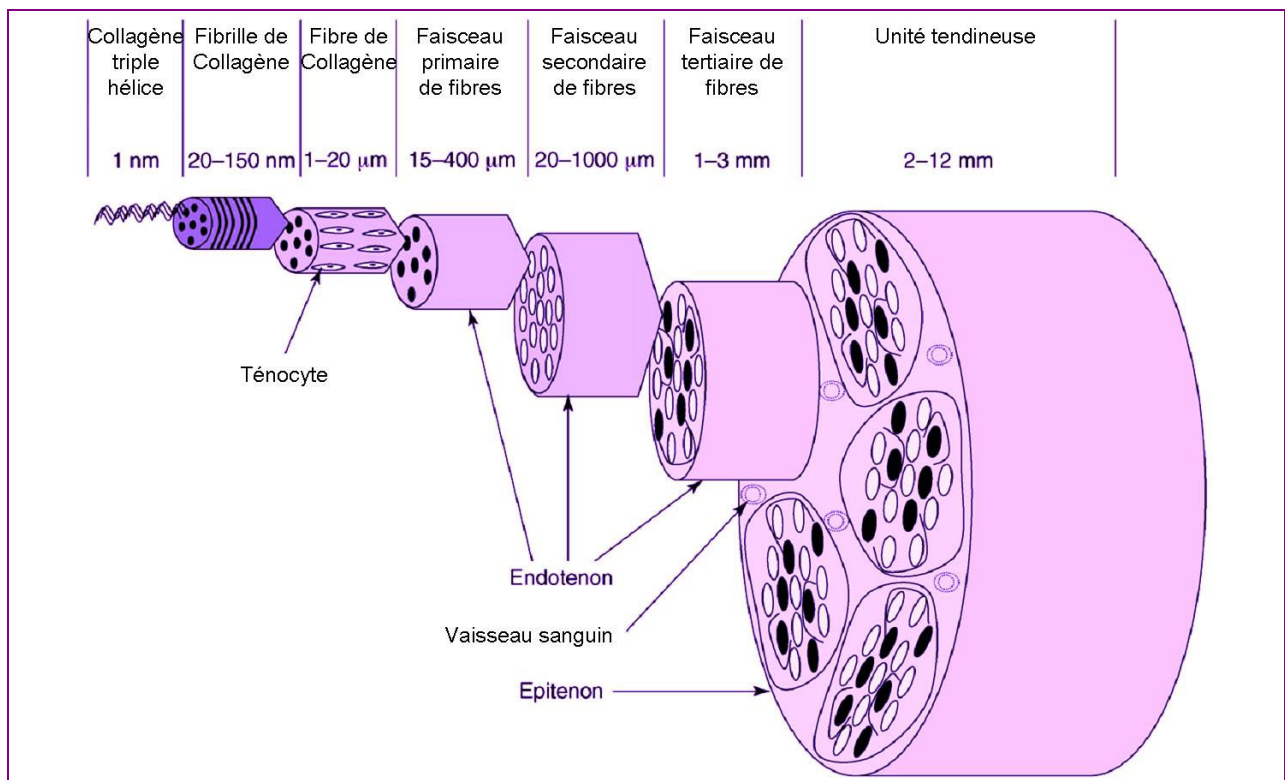
### **3.1.1. Organisation générale**

#### **3.1.1.1. Ultrastructure**

Les tendons sont des structures fibreuses permettant de relier les muscles aux os. Selon leur localisation anatomique, ces structures sont plus ou moins importantes. Chez le cheval, les tendons fléchisseurs superficiels et profonds du doigt peuvent par exemple mesurer une trentaine de centimètres.

Constitués de 60 à 70 % d'eau, le principal élément structural de la matière sèche des tendons est le collagène, essentiellement de type I et en moindre quantité de type III (Hoffmann and Gross 2007).

Le tendon est composé d'une riche matrice extracellulaire hautement ordonnée dans laquelle les molécules de collagène (type I) sont assemblées en fibrilles de collagène filamenteux (de 20 à 150 nm de diamètre) qui s'agrègent pour former des fibres de collagène (de 1 à 20 µm de diamètre), les principaux composants structurels. Ces fibres de collagènes sont groupées dans des fascicules pour former des faisceaux de fibres primaires, secondaires et tertiaires. Le tendon représente ainsi une structure hiérarchisée de faisceaux primaires, secondaires et tertiaires, disposés parallèlement à l'axe longitudinal du tendon (Figure 31). Fibres et faisceaux sont entourés par une enveloppe appelée endotendon\* et l'ensemble est enveloppé par l'épitenon\*, membrane externe du tendon (Richardson, Dudhia et al. 2007). L'endotendon est une membrane de tissu conjonctif lâche contiguë à la couche externe ou épitenon, et inclut également les vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que les nerfs. Le tout est englobé dans le paratenon (couche la plus superficielle). Les longs tendons comme les fléchisseurs profond et superficiel du doigt sont en plus enfermés dans une gaine synoviale permettant la lubrification et le glissement de ces tendons lors des mouvements (Hoffmann and Gross 2007).



**Figure 31 : Composition fibrillaire du tendon.** Adapté de (Richardson, Dudhia et al. 2007).

### 3.1.1.2. Vascularisation et innervation

Alors que les tendons sont métaboliquement très actifs au cours de leur développement, nécessitant un riche réseau capillaire, les tendons matures sont quant à eux peu vascularisés. Les nutriments proviennent d'avantages de la diffusion du liquide synovial que de la perfusion vasculaire, même si les tendons possèdent plus de vaisseaux sanguins qu'il n'est communément admis (Fenwick, Hazleman et al. 2002). Les vaisseaux sanguins sont généralement disposés longitudinalement à l'intérieur du tendon, passant autour des faisceaux de fibres de collagène de l'endoténon (Fenwick, Hazleman et al. 2002) (Figure 31).

Quant à l'innervation, les tendons sont pourvus de nombreuses fibres nerveuses sensibles qui renseignent le système nerveux central sur la position et le mouvement (fibres proprioceptives). Cette riche innervation sensitive joue un rôle indispensable dans la régulation de la contraction musculaire, notamment grâce à des mécanorécepteurs (appareil tendineux de Golgi).



### 3.1.1.3. Composante cellulaire

Les tendons comprennent environ 20 % (en volume) de cellules appelées ténocytes.

Les ténocytes sont des cellules fibroblastiques situées entre les fibres tendineuses. Les ténocytes permettent la synthèse de la matrice tendineuse, c'est-à-dire de tous les constituants participant à la formation, au renouvellement et au maintien des fibres de collagène. Ces cellules sont ainsi capables de synthétiser et sécréter des molécules de collagène (essentiellement de type I), mais aussi de l'élastine, des glycosaminoglycanes (GAGs), des protéoglycanes (comprenant des GAGs) et des glycoprotéines (comme par exemple la fibronectine) (Hoffmann and Gross 2007).

A partir de la synthèse des différents constituants de la matrice tendineuse, certains marqueurs ténocytaires ont été identifiés. Les ténocytes peuvent notamment être caractérisés selon leur capacité à exprimer les gènes codant pour le collagène de type I et le marqueur ténocytair scleraxis. Scleraxis (SCX) est un facteur de transcription permettant notamment la synthèse de ténomoduline (TNMD), un autre marqueur ténocytair (Shukunami, Takimoto et al. 2006; Taylor, Vaughan-Thomas et al. 2009). La ténomoduline est une glycoprotéine transmembranaire qui s'est révélée nécessaire à la prolifération des ténocytes et à la maturation du collagène (Docheva, Hunziker et al. 2005)

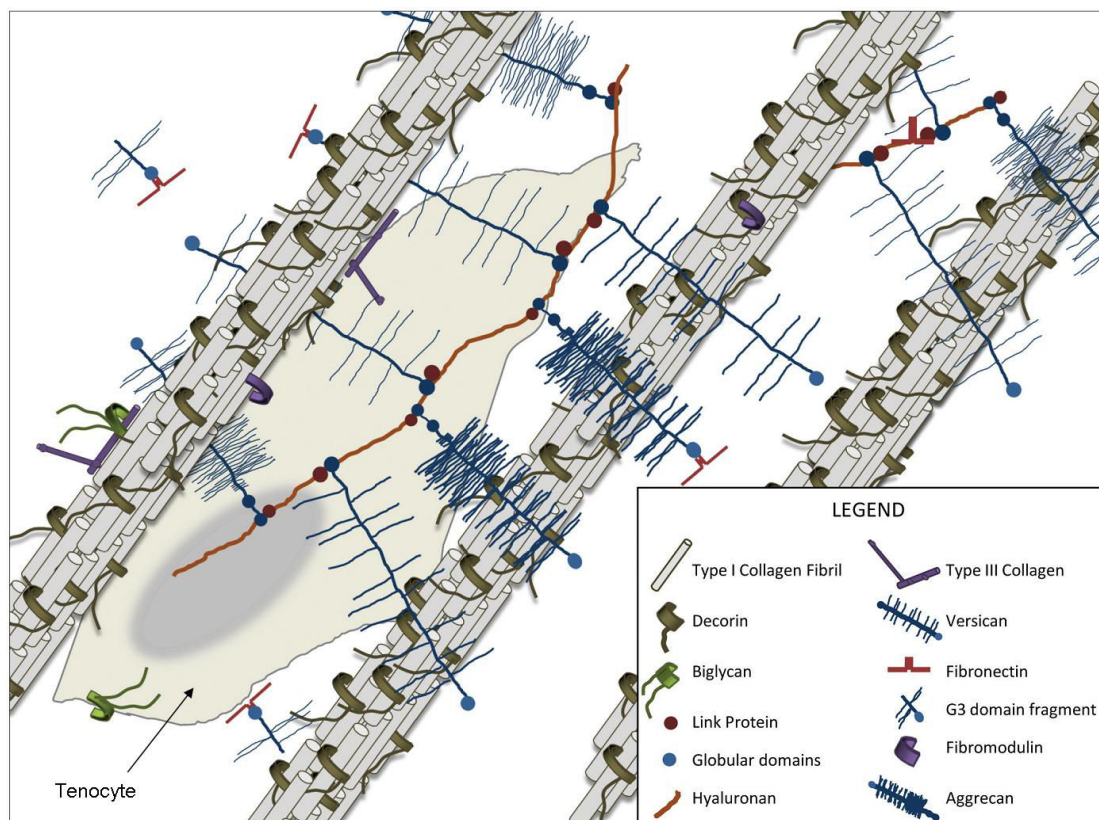
Les ténocytes ont de grandes extensions cytoplasmiques, qui relient les cellules adjacentes par l'intermédiaire de jonctions (de type « gap »), à la fois longitudinalement et latéralement, tout le long du tendon (Stanley, Fleck et al. 2007). Ces jonctions seraient impliquées dans la réponse coordonnée des cellules face aux forces exercées sur le tendon (Clegg, Strassburg et al. 2007). Cette réponse cellulaire consisterait à adapter la composition de la matrice extracellulaire en fonction des forces exercées. Par exemple, les ténocytes situés vers l'articulation métacarpo-phalangienne sont plus arrondis et ressemblent d'avantages à des chondrocytes, synthétisant une MEC plus fibro-cartilagineuse qui permet de subir les forces de compression exercée à ce niveau (Clegg, Strassburg et al. 2007). Aussi, les cellules pourraient « répondre » à ces forces et adapter la composition de la MEC en étant elles-mêmes soumises aux pressions et en les ressentant au niveau de leur cytoplasme et de leurs prolongements cytoplasmiques (Patterson-Kane, Becker et al. 2012).

De plus, comme décrit dans de plus en plus de tissus, les tendons disposent eux aussi de niches de cellules progénitrices permettant de maintenir le pool de ténocytes et d'assurer la

réparation des tendons lors de lésions (Bi, Ehirchiou et al. 2007; Patterson-Kane, Becker et al. 2012). Mais comme nous allons le voir, cette réparation naturelle est loin d'être optimale.

### 3.1.2. Composition macromoléculaire du tendon

Comme on l'a vu, le tendon est un tissu conjonctif dense composé d'environ 20 % de cellules (les ténocytes) et d'une riche matrice extracellulaire (MEC) représentant 80 % du volume total. Composée en grande partie d'eau (70 %), cette matrice contient 30 % d'éléments solides synthétisés et sécrétés par les ténocytes : du collagène, de l'élastine et une substance fondamentale (glycosaminoglycanes dont l'acide hyaluronique libre, protéoglycanes comme biglycane, fibromoduline, décorine, ...) qui contribue à stabiliser le « squelette » collagénique du tendon (Hoffmann and Gross 2007) (Figure 32).



**Figure 32 : Composition de la matrice extracellulaire d'un tendon normal.** Nichés entre les fibrilles de collagène, les ténocytes sont responsables de la synthèse et de la maintenance de la MEC. Les protéoglycanes interagissent avec les différents constituants de la matrice. Reproduit de (Parkinson, Samiric et al. 2011).

## ✓ Le collagène

Le collagène est une protéine fibreuse de la matrice extracellulaire représentant généralement plus de 95 % du poids sec du tendon. Son élément de base est le tropocollagène, une protéine hélicoïdale rigide, composée de trois brins de 300 nm de longueur et de 1,5 nm de diamètre (Killian, Cavinatto et al. 2012). Ces trois brins représentent les trois chaînes polypeptidiques (chaînes  $\alpha$ ), chacune constituée d'environ 1050 acides aminés, comportant principalement des résidus de glycine ainsi que de la proline et de la lysine qui peuvent être hydroxylées. Les résidus de proline sont disposés tous les trois résidus et permettent aux chaînes  $\alpha$  de s'enrouler pour former une triple hélice.

En fonction des chaînes  $\alpha$ , il existe différents types de collagène dans les tissus conjonctifs (essentiellement de type I, II et III) (Prockop and Kivirikko 1995; Brodsky and Persikov 2005). Le collagène de type I est majoritaire dans les tendons (près de 98 % du collagène total), mais on trouve également du type III (normalement en moindre quantité, sauf en cas de liaison tendineuse), et des types V, IX, XI, XII, XIV. Le type II, prédominant dans les cartilages articulaires, peut être présent au niveau des sites d'insertion osseuse du tendon (enthèses).

Les liaisons intra- (liaisons faibles) et extra-chaîne (liaisons faibles et fortes par la formation de ponts aldoliques entre structures trimériques) participent à la résistance et la solidité des tendons (Franchi, Trire et al. 2007).

Les microfibrilles de collagène décrites précédemment sont constituées d'un enchaînement régulier de cinq molécules de tropocollagène, agencées parallèlement et de manière échelonnée. Ces microfibrilles s'assemblent ensuite pour former les fibrilles, les fibres puis les faisceaux du tendon.

Différents facteurs de croissance et cytokines peuvent induire la synthèse du collagène, comme IL-1, IL-4, TGF $\beta$ , IGF-1, et FGF (Rossert, Terraz et al. 2000).

## ✓ Les glycosaminoglycanes et protéoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des polysaccharides anioniques qui se lient par liaisons covalentes à des chaînes peptidiques (à l'exception de l'acide hyaluronique qui reste libre) pour former des molécules appelées protéoglycanes (PG).

Même si les protéoglycanes (PG) ne représentent que 1 % de la matière sèche, ils contribuent de façon significative à la fonction structurale et biomécanique de la MEC (Parkinson, Samiric et al. 2011). Les PG situés dans les tendons peuvent être classés en deux groupes : les SLRPs (« small leucine-rich proteoglycans ») et les larges protéoglycanes d'agrégation (famille des lecticanes).

Comme leur nom l'indique, les SLRPs sont caractérisés par la répétition de résidus leucine. Ces protéines ont en général une structure en forme de fer à cheval qui facilite les interactions protéine-protéine, permettant notamment la liaison au collagène. Parmi les SLRPs, la décorine constitue le PG le plus abondant de la matrice tendineuse. D'autres SLRPs sont présents, comme le biglycane et la fibromoduline.

Les SLRPs sont connus pour se lier aux fibrilles de collagènes et jouent un rôle majeur dans la fibrillogenèse du collagène. Ils participent également à la modulation de l'accessibilité des facteurs de croissance et à la régulation de la croissance cellulaire.

Très importante dans les tendons, la décorine se lie aux collagènes de type I et III, ainsi qu'à la fibronectine, favorisant la formation des fibres de collagène fonctionnelles en augmentant leur stabilité. Des études menées sur des souris dont les gènes codant pour des SLRPs ont été inactivés (souris « knockout » pour décorine, biglycane, fibromoduline) ont en effet montré une formation anormale des fibrilles de collagène, de diamètre plus petit, ayant pour conséquence des tendons faibles et moins rigides (Parkinson, Samiric et al. 2011).

Les larges PG (lecticanes) sont quant à eux représentés au sein des tendons par les molécules d'agrécane et de versicane. Ces molécules ont pour principale fonction de conférer rigidité aux tendons, leur permettant de résister aux compressions. Ces larges PG sont caractérisés par la présence de domaines globulaires séparés par des GAG. Le monomère d'agrécane dispose par exemple de trois domaines globulaires, permettant notamment la liaison avec d'autres constituants de la MEC comme l'acide hyaluronique. Agrécane et versicane ont également la particularité de disposer d'un grand nombre de chaînes GAG chargées négativement, leur permettant d'attirer et de se lier aux molécules d'eau présentes dans le tendon. Au niveau du site d'insertion à l'os, la région de nature plutôt fibrocartilagineuse dispose d'un nombre plus élevé de ces deux PG et disposerait également d'un autre PG (proteoglycane 4) qui aurait un rôle de lubrifiant (Parkinson, Samiric et al. 2011).

### ✓ **Les glycoprotéines**

Les glycoprotéines sont un groupe de protéines glycosylées dont fait partie COMP (« cartilage oligomeric matrix protein »). D'abord découverte dans les cartilages, COMP est abondamment présente dans les tendons. De la famille des thrombospondines, COMP dispose de domaines de liaison au collagène (de type I dans les tendons et de type II dans les cartilages). COMP est également capable de se lier à des protéoglycanes, notamment à la fibromoduline, et sa fonction est liée à la fibrillogenèse. COMP participe ainsi à l'organisation structurale des tendons.

La fibronectine et la ténascine-C sont deux autres glycoprotéines présentes dans le tendon. La ténascine-C est abondante essentiellement dans les tendons en développement, puis diminue dans les tendons matures, sauf en cas de tendinopathie. La ténascine-C est impliquée dans l'adhésion, la croissance, la migration et la différenciation des cellules. Elle interagit avec la fibronectine, une autre glycoprotéine qui se lie aux intégrines transmembranaires des cellules. La fibronectine peut également se lier aux protéoglycanes et au collagène.

### ✓ **L'élastine**

L'élastine est une protéine élastique peu abondante dans le tendon. Les fibres élastiques ne représentent que 1 à 2 % de la masse sèche du tendon. Le tendon est de ce fait une structure peu élastique, rigide, et ce sont principalement les fibres de collagène qui participent à son étirement. Néanmoins, ces fibres élastiques participent au rétablissement de la configuration « normale » des fibres de collagène lors de l'étirement du tendon (Kannus 2000).

### ✓ **Les métalloprotéinases**

Outre les composants structuraux de la MEC tendineuse, les ténocytes sécrètent également des protéases (enzymes protéolytiques) permettant de dégrader ces différents composants matriciels. Ces protéases sont appelées métalloprotéinases (MMPs). Il existe différentes MMPs selon leur spécificité de dégradation : par exemple, MMP9 et MMP13 (collagénase 3) sont responsables de la dégradation du collagène, et MMP3 est entre autre capable de

dégrader plus spécifiquement la fibronectine et le collagène de type 3. Cette dernière protéase, MMP3, est notamment associée à la maintenance normale du tendon ainsi qu'à sa réparation.

Dans les conditions normales d'un tendon sain, ces MMPs participent naturellement au renouvellement de la MEC. Pour cela, les ténocytes synthétisent aussi des inhibiteurs de ces MMPs, les TIMPs (« tissue inhibitor metalloproteinases », qui permettent de réguler l'activité protéolytique de dégradation de la matrice. Une interaction importante existe entre MMPs et TIMPs afin de permettre le renouvellement de la MEC, c'est-à-dire le remplacement des éléments usés par de nouveaux composants. Toutefois, comme nous le verrons dans le cas des tendinopathies, des MMPs peuvent être libérés par des cellules stressées ou endommagées et induire une dégradation incontrôlée de la MEC.

### **3.1.3. Fonction**

Partie intégrante du système musculo-squelettique, le tendon agit pour transmettre les forces musculaires au système squelettique. Sorte de médiateur entre le muscle et l'os, le tendon joue un rôle important dans le mouvement et la locomotion. Il est en effet une composante essentielle pour le mouvement articulaire, participant à la stabilisation des articulations. Contrairement au muscle auquel il est lié, le tendon ne produit pas lui-même le mouvement, mais il va permettre de mobiliser les os autour d'une articulation donnée en transmettant la force musculaire aux pièces osseuses.

Les tendons font bien plus qu'assurer la liaison entre le muscle et l'os. Chez le cheval, les tendons fléchisseurs du doigt doivent supporter le poids du corps et fonctionnent également comme des ressorts, absorbant et libérant l'énergie élastique durant les différentes phases de la foulée. Ainsi, en plus de contribuer à la locomotion, ils jouent aussi un rôle d'amortisseur pour le membre (Richardson, 2007 #1905).

Principal support mécanique du corps, le collagène est une protéine de grande stabilité mécanique qui confère au tendon rigidité et résistance.

Avec leur composition fibrillaire et l'organisation hiérarchique des fibres et fibrilles de collagène, les tendons sont naturellement très solides, ayant une résistance de traction de 49 à 98 N/mm<sup>2</sup>. Principal composant des tendons, le collagène est capable de résister aux forces

exercées sur les tendons et aurait un point de rupture comparable à celui de l'acier (Giffin and Stanish 1993). Les liaisons entre les fibres de collagène et les autres composants de la matrice tendineuse participent également à la transmission et l'absorption des forces (Franchi, Trire et al. 2007).

Ainsi, l'ensemble de la structure du tendon est étroitement corrélé à sa fonction.

## **3.2. Les tendinopathies équinés et leur traitement**

### **3.2.1. Physiopathologie**

Par sa nature, le cheval est un véritable athlète et peut souffrir, tout comme l'homme, de troubles de l'appareil locomoteur. Les tendinopathies représentent une des pathologies les plus fréquentes, faisant souffrir bon nombre de chevaux.

Même si les tendons sont des structures très solides, des efforts répétés et une inflammation peuvent les fragiliser et entraîner la rupture de fibres, voir la rupture complète du tendon.

#### **3.2.1.1. Définition**

Les tendinopathies représentent l'ensemble des atteintes ou pathologies des tendons. Bien que le terme « tendinites » soit communément employé, ce dernier ne reflète pas toutes les lésions tendineuses et a ainsi été remplacé par « tendinopathies ». Une tendinite correspond en réalité à une inflammation du tendon, or toutes les lésions tendineuses ne sont pas forcément accompagnées de phénomène inflammatoire. Les tendinoses sont par exemple une dégénération des tendons, non inflammatoire, due à une atrophie qui peut être liée à l'âge, à des microtraumatismes ou à une atteinte vasculaire ne permettant pas d'oxygéner correctement le tissu (Giffin and Stanish 1993).

Il existe ainsi différents types de tendinopathies, selon leur position au sein du tissu, leur degré d'atteinte (degré de désorganisation de la matrice tendineuse, rupture plus ou moins importante de fibres), et selon l'inflammation. On distingue notamment les tendinites aiguës, correspondant à une atteinte récente, et les tendinites chroniques, correspondant généralement aux récurrences dues à la mauvaise réparation du tissu dans le temps. Selon la localisation de la lésion, les gaines synoviales peuvent également être atteintes et donner alors lieu à une « ténosynovite » (avec inflammation de la synoviale) (Giffin and Stanish 1993).

De plus, chez le cheval, une lésion du ligament suspenseur du boulet est appelée « desmite ».

L'examen clinique est d'abord basé sur la palpation des membres. En phase aiguë, le membre atteint est engorgé, chaud et douloureux à la palpation (Figure 33). Ceci traduit une hémorragie, un œdème et une accumulation de fibrine au sein du tendon lésé. Une boiterie



peut être apparente, essentiellement lors des phénomènes inflammatoires. Dans les cas de tendinite chronique, une boiterie peut apparaître suite à l'échauffement, ou suite à un effort ou à la fatigue. Un examen échographique permet de déterminer le site et la gravité de la lésion. Les ondes ultrasons vont en effet renvoyer une image de la structure du tendon : l'échographie permet d'observer l'épaisseur et l'alignement des fibres de collagène, ou leur désorganisation. Cette désorganisation est reflétée notamment par la présence de zones hypoéchogènes qui apparaissent comme des « lacunes ». Cela dit, le terme « lacune » est ambigu et ne signifie pas qu'il y a un trou (sauf peut-être dans les modèles expérimentaux de tendinite induite à la collagénase). En fait, lorsque les fibres sont désorganisées, elles sont alors orientées dans tous les sens (isotropie de distribution) et non plus parallèlement (anisotropie de distribution), les ondes sont alors elles-mêmes renvoyées dans toutes les directions et il en résulte une zone noire visuellement.



**Figure 33 : Tuméfaction d'un membre antérieur atteint de tendinite du tendon du fléchisseur superficiel du doigt.**

Chez le cheval, les tendons les plus atteints sont les tendons des muscles fléchisseurs superficiel et profond du doigt (TFSD et TFPD), ainsi que le ligament suspenseur du boulet (LSB). Supportant 60 à 65 % du poids du cheval, les membres antérieurs sont plus souvent atteints que les postérieurs (Adams 1974). Les antérieurs doivent en effet à la fois supporter le poids du corps en mouvement et assister en plus les postérieurs dans la propulsion.

L'anatomie permet de mieux comprendre l'importance de ces structures et leur vulnérabilité.

### **3.2.1.2. Anatomie**

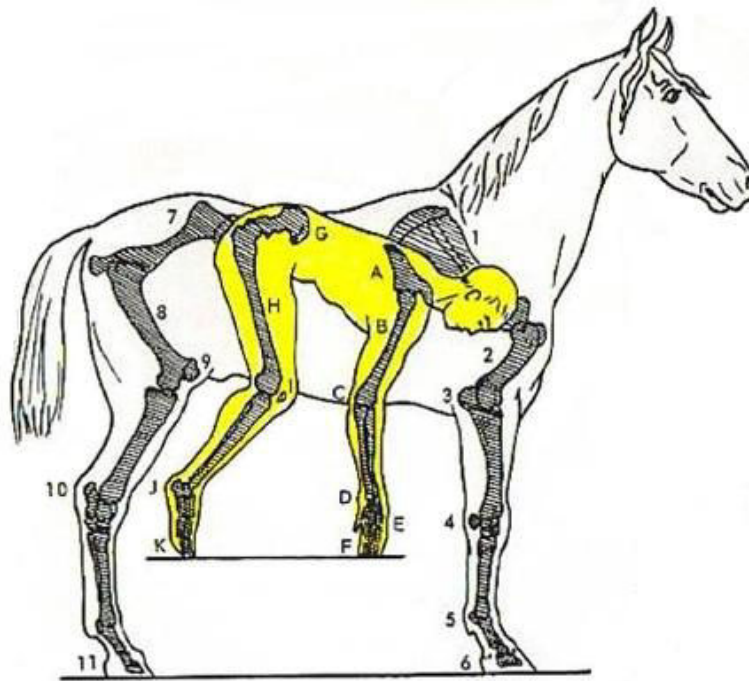
Afin de favoriser le comportement de fuite face aux prédateurs, l'évolution a fait du cheval un animal de grande taille se déplaçant sur un unique doigt, avec des membres fins, élancés.

En comparaison à l'homme, les os du carpe correspondant au poignet sont communément et faussement appelés « genou » chez le cheval, et toute la partie sous-jacente correspond en réalité à la main (Figure 34).

Cette correspondance anatomique entre l'homme et le cheval permet de comprendre que les TFSD, TFPD et LSB sont d'importantes et longues structures participant activement au soutien et à la mobilisation des membres.

Ces trois tendons représentent l'appareil suspenseur du boulet et participent à la flexion du boulet. Le tendon le plus en arrière est le tendon perforé, ou tendon du fléchisseur superficiel du doigt (TFSD), puis devant, le perforant, ou tendon du fléchisseur profond du doigt (TFPD), avec sa bride carpienne de renforcement, et finalement, contre l'os du canon (métacarpe pour l'antérieur ou métatarse pour le postérieur), le suspenseur du boulet (Figure 35). Ce dernier porte le nom de « ligament » suspenseur du boulet (LSB), bien qu'il soit apparenté à un tendon par sa structure, son anatomie et sa fonction. Le LSB est en fait le vestige du muscle interosseux III (Barone 1966).

Toutes ces structures sont enveloppées individuellement dans une gaine de tissu conjonctif élastique et le tout est regroupé dans une aponévrose\*.



Membre antérieur		Cheval	Homme
1-A	Scapula ou omoplate	Epaule	Epaule
2-B	Humérus	Bras	Bras
3-C	Olécrane	Coude	Coude
3-4-C-D	Radius et Cubitus	Avant-bras	Avant-bras
4-D	Carpe	« Genou »	Poignet
4-5-D-E	Métacarpes		
5-6-E-F	Phalanges		
6-F	Enveloppe cornée	Sabot	Ongle
4-5-6-D-E-F		Canon, boulet, paturon, couronne et pied	Main

Membre postérieur		Cheval	Homme
7-G	Iléum et os coxaux	Hanches et croupe	Hanche et bassin
8-H	Fémur	Cuisse	Cuisse
9-I	Rotule	Grasset	Genou
9-10-I-J	Tibia et péroné	Jambe	Jambe
10-J	Calcanéum	Pointe du jarret	Talon
10-11-J-K	Métatarses et phalanges	Canon, boulet, paturon, couronne et pied	Pied

Figure 34 : Comparaison entre l'homme et le cheval.



**Figure 35 : Anatomie de l'extrémité distale du membre antérieur du cheval, vue latérale gauche.** Adapté de (Richardson, Dudhia et al. 2007). Abréviation : M pour muscle.

Le TFSD se situe juste sous la peau, en arrière du métacarpe (ou du métatarse). Il commence au-dessus du carpe (ou du tarse) où il est lié au muscle fléchisseur superficiel, lequel commence au niveau du coude (pour le membre antérieur). Un ligament accessoire (bride radiale) situé vers la jonction musculo-tendineuse permet de protéger cette dernière des étirements excessifs. Dans le canal carpien, le tendon est également protégé par un récessus synovial\*, le liquide synovial\* permettant ainsi d'éviter les frottements liés à la mobilisation des articulations radio-carpienne, médio-carpienne et carpo-métacarpienne. A proximité du boulet, le TFSD vient envelopper le TFPD (Manica flexoria, ou anneau du tendon perforant) (Annexe 3). Puis, au niveau du paturon, l'extrémité distale du tendon se divise en deux branches qui viennent s'insérer sur les éminences latérales proximales de la deuxième phalange. Le TSFD participe ainsi à la flexion du boulet.

En avant du TFSD, le TFPD et le LSB longent également le métacarpe principal (ou métatarse pour les membres postérieurs). Le TFPD s'attache également à un muscle qui commence au niveau du coude et dispose aussi d'un ligament accessoire (bride carpienne) permettant d'éviter les étirements excessifs. Passant ensuite entre les deux branches terminales du TFSD, le TFPD continue sa course jusqu'à la phalange distale où il s'insère. Son enthèse\* (site d'insertion à l'os) est élargie en une aponévrose palmaire et la bourse podotrochléaire (synoviale) permet le glissement du TFPD à la surface de l'os sésamoïde distal.

Dans son extrémité distale, le LSB est quant à lui inséré latéralement sur les os grands sésamoïdes à partir desquels il délivre également une branche pour le tendon du muscle extenseur dorsal du doigt (Figure 35).

A quelques détails près, la configuration est la même entre le membre antérieur et le membre postérieur (Barone 1966).

Ainsi, par sa position anatomique, étant plus exposé, le TFSD (ou perforé) est plus fragile que le TFPD (ou perforant). Le suspenseur du boulet est quant à lui également sujet aux atteintes, malgré sa situation plus « profonde », subissant les contraintes d'allongement répétées lors de la réception des obstacles par exemple.

De plus, la position anatomique de ces tendons permet de les palper assez facilement.

La palpation des tendons, membre à l'appui ou au soutien, doit être indolore. En revanche, il ne faut pas confondre douleur et sensibilité normale car le LSB est particulièrement riche en fibres nerveuses sensibles et le perforé est contourné par un petit filet nerveux qui peut entraîner un mouvement réflexe lorsque celui-ci est pincé.

### **3.2.1.3. Etiologie**

Les lésions tendineuses peuvent se produire suite à un seul évènement (contrainte excessive) ou suite à une fatigue résultant de l'accumulation de charges cycliques sur le tendon (Dowling and Dart 2005).

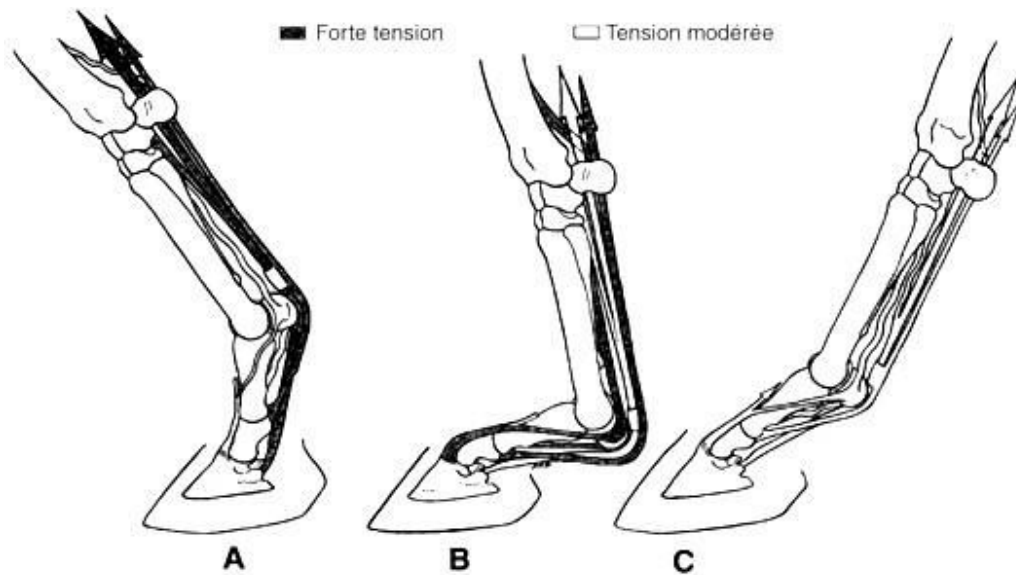
Certains facteurs prédisposent à l'apparition de lésions tendineuses. Ces causes intrinsèques sont l'âge, la morphologie (la conformation du cheval, les mauvais aplombs et une mauvaise ferrure), l'état du cheval (fatigue ou cas de déshydratation par exemple, sachant qu'un tendon est normalement constitué jusqu'à 70 % d'eau). Les causes extrinsèques sont quant à elles les accidents (traumatisme), les efforts excessifs, les coups... L'apparition des tendinopathies peut également être liée à des facteurs hormonaux ou médicamenteux (le cheval supporte par exemple assez mal les corticothérapies).

Les tendons peuvent être coupés par des objets tranchants (comme des fils de fer barbelés) ou meurtris en étant frappés par un autre membre (lorsqu'un postérieur vient toucher un antérieur), ou même endommagés par des bandages trop serrés. Des entraves au-dessus du boulet sont un motif de blessure au tendon.

Une tension excessive sur les tendons causée par un étirement excessif soudain ou répété (surcharge) est également une cause fréquente de dommages (Giffin and Stanish 1993), dus finalement à une mauvaise méthode de travail, trop intensive, non progressive, voir abusive. Même les jeunes chevaux mis au travail trop rapidement peuvent facilement subir des blessures mineures qui vont affaiblir la structure du tendon, risquant alors de « casser ». Mais un sur-étirement soudain peut aussi être simplement causé lors d'un « faux pas », lorsqu'un animal fatigué trébuche maladroitement sur un sol imparfait.

La biomécanique de la partie digitale du membre permet de comprendre ces phénomènes de surcharge (Figure 36) : les tendons sont naturellement soumis à de fortes tensions qui provoquent leur étirement. Les tensions maximales dans le TFSD d'un pur-sang ont par

exemple été mesurées à 16 % au cours du galop (Stephens, Nunamaker et al. 1989). Cependant, les déformations mesurées *in vitro* indiquent que le seuil de défaillance du TFSD se situe entre 10 % et 20 % (Goodship, Birch et al. 1994), ce qui indique que le TFSD fonctionne proche de sa limite fonctionnelle. Il est donc facile d'imaginer que, lors d'exercices trop importants et d'un mauvais échauffement (ou de la fatigue), ces structures peuvent se résoudre à lâcher.



**Figure 36 : Biomécanique des tendons fléchisseurs du doigt et du suspenseur du boulet. (a) Propulsion ; (b) Phase d'appui ; (c) Réception. D'après (Denoix 1994).**

En plus de la fatigue, de mauvais aplombs ou une mauvaise conformation des sabots (mauvaise ferrure ou mauvais parage) peuvent prédisposer aux tendinopathies en provoquant des contraintes non uniformes sur les tendons (Lawson, Chateau et al. 2007). Par exemple, les chevaux longs en pince\* avec un talon bas semblent particulièrement vulnérables aux lésions tendineuses, ce qui n'est pas étonnant étant donné que le TFPD inséré sur la troisième phalange est alors sujet à d'avantages de contraintes. De plus, les chevaux présentant une boiterie pour une raison quelconque peuvent également surcharger le tendon du membre opposé. Le travail du cheval sur un mauvais sol peut également favoriser les lésions : alors qu'un sol trop dur peut causer des lésions ostéo-articulaires, un sol trop mou augmentera les contraintes et l'étirement des tendons, favorisant donc les lésions tendineuses. L'importance de la qualité des sols a mené des sociétés à proposer de nouveaux matériaux, ce qui a sollicité

des études pour tester l'influence de différents types de surfaces sur les tendons des chevaux (Crevier-Denoix, Pourcelot et al. 2009).

Ainsi, les causes d'apparition des tendinites sont variées, mais la première cause est malgré tout humaine : les causes purement accidentelles sont bien moins fréquentes que les causes liées au travail du cheval (efforts soudains ou répétés, mauvais échauffement, fatigue, mauvaise ferrure...).

#### **3.2.1.4. Processus de cicatrisation naturelle**

Les ténocytes étant impliqués dans la synthèse et la sécrétion de la MEC tendineuse, ils participent évidemment à la réparation naturelle des tendons en cas de lésion. Cependant, cette réparation est loin d'être optimale et conduit à une fragilisation du tendon. Les ténocytes sont en effet incapables de régénérer parfaitement un tendon lésé et la structure du tendon réparé est différente de celle du tendon d'origine.

Alors que le nombre de ténocytes est élevé lors de la croissance, permettant la maturation des tendons (vers 2-3 ans chez le cheval), une fois les tendons matures, la cellularité\* diminue ensuite avec l'âge. Le nombre de liaisons intercellulaires (communication via des jonctions « gap ») diminue également. Ces jonctions influençant la synthèse de collagène, les ténocytes synthétisent moins de collagène de type I. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi les ténocytes ne sont pas capables de réparer naturellement et correctement un tendon lésé (Young, Becker et al. 2009). Mais les tendinopathies engendrent des phénomènes plus complexes...

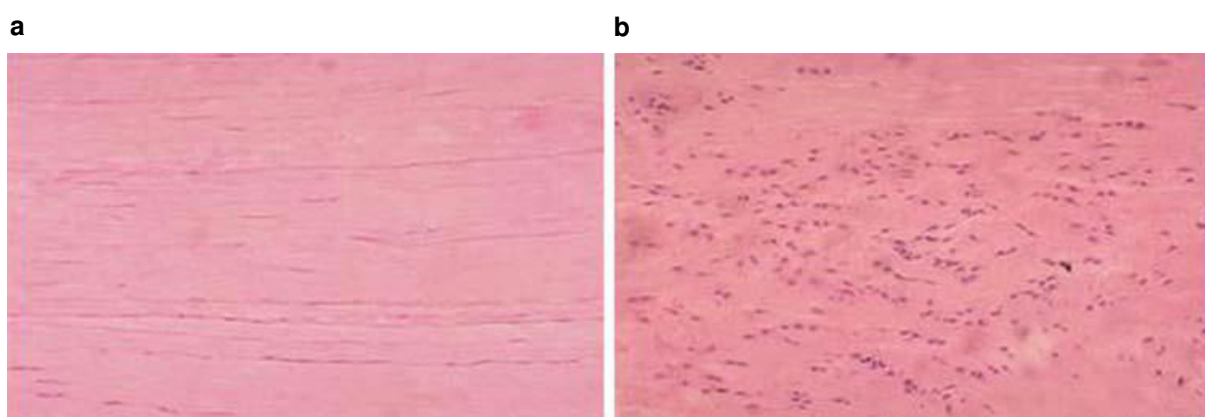
Lors d'une lésion tendineuse, la cellularité augmente au niveau du tendon atteint (Figure 37) et est ainsi accompagnée de modifications qualitatives et quantitatives dans la composition de la MEC.

Les changements moléculaires majeurs incluent une augmentation du collagène de type III, au détriment du type I (changement du ratio Col III/Col I), ainsi qu'une augmentation de fibronectine, de tenascine-C, d'agrécan et de biglycane (Corps, Robinson et al. 2006; Riley 2008; Parkinson, Samiric et al. 2011).



Même si ces changements reflètent l'activité de réparation des ténocytes, ce remodelage de la MEC contribue à la fragilisation des tendons. Ceci est en partie dû au fait que la structure néoformée n'est pas autant capable de supporter les forces exercées sur les tendons, en comparaison avec la structure d'origine qui elle, est particulièrement riche en Col I (Riley 2008). Les fibrilles de collagène de type III formées « en urgence » au cours du processus de réparation ont un diamètre généralement plus mince par rapport aux fibrilles de collagène de type I. Pour la réparation rapide du tendon blessé, ces fibrilles de Col III sont rapidement synthétisées pour rétablir une certaine résistance et une élasticité. Toutefois, ces fibrilles n'ont pas la qualité et les propriétés fonctionnelles du Col I et ne sont pas capables de supporter les mêmes forces (Dahlgren, Brower-Toland et al. 2005).

Ces modifications de la MEC sont finalement visibles lors des examens échographiques qui peuvent montrer le mauvais alignement des fibres tendineuses et une épaisseur anormale du tendon due à la « désorganisation » des composants de la MEC. Des coupes histologiques réalisées sur animaux euthanasiés ont également prouvé cet « désorganisation » au sein des lésions tendineuses (Figure 37).



**Figure 37 : Coupes histologiques de tendon sain (a) et de tendon lésé (b).** Un tendon sain montre une organisation structurale homogène, avec des fibres alignées longitudinalement à l'axe du tendon et des ténocytes allongés intercalés entre les fibres de collagène (a). Un tendon lésé présente en revanche une structure désorganisée avec une augmentation du nombre de ténocytes arrondis (b). D'après (Xu and Murrell 2008).

De plus, étant donné que les larges protéoglycanes comme agrécane peuvent attirer les molécules d'eau et s'y lier, leur augmentation au sein du tendon lésé peut expliquer le gonflement (œdème) souvent observé au niveau du membre atteint (Parkinson, Samiric et al. 2011). Ceci doit contribuer également à la dégénérescence des fibres de Col I.

D'autres molécules sécrétées par les ténocytes interviennent dans le remodelage de la MEC, les métalloprotéinases\* (MMPs). Alors que leur niveau d'expression global dans un tendon sain est assez bas (juste de quoi remodeler naturellement la MEC), certaines MMPs voient leur expression augmenter dans les tendons atteints, participant donc activement à la dégradation de la MEC. Parmi ces MMPs, MMP-9, ADAM-12, MMP-23, ainsi que TIMP-1, ont été rapportées comme étant augmentées dans les tendinopathies (Riley 2008; Parkinson, Samiric et al. 2011).

Le but est donc de trouver une solution thérapeutique efficace pour régénérer les tendons, c'est-à-dire obtenir une structure identique à l'original et éviter ce remodelage trop inadéquate et fragilisant. Favoriser la synthèse de collagène de type I fait notamment partie des priorités.

### **3.2.2. Traitements des tendinopathies**

#### **3.2.2.1. Les traitements classiques**

Les traitements classiques (Tableau 7) ont pour objectifs d'aider la guérison naturelle des tendons (Henninger 1994).

En phase aiguë, ces traitements visent d'abord la diminution de l'inflammation et de la douleur. Pour cela, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont couramment employés, parmi lesquels, la phénylbutazone et le ketoprofène. Cependant, leur administration fait débat : il est question de savoir si la phase inflammatoire, faisant partie du processus naturel de réparation tendineuse, est bénéfique ou non. De plus, des études récentes ont montré que certains AINS (indométhacine, naproxène) peuvent diminuer la prolifération des ténocytes et la synthèse de GAGs (Riley, Cox et al. 2001), et n'empêcheraient pas la propagation de la lésion tendineuse (Marsolais and Frenette 2005).

Les corticoïdes (dexaméthasone) peuvent être administrés à la place des AINS (injections intra- et/ou péri-lésionnelles), mais leur utilisation est peu recommandée et doit être très brève en raison de leurs effets secondaires délétères à la réparation tendineuse : ils inhibent la sécrétion protéique (Riley 2008), ce qui ne favorise pas la réorganisation de la matrice tendineuse, et ils seraient également capables d'induire l'apoptose dans les ténocytes (Hossain, Park et al. 2008). De plus, le cheval supporte assez mal les corticothérapies qui

peuvent entre autre être la cause de troubles digestifs (coliques) et de l'apparition de fourbure\*.

Le dyméthylsulfoxyde (DMSO) est également utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires ou pour favoriser la pénétration dans les tissus d'autres substances appliquées localement (comme les vésicatoires). Néanmoins, ce produit affaiblirait la structure du tendon (Verwilghen et al. 2010).

A l'opposé de ces traitements médicamenteux destinés à réduire l'inflammation, une méthode vise au contraire à provoquer l'afflux de cellules inflammatoires : la cautérisation. Ceci était traditionnellement effectué au moyen d'un thermocautère (« feux »), puis remplacé par les vésicatoires. Les feux consistent à appliquer un fer rouge le long du tendon (en traits transversaux ou en pointes), de façon à provoquer un afflux de cellules sanguines (et de facteurs de croissance) et une inflammation. Les vésicatoires sont des onguents provoquant également des brûlures et agissant ainsi de la même manière que les feux. Ces techniques étaient couramment employées il y a une vingtaine d'années. Même si leur utilisation a maintenant diminué, ces techniques restent cependant assez barbares et l'efficacité réelle de telles pratiques n'a jamais pu être prouvée (Verwilghen et al. 2010).

D'autres traitements médicamenteux sans rapport avec l'inflammation peuvent être utilisés. L'antiphlogistine est couramment employée pour limiter l'œdème (application locale, cataplasme). Des produits injectables sont également employés pour cette fois favoriser la cicatrisation tendineuse et la synthèse des constituants de la matrice tendineuse (Col I, GAGs, etc). Parmi ces produits, on retrouve comme en chirurgie esthétique l'acide hyaluronique (en injection intra- ou péri-tendineuse), mais aussi des glycosaminoglycanes sulfatés. Dans les années 90, le fumarate de  $\beta$ -aminopropionitrile (Bapten<sup>®</sup>) est vite devenu « à la mode » aux Etats-Unis, en montrant son efficacité par le retour rapide au travail des chevaux traités, mais ce produit a finalement été retiré du marché. Il favorisait l'alignement des fibres de collagène en inhibant les liaisons intra- et inter-fibrillaires mais ralentissait finalement la cicatrisation et plus de 40 % des chevaux tendineux traités récidivèrent (Verwilghen et al. 2010).

Comme chez l'homme, des traitements chirurgicaux existent chez le cheval (Tableau 7), mais ceux-ci restent peu utilisés en raison des risques non négligeables que représentent ces actes invasifs sur le cheval. De plus, leur efficacité est contestée puisque la convalescence est

finaleme nt très longue (jusqu'à 24 mois) et le cheval ne retrouve pas forcément ses performances (Verwilghen et al. 2010; Maffulli, Longo et al. 2010).

Les méthodes classiques comprennent également des traitements nettement moins rudes, non invasifs : l'inflammation peut notamment être diminuée par la simple application de froid (douche froide, bandages froids, cryothérapie). L'hydrothérapie (douche prolongée du tendon lésé ou exercices adaptés en piscine pour chevaux) peut également contribuer à favoriser la réparation tendineuse (notamment par activation du drainage lymphatique).

De plus, le maréchal-ferrant a un rôle important à jouer afin de confectionner une ferrure orthopédique sur mesure pour soulager les tendons : parage et élévation du talon par une ferrure correctrice adaptée contribuent à l'amélioration de la lésion (Lawson, Chateau et al. 2007).

Mais avant tout, le repos est finalement le traitement classique le plus efficace, consistant à laisser le temps aux cellules de réparer la matrice tendineuse. Cette réparation est longue : dans un premier temps, les ténocytes synthétisent du collagène de type III afin de combler rapidement le manque de collagène, puis le collagène de type I est synthétisé de manière progressive. Des études *in vitro* et *in vivo* (notamment chez le rat) ont en effet montré l'intérêt de l'immobilisation dans la guérison des tendons, avec entre autre une diminution de la synthèse de Col III (Killian, Cavinatto et al. 2012). Cependant, comme on l'a vu précédemment, le tissu cicatriciel finalement formé est plus fragile et le tendon peut facilement être sujet à récurrence.

Même si le repos est nécessaire, une inactivité totale n'est pas non plus préconisée. En effet, les longs tendons comme les TFSD et TFPD disposent d'une gaine synoviale qui doit rester active pour éviter les adhérences. Le succès de la réparation de ces tendons nécessite l'entretien des propriétés de glissement de la synoviale, or ceci n'est pas possible en cas d'immobilisation totale qui favorise au contraire les adhérences. Il est ainsi préconisé d'exercer un mouvement passif, sans force musculaire, permettant au tendon de se déplacer naturellement dans sa gaine (Killian, Cavinatto et al. 2012). L'activité, à condition qu'elle soit douce et très progressive, a ainsi un effet sur la guérison.

Ceci rejoint l'idée d'Andrew Taylor Still (1828-1917), fondateur de l'ostéopathie, qui avait pour principe fondamental « Life is movement – Movement is life » (la vie c'est le mouvement, et vice versa).

En parlant d'ostéopathie, les tendinites sont justement une des indications des traitements ostéopathiques. Ceux-ci consistent à éviter les adhérences et libérer les tendons des tensions via un étirement passif exercé à partir du boulet. Cette manipulation aiderait à réduire la lésion, favorisant une meilleure circulation sanguine et activant le drainage lymphatique en libérant les tissus locaux congestionnés.

Mais aucun de ces traitements ne constitue une réelle solution thérapeutique puisque, même si certains d'entre eux peuvent aider à diminuer la lésion, aucun n'est réellement efficace à long terme. Les chevaux font en effet bien souvent l'objet de récurrences, le tissu cicatriciel formé étant plus fragile que le tissu originel.

Face à l'échec des traitements classiques, de nouvelles initiatives sont testées, comme l'application d'ondes de choc (van der Worp, van den Akker-Scheek et al. 2012), ou des injections de plasma riche en plaquettes (PRP) qui contient de nombreux facteurs de croissance, parmi lesquels PDGF, TGF $\beta$ , IGF-1, VEGF, FGF et EGF (McCarrel and Fortier 2009). Ces nouvelles tentatives ne donnent en revanche aucune preuve concrète de leur efficacité dans le traitement des tendinopathies.

Le traitement des tendinopathies est maintenant tourné vers les thérapies d'avenir : la bio-ingénierie et la thérapie cellulaire. La recherche dans ce domaine est de plus en plus élaborée ; de nombreuses études sont orientées sur les facteurs influençant la synthèse de la matrice tendineuse (études *in vitro* et *in vivo* sur les facteurs de croissance), ou sur l'ingénierie tissulaire (comme on l'a vu au chapitre 2, recherche de biomatériaux afin de recréer une matrice tendineuse par exemple), et évidemment, sur les cellules souches. Combinant les cellules souches et la synthèse de facteurs de croissance, la thérapie génique est également un sujet de recherche d'actualité (Hoffmann and Gross 2007; Nixon, Watts et al. 2012; Rodrigues, Reis et al. 2012).

Le but est ainsi de trouver des traitements innovants permettant d'influencer la composition du tendon en évitant la formation du tissu cicatriciel fragile.

Type de traitement	Traitement	Mode d'action principal	Efficacité - Limites
Physiothérapie	Repos	Laisse le temps pour la réparation naturelle du tendon (synthèse de Col I)	Meilleurs traitements conventionnels, surtout lorsque combinés : aident à la guérison du tendon Mais tissu cicatriciel fragile et longue convalescence (6 à 24 mois)
	Hydrothérapie (douche ou piscine)	Diminue l'inflammation, favorise le drainage lymphatique Piscine : mouvements passifs favorisant la réparation de la matrice tendineuse	
	Bandages froids, cryothérapie	Diminuent l'inflammation aiguë et le métabolisme cellulaire	
	Ostéopathie, massages, et mobilisations passives	Evitent les adhérences, stimulent l'activité cellulaire et le flux sanguin	
Traitement orthopédique	Parage et ferrure adaptée	Soulagent les tendons	
Traitement médicamenteux	Antiphlogistine	Diminue l'œdème	Aucune efficacité prouvée
	AINS	Diminuent l'inflammation (par inhibition de la synthèse des prostaglandines)	Ne pas prolonger car délétères pour les fibres tendineuses (surtout les corticoïdes, peu recommandés) et utilisation controversée
	Corticothérapie	Diminuent l'inflammation (diminution globale de la synthèse protéique)	
	Acide hyaluronique	Favorise la cicatrisation, diminue les adhérences	Effets bénéfiques contestés
Traitement médical et chirurgical	Feux (cautérisation)	Provoquent une inflammation (sur tendinite chronique)	Technique barbare, aucune efficacité prouvée
	Vésicatoires (« feux liquides »)	Comme pour les feux	Brûlent la peau, aucune efficacité prouvée
	Ténotomie longitudinale	Influence la revascularisation	Méthode invasive Chirurgie lourde et risquée chez le cheval N'empêche pas la formation de tissu cicatriciel fragile Longue convalescence (6 à 24 mois)
	Desmotomie de la bride radiale	Implique le muscle fléchisseur superficiel pour le soutien du membre, soulage le tendon en déplaçant le centre de tension maximal	Comme pour la ténotomie Complication fréquente : desmite du LSB (due au report des charges sur cette structure)

**Tableau 7 : Récapitulatif des principaux traitements classiques des tendinopathies chez le cheval.**

### 3.2.2.2. Les thérapies cellulaires

Enfin, malgré les nombreuses tentatives de traitement, rien de réellement convainquant n'existait avant l'arrivée des cellules souches. Les cellules souches ont en effet révélé des résultats très satisfaisants et ont déjà permis à bon nombre de chevaux de reprendre le travail. Ce sont d'abord les cellules souches de la moelle osseuse (BMSCs) qui ont été utilisées, puis les cellules souches du tissu adipeux (ASCs) ont fait leur entrée (Richardson, Dudhia et al. 2007; Nixon, Dahlgren et al. 2008). Ces deux sources de cellules souches utilisées chez le cheval ont fait naître la société britannique VetCell (qui utilise les BMSCs) et la société américaine Vet-stem (qui utilise les ASCs). Ces sociétés détiennent pour l'instant le monopole dans le commerce des thérapies cellulaires, ayant montré l'efficacité d'une telle thérapie après avoir traité des milliers de chevaux tendineux. Une autre société européenne a vu le jour à partir d'études menées par des chercheurs de l'Université de Liège (Belgique) : la société BiopTis. Cette société commercialise des « trousseaux de prélèvement et de préparation » de PRP et de cellules souches de la moelle osseuse.

A noter que des études récentes portent également sur les cellules souches embryonnaires (Watts, Yeager et al. 2011), dont l'utilisation est moins controversée chez l'animal, mais qui exige cependant d'établir des banques de cellules souches et des lignées cellulaires pour faciliter la recherche. Certains chercheurs tentent même d'utiliser des cellules provenant d'autres espèces, comme par exemple des cellules amniotiques ovines (Muttini, Valbonetti et al. 2012), mais les études nécessitent d'être approfondies avant de pouvoir commercialiser de tels procédés. La société française Vetbiobank propose néanmoins depuis fin 2011 une banque de cellules souches de cordon ombilical, les cellules étant prélevées à partir de cordon de chevaux sélectionnés (allogreffe) ou directement à partir du cordon des poulains (cellules stockées pour une éventuelle autogreffe ultérieure).

Sans pour autant remettre en question leurs avancées majeures dans le domaine, les sociétés qui commercialisent une thérapie cellulaire pour traiter les tendinopathies équinées proposent des protocoles de traitement assez contraignants, avec certaines limites.

Rappelons en effet que les BMSCs, initialement peu nombreuses, nécessitent une phase de prolifération en culture cellulaire. Leur utilisation oblige donc au vétérinaire à effectuer deux interventions sur le cheval espacées dans le temps (une semaine d'intervalle), une pour le prélèvement, puis une seconde pour l'implantation des cellules. En revanche, BiopTis propose une injection extemporanée des BMSCs, en complément éventuellement de PRP, mais aucune

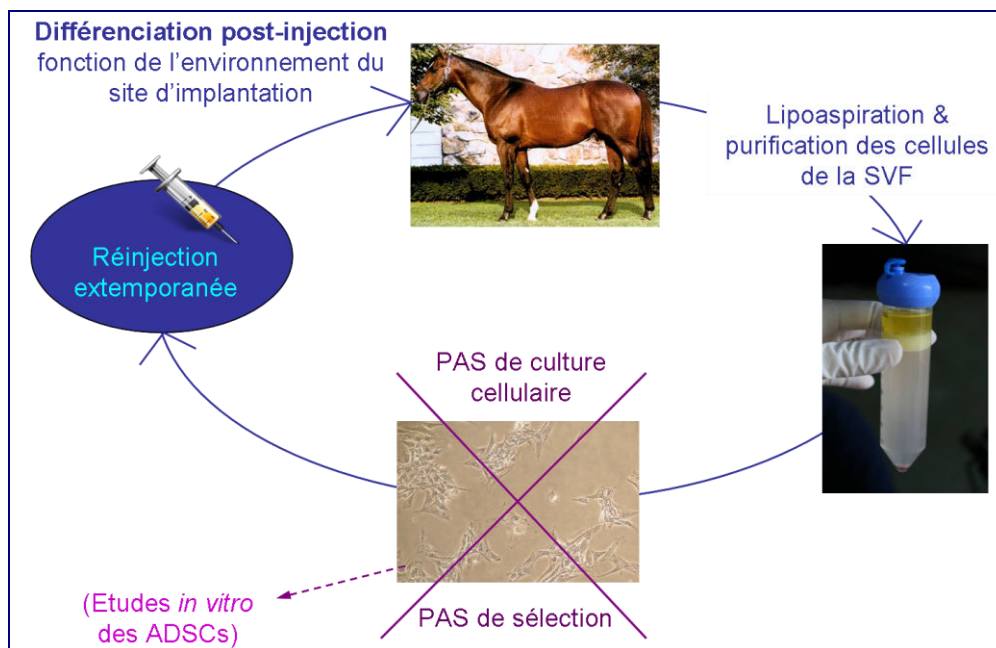
étude ne montre l'efficacité de leur méthode et encore une fois, rappelons que le nombre de cellules souches obtenues à partir de moelle osseuse est limité.

Malgré l'abondance des cellules souches dans le tissu adipeux, la société Vet-stem propose également un protocole impliquant deux interventions : le tissu adipeux est prélevé sur la région glutéale par exérèse (ce qui nécessite une suture) puis expédié dans un laboratoire pour extraire les ASCs qui sont réinjectées 2 jours après.

C'est en s'appuyant sur ces constats que la société TENO'sculpt est née...

La société TENO'sculpt (groupe STEMCIS) a voulu s'affranchir des contraintes et limites liées aux procédés de ses concurrents (notamment la contrainte temporelle), en mettant au point un procédé innovant permettant, de façon la plus simple possible, de prélever le tissu adipeux chez le cheval, de purifier les cellules de la SVF et de les réinjecter extemporanément (Figure 38 et Tableau 8).

Cette thèse a été réalisée dans ce but de mettre au point un protocole permettant l'élaboration d'un kit à usage unique destiné aux vétérinaires, dans le domaine de traitement des tendinopathies équinines.



**Figure 38 : Stratégie de TENO'sculpt.** La réinjection des cellules se fait directement après leur purification. La culture cellulaire n'est envisagée que dans les cas d'études *in vitro*.



Le tableau ci-après (Tableau 8) résume les différentes méthodes utilisées par les sociétés commercialisant un procédé de thérapie cellulaire pour traiter les tendinopathies équinés.

Société	Type de cellules	Traitement des cellules	Injection	Inconvénients
VetCell	BMSCs	Culture en laboratoire	1 semaine après	Expédition du tissu Culture Durée
Vet-stem	ASCs	Culture en laboratoire	2 jours après	Expédition du tissu Culture Durée
BiopTis	BMSCs	Pas de culture Eventuellement PRP en complément	Extemporaneé	Peu de cellules Efficacité ?
Vetbiobank	Cellules de cordon ombilical ou BMSCs	Banque de cellules souches (stockage à plus ou moins long terme) BMSCs cultivées	Après commande des cellules	Expédition des cellules de cordon rapide mais délai de 2 à 3 semaines pour les BMSCs
TENO'sculpt	ASCs	Pas de culture	Extemporaneé	-

**Tableau 8 : Thérapies cellulaires commercialisées.**

### **3.3. Utilisation des cellules souches du tissu adipeux pour traiter les tendinites du cheval**

Le cahier des charges du kit TENO'sculpt était d'apporter l'ensemble des éléments permettant d'effectuer le prélèvement, la purification et la réinjection en un temps de quelques heures et sur place, au pied du cheval patient, le tout étant effectué de façon stérile en système clos, sans nécessité de mise en culture et d'expansion cellulaire, et donc sans nécessité d'investir dans du matériel et une infrastructure lourds et trop coûteux.

Mon travail de thèse a permis en partie d'élaborer le protocole et la composition du kit comprenant tout le matériel nécessaire à chaque étape de la procédure (canules, tubes,

seringues, aiguilles, collagénase). Le protocole d'isolement des ASCs élaboré au cours de ce travail ne nécessite comme unique investissement qu'une centrifugeuse et qu'un petit incubateur rotatif à 37°C, facilement transportables en ambulatoire.

Ce kit complet est actuellement en cours de fabrication et devrait être disponible sur le marché début 2013. Après des tests préliminaires de validation du protocole chez quelques chevaux (en collaboration avec des vétérinaires de la Réunion et de France métropolitaine), ce kit est en cours d'évaluation dans une étude clinique réalisée au sein de la Clinique Desbrosse (Drs Perrin, Launois et Brogniez ; Saint Lambert des Bois, 78 ; <http://www.cliniquedesbrosse.fr>).

### **3.3.1. Optimisation des protocoles chez le cheval en faveur de la survie des cellules**

Suite à nos différentes études sur le tissu adipeux humain et ses cellules souches dérivées, les protocoles de prélèvement et de purification ont été optimisés chez le cheval.

#### **3.3.1.1. Prélèvement du tissu adipeux par lipoaspiration**

Jusque là, le prélèvement du tissu adipeux chez le cheval consistait à prélever un morceau de tissu adipeux sous-cutané après avoir réalisé une incision sur une dizaine de centimètres, pour obtenir en fin de compte 15 à 20 g de tissu adipeux, et nécessitant une fermeture de la plaie par des points de suture (Nixon, Dahlgren et al. 2008), laissant alors place à une cicatrice assez large (protocole Vet-stem). De plus, le tissu adipeux ainsi récupéré est exposé à l'air libre, pouvant donc se détériorer ou être contaminé par des pathogènes extérieurs.

Pour faire face à ces deux inconvénients majeurs, la société TENO'sculpt a privilégié un mode de prélèvement peu invasif, plus sûr pour le tissu, et couramment utilisé chez l'homme : la lipoaspiration.

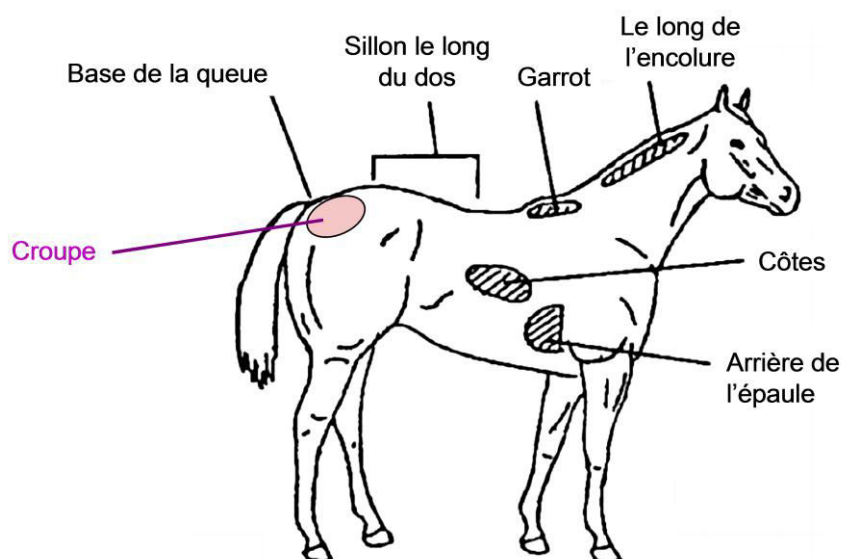
Le protocole de lipoaspiration utilisé initialement chez l'homme a ainsi été adapté au cheval.

### 3.3.1.1.1. Zone de prélèvement

Dans ce travail d'optimisation, la première étape a consisté à repérer les zones adipeuses pouvant être sujettes à la lipoaspiration.

De par son anatomie et sa conformation, le cheval a une répartition du tissu adipeux sous-cutané quelque peu différente de celle de l'homme. Les zones les plus abondantes sont l'encolure (tissu graisseux du ligament cervical, chignon), la croupe, l'attache de la queue, mais des zones adipeuses sont également référencées au niveau du garrot, de la ligne du dos, de l'arrière de l'épaule et des côtes (Figure 41) (Henneke, 1983) (Carroll and Huntington 1988). Ces zones ont été déterminées grâce à des études sur la « corpulence » du cheval : tout comme l'indice de masse corporel (IMC) établi chez l'homme, des critères de notation ont été attribués au cheval en fonction de son état corporel, corrélé au tissu adipeux. Ces notes sont basées sur des appréciations visuelles et manuelles, au moyen de palpations.

Des études préliminaires réalisées à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL) ont confirmé ces points d'anatomie clés grâce à des examens échographiques. Cependant, la croupe a été retenue comme zone de prélèvement privilégiée, étant la zone la plus facilement accessible et la moins risquée : la vascularisation et l'innervation de cette région ne laisse présager aucun risque de toucher un vaisseau (artère) ou un nerf importants (Barone 1966).



**Figure 39 : Sites anatomiques correspondant à des dépôts de tissu adipeux sous-cutané chez le cheval.** Ces sites ont souvent été utilisés pour la notation de l'état corporel du cheval (adapté de Henneke, 1983). La région de la croupe en rose indique le site choisi pour effectuer la lipoaspiration.

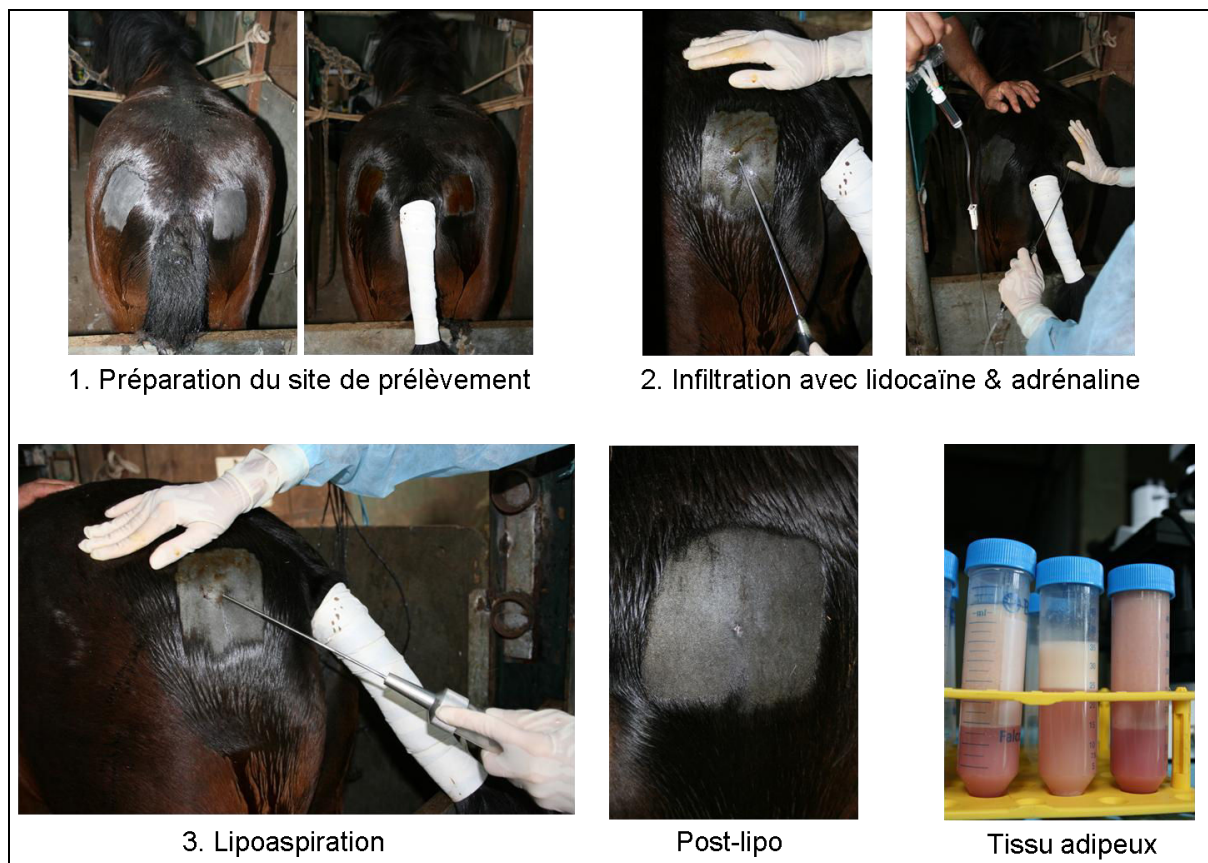
### 3.3.1.1.2. Procédure de lipoaspiration

Une fois la région de la croupe sélectionnée (pour son « moelleux » à la palpation), la zone est rasée et nettoyée, puis une petite incision d'1 à 2 mm est effectuée à l'aide d'une fine lame de scalpel.

La zone est préalablement infiltrée par une solution tumescence contenant de la lidocaïne (0,8 mg/mL) pour l'anesthésie locale, et de l'adrénaline (1 mg), un vasoconstricteur permettant d'éviter les saignements. Lidocaïne et adrénaline sont diluées dans un grand volume de Ringer Lactate (500 mL) et leur concentration finale tient compte de nos études sur les effets de ces drogues sur les cellules souches du tissu adipeux (Girard et al. 2012). Cette solution est infiltrée à l'aide d'une canule d'infiltration de 25 cm de longueur permettant d'irradier la zone de prélèvement (de la base de la queue, au-dessus de la tubérosité ischiatique, vers l'articulation coxo-fémorale et les épines iliaques dorso-crâniale et ventro-caudale). Une poche de 500 mL de cette solution permet d'infiltrer les deux côtés de la croupe (Figure 40).

Une fois la zone infiltrée, le tissu adipeux est prélevé manuellement, à la seringue de 50 mL, au moyen d'une canule de type « Mercedes » de 3 mm de diamètre et de 25 cm de long (Figure 40). Cette canule a été sélectionnée parmi d'autres après avoir effectué des tests de prélèvement sur plusieurs chevaux. Le choix s'est porté sur la canule permettant d'obtenir un tissu de meilleure qualité, sans effet délétère sur les cellules de la SVF (objectivation faite selon la quantité, la qualité et l'aspect du tissu, ainsi que la numération et la viabilité cellulaire).

De la même manière, des tests ont été réalisés pour comparer les prélèvements manuels et automatiques (« Lipomatic »). Les lipoaspirations peuvent en effet être maintenant réalisées à l'aide d'une machine qui procure à la canule d'aspiration un petit mouvement de « nutation » (un mouvement d'avant en arrière et latéral), permettant d'émulsifier les graisses avant de les aspirer, tout en respectant les tissus environnants (« vibroliposuccion »). Mais chez le cheval, la méthode manuelle (à la seringue) s'est révélée plus pratique, avec un meilleur rendement.



**Figure 40 : Procédure de lipoaspiration chez le cheval.**

### **3.3.1.2. Purification extemporanée de la fraction stromale vasculaire**

L'optimisation du protocole de purification des cellules de la SVF a d'abord été réalisée à partir de cellules humaines, facilement accessibles (déchets opératoires), et a été objectivée en fonction de la numération et de la viabilité cellulaire, ainsi que par analyse cytométrique du phénotype. L'ensemble du protocole, incluant la concentration en collagénase et le temps de digestion, a ainsi été déterminé de façon à obtenir le maximum de cellules vivantes en un minimum de temps (données précises confidentielles). Outre la collagénase et le Ringer Lactate, aucun autre produit n'est utilisé (pas de solution de lyse de globules rouges) afin de ne pas influencer sur la survie ou la qualité des cellules.

Les résultats obtenus chez l'homme ont été testés et confirmés chez le cheval.

Pour le kit Teno'sculpt, le protocole de purification de la SVF prend ainsi en compte l'ensemble des résultats obtenus chez l'homme, y compris concernant le lavage des cellules pour se débarrasser de la lidocaïne : le tissu adipeux est lavé et centrifugé afin de se

débarrasser des molécules présentes lors de la lipoaspiration (solution tumescence pour l'infiltration incluant lidocaïne et adrénaline). Les cellules sont également lavées et centrifugées après la digestion à la collagénase afin d'éliminer les molécules (protéases, collagénase) pouvant avoir un effet délétère, notamment sur l'ancrage des cellules.

Le kit Teno'sculpt a finalement été optimisé de façon à permettre l'extraction extemporanée des cellules de la SVF, sans nécessité de gros matériel comme une hotte de culture type PSM. Les seuls besoins du kit (à usage unique) sont une centrifugeuse et un petit four rotatif permettant la digestion du tissu à 37°C.

### **3.4. Efficacité des cellules souches du tissu adipeux pour traiter les tendinites du cheval : étude *in vitro* et *in vivo***

#### **3.4.1. Introduction**

Les tendinites représentant un véritable fléau dans le monde hippique, il est indispensable de trouver une solution thérapeutique efficace pour traiter les chevaux atteints. Grâce à leurs forts potentiels en médecine régénérative, les cellules souches adultes mésenchymateuses présentent une belle alternative face aux traitements classiques, jusque là peu efficaces et non définitifs puisque les chevaux sont souvent sujets à récurrences. Même en médecine vétérinaire équine, les cellules souches du tissu adipeux (ASCs) ont montré de nombreux avantages, étant facilement accessibles, en grande quantité et présentant des capacités phénotypiques et de différenciation propices à la régénération tissulaire (Vidal, Kilroy et al. 2007; de Mattos Carvalho, Alves et al. 2009; Raabe, Shell et al. 2011). Leur efficacité a d'ailleurs été prouvée dans la régénération des tendons chez le cheval (Del Bue, Ricco et al. 2008; Nixon, Dahlgren et al. 2008).

Cependant, même si de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont permis d'observer les multiples capacités de ces cellules souches, aucune donnée ne permet de comprendre exactement comment les ASCs agissent *in vivo*. De plus, les ASCs ont fait l'objet d'encore peu d'études chez le cheval, en comparaison à leurs homologues de la moelle osseuse.

Le but des nouvelles thérapies dans la guérison tendineuse repose notamment sur la synthèse d'une matrice tendineuse identique à l'original, avec une organisation fibrillaire naturellement solide. Pour cela, en vue d'utiliser les ASCs dans le traitement des tendinopathies équinées, il est primordial de connaître leur capacité à produire les éléments constitutifs du tendon, ces éléments étant normalement synthétisés par les ténocytes. La première partie de cette étude est ainsi consacrée à l'analyse *in vitro* de l'expression des gènes codant pour des marqueurs ténocytaires et des molécules phares de la matrice extracellulaire des tendons. Pour la première fois chez le cheval, nous avons alors comparé les taux d'expression des cellules souches adipeuses et des ténocytes.

D'autre part, nous avons initié une étude de cas pour valider l'efficacité thérapeutique de notre procédé chez des chevaux atteints de tendinites. Ce nouveau procédé innovant a pour stratégie la réinjection extemporanée des cellules de la SVF fraîchement extraites, au sein d'un tendon lésé.

### **3.4.2. Matériels et méthodes**

#### **Prélèvement du tissu adipeux**

Les chevaux de cette étude ont été utilisés après consentement du propriétaire et en collaboration avec le vétérinaire traitant.

Le tissu adipeux a été prélevé par lipoaspiration, sur cheval debout et tranquilisé (chevaux entre 3 et 10 ans). Le prélèvement a été effectué au niveau de la croupe, vers la base de la queue et de chaque côté, après infiltration d'une solution tumescence contenant 500 mL de Ringer Lactate, 20 mL de lidocaïne 2 % pour anesthésier localement la zone, et 1 mg d'adrénaline pour éviter les saignements. La procédure de lipoaspiration a été réalisée manuellement, à la seringue de 50 mL et avec une canule de 3 mm de diamètre (type « Mercedes »).

#### **Prélèvement des tendons**

La partie moyenne des tendons des fléchisseurs superficiel et profond, ainsi que du suspenseur du boulet, a été prélevée chirurgicalement à partir d'un antérieur, après euthanasie d'une jument (la cause de la mort n'étant aucunement en relation avec cette étude). Le tissu adipeux de cette jument avait été prélevé plusieurs mois avant.

### **Purification des cellules de la SVF**

Le tissu adipeux obtenu par lipoaspiration a été lavé et centrifugé avant d'être digéré à la collagénase pendant 1 h, à 37°C. Le tissu digéré a ensuite été centrifugé 4 min à 900 g et le culot cellulaire (SVF, « stromal vascular fraction ») a été lavé trois fois au Ringer Lactate puis filtré au travers d'un Steriflip 100 µm (Millipore, France). Après centrifugation, les cellules sont, soit resuspendues dans du Ringer Lactate pour être réinjectées dans les tendons lésés, soit resuspendues dans du milieu de culture M199 (PAN Biotech, France).

### **Extraction des ténocytes**

Les morceaux de tendons récupérés ont été disséqués et mis en petits morceaux pour faciliter la purification des cellules. Les fragments obtenus ont alors été digérés à la collagénase pendant 10 h. Les tendons digérés ont ensuite été centrifugés 4 min à 900 g et le culot cellulaire comprenant les ténocytes a été lavé au Ringer Lactate.

### **Culture des cellules de la SVF et des ténocytes**

Pour la mise en culture, le nombre de cellules et la viabilité ont été évalués au bleu Trypan (Sigma-Aldrich, France). Environ 300,000 cellules/cm<sup>2</sup> ont étéensemencées en plaques 6 puits dans du milieu M199 contenant de la L-glutamine, du glucose (2 g/L), de l'amphotéricine B (10 mg/mL), de la streptomycine (0.4 mg/mL) et de la pénicilline (400 U/mL) (PAN Biotech, France). Lors de la mise en culture, ce milieu est complété avec 20 % de sérum de veau fœtal (PAN Biotech, France), puis 10 % les jours suivants. Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> et le milieu de culture a été changé tous les 2 jours. Les cellules ont été laissées quelques jours seulement, pour proliférer jusqu'à confluence, mais aucun passage n'a été effectué. Les cellules dérivées de la SVF en culture sont appelées ADSCs (« adipose-derived stem cells »).

### **Extraction des ARNs, RT et qPCR**

Une fois à 80 % de confluence, les cellules en culture ont été lysées avec 500 µL/puits de solution de TRIzol™ (Invitrogen, France). Les ARNs ont ensuite été extraits par addition de chloroforme et précipités à l'isopropanol et à l'éthanol 70 %, selon les instructions du fabricant. Après dosage au spectrophotomètre, 2 µg des ARNs totaux ont été utilisés pour la transcription inverse avec des amorces aléatoires « random heptamer primers » (Eurogentec, Belgium) et avec l'enzyme « MMLV » (Invitrogen, France). Puis 1µL de l'ADNc ainsi obtenu a été amplifié par PCR sur un thermocycleur « ABI PRISM 7000 » (Applied



Biosystems, France), en utilisant les réactifs « Taqman™ Master Mix Kit » (Eurogentec, Belgium). Le « 18S rRNA Control kit FAM-TAMRA » (Eurogentec, Belgium) a été utilisé comme référence. La quantification de l'ARNm cible a été effectuée par comparaison du nombre de cycle requis pour obtenir les valeurs seuils (« Threshold ») entre le gène de référence et le gène cible (méthode DDCT). Chaque analyse a été effectuée à partir de 6 échantillons par condition. Le tableau 9 présente les séquences des amorces et sondes ayant été créées pour cette étude. Les PCR ont été au préalable optimisées pour avoir 100 % ± 10% d'efficacité.

Gène	Amorces	Sonde
Col1a1	5'-CCACTTGCTTGAAGACCCATGT-3' 3'-GCATGGAGAAAGGAGCAGAAAAG-5'	5'-FAM-TTTCTGCCCGTTGGGCTTATGATACCC-TAMRA-3'
Col2a1	5'-AACACTGCCAACGTCCAGATG-3' 3'-AGGTTGCCAGCTGCTTCG-5'	5'-FAM-CTCCCAGAACATCACCTACCACTGCAAGA-TAMRA-3'
Col3a1	5'-GCTGGTGAACCTGGAAGAGATG-3' 3'-CCAGGGGCACCAGGAGA-5'	5'-FAM-TGGTGGCAAGGGTGATCGTGGTG-TAMRA-3'
Col5a1	5'-CCTCTACGAAGACCACACAGGG-3' 3'-GTGACATTTTCTTGTGGACGC-5'	5'-FAM-TCAACCTGTCAGATGGCAAGTGGCAC-TAMRA-3'
Col12a1	5'-GTCATCCAGCAGTCAGGGTTC-3' 3'-CCACAATGAACACATGCCTTTCAC-5'	5'-FAM-TGAGCTTGCCAACATTGCCAGCA-TAMRA-3'
BGN	5'-CTCCCAGAGACCCTGAATGAAC-3' 3'-CAGGCTGCCATTCTCGATC-5'	5'-FAM-CGCTACTCCAAGCTGTACAGGCTGGGC-TAMRA-3'
COMP	5'-GACAGTGATGGCGATGGTATAGG-3' 3'-CACAAGCGTCTCCACGAA-5'	5'-FAM-TGACAACTGTCCCAGAAGAGCAACCC-TAMRA-3'
FMOD	5'-GCCCAGTATGACGAAGACCC-3' 3'-GCTCATAAGGGTAAGGGTCATAGG-5'	5'-FAM-TGGTGGTTCCTACTACCTCCGCAGC-TAMRA-3'
TNMD	5'-CATGCTGGATGAGAGAGGTTATTG-3' 3'-TGACACGACAGATAACCCGC-5'	5'-FAM-CCGCCGCTCTGTGAACCTTACTAG-TAMRA-3'
SCX	5'-AGAACGCCAGCCCAAAC-3' 3'-CTTTCTGTCGCGGTCTTTG-5'	5'-FAM-CTGCACCTTCTGCCTCAGCAACCAG-TAMRA-3'

**Tableau 9 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour la qPCR.** Abréviations : Col, aollagène ; BGN, biglycane ; COMP, cartilage-oligomeric matrix protein ; FMOD, fibromoduline ; TNMD, ténomoduline ; SCX, scleraxis.

### Étude de cas chez des chevaux tendineux

Les cellules de la SVF obtenues après purification ont été réinjectées sous échographie au sein du tendon lésé, au niveau du site de lésion, par un vétérinaire diplômé d'état.

Des observations préopératoires et postopératoires ont été effectuées pour évaluer l'évolution de la pathologie tendineuse. L'examen clinique comprend une évaluation de la boiterie, de

l'appui, de la flexion ainsi que des échographies. Ces examens ont été réalisés à différents temps d'intervalle.

Cette étude totalise pour l'instant 6 chevaux (Tableau 10). La première intervention a été réalisée à la Réunion, au Centre Hippique de Bourbon, sur un hongre de 7 ans souffrant de tendinite chronique au niveau du suspenseur du boulet, sur le postérieur gauche. Puis, au sein de la Clinique Desbrosse, 5 chevaux ont été traités en aigu, 3 à 4 jours après l'apparition de tendinite (entre mai et juillet 2012).

Cheval	Sexe	Age	Diagnostic	Membre	Signes cliniques
C1	Hongre	11 ans	Tendinopathie d'insertion du LSB	Postérieur	Boiterie chronique intermittente
C2	Hongre	7 ans	Desmite du LSB	Postérieur	Boiterie aiguë
C3	Hongre	10 ans	Tendinite aiguë du TFSD	Antérieur	Boiterie aiguë
C4	Hongre	9 ans	Tendinite aiguë du TFSD	Antérieur	Boiterie aiguë
C5	Jument	12 ans	Tendinite aiguë du TFPD	Antérieur	Boiterie aiguë
C6	Jument	9 ans	Tendinite aiguë du LSB	Antérieur	Boiterie aiguë

**Tableau 10 : Descriptif des chevaux traités et de leur pathologie.**

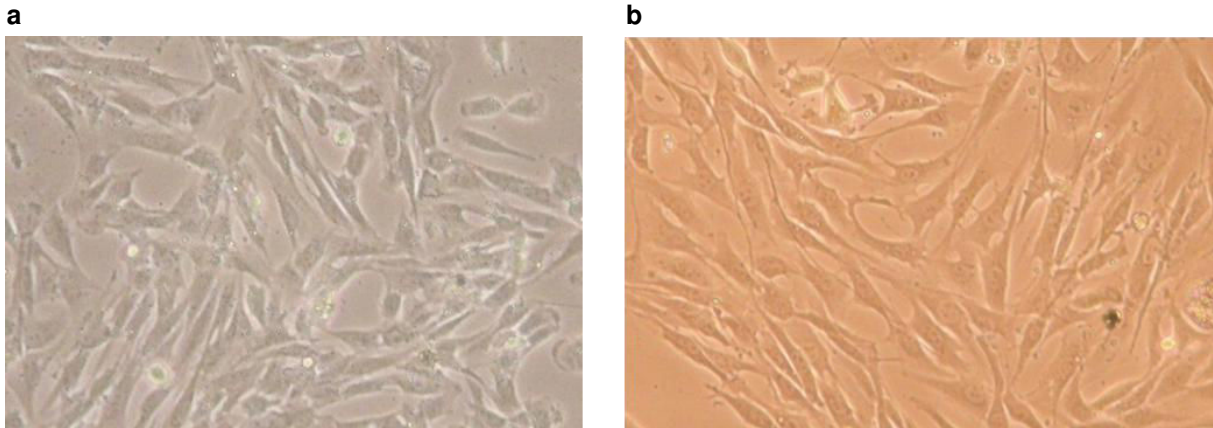
### Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur Microsoft Excel. La significativité des résultats a été testée par le test de Student. Les différences observées ont été considérées comme significatives pour \*P < 0,05 ; \*\*P < 0,005 ; \*\*\*P < 0.0005. Les barres d'erreur sur les graphes montrent les déviations standards  $\pm$  SD.

### 3.4.3. Résultats

#### Etude comparative *in vitro*

Suite à leur extraction, les ADSCs et les ténocytes de cheval ont été mis en culture primaire et aucun passage n'a été effectué. Après avoir adhéré au plastique des boîtes de culture, les cellules ont proliféré de façon homogène (donnée non montrée). D'un point de vue morphologique, les ADSCs et les ténocytes de cheval en culture ont présenté le même aspect fibroblastique (Figure 41).



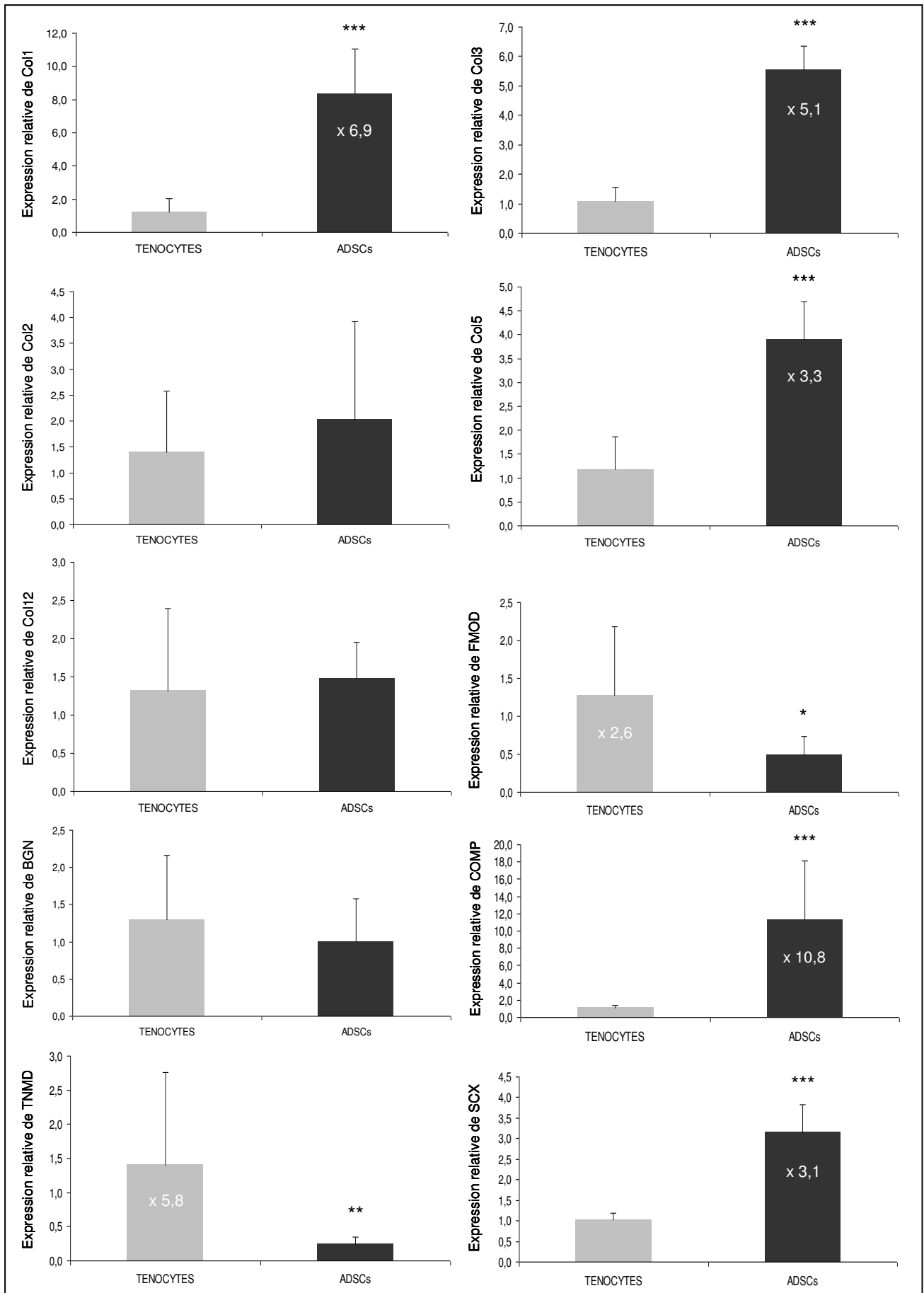
**Figure 41 : Morphologie des ADSCs (a) et des ténocytes (b) de cheval en culture.** Photos prises en microscopie optique à contraste de phase (x100). Cellules en culture primaire, n'ayant subi aucun passage.

Une fois les cellules à confluence (après 2 à 7 jours), l'analyse de l'expression des gènes codant pour différentes molécules caractéristiques des tendons a été réalisée par PCR quantitative.

Globalement, l'analyse comparative des gènes au sein des ADSCs a révélé une forte expression de Col1, majoritairement exprimé, ainsi que de Col3, mais une expression nettement moindre de Col2 et de COMP (données non montrées). Les mêmes observations ont pu être faites à partir des ténocytes (données non montrées).

En comparaison avec les ténocytes, les ADSCs montrent une expression significativement plus forte des gènes codant pour Col1 (x 6,9), Col3 (x 5,1), Col5 (x 3,3), COMP (x 10,8) et scleraxis (x 3,1). Au contraire, les ténocytes expriment de plus forts taux d'expression génique pour fibromoduline (x 2,6) et ténomoduline (x 5,8) (Figure 42).

En revanche, aucune différence n'a été observée pour Col2, Col12 et biglycane, à partir de l'expression des gènes.



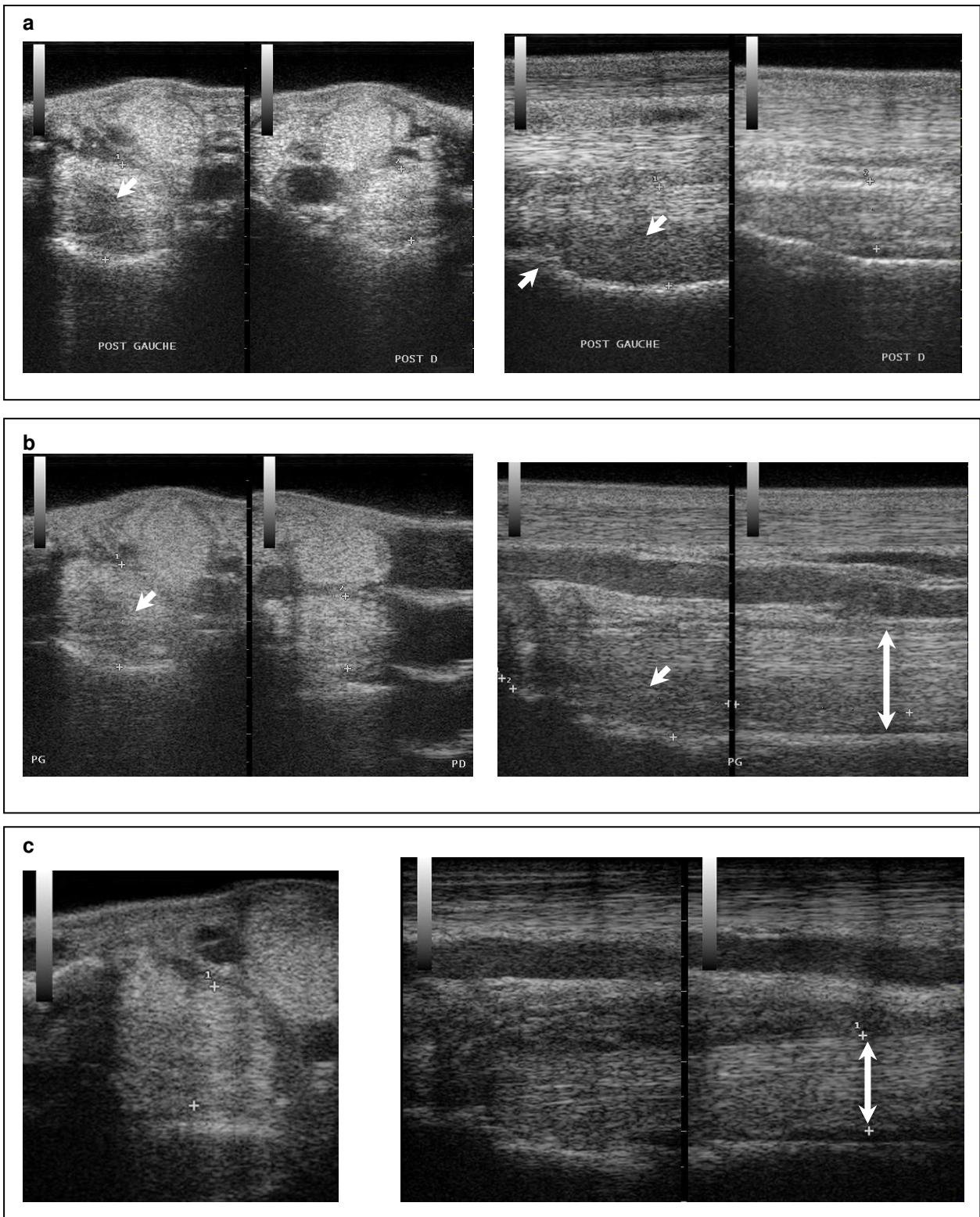
**Figure 42 : Comparaison de l'expression relative des gènes des ténocytes et des ADSCs.** Les ratios figurant ont été calculés à partir des valeurs moyennes. \*P < 0,05; \*\*P < 0,005; \*\*\*P < 0.0005 par rapport aux ténocytes.

### **Etude *in vivo***

Le premier cas (C1) concernait une tendinopathie chronique sur laquelle tous les traitements classiques ont échoué. Ces traitements ont consisté à laisser le cheval C1 au repos absolu pendant 2 mois, à traiter aux anti-inflammatoires et à poser une ferrure orthopédique pour soulager les tendons. Les examens échographiques initiaux ont montré une lésion assez sévère avec une zone très hypoéchogène (large « lacune »), un épaissement du LSB et des irrégularités au niveau du site d'insertion du LSB sur le métatarse principal (Figure 43a). Puis, 2 mois après traitement « classique », la boiterie était toujours présente et les images ultrasons montrent une lésion qui ne s'est que partiellement comblée (Figure 43b). Les cellules de la SVF fraîchement extraites ont alors été injectées et des examens cliniques réguliers ont permis de suivre l'évolution de la lésion. Dès un mois après l'injection de la SVF, le cheval C1 ne présentait plus de boiterie apparente et les examens échographiques ont pu clairement montrer le comblement de la zone hypoéchogène, objectivant un réalignement des fibres et un affinement du tendon (Figure 43c).

Pour les 5 autres chevaux (C2 à C6) injectés en phase aiguë, une nette amélioration a également été observée peu de temps après l'injection des cellules, avec tout d'abord une diminution de l'inflammation et de la boiterie. Puis seulement un mois après, les examens échographiques ont confirmé cette nette amélioration de la pathologie avec une réorganisation des fibres bien visible, de la même façon que pour C1.

Tous les chevaux traités ont pu reprendre progressivement le travail dès 2 mois après l'injection des cellules de la SVF fraîchement extraites. Ainsi, pour l'ensemble des cas traités à ce jour, une évolution positive de la pathologie a pu être observée, permettant une reprise du travail assez rapide.



**Figure 43 : Images ultrasons des examens échographiques du cheval C1.** Les images de gauche montrent les scans transversaux et celles de droite, les scans longitudinaux. **(a) Examen initial.** Postérieur gauche (PG) lésé et postérieur droit (PD) sain. **(b) Examen 2 mois après traitement « classique », avant l'injection de SVF.** Seul le postérieur gauche lésé est représenté sur la coupe longitudinale. **(c) Examen 1 mois post-injection de la SVF.** Seul le postérieur gauche traité est représenté. Les simples flèches indiquent les zones hypoéchogènes et les irrégularités (lésion). Les doubles flèches indiquent l'épaisseur du tendon (LSB), avant et après injection.

#### 3.4.4. Discussion

Tout d'abord, en accord avec des études précédentes, nos résultats montrent que les ténocytes en culture présentent des taux d'expression élevés pour le collagène de type I, majoritaire dans les tendons, et expriment les marqueurs ténocytaires scleraxis et ténomoduline (Taylor, Vaughan-Thomas et al. 2009).

Lors de lésion tendineuse, alors que le devenir *in vivo* des ADSCs réinjectées dans la lésion n'est pas encore clairement établi, les résultats *in vitro* obtenus ici montrent que les ADSCs sont capables de synthétiser les principaux constituants de la matrice tendineuse, et en particulier le collagène de type I. Ceci rejoint les résultats d'une récente étude comparant les caractéristiques de différentes sources de cellules souches mésenchymateuses chez le cheval, parmi lesquelles les cellules de tendon et les cellules souches du tissu adipeux expriment le plus fortement le collagène de type I (Burk, Ribitsch et al. 2012). Plus étonnant encore, les ADSCs expriment également les marqueurs ténocytaires scleraxis et ténomoduline, en quantité moindre pour ce dernier mais 3 fois plus que les ténocytes pour scleraxis. Les ADSCs sont aussi capables de synthétiser aussi bien voir mieux que les ténocytes certains composants matriciels comme Col1, Col3, Col5 et COMP, et cela sans aucun ajout de facteurs de croissance ou d'autres facteurs connus pour induire la différenciation ténocytaire. Les ténocytes et les ADSCs en culture ont en effet proliféré dans les mêmes conditions et le même milieu de culture basique a été utilisé pour les deux types cellulaires.

A la question de savoir comment les ASCs agissent *in vivo*, on peut entre autre supposer que les ASCs aident les ténocytes lors du processus de réparation naturelle grâce à leur potentiel de synthèse de la MEC tendineuse. Rappelons que les ténocytes seuls ne sont pas capables d'assurer la régénération des tendons et que leur première action consiste à synthétiser en urgence du collagène de type III, en guise de « dépannage » temporaire, le temps de permettre la synthèse du collagène de type I plus solide. Au vu de nos résultats *in vitro*, les ADSCs exprimant du collagène de type I en très grande quantité, ceci ne fait que renforcer cette hypothèse, évitant probablement aux ténocytes de produire trop de collagène de type III.

Cependant, les deux types cellulaires ont montré des taux d'expression pour Col3 presque aussi élevés que pour Col1. Les ADSCs présentant le même profil d'expression que les ténocytes issus de tendon sain, les ADSCs doivent donc interférer sur le ratio Col3/Col1 et combler le manque de synthèse de Col1 par les ténocytes lors de la réparation tendineuse, sans pour autant augmenter l'expression de Col3 comme le font les ténocytes.

Les examens échographiques effectués lors de l'étude clinique de cas confortent également cette hypothèse d'assistance des ASCs aux ténocytes puisque les images ultrasons ont clairement montré une amélioration de la lésion chez les différents chevaux traités, avec comblement des « lacunes », réalignement des fibres tendineuses et dégonflement du tendon lésé. Ceci s'est effectué de façon relativement rapide comparé à une cicatrisation naturelle lente et dépasse sans conteste les traitements traditionnels, comme rapporté dans d'autres études utilisant les cellules souches mésenchymateuses (Crovace, Lacitignola et al. 2007; Pacini, Spinabella et al. 2007; Nixon, Dahlgren et al. 2008; Smith 2008).

Mais d'autres mécanismes doivent rentrer en jeu pour assurer la régénération et éviter la formation de tissu cicatriciel fragile.

Outre leur potentiel de synthèse de la matrice tendineuse, les ASCs sont aussi connues pour leurs effets anti-inflammatoires qui sont d'ailleurs confirmés dans l'étude *in vivo* puisque l'injection de la SVF permet une nette diminution de l'inflammation assez rapidement (une semaine) chez les chevaux C2 à C6 atteints de tendinite aiguë. De plus, la boiterie disparaît en un mois, ce qui rend également compte de ce phénomène puisqu'une boiterie est en général occasionnée par la douleur liée à l'inflammation.

D'autres effets connus des ASCs doivent probablement participer à la régénération des tendons, parmi lesquels des effets paracrines (Richardson, Dudhia et al. 2007). En plus d'apporter des molécules anti-inflammatoires ou des facteurs de croissance, les cellules souches mésenchymateuses sont également connues pour synthétiser des chimiokines qui permettent d'attirer les cellules endogènes vers les lésions, ce qui favorise la réparation des tissus. Ce chimiotactisme a récemment été mis en évidence à partir de la SVF de cheval et a entre autre démontré son intérêt pour la prolifération cellulaire dans des systèmes de co-culture (Kol, Walker et al. 2012). Cette récente étude conforte donc notre stratégie thérapeutique qui est basée sur la réinjection de l'ensemble de la SVF fraîchement extraite et non sur la réinjection d'une sélection de cellules souches dérivées.

## **Conclusion**

Tandis que les ténocytes vont tenter de réparer « naturellement » le tendon, sans avoir pour autant le pouvoir de le régénérer complètement, à l'identique du tendon d'origine, les ASCs semblent jouer un rôle important et prendre le relais là où les ténocytes sont désespérés.



Ainsi, pour l'ensemble des chevaux traités à ce jour au moyen de notre procédé, une évolution positive de la pathologie a pu être observée, permettant une reprise du travail assez rapide.

Cette étude prouve une fois de plus le potentiel thérapeutique des ASCs dans le traitement des tendinopathies équines.

Cependant, une telle efficacité thérapeutique et une telle rapidité de traitement ne doivent pas laisser sans considération les procédés de physiothérapie visant à reprendre progressivement l'exercice pour rééduquer les structures régénérées. Le but étant que le cheval récupère définitivement toutes ses performances, la kinésithérapie ne doit pas être négligée et lorsque cela est possible, le travail en piscine peut être une solution intéressante.

En conclusion, ces résultats préliminaires sont d'ores et déjà très encourageants. L'étude clinique de cas se poursuivant, nous espérons pouvoir prochainement valider l'efficacité thérapeutique de notre procédé pour traiter les tendinites du cheval.

Une fois l'étude de cas achevée, les résultats ci-dessus et à venir feront l'objet d'une publication.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

*« Dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin. »*

*Erwin Chargaff*

Entre les milliers d'animaux ayant été traités grâce aux cellules souches et les centaines d'essais cliniques chez l'homme, les cellules souches et la régénération tissulaire ne font définitivement plus partie du domaine de la science-fiction.

Parmi les sources de cellules souches, le tissu adipeux a montré de nombreux avantages et a d'ores et déjà un bel avenir devant lui. Les cellules souches qu'il renferme offrent en effet de nombreuses perspectives thérapeutiques. L'une de ces perspectives est présentée dans cette thèse : le traitement des tendinopathies équinées.

Ainsi, la finalité de cette thèse était la mise en place d'un protocole de prélèvement du tissu adipeux chez le cheval ainsi que l'optimisation de la purification de la fraction stromale vasculaire contenant les ASCs. Souhaitant avant tout proposer aux vétérinaires un procédé innovant, facile, rapide et efficace, nous nous sommes en premier lieu intéressés aux procédés de lipoaspiration humaine utilisés en chirurgie esthétique ainsi qu'à la manipulation du tissu adipeux lors du transfert de graisse autologue.

Le tissu adipeux est en effet utilisé depuis plus d'un siècle en chirurgie esthétique et reconstructrice, en tant que produit de comblement.

La chirurgie esthétique a connu un grand essor. De plus en plus de personnes y ont recours, soit pour corriger des malformations ou des séquelles de maladies, ou soit (et surtout) pour corriger de petits défauts et pour se refaire une jeunesse. Même si de nombreux produits de synthèse ont vu le jour au cours de ces dernières années (acide hyaluronique, toxine botulique, prothèses mammaires...), les patients sont de moins en moins crédules devant de soi-disant « produits miracles » et recherchent d'avantages des solutions naturelles. Contrairement à ces récents produits pour lesquels il existe peu de recul, la greffe autologue de tissu adipeux représente une bonne alternative. Cette technique, utilisant un produit naturel provenant de notre propre corps, est en effet utilisée depuis plus d'un siècle et a fait ses preuves dans de nombreuses interventions.

Cependant, malgré le développement de la technique et le protocole finalement proposé par Coleman, cette technique nécessitait encore d'être améliorée en raison de la résorption persistante du greffon. Notre première étude a permis de proposer une solution efficace pour résoudre ce problème. Le protocole MICROFILL<sup>®</sup> développé par ADIP'Sculpt permet en effet de favoriser la survie cellulaire au sein du greffon, ceci grâce à une manipulation appropriée du tissu adipeux. Ce protocole inclut des étapes de lavages et de centrifugations douces afin d'éliminer le liquide résiduel contenant notamment d'éventuelles cytokines

inflammatoires ainsi que l'anesthésique local utilisé lors de la lipoaspiration. Le protocole MICROFILL<sup>®</sup> permet également le développement d'une matrice conjonctive qui reflète l'activité de cellules souches adipeuses présentes. Ceci ne peut que conforter la survie du greffon à long terme, et on peut aussi supposer que ces cellules souches synthétisent des facteurs trophiques favorables à une régénération tissulaire, et donc favorables entre autre au rajeunissement de la peau.

L'anesthésique local le plus couramment utilisé étant la lidocaïne, que nous souhaitions également utiliser lors des prélèvements chez le cheval, notre seconde étude a porté sur les effets de cette drogue sur les cellules souches du tissu adipeux, afin de vérifier l'hypothèse que nous avons supposé concernant son effet délétère.

Et cette hypothèse a bel et bien été confirmée puisque deux études ont montré l'impact fatal de la lidocaïne sur les ASCs. Suivant la dose de lidocaïne utilisée en clinique, et suivant la durée d'exposition des ASCs à la drogue, la mort par nécrose augmente et, plus surprenant encore, les cellules vacuolisent de façon massive. En parallèle, la lidocaïne bloque la prolifération cellulaire en inhibant la réplication de l'ADN. La lidocaïne représente donc un réel stress pour les ASCs. Face à ce stress, les ASCs déclenchent l'autophagie, certainement dans le but de trouver la « force » nécessaire pour survivre. Mais la balance entre fonction vitale et une éventuelle fonction létale de l'autophagie n'est pas évidente. Les bases moléculaires de l'autophagie sont complexes, encore mal comprises, et il reste notamment des questions en suspens vis-à-vis des mécanismes qui vont faire basculer la cellule en faveur de la survie ou de la mort. En effet, le contrôle de l'autophagie, de la mort programmée cellulaire et même du cycle cellulaire, passe par des voies de signalisation communes qui rendent difficiles la compréhension de ces mécanismes et qui nécessitent de plus amples investigations.

Dans le cadre de l'élaboration d'un kit à usage vétérinaire, les études décrites dans ce manuscrit ont ainsi contribué à l'optimisation des procédures de manipulation du tissu adipeux et de purification des cellules.

Que ce soit en chirurgie esthétique et reconstructrice ou en thérapie cellulaire, ces études ont permis d'optimiser les protocoles en faveur de la survie cellulaire. Les premières applications chez le cheval tendineux sont d'ailleurs un succès.

Des études sont maintenant nécessaires pour évaluer les propriétés des cellules souches *in vivo*, après utilisation dans le cadre d'un traitement. Des essais cliniques seront nécessaires pour accroître notre compréhension scientifique et améliorer les procédures. Même si de nombreux rapports ont été publiés sur l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses, il existe finalement peu de données sur le devenir de ces cellules une fois injectées au sein d'un tissu lésé : que se passe-t-il vraiment ? Comment les cellules interagissent-elles avec leur nouvel environnement pour permettre la régénération tissulaire ?

Notre étude chez le cheval pour traiter des cas de tendinopathies équinées a montré la capacité des ASCs à synthétiser des constituants essentiels à la matrice extracellulaire tendineuse. La comparaison avec les ténocytes a permis d'envisager certaines hypothèses quant à l'activité des ASCs injectées au niveau du site de lésion : les ASCs doivent finalement prendre le relais lorsque les ténocytes sont « à bout », favorisant une néo-synthèse similaire à la matrice originelle. Cette synthèse est d'autant plus rapide grâce aux ASCs, mais cette rapidité n'empêche pas la formation de fibres solides, contrairement aux ténocytes seuls qui eux, vont former un tissu cicatriciel fragile. Mais évidemment, ceci n'explique qu'une infime partie du devenir des cellules souches injectées. Par leurs nombreuses propriétés mises en évidence *in vitro* (effets immunomodulateurs, effets paracrines, homing, ...), leur devenir est très certainement multifactoriel.

Tissu adipeux, chirurgie plastique et thérapie cellulaire sont à première vue trois domaines bien distincts. Pourtant, au travers des récentes découvertes, ce manuscrit montre que les chemins de ces trois univers se croisent.

L'ensemble des études présentées dans cette thèse a finalement débouché sur de nouveaux projets actuellement en cours de développement au sein de la société STEM CIS. Les cellules souches du tissu adipeux représentent en effet une bonne matière première pour la régénération tissulaire. Bien qu'un seul exemple d'application soit décrit ici, d'autres projets ont d'ores et déjà pu être initiés, parmi lesquels le traitement des arthropathies canines, mais aussi le traitement de pathologies humaines liées à l'ischémie : membres diabétiques, incontinence urinaire d'effort chez la femme, dysfonctions érectiles, insuffisance et greffe rénales. Le traitement de ces pathologies fait d'ailleurs l'objet d'un projet ANR nommé TRAVESTI. Ce projet prévoit également de combiner thérapie cellulaire et bioingénierie par la mise en contact des ASCs avec des microparticules (PAMs) dans le but d'augmenter l'efficacité thérapeutique.

Les cellules souches offrent évidemment de nombreuses perspectives thérapeutiques et bien d'autres projets peuvent encore voir le jour. Par exemple, l'implication de l'autophagie dans l'homéostasie et la différenciation cellulaire ouvre encore de nombreuses portes...

Cellules souches et autophagie représentent en effet des phénomènes naturels qui ont été décrits il y a un demi-siècle, mais qui ont vraiment émergé seulement ces 15 dernières années. Il est finalement logique de voir que les cellules souches et en parallèle, l'autophagie, puissent tant influencer la recherche actuelle.

Ainsi, de la chirurgie esthétique et reconstructrice à la médecine régénérative, avec par exemple la régénération des tendons chez les chevaux, cette thèse présente une nouvelle facette du tissu adipeux.

## REFERENCES

- Acquistapace, A., T. Bru, et al. (2011). "Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer." *Stem Cells* 29(5): 812-824.
- Adams, O. R. (1974). *Lameness in horses*. Philadelphia,, Lea & Febiger.
- Al Battah, F., J. De Kock, et al. (2011). "Evaluation of the multipotent character of human adipose tissue-derived stem cells isolated by Ficoll gradient centrifugation and red blood cell lysis treatment." *Toxicol In Vitro* 25(6): 1224-1230.
- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science.
- Ali, A. (2011). "Contouring of the gluteal region in women: enhancement and augmentation." *Ann Plast Surg* 67(3): 209-214.
- Amaravadi, R. K. and C. B. Thompson (2007). "The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment." *Clin Cancer Res* 13(24): 7271-7279.
- Augello, A., T. B. Kurth, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches." *Eur Cell Mater* 20: 121-133.
- Baek, S. J., S. K. Kang, et al. (2011). "In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors." *Exp Mol Med* 43(10): 596-603.
- Baer, P. C. and H. Geiger (2012). "Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity." *Stem Cells Int* 2012: 812693.
- Barone, R. (1966). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Lyon,, École nationale vétérinaire, Laboratoire d'anatomie.
- Bartynski, J., M. S. Marion, et al. (1990). "Histopathologic evaluation of adipose autografts in a rabbit ear model." *Otolaryngol Head Neck Surg* 102(4): 314-321.
- Bawolak, M.-T., G. Morissette, et al. (2010). "Vacuolar ATPase-mediated sequestration of local anesthetics in swollen macroautophagosomes." *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie* 57(3): 230-239.
- Bawolak, M. T., G. Morissette, et al. (2010). "Vacuolar ATPase-mediated sequestration of local anesthetics in swollen macroautophagosomes." *Can J Anaesth* 57(3): 230-239.
- Becker, A. J., C. E. Mc, et al. (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells." *Nature* 197: 452-454.
- Bernards, C. M. and D. J. Kopacz (1999). "Effect of epinephrine on lidocaine clearance in vivo: a microdialysis study in humans." *Anesthesiology* 91(4): 962-968.
- Bi, Y., D. Ehrchiou, et al. (2007). "Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche." *Nat Med* 13(10): 1219-1227.
- Billings, E., Jr. and J. W. May, Jr. (1989). "Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery." *Plast Reconstr Surg* 83(2): 368-381.
- Bircoll, M. (1987). "Autologous fat transplantation." *Plast Reconstr Surg* 79(3): 492-493.
- Black, L. L., J. Gaynor, et al. (2008). "Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs." *Vet Ther* 9(3): 192-200.
- Black, L. L., J. Gaynor, et al. (2007). "Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial." *Vet Ther* 8(4): 272-284.
- Bobis-Wozowicz, S., K. Miekus, et al. (2011). "Genetically modified adipose tissue-derived mesenchymal stem cells overexpressing CXCR4 display increased motility,



- invasiveness, and homing to bone marrow of NOD/SCID mice." Exp Hematol 39(6): 686-696 e684.
- Bochtler, W., M. Maiers, et al. (2011). "World Marrow Donor Association framework for the implementation of HLA matching programs in hematopoietic stem cell donor registries and cord blood banks." Bone Marrow Transplant 46(3): 338-343.
- Bonfield, T. L., M. T. Nolan Koloze, et al. (2010). "Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo." J Inflamm (Lond) 7: 51.
- Boni, R. (2010). "Tumescent liposuction: efficacy of a lower lidocaine dose (400 mg/l)." Dermatology 220(3): 223-225.
- Boquest, A. C., A. Shahdadfar, et al. (2005). "Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture." Mol Biol Cell 16(3): 1131-1141.
- Boselli, E., F. Duflo, et al. (2003). "The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine." Anesth Analg 96(3): 755-756, table of contents.
- Bouffi, C., O. Thomas, et al. (2010). "The role of pharmacologically active microcarriers releasing TGF-beta3 in cartilage formation in vivo by mesenchymal stem cells." Biomaterials 31(25): 6485-6493.
- Bourin, P., J. A. Peyrafitte, et al. (2011). "A first approach for the production of human adipose tissue-derived stromal cells for therapeutic use." Methods Mol Biol 702: 331-343.
- Bradley, J. A., E. M. Bolton, et al. (2002). "Stem cell medicine encounters the immune system." Nat Rev Immunol 2(11): 859-871.
- Brodsky, B. and A. V. Persikov (2005). "Molecular structure of the collagen triple helix." Adv Protein Chem 70: 301-339.
- Burk, J., I. Ribitsch, et al. (2012). "Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources." Vet J.
- Bursch, W., K. Hohegger, et al. (2000). "Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments." J Cell Sci 113 ( Pt 7): 1189-1198.
- Bursch, W., A. Karwan, et al. (2008). "Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors." Toxicology 254(3): 147-157.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res 9(5): 641-650.
- Caplan, A. I. (1994). "The mesengenic process." Clin Plast Surg 21(3): 429-435.
- Caplan, A. I. and J. E. Dennis (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." J Cell Biochem 98(5): 1076-1084.
- Carroll, C. L. and P. J. Huntington (1988). "Body condition scoring and weight estimation of horses." Equine Vet J 20(1): 41-45.
- Cecconi, F. and B. Levine (2008). "The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death." Dev Cell 15(3): 344-357.
- Cecil, R. L., L. Goldman, et al. (2008). Cecil medicine. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Chamberlain, G., J. Fox, et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." Stem Cells 25(11): 2739-2749.
- Cho, K. S., H. K. Park, et al. (2009). "IFATS collection: Immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells in an allergic rhinitis mouse model." Stem Cells 27(1): 259-265.
- Chung, C. W., K. G. Marra, et al. (2012). "VEGF microsphere technology to enhance vascularization in fat grafting." Ann Plast Surg 69(2): 213-219.

- Clegg, P. D., S. Strassburg, et al. (2007). "Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons." Int J Exp Pathol 88(4): 227-235.
- Coleman, S. R. (2004). Structural fat grafting. St. Louis, Mo., Quality Medical Pub.
- Coleman, S. R. (2004) Problems, Complications and Postprocedure Care: Chapter 4. Structural fat grafting. St. Louis, Mo.: Quality Medical Pub 75–102.
- Coleman, S. R. (1995). "Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations." Aesthetic Plast Surg 19(5): 421-425.
- Coleman, S. R. (1997). "Facial recontouring with lipostructure." Clin Plast Surg 24(2): 347-367.
- Coleman, S. R. (1998). "Structural fat grafting." Aesthet Surg J 18(5): 386, 388.
- Coleman, S. R. (2002). "Hand rejuvenation with structural fat grafting." Plast Reconstr Surg 110(7): 1731-1744; discussion 1745-1737.
- Coleman, S. R. (2006). "Facial augmentation with structural fat grafting." Clin Plast Surg 33(4): 567-577.
- Coleman, S. R. (2006). "Structural fat grafting: more than a permanent filler." Plast Reconstr Surg 118(3 Suppl): 108S-120S.
- Corps, A. N., A. H. Robinson, et al. (2006). "Increased expression of aggrecan and biglycan mRNA in Achilles tendinopathy." Rheumatology (Oxford) 45(3): 291-294.
- Coulombeau, B., R. Perouse, et al. (2001). "[Results of six years experience using an injection of autologous fat into the vocal cord]." Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord) 122(5): 295-298.
- Crevier-Denoix, N., P. Pourcelot, et al. (2009). "Influence of track surface on the equine superficial digital flexor tendon loading in two horses at high speed trot." Equine Vet J 41(3): 257-261.
- Crovace, A., L. Lacitignola, et al. (2007). "Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study." Vet Res Commun 31 Suppl 1: 281-283.
- Csete, M., J. M. Schwab, et al. (2008). "Anesthetics Impact the Resolution of Inflammation." PLoS ONE 3(4): e1879.
- Cui, L., S. Yin, et al. (2007). "Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2." Tissue Eng 13(6): 1185-1195.
- Cummins, T. R. (2007). "Setting up for the block: the mechanism underlying lidocaine's use-dependent inhibition of sodium channels." The Journal of Physiology 582(1): 11-11.
- Cummins, T. R. (2007). "Setting up for the block: the mechanism underlying lidocaine's use-dependent inhibition of sodium channels." J Physiol 582(Pt 1): 11.
- da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues." J Cell Sci 119(Pt 11): 2204-2213.
- Dahlgren, L. A., B. D. Brower-Toland, et al. (2005). "Cloning and expression of type III collagen in normal and injured tendons of horses." Am J Vet Res 66(2): 266-270.
- Dani, C. and L. Casteilla (2006). "[Adipose tissue: Mr Hyde obesity and Dr Jekyll regenerative medicine]." Med Sci (Paris) 22(11): 928-929.
- De Duve, C. and R. Wattiaux (1966). "Functions of lysosomes." Annu Rev Physiol 28: 435-492.
- de Mattos Carvalho, A., A. L. Alves, et al. (2009). "Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue." Vet Immunol Immunopathol 132(2-4): 303-306.
- De Ugarte, D. A., K. Morizono, et al. (2003). "Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow." Cells Tissues Organs 174(3): 101-109.
- Del Bue, M., S. Ricco, et al. (2008). "Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo." Vet Res Commun 32 Suppl 1: S51-55.

- Delay, E., S. Garson, et al. (2009). "Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years." Aesthet Surg J 29(5): 360-376.
- Denoix, J. M. (1994). "Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (manus and pes)." Vet Clin North Am Equine Pract 10(2): 273-322.
- Dicke, K. A., U. W. Schaefer, et al. (1973). "The use of stem cell concentrates as bone marrow grafts in man." Transplant Proc 5(1): 909-912.
- Dickens, B. M. (2008). "International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Guidelines for the Conduct of Human Embryonic Stem Cell Research (December 2006)." Med Law 27(1): 179-190.
- Dixon-Shanies, D., J. Rudick, et al. (1975). "Observations on the growth and metabolic functions of cultured cells derived from human adipose tissue." Proc Soc Exp Biol Med 149(2): 541-545.
- Djouad, F., L. M. Charbonnier, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism." Stem Cells 25(8): 2025-2032.
- Docheva, D., E. B. Hunziker, et al. (2005). "Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation." Mol Cell Biol 25(2): 699-705.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy 8(4): 315-317.
- Doornaert, M. A., H. Declercq, et al. (2012). "<< Intrinsic Dynamics of the Fat Graft: In vitro interactions between the main cell actors >>." Plast Reconstr Surg.
- Dowling, B. A. and A. J. Dart (2005). "Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon." Vet J 170(2): 184-192.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2003). "Defective autophagy leads to cancer." Cancer Cell 4(6): 422-424.
- Ema, H. and T. Suda (2012). "Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity." Blood.
- Étienne-Steiner, C., J. Girard, et al. (2011). Du Vaudreuil ville nouvelle à Val-de-Reuil : Haute-Normandie. Rouen, Région Haute-Normandie.
- Fang, B., Y. Song, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells for the treatment of refractory pure red cell aplasia after major ABO-incompatible hematopoietic stem cell transplantation." Ann Hematol 88(3): 261-266.
- Fang, B., Y. P. Song, et al. (2006). "Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells." Bone Marrow Transplant 38(5): 389-390.
- Fedder, C., B. Beck-Schimmer, et al. (2010). "In vitro exposure of human fibroblasts to local anaesthetics impairs cell growth." Clinical & Experimental Immunology 162(2): 280-288.
- Fenwick, S. A., B. L. Hazleman, et al. (2002). "The vasculature and its role in the damaged and healing tendon." Arthritis Res 4(4): 252-260.
- Festy, F., L. Hoareau, et al. (2005). "Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes." Histochem Cell Biol 124(2): 113-121.
- Fiester, A., H. Scholer, et al. (2004). "Stem cell therapies: time to talk to the animals." Cloning Stem Cells 6(1): 3-4.
- Fox, L. E., J. Shen, et al. (2010). "Membrane properties of neuron-like cells generated from adult human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev 19(12): 1831-1841.

- Foyatier, J. L., A. Mojallal, et al. (2004). "[Clinical evaluation of structural fat tissue graft (Lipostructure) in volumetric facial restoration with face-lift. About 100 cases]." Ann Chir Plast Esthet 49(5): 437-455.
- Franchi, M., A. Trire, et al. (2007). "Collagen structure of tendon relates to function." ScientificWorldJournal 7: 404-420.
- Freshwater, M. F. (2012). "Will the bra cup's contents remain 60 percent full, 40 percent empty, or develop microcalcifications? The need for long-term independent studies of Brava and fat grafting." Plast Reconstr Surg 129(1): 172e.
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, et al. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol 4(5): 267-274.
- Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, et al. (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." Transplantation 6(2): 230-247.
- Frisbie, D. D., J. D. Kisiday, et al. (2009). "Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis." J Orthop Res 27(12): 1675-1680.
- Galie, M., M. Pignatti, et al. (2008). "Comparison of different centrifugation protocols for the best yield of adipose-derived stromal cells from lipoaspirates." Plast Reconstr Surg 122(6): 233e-234e.
- Galluzzi, L., E. Morselli, et al. (2008). "Life, death and burial: multifaceted impact of autophagy." Biochem Soc Trans 36(Pt 5): 786-790.
- Galluzzi, L., J. M. Vicencio, et al. (2008). "To die or not to die: that is the autophagic question." Curr Mol Med 8(2): 78-91.
- Gattegno-Ho, D., S. A. Argyle, et al. (2012). "Stem cells and veterinary medicine: tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery." Vet J 191(1): 19-27.
- Gehmert, S., S. Sadat, et al. (2008). "The anti-apoptotic effect of IGF-1 on tissue resident stem cells is mediated via PI3-kinase dependent secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) release." Biochem Biophys Res Commun 371(4): 752-755.
- Giffin, J. R. and W. D. Stanish (1993). "Overuse tendonitis and rehabilitation." Can Fam Physician 39: 1762-1769.
- Gimble, J. and F. Guilak (2003). "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential." Cytotherapy 5(5): 362-369.
- Gimble, J. M., B. A. Bunnell, et al. (2011). "Taking stem cells beyond discovery: a milestone in the reporting of regulatory requirements for cell therapy." Stem Cells Dev 20(8): 1295-1296.
- Gimble, J. M., F. Guilak, et al. (2010). "Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells." Stem Cell Res Ther 1(2): 19.
- Gimble, J. M., A. J. Katz, et al. (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." Circ Res 100(9): 1249-1260.
- Goodship, A. E., H. L. Birch, et al. (1994). "The pathobiology and repair of tendon and ligament injury." Vet Clin North Am Equine Pract 10(2): 323-349.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, et al. (1998). "Understanding adipocyte differentiation." Physiol Rev 78(3): 783-809.
- Griesche, N., W. Luttmann, et al. (2010). "A simple modification of the separation method reduces heterogeneity of adipose-derived stem cells." Cells Tissues Organs 192(2): 106-115.
- Grishko, V., M. Xu, et al. (2010). "Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine." J Bone Joint Surg Am 92(3): 609-618.

- Gronthos, S., D. M. Franklin, et al. (2001). "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells." J Cell Physiol 189(1): 54-63.
- Guercio, A., P. Di Marco, et al. (2012). "Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints." Cell Biol Int 36(2): 189-194.
- Gurunluoglu, R., A. Gurunluoglu, et al. (2011). "Current Trends in Breast Reconstruction: Survey of American Society of Plastic Surgeons 2010." Ann Plast Surg.
- Hanke, C. W., G. Bernstein, et al. (1995). "Safety of tumescent liposuction in 15,336 patients. National survey results." Dermatol Surg 21(5): 459-462.
- Harman, R., Black L., Harman S., Smith A. (2011). "The FDA approval process for veterinary allogenic stem cell products – Yes – Stem cells are drugs in veterinary medicine too." Presented at IFATS 2011, Miami
- Harris, J. (2011). "Autophagy and cytokines." Cytokine 56(2): 140-144.
- Henics, T. and D. N. Wheatley (1999). "Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features." Biol Cell 91(7): 485-498.
- Henneke, D. R., Potter G. D., Kreider J. L. and Yeates B. F. (1983). "Relationship Between Condition Score, Physical Measurements and Body Fat Percentage in Mares." Equine Veterinary Journal 15: 371 – 372
- Henninger, R. (1994). "Treatment of superficial digital flexor tendinitis." Vet Clin North Am Equine Pract 10(2): 409-424.
- Henry, S. L., J. G. Bensley, et al. (2012). "White adipocytes: more than just fat depots." Int J Biochem Cell Biol 44(3): 435-440.
- Hernandez-Perez, E. (1998). "Practice perspectives: fat injection in different parts of the body." Dermatol Nurs 10(2): 135-138.
- Herthel D. J. (2001). "Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and Other Bone Marrow Components." In Proceedings of the 47th annual convention AAEP, Nov 24th-28th 2001, San Diego Ca. AAEP. pp. 319 – 321
- Hiruma, H. and T. Kawakami (2011). "Characteristics of weak base-induced vacuoles formed around individual acidic organelles." Folia Histochem Cytobiol 49(2): 272-279.
- Hoareau, L., M. Buyse, et al. (2009). "Anti-inflammatory effect of palmitoylethanolamide on human adipocytes." Obesity (Silver Spring) 17(3): 431-438.
- Hoareau, L., P. Ravanan, et al. (2006). "Effect of PEA on LPS inflammatory action in human adipocytes." Cytokine 34(5-6): 291-296.
- Hocking, L. J., C. Whitehouse, et al. (2012). "Autophagy: a new player in skeletal maintenance?" J Bone Miner Res 27(7): 1439-1447.
- Hoffmann, A. and G. Gross (2007). "Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches." Int Orthop 31(6): 791-797.
- Hollmann, M. W. and M. E. Durieux (2000). "Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication?" Anesthesiology 93(3): 858-875.
- Hong, S. J., J. H. Lee, et al. (2010). "Enhancing the viability of fat grafts using new transfer medium containing insulin and beta-fibroblast growth factor in autologous fat transplantation." J Plast Reconstr Aesthet Surg 63(7): 1202-1208.
- Hossain, M. A., J. Park, et al. (2008). "Dexamethasone induces apoptosis in proliferative canine tendon cells and chondrocytes." Vet Comp Orthop Traumatol 21(4): 337-342.
- Housman, T. S., N. Lawrence, et al. (2002). "The safety of liposuction: results of a national survey." Dermatol Surg 28(11): 971-978.
- Huber, T. B., C. L. Edelstein, et al. (2012). "Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging." Autophagy 8(7).
- Hyun, I., O. Lindvall, et al. (2008). "New ISSCR guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research." Cell Stem Cell 3(6): 607-609.

- Ikegame, Y., K. Yamashita, et al. (2011). "Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy." Cytotherapy 13(6): 675-685.
- Illouz, Y. G. (1986). "The fat cell "graft": a new technique to fill depressions." Plast Reconstr Surg 78(1): 122-123.
- Illouz, Y. G. and A. Sterodimas (2009). "Autologous fat transplantation to the breast: a personal technique with 25 years of experience." Aesthetic Plast Surg 33(5): 706-715.
- Ishimura, D., N. Yamamoto, et al. (2008). "Differentiation of adipose-derived stromal vascular fraction culture cells into chondrocytes using the method of cell sorting with a mesenchymal stem cell marker." Tohoku J Exp Med 216(2): 149-156.
- Ivanova-Todorova, E., I. Bochev, et al. (2009). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Immunol Lett 126(1-2): 37-42.
- Jacobs, T. F., P. S. Vansintjan, et al. (2011). "The effect of Lidocaine on the viability of cultivated mature human cartilage cells: an in vitro study." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 19(7): 1206-1213.
- Jauffret, J. L., P. Champsaur, et al. (2001). "[Arguments in favor of adipocyte grafts with the S.R. Coleman technique]." Ann Chir Plast Esthet 46(1): 31-38.
- Johnson, G. W. (1987). "Body contouring by macroinjection of autologous fat." Am J Cosmet Surg 4: 103-109.
- Joseph, G. B., T. Baum, et al. (2012). "Baseline mean and heterogeneity of MR cartilage T2 are associated with morphologic degeneration of cartilage, meniscus, and bone marrow over 3 years--data from the Osteoarthritis Initiative." Osteoarthritis Cartilage 20(7): 727-735.
- Juhasz, G. and T. P. Neufeld (2006). "Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source." PLoS Biol 4(2): e36.
- Jurgens, W. J., M. J. Oedayrajsingh-Varma, et al. (2008). "Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies." Cell Tissue Res 332(3): 415-426.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, et al. (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." EMBO J 19(21): 5720-5728.
- Kannus, P. (2000). "Structure of the tendon connective tissue." Scand J Med Sci Sports 10(6): 312-320.
- Karam, J. P., C. Muscari, et al. (2012). "Combining adult stem cells and polymeric devices for tissue engineering in infarcted myocardium." Biomaterials 33(23): 5683-5695.
- Kaufman, M. R., J. P. Bradley, et al. (2007). "Autologous fat transfer national consensus survey: trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results." Plast Reconstr Surg 119(1): 323-331.
- Kaufman, M. R., T. A. Miller, et al. (2007). "Autologous fat transfer for facial recontouring: is there science behind the art?" Plast Reconstr Surg 119(7): 2287-2296.
- Keck, M., J. Janke, et al. (2009). "Viability of Preadipocytes In Vitro: The Influence of Local Anesthetics and pH." Dermatologic Surgery 35(8): 1251-1257.
- Keck, M., M. Zeyda, et al. (2012). "Coenzyme q10 does not enhance preadipocyte viability in an in vitro lipotransfer model." Aesthetic Plast Surg 36(2): 453-457.
- Keck, M., M. Zeyda, et al. (2010). "Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation into adipocytes." Plast Reconstr Surg 126(5): 1500-1505.

- Khouri, R. K., M. Eisenmann-Klein, et al. (2012). "Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study." Plast Reconstr Surg 129(5): 1173-1187.
- Kieffer, E., S. Kuntz, et al. (2010). "[An overview of pluripotent stem cell lines]." Med Sci (Paris) 26(10): 848-854.
- Killian, M. L., L. Cavinatto, et al. (2012). "The role of mechanobiology in tendon healing." J Shoulder Elbow Surg 21(2): 228-237.
- Kim, W. S., B. S. Park, et al. (2008). "Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress." J Dermatol Sci 49(2): 133-142.
- Kim, Y., H. Kim, et al. (2007). "Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia." Cell Physiol Biochem 20(6): 867-876.
- Kishi, K., N. Imanishi, et al. (2010). "Distribution of adipose-derived stem cells in adipose tissues from human cadavers." J Plast Reconstr Aesthet Surg 63(10): 1717-1722.
- Kisiel, A. H., L. A. McDuffee, et al. (2012). "Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum." Am J Vet Res 73(8): 1305-1317.
- Klein, J. A. (1987). "The tumescent technique for liposuction surgery." Am J Cosmetic Surg 4:263-267.
- Klionsky, D. J. (2007). "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade." Nat Rev Mol Cell Biol 8(11): 931-937.
- Klionsky, D. J., F. C. Abdalla, et al. (2012). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy." Autophagy 8(4): 445-544.
- Koch, T. G. and D. H. Betts (2007). "Stem cell therapy for joint problems using the horse as a clinically relevant animal model." Expert Opin Biol Ther 7(11): 1621-1626.
- Kol, A., N. J. Walker, et al. (2012). "Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression." Equine Vet J.
- Kondo, Y. and S. Kondo (2006). "Autophagy and cancer therapy." Autophagy 2(2): 85-90.
- Koppen, A. and E. Kalkhoven (2010). "Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story." FEBS Lett 584(15): 3250-3259.
- Kroemer, G. and M. Jaattela (2005). "Lysosomes and autophagy in cell death control." Nat Rev Cancer 5(11): 886-897.
- Kuo, C. K., J. E. Marturano, et al. (2010). "Novel strategies in tendon and ligament tissue engineering: Advanced biomaterials and regeneration motifs." Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol 2: 20.
- Kurita, M., D. Matsumoto, et al. (2008). "Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation." Plast Reconstr Surg 121(3): 1033-1041; discussion 1042-1033.
- Lampe, K. J. and S. C. Heilshorn (2012). "Building stem cell niches from the molecule up through engineered peptide materials." Neurosci Lett 519(2): 138-146.
- Large, V., S. Reynisdottir, et al. (1997). "Lipolysis in human fat cells obtained under local and general anesthesia." Int J Obes Relat Metab Disord 21(1): 78-82.
- Lavallard, V. J., A. J. Meijer, et al. (2012). "Autophagy, signaling and obesity." Pharmacol Res.
- Lawson, S. E., H. Chateau, et al. (2007). "Effect of toe and heel elevation on calculated tendon strains in the horse and the influence of the proximal interphalangeal joint." J Anat 210(5): 583-591.

- Lee, E. Y., Y. Xia, et al. (2009). "Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF." Wound Repair Regen 17(4): 540-547.
- Lee, M. J., Y. Wu, et al. (2010). "Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity." Curr Opin Clin Nutr Metab Care 13(4): 371-376.
- Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." Cell 132(1): 27-42.
- Li, C. Y., C. S. Tsai, et al. (2003). "Lidocaine attenuates monocyte chemoattractant protein-1 production and chemotaxis in human monocytes: possible mechanisms for its effect on inflammation." Anesth Analg 97(5): 1312-1316.
- Li, H., K. Dai, et al. (2007). "Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2." Biochem Biophys Res Commun 356(4): 836-842.
- Lim, J. H., L. Boozer, et al. (2010). "Generation and characterization of neurospheres from canine adipose tissue-derived stromal cells." Cell Reprogram 12(4): 417-425.
- Lin, C. S., G. Lin, et al. (2012). "Allogeneic and Xenogeneic Transplantation of Adipose-Derived Stem Cells in Immunocompetent Recipients Without Immunosuppressants." Stem Cells Dev.
- Lin, K., Y. Matsubara, et al. (2008). "Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system." Cytotherapy 10(4): 417-426.
- Lindroos, B., R. Suuronen, et al. (2011). "The potential of adipose stem cells in regenerative medicine." Stem Cell Rev 7(2): 269-291.
- Livesey, K. M., D. Tang, et al. (2009). "Autophagy inhibition in combination cancer treatment." Curr Opin Investig Drugs 10(12): 1269-1279.
- Locke, M., V. Feisst, et al. (2011). "Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need." Stem Cells 29(3): 404-411.
- Locke, M., J. E. Ussher, et al. (2011). "Transduction of human adipose-derived mesenchymal stem cells by recombinant adeno-associated virus vectors." Tissue Eng Part C Methods 17(9): 949-959.
- Lopatina, T., N. Kalinina, et al. (2011). "Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo." PLoS ONE 6(3): e17899.
- Lotz, M. K. and B. Carames (2011). "Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA." Nat Rev Rheumatol 7(10): 579-587.
- Lucchinetti, E., A. E. Awad, et al. (2012). "Antiproliferative effects of local anesthetics on mesenchymal stem cells: potential implications for tumor spreading and wound healing." Anesthesiology 116(4): 841-856.
- Maffulli, N., U. G. Longo, et al. (2010). "Novel approaches for the management of tendinopathy." J Bone Joint Surg Am 92(15): 2604-2613.
- Mambelli, L. I., E. J. Santos, et al. (2009). "Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation." Tissue Eng Part C Methods 15(1): 87-94.
- Marra, K. (2011). "Encapsulated adipogenic factors effect in adipose graft retention." Presented at IFATS 2011, Miami
- Marsolais, D. and J. Frenette (2005). "[Inflammation and tendon healing]." Med Sci (Paris) 21(2): 181-186.
- Martinet, W., M. W. Knaapen, et al. (2007). "Autophagy in cardiovascular disease." Trends Mol Med 13(11): 482-491.
- Matsumoto, D., K. Sato, et al. (2006). "Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection." Tissue Eng 12(12): 3375-3382.



- Maumus, M., J. A. Peyrafitte, et al. (2011). "Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype." Int J Obes (Lond) 35(9): 1141-1153.
- Maurice, J. M., Y. Gan, et al. (2010). "Bupivacaine causes cytotoxicity in mouse C2C12 myoblast cells: involvement of ERK and Akt signaling pathways." Acta Pharmacologica Sinica 31(4): 493-500.
- Mazzeinghi, B., E. Ronconi, et al. (2008). "Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells." J Exp Med 205(2): 479-490.
- McCarrel, T. and L. Fortier (2009). "Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression." J Orthop Res 27(8): 1033-1042.
- Medina, M. A., 3rd, J. T. Nguyen, et al. (2011). "Polymer therapy: a novel treatment to improve fat graft viability." Plast Reconstr Surg 127(6): 2270-2282.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2006). "Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease." Mol Aspects Med 27(5-6): 411-425.
- Meley, D., S. Pattingre, et al. (2006). "[PI3 kinases and the control of autophagia]." Bull Cancer 93(5): 439-444.
- Memon, I. A., Y. Sawa, et al. (2005). "Combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in canine hearts for ischemic cardiomyopathy." J Thorac Cardiovasc Surg 130(3): 646-653.
- Merceron, C., S. Portron, et al. (2012). "Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine." Stem Cells 30(3): 471-480.
- Merceron, C., C. Vinatier, et al. (2008). "Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering." Joint Bone Spine 75(6): 672-674.
- Mitchell, J. B., K. McIntosh, et al. (2006). "Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers." Stem Cells 24(2): 376-385.
- Mizuno, H. (2009). "Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review." J Nihon Med Sch 76(2): 56-66.
- Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." Genes Dev 21(22): 2861-2873.
- Mizushima, N., B. Levine, et al. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature 451(7182): 1069-1075.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, et al. (2010). "Methods in mammalian autophagy research." Cell 140(3): 313-326.
- Mohty, M. and A. D. Ho (2011). "In and out of the niche: perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells." Exp Hematol 39(7): 723-729.
- Mojallal, A. and J. L. Foyatier (2004). "[Historical review of the use of adipose tissue transfer in plastic and reconstructive surgery]." Ann Chir Plast Esthet 49(5): 419-425.
- Moon, M. H., S. Y. Kim, et al. (2006). "Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia." Cell Physiol Biochem 17(5-6): 279-290.
- Moore, J. H., Jr., J. W. Kolaczynski, et al. (1995). "Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine." Aesthetic Plast Surg 19(4): 335-339.
- Moore, K. E., J. F. Mills, et al. (2006). "Alternative sources of adult stem cells: a possible solution to the embryonic stem cell debate." Gend Med 3(3): 161-168.

- Morissette, G. (2004). "Massive Cell Vacuolization Induced by Organic Amines Such as Procainamide." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 310(1): 395-406.
- Moseley, T. A., M. Zhu, et al. (2006). "Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery." Plast Reconstr Surg 118(3 Suppl): 121S-128S.
- Murumalla, R., K. Bencharif, et al. (2011). "Effect of the Cannabinoid Receptor-1 antagonist SR141716A on human adipocyte inflammatory profile and differentiation." J Inflamm (Lond) 8: 33.
- Musilli, C., J. P. Karam, et al. (2012). "Pharmacologically active microcarriers for endothelial progenitor cell support and survival." Eur J Pharm Biopharm 81(3): 609-616.
- Muttini, A., L. Valbonetti, et al. (2012). "Ovine amniotic epithelial cells: In vitro characterization and transplantation into equine superficial digital flexor tendon spontaneous defects." Res Vet Sci.
- Nakamura, S., M. Ishihara, et al. (2010). "Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats." Ann Plast Surg 65(1): 101-106.
- Nemchenko, A., M. Chiong, et al. (2011). "Autophagy as a therapeutic target in cardiovascular disease." J Mol Cell Cardiol 51(4): 584-593.
- Neuber, G. (1893). "Fetttransplantation." Verh Dstch Ges Chir 22:66.
- Nguyen, A., K. A. Pasyk, et al. (1990). "Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques." Plast Reconstr Surg 85(3): 378-386; discussion 387-379.
- Nguyen, P. S., C. Desouches, et al. (2012). "Development of micro-injection as an innovative autologous fat graft technique: The use of adipose tissue as dermal filler." J Plast Reconstr Aesthet Surg.
- Nixon, A. J., L. A. Dahlgren, et al. (2008). "Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis." Am J Vet Res 69(7): 928-937.
- Nixon, A. J., A. E. Watts, et al. (2012). "Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration." J Shoulder Elbow Surg 21(2): 278-294.
- Oedayrajsingh-Varma, M. J., S. M. van Ham, et al. (2006). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure." Cytotherapy 8(2): 166-177.
- Oh, D. S., Y. W. Cheon, et al. (2011). "Activated platelet-rich plasma improves fat graft survival in nude mice: a pilot study." Dermatol Surg 37(5): 619-625.
- Pacini, S., S. Spinabella, et al. (2007). "Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses." Tissue Eng 13(12): 2949-2955.
- Parkinson, J., T. Samiric, et al. (2011). "Involvement of proteoglycans in tendinopathy." J Musculoskelet Neuronal Interact 11(2): 86-93.
- Patterson-Kane, J. C., D. L. Becker, et al. (2012). "The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: the horse as a natural model for basic cellular research." J Comp Pathol 147(2-3): 227-247.
- Peer, L. A. (1950). "Loss of Weight and Volume in Human Fat Grafts: With Postulation of A "Cell Survival Theory"." Plastic and Reconstructive Surgery 5(3): 217-230.
- Peterson, M. J., S. A. Czerwinski, et al. (2003). "Development and validation of skinfold-thickness prediction equations with a 4-compartment model." Am J Clin Nutr 77(5): 1186-1191.
- Petit, J. Y., V. Lohsiriwat, et al. (2011). "The oncologic outcome and immediate surgical complications of lipofilling in breast cancer patients: a multicenter study--Milan-Paris-Lyon experience of 646 lipofilling procedures." Plast Reconstr Surg 128(2): 341-346.

- Phadwal, K., A. S. Watson, et al. (2012). "Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging." Cell Mol Life Sci.
- Philips, B. J., K. G. Marra, et al. (2012). "Adipose stem cell-based soft tissue regeneration." Expert Opin Biol Ther 12(2): 155-163.
- Pires Fraga, M. F., R. T. Nishio, et al. (2010). "Increased survival of free fat grafts with platelet-rich plasma in rabbits." J Plast Reconstr Aesthet Surg 63(12): e818-822.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science 284(5411): 143-147.
- Planat-Benard, V., C. Menard, et al. (2004). "Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells." Circ Res 94(2): 223-229.
- Planat-Benard, V., J. S. Silvestre, et al. (2004). "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives." Circulation 109(5): 656-663.
- Plotnikov, E. Y., T. G. Khryapenkova, et al. (2010). "Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture." Exp Cell Res 316(15): 2447-2455.
- Por, Y. C., V. K. Yeow, et al. (2009). "Platelet-rich plasma has no effect on increasing free fat graft survival in the nude mouse." J Plast Reconstr Aesthet Surg 62(8): 1030-1034.
- Pountos, I., D. Corscadden, et al. (2007). "Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application." Injury 38 Suppl 4: S23-33.
- Prockop, D. J. and K. I. Kivirikko (1995). "Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy." Annu Rev Biochem 64: 403-434.
- Prunet-Marcassus, B., B. Cousin, et al. (2006). "From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences." Exp Cell Res 312(6): 727-736.
- Puissant, B., C. Barreau, et al. (2005). "Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells." Br J Haematol 129(1): 118-129.
- Raabe, O., K. Shell, et al. (2011). "Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells." Vet Res Commun 35(6): 355-365.
- Rada, T., R. L. Reis, et al. (2009). "Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering." Tissue Eng Part B Rev 15(2): 113-125.
- Rada, T., R. L. Reis, et al. (2011). "Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential." Stem Cell Rev 7(1): 64-76.
- Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature 356(6368): 397-400.
- Raymond, K., M. A. Deugnier, et al. (2009). "Adhesion within the stem cell niches." Curr Opin Cell Biol 21(5): 623-629.
- Rehman, J., D. Traktuev, et al. (2004). "Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells." Circulation 109(10): 1292-1298.
- Reymond, E., H. Langlois, et al. (1910). Interpellation de m. le dr Émile Reymond, sénateur de la Loire, sur l'aérostation militaire. Paris., Impr. des Journaux officiels.
- Ribitsch, I., J. Burk, et al. (2010). "Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine." Adv Biochem Eng Biotechnol 123: 219-263.
- Richardson, L. E., J. Dudhia, et al. (2007). "Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury." Trends Biotechnol 25(9): 409-416.
- Riley, G. (2008). "Tendinopathy--from basic science to treatment." Nat Clin Pract Rheumatol 4(2): 82-89.

- Riley, G. P., M. Cox, et al. (2001). "Inhibition of tendon cell proliferation and matrix glycosaminoglycan synthesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs in vitro." J Hand Surg Br 26(3): 224-228.
- Rodbell, M. (1964). "Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis." J Biol Chem 239: 375-380.
- Rodrigues, M. T., R. L. Reis, et al. (2012). "Engineering tendon and ligament tissues: present developments towards successful clinical products." J Tissue Eng Regen Med.
- Rombouts, W. J. and R. E. Ploemacher (2003). "Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture." Leukemia 17(1): 160-170.
- Rosen, E. D. and O. A. MacDougald (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." Nat Rev Mol Cell Biol 7(12): 885-896.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." Nature 444(7121): 847-853.
- Rosland, G. V., A. Svendsen, et al. (2009). "Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation." Cancer Res 69(13): 5331-5339.
- Rossert, J., C. Terraz, et al. (2000). "Regulation of type I collagen genes expression." Nephrol Dial Transplant 15 Suppl 6: 66-68.
- Rubin, J. P., A. DeFail, et al. (2009). "Encapsulation of adipogenic factors to promote differentiation of adipose-derived stem cells." J Drug Target 17(3): 207-215.
- Ryu, H. H., J. H. Lim, et al. (2009). "Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury." J Vet Sci 10(4): 273-284.
- Sadat, S., S. Gehmert, et al. (2007). "The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF." Biochem Biophys Res Commun 363(3): 674-679.
- Saito, T., J. Q. Kuang, et al. (2002). "Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells." Ann Thorac Surg 74(1): 19-24; discussion 24.
- Salgado, A. J., R. L. Reis, et al. (2010). "Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine." Curr Stem Cell Res Ther 5(2): 103-110.
- Salgarello, M., G. Visconti, et al. (2011). "Breast fat grafting with platelet-rich plasma: a comparative clinical study and current state of the art." Plast Reconstr Surg 127(6): 2176-2185.
- Sanz-Ruiz, R., M. E. Santos, et al. (2008). "Adipose tissue-derived stem cells: the friendly side of a classic cardiovascular foe." J Cardiovasc Transl Res 1(1): 55-63.
- Scadden, D. T. (2006). "The stem-cell niche as an entity of action." Nature 441(7097): 1075-1079.
- Scarlatti, F., C. Bauvy, et al. (2004). "Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1." J Biol Chem 279(18): 18384-18391.
- Schaffler, A., J. Scholmerich, et al. (2005). "Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2(2): 103-111.
- Sen, A., Y. R. Lea-Currie, et al. (2001). "Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous." J Cell Biochem 81(2): 312-319.
- Sensebe, L., P. Bourin, et al. (2011). "Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells." Hum Gene Ther 22(1): 19-26.
- Shafik, A. (1995). "Perianal injection of autologous fat for treatment of sphincteric incontinence." Dis Colon Rectum 38(6): 583-587.

- Shiffman, M. (2010). History of Autologous Fat Transfer. Autologous Fat Transfer. M. A. Shiffman, Springer Berlin Heidelberg: 3-4.
- Shiffman, M. A. (2010). Autologous fat transfer : art, science, and clinical practice. Berlin, Springer.
- Shiffman, M. A. (2010). History of Autologous Fat Transplant Survival Autologous Fat Transfer. M. A. Shiffman, Springer Berlin Heidelberg: 5-10.
- Shizuru, J. A., R. S. Negrin, et al. (2005). "Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hemato-lymphoid system." Annu Rev Med 56: 509-538.
- Shoshani, O., J. Berger, et al. (2005). "The effect of lidocaine and adrenaline on the viability of injected adipose tissue--an experimental study in nude mice." J Drugs Dermatol 4(3): 311-316.
- Shukunami, C., A. Takimoto, et al. (2006). "Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes." Dev Biol 298(1): 234-247.
- Siminovitch, L., E. A. McCulloch, et al. (1963). "The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies." J Cell Physiol 62: 327-336.
- Singh, R., Y. Xiang, et al. (2009). "Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice." J Clin Invest 119(11): 3329-3339.
- Smith, P., W. P. Adams, Jr., et al. (2006). "Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival." Plast Reconstr Surg 117(6): 1836-1844.
- Smith, R. K. (2008). "Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy." Disabil Rehabil 30(20-22): 1752-1758.
- Smith, R. K., M. Korda, et al. (2003). "Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment." Equine Vet J 35(1): 99-102.
- Sommer, B. and G. Sattler (2000). "Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature." Dermatol Surg 26(12): 1159-1166.
- Spees, J. L., S. D. Olson, et al. (2006). "Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration." Proc Natl Acad Sci U S A 103(5): 1283-1288.
- Stanley, R. L., R. A. Fleck, et al. (2007). "Gap junction protein expression and cellularity: comparison of immature and adult equine digital tendons." J Anat 211(3): 325-334.
- Stephens, P. R., D. M. Nunamaker, et al. (1989). "Application of a Hall-effect transducer for measurement of tendon strains in horses." Am J Vet Res 50(7): 1089-1095.
- Sterodimas, A., F. Boriani, et al. (2012). "Thirtyfour years of liposuction: past, present and future." Eur Rev Med Pharmacol Sci 16(3): 393-406.
- Sumrall, A. J. (1987). "A review of liposuction as a cosmetic surgical procedure." J Natl Med Assoc 79(12): 1275-1279.
- Tabit, C. J., G. C. Slack, et al. (2011). "Fat Grafting Versus Adipose-Derived Stem Cell Therapy: Distinguishing Indications, Techniques, and Outcomes." Aesthetic Plast Surg.
- Tabit, C. J., G. C. Slack, et al. (2012). "Fat grafting versus adipose-derived stem cell therapy: distinguishing indications, techniques, and outcomes." Aesthetic Plast Surg 36(3): 704-713.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell 126(4): 663-676.
- Tan, J., E. Buache, et al. (2011). "Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells." Int J Dev Biol 55(7-9): 851-859.

- Tarnus, E. and E. Bourdon (2006). "Anthropometric evaluations of body composition of undergraduate students at the University of La Reunion." Adv Physiol Educ 30(4): 248-253.
- Tarte, K., J. Gaillard, et al. (2010). "Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation." Blood 115(8): 1549-1553.
- Taylor, S. E., A. Vaughan-Thomas, et al. (2009). "Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems." BMC Musculoskelet Disord 10: 27.
- Temourian B. (1988). "Blindness following fat injections". Plast Reconstr Surg 82(1):361.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science 282(5391): 1145-1147.
- Thomson, J. A. and V. S. Marshall (1998). "Primate embryonic stem cells." Curr Top Dev Biol 38: 133-165.
- Till, J. E. and C. E. Mc (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res 14: 213-222.
- Till, J. E. and C. E. Mc (1963). "Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo." Radiat Res 18: 96-105.
- Tiryaki, T., N. Findikli, et al. (2011). "Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: a preliminary report." Aesthetic Plast Surg 35(6): 965-971.
- Trayhurn, P. (2005). "Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat." Acta Physiol Scand 184(4): 285-293.
- Trojahn Kollé, S. F., R. S. Oliveri, et al. (2012). "Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: a systematic review of existing studies." J Plast Surg Hand Surg 46(2): 59-68.
- Trounson, A., R. G. Thakar, et al. (2011). "Clinical trials for stem cell therapies." BMC Med 9: 52.
- Umeno, H., H. Shirouzu, et al. (2005). "Analysis of voice function following autologous fat injection for vocal fold paralysis." Otolaryngol Head Neck Surg 132(1): 103-107.
- van der Worp, H., I. van den Akker-Scheek, et al. (2012). "ESWT for tendinopathy: technology and clinical implications." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.
- Varma, M. J., R. G. Breuls, et al. (2007). "Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells." Stem Cells Dev 16(1): 91-104.
- Verwilghen et al. (2010). "Les tendinopathies et desmopathies de la région métacarpienne et tarsienne : une revue des thérapies actuelles. Seconde partie : les traitements." Ann. Méd. Vét. 154, 1-15
- Vidal, M. A., G. E. Kilroy, et al. (2007). "Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells." Vet Surg 36(7): 613-622.
- Vieira, N. M., V. Brandalise, et al. (2010). "Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells." Cell Transplant 19(3): 279-289.
- Vinatier, C., D. Mrugala, et al. (2009). "Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors." Trends Biotechnol 27(5): 307-314.
- Wagner, J., T. Kean, et al. (2009). "Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics." Curr Opin Biotechnol 20(5): 531-536.
- Wajchenberg, B. L. (2000). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome." Endocr Rev 21(6): 697-738.

- Wang, H. L., W. H. Zhang, et al. (2011). "The inhibitory effect of lidocaine on the release of high mobility group box 1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages." Anesth Analg 112(4): 839-844.
- Wang, Y., Z. B. Han, et al. (2012). "Safety of mesenchymal stem cells for clinical application." Stem Cells Int 2012: 652034.
- Watts, A. E., A. E. Yeager, et al. (2011). "Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model." Stem Cell Res Ther 2(1): 4.
- Weissman, I. L. and J. A. Shizuru (2008). "The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases." Blood 112(9): 3543-3553.
- Wertheimer, E. and B. Shapiro (1948). "The physiology of adipose tissue." Physiol Rev 28(4): 451-464.
- Wognum, A. W., A. C. Eaves, et al. (2003). "Identification and isolation of hematopoietic stem cells." Arch Med Res 34(6): 461-475.
- Wolkenstein, O. v., K. K. Klein, et al. (1987). Die Lieder Oswalds von Wolkenstein. Tübingen, M. Niemeyer.
- Wong, V. W., B. Levi, et al. (2012). "Stem cell niches for skin regeneration." Int J Biomater 2012: 926059.
- Wronska, A. and Z. Kmiec (2012). "Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots." Acta Physiol (Oxf) 205(2): 194-208.
- Wu, A. G., M. Michejda, et al. (1999). "Analysis and characterization of hematopoietic progenitor cells from fetal bone marrow, adult bone marrow, peripheral blood, and cord blood." Pediatr Res 46(2): 163-169.
- Wu, I., Z. Nahas, et al. (2012). "An injectable adipose matrix for soft-tissue reconstruction." Plast Reconstr Surg 129(6): 1247-1257.
- Xie, Z. and D. J. Klionsky (2007). "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." Nat Cell Biol 9(10): 1102-1109.
- Xu, Y. and G. A. Murrell (2008). "The basic science of tendinopathy." Clin Orthop Relat Res 466(7): 1528-1538.
- Yanez, R., M. L. Lamana, et al. (2006). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease." Stem Cells 24(11): 2582-2591.
- Yanez, R., A. Oviedo, et al. (2010). "Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells." Exp Cell Res 316(19): 3109-3123.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Eaten alive: a history of macroautophagy." Nat Cell Biol 12(9): 814-822.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation." Curr Opin Cell Biol 22(2): 124-131.
- Yi, T. and S. U. Song (2012). "Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications." Arch Pharm Res 35(2): 213-221.
- Yoo, S. W., S. S. Kim, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model." Exp Mol Med 40(4): 387-397.
- Yoshimura, K., Y. Asano, et al. (2010). "Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications." Breast J 16(2): 169-175.
- Yoshimura, K., H. Eto, et al. (2011). "In vivo manipulation of stem cells for adipose tissue repair/reconstruction." Regen Med 6(6 Suppl): 33-41.

- Yoshimura, K., K. Sato, et al. (2007). "Cell-Assisted Lipotransfer for Cosmetic Breast Augmentation: Supportive Use of Adipose-Derived Stem/Stromal Cells." Aesthetic Plastic Surgery 32(1): 48-55.
- Yoshimura, K., K. Sato, et al. (2008). "Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells." Aesthetic Plast Surg 32(1): 48-55; discussion 56-47.
- Yoshimura, K., K. Sato, et al. (2008). "Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells." Dermatol Surg 34(9): 1178-1185.
- Yoshimura, K., T. Shigeura, et al. (2006). "Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates." J Cell Physiol 208(1): 64-76.
- Yoshizaki, T., C. Kusunoki, et al. (2012). "Autophagy regulates inflammation in adipocytes." Biochem Biophys Res Commun 417(1): 352-357.
- Young, N. J., D. L. Becker, et al. (2009). "Maturational alterations in gap junction expression and associated collagen synthesis in response to tendon function." Matrix Biol 28(6): 311-323.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science 318(5858): 1917-1920.
- Yuksel, E., A. B. Weinfeld, et al. (2000). "Increased free fat-graft survival with the long-term, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-I, and basic fibroblast growth factor by PLGA/PEG microspheres." Plast Reconstr Surg 105(5): 1712-1720.
- Zhang, Y., S. Goldman, et al. (2009). "Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 106(47): 19860-19865.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature 372(6505): 425-432.
- Zhu, M., Z. Zhou, et al. (2010). "Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention." Ann Plast Surg 64(2): 222-228.
- Zuk, P. A. (2010). "The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead." Mol Biol Cell 21(11): 1783-1787.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell 13(12): 4279-4295.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng 7(2): 211-228.



## Sites Internet

Agence de la biomédecine :

<http://www.agence-biomedecine.fr/>

ANSM :

<http://ansm.sante.fr/Produits-de-sante/Produits-cellulaires-a-finalite-therapeutique>

BiopTis :

<http://www.biopTis.com>

Clinique Desbrosse (Saint Lambert des Bois, 78), médecine et chirurgie équine :

<http://www.cliniquedesbrosse.fr>.

European Medicines Agency (EMA) :

<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/cat/57113409en.pdf>

Food and Drug Administration (FDA) :

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/default.htm>

Législation sur les produits thérapeutiques annexes et l'autorisation de mise sur le marché :

<http://droit-finances.commentcamarche.net/legifrance/511589-produits-therapeutiques-annexes>

Réglementation européenne sur les « médicaments de thérapie innovante » (EC) N° 1394/2007 :

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:324:0121:0137:EN:PDF>

SoFCPRE :

<http://www.plasticiciens.org/Sfcpre.php?sec=10>

Tissue Genesis :

<http://www.tissuegenesis.com>

Vet-Stem :

[www.vet-stem.com](http://www.vet-stem.com)

VetCell :

<http://www.vetcell.com/equine-stem-cell-therapy/>

## GLOSSAIRE

**Allogénique** : se dit d'une greffe dont le donneur est différent du receveur, à l'opposé de greffe autologue.

**Amyotrophie** : fonte musculaire.

**Aponévrose** : membrane fibreuse enveloppant un muscle ou un groupe de muscle. Une aponévrose d'insertion peut être présente pour permettre l'insertion d'un muscle (ou d'un tendon) à un os.

**Apoptose** : mort cellulaire programmée ; à l'opposé de la nécrose\*, l'apoptose est un mécanisme par lequel la cellule déclenche son autodestruction (sorte de « suicide ») en réponse à des signaux. Ce mécanisme naturel est indispensable au développement et à la survie des organismes multicellulaires.

**Autocrine** : se dit de molécules sécrétées par une cellule et qui exercent des effets sur cette même cellule.

**Autologue** : se dit d'une greffe dont le donneur est le receveur.

**Autophagie** : du grec, « se manger soi-même » ; désigne un mécanisme par lequel une cellule peut digérer une partie de son contenu (contenu cytoplasmique, organites et protéines cellulaires). Stress, carence nutritionnelle, absence de facteurs de croissance ou hypoxie peuvent déclencher l'autophagie. L'autophagie joue un rôle physiologique important, notamment dans le maintien de l'homéostasie\*, et aurait également un rôle anti-tumoral et un rôle protecteur dans les maladies neurodégénératives.

**Autophagosome** : vésicule d'autophagie\* à double membrane dans laquelle sont séquestrés des constituants cytoplasmiques ou des pathogènes, en vue de leur dégradation.

**Autophagolysosome** ou **autolysosome** : vésicule résultant de la fusion entre un phagophore et un lysosome (ou un endosome). Le contenu séquestré ainsi que la membrane interne de l'autophagosome\* sont alors dégradés par les hydrolases lysosomales.

**Axonotmésis** : rupture des axones.

**Cardiomyopathie dilatée canine** : maladie cardiaque touchant principalement les chiens de grand format (Doberman, Dogue Allemand, Terre Neuve, Boxer, Rottweiler...) mais aussi le Cocker et le Dalmatien. Cette maladie est caractérisée par une dilatation des cavités cardiaques (ventricules et oreillettes) et un amincissement de la paroi du myocarde, entraînant une insuffisance cardiaque et pouvant aboutir au décès prématuré des chiens atteints.

**Cellularité** : taux de cellules présentes dans un tissu.

**Cellule souche** : cellule non spécialisée capable de s'auto-renouveler et de se différencier.

**Chimiokine** : ou cytokine chimioattractante, désigne une protéine synthétisée et sécrétée par une cellule et attirant d'autres cellules. Il s'agit généralement de petites protéines, de 8 à 10 kDa. Les fonctions d'attraction (chémotactisme) et de contrôle de l'activation des cellules immunitaires sont les plus étudiées, mais les chimiokines participent également au développement et à la migration des cellules.

**Diabète** : dysfonctionnement du système de régulation de la glycémie (taux de sucre dans le sang, qui dépasse 1,26 g/L chez les diabétiques). Le **diabète de type 1** (insulino-dépendent) est considéré comme une maladie auto-immune puisque les cellules immunitaires participent à la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Ces cellules synthétisent normalement l'insuline, hormone indispensable qui permet entre autre de réguler les taux de glucose. Le **diabète de type 2** est quant à lui généralement non insulino-dépendent et apparaît souvent chez les personnes en surpoids ou obèses, et est également bien souvent associé au syndrome métabolique (hypertension artérielle, hyperglycémie, hypercholestérolémie). L'étiologie du diabète de type 2 est le développement d'une résistance à l'insuline, c'est-à-dire une insensibilisation des récepteurs cellulaires à l'insuline, empêchant le glucose de rentrer dans les cellules pour y être métabolisé. Le glucose s'accumule alors dans le sang ce qui provoque en contrepartie une hypersécrétion d'insuline

par le pancréas. Dans ce cercle vicieux, les cellules pancréatiques finissent par s'épuiser et une intolérance au glucose apparaît.

**Diapédèse :** faculté pour une cellule de se déplacer sur un substrat. C'est par ce mécanisme que les cellules passent de la circulation sanguine vers un tissu, traversant ainsi la paroi vasculaire. Ce phénomène est essentiellement décrit pour les leucocytes lorsque ceux-ci vont cibler un site d'inflammation.

**Différenciation :** processus par lequel une cellule non spécialisée acquiert les caractéristiques d'une cellule spécialisée, comme une cellule de tendon, de muscle, du cœur, du foie, etc. La différenciation est contrôlée par l'interaction des gènes d'une cellule avec les conditions physiques et chimiques extérieures à la cellule, généralement par le biais des voies de signalisation impliquant des protéines incorporées à la surface de la cellule.

**Dystrophie musculaire :** maladie musculaire (myopathie) d'origine héréditaire, caractérisée par une faiblesse progressive des muscles squelettiques, due à des défauts de production de protéines conduisant à la mort des cellules et du tissu musculaires.

**Endotendon :** membrane interne de nature conjonctive enveloppant les faisceaux de fibres à l'intérieur du tendon.

**Enthèse :** site d'insertion entre un tendon ou un ligament et un os.

**Fourbure :** pathologie grave chez le cheval (ou le bétail) entraînant le basculement de la troisième phalange. L'origine de ce basculement est une congestion inflammatoire aiguë du pied qui entraîne un arrêt de la circulation et une ischémie des tissus (notamment le podophylle, qui entoure les structures internes du pied). Les structures internes du pied se désolidarisent alors de la paroi du sabot et, sous la contrainte du poids du cheval et des forces exercées sur le pied, la troisième phalange bascule vers l'avant. Dans le cas le plus grave, la troisième phalange peut aller jusqu'à perforer la sole (face plantaire du sabot).

**Homéostasie :** processus physiologique permettant de maintenir un équilibre entre les composantes du milieu intérieur de l'organisme. L'homéostasie est nécessaire au bon

fonctionnement d'un tissu, d'un organe, et de l'organisme entier, permettant d'assurer une constance intérieure en dépit des contraintes du milieu extérieur.

**Hypotrophie** ou **atrophie** : caractérise la diminution de volume ou de poids d'un tissu ou d'un organe.

**Infarctus du myocarde** : communément appelé « crise cardiaque » ; représente la diminution aiguë et drastique de la perfusion. L'ischémie\* induite lorsque les artères coronaires se bouchent empêche l'oxygénation des cellules du muscle cardiaque, pouvant ainsi entraîner un arrêt de fonctionnement du cœur.

**Ischémie** : diminution de l'apport en oxygène d'un tissu ou d'un organe (hypoxie), causée par une diminution de l'apport sanguin artériel. L'ischémie peut perturber le fonctionnement de l'organe atteint, voir causer la nécrose des tissus et des dégâts irréversibles.

**Liquide synovial** : fluide visqueux qui permet la lubrification ainsi que l'apport de nutriments et la protection des articulations dites synoviales, ainsi que des tendons compris dans une gaine synoviale. Le liquide synovial permet également le glissement des structures, sans frottements (par exemple, le glissement des tendons au niveau des articulations qui font poulie comme au niveau du carpe).

**Macroautophagie** : type d'autophagie\* impliquant la formation d'un phagophore\* et d'un autophagosome\* pour séquestrer du contenu cytoplasmique (ou des pathogènes). Ce contenu est ensuite dégradé après fusion avec un lysosome ou un endosome.

**Maladie auto-immune** : dysfonction du système immunitaire qui reconnaît certaines cellules autologues comme étrangères.

**Maladie d'Alzheimer** : maladie neurodégénérative du tissu cérébral ; maladie progressive, irréversible et incurable entraînant la perte des fonctions mentales, notamment de la mémoire.

**Maladie de Crohn** : maladie inflammatoire chronique de l'intestin. L'inflammation est de nature auto-immune\* et est généralement localisée au niveau de la partie terminale de l'intestin grêle (iléon), du côlon et/ou de l'anus. Il s'agit d'une maladie rare, caractérisée par

des phases de rémissions, asymptomatiques, et des phases de poussées, ayant pour symptômes des douleurs abdominales, des diarrhées, et pouvant être accompagnées par une perte de poids, de la fièvre et de la fatigue. La flore intestinale des patients atteints est modifiée et la digestion est d'autant plus difficile.

**Maladie de Parkinson :** maladie neurodégénérative affectant le système nerveux central ayant pour symptômes une hypertonie musculaire (rigidité), un tremblement au repos, une akinésie (rareté et lenteur des mouvements). Cette maladie affecte ainsi la coordination des mouvements.

**Métalloprotéinases :** protéases (enzymes protéolytiques) participant à la dégradation de la matrice extracellulaire.

**Microautophagie :** type d'autophagie\* permettant la dégradation des protéines de longue vie directement par des vésicules de type lysosome, sans l'intervention d'une séquestration préalable dans un autophagosome\* comme c'est le cas pour la macroautophagie\*.

**Microsomie hémifaciale :** malformation faciale congénitale caractérisée par une hypoplasie mandibulaire (sous-développement des mandibules inférieure et supérieure), une atteinte auriculaire et une hypotrophie\* des tissus mous latéro-faciaux. Cette malformation résulte d'une anomalie de développement lors de la morphogénèse crânio-faciale.

**Multipotence :** caractère d'une cellule indifférenciée capable de donner plusieurs types cellulaires issus du même feuillet embryonnaire. Les cellules souches mésenchymateuses d'origine mésodermique sont ainsi capables de se différencier en cellules du même feuillet (mésoderme).

**Myocarde :** muscle cardiaque.

**Nécrose :** mort cellulaire non programmée, caractérisée par la rupture de la membrane cellulaire. La nécrose est habituellement accompagnée d'une réponse inflammatoire. Elle peut notamment être causée par l'ischémie\* d'un membre.

**Neuropraxie :** compression du nerf avec atteinte de la gaine de myéline.

**Neurotmésis** : section ou rupture complète du nerf.

**Œdème** : désigne le gonflement d'un tissu ou d'un organe dû à l'accumulation excessive de liquide dans le milieu interstitiel.

**Organites** : structures spécialisées contenues dans le cytoplasme aux fonctions spécifiques (noyau, mitochondries, lysosomes, réticulum endoplasmique, ribosomes, appareil de Golgi...), participant à la vie et au fonctionnement de la cellule.

**Ostéoarthrite** : inflammation et dégénérescence des cartilages articulaires pouvant finalement porter atteinte aux os. Une fois que l'inflammation est installée (arthrite), à mesure que la détérioration des cartilages progresse, leur rôle protecteur pour éviter les frottements entre les os diminue et un véritable cercle vicieux se met en place. La douleur articulaire rend les mouvements difficiles et douloureux.

**Paracrine** : se dit de molécules sécrétées par une cellule et qui exercent des effets à distance sur d'autres cellules. Ces molécules sont des signaux cellulaires permettant aux cellules de communiquer entre elles.

**Paratenon** : membrane externe de nature conjonctive enveloppant l'ensemble des faisceaux de fibres composant le tendon.

**Passage** : en culture cellulaire, les cellules prolifèrent jusqu'à occuper l'espace maximal du récipient de culture (confluence cellulaire) ; les passages désignent alors le processus par lequel les cellules sont dissociées, lavées, et réensemencées dans de nouveaux récipients de culture pour permettre une nouvelle expansion des cellules. Le nombre de passages est une indication sur la stabilité des cellules en culture.

**Phagophore** : double membrane d'origine inconnue venant englober des constituants cytoplasmiques ou des pathogènes. La formation du phagophore constitue la première étape de l'autophagie\* et aboutit à la formation d'un autophagosome\*.

**Pince** : partie la plus en avant du sabot du cheval.

**Pluripotence** : caractère d'une cellule souche capable de donner toutes les cellules du corps, sauf les annexes embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires issues de la masse cellulaire interne du blastocyte sont pluripotentes et permettent la formation des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), lesquels donneront les différents tissus et organes d'un individu.

**Polyarthrite rhumatoïde** : inflammation de plusieurs articulations à la fois, qui enflent, sont douloureuses et dont le mouvement est difficile (voir **Ostéoarthrite**). La polyarthrite rhumatoïde est considérée comme une maladie auto-immune\*. Elle touche généralement d'abord les mains, les poignets, les genoux et les petites articulations des pieds. Puis, avec le temps, ou parfois dès le début de la maladie, les épaules, les coudes, la nuque, les mâchoires, les hanches et les chevilles peuvent également être touchés.

**Quiescence** : phase de repos durant laquelle une cellule arrête de se diviser et reste en phase G0 du cycle cellulaire. C'est en quelque sorte une phase du cycle cellulaire au cours de laquelle une cellule ne se divise pas et ne se prépare pas non plus à se diviser, mais elle a encore la possibilité de le faire sous réserve d'un signal approprié.

**Récessus synovial** : en anatomie, désigne une petite cavité remplie de liquide synovial\*.

**Sclérodermie** : désigne une dermatose (affection de la peau) touchant le tissu conjonctif et provoquant un durcissement et un épaissement de la peau. Il peut s'agir de maladie auto-immune.

**Sclérose latérale amyotrophique** : maladie neurodégénérative de cause inconnue. La dégénérescence touche les neurones moteurs (ou motoneurones) du cortex cérébral et de la moelle épinière. La maladie se manifeste par des troubles moteurs centraux et périphériques (crampes, perte de force musculaire, amyotrophie) pouvant évoluer vers la paralysie. Le pronostic vital est engagé lorsque la fonction respiratoire est atteinte.

**Secrétome** : représente l'étude globale des protéines sécrétées par une cellule, un tissu ou un organisme.



**Somatique** : relatif au corps ; qualifie toutes les cellules du corps à l'exception des cellules germinales (c'est-à-dire les cellules issues de méiose des organes sexuels : ovules et spermatozoïdes).

**Syndrome de Poland** : maladie d'origine inconnue (peut-être génétique) caractérisée par une aplasie unilatérale du muscle grand pectoral, laissant apparaître visuellement un sein plus petit que l'autre. Cette maladie est souvent accompagnée par d'autres troubles comme une asymétrie des membres supérieures, une scoliose, mais aussi des anomalies au niveau du diaphragme et des organes (cœur à droite, reins, foie, côlon).

**Syndrome de Parry-Romberg** : maladie neurocutanée rare de cause inconnue, caractérisée par une atrophie hémifaciale progressive qui peut s'étendre au reste de l'hémicorps. Cette maladie provoque une dégénérescence du tissu conjonctif sous-cutané et est souvent accompagnée de troubles neurologiques, oculaires et oraux.

**Tendinopathies** : ensemble des pathologies ou atteintes du tendon. Ce terme comprend les tendinites aiguës, les tendinites chroniques, les ténosynovites (atteinte de la gaine synoviale).

**Totipotence** : caractère d'une cellule souche capable de donner toutes les cellules d'un organisme. Les cellules totipotentes participent à la formation de l'embryon et des annexes embryonnaires.

**Unipotence** : caractère d'une cellule souche (progénitrice) capable de se différencier en un seul type cellulaire.

**Xénogénique** : issu d'une autre espèce.

# **ANNEXES**



## **ANNEXE 1**

### **Plaquette commerciale MICROFILL®**

# MICROFILL®

## UN SYSTÈME INNOVANT POUR LE MICROFILLING

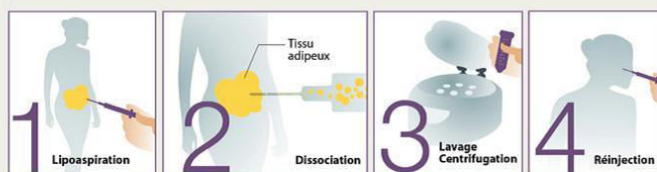
Le Microfilling est une nouvelle technique, réalisée en circuit fermé, s'appuyant sur plus de 4 années de recherches fondamentales sur le tissu adipeux.

Elle permet de réaliser un lipofilling efficace grâce à :

- Une micro-canule de lipoaspiration favorisant la vascularisation des lobules ;
- Une aspiration avec une faible dépression préservant la survie cellulaire et donc améliorant la prise de la greffe ;
- Un protocole d'élimination des molécules toxiques ;
- Une infiltration courte.

L'injection à travers une canule extrêmement fine permet une injection facile et atraumatique.

Microfilling® : une nouvelle technique pour le rajeunissement facial.



### UN KIT À USAGE UNIQUE

La technique de Microfilling est réalisée grâce au kit Microfill présenté en version stérile à usage unique. Celui-ci contient l'ensemble des éléments nécessaires à la procédure, du prélèvement jusqu'à la ré-injection.

Composition du kit MICROFILL :

- 1 canule d'infiltration 2,5mm x 150mm
- 4 seringues d'aspiration 10cc BD
- 1 canule de prélèvement 2,1mm x 150mm, 8 trous (1,2mm ouverture)
- 1 canule de transfert 3,5mm x 130mm
- 2 tubes de transfert du tissu
- 2 embouts adaptateur Luer-Lock
- 4 seringues d'injection 1cc
- 1 canule d'injection 0,9mm x 50mm
- 1 canule d'injection 1,4mm x 100mm
- 1 aiguille 18 Gauge
- 1 écrou pour rotor

Le kit MICROFILL s'utilise avec la centrifugeuse ADIP'spin. Celle-ci permet, en changeant simplement le rotor, de centrifuger :

- les tubes spécifiques de MICROFILL® ;
- des seringues de 10mL pour lipofilling classique ;
- des tubes de sang de 10mL pour PRP (plasma riche en plaquette) ou autres.



Référence : 2054-KTA2



Référence : LMC 3000

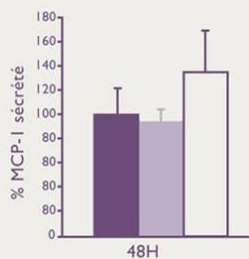
## AVANTAGES

### MICROFILL® préserve la viabilité du tissu et élimine le liquide interstitiel

	Microfill (2000rpm, 1min)	Décantation	Lipostructure (3000rpm, 3min)
% Huile (mort cellulaire)	6%	2%	18%
% Liquide interstitiel	6%	24%	5%
% Tissu adipeux	88%	77%	74%

Mesure de l'huile et du liquide interstitiel dans le tissu adipeux après traitement avec chacune des méthodes.

### MICROFILL® limite l'inflammation du tissu adipeux



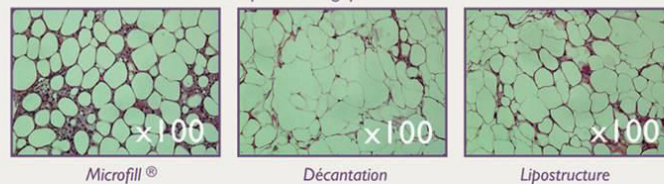
Grâce à une manipulation en douceur du tissu et aux rinçages successifs, MICROFILL® permet de fortement limiter la sécrétion de molécules inflammatoires.

■ Microfill® ■ Décantation □ Lipostructure

Mesure de la sécrétion des cytokines inflammatoires MCP-1 par le tissu adipeux après traitement avec chacune des méthodes.

### MICROFILL® augmente la prise de greffe et la qualité du greffon

Résultat de coupes histologiques selon les 3 méthodes.



Microfill® permet d'effectuer un prélèvement et une injection de lobules adipeux (groupe de cellules du tissu adipeux) très fins, qui vont être facilement vascularisés, optimisant ainsi la prise de greffe. Les coupes histologiques de tissu greffé sont identiques aux coupes de tissus d'origine, mais avec une sécrétion de collagène plus importante.

### MICROFILL® augmente l'effet trophique sur la peau grâce à la sécrétion de collagène type III



## Bibliographie

- 1- Keck M, Zeyda M, Gollinger K, Buriak S, Kamolz LP, Frey M, Stulnig TM. Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation to adipocytes. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Jul 15.
- 2- Ferraro GA, De Francesco F, Tirino V, Cataldo C, Rossano F, Nicoletti G, D'Andrea F. Effects of a new centrifugation method on adipose cell viability for autologous fat grafting. *Aesthetic Plast Surg.* 2011 Jun;35(3):341-8.
- 3- Girard AC, Loyher PL, Bencharif K, Balat M, Lefebvre d'Hellencourt C, Delarue P, Hulard O, Roche R, Hoareau L, Festy F. Lidocaine: an attractive local anesthetic for lipoaspiration procedure in stem cells regenerative medicine. *IFATS Paper Presenters 2011 Miami Beach, Florida*
- 4- Hoareau L, Bencharif K, Gence L, Girard AC, Delarue P, Hulard O, Festy F, Roche R. Washing or centrifugating the fat? *SICAAAMS 2012, GENEVA, April 19-21*
- 5- Ould-Ali D : Mechanical factors influencing fat cell transplants quality. *IFATS 2010, Dallas. Oct 23.*

Les produits EASYFEEL, FEELSAFE, MICROFILL & ADIP'spin sont marqués CE. Ces produits sont élaborés par la société Adip'sculpt et fabriqués par la société ALCIS - Besançon - France.

Distributeur :



GRUPE SEBBIN SAS 39, Parc d'Activités des QuatreVents - 95650 Boissy l'Aillerie - France  
Tél. : + 33 1 34 42 13 28 - Fax : + 33 1 34 42 16 88 - [www.sebbin.com](http://www.sebbin.com)

## **ANNEXE 2**

### **Articles du Code de la Santé publique**



## Code de la santé publique

---

- Partie réglementaire
  - Première partie : protection générale de la santé
    - Livre II : don et utilisation des éléments et produits du corps humain

### **Titre IV : tissus, cellules et produits**

---

- **Chapitre Ier** : prélèvement et collecte
  - **Section 1** : prélèvement sur une personne décédée
    - [Art. R1241-1 à R1241-2-1](#) Sous-section 1 : prélèvement à des fins thérapeutiques.
    - [Art. R1241-2-2](#) Sous-section 2 : prélèvement à des fins scientifiques.
  - **Section 2** : prélèvement sur une personne vivante
    - [Art. R1241-3 à R1241-4](#) Sous-section 1 : prélèvement sur un donneur majeur
    - [Art. R1241-5 à R1241-11](#) Sous-section 2 : prélèvement sur un donneur majeur faisant l'objet d'une mesure de curatelle ou de sauvegarde de justice
    - [Art. R1241-12 à R1241-15](#) Sous-section 3 : prélèvement sur un donneur majeur faisant l'objet d'une mesure de tutelle
    - [Art. R1241-16 à R1241-19](#) Sous-section 4 : prélèvement sur un donneur mineur
  - [Art. R1241-20 à R1241-23](#) **Section 3** : prélèvement à des fins scientifiques de tissus ou de cellules embryonnaires ou foetaux à l'issue d'une interruption de grossesse.
- **Chapitre II** : établissements autorisés à effectuer des prélèvements ou participant à cette activité
  - [Art. R1242-1 à R1242-7](#) **Section 1** : établissements autorisés à prélever des tissus à des fins thérapeutiques.
  - [Art. R1242-8 à R1242-13](#) **Section 2** : établissements autorisés à prélever des cellules à des fins thérapeutiques
  - [Art. R1242-14](#) **Section 3** : modalités d'application au service de santé des armées.
- **Chapitre III** : préparation, conservation, distribution et cession des tissus, de leurs dérivés, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire
  - **Section 1** : autorisation des activités de préparation, de conservation, de distribution et de cession des tissus, de leurs dérivés, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire.
    - [Art. R1243-1 à R1243-3](#) Sous-section 1 : dispositions générales.
    - [Art. à R1243-11](#) Sous-section 2 : procédure d'autorisation
    - [Art. R1243-12 à R1243-19](#) Sous-section 3 : conditions d'autorisation.
    - [Art. R1243-20 à R1243-30](#) Sous-section 4 : règles applicables aux établissements et organismes autorisés
    - [Art. R1243-32](#) Sous-section 5 : modalités d'application aux hôpitaux des armées et au centre de transfusion sanguine des armées
  - **Section 2** : autorisation de procédés concernant les tissus, leurs dérivés et les préparations de thérapie cellulaire.
    - [Art. à R1243-37](#) Sous-section 1 : conditions d'autorisation.
    - [Art. à](#)
    - [Art. R1243-48](#) Sous-section 3 : modalités d'application aux hôpitaux des armées et au centre de transfusion sanguine des armées.
  - **Section 3** : conservation et préparation à des fins scientifiques de tissus et cellules issus du corps humain
    - [Art. R1243-49 à R1243-51](#) Sous-section 1 : organismes assurant la conservation et la préparation de tissus et de cellules issus du corps humain pour les besoins de leurs propres programmes de recherche
    - [Art. R1243-61 à R1243-72](#) Sous-section 2 : organismes assurant la conservation et la préparation de tissus et de cellules issus du corps humain en vue de leur cession pour un usage scientifique
    - [Art. R1243-73](#) Sous-section 3 : application aux hôpitaux des armées
- **Chapitre IV** : don et utilisation de gamètes
  - [Art. R1244-1 à R1244-6](#) Section unique
- **Chapitre V** : dispositions communes
  - [Art. R1245-1 à R1245-2](#) **Section 1** : dispositions générales relatives à l'importation et à l'exportation.
  - **Section 2** : importation et exportation à des fins thérapeutiques
    - [Art. à R1245-8](#) **Sous-section 1 : dispositions relatives aux établissements ou organismes**
      - [Art. à R1245-7](#) Paragraphe 1 : procédure d'autorisation d'activité d'importation et d'exportation
      - [Art. R1245-8](#) Paragraphe 2 : obligations de l'importateur et de l'exportateur
    - [Art. R1245-9 à R1245-10](#) Sous-section 2 : dispositions relatives à l'importation des produits
    - [Art. à R1245-12](#) Sous-section 3 : dispositions relatives à l'exportation des produits
    - [Art. à R1245-14](#) Sous-section 4 : importation et exportation dans des situations d'urgence
    - [Art. R1245-15 à R1245-17](#) Sous-section 5 : importation et exportation des cellules hématopoïétiques issues de la moelle osseuse
  - [Art. R1245-18](#) **Section 3** : importation et exportation à des fins scientifiques
  - [Art. à R1245-19](#) **Section 4** : importation de tissus, de leurs dérivés et de cellules destinés à la fabrication de dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, de produits thérapeutiques annexes ou de produits pharmaceutiques
  - [Art. R1245-20](#) **Section 5** : importation ou exportation des échantillons biologiques
  - [Art. R1245-21](#) **Section 6** : modalités d'application au service de santé des armées

- Partie législative
  - Première partie : protection générale de la santé
    - Livre II : don et utilisation des éléments et produits du corps humain
      - Titre VI : dispositions relatives aux produits thérapeutiques annexes

---

**Chapitre unique.** Version en vigueur au 5 septembre 2012

---

[Article L1261-1](#)

On entend par produit thérapeutique annexe tout produit, à l'exception des dispositifs médicaux mentionnés à l'[article L. 5211-1](#), entrant en contact avec des organes, tissus, cellules ou produits issus du corps humain ou d'origine animale au cours de leur conservation, de leur préparation, de leur transformation, de leur conditionnement ou de leur transport avant leur utilisation thérapeutique chez l'homme, ainsi que tout produit entrant en contact avec des embryons dans le cadre d'une activité d'assistance médicale à la procréation.

[Article L1261-2](#)

Tout produit thérapeutique annexe fait l'objet, préalablement à sa mise sur le marché, d'une autorisation délivrée par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.

L'autorisation est refusée lorsqu'il apparaît que le produit ne présente pas les conditions garantissant sa qualité, son innocuité et son efficacité dans des conditions normales d'emploi.

L'autorisation peut être modifiée, suspendue ou retirée par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Un décret en Conseil d'Etat précise les conditions d'octroi, de suspension ou de retrait de l'autorisation.

Elle peut enfin fixer des conditions particulières ou des restrictions pour l'utilisation de ces produits afin de garantir leur sécurité sanitaire.

*NOTA:*

Loi n° 2011-2012 du 29 décembre 2011 article 41 III : Les présentes dispositions entrent en vigueur à une date prévue par le décret pris pour leur application et au plus tard le 1er août 2012. Dès cette entrée en vigueur, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé exerce l'ensemble des droits et supporte l'ensemble des obligations de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Jusqu'à l'entrée en vigueur mentionnée au premier alinéa du présent III, les compétences et pouvoirs que la présente loi attribue à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé sont exercés par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

Le décret n° 2012-597 du 27 avril 2012 est entré en vigueur le 1er mai 2012.

[Article L1261-3](#)

La préparation, la transformation, le conditionnement, la conservation, l'importation, le transport ou la distribution des produits thérapeutiques annexes doivent être réalisés en conformité avec des règles de bonne pratique dont les principes sont définis par décision de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.

*NOTA:*

Loi n° 2011-2012 du 29 décembre 2011 article 41 III : Les présentes dispositions entrent en vigueur à une date prévue par le décret pris pour leur application et au plus tard le 1er août 2012. Dès cette entrée en vigueur, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé exerce l'ensemble des droits et supporte l'ensemble des obligations de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Jusqu'à l'entrée en vigueur mentionnée au premier alinéa du présent III, les compétences et pouvoirs que la présente loi attribue à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé sont exercés par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

Le décret n° 2012-597 du 27 avril 2012 est entré en vigueur le 1er mai 2012.

- Partie réglementaire
  - Première partie : protection générale de la santé
    - Livre II : don et utilisation des éléments et produits du corps humain
      - Titre VI : produits de thérapies génique et cellulaire et produits thérapeutiques annexes (Modifié)
        - [Chapitre unique : produits thérapeutiques annexes](#)

### **Section 1 : Définitions** Version en vigueur au 5 septembre 2012

---

#### [Article R1261-1](#)

Pour l'application du présent chapitre, on entend par :

1° Fabricant, toute personne physique ou morale se livrant, en vue de leur vente en gros ou au détail, de leur cession à titre gratuit ou de leur utilisation, à la fabrication de produits thérapeutiques annexes définis à l'[article L. 1261-1](#).

La fabrication comprend les opérations concernant l'achat de matières premières et des articles de conditionnement, les opérations de préparation, de production, de contrôle de la qualité, de libération des lots, ainsi que les opérations de stockage correspondantes, telles qu'elles sont définies par les bonnes pratiques prévues à l'[article L. 1261-3](#) applicables à cette activité ;

2° Importateur, toute personne physique ou morale se livrant, en vue de leur vente en gros ou au détail, de leur cession à titre gratuit ou de leur utilisation, à l'importation, au stockage, au contrôle de la qualité et à la libération des lots de produits thérapeutiques annexes ;

3° Distributeur, toute personne physique ou morale se livrant à l'achat et au stockage de produits thérapeutiques annexes en vue de leur distribution en gros ou au détail et en l'état, ou de leur exportation en l'état ;

4° Utilisateur, toute personne physique ou morale se livrant à l'utilisation de produits thérapeutiques annexes dans le cadre des activités mentionnées à l'[article L. 1261-1](#). L'utilisation de ces produits comprend les opérations allant de l'achat à l'emploi du produit dans les conditions fixées par l'autorisation et pour l'effet in vitro revendiqué.

### **Section 2 : Autorisation préalable à la mise sur le marché des produits thérapeutiques annexes**

Version en vigueur au 5 septembre 2012

---

#### [Article R1261-2](#)

La demande d'autorisation prévue à l'[article L. 1261-2](#) est adressée sous pli recommandé avec demande d'avis de réception ou déposée contre récépissé au directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé par le fabricant ou par l'importateur du produit thérapeutique annexe pour lequel l'autorisation est sollicitée.

Elle est accompagnée d'un dossier technique dont le contenu est fixé par arrêté du ministre chargé de la santé sur proposition du directeur général de cette agence.

Ce dossier comporte notamment tous les renseignements permettant d'établir et de garantir la qualité, l'innocuité et l'efficacité du produit dans les conditions normales de son utilisation in vitro.

#### [Article R1261-3](#)

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé se prononce sur la demande mentionnée à l'[article R. 1261-2](#) après l'avis du directeur général de l'Agence de la biomédecine.

Ce dernier dispose d'un délai de quarante-cinq jours à compter de la réception de la demande d'avis pour se prononcer. L'absence de réponse dans ce délai vaut avis favorable.

#### [Article R1261-4](#)

Le directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé notifie sa décision au demandeur dans un délai de quatre-vingt-dix jours à compter de la date de réception du dossier de demande complet.

Il peut requérir de ce dernier toute information complémentaire et peut procéder à toute consultation ou étude particulière qu'il juge nécessaire pour lui permettre de se prononcer sur la demande. Il peut, à cette fin, prolonger le délai prévu à l'alinéa précédent pour une durée qui ne peut excéder six mois. En ce cas, il doit notifier au demandeur les motifs de cette prolongation ainsi que sa durée. Le délai prévu au premier alinéa est suspendu jusqu'à la fourniture de ces éléments.

L'absence de décision à l'expiration du délai prévu vaut rejet de la demande.

Le refus d'autorisation est motivé.

Le directeur général de l'Agence de la biomédecine est informé des décisions prises en application du présent article.

#### [Article R1261-5](#)

L'autorisation est délivrée pour une durée de cinq ans. Elle peut être assortie de prescriptions spéciales relatives aux conditions d'utilisation du produit. Sur demande du titulaire présentée au plus tard trois mois avant la date normale d'expiration, l'autorisation initiale est renouvelable pour une durée de cinq ans, après examen de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé d'un dossier décrivant notamment l'état des données relatives aux effets indésirables susceptibles d'être dus à ce produit. Le contenu de ce dossier est fixé par arrêté du ministre chargé de la santé sur proposition du directeur général de cette agence.

Le directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé se prononce sur cette demande de renouvellement dans les conditions et délais prévus à l'[article R. 1261-4](#).

A défaut de cette demande, l'autorisation est réputée caduque à compter de sa date d'expiration.

#### [Article R1261-6](#)

Tout projet de modification de l'un des éléments de l'autorisation initiale doit faire l'objet d'une nouvelle demande d'autorisation déposée et instruite dans les mêmes conditions que la demande de l'autorisation initiale. Celle-ci continue à courir jusqu'à son terme initial.

En cas de refus de la modification, l'autorisation initiale demeure si ce refus n'est pas de nature à remettre en cause cette autorisation.

#### [Article R1261-7](#)

L'autorisation peut être modifiée, suspendue ou retirée par le directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé lorsque le produit thérapeutique annexe ne présente pas les conditions garantissant sa qualité, son innocuité et son efficacité lors de son utilisation in vitro, dans des conditions normales d'emploi ou en cas d'infraction aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur, notamment en cas de non-respect des règles de bonnes pratiques mentionnées à l'[article L. 1261-3](#).

La modification ou le retrait ne peut intervenir qu'après que le titulaire a été invité à présenter ses observations dans un délai fixé par le directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, qui ne peut être inférieur à un mois.

Toutefois, en cas d'urgence, l'autorisation peut être immédiatement suspendue pour une durée ne pouvant excéder un an, ou modifiée.

Le directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé informe le directeur général de l'Agence de la biomédecine des mesures de modification, de suspension ou de retrait qu'il a prononcées.

### Section 3 : Suivi des produits thérapeutiques annexes

Version en vigueur au 5 septembre 2012

---

#### [Article R1261-8](#)

Le fabricant, l'importateur ou le distributeur de produits thérapeutiques annexes doit assurer la traçabilité de ces produits depuis leur fabrication jusqu'à leur cession conformément aux règles de bonnes pratiques mentionnées à l'[article L. 1261-3](#).

Pour l'application de l'[article L. 1211-7](#), il doit en outre mettre en oeuvre le dispositif de vigilance prévu à la section 3 du chapitre unique du titre Ier du présent livre.

#### [Article R1261-9](#)

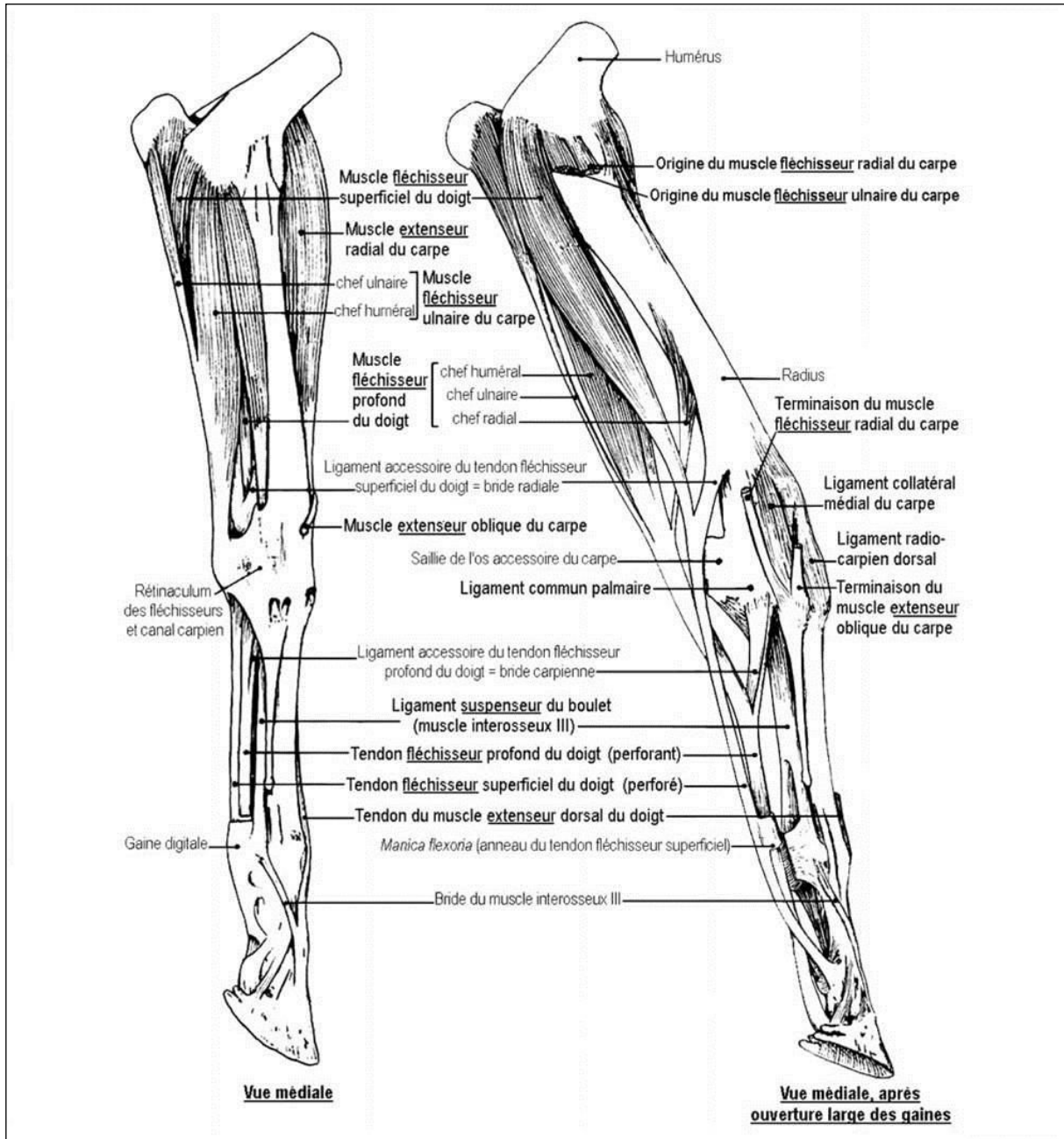
Le fabricant ou l'importateur transmet au directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé un rapport présentant la synthèse des informations relatives à l'ensemble des incidents et effets indésirables qu'il a déclarés ou qui lui ont été signalés et de toutes les informations utiles à l'évaluation des risques et des bénéfices liés à l'emploi du produit thérapeutique annexe.

La transmission de ce rapport s'effectue dans les conditions suivantes :

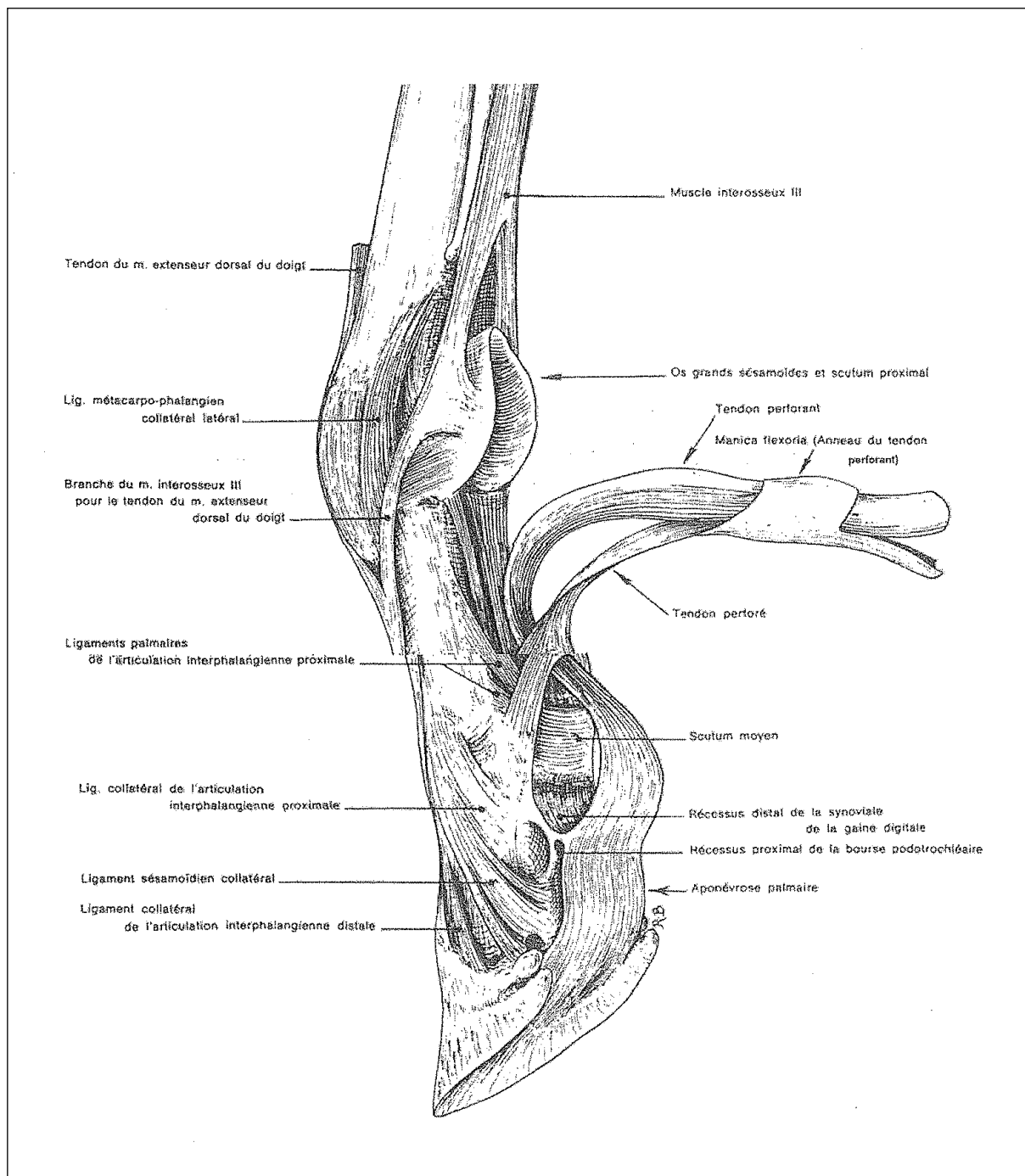
- immédiatement sur demande ;
- semestriellement durant les deux ans suivant l'autorisation de mise sur le marché du produit thérapeutique annexe ou de sa modification ;
- annuellement les deux années suivantes, ainsi qu'au moment du renouvellement quinquennal de l'autorisation.

## **ANNEXE 3**

### **Planches d'anatomie des membres du cheval**

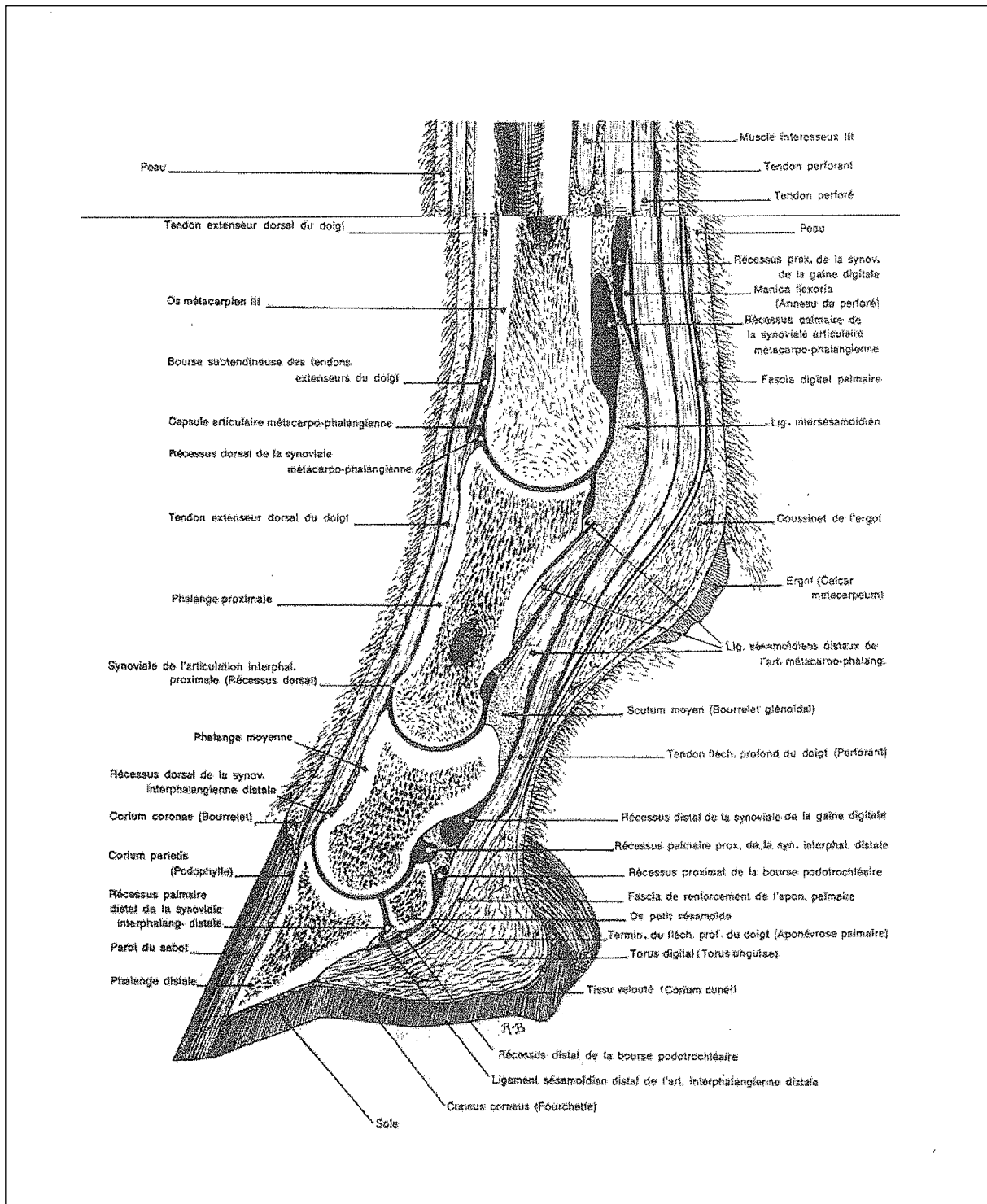


Membre antérieur gauche de cheval, vue médiale. Reproduit de (Barone, 1966)



Terminaison des tendons fléchisseurs du doigt, antérieur gauche de cheval, vue latéro-palmaire. Reproduit de (Barone, 1966)





Coupe sagittale de la région digitale, antérieur gauche de cheval. Reproduit de (Barone, 1966)