



HAL
open science

Spécificités des cellules stromales isolées des deux couches du tissu adipeux sous-cutané : rôles de leur sécrétion sur l'angiogenèse et la neurogenèse

Jérôme Laloze

► **To cite this version:**

Jérôme Laloze. Spécificités des cellules stromales isolées des deux couches du tissu adipeux sous-cutané : rôles de leur sécrétion sur l'angiogenèse et la neurogenèse. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2023. Français. NNT : 2023LIMO0051 . tel-04323456

HAL Id: tel-04323456

<https://theses.hal.science/tel-04323456>

Submitted on 5 Dec 2023

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.

Université de Limoges

ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)

**Laboratoire UR 20218 NEURIT – Neuropathies Périphériques et Innovations
Thérapeutiques**

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Physiologie et physiopathologie

Présentée et soutenue par
Jérôme LALOZE

Le 23 novembre 2023

**Spécificités des cellules stromales mésenchymateuses isolées des
deux couches du tissu adipeux sous-cutané : rôles de leur
sécrétion sur l'angiogenèse et la neurogenèse**

Thèse dirigée par le Pr. Alexis DESMOULIERE

JURY :

Président du jury

M. Jean-Jacques LATAILLADE

Rapporteurs

M. Jean-Jacques LATAILLADE, PU-PH, Centre de Transfusion Sanguine des Armées – SSA
Ministère des Armées

Mme Barbara HERSANT, PU-PH, Université Paris-Est-Créteil

Examineurs

M. Alexis DESMOULIERE, PU, NEURIT UR 20218, Université de Limoges

M. Benoit CHAPUT, PU-PH, RESTORE Toulouse, Université Paul Sabatier Toulouse

M. Joël BRIE, PA, IRCER, Université de Limoges

Mme Audrey VARIN, CR INSERM, RESTORE, Université Paul Sabatier Toulouse

Mme Amandine ROVINI, post-doctorante, NEURIT UR 20218, Université de Limoges



A ma famille

« Quand on veut, on peut ; quand on peut, on doit. »
Napoléon Bonaparte

Remerciements

Pour débiter ses remerciements, je souhaite témoigner de ma gratitude à tous les membres qui ont acceptés de faire partie de mon jury de thèse. En particulier, j'aimerais remercier les rapporteurs de ce travail, les Pr Lataillade et Hersant, qui ont accepté de relire mon manuscrit. Je souhaite également remercier les examinateurs de cette thèse : les Pr Chaput et Brie ainsi que les Dr Varin et Rovini.

Je tiens à remercier plus particulièrement le Pr Desmoulière pour m'avoir guidé tout au long de cette thèse. Merci de vous être tant investi durant ces dernières années autant dans les expériences que dans la relecture de mon manuscrit ou des différents articles.

Je souhaite également remercier particulièrement le Dr Rovini, qui m'a considérablement aidé dans les expériences, l'encadrement des différents masters et la relecture des articles.

Je leur suis très reconnaissant d'avoir compris les contraintes inhérentes à mon double cursus, universitaire et praticien hospitalier. Ils ont su s'y adapter pour m'amener là où je suis actuellement.

Je tiens à remercier toutes les équipes de l'UR20218, que ce soit au 6^{ème} étage mais aussi surtout au 4^{ème} étage : Zeina, Mohammed, Sarah, Tarek ...

Je tiens également à remercier les différents stagiaires qui m'ont apporté une aide vitale dans la réalisation des expériences du projet : Clara Six, Moana Liufau, Faris Marouf et Marie Lacoste.

Je tiens à remercier enfin le Pr Sturtz, directeur de l'unité, pour m'avoir accepté dans son unité et permis de réaliser ma thèse.

J'espère que notre collaboration se poursuivra le plus longtemps possible.



Gueules Cassées
Sourire Quand Même

Union des Blessés de la Face et de la Tête
Fondation des «Gueules Cassées»

Un profond et sincère merci également à la Fondation des Gueules Cassées pour avoir soutenu financièrement mon projet par deux fois. Je suis sûr que notre collaboration portera ses fruits et se poursuivra.

A mes maîtres d'internat,

qui m'ont enseigné dans toutes les disciplines différentes qu'elle comporte, la maîtrise de la chirurgie.

Aux services d'orthopédie, de chirurgie viscérale et digestive, de chirurgie infantile.

A toutes les équipes de chirurgie plastique de Bordeaux et de Toulouse (que ce soit l'IUCT mais aussi et surtout Rangueil). Merci de m'avoir accueilli, d'avoir permis de faire mes mobilités et notamment de m'avoir appris la chirurgie plastique. Je suis rentré à Limoges beaucoup plus serein.

Au service de chirurgie maxillo-faciale et plastique désormais de LIMOGES. En particulier, au Pr Brie, mon maître, qui m'a appris à opérer de façon sereine et sûre. Merci de votre soutien perpétuel. J'espère être à la hauteur.

Merci également à Julie, Esther, Adeline, Laureline, les futurs internes de maxillo et plastique. Une nouvelle aventure commence !

Au laboratoire STROMALab :

Audrey, tu m'as pris au stade embryonnaire, et tu as réussi à faire de moi un « mini-chercheur ». Grâce à ta gentillesse, ta disponibilité, tes connaissances et ta pédagogie, « ça l'a fait ». Tu m'as encadré tout au long de cette année recherche et tu es restée mon amie.

Et bien sûr un énorme like à mes deux « bros », Loïc et Mathieu. Merci pour les moments passés au labo mais aussi à l'extérieur.

A tous mes amis.

A ma famille.

A ma mère et mon père

Je voudrais pouvoir élever mes enfants comme vous l'avez fait avec nous. Vous avez su me pousser pour toujours aller plus loin et réaliser mon plus grand rêve depuis que je suis tout petit. Merci. Je n'oublierai jamais. Je suis fier d'en être arrivé là aujourd'hui, et cela n'aurait pas été possible sans vous. Même maintenant, vous prenez encore soin de moi. Je suis sûr que vous veillerez sur ma nouvelle famille avec autant de bienveillance et de bonté. Encore merci pour tout.

A ma sœur et mon frère.

A mes neveux et filleuls.

A tout le reste de la famille, ceux qui sont là et ceux qui nous ont quitté malheureusement trop tôt. Je pense à vous.

A ma belle famille

Merci de m'avoir accueilli chez vous avec autant de facilité et de continuer de nous aider et nous soutenir tous les jours, Constance et moi. Je suis ravi de savoir qu'avec nos deux familles, nos enfants seront autant aimés et protégés.

Merci infiniment.

A Constance, mon amour,

Partager ma vie avec toi est une chance, et je veux te rendre la plus heureuse des femmes. On s'élève l'un l'autre, on s'améliore, on se protège, on partage tout.

Merci pour tout ce que tu fais pour moi, chaque jour, tes attentions...

Ce que tu m'apporte est immense, plus encore. Qui aurait imaginé qu'on en serait là aujourd'hui.

Tu m'as donné un nouveau but, la chose la plus essentielle dans la vie. Tu m'as donné deux fils, Joseph puis Gabriel.

Tu es une excellente mère. Je sais que tu les protégeras toujours.

Tu as fait déjà tellement attention à eux pendant la grossesse. J'espère être à la hauteur.

A Joseph et Gabriel,

Mes fils, je vous aime tellement aussi. Je suis si fier. Vous êtes la chose la plus précieuse. J'adore vous voir évoluer et grandir chaque jour. J'en apprendis tellement avec vous. Sachez que je serais toujours là pour vous. Vous êtes notre plus belle histoire.

Je vous aime tous les trois plus que tout.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Abréviations	14
Introduction	15
I.1. Le tissu adipeux.....	15
I.1.1. Anatomie du TA	15
I.1.1.1. Le TA blanc sous-cutané.....	17
I.1.1.2. Le TA blanc viscéral	18
I.1.2. Le TA et la régulation de l'homéostasie énergétique.....	18
I.1.3. Le TA, organe endocrinien.....	21
I.1.4. Focus sur l'adipocyte	22
I.1.4.1. Morphologie.....	22
I.1.4.2. Lipogenèse.....	23
I.1.4.2.1. Source des acides gras	23
I.1.4.2.2. Source de G3P	24
I.1.4.2.3. Synthèse des triglycérides.....	25
I.1.4.3. Lipolyse	26
I.1.5. Origine et développement du TA	27
I.1.6. La différenciation adipocytaire (adipogenèse)	28
I.1.6.1. Arrêt de la prolifération	28
I.1.6.2. Expansion clonale	29
I.1.6.3. Phase terminale de différenciation	30
I.1.7. Les deux couches du TA et le fascia superficiel	30
I.1.7.1. Le TA superficiel.....	34
I.1.7.2. Fascia superficiel (fascia superficialis)	37
I.1.7.3. Le TA profond.....	40
I.2. La vascularisation de la peau	44
I.2.1. La microcirculation sanguine cutanée.....	44
I.2.1.1. Organisation	44
I.2.1.2. Structures des différents composants	45
I.2.1.3. Fonctions.....	48
I.2.2. Le système lymphatique	49
I.2.2.1. Structure du système lymphatique cutané	49
I.2.2.2. Les fonctions du système lymphatique	50
I.3. L'innervation de la peau	50
I.3.1. Organisation générale du système nerveux	50
I.3.2. Le système nerveux cutané	51
I.3.3. Le système nerveux cutané autonome	53
I.3.4. Le système nerveux cutané sensoriel.....	53
I.3.4.1. Les différents types de sensibilité	53
I.3.4.2. Les différents types de fibres nerveuses et de récepteurs cutanés	54
I.3.4.3. Les mécanorécepteurs et les différents types de sensibilité mécanique	55
I.3.4.3.1. La sensibilité à la pression.....	56
I.3.4.3.2. Le toucher	56
I.3.4.3.3. La sensibilité à la vibration.....	57
I.3.4.4. La sensibilité thermique.....	58
I.3.4.5. Nociception et douleur.....	59

I.4. Les cellules stromales mésenchymateuses issues du TA	61
I.4.1. La sécrétion paracrine des AD-MSCs.....	97
I.4.2. La fraction stromale vasculaire (FSV) et son mode d'extraction.....	97
I.4.3. Le milieu conditionné des MSCs.....	102
I.4.4. Les cytokines et facteurs de croissance	104
I.4.5. Les vésicules extracellulaires	104
I.4.5.1. Caractéristiques et définition	104
I.4.5.2. Propriétés des exosomes dans la cicatrisation cutanée	106
I.4.6. Méthode de préparation des produits de sécrétions.....	117
I.4.7. Méthode d'analyse des produits de sécrétions.....	120
I.5. Les techniques de chirurgie plastique	122
I.5.1. La lipoaspiration.....	122
I.5.1.1. Principes de la technique	122
I.5.1.2. Technique opératoire	126
I.5.1.3. Suites	127
I.5.1.4. Complications de la lipoaspiration	127
I.5.2. Les dermolipectomies	128
I.5.2.1. Dermolipectomie abdominale ou abdominoplastie.....	128
I.5.2.1.1. Technique chirurgicale : plastie abdominale transversale basse ou dermolipectomie antérieure avec transposition de l'ombilic	128
I.5.2.1.2. Dermolipectomie totale circulaire.....	133
I.5.2.2. Suites et mesures associées.....	135
I.5.2.3. Complications.....	136
Objet du travail de thèse	139
Travail de thèse.....	141
Discussion.....	161
Conclusion	191
Références bibliographiques.....	192

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique du tissu adipeux blanc et de sa composition cellulaire.	17
Figure 2 : Rôle du tissu adipeux blanc et des organes périphériques dans le stockage de l'énergie après un repas (état post-prandial).	19
Figure 3 : Rôle du tissu adipeux blanc et des organes périphériques dans la fourniture et la consommation de l'énergie à jeun.	20
Figure 4 : Schéma de la morphologie d'un adipocyte au microscope électronique.	23
Figure 5 : Lipogenèse et synthèse des triglycérides dans l'adipocytes (état post-prandial). ..	25
Figure 6 : Lipolyse, glycérogenèse, et ré-estérification à jeun.	27
Figure 7 : Détermination et différenciation de l'adipocyte.	28
Figure 8 : Section du TA sous-cutané de la cuisse.	31
Figure 9 : Organisation du TA sous-cutané.	32
Figure 10 : Peau abdominale.	32
Figure 11 : Histologie du TA sous-cutané de la hanche (coloration hématoxyline-éosine). ..	33
Figure 12 : Aspect macroscopique du TA sous-cutané de l'abdomen.	35
Figure 13 : Muscle platysma à l'intérieur de l'aponévrose superficielle.	36
Figure 14 : Échographie de la hanche.	37
Figure 15 : Tomodensitométrie (TDM) de l'abdomen.	38
Figure 16 : IRM de la région lombaire.	39
Figure 17 : Dissection de la région abdominale.	41
Figure 18 : Dissection de la jambe.	42
Figure 19 : Dissection de la région glutéale.	43
Figure 20 : Représentation schématique de l'organisation de la microcirculation cutanée. ..	45
Figure 21 : Vue en microscopie électronique à transmission d'un capillaire sanguin en coupe transversale dans une peau humaine.	47
Figure 22 : Représentation schématique d'une anse capillaire équipée de sphincters précapillaires et de leur fonction.	48
Figure 23 : Moelle : composants sensoriels, moteurs et autonomes du système nerveux périphériques.	52
Figure 24 : Vue schématique du système nerveux sensoriel de la peau.	55
Figure 25 : Médiateurs chimiques périphériques de la douleur.	61
Figure 26 : Obtention de la fraction vasculaire stromale.	98
Figure 27 : Présentation schématique des vésicules extracellulaires et de leurs actions dans la cicatrisation.	105

Figure 28 : Présentation des différentes méthodes d'isolement des vésicules avec leurs principaux avantages et inconvénients pour chacune des techniques.	119
Figure 29 : Zones classiques de lipoaspiration.	123
Figure 30 : Les différentes voies d'abord en fonction des zones et trajets des tunnellisations à réaliser.	124
Figure 31 : Gestes à effectuer (pour un droitier).	125
Figure 32 : Dermolipectomie abdominal antérieure.	128
Figure 33 : Différents dessins préopératoires de mini-abdominoplasties.	131
Figure 34 : Dessin préopératoire d'un abdominoplastie en « fleur de lys ».	132
Figure 35 : Exemple de montage avec une chambre microfluidique.	166
Figure 36 : Image au microscope confocal de l'internalisation des exosomes dans des fibroblastes.	167

Table des tableaux

Tableau 1 : Les réserves d'énergie du corps humain.	21
Tableau 2 : Facteurs sécrétés par le tissu adipeux.....	22
Tableau 3 : Principales études précliniques <i>in vivo</i> utilisant du milieu conditionné pour améliorer la cicatrisation.	102
Tableau 4 : Principales études précliniques utilisant des VE pour traiter les brûlures.....	108
Tableau 5 : Test de détection de substance P en fonction de l'ajout d'exosomes des deux couches du TA sur un milieu de culture neuronal.	164

Abréviations

°C : degré Celcius	MC : milieu conditionné
ACS : Acyl-CoA synthase	MCP : monocyte chemoattractant protein
ACTH : corticotropine	mL : millilitre
AD-MSCs : adipose mesenchymal stromal cells	Mm : millimètre
AG : acides gras	MSH : mélanotropine
AKT ou PKB : protein kinase B	NTA : nanoparticle tracking analysis
AQP : aquaporine	PAI1 : plasminogen activator inhibitor 1
ARNm : acide ribonucléique messenger	PEG : polyéthylène glycol
ATGL : adipose triglyceride lipase	PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase
ATP : adénosine triphosphate	PGE : prostaglandine E
b-FGF : basic fibroblast growth factor	PHI : peptide histidine-isoleucine
BCA : bicinchoninic acid assay	PKH : Paul Karl Horan
BM-MSCs : bone marrow mesenchymal stromal cells	PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ
C/EBP- α : CCAAT/enhancer binding protein- α	RANTES : regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
CD : cluster de differentiation	RT-PCR : retrotranscriptase-polymerase chain reaction
CGRP : calcitonin-gene related peptide	sAAT : superficial abdominal adipose tissue
CoA : co-enzyme A	SEC : size exclusion chromatography
CO ₂ : dioxyde de carbone	SEM : scanning electronic microscopy
dAAT : deep abdominal adipose tissue	SMAS : système musculo-aponévrotique superficiel
DAG : diacylglycerols	SNEIC : système neuro-endocrino-immuno-cutané
DLS : dynamic light scattering	STAT : signal transducers and activators of transcription
EIAS : épine iliaque antéro-supérieure	TDM : tomodensitométrie
ERK : extracellular signal-regulated kinase	TEM : transmission electronic microscopy
FABP : fatty acid binding protein	TF : Transferrine
FATP : fatty acid transport protein	TFF : technique de filtration par flux tangantiel
FSV : fraction stromale vasculaire	TGF- β : transforming growth factor β
g : gramme	TLR4 : toll like receptor 4
G3P : glycerol-3-phosphate	TNF- α : tumor necrosis factor α
Glut : glutamate	TRPS : tunable resistive pulse sensing
GRP : gastrin-releasing peptide	UV : ultraviolet
H ₂ O ₂ : eau oxygénée	VE : vesicules extra-cellulaires
HUVECs : human endothelial vein ombilical cells	VIP : vaso-active intestinal peptide
Hz : hertz	VLDL : very low density lipoprotein
IL : interleukine	VMAT2 : vesicular monoamine transporter
IP10 : inducible protein 10	μ m : micromètre
ISEV : International Society for Extracellular Vesicles	
K ⁺ : potassium	
Kg : kilogramme	
LCF-CoA : long chain fatty acid – CoEnzyme A	
LHS : lipase hormone sensible	
LPL : lipoproteine lipase	
LPS : lipopolysaccharide	
MAG : monoacylglycerols	

Introduction

I.1. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux (TA) est un organe essentiel pour le corps, tant du point de vue de sa quantité que de sa fonction. Même chez les individus minces, il peut représenter 15 à 25% du poids total du corps, et dans les cas d'obésité morbide, cette proportion peut augmenter jusqu'à 50%. En plus de sa fonction de stockage des graisses, le TA joue un rôle crucial dans la régulation de l'énergie et exerce des fonctions endocrines complexes.

Ses principales fonctions sont les suivantes :

- **Stockage et libération des Lipides** : Le TA stocke les graisses sous forme de triglycérides. En périodes d'abondance alimentaire, il accumule les lipides, puis les libère lorsque l'organisme a besoin d'énergie. Ce mécanisme de stockage et de libération de lipides permet de maintenir l'homéostasie énergétique du corps.
- **Organe endocrinien** : Le TA produit et libère des substances bioactives appelées adipokines. Ces adipokines agissent comme des hormones et des messagers chimiques. Elles ont un impact sur divers processus biologiques, y compris le métabolisme, l'inflammation, la régulation de l'appétit et même la fonction immunitaire. Les adipokines peuvent agir localement, au sein du tissu adipeux lui-même (autocrine ou paracrine), ou être libérées dans la circulation sanguine pour influencer d'autres organes à distance.

Pendant longtemps, le tissu adipeux a été négligé par les scientifiques et considéré principalement comme un dépôt passif de graisse. Cependant, il est maintenant de plus en plus évident que le tissu adipeux joue un rôle central dans la régulation de divers processus physiologiques et métaboliques.

Il existe différents types de tissus adipeux dans le corps, chacun ayant des fonctions spécifiques. Dans notre description, nous nous concentrerons sur le tissu adipeux blanc sous-cutané qui se trouve dans l'hypoderme, la couche la plus profonde de la peau. Ce tissu adipeux blanc sous-cutané agit comme une réserve d'énergie, stockant les graisses pour une utilisation future. De plus, en raison des propriétés isolantes de la graisse, il contribue à la thermorégulation en aidant à maintenir une température corporelle stable. Ce tissu joue également un rôle protecteur en amortissant les chocs et les impacts, et il participe à la définition de la forme corporelle, élément fondamental de la chirurgie plastique.

En somme, le tissu adipeux va bien au-delà d'une simple réserve de graisse. Il est actif sur le plan métabolique et endocrinien, agissant en collaboration avec d'autres tissus pour maintenir l'équilibre énergétique et la santé globale du corps.

I.1.1. Anatomie du TA

Il existe deux types de TA : le TA blanc et le TA brun, dont les rôles métaboliques sont distincts et complémentaires.



1. **Tissu adipeux blanc (TA blanc)** : Le TA blanc est principalement composé d'adipocytes blancs. Son rôle majeur est de stocker l'énergie excédentaire sous forme de graisses (triglycérides) lorsque l'apport énergétique est supérieur aux besoins immédiats. Il constitue la plus grande réserve d'énergie chez les mammifères. Le TA blanc se trouve sous la peau (TA sous-cutané) ainsi qu'autour des organes internes (TA viscéral). Le TA blanc viscéral est associé à des sensibilités métaboliques différentes et peut avoir un impact sur la santé métabolique. De plus, le TA blanc synthétise et libère des adipokines, qui sont des molécules impliquées dans la régulation métabolique et inflammatoire de l'organisme.
2. **Tissu adipeux brun (TA brun)** : Le TA brun se caractérise par sa couleur due à une irrigation plus dense et à une concentration élevée de mitochondries. Il est spécialisé dans la thermogénèse adaptative, c'est-à-dire la production de chaleur en brûlant les graisses stockées sous forme de triglycérides. Le TA brun était à l'origine pensé être principalement présent chez les nouveau-nés et les rongeurs pour aider à réguler la température corporelle, mais des études récentes suggèrent qu'il pourrait également jouer un rôle chez les adultes humains.

Le tissu adipeux ne se compose pas seulement d'adipocytes. En plus des adipocytes matures remplis de lipides, il contient également des pré-adipocytes, qui sont des cellules immatures capables de se différencier en adipocytes fonctionnels. De plus, le tissu adipeux contient une fraction stromale vasculaire (FSV), qui comprend des cellules sanguines, des cellules endothéliales, des macrophages et des cellules souches, également appelées cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (AD-MSCs pour *adipose tissue-derived mesenchymal stromal/stem cells*) (Figure 1). Ces cellules souches ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires, y compris des adipocytes.

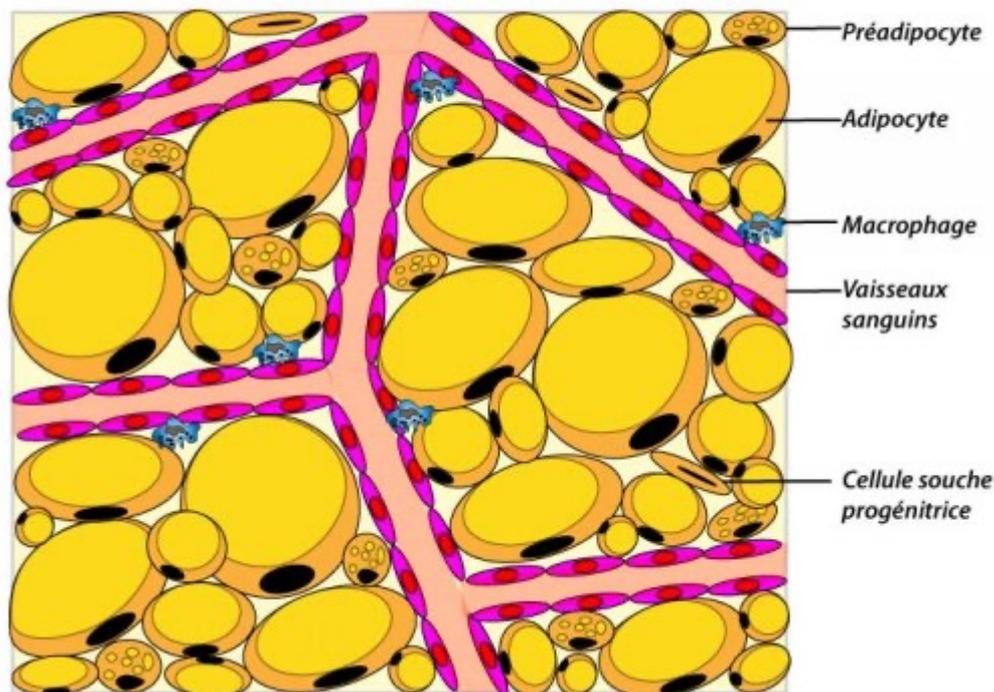


Figure 1 : Représentation schématique du tissu adipeux blanc et de sa composition cellulaire.
 Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

I.1.1.1. Le TA blanc sous-cutané

Les dépôts sous-cutanés sont ceux qui subissent les plus importants changements de taille sans effet notable sur la sensibilité à l'insuline, le métabolisme du glucose ou le profil métabolique de l'organisme (Despres et al., 1989).

1. **Différences entre les couches de tissu adipeux sous-cutané** : Chez l'homme, il existe deux couches distinctes de tissu adipeux sous-cutané : le tissu adipeux sous-cutané superficiel et le tissu adipeux sous-cutané profond. Chez la femme, environ 51% du tissu adipeux sous-cutané total se trouve dans les couches profondes, tandis que chez l'homme, ce pourcentage est plus élevé, à environ 66%. Cette différence entre les sexes peut contribuer aux variations observées dans les profils corporels féminins et masculins.
2. **Distribution du tissu adipeux sous-cutané** : L'épaisseur du tissu adipeux sous-cutané varie en fonction des régions du corps et du sexe. De manière générale, le tissu adipeux sous-cutané est réparti sur tout le corps, mais il montre une tendance à se développer dans certaines zones spécifiques. Chez les hommes, il a tendance à s'accumuler au-dessus de la ceinture, notamment au niveau du ventre et des épaules, ce qui est connu sous le nom d'obésité androïde. Chez les femmes, l'accumulation se produit davantage en dessous de la ceinture, affectant les cuisses, les hanches et les fesses, ce qui est appelé obésité gynoïde. Nous reverrons de façon beaucoup plus exhaustive, notamment sur un plan histologique, les deux couches du TA sous-cutané (chapitre I.1.7).

3. **Impact de l'obésité sur les couches de tissu adipeux sous-cutané** : Il a été observé que l'obésité entraîne une augmentation préférentielle de l'épaisseur de la couche profonde du tissu adipeux sous-cutané. De plus, lors de la perte de poids chez les individus obèses, cette couche profonde est également davantage affectée. Cela suggère que la couche profonde du tissu adipeux sous-cutané est plus active sur le plan métabolique que la couche superficielle (He et al., 2005).

Ces informations soulignent l'importance de comprendre la distribution et les caractéristiques du tissu adipeux sous-cutané, ainsi que son rôle potentiel dans le métabolisme, l'obésité et la perte de poids. Les variations observées dans la répartition de la graisse corporelle peuvent avoir des implications pour la santé métabolique et la physiologie.

I.1.1.2. Le TA blanc viscéral

Le tissu adipeux viscéral se compose des compartiments intra- et rétropéritonéaux, et le tissu adipeux intrapéritonéal est à son tour constitué des tissus adipeux omental, mésentérique et, chez les rongeurs, périgonadal (épididymal). La limite entre les tissus adipeux intra- et rétropéritonéaux est située le long de la face ventrale du rein et de la face dorsale des intestins. Chez l'homme, le tissu adipeux rétropéritonéal est moins prédominant et ne représente que 25% du total des dépôts viscéraux (Wajchenberg, 2000). Le tissu adipeux viscéral se distingue des autres dépôts par sa connexion directe au foie par le biais de la veine porte.

Réduire la quantité de tissu adipeux viscéral améliore la sensibilité à l'insuline de l'organisme et favorise le métabolisme du glucose. En effet, la masse de tissu adipeux viscéral est positivement associée à l'intolérance au glucose, à l'altération des niveaux plasmatiques de lipoprotéines, à l'augmentation des taux de triglycérides et de cholestérol, ainsi qu'à l'hypertension et à la dyslipidémie (Klein et al., 2004 ; Thörne et al., 2002). De plus, l'analyse des voies de signalisation de l'insuline dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané humains démontre que le tissu adipeux viscéral exprime des niveaux plus élevés de protéines spécifiques de la voie de signalisation de l'insuline et présente une plus grande sensibilité à l'insuline (Laviola et al., 2006). En outre, le tissu adipeux viscéral réagit davantage à la perte de poids que le tissu adipeux sous-cutané, il est métaboliquement plus actif, favorise la lipolyse et produit davantage d'adipokines (Park & Lee, 2005).

I.1.2. Le TA et la régulation de l'homéostasie énergétique

L'une des fonctions primordiales du tissu adipeux (TA) consiste à emmagasiner l'excès d'énergie sous forme de lipides, qui seront ensuite libérés par d'autres tissus en réponse aux besoins métaboliques pendant les périodes de restriction alimentaire.

Pour donner suite à des repas copieux, le TA stocke l'excédent d'énergie sous forme de triglycérides (TG) dans un processus appelé lipogenèse. Les adipocytes ont la capacité d'accumuler des quantités considérables de TG, stockées au sein de gouttelettes lipidiques intracellulaires entourées de protéines appelées périlipines, sans engendrer de lipotoxicité (Greenberg et al., 1993) (Figure 2).

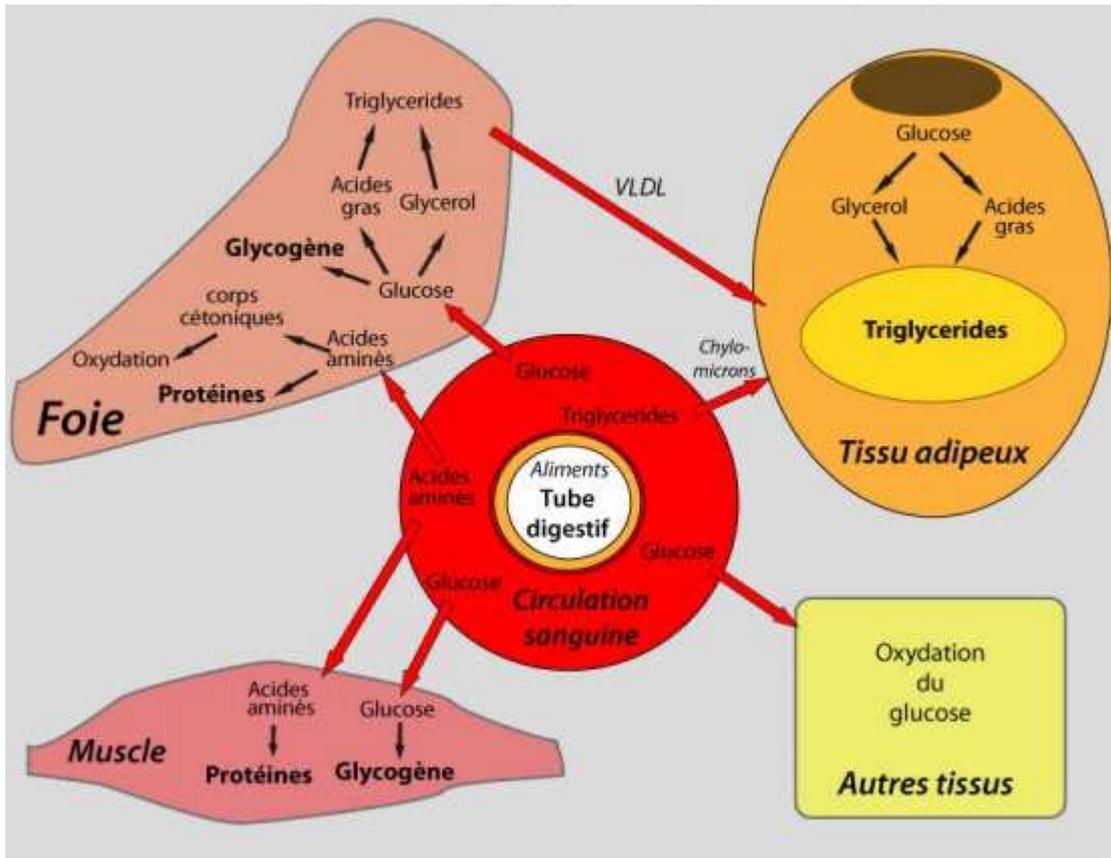


Figure 2 : Rôle du tissu adipeux blanc et des organes périphériques dans le stockage de l'énergie après un repas (état post-prandial).

Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

En période de jeûne, les TG sont décomposés en acides gras (AG) libres et en glycérol par un processus de lipolyse. Les AG libres sont ensuite utilisés comme source d'énergie par des tissus métaboliquement actifs comme les muscles, où leur oxydation génère de l'ATP par conversion en CO_2 et en eau. Cependant, une partie de ces AG libres peut être directement réestérifiée dans le TA sans entrer dans la circulation (Figure 3).

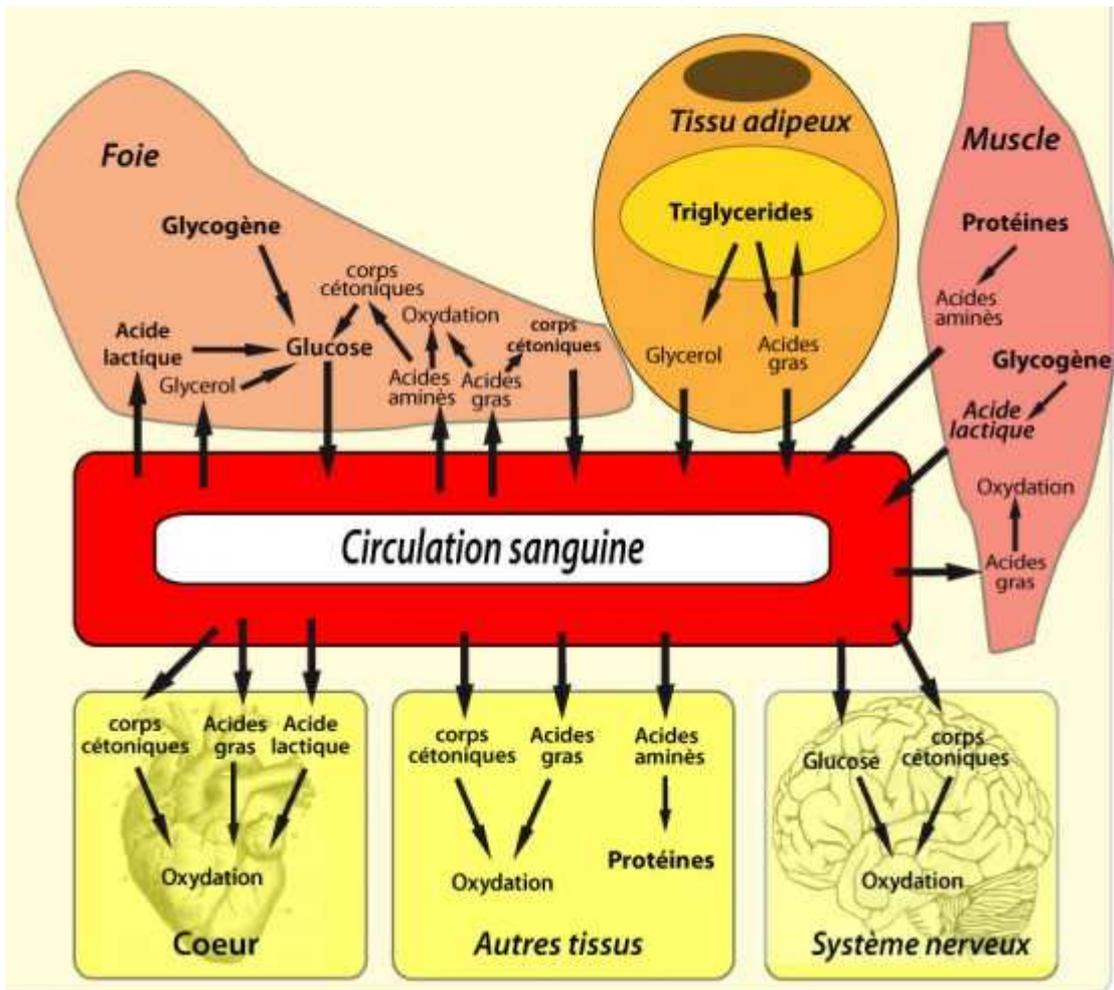


Figure 3 : Rôle du tissu adipeux blanc et des organes périphériques dans la fourniture et la consommation de l'énergie à jeun.

Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

Dans le foie, la majeure partie de l'acétyl-CoA produite lors de l'oxydation des AG libres est utilisée pour synthétiser des corps cétoniques tels que l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate, qui sont libérés dans la circulation et servent de source d'énergie pour les tissus périphériques. Le glycérol provenant de l'hydrolyse des TG est utilisé pour la synthèse du glucose, qui est réservé aux cellules dépendantes du glucose en tant que source énergétique (neurones, globules rouges). La régulation des réserves de TG est d'une importance vitale, car sans le TA et ses réserves lipidiques, les organismes devraient se nourrir de manière continue, ce qui serait clairement impossible (Tableau1).

Les réserves d'énergie du corps humain		
Les zones de réserve d'énergie	Quantité moyenne	Durée de fourniture d'énergie en période de jeun
La graisse	10-15 kg	35 jours
Le glycogène musculaire	350 g	15 h
Le glycogène hépatique	80 g	3,5 h
Le glucose circulant	20 g	40 mn
Les protéines du corps	6-7 kg	15 jours

Tableau 1 : Les réserves d'énergie du corps humain.
Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

Le métabolisme lipidique dans le TA est régulé à trois niveaux principaux : l'absorption des AG, la lipogenèse et la lipolyse. La lipogenèse et la lipolyse coexistent à un rythme modéré, et la vitesse de l'une ou l'autre voie est déterminée par l'équilibre entre l'apport en AG provenant des chylomicrons et des lipoprotéines à très faible densité (VLDL : *very low density lipoprotein*) d'une part, et la demande en AG par les tissus consommateurs d'autre part. Ces processus sont régulés par divers stimuli externes, parmi lesquels l'insuline, les corticoïdes, les catécholamines, les peptides natriurétiques et des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α : *tumor necrosis factor α*).

I.1.3. Le TA, organe endocrinien

Pendant longtemps considéré principalement comme un organe passif, chargé du stockage et de la libération de lipides en réponse aux besoins métaboliques, le tissu adipeux (TA) est maintenant reconnu comme un organe endocrinien actif. Il est capable d'interpréter des signaux hormonaux provenant de différentes parties du corps et d'y réagir en produisant des peptides de signalisation propres, appelés adipokines. Ces médiateurs exercent leur influence sur divers tissus cibles, tels que le foie et les muscles squelettiques, et contribuent directement à la régulation globale de l'équilibre énergétique. Certains de ces adipokines, comme la leptine ou l'adiponectine, stimulent des circuits neuronaux dans des régions cérébrales telles que l'hypothalamus, ayant un impact sur la régulation systémique de la dépense énergétique et du métabolisme lipidique (Ahima et al., 2006).

En plus de leur rôle dans la régulation énergétique, le TA produit également des cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires en réponse à des situations de stress, contribuant ainsi à l'équilibre de l'homéostasie énergétique. La sécrétion de ces adipokines et cytokines par le TA est étroitement régulée par la quantité de tissu adipeux et l'état physiologique de l'organisme (Verreth et al., 2004).

Bien que de nouvelles adipokines liées à l'équilibre énergétique aient été découvertes ces dernières années, les plus étudiées demeurent la leptine, l'adiponectine, la résistine, l'*angiopoietin-like protein 4* et le *preadipocyte factor 1*. Parmi les autres molécules sécrétées

par le TA (telles que les chimiokines, adipokines et protéines vasculaires), certaines sont impliquées dans des réponses inflammatoires pro-inflammatoires (comme le TNF- α , l'interleukine 1 (IL1) et l'IL6), tandis que d'autres ont un effet anti-inflammatoire (comme le *transforming growth factor- β* (TGF- β), l'IL1R α , l'IL10, le monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), l'IL8, le *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES), l'*interféron gamma-induced protein 10* (IP10), l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène-1 (PAI1), la transferrine (TF) et l'angiotensine 2) (Tableau 2).

Nom	Expression	Principales fonctions
Leptine	Adipocytes	Hormone, reflet de la masse adipeuse Signal de satiété par effet direct sur l'hypothalamus Stimule la lipolyse, inhibe la lipogénèse, stimule l'oxydation des AG
Adiponectine	Adipocytes	Hormone insulino-sensible Stimule l'oxydation des AG Action anti-inflammatoire
Adipsine	Adipocytes	Composante du complément Stimule le stockage de TG, inhibe la lipolyse
Pref-1	Préadipocytes	Inhibe l'adipogénèse Sa surexpression dans le TA affecte la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline
TNF α	Macrophages	Cytokine pro-inflammatoire Induit l'insulino-résistance Augmente la lipolyse dans les adipocytes
IL-6	Adipocytes	Cytokine pro-inflammatoire Diminue les voies de signalisation de la leptine et de l'insuline
TGF β	Adipocytes/ Macrophages	Facteur de croissance, adipokine anti-inflammatoire Effet sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose Expression augmentée au cours de l'obésité
MCP1	Adipocytes/ Macrophages	Chémokine anti-inflammatoire Recrute les macrophages sur les sites inflammatoires Augmente la lipolyse et la sécrétion de leptine
PAI1	Adipocytes	Protéines vasculaires, puissant inhibiteur du système fibrinolytique Lié au développement de l'insulino-résistance Niveaux circulants augmentés en cas d'obésité

Tableau 2 : Facteurs sécrétés par le tissu adipeux.

Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

I.1.4. Focus sur l'adipocyte

I.1.4.1. Morphologie

L'adipocyte blanc se compose principalement d'une gouttelette de lipides, avec son noyau repoussé en périphérie et un cytoplasme restreint formant une fine couronne autour de la gouttelette lipidique (Figure 4).

Les adipocytes stockent les acides gras libres sous forme de triglycérides (TG), qui sont emmagasinés dans la gouttelette lipidique lors du processus de lipogénèse. La taille de ces adipocytes peut varier considérablement, parfois jusqu'à 20 fois leur taille initiale. En revanche,

lorsqu'il y a une demande d'énergie, les triglycérides subissent une hydrolyse, libérant ainsi des acides gras libres dans la circulation dans un processus appelé lipolyse.

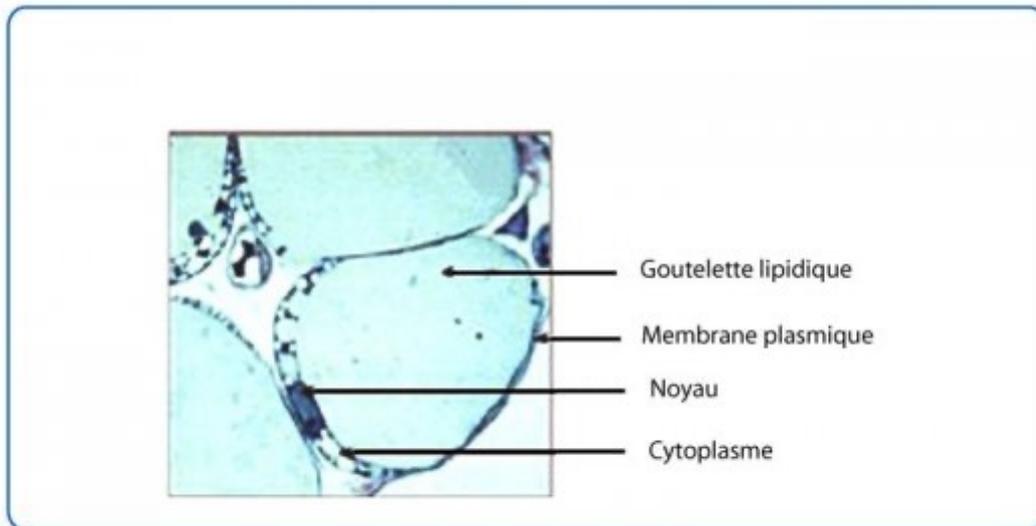


Figure 4 : Schéma de la morphologie d'un adipocyte au microscope électronique.

Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

I.1.4.2. Lipogenèse

Les triglycérides (TG) qui sont stockés dans les adipocytes sont produits à l'intérieur de ces cellules à partir d'acides gras (AG) et de glycérol. Avant d'être incorporés dans la synthèse des TG, les acides gras et le glycérol doivent d'abord subir une activation préalable, transformant les acides gras en acyl-CoA et le glycérol en glycérol-3-phosphate (G3P). La majorité des acides gras utilisés dans ce processus proviennent des lipides présents dans la circulation sanguine, tandis que le glycérol peut avoir deux sources possibles : la glycolyse ou la gluconéogenèse.

L'emplacement précis où se déroule la synthèse des triglycérides ainsi que la méthode par laquelle les nouvelles molécules de TG sont acheminées vers les gouttelettes lipidiques demeurent des sujets de débat et de recherche.

I.1.4.2.1. Source des acides gras

La plupart des acides gras (AG) utilisés pour la synthèse des triglycérides (TG) dans le tissu adipeux humain proviennent des lipides circulants présents dans le plasma sanguin. Ces acides gras circulants peuvent être soit des acides gras non estérifiés (AGNE) liés à l'albumine, soit des triglycérides incorporés dans des lipoprotéines, principalement les VLDL (lipoprotéines à très faible densité) en période post-absorptive et les chylomicrons en période postprandiale. Avant d'être stockés sous forme de TG, ces lipoprotéines doivent d'abord être décomposées par l'enzyme lipoprotéine lipase (LPL) présente au niveau des capillaires du tissu adipeux (Mead et al., 2002), libérant ainsi les acides gras. L'expression et l'activité de la LPL augmentent dans le tissu adipeux en période d'alimentation, en particulier lors d'un régime riche en glucides, probablement sous l'influence de l'insuline. En revanche, en période de jeûne ou de régime riche en lipides, son expression et son activité diminuent (Braun & Severson, 1992).

Quelle que soit leur origine, l'absorption des acides gras à longue chaîne par les adipocytes nécessite des mécanismes spécifiques pour traverser la membrane plasmique (Luiken et al., 2004). Il est probable qu'une combinaison de transporteurs spécifiques et de diffusion passive soit à l'œuvre. Les adipocytes blancs humains expriment plusieurs transporteurs d'acides gras qui facilitent et régulent leur entrée, notamment la protéine *cluster of differentiation 36* (CD36) (homologue de la protéine murine FAT, responsable de la majorité de l'absorption des acides gras), la protéine de transport des acides gras (FATP ou *fatty acid transport protein*) et la protéine de liaison des acides gras (FABP : *fatty acid binding protein*) (Ibrahimi & Abumrad, 2002). L'insuline favorise ce processus en stimulant l'expression de ces transporteurs et leur translocation vers la membrane plasmique (Czech, 2002).

Étant donné que les acides gras ne sont pas solubles dans le cytosol et peuvent être toxiques pour les membranes cellulaires, ils sont ensuite liés de manière étroite à des protéines cytosoliques appelées protéines de liaison aux acides gras (FABP). Ces protéines aident au transport des acides gras d'une membrane à l'autre jusqu'à ce qu'ils atteignent l'enzyme acyl-CoA synthase (ACS). Les adipocytes blancs humains expriment deux types de FABP : la protéine 2 des adipocytes (aP2 : *adipocyte protein 2*), principalement présente et spécifique des adipocytes, et la protéine de liaison aux lipides des kératinocytes, présente également chez les macrophages. Le premier pas du métabolisme des acides gras après leur absorption et leur liaison aux FABP consiste à les activer en acyl-CoA à longue chaîne (LCFA-CoA : *long chain fatty acyl-CoA*) à l'aide de l'acyl-CoA synthase. Les LCFA-CoA peuvent ensuite être utilisés pour l'oxydation ou pour la synthèse de lipides plus complexes comme les triglycérides. Pour l'oxydation, les LCFA-CoA doivent entrer dans les mitochondries, ce qui est favorisé par l'action de la carnitine-palmitoyl transférase I.

En plus de l'absorption des acides gras circulants, une autre source d'acides gras dans les adipocytes est la lipogenèse de novo. Cela implique la synthèse de nouveaux acides gras à partir de substrats non lipidiques, principalement des glucides chez les mammifères. Les processus de lipogenèse et de glycolyse sont étroitement liés dans les tissus producteurs de lipides. Bien que les adipocytes soient l'un des principaux sites de lipogenèse de novo, cette voie est généralement moins active chez l'homme que chez le rongeur et contribue moins aux réserves lipidiques des adipocytes que les triglycérides issus de l'alimentation (Marin et al., 1992). Les enzymes clés de la lipogenèse sont présentes dans les adipocytes, mais leur expression et leur activité sont plus faibles chez l'homme que chez le rat (Letexier et al., 2003). Même si la lipogenèse de novo dans les adipocytes est moins active que dans le foie (exprimée par gramme de tissu), les contributions respectives du foie (1,5 kg) et du tissu adipeux (12 à 15 kg) restent comparables à l'échelle de l'organisme (environ 1 à 2 g par jour pour chaque tissu) (Diraison et al., 2003). Cependant, ces contributions restent minimes par rapport à l'apport en triglycérides alimentaires (plus de 100 g/jour).

I.1.4.2.2. Source de G3P

La synthèse des triglycérides (TG) requiert la présence de glycérol-3-phosphate (G3P) pour l'étape initiale d'estérification des acides gras. Cependant, l'activité de la glycérol-kinase, enzyme nécessaire à la production de G3P, est extrêmement faible dans les adipocytes (Figure 5). Par conséquent, le G3P peut être généré à partir du glucose par les premières étapes de la glycolyse, ou à partir de précurseurs gluconéogéniques par la voie de la glycéronéogenèse (Reshef et al., 2003). Le glucose pénètre dans les adipocytes par

l'intermédiaire des transporteurs de glucose 1 et 4 (Glut-1 et Glut-4), qui sont responsables respectivement de l'entrée basale du glucose et de l'entrée stimulée par l'insuline. L'autre source de G3P provient de la glycéronéogenèse, une version réduite de la gluconéogenèse qui génère du G3P à partir de substrats gluconéogéniques tels que le lactate et le pyruvate. L'étape limitante de cette réaction est contrôlée par la forme cytosolique de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Les proportions relatives de glycolyse et de glycéronéogenèse dans la production de G3P varient en fonction de facteurs nutritionnels et pharmacologiques. La disponibilité globale de G3P régule le taux d'estérification des acides gras issus de la lipogenèse de novo ou des lipides circulants, ainsi que la ré-estérification partielle des acides gras libérés lors de la lipolyse des triglycérides.

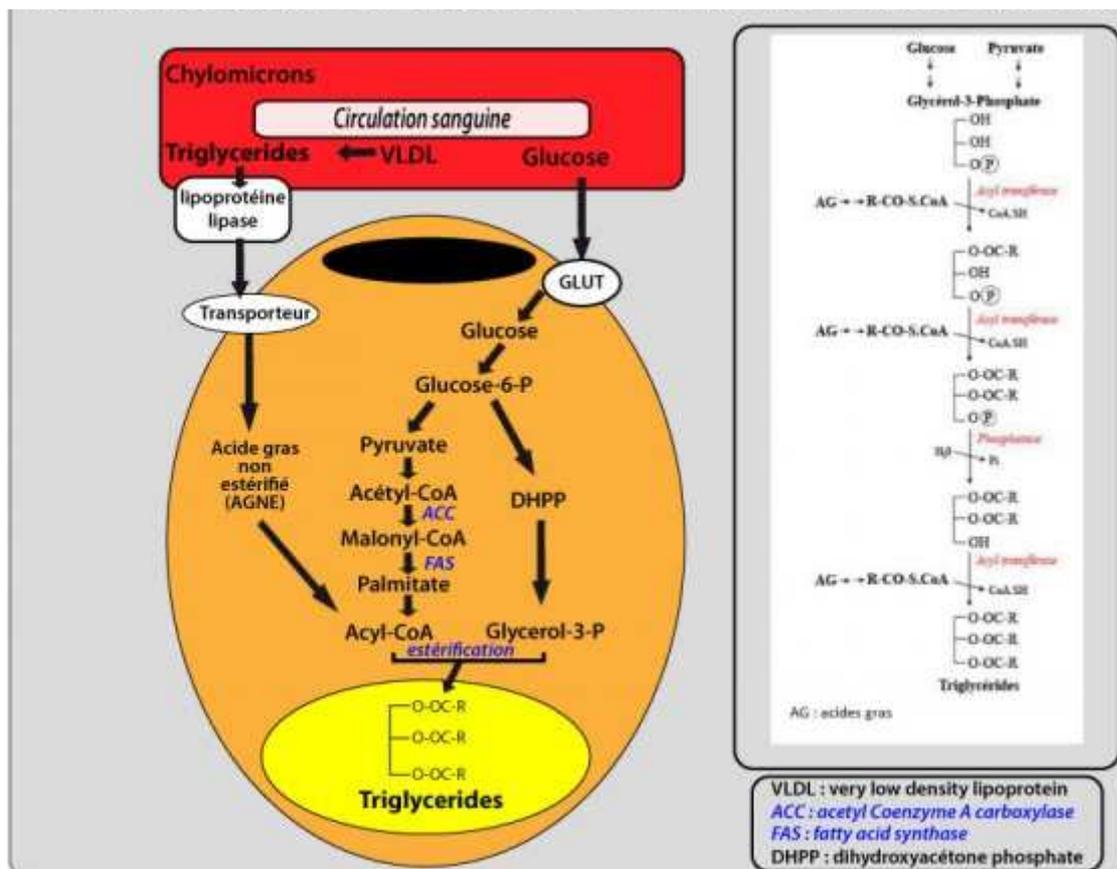


Figure 5 : Lipogenèse et synthèse des triglycérides dans l'adipocytes (état post-prandial).

Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

1.1.4.2.3. Synthèse des triglycérides

Les triglycérides (TG) sont formés par la liaison d'une molécule de glycérol à trois molécules d'acides gras (AG). La biosynthèse des TG implique une série d'étapes d'estérification successives des groupes alcool du glycérol-3-phosphate (G3P) par diverses enzymes. Ces enzymes comprennent trois acyl transférase et une phosphatase, qui ensemble forment la triglycéride synthase. Ce complexe enzymatique multienzymatique est associé à la membrane du réticulum endoplasmique.

I.1.4.3. Lipolyse

Les triglycérides (TG) présents dans le tissu adipeux sont dégradés lorsqu'il y a un besoin énergétique insatisfait dans l'organisme, par exemple en cas de jeûne. Ce processus de dégradation, appelé lipolyse intracellulaire, se produit en plusieurs étapes (Figure 6). Les TG sont d'abord hydrolysés en diacylglycérols (DAG) et ensuite en monoacylglycérols (MAG), aboutissant finalement à la libération de trois molécules d'acides gras (AG) et d'une molécule de glycérol par molécule de TG. Cette hydrolyse est généralement complète, bien que quelques DAG et MAG puissent s'accumuler. Étant donné que le tissu adipeux a une faible activité de glycérol-kinase, le glycérol produit est relâché dans la circulation pour être utilisé par d'autres tissus. La libération de glycérol dépend partiellement d'une protéine appelée aquaporine (AQP), qui forme un canal dans la membrane cellulaire.

Les acides gras libérés lors de la dégradation des TG peuvent soit être relâchés dans la circulation, soit être réestérifiés en TG sans quitter la cellule adipeuse. Ce recyclage intracellulaire des acides gras dépend de la disponibilité en glycérol-3-phosphate (G3P) et de l'expression des enzymes impliquées dans la réestérification. À l'état basal ou post-absorptif, ce recyclage est limité, mais il augmente en période de jeûne ou dans des situations pathologiques telles que l'hyperthyroïdie ou le stress (Beylot et al., 1991) (Bahr et al., 1990). Ces mécanismes de régulation du recyclage des acides gras contribuent à la régulation des taux d'acides gras dans le sang.

La lipase hormono-sensible (LHS) joue un rôle crucial dans la dégradation des TG. La lipolyse est activée par des hormones ou des médiateurs qui stimulent le système de l'adénylate cyclase, tels que l'adrénaline, la noradrénaline et le glucagon. Cela entraîne une augmentation de la concentration d'AMP cyclique à l'intérieur de la cellule, ce qui active une protéine kinase A. Cette protéine kinase A active ensuite la LHS et les périlipines en les phosphorylant. L'inhibition de l'expression de la LHS chez la souris entraîne l'accumulation de DAG au lieu de TG, ce qui suggère que bien que la LHS puisse dégrader les TG, ses substrats principaux sont les DAG.

Une autre lipase présente dans le tissu adipeux est la lipase triglycéride adipeuse (ATGL). L'inhibition simultanée de l'ATGL et de la LHS entraîne une inhibition de plus de 90 % de la dégradation des TG dans le tissu adipeux (Zimmermann et al., 2004). Par conséquent, la dégradation des TG dépend principalement de l'ATGL, avec une contribution accessoire de la LHS. L'hydrolyse des DAG est ensuite assurée par la LHS, tandis qu'une lipase MAG produit le dernier acide gras et un glycérol. On considère généralement que la lipase MAG représente l'étape limitante de la libération de glycérol et d'acides gras libres.

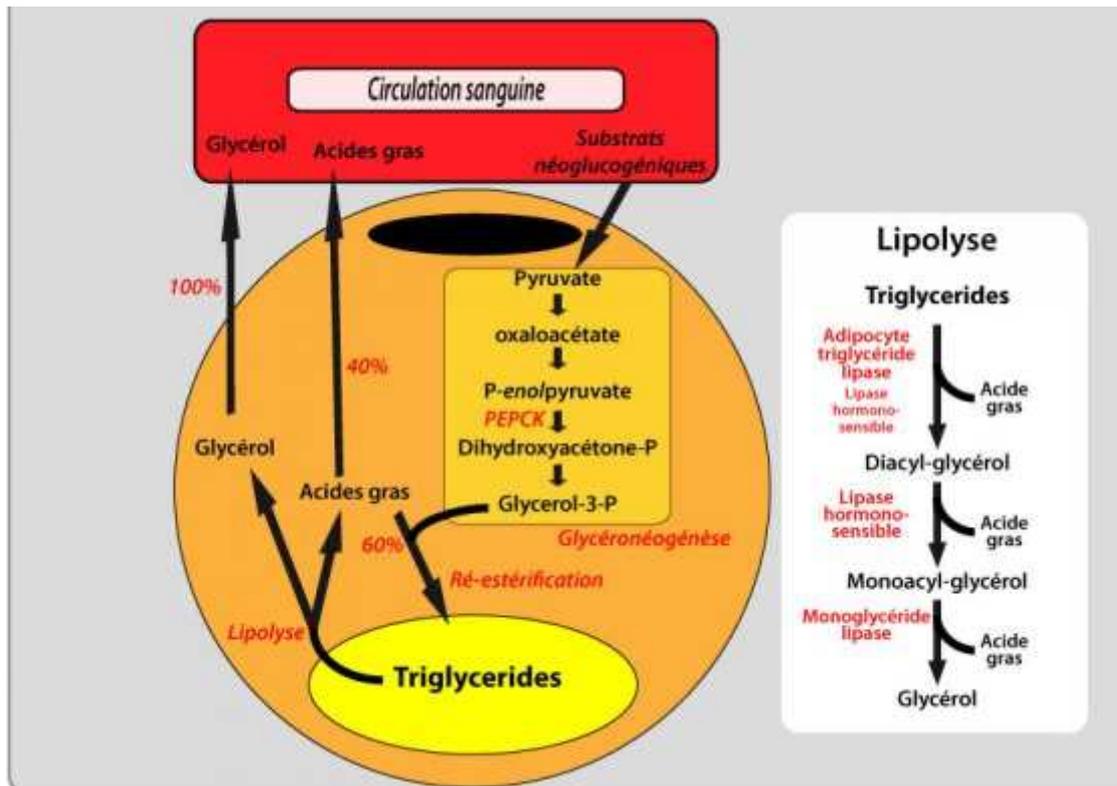


Figure 6 : Lipolyse, glycéronéogenèse, et ré-estérification à jeun.
Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

I.1.5. Origine et développement du TA

Dans la plupart des espèces, la formation du tissu adipeux (TA) commence avant la naissance. Après la naissance, le tissu adipeux se développe rapidement grâce à une augmentation à la fois du nombre et de la taille des cellules adipeuses. Ces processus sont respectivement appelés hyperplasie (augmentation du nombre) et hypertrophie (augmentation de la taille). Plusieurs études suggèrent que l'expansion du tissu adipeux à l'âge adulte ne résulte pas seulement de l'augmentation de la taille des cellules adipeuses existantes, mais également de l'augmentation de leur nombre. Des observations d'hyperplasie adipocytaire ont été réalisées dans différents modèles murins (Gregoire, 2001 ; Okuno et al., 1998). Bien que l'existence de l'hyperplasie adipocytaire chez l'homme soit encore débattue, des cellules précurseurs capables de se différencier en adipocytes ont été isolées du tissu adipeux adulte humain (Sen et al., 2001), ce qui indique que la capacité à générer de nouvelles cellules adipeuses persiste tout au long de la vie. De plus, des cellules dérivées de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux humain peuvent être différenciées en cellules adipeuses (les AD-MSCs), ainsi qu'en cellules de divers autres types en présence de signaux inducteurs spécifiques (Zuk et al., 2001), ce qui met en évidence la plasticité du tissu adipeux.

Cela suggère qu'en plus des cellules déjà prédestinées à devenir des adipocytes (appelées pré-adipocytes), le tissu adipeux adulte humain contient des cellules précurseuses multipotentes. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la détermination de ces cellules primitives vers la lignée adipocytaire restent encore mal compris. En revanche, les processus moléculaires et cellulaires qui permettent la transition des cellules

indifférenciées de type fibroblastique en adipocytes matures ont fait l'objet de nombreuses recherches. Ce phénomène est appelé différenciation ou adipogenèse.

I.1.6. La différenciation adipocytaire (adipogenèse)

Pendant la différenciation adipocytaire, l'acquisition du phénotype adipocytaire est caractérisée par des changements chronologiques dans l'expression de nombreux gènes. Cela se reflète par l'apparition de marqueurs précoces, intermédiaires et tardifs d'ARNm ou de protéines, et par l'accumulation de TG. Ces changements sont principalement transcriptionnels (Figure 7).

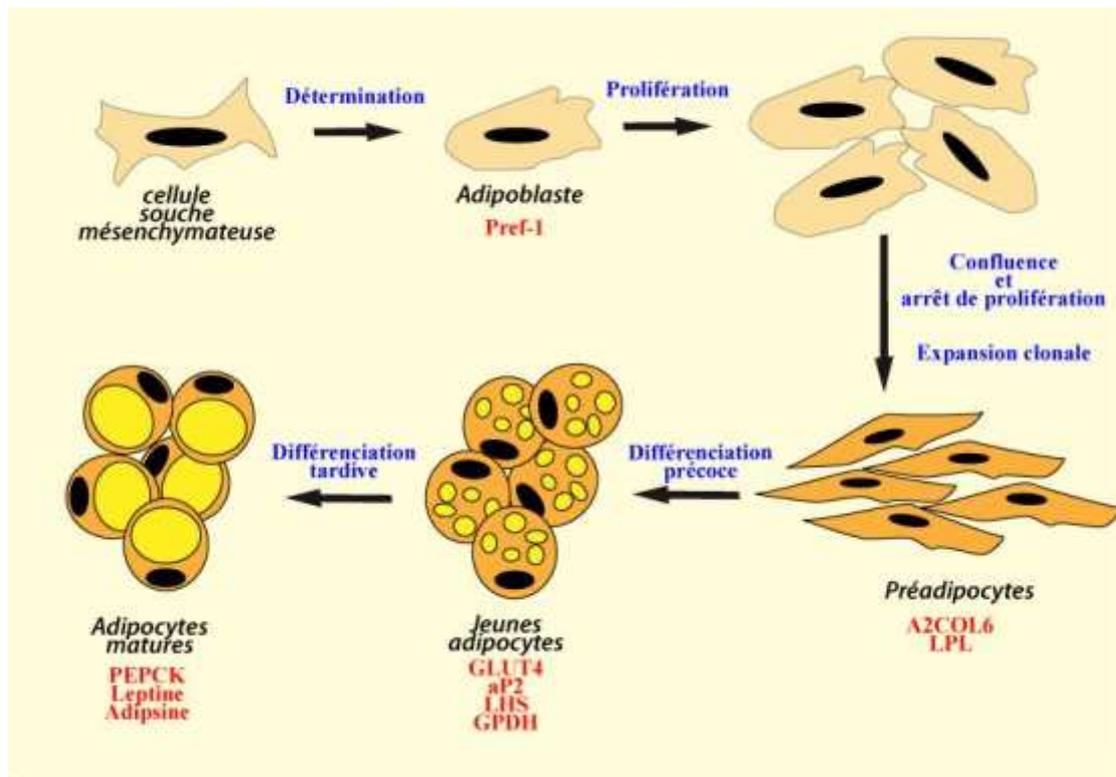


Figure 7 : Détermination et différenciation de l'adipocyte.

Les différentes étapes de la différenciation adipocytaire sont écrites en bleu, les différents stades cellulaires sont en noir et les marqueurs caractéristiques de chaque stade sont en rouge.

Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

Les changements dans l'expression de gènes pendant les phases précoces et tardives de la différenciation adipocytaires ont été principalement caractérisés en utilisant des lignées cellulaires de pré-adipocytes, comme la lignée murine 3T3-L1 qui sera présentée ci-après. Les principales étapes de la différenciation adipocytaire sont présentées ci-dessous. Pour une revue complète sur ce phénomène, voir (Gregoire et al., 1998).

I.1.6.1. Arrêt de la prolifération

Après une phase de croissance exponentielle régulée par des facteurs de croissance, les adipoblastes, qui ont une morphologie fibroblastique, atteignent un stade de confluence où leur prolifération ralentit. Au-delà des interactions cellulaires, cet arrêt de la croissance semble être un prérequis pour le déclenchement du processus de différenciation vers les adipocytes.

À ce stade, les adipoblastes deviennent des pré-adipocytes. Deux facteurs de transcription, *CCAAT/enhancer binding protein- α* (C/EBP- α) et *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ), dont l'expression augmente continuellement pendant la différenciation, semblent jouer un rôle dans cet arrêt de la prolifération cellulaire, même si leur niveau d'expression dans les pré-adipocytes est relativement faible. Ces pré-adipocytes arrêtés en phase G0/G1 du cycle cellulaire expriment des marqueurs précoces tels que la chaîne $\alpha 2$ du collagène de type VI (A2COL6) ou la lipoprotéine lipase (LPL). C'est également à ce stade que l'expression du *pre-adipocyte factor 1* (pref 1), une protéine soluble ayant un effet inhibiteur sur la différenciation adipocytaire, diminue (Sul et al., 2000).

I.1.6.2. Expansion clonale

Les pré-adipocytes ne peuvent entrer dans le processus de différenciation que s'ils passent par une phase d'expansion clonale, impliquant plusieurs cycles de mitoses post-confluentes (Tang et al., 2003). Cependant, les pré-adipocytes primaires dérivés du tissu adipeux humain n'ont pas besoin de se diviser pour amorcer la différenciation (Entenmann & Hauner, 1996).

Dans ces cellules, l'inhibition de la mitose à l'aide de la cytosine arabinoside n'affecte pas le développement adipocytaire, ce qui suggère que l'amplification clonale de cellules déjà déterminées n'est pas une étape critique.

Ces deux phases, à savoir l'arrêt de la croissance et l'expansion clonale, s'accompagnent de modifications complexes dans l'expression des gènes, qui peuvent varier en fonction du modèle cellulaire et des protocoles de différenciation utilisés. L'expression de l'ARNm de la lipoprotéine lipase (LPL) a souvent été mentionnée comme un marqueur précoce de la différenciation adipocytaire. Cependant, l'expression de la LPL est spontanée dans les pré-adipocytes parvenus à la confluence et ne dépend pas de l'ajout des agents nécessaires à la différenciation. Cela laisse entendre que la LPL pourrait plutôt être un indicateur de la phase d'arrêt de la croissance cellulaire que d'une étape précoce de la différenciation.

Au moins deux familles de facteurs de transcription sont induites tôt pendant la différenciation adipocytaire : les C/EBP et les PPAR. L'expression précoce de C/EBP et PPAR est logique, étant donné leur rôle essentiel dans la phase finale de différenciation des cellules en activant la transcription de gènes spécifiques des adipocytes. PPAR γ est spécifique aux adipocytes, présent à des niveaux faibles mais détectables dans les pré-adipocytes. Son expression augmente rapidement après l'induction hormonale de la différenciation, atteignant son apogée dans les adipocytes matures. Une augmentation transitoire de l'expression de C/EBP- β et C/EBP- δ précède l'expression de PPAR γ . Ensuite, la diminution de l'expression de C/EBP- β et C/EBP- δ aux stades précoces à moyens de la différenciation est suivie par l'induction de C/EBP- α . L'induction de C/EBP- α survient juste avant l'expression de gènes spécifiques des adipocytes.

Enfin, pendant la différenciation adipocytaire, les cellules passent d'un phénotype fibroblastique allongé à une forme cellulaire sphérique. Des changements drastiques sont observés dans la morphologie cellulaire, les composants du cytosquelette et les éléments de la matrice extracellulaire. Une diminution de la synthèse de l'actine et de la tubuline, respectivement de 90 % et 95 %, est observée dans les phases très précoces. Ce phénomène représente un événement propre au processus de différenciation et ne découle pas

uniquement de l'accumulation de lipides (Spiegelman & Farmer, 1982). De même, un changement dans l'expression des gènes du collagène est un événement précoce de la différenciation adipocytaire. Les concentrations de procollagène de type I et III diminuent au fur et à mesure de la différenciation des cellules 3T3-L1, tandis que la sécrétion de collagène de type IV augmente (Weiner et al., 1989). Enfin, une augmentation de la production de protéoglycanes de sulfate de chondroïtine (versican) est également observée (Calvo et al., 1991).

I.1.6.3. Phase terminale de différenciation

Lors de la phase finale de différenciation, les adipocytes en culture connaissent une nette augmentation de la lipogenèse de novo et acquièrent leur réactivité à l'insuline. L'activité, l'expression des protéines, ainsi que les ARNm des enzymes impliquées dans le métabolisme des triglycérides connaissent une augmentation substantielle, allant de 10 à 100 fois. Parmi ces enzymes figurent l'ATP citrate lyase, l'enzyme malique, l'acétyl-CoA carboxylase, la stéaroyl-CoA désaturase, la glycérol-3-phosphate acyltransférase, la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, la synthèse des acides gras, et d'autres encore. Les transporteurs du glucose (GLUT4) et d'insuline, ainsi que la sensibilité à l'insuline, connaissent une augmentation. Parallèlement, d'autres gènes spécifiques des adipocytes voient leur expression croître, tels que aP2, CD36, périlipine, adiposine, leptine, et PEPCK.

I.1.7. Les deux couches du TA et le fascia superficiel

Pour comprendre l'organisation du tissu sous-cutané et la présence éventuelle du fascia superficiel, il faut considérer l'ensemble du corps humain et penser qu'une organisation commune doit exister, avec probablement quelques différences locales. C'est pourquoi nous nous appuyerons sur des dissections, couche par couche de l'ensemble du corps humain. Ces dissections de cadavres frais ont révélé que le tissu sous-cutané est divisé par une lame fibreuse en sous-couches, chacune ayant des caractéristiques distinctes (Figure 8). La sous-couche superficielle est appelée "tissu adipeux superficiel" (*superficial adipose tissue* ou SAT), la profonde "tissu adipeux profond" (*deep adipose tissue* ou DAT) et la lame fibreuse située au milieu "fascia superficiel" (Figure 9 et 10). Les deux terminologies sAAT (*superficial abdominal adipose tissue*) et dAAT (*deep abdominal adipose tissue*) seront souvent employées dans le reste de notre travail en référence au tissu adipeux sous-cutané prélevé en abdominal. Ce chapitre utilise le terme "fascia superficiel" en suivant la description du Professeur Sterzi de 1910 (Giuseppe Sterzi, 1910). La terminologie anatomique définit le "fascia" comme une gaine, un feuillet ou toute autre agrégation dissécable de tissu conjonctif ; par conséquent, d'après ces dissections, le fascia superficiel est à toutes fins utiles un véritable fascia.

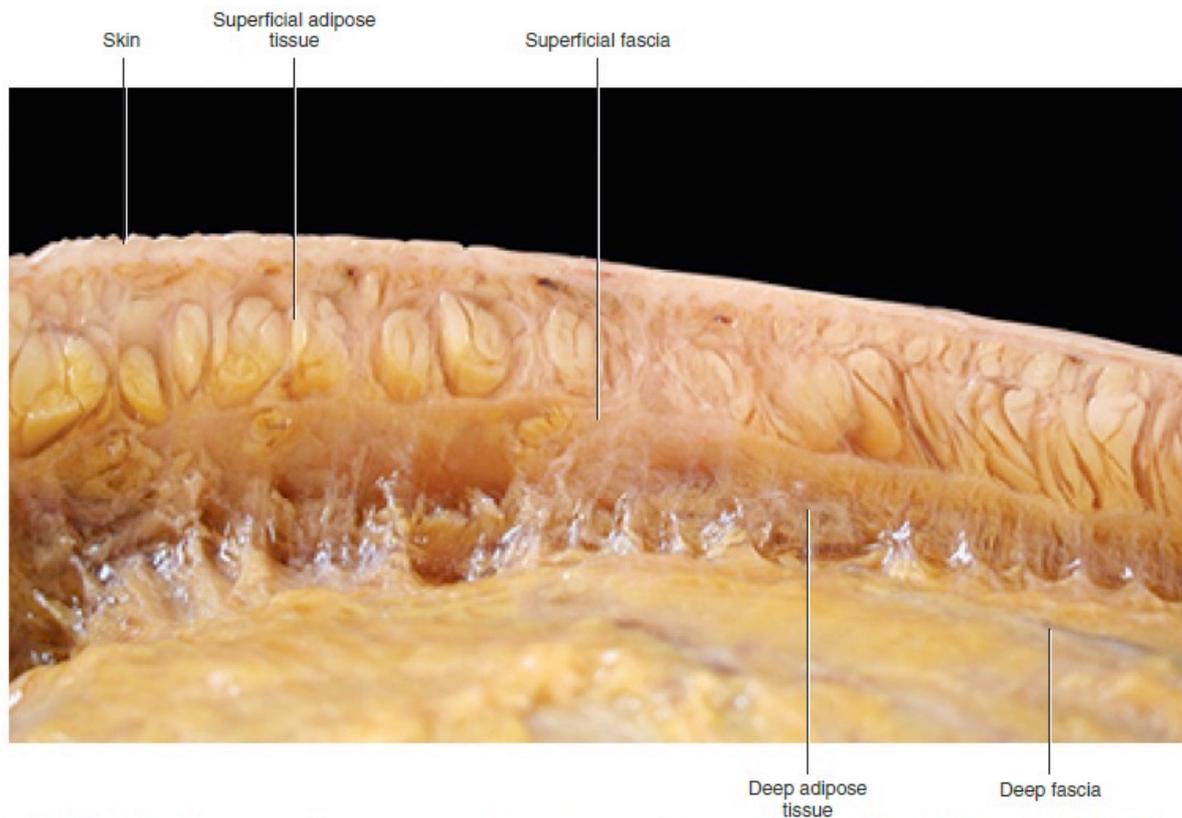


Figure 8 : Section du TA sous-cutané de la cuisse.

Les couches du TA sous-cutané sont représentées. L'aponévrose superficielle sépare le SAT du DAT. Le SAT a une structure distincte, avec des septas fibreuses orientés verticalement et des lobules graisseux situés entre eux. Le DAT est formé d'un tissu conjonctif lâche, il y a peu de cellules et les septas sont plus fins et moins fibreux. Cette structure permet un plan de glissement entre le fascia superficiel et le fascia profond.

Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

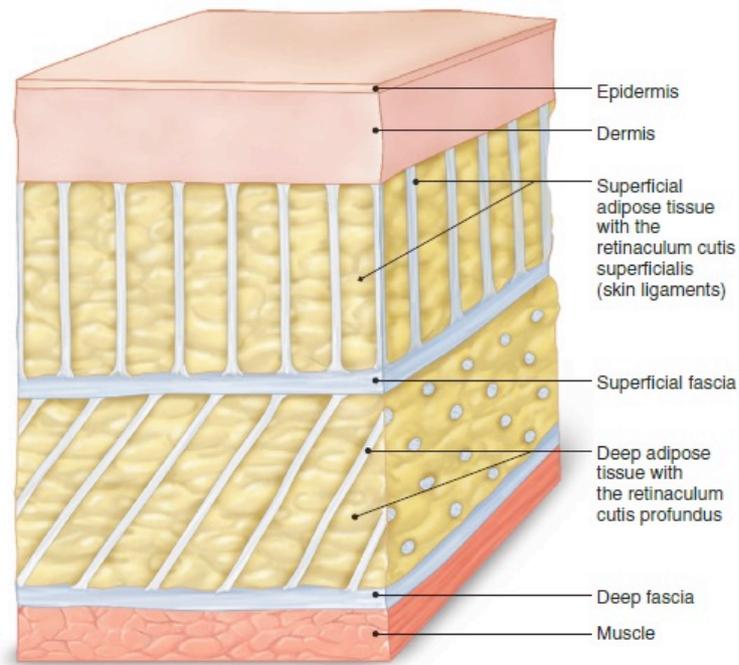


Figure 9 : Organisation du TA sous-cutané.

Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.



Figure 10 : Peau abdominale.

La peau de l'abdomen a été découpée et soulevée. Les rétinnacula cutis superficiels sont ainsi étirés pour une meilleure définition visuelle.

Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

Le fascia superficiel est relié à la peau (retinaculum cutis superficialis) et au fascia profond (retinaculum cutis profundus) par des septas fibreuses, qui confèrent des propriétés mécaniques spécifiques au tissu sous-cutané (Nash et al., 2004). Certains septas sont très obliques et l'analyse d'une petite partie de ces zones révèle, ce qui semble être des lames fibreuses multiples. Cependant, si des zones plus grandes sont disséquées, on constate que ces lamines ne se fusionnent pas en une structure distinctive. Ces conclusions ont été confirmées par l'imagerie et l'examen histologique. Il est évident que le tissu sous-cutané est structuré de manière uniforme, avec des caractéristiques spécifiques qui diffèrent selon la région du corps. Dans certaines parties, la composante fibreuse est prédominante, dans d'autres c'est la composante adipeuse qui prédomine. Ceci définit les caractéristiques mécaniques et biologiques du tissu sous-cutané. Parfois, le fascia superficiel se divise pour envelopper les vaisseaux, les nerfs ou les cellules graisseuses, et il semble que ce fascia soit composé de plus d'une couche.

Les caractéristiques du tissu sous-cutané varient dans tout le corps, en particulier le SAT et le DAT diffèrent en termes d'épaisseur, de forme, et de disposition des lobules adipeux et des septa fibreux. Les retinacula cutis superficialis (ou "ligaments cutanés" dans les manuels anglais) sont généralement presque perpendiculaires (Figure 11). La retinacula cutis profundus est généralement plus oblique et plus fine que les septas superficiels, et crée une séparation nette entre le fascia superficiel et le fascia profond (ou aponévrose). Lorsque les rétinnacula cutis superficelles et profondes s'insèrent dans le fascia superficiel, ils présentent généralement une large zone d'attachement, semblable à un éventail ou à un cône. Dans ces zones, le fascia superficiel apparaît plus épais. Il est probable que l'arrangement de ces septas ait contribué à la grande variabilité dans les valeurs d'épaisseur du fascia rapportées dans la littérature.

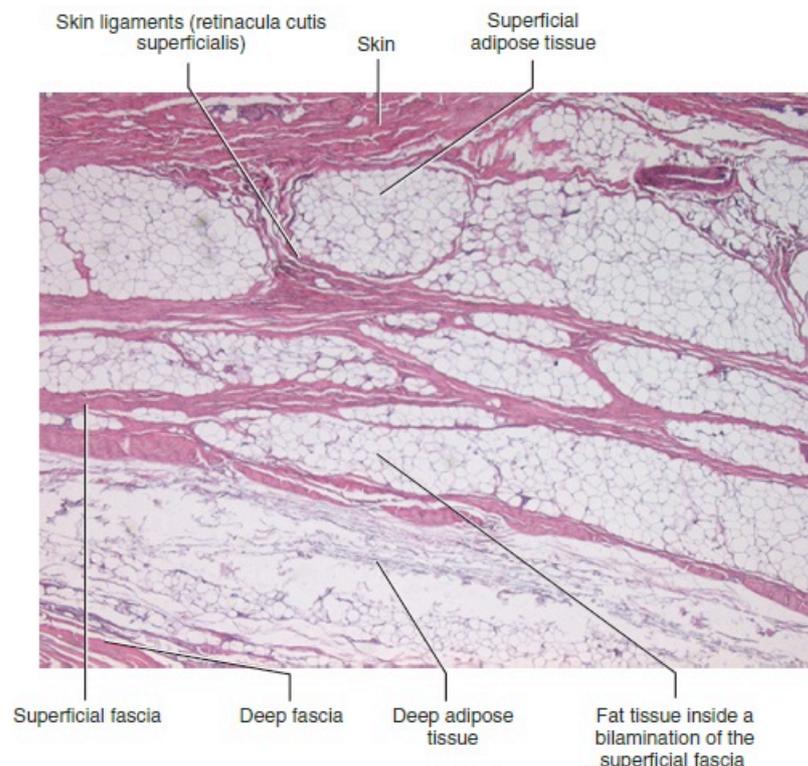


Figure 11 : Histologie du TA sous-cutané de la hanche (coloration hématoxyline-éosine).

Les ligaments cutanés et les lobules graisseux sont évidents dans le SAT, tandis que dans le DAT, le tissu conjonctif lâche est prédominant. Le fascia superficiel est formé de plusieurs couches de tissu

fibreux et de tissu adipeux. Ces sous-couches sont bien définies dans une étude histologique, tandis que dans les études macroscopiques, le fascia superficiel apparaît comme une couche unique.

Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

Le fascia superficiel et le retinacula cutis forment un réseau tridimensionnel entre les lobules graisseux de l'hypoderme, et ce réseau fournit un ancrage dynamique de la peau aux tissus sous-jacents. Cet arrangement permet un mécanisme flexible et pourtant résistant de transmission de charges mécaniques provenant de forces multidirectionnelles. D'après W. Li & Ahn, 2011, les rétinaacula cutis superficielles et profondes (qu'ils nomment collectivement "bandelettes sous-cutanées") pourraient être considérés comme des ponts structurels qui relient mécaniquement la peau, la couche sous-cutanée et la couche musculaire plus profonde. Leur quantité et leurs caractéristiques morphologiques varient en fonction de la région du corps. Par exemple, la zone occupée par la rétinaacula cutis, par rapport au tissu sous-cutané, est plus épaisse dans la cuisse et le mollet que dans le bras, ces zones n'étant pas liées à l'épaisseur de l'hypoderme. La cuisse présente le plus grand nombre moyen de rétinaacula cutis, tandis que la plus grande épaisseur moyenne de rétinaacula cutis est observée au niveau du mollet. Les variations régionales déterminent les différences de mobilité de la peau par rapport aux tissus sous-jacents et peuvent refléter les forces mécaniques composites subies par la partie du corps. Par exemple, dans les paupières, le pénis et le scrotum, le tissu adipeux et la rétinaacula cutis sont absents. La peau présente donc une mobilité accrue par rapport aux plans sous-jacents. D'autres exemples sont la paume de la main et la surface plantaire du pied où le DAT est absent. Dans ces zones, le fascia superficiel adhère à l'aponévrose profonde, et dans le SAT, les ligaments cutanés sont très épais et densément emballés, reliant fortement la peau avec les plans sous-jacents.

I.1.7.1. Le TA superficiel

Le SAT est composé de grands lobules graisseux enfermés entre des septa fibreux (Figure 12). Les lobules graisseux sont presque circulaires et les cloisons (retinacula cutis superficialis ou ligaments cutanés) sont bien définies et généralement orientées perpendiculairement à la surface du corps ancrant le derme aux plans plus profonds. Les lobules graisseux sont organisés en couches simples ou multiples en fonction du contenu en graisse et de l'épaisseur du SAT chez le sujet (Figure 13).

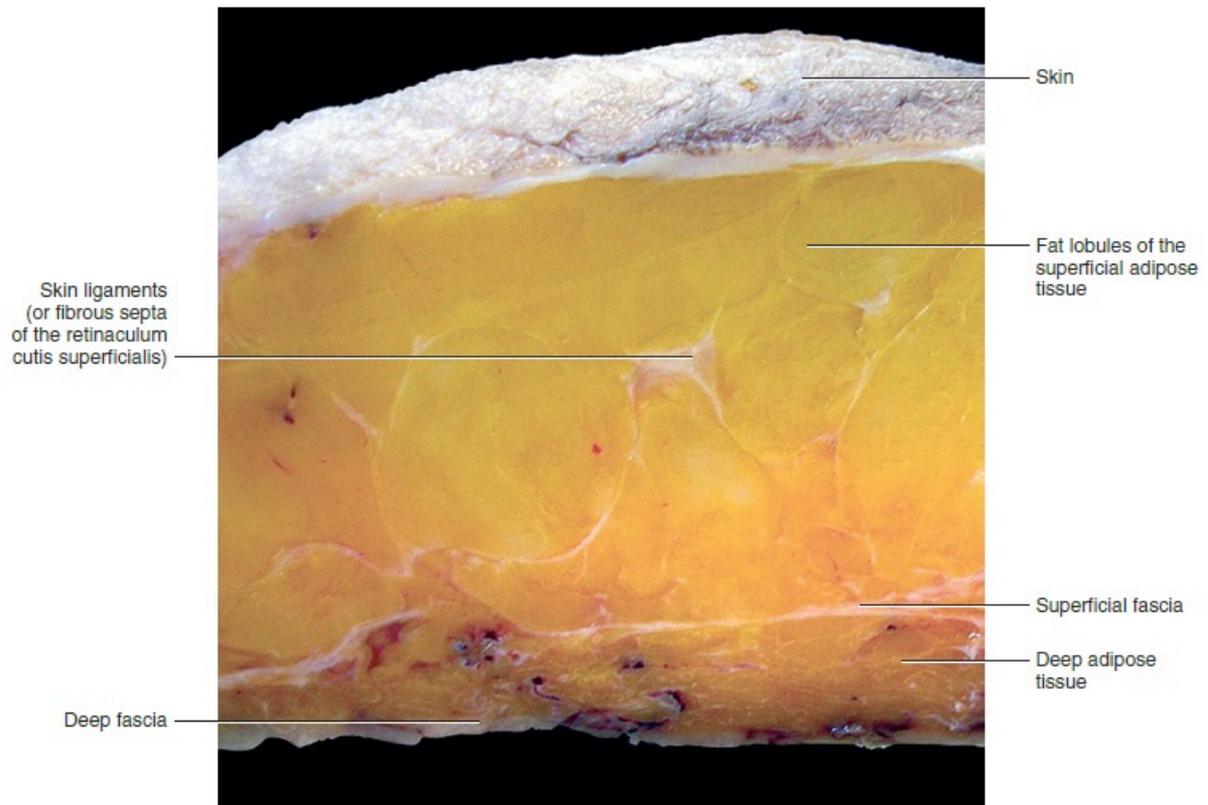


Figure 12 : Aspect macroscopique du TA sous-cutané de l'abdomen.
Notez la couche fibreuse (fascia superficiel) qui divise l'hypoderme en deux parties : le SAT et le DAT.
Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

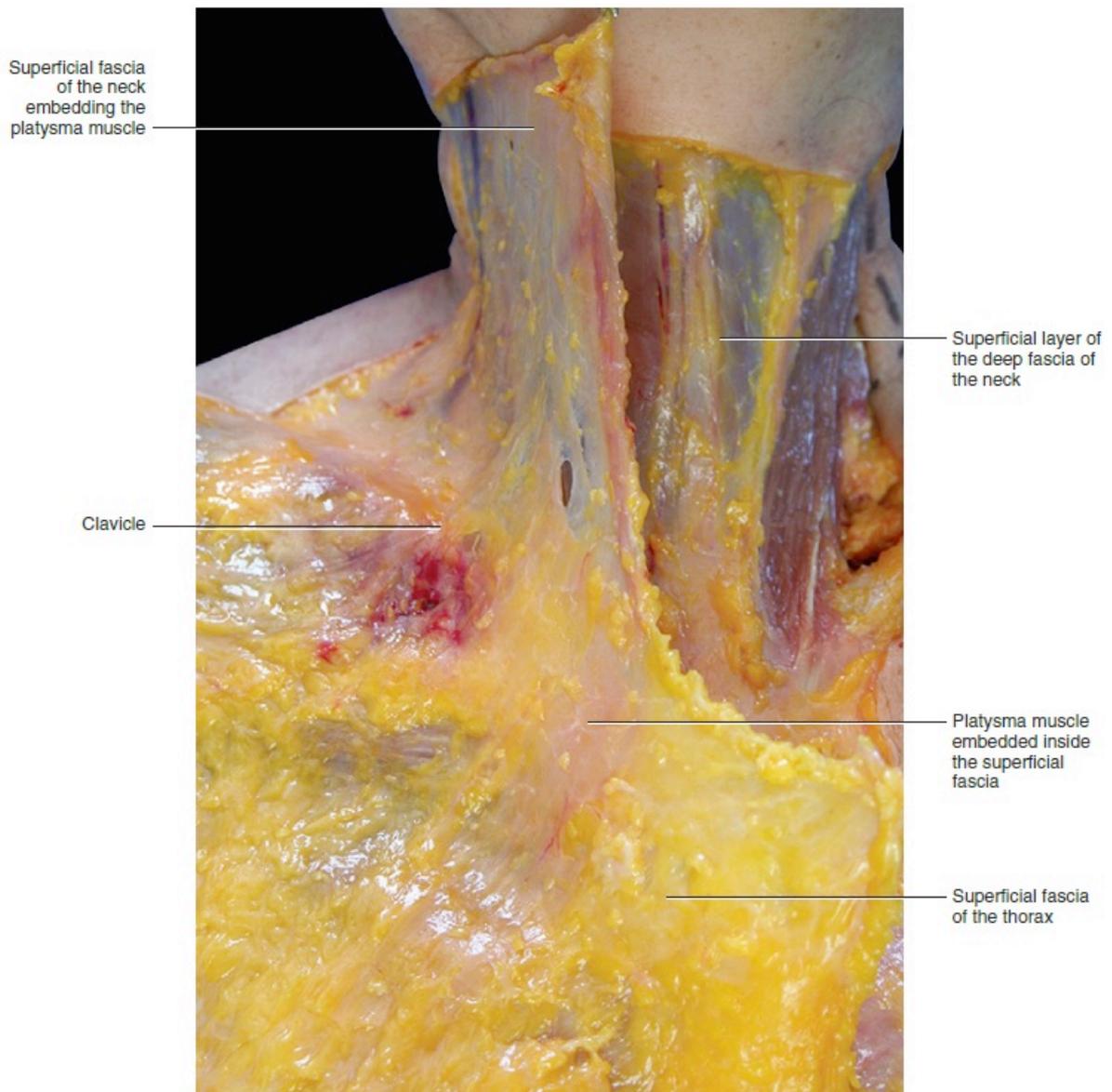


Figure 13 : Muscle platysma à l'intérieur de l'aponévrose superficielle.

Notez que l'aponévrose superficielle du cou se prolonge dans l'aponévrose superficielle du thorax. De même, le platysma ne s'arrête pas au cou, mais se poursuit dans le thorax.

Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

L'épaisseur du SAT est assez uniforme dans tout le tronc et présente généralement moins de variations selon la région que le DAT. Dans les extrémités, le SAT est plus épais dans les membres inférieurs que dans les membres supérieurs. Le SAT dans la paume de la main et la région plantaire du pied est mince et contient des rétinacula verticaux plus nombreux et plus forts. Par conséquent, la peau de ces zones adhère fortement aux plans plus profonds. Sur le dos de la main, une anatomie fasciale différente permet plus de mouvement de la peau par rapport aux plans sous-jacents car la retinacula cutis superficielle est mince.

L'épaisseur du SAT varie selon les sujets. Chez les sujets obèses, le SAT du tronc a une épaisseur moyenne de 17,2 mm (entre 6 et 35 mm), tandis que chez les sujets de poids normal l'épaisseur moyenne est de 3,7 mm (fourchette : 1-10 mm). Chez les sujets obèses, l'épaisseur

du SAT augmente de manière significative et progressivement de T10 à la tête fémorale, et chez les sujets minces, le SAT est uniforme. L'épaisseur de la *retinacula cutis superficialis* varie également selon la région du corps et le sujet. Par exemple, dans le tronc, la *retinacula cutis superficialis* est plus épaisse et plus résistante que dans le dos, donnant au SAT du *dorsum* une plus grande résistance par rapport au SAT de l'abdomen. Sterzi (Giuseppe Sterzi, 1910) a découvert que les ligaments cutanés de la main d'un ouvrier présentaient une épaisseur double ou triple par rapport aux septas de la main d'un sujet sédentaire. Sterzi décrit également des différences sexuelles dans le SAT : les femmes ont plus de cellules graisseuses dans le SAT, les ligaments cutanés sont plus minces et les lobules graisseux sont disposés en plusieurs couches.

Ces caractéristiques expliquent probablement pourquoi la cellulite (hernie de la graisse sous-cutanée dans le tissu conjonctif fibreux qui se manifeste topographiquement par un capitonnage cutané et une nodularité) est plus fréquente chez les femmes. Chez les personnes âgées, les lobules graisseux du SAT sont moins gonflés et les rétacula sont moins verticaux, reliant ainsi la peau au fascia superficiel avec une force diminuée.

Ces deux éléments sont responsables de la flaccidité du tissu superficiel avec l'âge. La partie sécrétoire des glandes sudoripares, les follicules pileux et les corpuscules de Pacini se trouvent dans le SAT. Habituellement, ces structures se trouvent à proximité des *retinacula cutis superficialis* (ligaments de la peau) qui offrent une protection contre l'étirement et des charges mécaniques.

I.1.7.2. Fascia superficiel (*fascia superficialis*)

Le fascia superficiel est une couche fibreuse de tissu conjonctif, formée de fibres de collagène peu serrées et entrelacées et lâches, mélangées à d'abondantes fibres élastiques (Figure 14). Il est homologue avec la couche musculaire cutanée (*panniculus carnosus*) que l'on trouve chez de nombreux mammifères inférieurs où l'on peut trouver une fine couche de muscle strié à l'intérieur ou juste en dessous du fascia superficiel, et servant à produire un mouvement local de la peau. Par exemple, un animal au pâturage peut faire bouger le *panniculus carnosus* pour contrer les tentatives d'un oiseau de se percher sur son dos, ou aussi pour chasser les mouches.

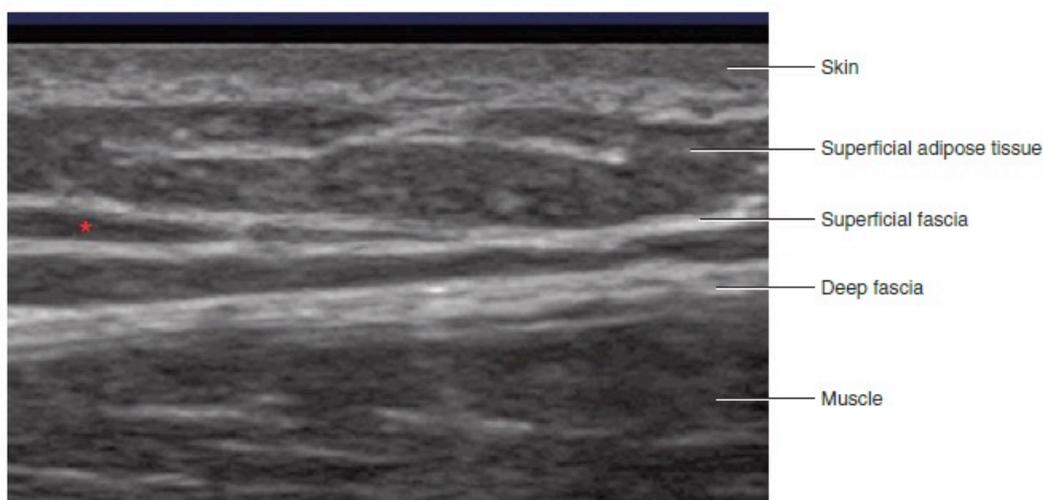


Figure 14 : Échographie de la hanche.

Les fascias superficiels et profonds sont clairement évaluable. Fibreux, ils apparaissent comme des couches blanches. L'aponévrose superficielle se divise en deux sous-couches, impliquant une partie du tissu adipeux.

Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

Cette couche musculaire est rare chez l'homme et lorsqu'on la trouve, elle prend une disposition structurelle musculaire précise principalement dans le cou (muscle platysma) (Figure 15), dans le visage (le SMAS ou système musculo-aponévrotique superficiel), dans la région anale (sphincter anal externe), et dans le scrotum (le muscle dartos). Des fibres musculaires isolées peuvent être trouvées dans tous les fascias superficiels. Le fascia superficiel est présent dans tout le corps, et, selon Abu-Hijleh (Abu-Hijleh et al., 2006), sa disposition et son épaisseur varient en fonction de la région du corps, de la surface corporelle et du sexe. Dans l'abdomen, le fascia superficiel présente une épaisseur moyenne de $847,4 \pm 295 \mu\text{m}$ et augmente dans une direction proximo-caudale, avec une valeur moyenne de $551 \mu\text{m}$ dans l'abdomen, une valeur moyenne de $551 \mu\text{m}$ dans l'épigastre et de $1045 \mu\text{m}$ dans l'hypogastre (Lancerotto et al., 2011). Il est plus épais dans les extrémités inférieures que dans les supérieures et sur la face postérieure plutôt que sur la face antérieure du corps.

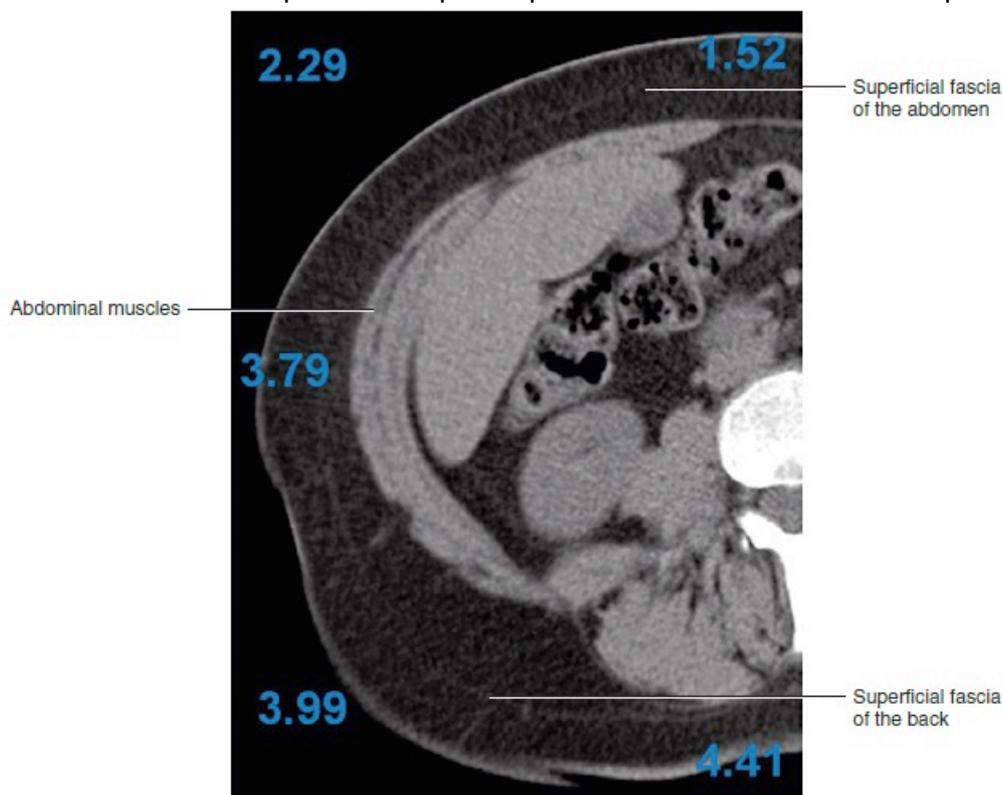


Figure 15 : Tomodensitométrie (TDM) de l'abdomen.

Le fascia superficiel est clairement visible au milieu de l'hypoderme. Il est possible d'évaluer la continuité entre le fascia superficiel de l'abdomen et du dos. Il est également possible de mesurer l'épaisseur de l'aponévrose superficielle, du SAT et du DAT aux différents niveaux. Les chiffres se réfèrent à l'épaisseur de l'aponévrose superficielle (mm).

Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

Abu-Hijleh et al (2006) ont constaté que l'épaisseur moyenne du fascia superficiel sur la face dorsale du pied, la face antérieure et postérieure de l'épaule, du pied, de la face antérieure de la cuisse et de la périphérie de la poitrine est significativement plus élevée chez les femmes

que chez les hommes. De plus, l'épaisseur moyenne du fascia superficiel de la face dorsale de la main et du bras ainsi que sur la face antérieure de la jambe est significativement plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Chez les obèses, le fascia superficiel est généralement rempli de cellules graisseuses et présente une augmentation d'épaisseur de 50%. Sterzi (1910) décrit le fascia superficiel comme plus épais et plus résistant chez les individus robustes aux muscles bien développés.

Chez l'homme, le fascia superficiel devient très fin aux extrémités distales des membres, et il est impossible de le séparer en tant que couche fibreuse distincte mais il est toujours possible de distinguer le SAT et le DAT. Chez les mammifères, comme le lapin par exemple, le panniculus carnosus est absent dans la partie distale des membres et seule une fine couche fibreuse continue, jusque dans le carpe et le tarse est présente. Ceci explique pourquoi il est si facile de dépouiller ces animaux, sauf les pattes, la queue, les oreilles et le pourtour du museau.

Histologiquement, le fascia superficiel est formé par un réseau de fibres de collagènes et élastiques disposées de façon irrégulière (Figure 16). Macroscopiquement, le fascia superficiel apparaît et peut être isolé comme une membrane bien définie, mais au microscope, sa structure est mieux décrite comme multilamellaire, ou comme un nid d'abeille très serré.

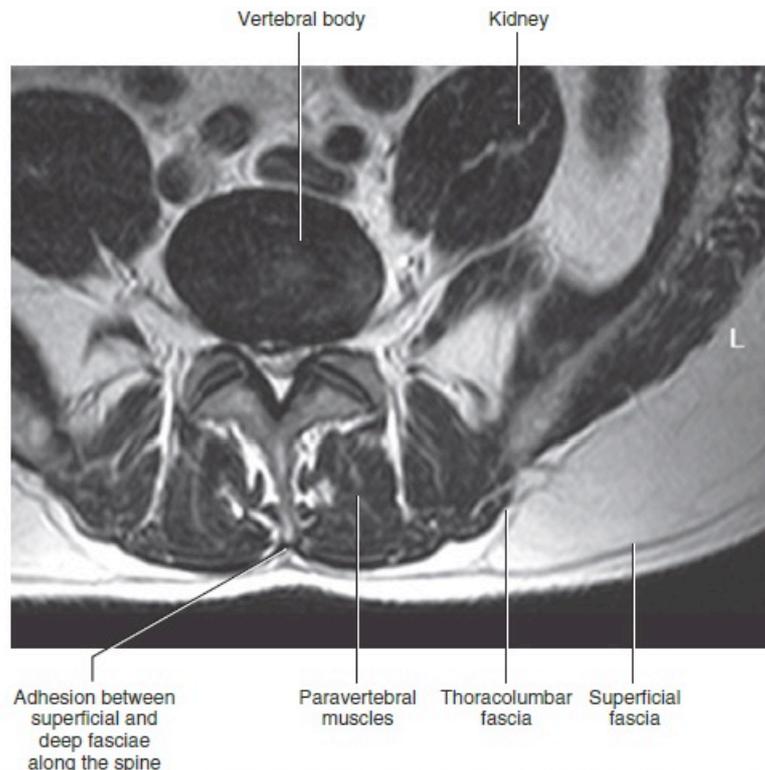


Figure 16 : IRM de la région lombaire.

Le fascia superficiel est clairement visible sous la forme d'une couche fibreuse (noire) au milieu du tissu adipeux sous-cutané (blanc). Il est difficile de visualiser le fascia thoraco-lombaire en raison de la faible quantité de tissu conjonctif lâche entre lui et les muscles sous-jacents.

Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

Les différentes sous-couches ont une épaisseur moyenne de $66,6 \pm 18,6 \mu\text{m}$ et on peut distinguer de nombreux points d'interconnexion entre les sous-couches. Des îlots irréguliers

de cellules graisseuses (épaisseur moyenne $83,87 \pm 72,3 \mu\text{m}$) peuvent être déposés entre les sous-couches de fibres de collagène.

Chez les jeunes, le fascia superficiel est très élastique permettant au tissu sous-cutané de s'adapter aux contraintes dans toutes les directions et de revenir ensuite à son état d'origine. Avec l'âge, le fascia superficiel et la retinacula cutis perdent leur élasticité. Ceci pourrait expliquer l'éventuelle ptose de la peau, la formation de rides et l'hypotonie générale du tissu sous-cutané. Sur les proéminences osseuses et au niveau de certains plis ligamentaires, le fascia superficiel adhère au fascia profond.

A l'intérieur du fascia superficiel, on observe de nombreuses fibres nerveuses et dans certaines régions, le fascia superficiel se divise, formant des compartiments spéciaux. Cela se produit notamment autour des principales veines sous-cutanées (Caggiati, 1999) et des vaisseaux lymphatiques. Les septas fibreux s'étendent de la tunique externe des parois des vaisseaux jusqu'au fascia superficiel.

Fonctionnellement, le fascia superficiel joue un rôle dans l'intégrité de la peau et soutient les tissus sous-cutanés, notamment les veines, en assurant leur perméabilité.

Le fascia superficiel ainsi que la retinacula cutis soutiennent et aident à organiser la position du tissu adipeux. Enfin, le fascia superficiel sépare la peau du système musculo-squelettique, permettant le glissement normal des muscles et de la peau l'un sur l'autre.

I.1.7.3. Le TA profond

En comparaison avec le SAT, le DAT est généralement formé par des septas fibreux relativement lâches, moins organisés et plus obliques (retinaculum cutis profundus) (Figure 17). Les lobules graisseux sont plus ovales et ont tendance à se déplacer (Figure 18 et Figure 19).

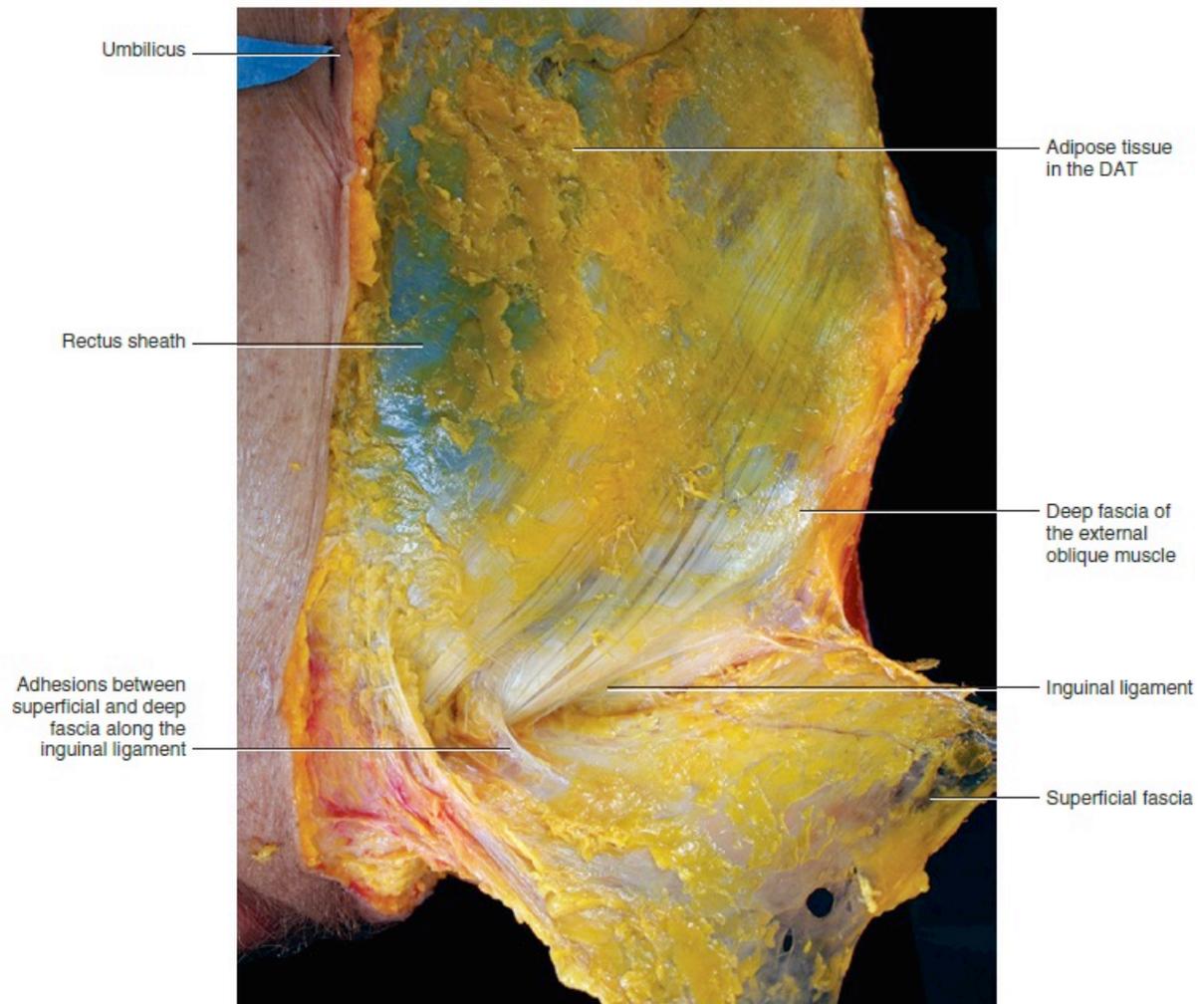


Figure 17 : Dissection de la région abdominale.

L'aponévrose superficielle a été détachée des plans sous-jacents pour montrer le DAT. Dans la région antérieure de l'abdomen, le DAT est effacé et les retinacula cutis sont moins nombreux et plus minces. Ceci permet un plan de glissement parfait entre l'aponévrose superficielle et l'aponévrose profonde. Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

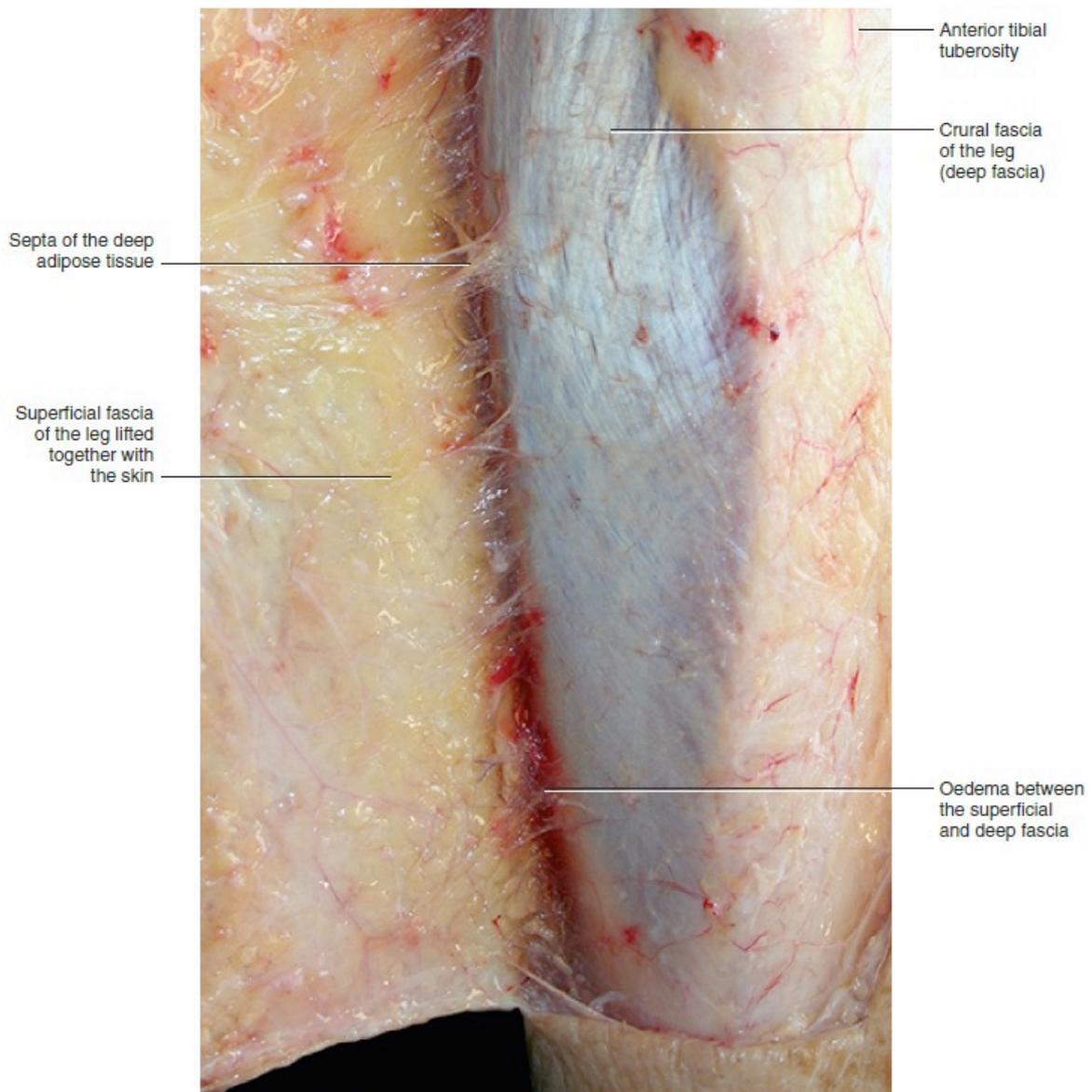


Figure 18 : Dissection de la jambe.

Les septas de la rétinacula cutis profundis sont présents. Chez ce sujet, un œdème est évident. Il implique surtout le fascia superficiel et le DAT, provoquant leur fibrose.

Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

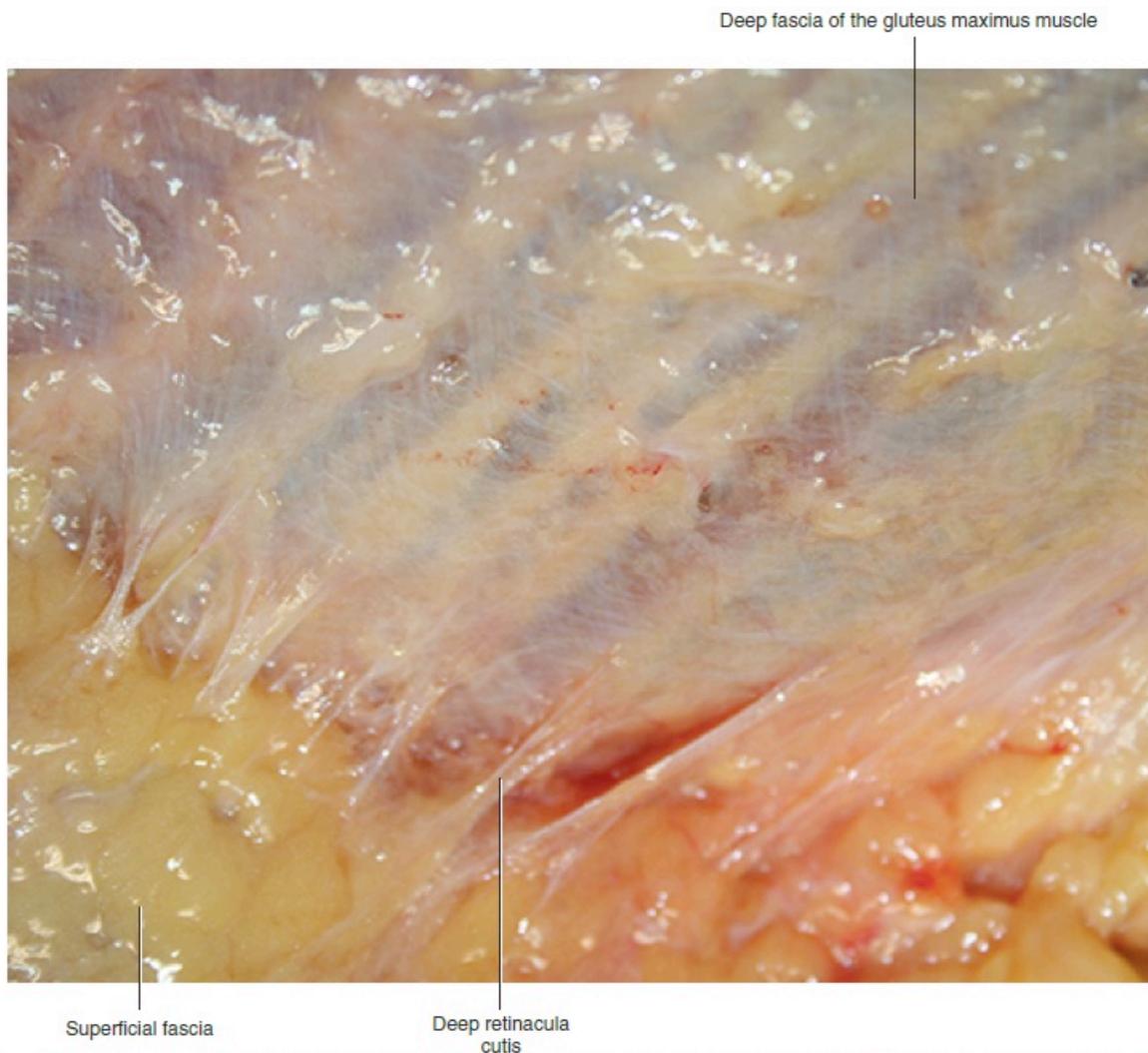


Figure 19 : Dissection de la région glutéale.

Adhérences transversales entre le fascia superficiel et le fascia profond au niveau du pli fessier. À ce niveau, la peau adhère aux plans profonds. Lorsque la peau est étirée, la tension est transmise aux muscles sous-jacents, grâce à l'adhérence de l'aponévrose superficielle avec les plans sous-jacents. Source : Stecco Carla, Hammer Warren and al. Functional atlas of the human fascial system. 2015.

Les propriétés élastiques du DAT sont bonnes. Ces éléments peuvent expliquer comment le fascia superficiel glisse sur le fascia profond. Selon Markman et Barton (Markman & Barton, 1987), le DAT varie significativement en épaisseur et en teneur en graisse dans les différentes régions du corps. En général, le DAT tend à être plus fin dans la région antérieure du tronc et présente l'épaisseur maximale au niveau des flancs, où l'on trouve une "poche d'accumulation de graisse". Dans certaines régions, comme au niveau des flancs, le DAT peut contenir encore plus de tissu adipeux que le SAT. Sous les muscles mimétiques, seul un tissu conjonctif lâche contenant très peu d'adipocytes est présent. Le DAT varie en fonction du sujet. Chez le sujet obèse, le DAT du tronc a une épaisseur moyenne de 18,5 mm (fourchette 10-35 mm), et chez les sujets de poids normal, elle est de 3,14 mm (intervalle 0,5-8 mm). Chez les sujets minces, l'épaisseur du DAT augmente sensiblement de T10 à la tête fémorale.

Dans certaines régions, le DAT est soit absent, soit très mince, tandis que les septas du retinaculum cutis profonds s'épaississent. Ainsi, le fascia superficiel s'ancre au fascia

profond. Ces points d'adhésion sont constants et peuvent être cartographiés. Les adhérences peuvent être organisées de deux façons pour former des lignes horizontales et verticales. Ces lignes d'adhérence sont similaires aux ceintures décrites par Ida Rolf (Schultz et al., 1996). La cartographie de toutes les adhérences dans le corps révèle des compartiments bien définis à l'intérieur du tissu adipeux profond, appelés "quadrants". Ces quadrants semblent correspondre aux distributions des vaisseaux et des nerfs superficiels et également au drainage lymphatique. Cela suggère une organisation précise du tissu sous-cutané qui définit la distribution des vaisseaux et des nerfs. Les bourses séreuses sous-cutanées et les glandes lymphatiques se trouvent dans le DAT.

Comprendre l'anatomie topographique des couches sous-cutanées peut aider à expliquer les déformations et fournir la base anatomique pour une correction chirurgicale. Selon Markman et Barton (Markman & Barton, 1987) l'épaisseur du SAT de chaque individu est relativement constante dans tout le corps. Le tissu adipeux profond varie cependant de manière significative en fonction de la région anatomique. Ils ont suggéré que l'épaisseur du SAT est en corrélation avec le "test du pincement" qui est couramment utilisé pour évaluer cliniquement la profondeur d'insertion de la canule lors d'une lipoaspiration. Selon Chopra (Chopra et al., 2011), le chirurgien doit rester sous l'aponévrose superficielle afin d'éviter les capitons postopératoires, les ondulations, la sur-résection et les autres irrégularités de l'aspiration. Le remodelage corporel assisté par aspiration doit viser à éliminer la couche profonde du tissu sous-cutané sans perturber le SAT et le fascia superficiel.

De façon similaire, selon Joseph et Remus (2009) (Hunstad & Repta, 2009), la préservation du fascia superficiel est importante dans l'abdominoplastie de la partie inférieure de l'abdomen. Après la résection des tissus mous, une tension est placée sur le fascia superficiel qui permet de fermer la peau avec une tension relativement moindre et sans compromission vasculaire. La préservation de l'aponévrose superficielle pourrait être considérée comme un moyen de réduire les complications associées à l'abdominoplastie conventionnelle.

I.2. La vascularisation de la peau

Dans la peau, le derme et l'hypoderme sont abondamment vascularisés grâce à un réseau sanguin hautement structuré composé d'artérioles de moyen et petit calibre, de capillaires et de veinules. En revanche, l'épiderme, à l'instar de tous les épithéliums, n'est pas vascularisé en lui-même ; il reçoit sa nutrition par imbibition à partir des réseaux capillaires situés dans les papilles dermiques. De plus, le système lymphatique se trouve dans le derme et l'hypoderme, mais demeure absent de l'épiderme (Braverman, 2000a ; Skobe & Detmar, 2000).

I.2.1. La microcirculation sanguine cutanée

I.2.1.1. Organisation

Dans la partie profonde de l'hypoderme, les artères se dirigent vers la surface cutanée et créent un premier réseau anastomotique qui s'étend parallèlement à la surface de la peau. De ce réseau, des branches perpendiculaires émergent, pénétrant l'hypoderme (connues sous le nom d'artères perforantes). Ces branches émettent des ramifications collatérales destinées à irriguer les lobules graisseux ainsi que les structures annexes, telles que les glandes sudoripares et les follicules pileux. Ces ramifications se rejoignent dans la partie profonde du derme réticulaire pour former un deuxième réseau anastomotique dont les mailles suivent le même parallélisme que le premier réseau et la surface cutanée. À partir de ce deuxième

réseau, des artérioles, appelées "artérioles en candélabre", partent perpendiculairement, fournissant des branches aux annexes cutanées et au derme réticulaire. Ces artérioles en candélabre se rejoignent pour former un troisième réseau à la jonction entre le derme papillaire et le derme réticulaire. De ce dernier réseau, émergent des capillaires qui atteignent les papilles dermiques. Le réseau veineux suit un schéma similaire à celui du réseau artériel. Des connexions artério-veineuses, avec ou sans glomus (structures spécialisées de régulation thermique), sont présentes dans la région des ongles et dans les régions palmoplantaires (mains, doigts, pieds et orteils). Ces connexions jouent un rôle essentiel dans la régulation de la température corporelle (thermorégulation) (Figure 20).

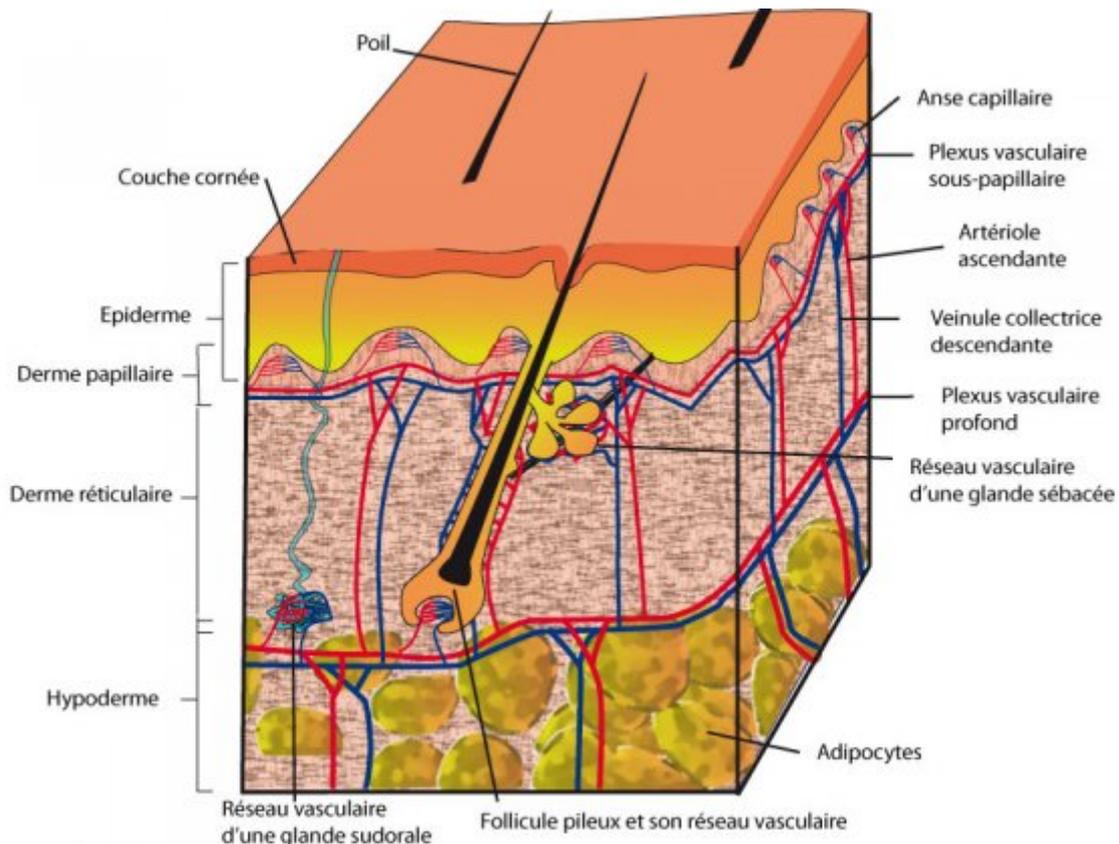


Figure 20 : Représentation schématique de l'organisation de la microcirculation cutanée.
Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

I.2.1.2. Structures des différents composants

Dans le derme, les artérioles affichent une lumière circulaire avec un diamètre de 20 à 30 μm . Leur paroi est composée de trois couches distinctes : l'intima, la média et l'adventice. L'intima est constituée d'une couche de cellules endothéliales reposant sur une assise conjonctive élastique. La média comprend deux couches de fibres musculaires lisses disposées longitudinalement et en anneau concentrique, avec une épaisseur plus prononcée dans les vaisseaux profonds. L'adventice, quant à elle, est la couche externe constituée de fibres de collagène, parfois associée à une lame élastique externe.

Les artérioles principales présentent une paroi avec une couche musculaire lisse particulièrement épaisse, intensément innervée par des fibres nerveuses. Ces fibres

nerveuses forment un réseau périvasculaire avec des afférences aboutissant à la limite de la média et de l'adventice. Cette particularité signifie que c'est toute la tunique musculaire qui réagit à un stimulus, et non chaque cellule musculaire lisse individuellement. Ce type de muscle lisse est appelé "unitaire".

Les veines et veinules partagent une structure similaire à celle des artères et artérioles, mais avec une lumière plus large et une paroi musculaire plus fine. On y trouve parfois des valves. L'assise conjonctive élastique de l'intima peut être plus mince ou absente, tandis que l'adventice est plus épaisse et contient moins de fibres élastiques. Les artérioles et veinules du derme profond et de l'hypoderme sont plus grandes que celles du plexus superficiel, avec des diamètres respectifs de 50 à 100 μm par rapport à 25 μm , et une paroi plus épaisse de 10 à 15 μm par rapport à 4 à 5 μm . Les cellules musculaires lisses y sont également plus abondantes.

Les vaisseaux capillaires ont un diamètre de 5 à 8 μm et une longueur moyenne de 0,5 à 1 mm (Figure 21). Ils constituent le site des échanges entre le sang et les tissus. Ils succèdent aux artérioles de manière progressive. Les capillaires dermiques se distinguent des artérioles et des veinules post-capillaires par la structure de leur paroi. La couche de fibres musculaires de la média devient discontinue voire disparaît. L'adventice disparaît également. Les capillaires dermiques sont composés d'une seule couche de cellules endothéliales fenêtrées et d'une couche de péricytes en discontinuité entourée par une membrane basale. Les veinules post-capillaires, drainant de 4 à 5 capillaires, ont un diamètre compris entre 8 et 30 μm , légèrement plus grand que celui des capillaires. Le passage du capillaire à la veinule se caractérise par l'apparition de cellules musculaires lisses dans la paroi. Les veinules sont riches en fibres conjonctives et élastiques, ce qui leur confère une grande distensibilité et en fait un réservoir à capacité variable capable de réguler le volume sanguin dans la microcirculation.

Les capillaires forment un réseau complexe entre les artérioles et les veinules, connu sous le nom de lit capillaire. Ce réseau comporte des anastomoses artério-veineuses qui agissent comme des courts-circuits permettant au sang de passer directement de l'artériole à la veinule sans traverser le circuit capillaire, grâce à des sphincters précapillaires. Ces anastomoses artério-veineuses sont particulièrement présentes au niveau du nez, des oreilles, de la paume des mains, de la plante des pieds, des doigts et du lit de l'ongle. Elles jouent un rôle crucial dans la régulation de la température corporelle en permettant une augmentation du flux sanguin cutané et, par conséquent, une augmentation de la perte de chaleur à la surface de la peau (Figure 22).

Au niveau ultrastructural, les cellules endothéliales des artérioles les plus importantes du derme moyen et profond présentent des faisceaux de filaments intermédiaires de vimentine et de filaments d'actine. Elles renferment également des organites spécifiques appelés corps de Weibel-Palade. Ces organites, en forme de cigare et denses aux électrons, jouent un rôle dans le stockage du facteur de coagulation de von Willebrand. Ils sont absents dans les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, à l'exception des plus larges. Les cellules endothéliales des capillaires présentent des pores entre elles, facilitant le passage régulé du liquide intravasculaire dans les tissus. Les péricytes, entourés par une membrane basale, ont des prolongements dendritiques et contiennent des myofilaments.

La paroi des capillaires, autrefois considérée comme un simple filtre, est maintenant reconnue pour contenir des complexes actine-myosine qui permettent aux cellules endothéliales de se contracter en réponse à divers stimuli tels que l'histamine. Ceci élargit les interstices entre les cellules de la paroi des capillaires, entraînant une fuite plasmatique. Cette réaction, associée à la vasodilatation, est responsable de la rougeur et de l'œdème observés lors d'épisodes inflammatoires.

En conditions de repos, le volume sanguin cutané représente plus de 9 % du volume sanguin total, pouvant atteindre 12 % en période de vasodilatation. Le débit sanguin cutané global varie, étant de 0,5 L/min au repos, de 0,9 L/min lors d'un exercice modéré et pouvant atteindre 7 L/min lors d'un exercice intense et en présence de températures élevées.

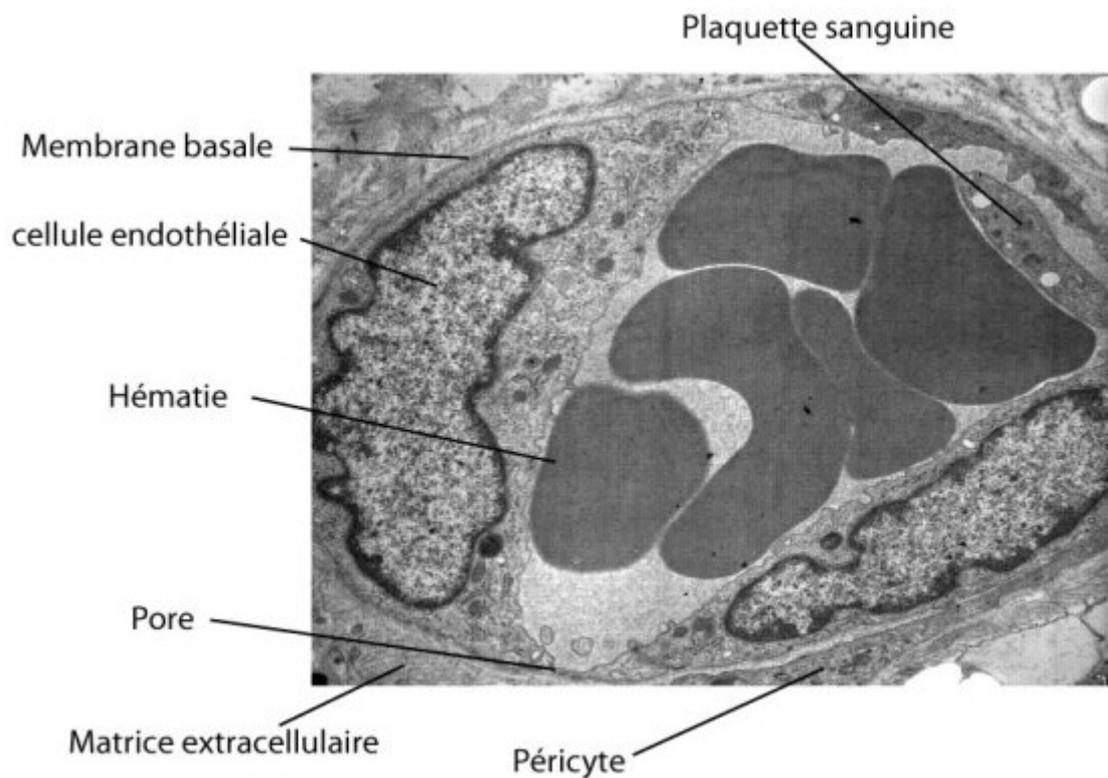


Figure 21 : Vue en microscopie électronique à transmission d'un capillaire sanguin en coupe transversale dans une peau humaine.

Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

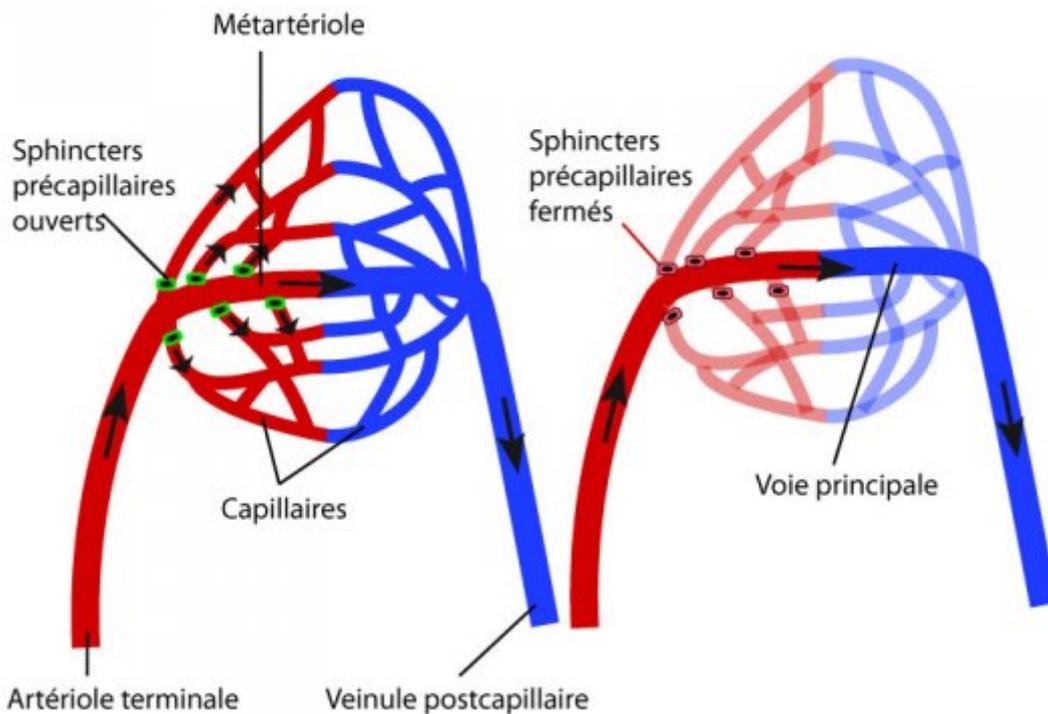


Figure 22 : Représentation schématique d'une anse capillaire équipée de sphincters précapillaires et de leur fonction.

A gauche, les sphincters sont ouverts et le sang emprunte l'ensemble des capillaires sanguins. A droite les sphincters sont fermés et la circulation du sang se limite à la métartériole.

Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

I.2.1.3. Fonctions

La micro-circulation cutanée remplit quatre fonctions principales cruciales pour le bon fonctionnement de la peau :

1. **Nutrition cellulaire** : Les vaisseaux sanguins fournissent les éléments nutritifs nécessaires aux cellules de l'épiderme, du derme, de l'hypoderme et des annexes cutanées, contribuant ainsi à leur métabolisme et à leur survie.
2. **Régulation de la pression artérielle** : La micro-circulation cutanée joue un rôle dans le maintien de la pression artérielle globale par le biais d'un tonus vasoconstricteur. En rétrécissant ou élargissant les vaisseaux, la peau peut aider à réguler la pression artérielle systémique.
3. **Tolérance à l'ischémie prolongée** : Les vaisseaux cutanés permettent à la peau de supporter les périodes prolongées d'ischémie (privation d'oxygène) causées par le poids du corps ou d'autres facteurs. Cette capacité contribue à préserver l'intégrité et la fonction de la peau.
4. **Réactivité vasomotrice pour la thermorégulation** : La micro-circulation cutanée est essentielle pour la régulation de la température corporelle. En modulant le flux sanguin

vers la peau, les vaisseaux sanguins contribuent à la dissipation de la chaleur corporelle, jouant un rôle crucial dans la thermorégulation.

En outre, il convient de noter que bien que le flux sanguin cutané au repos soit supérieur aux besoins métaboliques réels, cela s'explique par les fonctions importantes de tolérance à l'ischémie et de thermorégulation. La composition du sang dans les vaisseaux cutanés est similaire à celle du sang artériel, reflétant ainsi son rôle vital dans l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules cutanées.

Les vaisseaux cutanés, qui représentent plus de 9 % du volume vasculaire total, voire une proportion plus élevée de la micro-circulation, exercent également des fonctions endothéliales conventionnelles. Cela inclut des rôles dans la coagulation sanguine, la fibrinolyse, ainsi que la captation et l'élimination des complexes immuns, contribuant ainsi au maintien de la santé et de l'homéostasie cutanée.

I.2.2. Le système lymphatique

I.2.2.1. Structure du système lymphatique cutané

Le système lymphatique constitue un réseau de vaisseaux unidirectionnels qui facilitent le retour du liquide interstitiel vers la circulation sanguine. Dans la peau, les capillaires lymphatiques naissent sous forme d'anses en cul-de-sac au sommet des papilles dermiques, suivant le tracé du réseau veineux pour finalement converger et former des canaux collecteurs. Ces canaux collecteurs, par des confluences successives, se rejoignent pour former les canaux lymphatiques principaux qui se déversent dans les grosses veines près de l'oreillette droite, à la base du cou.

Les capillaires lymphatiques se distinguent des capillaires sanguins par plusieurs caractéristiques essentielles :

- Le diamètre des capillaires lymphatiques est plus large (pouvant atteindre jusqu'à 60 μm) et plus irrégulier que celui des capillaires sanguins (17-22 μm).
- Les cellules endothéliales des capillaires lymphatiques présentent un cytoplasme moins développé que celles des capillaires sanguins, sauf autour du noyau. Par exemple, dans le plexus sous-épidermique, l'épaisseur de la paroi des capillaires lymphatiques est d'environ 50-100 nm, tandis que celle des veinules post-capillaires est de 3,5-5 nm.
- Les cellules endothéliales des capillaires lymphatiques contiennent de nombreux filaments cytoplasmiques orientés longitudinalement, conférant à ces cellules une fonction contractile.
- Les capillaires lymphatiques ne sont pas entourés par une membrane basale ou celle-ci est peu développée.
- Les péricytes, présents dans les capillaires sanguins, sont absents des capillaires lymphatiques.
- Les capillaires lymphatiques présentent une densité de jonctions serrées et adhérentes plus faible.

Les parois des capillaires lymphatiques sont constituées de cellules endothéliales qui se chevauchent légèrement, formant des valves dont les bords ne sont pas fixés aux structures tissulaires environnantes. Ces valves s'ouvrent sous la pression du liquide interstitiel, permettant ainsi au liquide de pénétrer dans les capillaires lymphatiques. À ce stade, le liquide interstitiel est appelé "lymphe". L'entrée de la lymphe provoque une élévation de la pression à l'intérieur du vaisseau, ce qui induit la fermeture des valves, empêchant ainsi la fuite de la lymphe.

La progression de la lymphe à travers les vaisseaux lymphatiques est facilitée par plusieurs mécanismes. Les cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux lymphatiques se contractent de manière spontanée lorsque le vaisseau est distendu par la lymphe. Dans certaines régions du corps, notamment les membres, les contractions musculaires entraînent la compression des vaisseaux lymphatiques. De plus, les canaux lymphatiques sont équipés de valves anti-reflux, garantissant que la lymphe poussée par les mécanismes précédemment mentionnés ne peut avancer que dans une seule direction, vers les grosses veines.

I.2.2.2. Les fonctions du système lymphatique

Le système lymphatique exerce un rôle vital dans la régulation de la pression du liquide interstitiel. En conditions normales, il permet le drainage d'une quantité légèrement supérieure de liquide interstitiel hors des capillaires par rapport à ce qu'il en réabsorbe (environ 3 litres par jour). L'excédent de liquide filtré est ainsi collecté par le système lymphatique.

Chaque jour, environ la moitié des protéines circulantes s'échappent des vaisseaux sanguins sans pouvoir être réabsorbées par ceux-ci. Ces protéines sont captées par les vaisseaux lymphatiques. Le système lymphatique joue également un rôle dans l'élimination des cellules, protéines et déchets du tissu cutané.

En plus de ces fonctions, le système lymphatique est un acteur clé de la défense immunitaire de l'organisme. La lymphe traverse les ganglions lymphatiques, où les cellules immunitaires prolifèrent et se différencient en réponse à la présence d'antigènes. La lymphe transporte les antigènes ainsi que les cellules présentatrices d'antigène (comme les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques, par exemple) de la peau vers les cellules immunitaires présentes dans les ganglions lymphatiques. Cette action contribue à déclencher des réponses immunitaires spécifiques en présence de menaces potentielles.

I.3. L'innervation de la peau

I.3.1. Organisation générale du système nerveux

Le système nerveux est constitué de deux composants principaux : le système nerveux central et le système nerveux périphérique. Le système nerveux central comprend l'encéphale, la moelle épinière et la rétine, tandis que le système nerveux périphérique englobe les nerfs qui permettent la circulation de l'information entre le système nerveux central et le reste du corps, c'est-à-dire la périphérie.

Le système nerveux périphérique se divise en deux catégories de voies : les voies afférentes, également appelées sensibles, qui transportent l'information vers le système nerveux central et renseignent ce dernier sur les conditions extérieures et internes de l'organisme, et les voies

efférentes, ou motrices, qui transmettent les signaux émis par le système nerveux aux organes effecteurs, principalement les muscles et les glandes.

Les voies efférentes sont classées en deux types distincts : le système nerveux somatique, qui est sous contrôle volontaire et innervant les muscles squelettiques, et le système nerveux autonome, qui échappe au contrôle volontaire. Ce dernier innerve le cœur, les muscles lisses, la majorité des glandes exocrines et quelques glandes endocrines, et assure la régulation des fonctions viscérales telles que le rythme cardiaque, la respiration, la transpiration, la salivation, la digestion, la taille des pupilles et l'érection sexuelle. Le système nerveux autonome est traditionnellement subdivisé en deux sous-systèmes distincts : le système nerveux parasympathique et le système nerveux sympathique (Abraira & Ginty, 2013 ; Braverman, 2000b ; Green, 2004 ; Lamotte et al., n.d. ; Lechner & Lewin, n.d. ; Potenziari & Udem, n.d. ; Zimmerman et al., 2015).

I.3.2. Le système nerveux cutané

Le système nerveux cutané est une composante du système nerveux périphérique qui présente une complexité et une richesse particulières. Il englobe à la fois une voie afférente (sensitive) et une voie efférente (motrice), assurant l'innervation des trois compartiments de la peau : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (à l'exception de la couche cornée). En tant qu'organe en contact direct avec l'environnement externe, la peau joue un rôle majeur dans la perception sensorielle. En effet, la peau constitue le principal lieu d'interaction entre l'organisme et son environnement, ce qui fait du système nerveux cutané un récepteur et un répondeur constants à une diversité de stimuli, qu'ils soient physiques (thermiques, mécaniques, électriques, rayonnements UV), chimiques, ou même des signaux indirects générés par des allergènes, des agents microbiologiques, des traumatismes ou une inflammation. Les fibres nerveuses cutanées peuvent également réagir aux stimuli issus de la circulation sanguine ou induits par des stress émotionnels.

Dans la peau, sont présentes uniquement les terminaisons nerveuses de neurones (bipolaires) dont les corps cellulaires se situent dans des ganglions rachidiens (Figure 23).

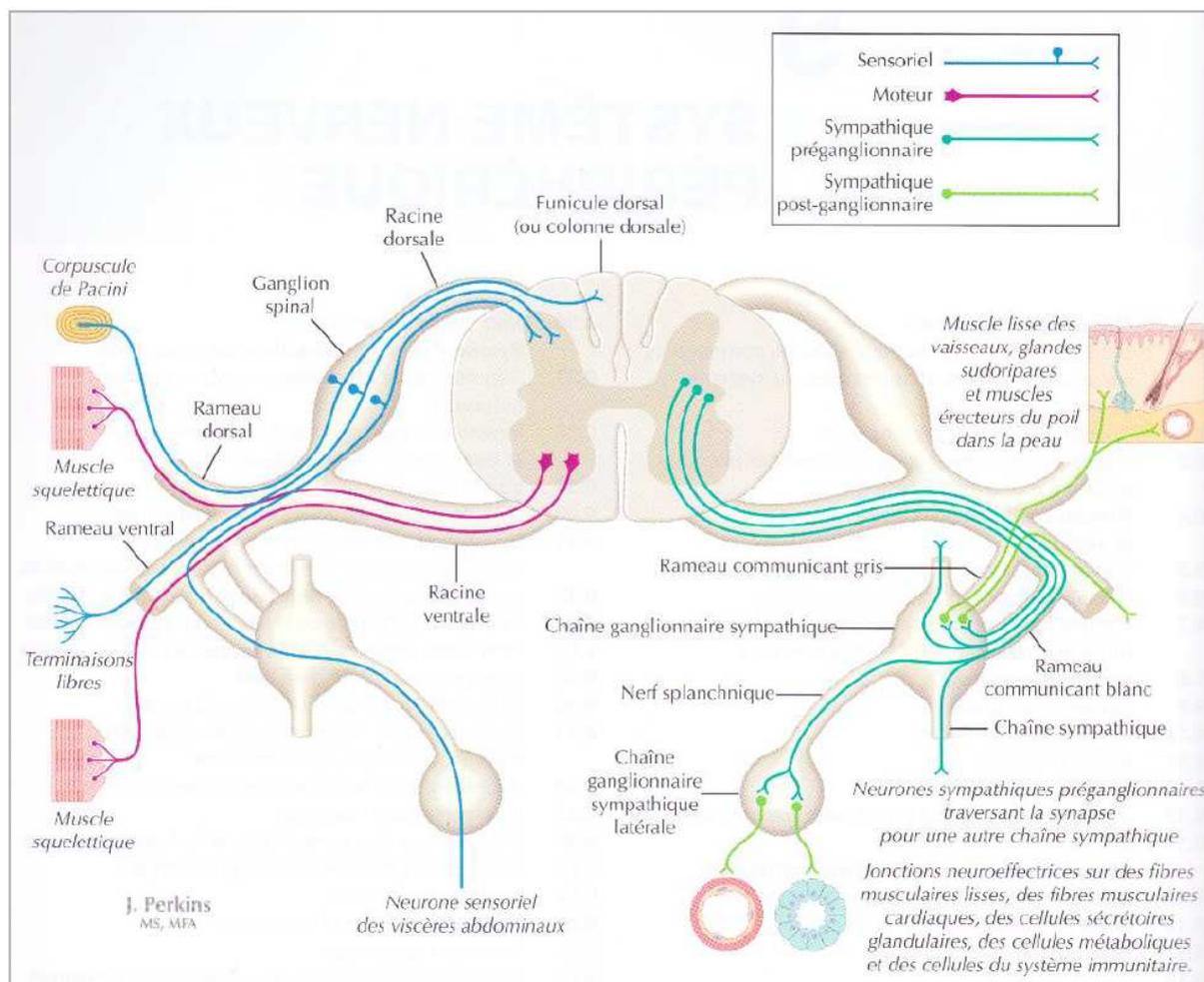


Figure 23 : Moelle : composants sensoriels, moteurs et autonomes du système nerveux périphériques. Source : *Atlas de Neurosciences humaines de Netter 2e édition*, 2011, Felten & Shetty (Felten et al., 2011)

Le système nerveux central peut influencer de multiples fonctions au sein de la peau, soit directement par les fibres nerveuses efférentes ou par l'intermédiaire de médiateurs chimiques, soit indirectement en agissant sur les cellules immunitaires ou les glandes surrénales. Ces fonctions incluent la régulation de la vasomotricité, de la thermorégulation, de l'érection pileuse, de la fonction barrière, de la sécrétion des glandes et des cellules, de la croissance et de la différenciation des tissus, mais aussi des processus tels que la cicatrisation, la réponse immunitaire et l'inflammation.

Des interactions étroites ont été identifiées entre les fibres nerveuses et les cellules cutanées. Les fibres nerveuses de la peau produisent des neuromédiateurs ((substance P, *vaso-active intestinal peptide* (VIP), somatostatine, *calcitonin-gene related peptide* (CGRP), *gastrin-releasing peptide* (GRP), neuropeptide Y, peptide histidine-isoleucine (PHI), neurotensine, neurokinines A et B, bradykinine, acétylcholine, catécholamines, endorphines et enképhalines) et des neurohormones ((prolactine, mélanotropine (MSH) ou corticotropine (ACTH)) qui jouent un rôle important dans la régulation des processus cutanés. Les cellules de la peau ainsi que les cellules immunitaires en transit dans la peau peuvent également produire ces neuromédiateurs et exprimer des récepteurs sensibles à leur action.

De cette complexité découle le concept de système neuro-endocrino-immuno-cutané (SNEIC), englobant les cellules cutanées, les composants du système nerveux et les éléments du système immunitaire présents dans la peau. Les grandes fonctions cutanées, telles que la fonction barrière, la thermorégulation et la perception sensorielle, seraient sous le contrôle de ce système. Ce concept permet de mieux comprendre l'influence du psychisme sur le maintien de l'homéostasie cutanée ainsi que sur l'apparition de troubles dermatologiques tels que le psoriasis ou l'eczéma.

À l'origine, les nerfs cutanés étaient classés en deux catégories : les efférents, responsables des fonctions eccrines, du flux sanguin et de l'érection pileuse, et les afférents, transmettant les informations sensorielles de l'environnement extérieur au système nerveux central. Cependant, il est rapidement apparu que le système nerveux sensoriel cutané ne se contente pas seulement de transmettre des informations, mais qu'il joue également un rôle effecteur dans les fonctions cutanées par le biais d'une action neuro-sécrétoire efférente au niveau de ses terminaisons.

I.3.3. Le système nerveux cutané autonome

Dans la peau, les fibres nerveuses du système nerveux autonome proviennent principalement des neurones sympathiques cholinergiques et, dans une moindre mesure, des neurones parasympathiques cholinergiques, principalement pour la région du visage. Bien que constituant une minorité des fibres nerveuses cutanées, elles sont présentes dans le derme où elles fournissent l'innervation des vaisseaux sanguins, des anastomoses artério-veineuses, des vaisseaux lymphatiques, des muscles érecteurs du poil, des glandes apocrines, des glandes eccrines et des follicules pileux.

Le système nerveux autonome cutané joue un rôle crucial dans la régulation de plusieurs fonctions, notamment la sudation des glandes sudoripares, la modulation de la vasomotricité, le contrôle du flux sanguin et, par extension, dans la thermorégulation. L'acétylcholine se présente comme un régulateur essentiel de la sudation. Il est intéressant de noter que les nerfs qui innervent les glandes sébacées chez les adultes expriment également toutes les protéines nécessaires pour une régulation complète via le système noradrénergique. Parmi ces protéines figurent la tyrosine hydroxylase, l'*aromatic amino acid decarboxylase*, la *dopamine b-hydroxylase* et le *vesicular monoamine transporter VMAT2*.

I.3.4. Le système nerveux cutané sensoriel

I.3.4.1. Les différents types de sensibilité

La perception sensorielle se divise en deux catégories principales : la "sensibilité générale" ou somesthésie, et la perception fournie par des organes sensoriels spécifiques comme la vision, l'audition, le goût et l'odorat.

La sensibilité générale se subdivise en deux types : la somesthésie et l'intéroception. La somesthésie englobe la sensibilité somatique et la sensibilité extéroceptive cutanée, ainsi que la sensibilité proprioceptive liée aux récepteurs musculaires et articulaires, qui permet de percevoir la position et les mouvements du corps. L'intéroception, quant à elle, fournit des

informations sur l'état des organes internes et les variations physico-chimiques de l'environnement interne.

Dans le cadre de la sensibilité cutanée, on peut distinguer trois modalités distinctes : la sensibilité mécanique, qui permet de percevoir les sensations tactiles et de pression, la sensibilité thermique, qui permet de ressentir les variations de température, et enfin la sensibilité douloureuse, également appelée nociception, qui permet de détecter les stimuli nocifs et de ressentir la douleur.

I.3.4.2. Les différents types de fibres nerveuses et de récepteurs cutanés

Les sensations cutanées sont transmises grâce à des récepteurs spécifiques situés dans la peau, qui sont ensuite relayées par un réseau de fibres sensorielles, comprenant des fibres myélinisées et non myélinisées.

Différents types de récepteurs ont été identifiés dans la peau pour transmettre des sensations spécifiques (Figure 24) :

1. Récepteurs mécaniques :

- **Terminaisons libres** : Ce sont des récepteurs présents dans tout le derme et l'épiderme qui répondent à une variété de stimuli mécaniques, thermiques et chimiques. Ils sont responsables de la sensibilité à la douleur, à la température et au toucher.
- **Disques de Merkel** : Situés dans l'épiderme, principalement dans les zones de pression, ces récepteurs jouent un rôle dans la sensibilité tactile fine et le toucher discriminatif.
- **Corpuscules de Meissner** : Présents dans les couches supérieures du derme, ces récepteurs sont responsables de la sensibilité à la pression légère et au toucher fin.
- **Corpuscules de Pacini** : Situés en profondeur dans le derme, ces récepteurs détectent les vibrations et les pressions profondes.
- **Corpuscules de Ruffini** : Situés en profondeur dans le derme, ils sont sensibles à l'étirement de la peau et contribuent à la perception de la pression constante.

2. **Thermorécepteurs** : Ces récepteurs détectent les variations de température de la peau, permettant de percevoir les sensations de chaud et de froid.

3. **Nocicepteurs** : Ce sont les récepteurs de la douleur. Ils détectent les stimuli nocifs et envoient des signaux au système nerveux pour signaler la douleur.

Les nerfs sensoriels innervent les trois couches de la peau : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Ils sont regroupés en quatre catégories en fonction de leur vitesse de conduction (Figure 2 de la revue parue dans *Advances in Wound Care*, Laloze, Fiévet, et al., 2021), p.75) :

- Fibres A α (80 à 120 m/s) : Elles sont responsables de l'innervation des récepteurs de la proprioception et des muscles squelettiques.
- Fibres A β (35 à 75 m/s) : Elles innervent les mécanorécepteurs cutanés, comme les corpuscules de Meissner et de Pacini.

- Fibres A δ (5 à 30 m/s) : Elles transmettent les signaux des thermorécepteurs et des nocicepteurs.
- Fibres C (0,5 à 2 m/s) : Ces fibres amyélinisées transmettent également les signaux des nocicepteurs.

Les fibres A β peuvent être divisées en fonction de leur vitesse d'adaptation :

- Fibres de type I à adaptation lente : Elles innervent les disques de Merkel.
- Fibres de type II à adaptation lente : Elles innervent les corpuscules de Ruffini.
- Fibres à adaptation rapide : Elles innervent les corpuscules de Meissner et de Pacini.

Dans la peau glabre (sans poils) et dans la peau velue, il y a une prédominance de récepteurs à adaptation rapide (84%), responsables principalement de la sensibilité tactile, par rapport aux récepteurs à adaptation lente (16%) qui sont impliqués dans la détection de la pression.

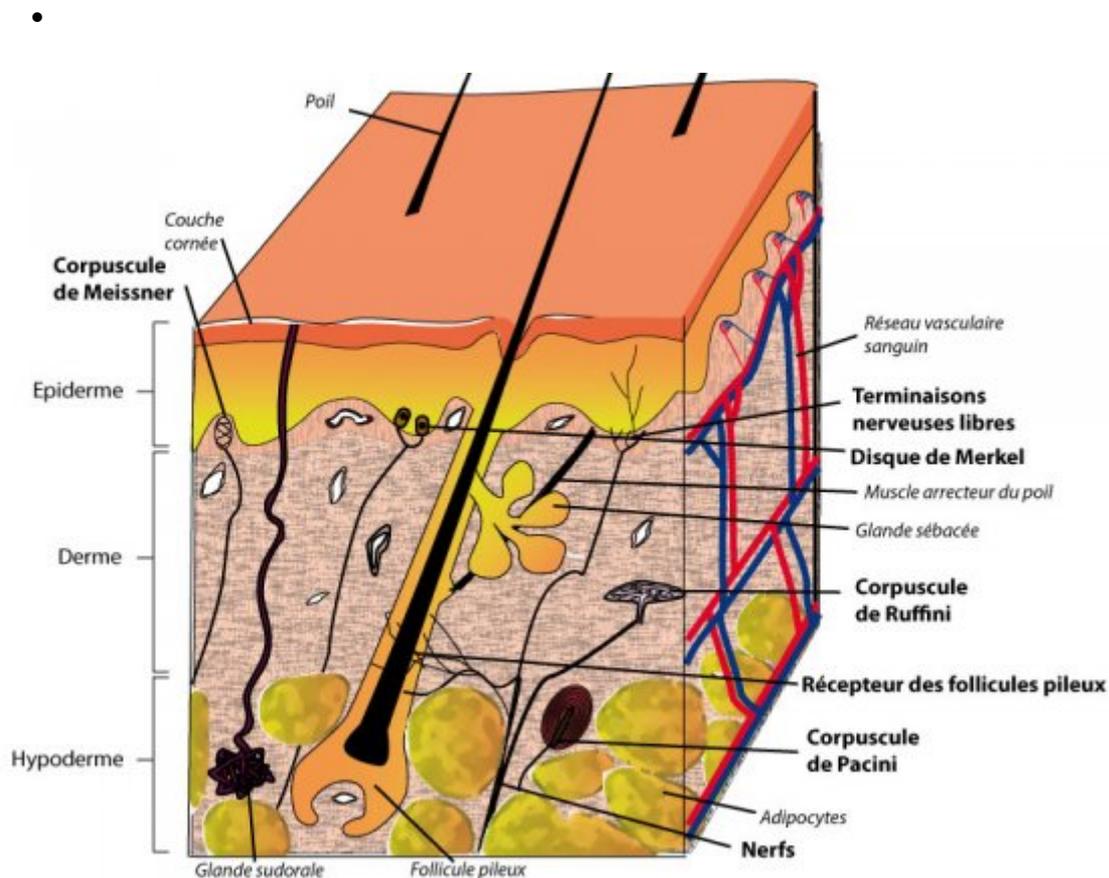


Figure 24 : Vue schématique du système nerveux sensoriel de la peau.
Source : <https://biologiedelapeau.fr>.

I.3.4.3. Les mécanorécepteurs et les différents types de sensibilité mécanique

Au sein de la sensibilité mécanique cutanée, on distingue :

- la sensibilité à la pression,
- la sensibilité fine épicrotique ou tact,

- et la sensibilité à la vibration.

I.3.4.3.1. La sensibilité à la pression

Effectivement, la sensibilité à la pression est un aspect important de la sensibilité cutanée, et elle est médiée par des récepteurs spécifiques tels que les disques de Merkel et les corpuscules de Ruffini.

Disques de Merkel : Les disques de Merkel sont situés à la base de l'épiderme, généralement dans les couches superficielles de la peau. Chaque disque de Merkel est composé d'une terminaison nerveuse en forme de disque et d'une cellule de Merkel associée. Cette terminaison nerveuse myélinisée forme une connexion synaptique avec la cellule de Merkel. Ces récepteurs répondent à des pressions localisées, c'est-à-dire lorsque la peau est enfoncée. Leur réponse au stimulus est de nature phasico-tonique, ce qui signifie qu'ils ont une réponse d'activation initiale suivie d'une adaptation lente au cours de la stimulation continue. Les disques de Merkel sont capables de coder des informations sur la position et la vitesse du stimulus, tels que les indentations de la peau, ce qui contribue à la sensibilité tactile fine et au toucher discriminatif.

Corpuscules de Ruffini : Les corpuscules de Ruffini sont situés dans les couches plus profondes du derme. Chaque corpuscule de Ruffini est constitué d'une terminaison nerveuse fuselée entourée d'une capsule fibroblastique. Contrairement aux disques de Merkel, les fibres nerveuses qui innervent les corpuscules de Ruffini perdent leur gaine de myéline. Des fibres de collagène traversent la capsule fibroblastique et ancrent le corpuscule mécaniquement dans le derme. Les corpuscules de Ruffini jouent un rôle important dans la détection de l'intensité et de la direction des étirements de la peau. Ils informent le système nerveux central sur les forces et les directions des cisaillements cutanés qui accompagnent les mouvements articulaires. Cela contribue à la sensation de pression continue et aux informations proprioceptives liées aux mouvements du corps.

En somme, les disques de Merkel et les corpuscules de Ruffini sont des récepteurs spécialisés dans la détection de la pression et des mouvements de la peau. Ils contribuent à la sensation de toucher, à la sensibilité fine, ainsi qu'à la perception de la pression constante et des changements de forme de la peau.

I.3.4.3.2. Le toucher

Tout à fait, le sens du toucher ou tact est une sensation complexe qui permet de percevoir des contacts légers avec la peau. Cette sensation est essentielle pour la perception de l'environnement et la communication avec le monde extérieur. Les récepteurs du tact détectent principalement la vitesse des stimulations et sont responsables de la détection des contacts légers ainsi que des vibrations.

Corpuscules de Meissner : Les corpuscules de Meissner sont des récepteurs tactiles situés dans la peau glabre, c'est-à-dire la peau qui ne contient pas de poils. Ils sont localisés dans les papilles dermiques, juste en dessous de l'épiderme. Ces récepteurs sont ancrés mécaniquement au tissu environnant par de fins filaments de tissu conjonctif. Leurs fibres axonales s'enroulent en spirale autour des cellules de Schwann. Les corpuscules de Meissner

sont des récepteurs superficiels à adaptation rapide, ce qui signifie qu'ils sont sensibles aux changements rapides de stimulation. Ils sont particulièrement sensibles à la vitesse d'établissement du stimulus, ce qui en fait des récepteurs sensibles aux mouvements légers et aux vibrations dans une gamme de fréquences allant de 5 à 200 Hz. Ils jouent un rôle important dans la perception des mouvements légers, des textures et des vibrations.

Récepteurs des follicules pileux : Les récepteurs des follicules pileux sont situés autour de la racine des poils, sous les glandes sébacées. Contrairement aux corpuscules de Meissner, ces récepteurs sont sensibles au mouvement des poils, créant ainsi une sensation spécifique liée à l'inclinaison des poils. Lorsque les poils sont inclinés, les terminaisons nerveuses libres situées autour des follicules pileux détectent ce mouvement et génèrent des signaux sensoriels. Ces récepteurs ont une adaptation relativement rapide, ce qui signifie qu'ils réagissent davantage aux changements de stimulation qu'à une stimulation constante. La fréquence des potentiels d'action émis par ces récepteurs est proportionnelle à la vitesse d'inclinaison des poils, ce qui permet au cerveau de percevoir le mouvement des poils et les sensations liées à cette inclinaison.

En résumé, les récepteurs du tact, tels que les corpuscules de Meissner et les récepteurs des follicules pileux, sont spécialisés dans la détection des contacts légers, des mouvements de la peau et des vibrations. Ils contribuent à la perception du toucher fin, à la reconnaissance des textures et au suivi des mouvements sur la surface de la peau.

I.3.4.3.3. La sensibilité à la vibration

Absolument, les corpuscules de Pacini sont des récepteurs sensoriels spécialisés dans la détection des vibrations et des changements rapides d'intensité. Ils jouent un rôle crucial dans la perception de sensations vibratoires et de vibrations mécaniques dans la peau. Voici quelques détails supplémentaires sur ces récepteurs :

Corpuscules de Pacini : Les corpuscules de Pacini sont des récepteurs situés dans le derme et l'hypoderme de la peau. Ils sont sensibles à la vibration et ont une gamme de fréquences de réponse allant de 30 à 1500 Hz, avec une sensibilité optimale autour de 300 Hz. Ces récepteurs sont caractérisés par leur structure en forme d'oignon ou de bulbe. Ils sont en effet constitués d'une terminaison nerveuse myélinisée, isolée, qui est enveloppée par un grand nombre de lamelles conjonctives concentriques, créant ainsi une structure en couches.

L'organisation en couches des corpuscules de Pacini a un rôle important dans leur fonctionnement. Ces couches séparent des espaces remplis de liquide. Lorsqu'une vibration ou une déformation mécanique de la peau est transmise jusqu'au corpuscule de Pacini, les changements rapides d'intensité de la déformation provoquent des variations de pression dans les espaces remplis de liquide. Cela conduit à une déformation de la terminaison nerveuse myélinisée à l'intérieur du corpuscule.

Un aspect intéressant des corpuscules de Pacini est leur sensibilité aux variations rapides d'intensité plutôt qu'à la durée ou à la vitesse de la stimulation. Cela signifie qu'ils ne répondent pas à des stimulations continues ou prolongées, mais plutôt aux changements brusques et rapides dans le niveau de déformation cutanée. En d'autres termes, ils détectent les

accélération de la déformation, ce qui les rend particulièrement adaptés à la perception des vibrations et des stimulations vibratoires.

En résumé, les corpuscules de Pacini sont des récepteurs sensoriels spécialisés dans la détection des vibrations et des variations rapides d'intensité dans la peau. Leur structure en couches et leur sensibilité aux accélérations de la déformation cutanée en font des récepteurs adaptés à la perception des sensations vibratoires dans une gamme de fréquences spécifique.

I.3.4.4. La sensibilité thermique

Les différentes sensations liées à la sensibilité thermique sont principalement la sensibilité au froid et au chaud. Ces sensations sont influencées par la situation du sujet juste avant la stimulation. Par exemple, plonger dans une piscine à 25°C peut donner une sensation de chaud en hiver (quand la température extérieure est de 10°C) et une sensation de froid en été (quand la température extérieure est de 30°C).

Plusieurs facteurs influencent ces sensations thermiques :

- La température initiale de la peau : Si la peau démarre à une température basse (28°C), le seuil de sensation de chaleur (1°C) est élevé et celui de froid (0,2°C) est bas. Avec une augmentation de la température initiale de la peau, le seuil de sensation de chaleur diminue tandis que celui de froid augmente. Ainsi, pour une même température finale de la peau (32,5°C), réchauffer la peau de 32°C à 32,5°C crée une sensation de chaleur, tandis que refroidir la peau de 33°C à 32,5°C génère une sensation de froid.
- La vitesse de changement de température : Une variation d'au moins 6°C par minute est nécessaire pour ressentir une sensation de chaud ou de froid. Si la variation est plus lente, il peut se passer un certain temps avant que le changement de température soit ressenti.
- La surface stimulée : Plus la zone stimulée est grande, plus la sensibilité thermique est élevée.

La sensation thermique s'atténue rapidement. Par exemple, quand nous nous plongeons dans un bain chaud le matin, la sensation d'eau très chaude diminue rapidement. Cette zone d'adaptation complète des récepteurs est appelée "zone de neutralité thermique". Chez l'homme, elle se situe entre 33 et 35°C pour toute la surface corporelle ou entre 30 et 36°C pour une surface de 15 cm².

En général, le port de vêtements nous aide à maintenir une température cutanée relativement stable, autour de 30°C, même lorsque la température ambiante est plus basse. En dehors de cette zone de neutralité thermique, les récepteurs thermiques ne s'adaptent pas complètement, et la sensation de chaud ou de froid persiste. Cette sensation peut devenir douloureuse si la température cutanée est inférieure à 17°C ou supérieure à 44°C.

La peau contient des terminaisons nerveuses libres sensibles au froid ou au chaud, situées près des capillaires sanguins. Les récepteurs de froid, liés à des fibres myéliniques fines,

se trouvent en surface, dans l'épiderme. Les récepteurs de chaud, liés à des fibres amyéliniques de type C, sont plus profonds, dans le derme.

Ces récepteurs ont des fibres efférentes présentant plusieurs caractéristiques fonctionnelles :

- Les seuils de stimulation des fibres efférentes sont proches des seuils de sensibilité thermique cutanée.
- Leur activité varie en fonction de la variation de la température cutanée, à la fois de manière dynamique et tonique.
- Les récepteurs de froid sont les plus actifs autour de 30°C, tandis que ceux de chaud le sont vers 43°C.

La densité des thermorécepteurs dans la peau est variable et inférieure à celle des mécanorécepteurs liés au toucher. Les points sensibles au froid sont plus nombreux que les points sensibles au chaud. La peau du visage a la plus grande densité de thermorécepteurs. Les champs récepteurs de ces récepteurs sont petits, avec chaque fibre innervant un petit nombre de récepteurs.

I.3.4.5. Nociception et douleur

Nous possédons des récepteurs sensoriels à seuil élevé qui ne sont activés que par des stimulations causant des lésions à l'organisme. Ces stimulations nocives activent des "nocicepteurs", générant ainsi une sensation consciente spécifique : la douleur. Il est important de distinguer entre douleur et nociception. La nociception est le processus sensoriel qui engendre le signal nerveux responsable de la douleur. Les nocicepteurs peuvent être très actifs sans déclencher de douleur, et à l'inverse, une douleur intense peut survenir sans une activation majeure des nocicepteurs. Il est bien connu qu'une forte émotion, un stress aigu, voire simplement une intense concentration, peuvent atténuer la sensation de douleur. Par exemple, lorsqu'on se coupe accidentellement en étant absorbé par une tâche, la douleur peut ne pas être immédiatement ressentie.

La douleur a pour rôle principal d'avertir des situations dangereuses et de déclencher des réflexes protecteurs pour éviter les stimuli nocifs et soulager les parties du corps subissant des tensions excessives. Les individus qui naissent avec un déficit de la sensation douloureuse courent un risque constant de s'infliger des blessures, car ils ne perçoivent jamais les signaux de douleur, ce qui conduit généralement à une mort prématurée. Les patients qui présentent un déficit acquis de la douleur comme dans les neuropathies diabétiques peuvent se brûler sans s'en rendre compte ce qui conduit à une blessure qui peut avoir beaucoup de mal à cicatriser. La neuropathie périphérique en elle-même ralentit le processus de cicatrisation. Ainsi il n'est pas rare de devoir amputer ses patients pour des blessures qui paraissent minimes au début.

Les caractéristiques de la douleur sont les suivantes :

- En fonction de la localisation de la stimulation : La douleur peut varier en fonction de son origine, qualifiée de superficielle si elle provient de la peau et de profonde si elle provient des muscles et des articulations.
- En fonction de l'intensité de la stimulation : Une stimulation telle qu'une piqûre d'aiguille provoque d'abord une douleur vive et localisée, qui disparaît rapidement. Une piqûre plus forte est suivie d'une douleur sourde, diffuse et moins localisée qui s'estompe plus lentement. Les fibres responsables de ces douleurs sont des fibres myéliniques fines ($A\delta$) pour la douleur rapide et des fibres amyéliniques (fibres C) pour la douleur lente.
- En fonction de la durée de la stimulation : Les douleurs aiguës, comme celles résultant d'une carie ou d'une brûlure, sont vives, localisées, accompagnées de réactions physiologiques et motrices fortes. Les douleurs chroniques, d'une durée supérieure à 6 mois, peuvent avoir des répercussions graves sur la personnalité, entraînant des problèmes tels que l'insomnie, les troubles de l'humeur et la dépression. Dans les douleurs chroniques, il peut ne pas y avoir de lien clair entre l'étendue de la lésion organique et l'intensité de la douleur.

Il existe des récepteurs cutanés, principalement des terminaisons libres de fibres amyéliniques, qui ne répondent qu'à des stimulations potentiellement dommageables pour la peau, telles que mécaniques, thermiques ou chimiques. On distingue quatre types de nocicepteurs (Figure 25) :

- Les nocicepteurs mécaniques réagissent aux piqûres, pincements ou torsions de la peau avec une décharge continue pendant la stimulation, sans adaptation. Leurs champs récepteurs sont larges et composés de zones actives séparées par des zones inactives. Ils sont principalement liés aux fibres $A\delta$.
- Les nocicepteurs thermiques réagissent à des températures élevées ($> 45^{\circ}\text{C}$) ou basses ($< 10^{\circ}\text{C}$). Leurs champs récepteurs sont ponctuels et associés aux fibres amyéliniques (fibres C).
- Les nocicepteurs sensibles aux agents chimiques réagissent aux substances toxiques externes ainsi qu'aux substances libérées par les tissus lésés.
- Les nocicepteurs polymodaux réagissent à la fois aux stimuli nociceptifs mécaniques et thermiques. Ils sont liés aux fibres C amyéliniques et représentent environ 90% des fibres amyéliniques dans un nerf cutané.

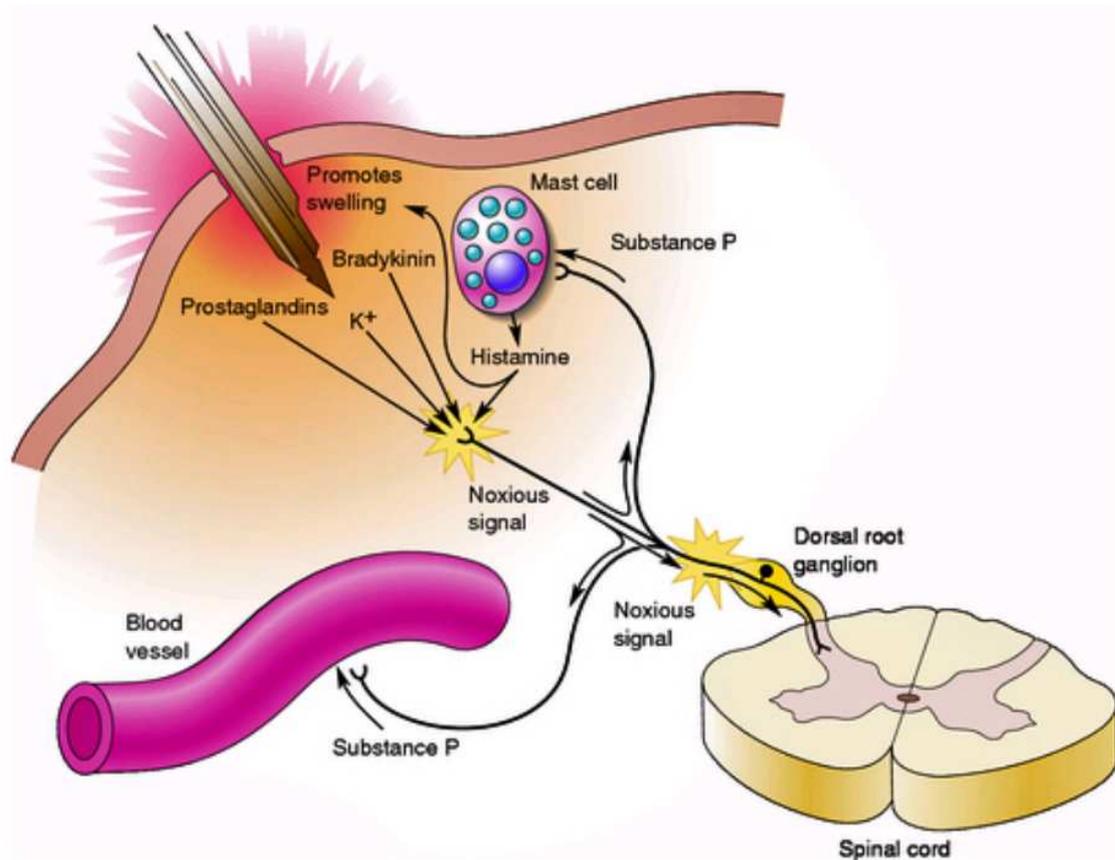


Figure 25 : Médiateurs chimiques périphériques de la douleur.

L'histamine, sécrétée par les mastocytes, est très algogène en injection intradermique. Elle excite les différents nocicepteurs. La bradykinine, puissant vasodilatateur, excite les nocicepteurs cutanés et facilite la réponse des fibres C à un échauffement. Les prostaglandines (PGE1 et PGE2), produites par les cellules endothéliales vasculaires, comme la sérotonine, présente dans les plaquettes sanguines, induisent des phénomènes de sensibilisation à l'histamine et à la bradykinine. Les terminaisons libres sont également sensibles aux variations de concentration locales en O₂, en CO₂ et à la composition ionique (K⁺) du milieu extracellulaire.

Source : Bear MF, Connors BW and Parasido MA, Neurosciences – Exploring the Brain, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

I.4. Les cellules stromales mésenchymateuses issues du TA

Pour commencer ce chapitre essentiel sur les AD-MSCs, deux états des lieux parfaitement exhaustifs publiés dans des revues à comité de lecture sont intégrés dans le manuscrit (Betheuil et al., 2019 ; Laloze et al., 2021). Ils précisent les caractéristiques, les principales propriétés de ces cellules et de leur sécrétion paracrine, et surtout les contextualisent en médecine régénérative. Par la suite, il sera précisé différents points de façon plus détaillée, qui nous paraissent essentiels pour la compréhension de notre travail.



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



GENERAL REVIEW

Adipose mesenchymal stromal cells: Definition, immunomodulatory properties, mechanical isolation and interest for plastic surgery



*Les cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux :
définition, propriétés immunomodulatrices, extraction
mécanique et intérêt en chirurgie plastique*

N. Bertheuil^{a,b,c,*}, B. Chaput^{d,e}, C. Ménard^{b,c}, A. Varin^d,
J. Laloze^d, E. Watier^{a,b,c}, K. Tarte^{b,c}

^a Service de chirurgie plastique et reconstructrice, hôpital Sud, université de Rennes 1, 35200 Rennes, France

^b Inserm U1236, université de Rennes 1, 35000Rennes, France

^c Laboratoire SITI, CHU de Rennes, 35000Rennes, France

^d STROMA lab, UMR5273 CNRS/UPS/EFS - Inserm U1031, hôpital Rangueil, 31100Toulouse, France

^e Service de chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, hôpital Rangueil, université Paul-Sabatier, 31400Toulouse, France

Received 20 June 2018; accepted 13 July 2018

KEYWORDS

Adipose stromal cells;
Adipose stem cells;
Nanofat grafting;
Fat grafting;
Immunomodulatory
properties

Summary Ever since their discovery in 2001, adipose mesenchymal stromal cells (ASC) have profoundly modified clinical indications and our practice of plastic surgery, thereby placing our discipline at the forefront of regenerative medicine. These cells act through paracrine signaling by synthesizing immunosuppressive and pro-angiogenic factors. They are of key importance with regard to the regenerative properties of autologously grafted adipose tissue (AT). Taken together, they make up the stromal vascular fraction (SVF) comprising all AT cells except for adipocytes. As our knowledge evolves, we are moving from fat grafting towards SVF grafting, of which the essential sought-after effect is tissue regeneration. The objective of the present review is to synthesize present-day information on ASCs and their immunomodulatory properties

* Corresponding author. Service de chirurgie plastique et reconstructrice, hôpital Sud, université de Rennes 1, 35200 Rennes, France.
E-mail address: nbertheuil@gmail.com (N. Bertheuil).

<https://doi.org/10.1016/j.anplas.2018.07.005>

0294-1260/© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

MOTS CLÉS

Cellules stromales
mésenchymateuses du
tissu adipeux ;
Tissu adipeux ;
Cellules souches ;
Nanofat grafting

and, from a practical standpoint, to indicate present-day and future steps towards establishment of clinical routine, particularly through application of techniques favoring mechanical digestion of adipose tissue.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Depuis leur découverte en 2001, les cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux (ASC) ont profondément modifiées nos indications cliniques et notre pratique en chirurgie plastique, plaçant notre discipline au cœur de la médecine régénérative. Ces cellules agissent par action paracrine en synthétisant des facteurs immunosuppresseurs et pro-angiogéniques. Elles sont la clé des propriétés régénératives du tissu adipeux greffé de façon autologue. Ces cellules composent la fraction vasculaire stromale (FVS) comprenant l'ensemble des cellules du tissu excepté les adipocytes. Au fur et à mesure de nos connaissances, nous basculons du *fat grafting* vers la *FVS grafting* où l'effet recherché est essentiellement la régénération tissulaire. Ainsi, cette revue a pour objectif de réaliser une synthèse des connaissances actuelles en matière d'ASC, de leurs propriétés immunomodulatrices, et de leurs méthodes d'obtention en routine clinique, notamment les techniques de digestion mécanique du tissu adipeux.

© 2018 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Over the last decade, the clinical use of MSCs has begun to skyrocket. Keen and exponentially increasing interest in a wide range of disciplines (hematology, proctology, cardiology, neurology, orthopedics...) has revolved around the notion of "stem cell", that is to say a cell capable of renewing itself ("auto-replication"), of proliferating and of being differentiated into a multitude of cell types. Stem cells are characterized as totipotent when they can generate a living being (embryonic stem cells), as pluripotent when they can be divided into three tissue types (ectoderm, mesoderm and endoderm), and as multipotent when they can only be differentiated in a given tissue type. MSCs belong to the last category and have been named according to their tissue origin: BM-MSC, ASC, UC-MSC, etc. Numerous studies have indicated that MSCs may be used in regenerative medicine in highly diversified clinical situations, leading to a scarcely imaginable medical and media craze initially explainable by their differentiation properties. However, reevaluation of their mechanisms of action was triggered by the massive retention of MSCs in the lungs during intravenous injections, by their low level of persistence in targeted tissues [1–3] and, finally, by demonstration of their limited capabilities of in vivo transdifferentiation into mature functional cells. At present, clinical utilization of MSCs is premised on the properties enabling them to produce trophic and immunosuppressant factors. More specifically, due to their immunomodulatory/immunosuppressant properties, the clinical interest of these cells in the treatment of inflammatory and dysimmunitary diseases has become obvious.

The objective of this review is to present today's knowledge base with regard to adipose stromal cells (ASC) and to pinpoint their clinical interest, particularly in plastic surgery. Indeed, ASCs are among the components of the fat

utilized in autologous reinjections either to compensate for a lack of substance or for regenerative purposes; indeed, ASC isolation techniques have been developed and may be applied during operations such as plastic surgery.

Mesenchymal stromal cells

Mesenchymal stromal cells (MSC) have been known since the 1970s and were initially isolated from bone marrow (bone marrow-mesenchymal stem cells [BM-MSC]) [4]. They are defined by three properties existing in culture:

- they are plastic-adherent and proliferate in vitro;
- they are multipotent, which means that they can be differentiated into diversified cell types derived from the mesoderm [5,6] (bone, cartilage, adipose tissue);
- contrary to hematopoietic cells, they do not express a specific surface marker, and as a result, their isolation and characterization have been restricted.

The minimum required phenotype consists in the presence of CD105, CD73, CD90 ($\geq 95\%$ positivity) and the absence of expression of the hematopoietic markers CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79a or CD19 ($\leq 2\%$). Moreover, without an inflammatory stimulus (particularly the interferon-gamma [IFN- γ]), MSCs fail to express HLA-DR (a molecule in the class II major histocompatibility complex) [5]. That said, recent studies have shown that MSCs are present in multiple tissues, including adipose tissue. There exist several other names for these cells, of which the most widely known, the designation given by the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) are ASCs and adipose-derived stromal cells (ADSC) [7]. Indeed, adipose tissue is a major reservoir for ASCs, easily accessible via the liposuction techniques routinely applied in plastic surgery [8,9].

Nowadays, it has become obvious that the efficacy of MSC injection in different models of tissue lesions and dysimmunitary diseases is largely ascribable to a paracrine effect

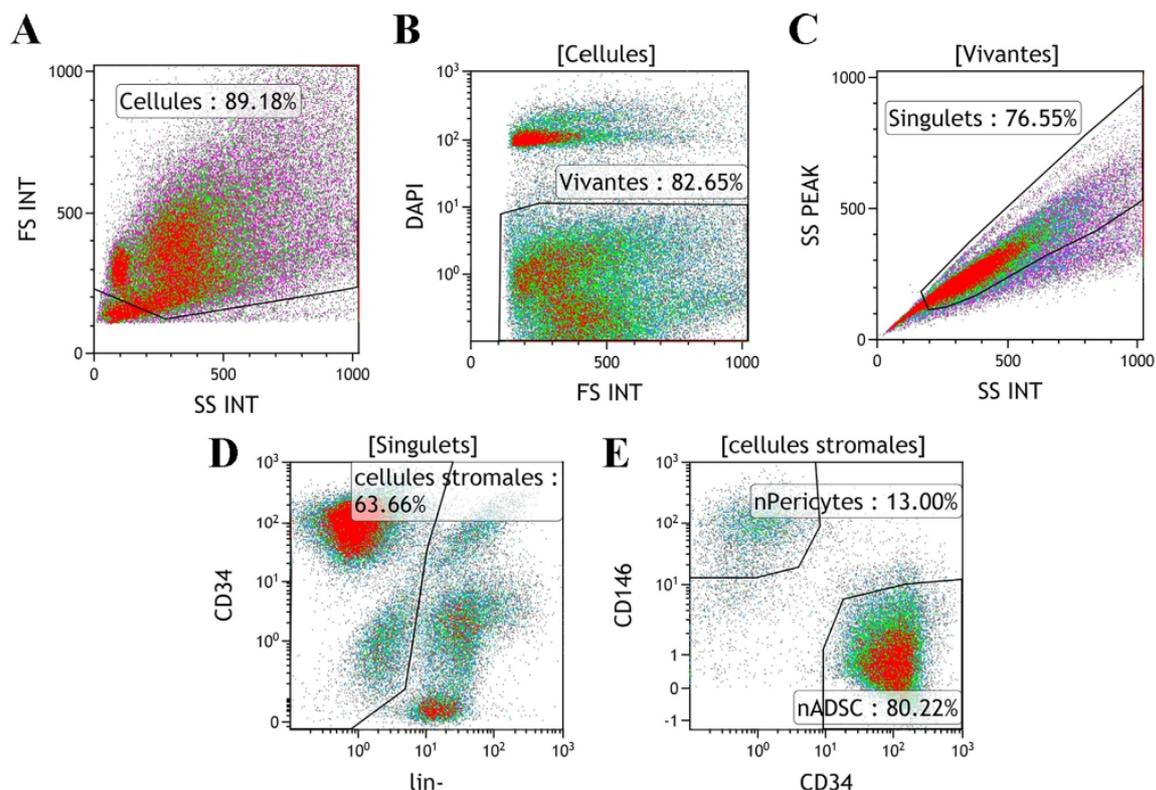


Figure 1 Analysis of stromal cells in adipose tissue by flow cytometry. After enzymatic tissue digestion and labelling of the SVF cells, MSC analysis is carried out by an appropriate gating strategy using Kaluza software. Each analysis involves a preliminary selection of cells with (A) exclusion of cell debris, (B) selection of living cells, (C) singlets, (D) exclusion of hematopoietic and endothelial cells (lin: CD45/CD11b/CD235a/CD31) and (E) analysis of the isolated populations from a diagram CD146/CD34.

through which, over a short period of time, MSCs produce anti-inflammatory and immunosuppressive molecules that contribute, in association with trophic factors, to the regeneration of host tissue, as has been shown in the encouraging results of trials on the treatment of complicated anal fistulas in Crohn's disease [10,11].

Current data in the literature show considerable heterogeneity in the description of MSCs. We now know that culture induces modifications in the expression of surface markers in contradistinction to their native state. In addition, the functional properties of MSCs vary according to their tissue origin and method of production [12]. In fact, it is highly likely that the heterogeneity in the clinical results achieved with MSC is to some extent due to differences in production processes. More specifically, processes differ with regard to cellular origin, duration, culture conditions and, consequently, the number of cell doublings (CD) in vitro [13,14].

However, current data on the characterization of ASCs in their native state remain insufficient to assess their heterogeneity and plasticity. From a clinical standpoint, relevant information is needed to evaluate the benefit/risk balance not only of plastic surgery by injection of autologous fat, particularly in the breast, but also of applications involving cell therapy.

Adipose stromal cells

In culture, ASCs as well as BM-MSCs are capable of multiplying (their multiplication can be quantified by determining the number of population doublings [PD]) and of being differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. Also in culture, while ASCs, BM-MSCs and MSCs of the umbilical cord (UC-MSC) present similar morphology and comparable membrane phenotypes, ASCs possess a greater capacity of clonogenicity, as is shown by a more elevated rate of *colony-forming unit fibroblast* (CFU-F), whereas UC-MSCs have a higher number of PDs than ASC, and BM-MSCs are the cells that multiply the least [15]. Notwithstanding their resemblances, MSCs differ in phenotype according to their environmental niche or their function within a tissue. For example, and unlike BM-MSCs, ASCs do not express the adhesion CD106 molecule [15,16]. Moreover, ASCs possess greater pro-angiogenic capacities than BM-MSCs, which is why they have been tested in cases of lower limb ischemia [17]. In addition, ASCs possess appreciable functional properties as regards the inhibition of inflammatory and immune responses [18].

While these different characteristics have been defined on the basis of ASCs obtained in cultures, as of now native

While these different characteristics have been defined on the basis of ASCs obtained in cultures, as of now native ASCs remain little known. They possess altogether specific characteristics such as expression *in vivo* of the CD34 marker [19–21]. Given the fact that hematopoietic and endothelial markers are not expressed, CD34 plays a major role in the isolation and characterization of ASCs (Fig. 1). The CD34 molecule is a transmembrane glycoprotein belonging to the sialomucine family, and its function has yet to be thoroughly elucidated [22,23]. Non-specific to a cell type, it is predominantly expressed by hematopoietic stem cells, endothelial cells [24] and endothelial progenitors [25]. As a marker, it is lost during culture [22,26], which is why, in the past, certain studies described ASCs as CD34-negative [27].

Over the last decade, given the development of fundamental knowledge pertaining to these cells, criteria have been put into place to define MSCs and to determine their differences with so-called stem cells [6]. The previously cited criteria included phenotype conditions [5] such as the presence of markers CD73, 90, 105 and the absence of markers CD45, 34, 14 or 11b. While it remains applicable to the BM-MSCs on which it is based, this definition has been called into question and it has become obvious that it is inapplicable to ASCs. Indeed, native ASCs express CD34 [20], which is the key marker of their isolation [19,28], rendering the criteria of Dominici et al. effectively inapplicable to adipose tissue [5]. Additional indications were consequently given in view of amending the definition of ASCs, which are phenotypically defined by the absence of markers CD45 (pan-hematopoietic marker), CD235a (which is conducive to the elimination of the erythrocytes remaining after addition of lysis buffer), CD31 (endothelial cells) and the presence of CD34. An expert group went on to explain that ASCs must also be positive with regard to the stromal markers CD73 and 90, and that their characterization can be enhanced by the presence of CD10, CD26, CD49d, CD49e as well as CD146 (MUC18) [29].

Lastly, other recent studies have suggested the existence of several stromal sub-populations in adipose tissue [19,30,31], one of them being known as a pericyte population due to its perivascular mural location, which puts it in contact with endothelial cells [30,32]. This population is largely defined by the presence of the marker CD146 [32]. Some authors have suggested that MSCs with differing tissue origins might be derived from a common, pericyte-like progenitor cell [19]. It is worthwhile to note that contrary to the aforementioned IFATS definition, these authors differentiate ASCs (CD34^{pos} cells) from pericytes (CD146^{pos} cells) [29]. However, only in a CD34^{pos} fraction did Maumus et al. [20] observe a population presenting clonogenic properties, a finding in contradiction with those of teams focusing on pericytes [30–32]. Fig. 1 presents an analysis of MSC sub-populations in adipose tissue following an adaptive selection strategy.

The immunomodulatory properties of MSCs

There exist many studies reporting the contrasting immunomodulatory properties of MSCs. In animals and humans alike, results *in vitro* differ. That said, it has been proven that MSCs are not constitutively immunosuppressant; only after

stimulation by inflammatory signals [33] from the micro-environment such as the inflammatory cytokines IFN- γ or TNF- α do they acquire such properties [34–36]. During inflammatory response, immune cells such as T lymphocytes, monocytes or macrophages produce the IFN γ necessary to MSC activation [37,38]. Moreover, MSCs are only weakly immunogenic; *in vitro*, they fail to activate allogeneic T lymphocytes. However, they are not immune-privileged, and can be recognized by the immune system of an allogeneic host and are consequently liable to be destroyed by effectors such as activated natural killer (NK) lymphocytes [39]. Their effects are not HLA-restricted, which means that the MSCs exercise their suppressive properties whatever the HLA genotype of the recipient's immune cells [40]. MSCs do not constitutively express either MHC Class II, which they can nonetheless express in an inflammatory context, or costimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86 [41,42]. They act upon all effectors of innate or adaptive immunity and alter cell proliferation (blocking in phase G0/G1 of the cell cycle [43,44]) as well as other immune cell functionalities.

Lymphocytes

Lymphocytes are the leucocytes implicated in adaptive immune response, and two main lines may be distinguished: T and B. With regard to T lymphocytes, MSCs inhibit proliferation [45,46], cytotoxicity and IFN- γ production [45,46]. MSCs induce differentiation into regulatory T lymphocyte (Treg)CD4^{pos}CD25^{high}FOXP3^{pos} [47–51]. MSCs can also impact secretory profile and, consequently, lymphocyte function. Indeed, numerous studies have reported repolarization of the Th1 lymphocyte (IFN γ synthesis) towards a Th2 profile (IL-4 synthesis), a process enabling tissue regeneration. Placenta MSCs have been described as allowing a switch from a Th1 profile towards a Th2 profile [45] by means of the IL-10-producing monocyte induced by HGF. *In vitro*, adipose tissue MSCs have been described as inhibiting proliferation of naive T-CD4+ lymphocytes and as blocking polarization in Th1 and Th17 [48]. Other studies have reported similar inhibition of Th1 polarization [44,52]. That said, works comparing the MSCs of different tissue sources have yielded discordant results on T lymphocytes. Puissant et al. reported similar effects on proliferation of T lymphocytes in the spinal cord and in adipose tissue [18], while Najar et al. reported similar results with ASCs as compared to umbilical cord MSCs and BM-MSCs [53]. Ribeiro et al. demonstrated the superiority of ASCs over BM-MSCs and UC-MSCs in the inhibition of T-CD4^{pos} and T-CD8^{pos} lymphocytes and NK [54]. As for Xishan et al., they highlighted the superiority of BM-MSCs over ASCs as inhibitors of the proliferation and activation of T lymphocytes [44]. As concerns B lymphocytes, the role of MSCs remains open to debate [55]. It now appears more and more evident that it depends on their activation status, which itself depends on the interactions of the MSCs with other immune cells [56]. In a non-inflammatory context, MSCs do not inhibit B lymphocyte proliferation, and they even permit the survival and generation of regulatory B cells (CD38^{high}CD24^{high} IL-10^{high}), whereas in an inflammatory context stimulated by IFN γ , MSCs inhibit B lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis by blocking plasmocytic maturation [57,58].

Please cite this article in press as: Bertheuil N, et al. Adipose mesenchymal stromal cells: Definition, immunomodulatory properties, mechanical isolation and interest for plastic surgery. *Ann Chir Plast Esthet* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2018.07.005>

Monocytes, macrophages, dendritic cells

Monocytes represent a population of blood leucocytes capable of being differentiated in tissues into macrophages and dendritic cells, which are antigen-presenting cells. These cells are implicated in innate cellular response. Much of what we know about macrophages is derived from studies on mice [59]. In an oversimplified manner, classical or pro-inflammatory M1 macrophages, with their response that can be compared to type Th1 in the nomenclature of T lymphocytes, are described as markedly differing from M2 macrophages, which are alternatively considered as activated or anti-inflammatory and can be compared to type Th2 responses [60,61]. It would nonetheless seem that in between these two extremes, macrophages are more substantially heterogeneous [62]. While M1 macrophages are induced in vitro through stimulation by IFN γ , lipopolysaccharide (LPS) or TNF α , M2 macrophages are stimulated by IL-4 or IL-13 [61]. There exists no single signature permitting characterization of a macrophage as M1 or M2; different clusters of arguments on each side warrant examination. In humans, at their surface M1s strongly express class II HLA-DR MHC molecules, and weakly express CD206 (mannose receptor, implicated in phagocytosis [63]); they have a pro-inflammatory secretory profile (IFN γ , TNF α , IL-1 β) and moderate capacities for phagocytosis. Conversely, on their surface M2s weakly express HLA-DR and strongly express CD206 [64]; they have an anti-inflammatory (IL-10) secretory profile and an elevated capacity for phagocytosis [65]. MSCs help to orient the polarization of macrophages with a pro-inflammatory phenotype towards those with an anti-inflammatory phenotype, thereby favoring tissue regeneration [65–68]. Indeed, when BM-MSCs are cultivated with macrophages, the latter increase CD206 expression, augment their capacities for phagocytosis and reduce their syntheses of pro-inflammatory cytokines while increasing their syntheses of anti-inflammatory cytokines [69]. MSCs facilitate the survival of monocytes and differentiation into macrophage M2 CD206^{pos}CD163^{pos}, cells synthesizing IL-10 and CCL-18, which plays a part in the attraction of T-regulatory lymphocytes [70]. Chiossone et al. found in vitro that monocytes cultivated with BM-MSCs permit maturation into M2 macrophages, which strongly express CD11b, CD206 and CD163 [67]. Lastly, MSCs can alter the differentiation and maturation of dendritic cells [71].

MSC action mechanisms are multiple and for the most part inducible by soluble factors [72]. For example, MSCs synthesize the immunosuppressive enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), which catabolizes tryptophane into kynurenine [73]. This molecule, which is crucial to inhibition of the proliferation of T lymphocyte effectors by human MSCs, acts by depletion of the medium into an essential amino acid, tryptophane, and by producing kynurenine, which is toxic for T lymphocytes. We now know that the percentage of inhibition of T lymphocyte proliferation is correlated with augmentation of the kynurenine/tryptophane ratio, which reflects IDO activity [12]. Not constitutively present in MSCs, IDO is triggered in response to IFN γ and potentialized by TNF α [35]. In the same way, the effects of MSC on B lymphocytes are mediated by IDO. In fact, tryptophane supplementation enables restoration of B lymphocyte proliferation and

immunoglobulin synthesis [58]. In addition, MSCs produce the cyclo-oxygenase 2 (COX-2) enzyme, which plays a part in the synthesis of prostaglandine E2 (PGE2) from arachidonic acid. PGE2 in association with IDO plays a part in inhibiting the proliferation of T [53] and NK [39] cells. Indeed, PGE2 has been reported as being one of the mechanisms enabling differentiation of macrophages into M2 macrophages, whereas this differentiation is lost in the presence of COX2 inhibitors [67]. Németh et al. went so far as to underline the key role of the PGE2 produced by BM-MSCs in reprogramming the M2 macrophages secreting IL-10. In these studies, interleukin 10 is considered as responsible for sepsis resolution and consequently for improved survival in mice [74]. Following exposure to TNF- α , MSCs secrete the protein TSG-6 (TNF- α stimulated gene/protein 6) which acts by negative retro-control on the macrophages by decreasing their synthesis of pro-inflammatory factors, thereby curtailing recruitment of polynuclear neutrophil [75,76]. And as regards TSG-6, due to its powerful anti-inflammatory effect in mice it elicits a diminution of infarcted territory in myocardial infarction [3] by reducing the deleterious effects of the excessive inflammation associated with the massive infiltration of polynuclear neutrophils. MSCs also produce a specific form of HLA, HLA-G5, which is considered as responsible for the induction of regulatory T lymphocytes [49]. Importantly, and even though in mice MSCs exhibit the same immunosuppressant and anti-inflammatory properties as human MSCs, the implicated mechanisms markedly differ according to species, thereby underscoring the key importance of studies conducted from human tissues [77]. While in humans, IDO is the main mechanism inhibiting T lymphocyte proliferation, in mice it is iNOS [78].

In order to objectify MSC heterogeneity, and more specifically to compare the immunological properties of the different MSCs, it is crucial to apply a standardized methodology allowing researchers to ascribe observed effects to the MSCs themselves (for example, to the type of source tissue being used) without being subject to bias due to the experimental conditions of an immunological test (for example, a variation in the type of immune cells being used). That, in any event, is how it has been shown that the immunosuppressant potential of ASCs is greater than that of BM-MSCs [12].

Stromal vascular fraction (SVF) and how it can be isolated. From fat grafting to SVF grafting . . .

In vivo, ASCs are embedded between adipocytes in the extracellular matrix. In order to study them and to have them amplified in vitro, the extracellular matrix has got to be digested by proteolytic enzymes. Adipose tissue (AT) is digested at 37 °C over a period that varies from one author to the next in a buffer containing collagenase enabling digestion of the collagen fibers of the extracellular matrix. Once the different cellular components have been separated, it is time to centrifuge the product of enzymatic digestion so as to isolate the stromal vascular fraction (SVF). SVF contains all cells except the adipocytes. In fact, extraction is divided into three phases; from top to bottom,

they involve the adipocytes, the digestive environment and, finally, SVF (containing hematopoietic cells, endothelial cells and stromal cells) [9]. It matters to remember that SVF contains approximately 2 to 10% of ASC [79].

ASC amplification in clinical projects involving cell therapy treatment subsequently initiates a stage of culturing under standard conditions of good manufacturing practices; the cells are considered as advanced therapy medicinal products [80].

Direct utilization of SVF (without a cell culture phase) in the operating room is of particular interest to plastic surgeons. Indeed, based on the concept of enzymatic digestion by collagenase, different machines are now at surgeons' disposal (see the paragraph on « plastic surgery context ») [81]. Contrary to cell therapy, which implicates a "pure" cellular population, SVF contains a heterogeneous collection of cells, of which the probable interactions may occasion non-elucidated disparities in clinical efficacy. Moreover, given the fact that methods for obtaining SVF have yet to be standardized, there exists a high likelihood of ending up with cellular cocktails of which the composition is diverse, variable and heterogeneous. In France, autologous use of SVF in the operating room is authorized without legal constraint, the reason being that during an operation, the surgeon can manipulate autologous tissues during maneuvers such as fat transplant or reinjection. Contrary to cultivated MSCs, which enter into the framework of "advanced therapy medicinal products", with pronouncedly more rigorous constraints, autologous tissues retain their basic cellular functions.

The clinical context in plastic surgery

On a parallel track, it has become increasingly evident that given the presence of MSCs, adipose tissue transfer presents considerable interest in regenerative surgery. Also known as fat grafting, lipofilling and lipomodélage, this treatment contributes to the regeneration of transplanted tissue. As was demonstrated for the first time in 2007 by Rigotti et al., it is of particular interest as a means of regenerating the sequels of radiotherapy. Indeed, this team showed that the injection of adipose tissue in severe radiation lesions (LENT-SOMA clinical score 3 and 4) in 20 patients permitted neoangiogenesis and improved tissue hydration. Using this technique, regeneration of the radiation dermatitis zone was observed, and it enabled simple reconstructions by split skin grafting instead of the usual, more debilitating reconstructions [27]. By producing trophic support the MSCs facilitated neoangiogenesis; reduced tissue inflammation was in all likelihood the key explanatory factor of clinical success [82]. Magalon et al. availed themselves of MSCs' properties and successfully applied the treatment to patients suffering from scleroderma, an autoimmune pathology leading to tissue fibrosis and microangiopathy clinically translated as Raynaud syndrome. Proof of its efficacy has been given by reinjection of human adipose tissue in nude mice in whom cutaneous scleroderma lesions were induced by bleomycin injection; following fat transfer, reduced tissue fibrosis and neoangiogenesis were observed [83]. As regards humans, a feasibility and safety study was conducted in twelve women and no adverse event was reported, while hand function was improved and pain, edema and Raynaud syndrome were

reduced [84–86]. Two randomized controlled studies are ongoing and will yield a high level of evidence on the role of this treatment in this type of pathology (<https://clinicaltrials.gov/shows/NCT02396238>; NCT02558543). In addition, SVF containing the ASCs is of particular interest to plastic surgeons on account of their capacity to improve fat graft survival. Indeed, during autologous fat transfers, the fat survival rate is variable, ranging from 20 to 80% [87]. The enrichment of fat with SVF, a concept known as "cell-assisted lipotransfert" that was developed by Matsumoto et al. in 2006, has led to improved adipose graft survival associated with better vascularization [88]. The same operation was carried out by Yoshimura et al. for breast augmentation, and the same results were achieved [89]. The popularity of this technique has proved conducive to the development of new systems through which SVF is extracted from adipose tissue for immediate use in the operating room as a means of enriching the tissue to be transferred, the goal being to improve fat retention. The Cytori[®] machine currently seems to yield the best results in terms of viable cells and the highest rate of clonogenic cells (CFU-F). In addition, it has helped to produce the lowest residual enzyme activity, which represents a significant criterion for clinical use [81]. And yet, notwithstanding the initially promising results obtained with this machine, discordant results ensued; in some studies no benefit was shown [90]. That much said, a high level of proof in evidence-based medicine of the clinical interest of MSCs in fat survival was achieved in 2013 by Kolle et al. [91]. In their randomized controlled study, they convincingly demonstrated that the enriched fat in MSCs cultivated in vitro led to pronouncedly improved graft survival, with a fat retention rate of 80.9% in the "enriched" group versus 16.3% in the placebo group. Unfortunately, their rigorous demonstration of the efficacy of these cells is not transposable in clinical routine. In plastic surgery, it would be hard to envisage firstly the extraction of adipose tissue, secondly a cell culture phase, and thirdly a second intervention with MSC-enriched tissue in accordance with indications for reconstruction; multiple constraints, for the most part economic, render this type of operation impractical. Moreover, in the aforementioned study, a major methodological bias prevents extrapolation of the results inasmuch as the tissue was reinjected in large quantities (30 mL) in monobloc surgery, which meant that it remained distant from any vascularization. This is contrary to the basic principles persuasively codified by Coleman [92]. On the same token, the quantity of cells reinjected after a culture phase with SVF extraction and direct utilization in a clinical setting is disproportionate. However, a well-conducted review of the literature applying rigorous methodology and including 25 studies and 696 patients came to the conclusion that fat graft enrichment with SVF cells actually improved graft survival (64 vs. 44%, $P > 0.0001$) for small-scale reinjected volumes [93].

Last but not least, the expensiveness of industrial systems of enzymatic isolation of SVF and the cost price of academic studies render these treatments difficult to provide in clinical routine. It will consequently be necessary to find new means of producing SVF cells usable in the operating room, either with the goal of increasing the volumetric retention of the graft or so as to undertake regenerative surgery, as has been done with regard to scleroderma. Techniques for

mechanical extraction of SVF cells meet the needs of our discipline and are likely to be representative of the future [94].

New hope was born in 2013 [94] with the first description of mechanical digestion of adipose tissue, a process the authors imperfectly termed “nanofat grafting”. In this technique, the tissue is emulsified, transferred to syringes ($n = 30$) and filtered at 500 μm ; in the end, SVF cells are produced. (If the term “nanofat grafting” is imprecise, the reason is that no adipocytes are involved, and that the cells involved, which are not nanometer-sized, corresponded according to the authors to ASCs.)

A second description of mechanical digestion reported by Raposio et al. consisted in tissue vortexing followed by long centrifugation; once again, the procedure presumably produced ASCs [95]. As concerns these two techniques, it was explained that they enabled ASC production to take place, even though neither one of them had provided a scientific demonstration. Moreover, the composition of the SVF cells produced by the two techniques differed, as did the percentage of ASC. In 2016, on the other hand, we demonstrated the possibility of ASC production by mechanical digestion of adipose tissue in accordance with existing benchmarks [96]. In our study, we compared the first two mechanical extraction techniques described in plastic surgery to enzymatic digestion, which is the reference method. We showed that SVF cell viability was inferior in the mechanical digestion groups associated with the traumatism related to the methodology; more precisely, the number of ASCs was 10 to 12 times inferior to the reference method. We came to the conclusion that the nanofat method described by Tonnard was of greater interest than the method detailed by Raposio insofar as it led to the production of SVF-enriched ASC, as was attested by a higher degree of CFU-F. Once the SVF is cultured subsequent to these three extraction techniques, we have observed that the ASCs possessed the same differentiation capacities and the same capacity to inhibit LT proliferation.

Numerous technical variants may modify SVF composition and shall necessitate characterization studies of the products used in a clinical setting. On a parallel track and as previously underlined by the authors, it will behoove researchers to agree on a definition of emulsification techniques and on the main lines of research to be undertaken in view of analyzing the reinjected product [97].

In conclusion

ASC and SVF have enabled new clinical indications to see the light of day in our discipline. Mechanical SVF production directly accessible in our operating rooms is probably representative of the future. A number of emerging techniques necessitate reiterated attempts at characterization of the products reinjected in our patients; for example, functional studies should allow us to determine whether or not the cells obtained indeed possess the same immunomodulatory and trophic support properties as cultivated ASCs. Following which, a phase of clinical experimentation will be necessary in order to clearly define the roles of these promising techniques in the therapeutic arsenal of the plastic surgeon.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003;108:863–8.
- [2] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8407–11.
- [3] Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell* 2009;5:54–63.
- [4] Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974;2:83–92.
- [5] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7.
- [6] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393–5.
- [7] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007;100:1249–60.
- [8] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–95.
- [9] Bertheuil N, Chaput B, Menard C, et al. Adipose-derived stromal cells: history, isolation, immunomodulatory properties and clinical perspectives. *Ann Chir Plast Esthet* 2015;60:94–102.
- [10] Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579–86.
- [11] Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009;52:79–86.
- [12] Menard C, Pacelli L, Bassi G, et al. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev* 2013;22:1789–801.
- [13] Galipeau J. The mesenchymal stromal cells dilemma: does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy* 2013;15:2–8.
- [14] Francois M, Galipeau J. New insights on translational development of mesenchymal stromal cells for suppressor therapy. *J Cell Physiol* 2012;227:3535–8.
- [15] Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;24:1294–301.
- [16] Yang ZX, Han ZB, Ji YR, et al. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *Plos One* 2013;8:e59354.
- [17] Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109:656–63.

- [18] Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005;129:118–29.
- [19] Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A* 2013;83:134–40.
- [20] Maumus M, Peyrafitte JA, D'Angelo R, et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:1141–53.
- [21] Li H, Zimmerlin L, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP. Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plast Reconstr Surg* 2011;128:663–72.
- [22] Suga H, Matsumoto D, Eto H, et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:1201–10.
- [23] Scherberich A, Di Maggio ND, McNagny KM. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. *World J Stem Cells* 2013;5:1–8.
- [24] Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75:2417–26.
- [25] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–7.
- [26] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonik S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006;24:376–85.
- [27] Rigotti G, Marchi A, Galie M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:1409–22 [discussion 23–4].
- [28] Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A* 2010;77:22–30.
- [29] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013;15:641–8.
- [30] Corselli M, Chen CW, Sun B, Yap S, Rubin JP, Peault B. The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Dev* 2012;21:1299–308.
- [31] Corselli M, Crisan M, Murray IR, et al. Identification of perivascular mesenchymal stromal/stem cells by flow cytometry. *Cytometry A* 2013;83:714–20.
- [32] Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* 2008;3:301–13.
- [33] Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, et al. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 2010;162:474–86.
- [34] Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008;2:141–50.
- [35] Francois M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* 2012;20:187–95.
- [36] Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:386–98.
- [37] Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007;96:41–101.
- [38] Kraaij MD, Vereyken EJ, Leenen PJ, et al. Human monocytes produce interferon-gamma upon stimulation with LPS. *Cytokine* 2014;67:7–12.
- [39] Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008;111:1327–33.
- [40] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11–20.
- [41] Najjar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: a gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* 2016;18:160–71.
- [42] Consensus C, Reinke P, Volk HD. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regen Med* 2015;10:305–15.
- [43] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105:2821–7.
- [44] Xishan Z, Baoxin H, Xinna Z, Jun R. Comparison of the effects of human adipose and bone marrow mesenchymal stem cells on T lymphocytes. *Cell Biol Int* 2013;37:11–8.
- [45] Chen PM, Liu KJ, Hsu PJ, et al. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *J Leukoc Biol* 2014;96:295–303.
- [46] Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells* 2009;27:693–702.
- [47] Engela AU, Baan CC, Peeters AM, Weimar W, Hoogduijn MJ. Interaction between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and regulatory T-cells. *Cell transplantation* 2013;22:41–54.
- [48] Larocca RA, Moraes-Vieira PM, Bassi EJ, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase skin allograft survival and inhibit Th-17 immune response. *Plos One* 2013;8:e76396.
- [49] Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+ CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 2008;26:212–22.
- [50] Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* 2011;60:788–98.
- [51] Ciccocioppo R, Russo ML, Bernardo ME, et al. Mesenchymal stromal cell infusions as rescue therapy for corticosteroid-refractory adult autoimmune enteropathy. *Mayo Clinic Proc* 2012;87:909–14.
- [52] Carrion F, Nova E, Luz P, Apablaza F, Figueroa F. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation. *Immunol Lett* 2011;135:10–6.
- [53] Najjar M, Raicevic G, Boufker HI, et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol* 2010;264:171–9.
- [54] Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:125.

- [55] Franquesa M, Hoogduijn MJ, Bestard O, Grinyo JM. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front Immunol* 2012;3:212.
- [56] Fan L, Hu C, Chen J, Cen P, Wang J, Li L. Interaction between mesenchymal stem cells and B-cells. *Int J Mol Sci* 2016;17:17.
- [57] Franquesa M, Mensah FK, Huizinga R, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells* 2015;33:880–91.
- [58] Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, et al. Inflammatory conditions dictate the effect of mesenchymal stem or stromal cells on B cell function. *Front Immunol* 2017;8:1042.
- [59] Gordon S, Lawson L, Rabinowitz S, Crocker PR, Morris L, Perry VH. Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;181:1–37.
- [60] Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol* 2013;34:216–23.
- [61] Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *Prime Rep* 2014;6:13.
- [62] Gordon S, Pluddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 2014;262:36–55.
- [63] Kerrigan AM, Brown GD. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 2009;214:562–75.
- [64] Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005;142:481–9.
- [65] English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013;91:19–26.
- [66] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787–95.
- [67] Chiossone L, Conte R, Spaggiari GM, et al. Mesenchymal stromal cells induce peculiar alternatively activated macrophages capable of dampening both innate and adaptive immune responses. *Stem Cells* 2016;34:1909–21.
- [68] Braza F, Dirou S, Forest V, et al. Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma. *Stem Cells* 2016;34:1836–45.
- [69] Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 2009;37:1445–53.
- [70] Melief SM, Schrama E, Brugman MH, et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 2013;31:1980–91.
- [71] Nauta AJ, Kruijselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006;177:2080–7.
- [72] Menard C, Tarte K. Immunoregulatory properties of clinical grade mesenchymal stromal cells: evidence, uncertainties, and clinical application. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:64.
- [73] Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103:4619–21.
- [74] Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009;15:42–9.
- [75] Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood* 2011;118:330–8.
- [76] Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 2012;20:14–20.
- [77] Ren G, Su J, Zhang L, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2009;27:1954–62.
- [78] Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, et al. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver natural killer T cells in an inducible nitric oxide synthase- and indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent manner. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;12:e1173–85.
- [79] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 2006;208:64–76.
- [80] Sensebe L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:66.
- [81] Aronowitz JA, Ellenhorn JD. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:932e–9e.
- [82] Shukla L, Morrison WA, Shayan R. Adipose-derived stem cells in radiotherapy injury: a new frontier. *Front Surg* 2015;2:1.
- [83] Dumas A, Eraud J, Hautier A, Sabatier F, Magalon G, Granel B. Interests and potentials of adipose tissue in scleroderma. *Rev Med Interne* 2013;34:763–9.
- [84] Granel B, Dumas A, Jouve E, et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Ann Rheum Dis* 2015;74:2175–82.
- [85] Guillaume-Jugnot P, Dumas A, Magalon J, et al. Autologous adipose-derived stromal vascular fraction in patients with systemic sclerosis: 12-month follow-up. *Rheumatology (Oxford)* 2016;55:301–6.
- [86] Dumas A, Magalon J, Jouve E, et al. Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. *Curr Res Transl Med* 2017;65:40–3.
- [87] Laloze J, Varin A, Bertheuil N, Grolleau JL, Vaysse C, Chaput B. Cell-assisted lipotransfer: current concepts. *Ann Chir Plast Esthet* 2017.
- [88] Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 2006;12:3375–82.
- [89] Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 2008;32:48–55 [discussion 6–7].
- [90] Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, et al. Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2013;66:1494–503.
- [90] Kolle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2013;382:1113–20.
- [92] Coleman SR, Saboeiro AP. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:775–85 [discussion 86–7].
- [93] Laloze J, Varin A, Gilhodes J, et al. Cell-assisted lipotransfer: friend or foe in fat grafting? Systematic review and meta-analysis. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;12:e1237–50.
- [94] Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:1017–26 [discussion 86–7].
- [95] Raposo E, Caruana G, Bonomini S, Libondi G. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem

- cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plast Reconstr Surg* 2014;133:1406–9.
- [96] Chaput B, Bertheuil N, Escubes M, et al. Mechanically isolated stromal vascular fraction provides a valid and useful collagenase-free alternative technique: a comparative study. *Plast Reconstr Surg* 2016;138:807–19.
- [97] Bertheuil N, Varin A, Carloni R, Girard P, Chaput B. Mechanically isolated stromal vascular fraction by nanofat emulsification techniques. *Plast Reconstr Surg* 2017;140:508e–9e.

Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Medicine: State of Play, Current Clinical Trials, and Future Prospects

Jérôme Laloze,^{1,2,†} Loïc Fiévet,^{3,†} and Alexis Desmoulière^{1,*}

¹Faculties of Medicine and Pharmacy, University of Limoges, Myelin Maintenance and Peripheral Neuropathies (EA 6309), Limoges, France.

²Department of Maxillo-Facial and Reconstructive Surgery and Stomatology, University Hospital Dupuytren, Limoges, France.

³STROMALab, Etablissement Français du Sang (EFS)-Occitanie, INSERM 1031, National Veterinary School of Toulouse (ENVT), ERL5311 CNRS, University of Toulouse, Toulouse, France.

[†]These two authors contributed equally.



Alexis Desmoulière, PharmD, PhD

Submitted for publication February 21, 2020.
Accepted in revised form April 21, 2020.

*Correspondence: Department of Physiology,
Faculty of Pharmacy, University of Limoges, 2 rue
du Dr. Marcland, Limoges cedex 87025, France
(e-mail: alexis.desmouliere@unilim.fr).

Significance: Wound healing is a complex process involving pain and inflammation, where innervation plays a central role. Managing wound healing and pain remains an important issue, especially in pathologies such as excessive scarring (often leading to fibrosis) or deficient healing, leading to chronic wounds.

Recent Advances: Advances in therapies using mesenchymal stromal cells offer new insights for treating indications that previously lacked options. Adipose-derived mesenchymal stromal cells (AD-MSCs) are now being used to a much greater extent in clinical trials for regenerative medicine. However, to be really valid, these randomized trials must imperatively follow strict guidelines such as consolidated standards of reporting trials (CONSORT) statement. Indeed, AD-MSCs, because of their paracrine activities and multipotency, have potential to cure degenerative and/or inflammatory diseases. Combined with their relatively easy access (from adipose tissue) and proliferation capacity, AD-MSCs represent an excellent candidate for allogeneic treatments.

Critical Issues: The success of AD-MSC therapy may depend on the robustness of the biological functions of AD-MSCs, which requires controlling source heterogeneity and production processes, and development of biomarkers that predict desired responses. Several studies have investigated the effect of AD-MSCs on innervation, wound repair, or pain management separately, but systematic evaluation of how those effects could be combined is lacking.

Future Directions: Future studies that explore how AD-MSC therapy can be used to treat difficult-to-heal wounds, underlining the need to thoroughly characterize the cells used, and standardization of preparation processes are needed. Finally, how this *a priori* easy-to-use cell therapy treatment fits into clinical management of pain, improvement of tissue healing, and patient quality of life, all need to be explored.

Keywords: adipose-derived mesenchymal stromal cell, wound healing, skin innervation, pain, regenerative medicine, advanced therapy medicinal product

SCOPE AND SIGNIFICANCE

SKIN REGENERATION IS a phenomenon that is increasingly being studied in fundamental and clinical research. Even if increasing numbers of so-

phisticated skin substitutes are now available, they remain difficult to use and are generally expensive. Easily available from adipose tissue (AT), the heterogeneous pool of cells found in

the matrix-free stromal vascular fraction (SVF) and purified adipose-derived mesenchymal stromal cells (AD-MSCs) or even exosomes isolated from these are gaining in use as tools in regenerative medicine, both in autologous or allogeneic methodologies.

This review aims to highlight the pros and cons and describe the impact of these tools on *ad integrum* skin regeneration, including their effects on innervation and pain management.

TRANSLATIONAL RELEVANCE

AD-MSCs are simple to amplify *in vitro*, but their medicinal properties (based on plasticity and secretion of paracrine factors) can be heterogeneous according to their manipulation, including the methods of isolation and culture conditions. This review will focus on the different ways to direct AD-MSC production for the desired clinical purpose. Moreover, the latest innovations using AD-MSCs in regenerative medicine will be discussed, in particular, the possibility of their use associated to biomaterials or as organoids.

Finally, due to their easy access from tissue (*e.g.*, AT), the amount of manipulation is reduced and this should facilitate clinical evaluation; however, standardization of methodologies is necessary to allow valid comparisons, not only between laboratory studies but also between different clinical trials.

CLINICAL RELEVANCE

Advanced therapy medicinal products (ATMPs) show promise in the modulation of wound inflammation, regulation of tissue repair, and pain management. This review will summarize the state of play in various diseases, including burns, excessive scarring, and ischemic diseases. The advantages of using liposuction (or AT aspiration) or dermolipectomy, which allows the separation of superficial and deep AT, are also examined.

The full potential of these cells, in particular their ability to treat loss of tissue and to improve scarring, is discussed with reference to the numerous clinical trials that have actually taken place around the world. It is critical to verify the validity of these clinical trials that must follow well-accepted guidelines (see, *e.g.*, concerning randomized clinical trials, the consolidated standards of reporting trials, or consolidated standards of reporting trials [CONSORT] Statement, consort-statement.org).

BACKGROUND

The normal healing processes

Tissue repair after injury is a complex phenomenon involving intricate and coordinated mechanisms. Normal healing processes are classically described as three overlapping phases (Fig. 1): hemostasis

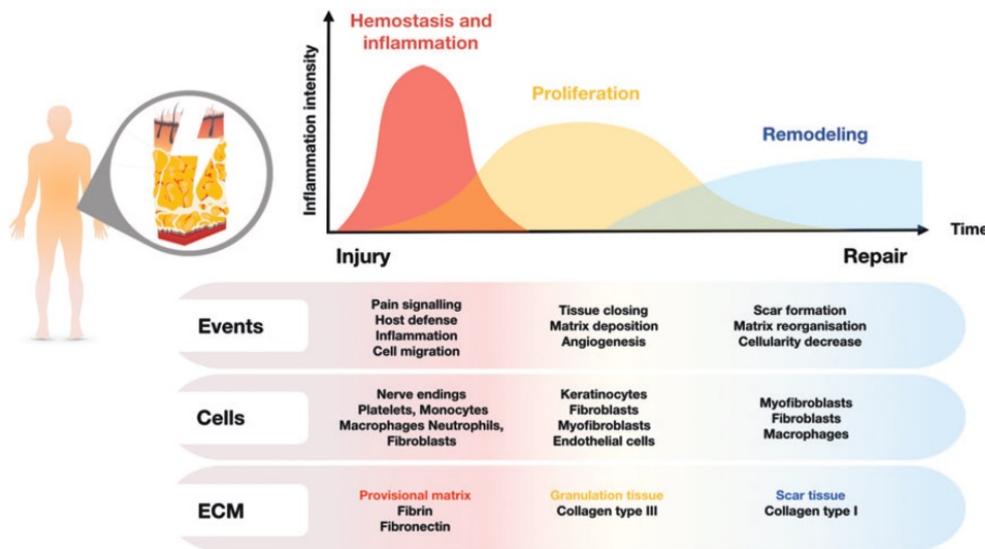


Figure 1. Normal healing processes. Normal tissue repair includes a number of overlapping phases. After injury, there is usually an early hemostasis and inflammatory step. Next, during the proliferation phase, as granulation tissue forms, fibroblasts invade the wound and begin to replace the provisional matrix with a more mature wound matrix. As the granulation tissue phase proceeds, fibroblasts acquire a new phenotype with prominent microfilament bundles. These typical myofibroblasts have been shown to develop a smooth muscle-like phenotype, and are responsible for wound contraction. Keratinocytes proliferate over the granulation tissue leading to wound closure. Finally, during the remodeling step leading to scar formation, there is considerable loss of several cell types, including myofibroblasts, by apoptosis, and the ECM is remodeled together with a final resolution of inflammation. ECM, extracellular matrix. Color images are available online.

and inflammation, proliferation, and remodeling, including final resolution of inflammation.¹⁻⁵

It is important to note that inflammation is present throughout the entire healing process. Obviously, inflammation is important immediately after tissue damage, but persists at a lower level during the subsequent phases, before disappearing completely at the end of the repair process in normal healing. Inflammation after injury is normally modular in nature, with three distinct phases facilitating the restoration of normal tissue architecture and developing in parallel with the three classically described tissue repair phases.

These stages include an early proinflammatory step, in which elements of the innate immune response initiate the repair response by mobilizing the recruitment of key inflammatory cells. In the second major phase, the proinflammatory response begins to subside, with key inflammatory cells such as macrophages switching to a reparative phenotype. In the final stage, tissue homeostasis is restored when the inflammatory cells either exit the site of injury or are eliminated, together with other cells such as myofibroblasts, through apoptosis.⁶

Pathological (acute and chronic) wound healing situations

Disrupting this normal wound healing processes can lead to a number of pathologies. In humans, problems with wound healing can manifest as either delayed wound healing (which occurs, *e.g.*, in diabetes or after radiation exposure) or excessive healing (as occurs with hypertrophic and keloid scars). In chronic wounds, the proliferative and remodeling stages do not readily occur.⁷ The wound thus remains in the inflammatory phase, which does not favor tissue regeneration, and therefore, the wound cannot heal.⁸ Targeting and correcting the cellular and molecular causes of prolonged inflammation in chronic wounds may be an effective method to return them to normal healing states.

Excessive healing is characterized by the deposition of excessive amounts of extracellular matrix (ECM) and by alterations in local cell proliferation and vascularization. This excessive healing commonly occurs after major injuries such as burns, and the resulting pathological healing is referred to as a hypertrophic scar. Such excessive healing can also appear for unknown reasons after a relatively minor trauma, as is the case for keloid scars, which may also have a genetic component to their development.

These two situations of excessive scarring (hypertrophic scar and keloids), which lead to abnormal accumulation of ECM within the skin and

which are often confused, do, however, show distinct histological characteristics.⁹ Hypertrophic scars contain numerous myofibroblasts that usually provoke extensive and dramatic contracture, while keloids, which are devoid of myofibroblasts, do not. This aspect is underlined by the fact that these two lesions require different therapeutic approaches.

Skin innervation and its roles during healing and regeneration

Skin innervation. The vital barrier that the skin represents contains a high-density network of sensory and autonomic nerve fibers¹⁰ (Fig. 2). It has become increasingly clear that this cutaneous innervation influences skin repair processes.

Essentially, nociceptors involve the free endings of poorly myelinated A δ fibers and of nonmyelinated C fibers. In particular, C fibers, which are abundant, respond to many forms of noxious stimuli, including mechanical stimuli, heat and cold, and chemical stimuli. Recently, in addition to the well-known structures that are already well described, a nociceptive glio-neural complex has been identified in mice.¹¹ Indeed, in the epidermis, nociceptive fibers form an intricate, mesh-like network with processes of nociceptive Schwann cells, which essentially contribute physiologically to the sensation of mechanical pain.

Interestingly, in the case of wound injury, glial cells along the injured nerve bundles change their phenotype to participate in the healing process. Indeed, after undergoing a dedifferentiation and developing expansion processes, injury-reprogrammed glial cells were showed to promote wound contraction by transforming growth factor (TGF)- β 1-mediated activation of myofibroblast formation.^{12,13} In addition, it is important to underline that keratinocytes can modulate nociception.¹⁴

Neuropeptides. Numerous neuropeptides that play physiological roles are expressed and released from cutaneous nerve endings, including calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), tachykinin/neurokinin A (TAC1), and vasoactive intestinal peptide (VIP). Moreover, cutaneous cells themselves such as keratinocytes, myofibroblasts, endothelial cells, and immune cells are capable of releasing neuropeptides. It is recognized that these neuropeptides are essential in the homeostasis of all connective tissues and therefore in their healing processes.

These neuropeptides are involved in different phases of wound healing.^{11,15,16} In addition, the density of neuropeptide-containing (*e.g.*, neuro-

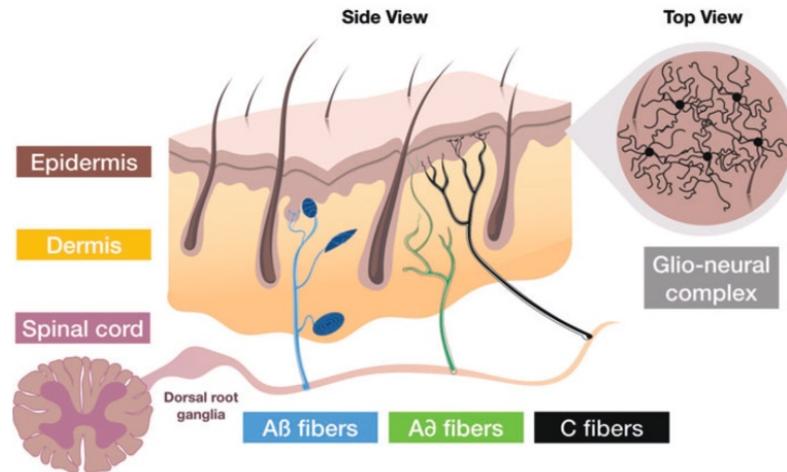


Figure 2. Skin innervation. The sensory endings, which extend throughout all layers of the skin, transfer signals from mechanoreceptors, nociceptors, and thermoreceptors to the cell bodies located in the dorsal root ganglia. From there, stimuli, including itching, pain, and burning, are forwarded to specific areas in the brain through the spinal cord. Cutaneous sensory fibers are classified, according to diameter and speed of conduction, as A β , A δ , and C fibers. A β fibers are fast and have large diameter, whereas C fibers are slow and have small diameter. A β and A δ are myelinated by accompanying Schwann cells. The fragile C fibers are protected by nonmyelinating Schwann cells. Mechanical stimuli are detected by mechanoreceptors associated with sensory corpuscles (Meissner, Pacini, Ruffini corpuscles, and Merkel discs) through A β fibers, while pain and temperature are detected, respectively, by nociceptors and thermoreceptors through free endings of A δ and C fibers. Filament-like protrusions associating nerve endings (C fibers) and mechanosensitive Schwann cell processes that extend into the epidermis, form the glio-neural complex (recently described in mice), a mesh-like structure that also participates in mechanical nociception.¹¹ Color images are available online.

peptide Y, VIP, SP, and CGRP and dopamine beta-hydroxylase) nerve fibers was found to be higher in tissues where there was excessive scarring compared to normal skin tissue samples.^{17,18}

Skin denervation. It is already established that peripheral neuropathies with a loss of sensitivity, as seen in spinal cord injury (SCI) or in type 2 diabetes, leading to pressure sores or foot perforating disorders, or as seen in leprosy, can induce a drastic retardation of the skin healing process. This often leads to the need to have surgical grafting. Specifically, damage to skin innervation leads to delayed healing and to the development of abnormal innervation in the scar tissue.¹⁹ Smith and Liu have shown, using capsaicin to induce sensory denervation, that loss of sensory innervation impairs cutaneous wound healing in developing rats, as manifested by delayed re-epithelialization and failure of the wound area to decrease normally over 21 days.²⁰

In another study, the use of surgical denervation not only halted regeneration in the super-healing MRL/MpJ mouse strain but also had a severe negative effect on normal ear wound repair in the C57BL/6 mouse strain.²¹ In addition, inducing sensory neuropathy using resiniferatoxin in rats delayed remodeling of the granulation tissue after a burn injury.²² In summary, denervation of the skin not only leads to a lack of sensation that pro-

vides an early warning sign of injury but also removes signals that, in normal conditions, positively promote wound repair.

Pain associated with skin healing and scarring

Indeed, pain is the very first physiological phenomenon after any injury. We can suggest that this painful stimulus initiates healing. Damage to cutaneous nerve endings induces centripetal influx (action potentials) leading to pain, and centrifugal influx in nearby nerve endings leading to the release of SP, which maintains pain, and of neuroinflammatory mediators such as histamine, serotonin, and prostaglandins that initiate the inflammation process.¹⁶ Of note, skin denervation experiments impair pain and wound healing in several models.²³ It is therefore important to maintain this initial nociceptive stimulus either related to persisting pain or not.

Thus, patients with pathologies that stop or slow down such messages may then have their wounds heal in a pathological way (delayed or chronic wounds). However, pain may abnormally persist or may even appear when the wound is healed, inconveniencing the patient and often leading them to consult a physician. The aim of regenerative medicine is to manage this chronic pain to improve patient quality of life and restore physiological healing. Interestingly, after injury, inflammation is also associated with the peripheral release of endogenous

opioid peptides by immune cells that infiltrate injured tissue and additionally by neural cells.

Opioid analogs, such as morphine, are frequently used as exogenous drugs for systemic postoperative pain relief, including treatment of the wound and ongoing inflammatory symptoms. Surprisingly, Dromard and colleagues have shown that opioids prevent regeneration of AT, in adult mammals, through inhibition of reactive oxygen species production.²⁴ Using naloxone, an opioid antagonist, they have been able to rescue regeneration of the fat pad after surgical resection, suggesting that regeneration could agree with the well-known adage “no pain no gain.” If opioids do alter regenerative capacities, there is an urgent need to develop new strategies for pain management, and mesenchymal stromal cell (MSC) therapy appears to represent a promising alternative.²⁵

Mesenchymal stromal cells

MSCs are multipotent cells that reside in tissues and can give rise to bone, cartilage, adipocytes, or vascular smooth muscle cells.^{26,27} In the 1960s and 1970s, Friedenstein, using murine bone marrow (BM) culture, described non-hematopoietic, plastic-adherent cells that were able to generate colony-forming unit-fibroblasts. These MSCs have a high proliferation potential that makes them relatively easy to amplify *ex vivo*.²⁸ Since this discovery, MSCs have been identified in several tissues other than the BM, including the dental pulp,²⁹ umbilical cord,³⁰ placenta,³¹ and AT.³²

A panel of international experts suggested establishing criteria for characterizing MSCs: on one hand, a phenotypic characterization using lists of positive (CD90, CD73, and CD105), and negative (CD45, CD34, CD31, and MHC class II molecules) cell membrane markers; and on the other hand, their multipotency to differentiate *in vitro* toward the mesodermal lineage (osteoblast, chondrocyte, and adipocyte lineages).³³ Controversial data suggest that MSCs can also differentiate into other cell types such as endothelial cells or neurons.³⁴

It should be noted that AD-MSCs share similar characteristics with BM-derived MSCs (BM-MSCs).³⁵ However, in contrast to BM-MSCs, AD-MSCs express the CD34 marker, which decreases after several passages in culture.³⁶ The accessibility of AT, being minimally invasive compared to that of BM, has led to greater clinical use of AD-MSCs in recent years. However, BM-MSCs remain the most widely used MSCs currently.^{37,38} This review aims to evaluate the pertinence of AD-MSC therapies in regenerative medicine and pain management.

DISCUSSION

Advancing AD-MSCs into therapeutic use represents a real challenge due to the heterogeneity and plasticity of AD-MSCs and the varying production processes in obtaining them.

Isolation of adipose derived mesenchymal stromal cells

Adipose tissue

AT develops in the fetus from the 14th week of pregnancy.³⁹ It is a soft connective tissue, rich in fat storage cells, which represents 20–30% of the total mass of the adult human body. This varies according to gender, age, lifestyle, and pathologies that may affect some individuals. Historically, AT has been classified into anabolic white adipose tissue (WAT) and catabolic brown adipose tissue (BAT). It is mainly composed of adipocytes (white for WAT and brown for BAT) that are responsible for the specific function of the tissue.

Other cell types contribute to other AT functions and these are known as the nonadipocyte fraction or SVF of the tissue. The SVF is mainly composed of endothelial cells, hematopoietic cells (B, T, and NK lymphocytes, macrophages, granulocytes, mast cells, etc.), and progenitor cells usually known as AD-MSCs,^{40,41} as well as fibroblasts that secrete the ECM, which includes mainly collagens and elastin (Fig. 3).

Modalities of extraction

Enzymatic dissociation. In 1964, Rodbell described a way to isolate fat cells from AT using collagenase digestion.⁴³ Since then, enzymatic digestion followed by several centrifugation steps has been the ‘gold standard’ method for isolation of SVF from the AT (Fig. 4).

Mechanical dissociation. Several manual methods of mechanical dissociation have been described. These are listed in Table 1. All of the techniques listed below used liposuction (AT aspiration) rather than dermolipectomy to remove the AT. Unlike liposuction, dermolipectomy tissue pieces are surgical specimens (*e.g.*, abdominoplasties), which allow recovery of skin with the AT. The AT is then separated from the skin, using scalpels or scissors, in the laboratory. In this case, the AT would be less affected by the random locations of liposuction. Moreover, it is easy to choose between the two layers of AT on these fresh pieces, compared to liposuction.

To our knowledge, only one recent study compared these two types of tissue sample origin (liposuction or dermolipectomy) using enzymatic digestion alone or an association of enzymatic and mechanical digestion (mechanical distortion).⁵²

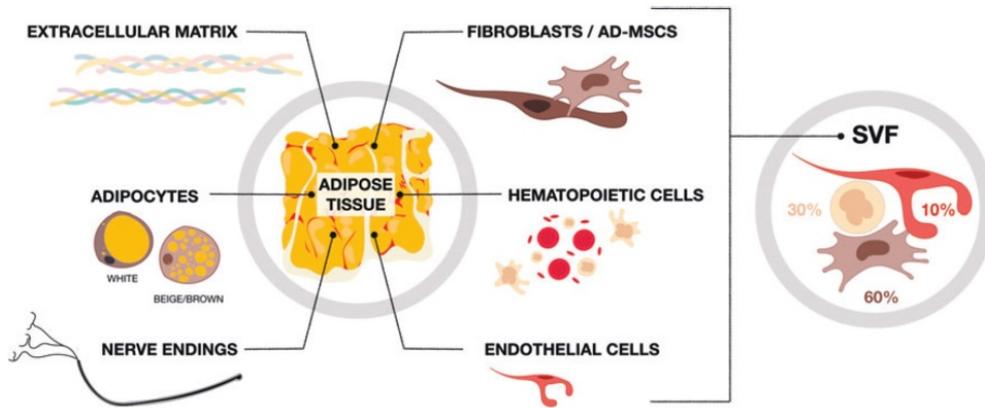


Figure 3. Components of adipose tissue. Adipose tissue is composed essentially of a multitude of adipocytes aggregated in lobules by the ECM (either *white/beige* in white adipose tissue or *brown* in brown adipose tissue). Adipose tissue is a richly innervated tissue that also contains a non-adipocyte fraction, also known as the SVF, composed mainly of ~60% fibroblasts and progenitor cells (AD-MSCs), 30% hematopoietic cells, and <10% endothelial cells.⁴² SVF, stromal vascular fraction; AD-MSC, adipose-derived mesenchymal stromal cell. Color images are available online.

They demonstrated that the association of the two types of digestion results in an increase of stem cell yield by 5.0-fold for the excised AT. No difference was shown with the enzymatic digestion alone. They speculated that the addition of mechanical digestion results in a finer tissue disruption, which increases the AT surface area, facilitating digestive enzyme action.

Finally, it is common to use adrenaline and lidocaine before liposuction to decrease the risk of bleeding, but it is known that adrenaline decreases the postoperative effectiveness of AT reinjection, and therefore may affect the capacities of the cells that

compose the SVF.⁵³ Indeed, depending on the desired results, the clinician may prefer to use liposuction or dermolipectomy to retrieve SVF or AD-MSCs.

The majority of the studies listed in Table 1 compare various new mechanical techniques to the enzymatic method. They all examine membrane characteristics to varying degrees of detail, but only the study of Condé-Green specified the results obtained in terms of different subpopulations present in the SVF.⁵⁴ After enzymatic digestion, more AD-MSCs and endothelial cells, but fewer hematopoietic cells and monocytes/macrophages, are obtained. However, it would be very interesting to study if

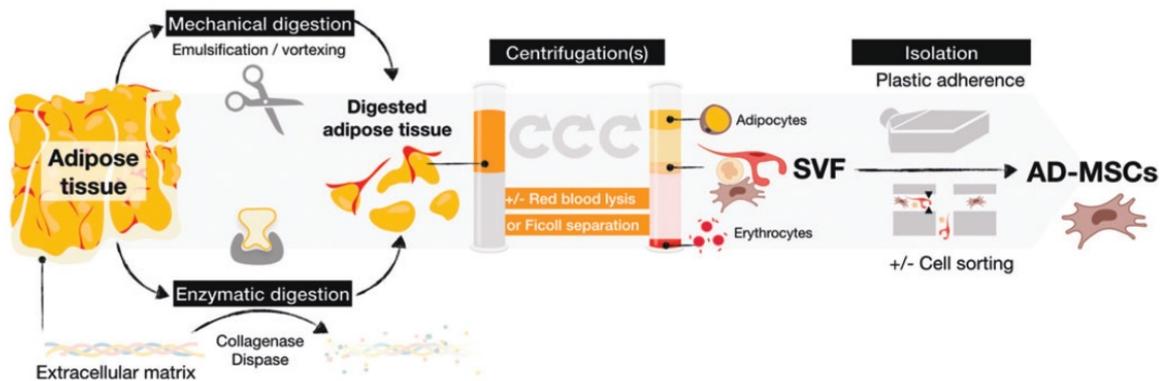


Figure 4. Different methods to obtain AD-MSCs from adipose tissue. (1) Mechanical and/or enzymatic digestion (collagenase and/or dispase) leads to fragmented adipose tissue. (2) Centrifugation(s) are performed to remove adipocytes and red blood cells (by lysis or Ficoll separation) leading to recovery of the SVF. (3) Isolation of AD-MSCs from SVF is commonly performed by culturing cells into plastic flasks, allowing adherence of AD-MSCs and removal of the nonadherent cell fraction throughout medium changes. (4) The recovery of AD-MSCs requires enzymatic detachment of cells with trypsin, a process that can possibly lead to genetic modification of the cells. AD-MSC isolation can also be performed by cell sorting of the SVF. Color images are available online.

Table 1. Comparison of different adipose-derived mesenchymal stromal cell isolation methods

Article	Isolation Method	Cell Concentration (Number/mL)	AD-MSCs (% of total cells)	Comments
Zuk <i>et al.</i> ³²	Enzymatic (gold standard)	4,000,000	14.3	AD-MSCs per gram of AT collagenase ± dispase
Baptista <i>et al.</i> ⁴⁴	Mechanical	240,000	5	PBS washing + centrifugation at 900 <i>g</i> for 15 min
Baptista <i>et al.</i> ⁴⁴ , Battah <i>et al.</i> ⁴⁵	Mechanical	25,000	NA	Erythrocyte lysis 15 min + centrifugation at 1200 <i>g</i> for 10 min
Shah <i>et al.</i> ⁴⁶	Mechanical	480,000	5.2	PBS washing under agitation during 1–2 min + centrifugation at 1200 <i>g</i> for 5 min
Tonnard <i>et al.</i> ⁴⁷	Mechanical (nanofat grafting)	[19,000–20,000]	5.1	30 inter-syringe passages + filtration at 500 μ M
Raposo <i>et al.</i> ⁴⁸	Mechanical (vortexing)	125,000	5	PBS washing + vortex 600 vibrations/min + centrifugation at 1600 rpm for 6 min
Condé-Green <i>et al.</i> ⁴⁹	Mechanical	[11,500–23,000]	[6–13]	High-speed centrifugation + vortex for 3 min + conventional centrifugation
Markarian <i>et al.</i> ⁵⁰	Mechanical	15,000	NA	Centrifugation at 800 <i>g</i> or 1280 <i>g</i> for 15 min
Mashiko <i>et al.</i> ⁵¹	Mechanical	[40,000–50,000]	[1.4–12.8]	Different trypsin concentration + lower centrifugation at 600 <i>g</i> for 10 min
	Mechanical (micronizing)	[700,000–800,000]	20	Passing throw rotating blade device centrifugation at 2300 <i>g</i> for 5 min squeeze vs. emulsification ⁴⁷

AD-MSC, adipose derived-mesenchymal stromal cell; AT, adipose tissue; PBS, phosphate-buffered saline; NA, not available.

there are differences in terms of subpopulations of AD-MSCs. Indeed, some subpopulations may have different characteristics and therefore lead to a different clinical impact.

However, interestingly, a recent study has shown that mechanical dissociation of tissue induces changes in gene expression in tissue subpopulations.⁵⁵ Concerning AT, it would, therefore, be relevant to review the SVF extraction process in order to decrease these variabilities.⁵⁶ The other potential biases found in these studies are the small size of the patient groups studied and the lack of analysis of phenotypic and secreted factors. Only Mashiko *et al.* compared two mechanical techniques (squeezing and emulsification), and did not report any significant difference in the percentage of CD31, CD45, and CD34+ cell populations.⁵¹

Finally, no published study has compared adipocyte, osteoblastic, or chondrocyte differentiation, or studied immunoregulation. This last point appears essential, since it is partly due to their immunomodulatory effects that AD-MSCs play a role in skin regeneration and pain treatment (see below).

Although not technically innovative, the first *in vitro* study comparing the main mechanical dissociation methods (vortex/centrifugation and nanofat grafting) with enzymatic digestion was published by Chaput *et al.* in 2016, demonstrating that cells isolated by these two techniques were AD-MSCs.⁵⁷ These AD-MSCs were able to proliferate, adhere to plastic, and differentiate into adipocytes, chondrocytes, and osteocytes. This study demonstrated that once cultured, AD-MSCs prepared by mechanical dissociation had immunomodulatory capacities through their ability to inhibit T lymphocyte proliferation, thus demonstrating the validity of the mechanical methods.

***In vivo* heterogeneity of source**

MSCs from different tissue sources share common markers.³³ However, source heterogeneity affects MSC potential in terms of differentiation and proliferation. In a recent study, Brennan *et al.* demonstrated that AD-MSCs display inferior osteogenesis and superior angiogenesis capacities *in vivo* compared to BM-MSCs.⁵⁸ AD-MSCs are more likely to differentiate into adipocytes, indicating the persistence of the footprint that their tissue origin has upon MSCs. The choice of the tissue thus is likely to be essential depending on the desired clinical application.

The human body has various types of AT, which exhibit functional differences based on their regional distribution. Several studies have already compared the characteristics of AD-MSCs between different locations of the body (visceral vs. subcutaneous).^{42,59} The harvesting site is believed to affect the yield for cell isolation along with cell growth properties.⁶⁰ Moreover, AD-MSCs, depending on their origin, not only display morphological differences⁶¹ but also exhibit some metabolic differences.^{59,62,63}

Anatomically, it is accepted that two AT subtypes are present: subcutaneous (deep and superficial) and internal (intrathoracic, visceral, and retroperitoneal).⁶⁴ Subcutaneous AT is itself separated into two layers by superficial fascia, a very fine ubiquitous collagenous membrane well recognized by plastic surgeons. This shows a complex architecture, which was originally described a long time ago. Basically, the superficial fascial system separates the subcutaneous AT into two layers: the areolar layer or superficial subcutaneous AT (sSAT) and the lamellar layer or deep subcutaneous AT (dSAT)^{65–70} (Fig. 5).

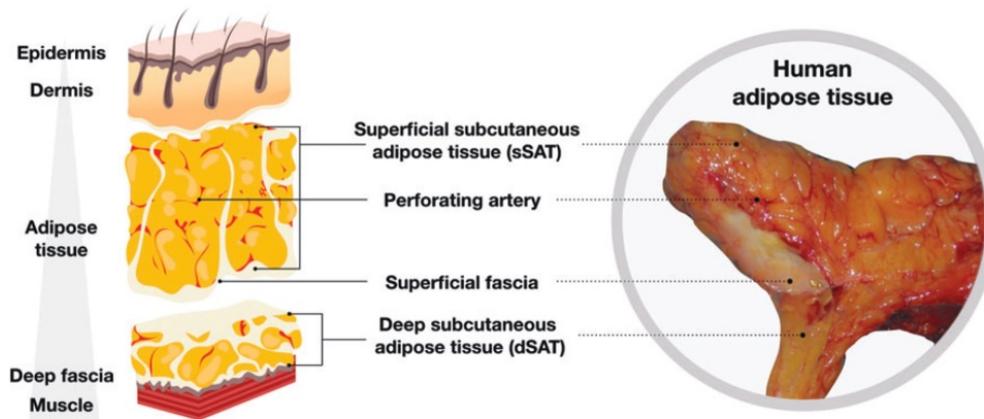


Figure 5. Organization of adipose tissue. sSAT is located directly below the skin and is formed by small fat lobules tightly packed between fibrous septae, it derives from the superficial fascial system, and is oriented perpendicularly to the skin. dSAT lies below the superficial fascia and consists of large fat lobules, loosely packed within widely spaced vertical and oblique fibrous septae. The sSAT is widely distributed all over the body, whereas dSAT is more represented in specific body areas such as abdomen and hips.^{71–76} dSAT, deep subcutaneous adipose tissue; sSAT, superficial subcutaneous adipose tissue. Color images are available online.

Although transcriptomic analysis comparing sSAT and the dSAT underlines the dSAT inflammatory profile in its globality,⁷⁴ no study has clearly compared the AD-MSCs isolated from these two sources. AD-MSCs are easily extracted from the AT and readily available, thanks to the liposuction commonly practiced in plastic surgery. However, in general, surgeons ignore the superficial fascia and collect both layers. Thus, if different AD-MSC properties do exist between the sSAT and the dSAT, it would be of interest to modify clinical practice and aspirate only one layer, depending on the desired use.

Interestingly, Schwalia *et al.* have demonstrated the heterogeneity of subcutaneous AD-MSCs in mice using scRNAseq.⁷⁷ Indeed, at least two populations of AD-MSCs have been identified in mice, derived from the Lin-negative population (Lin expression distinguishes mostly immune cells, while Lin-negative cells are all the other stromal cells) of inguinal white adipose tissue (iWAT) and epididymal white adipose tissue (eWAT).⁷⁸ Approximately equivalent in number, the first AD-MSC population could be distinguished by overexpression of genes corresponding to “regeneration,” “positive regulation of secretion by the cell,” and “positive regulation by migration,” and the second population by “extracellular exosomes.”⁷⁸

Recently, in human AT, it was shown that adipocytes generated from different AD-MSC subtypes displayed distinct metabolic and endocrine profiles.⁵⁹ Moreover, Liu *et al.* showed that cultured AD-MSCs from human liposuction tissue are composed of heterogeneous subpopulations.⁷⁹

Since bariatric surgery is the main source of AT, consideration about possible effects of body mass index and aging on AD-MSCs is something that should be taken into account. AD-MSCs isolated from AT of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate a loss of “stemness” and an increased commitment to an adipocyte-like phenotype.⁸⁰

Other studies suggest that the tissue regenerative properties of autologous AD-MSCs are also impaired as a function of age and gender.^{81–83} Experiments from the Gimble laboratory revealed that SVFs from iWAT, eWAT, and BAT in younger male mice contained more preadipocytes, hematopoietic progenitor cell-like cells, and CD25⁺ and FoxP3⁺ T regulatory cells compared to SVFs from middle-aged mice.⁸³ In addition, male iWAT contained more leukocytes and AD-MSCs than female iWAT.

These observations highlight that one of the major issues affecting any successful cell therapy is the heterogeneity of the biological starting material, which needs to be decreased or at least controlled for.

AD-MSC plasticity

Both the physical and chemical microenvironment deeply influence cell behavior *in vivo*. Similarly, the AD-MSC expansion culture conditions, either in two-dimensional (2D) plastic flasks or in three-dimensional (3D) bioreactors on biomaterials, will modify cell behavior and identity.

As mentioned above, MSCs differentiate into the three classical mesodermal lineages: adipocytes,

chondroblasts, and osteoblasts, in response to defined *in vitro* stimuli (Fig. 6). The differentiation can be shown morphologically (lipid droplets, sulfated proteoglycans, and calcium staining, respectively) and by using the expression of specific biomarkers (*PPARG*, *SOX9*, and *SP7* respectively). In terms of wound healing, enhancing the regeneration of adipocytes surrounded by vessels and nerves is the goal.

Adipocyte differentiation. MSCs produce mature and functional adipocytes through a differentiation process termed adipogenesis. All MSCs can form adipocytes, but AD-MSCs are specialized in adipogenesis.⁸⁴ AD-MSCs follow a first step of commitment into the adipocyte lineage from the microenvironment to give rise to an adipocyte precursor (also called a preadipocyte). This initiation is mediated by the activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (*PPAR* γ), a master transcriptional factor discovered in 1994.⁸⁵ Due to alternative splicing, *PPAR* γ exists in two isoforms that differ in the N-terminal part of the protein: *PPAR* γ 1 and *PPAR* γ 2. Only *PPAR* γ 2 is required and alone is sufficient for adipocyte formation.⁸⁶

Subsequently, a terminal step of maturation to generate adipocytes can be detected by the upregulation of specific genes such as *CEBPB*, *FOSB*, or *JUNB*.⁸⁷ In parallel, during adipogenesis, the cell shape changes from an elongated and fibroblastic phenotype to a circular appearance, together with accumulation of lipid.⁸⁸ These morphological changes are regulated by the ECM through cyto-

skeleton reorganization and the regulation of signaling cascades leading to adipogenesis.⁸⁹ Of note, bone morphogenetic protein (BMP) receptor-1A+ AD-MSCs showed an enhanced ability to generate *de novo* fat, underlining the role of BMP pathway in the regulation of adipogenesis.⁹⁰

In summary, adipocyte differentiation capacity of AD-MSCs is generally examined by their transcriptomic profile (overexpression of the *PPARG* and *ADIPOQ* genes, then, *CEBP*, *FOSB*, and *JUNB*) and by the cytoplasmic accumulation of lipid droplets highlighted by conventional Oil Red O staining. Interestingly, the differentiation of AD-MSCs into fibroblasts has not been clearly demonstrated. It could be due, in part, to the fact that the notion of fibroblastic cells can refer to a lot of different cell phenotypes and that the heterogeneity of fibroblast phenotypes in different organs is well known.

For example, in adult human skin, Philippees *et al.* characterize at least four distinct fibroblast populations.⁹¹ Tabib *et al.* identify multiple discrete dermal fibroblast populations, including two major and five minor fibroblast types, also suggesting functional heterogeneity.⁹² Interestingly, one of these populations expresses dipeptidyl peptidase-4/CD26, a marker shared with mesenchymal cells derived from AT progenitor cells and which are present in human AT.⁹³ Curiously, it has been shown that in the mouse, during wound healing, adipocytes regenerate from myofibroblasts.⁹⁴ However, further investigations are definitely needed to elucidate the point as to whether AD-MSCs can acquire a fibroblast phenotype.

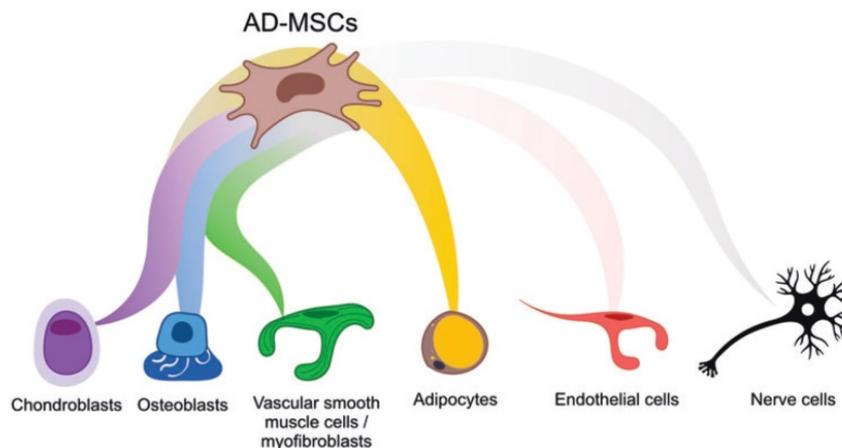


Figure 6. AD-MSC plasticity. AD-MSCs (brown) are able to differentiate *in vitro* into the three classical mesoderm lineages, chondroblasts (violet), osteoblasts (blue), and adipocytes (yellow). AD-MSCs can also give rise to vascular smooth muscle cells or myofibroblasts (green). More controversially, AD-MSCs may be able, in some culture conditions, to transdifferentiate into other lineages such as endothelial cells (pale red) or nerve (black) cells. Color images are available online.

Endothelial differentiation. AD-MSC involvement in blood vessel formation has been shown in the literature.⁹⁵ Experiments have shown that SVF-derived cells cultured in a basement membrane matrix (Matrigel®)⁹⁶ and in a defined medium (*e.g.*, endothelial cell growth medium-2) readily form vascular-like structures.^{95,97,98} AD-MSCs cultured in 3D assist vessel stabilization by cell–cell contact, mimicking *in vitro* their native perivascular localization.⁹⁸ Suga *et al.* have shown that transplanted AD-MSCs are preferentially retained in ischemic AT where they exert an angiogenic effect mainly through a paracrine mechanism.⁹⁹

Indeed, there is strong evidence that infused human MSCs have higher engraftment efficiencies within inflammatory or injury sites.¹⁰⁰ However, after intravenous injection, potential MSC migration to these sites is generally impeded by cell trapping within the lung.¹⁰¹ Although no studies have thus far robustly demonstrated clear AD-MSC transdifferentiation into endothelial cells, we cannot entirely exclude it. AD-MSCs possess greater proangiogenic ability than BM-MSCs, which is why they have been tested in clinical trials for lower limb ischemia (see below).^{102,103}

Neural differentiation. Findings concerning the participation of AD-MSCs in the formation of functional neurons are also contradictory. Some studies have confirmed their differentiation into neuronal cells, both morphologically and functionally, induced by specific culture media conditions^{34,104} or by reprogramming mediated by SOX1 or SOX2 transcription factors.^{105,106} In these studies, neural differentiation was characterized by immunohistochemistry techniques using enolase, β III-tubulin, glial fibrillary acidic protein, S100 protein, myelin basic protein, neuronal nuclei protein, neurofilament medium polypeptide, and microtubule-associated protein 2 staining.

Neural transcriptomic changes were also shown with an increase in the following genes: neuron markers (*TUBB3*, *GFAP*, *ENO1*, *RBFOX3*, *NCAM1*, *MAP2*, *NEFM*, and *GAP43*), glial cell markers (*SLC1A3*, *FABP7*, *S100 β* , and *SEPT4*), and pluripotent genes (*NANOG*, *OCT4*, and *SOX2*).^{107–109} Many researchers see potential for the treatment of nerve injuries using AD-MSCs; thus, confirmation of their participation in neuronal regeneration remains an important challenge.^{110–112}

Paracrine mode of action: trophic, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties

Aside from their capacity of multipotentiality, the paracrine properties of AD-MSCs may also be

beneficial in favoring tissue healing and regeneration in different organs. Delivery of these paracrine factors from AD-MSCs to other cells could be by a variety of pathways (Fig. 7): direct cell contact, extracellular secretion, or mediated extracellular vesicle (EV) secretion.

EVs are small vesicles characterized by a phospholipid bilayer and they contain a large variety of proteins, DNA, mRNA, and miRNAs. Two main types of EVs have been described: the first being small-size EVs called “exosomes” (<150 nm) and the second being microvesicles (also called microparticles) (150–1,000 nm). Apoptotic AD-MSCs are also able to transfer paracrine factors after efferocytosis (phagocytosis of apoptotic bodies) from macrophages in the case of a wound injury.¹¹⁴

Trophic factors are proteins that can promote cell growth and viability. Vascularization is a key point not only in the wound healing process but also in the case of organ transplantation. One of the major trophic functions of AD-MSCs relies on supporting angiogenesis. Paracrine AD-MSC secretion of factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor, and angiopoietin-1 (ANGPT1) lead to recruitment of adjacent endothelial progenitor cells *in vivo*,^{115–118} and thereby may improve tissue reperfusion. In the case of a wound injury, CXCL12 secretion by AD-MSCs also promotes recruitment of other immune cells and progenitors to the damaged site.¹¹⁹

Therapeutic effects of AD-MSCs in preclinical models of neurodegenerative diseases¹²⁰ have been previously highlighted, especially in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Huntington’s disease, multiple sclerosis (MS), Parkinson’s disease, and SCI.¹²¹ Indeed, AD-MSCs are able to secrete different kinds of proneurogenic cytokines to enhance neuronal growth (Fig. 8). It has been shown that AD-MSCs, stimulated by interferon- β , secrete brain-derived neurotrophic factor (BDNF).¹²²

BDNF is involved in the survival of existing neurons and in promoting the growth and differentiation of new neurons and synapses. In addition to neurotrophic BDNF, stimulation of AD-MSCs by a cytokine cocktail (composed of forskolin, fibroblast growth factor [FGF]-2, platelet-derived growth factor-AA, and neuregulin1- β 1) enhanced the secretion of nerve growth factor (NGF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF).¹²³ These cytokines have been shown to increase neurite outgrowth *in vitro*¹²⁴ and nerve extension after injury *in vivo* in a rat peripheral nerve injury model.¹¹⁶

AD-MSCs may also help to ease allodynia and hyperalgesia experienced in dorsal root ganglia sensory nerves as GDNF has been shown to mod-

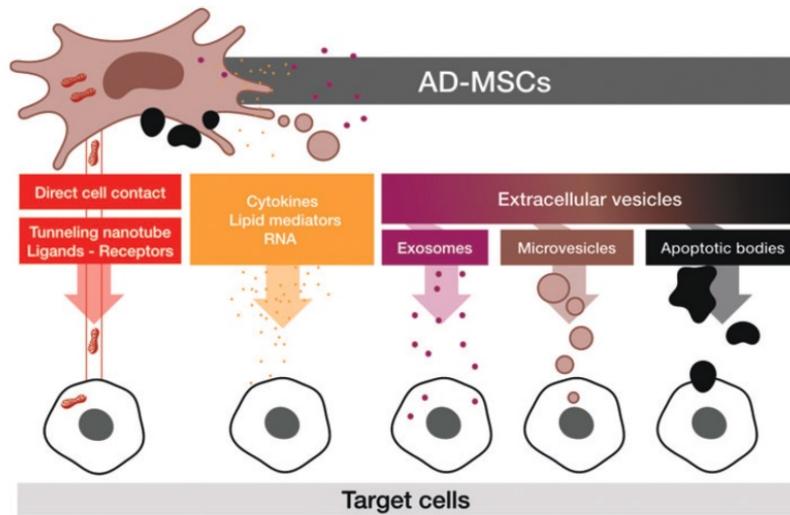


Figure 7. AD-MSC paracrine transfer mode of action. AD-MSCs are able to transfer cellular materials through direct cell contact (*red*), for example, mitochondria by forming tunneling nanotubes¹¹³ or enhancing cell target signaling by ligand-receptor cell-cell contact. AD-MSCs may also transmit information to target cells through indirect paracrine functions (*orange*), which may or may not be mediated by extracellular vesicles containing exosomes (*purple*), microvesicles (*brown*), or apoptotic bodies often subject to efferocytosis (*black*).¹¹⁴ Color images are available online.

ulate neuropathic pain in chronic constriction injury of the left sciatic nerve in rats.¹²⁵ Furthermore, in a clinical study of 37 patients with ALS, improvements in organs were correlated with the paracrine actions of neurotrophic factor BDNF and the angiogenic factor VEGF, with these factors acting synergistically.¹²⁶

AD-MSCs amplified *in vitro* do not express HLA-class II molecules or costimulatory molecules.¹²⁷

Thanks to this feature, cultured AD-MSCs are considered hypoimmunogenic, raising the scope for allogeneic uses. However, AD-MSCs have the ability to inhibit immune cell activity (Fig. 8) by a “licensing” signal from an inflammatory environment.¹²⁸ They have been found to suppress a broad range of immune cells, including T, B, and natural killer lymphoid cells, and to affect functions of myeloid cells such as monocytes, dendritic cells,

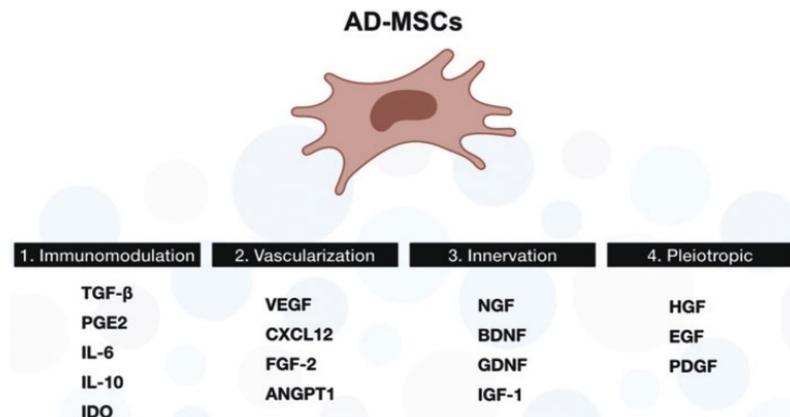


Figure 8. Summary of major cytokines secreted by AD-MSCs. List of predominant cytokines related to the following: 1. immunomodulation: TGF-β, PGE2, IL-6/10, and IDO; 2. vascularization: VEGF, CXCL12, FGF-2, and ANGPT1; 3. innervation: NGF, BDNF, GDNF, and IGF-1; and 4. pleiotropic: HGF, EGF, and PDGF. TGF-β, transforming growth factor-β; PGE2, prostaglandin E2; IL, interleukin; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; VEGF, vascular endothelial growth factor; CXCL12, C-X-C motif chemokine 12; FGF-2, fibroblast growth factor-2; ANGPT1, angiopoietin-1; NGF, nerve growth factor; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; IGF-1, insulin growth factor-1; HGF, hepatocyte growth factors; EGF, epithelial growth factors; PDGF, platelet derived growth factor. Color images are available online.

and macrophages.^{129–131} Indeed, AD-MSCs help to orient the polarization of macrophages from a proinflammatory M1 phenotype toward an anti-inflammatory M2 phenotype, thereby favoring tissue regeneration by resolution of inflammation through prostaglandin E2 (PGE2) secretion.^{132,133}

AD-MSCs, thanks to their immunomodulatory cytokines (PGE2, interleukin [IL]-6, etc.), have been widely used in inflammatory and autoimmune diseases.¹³⁴ Interestingly, there appears to be no significant difference between the release of these factors by AD-MSCs and other types of MSCs.¹³⁵ PGE2 secreted by AD-MSCs has been shown to mediate switching of the proinflammatory profile of M1-like macrophages to the M2-like phenotype,¹³³ supporting a specific role for AD-MSCs in inflammation resolution. AD-MSCs have also been reported to secrete IL-6,¹³⁶ a pleiotropic cytokine that regulates immune responses, acute phase reactions, and hematopoiesis, and may play a central role in host defense mechanisms.

Use of AD-MSCs in tissue engineering

In addition to their use in autologous fat transfer (lipofilling) or for their paracrine secretion, AD-MSCs are increasingly used in combination with biomaterials. As Gillies said even in his time, “replace like to like,” meaning that a tissue must be replaced by an equivalent tissue in terms of function and structure.¹³⁷ Thus, to replace a loss of skin, it is necessary to provide histologically identical skin. At present, only autografts provide this possibility, but these are limited by the lack of donor areas and the morbidity resulting from the intervention. Only advances in tissue engineering may one day lead to ideal outcomes.

To overcome this limitation, cultured epidermal autografts (CEA), consisting of keratinocytes, were developed to provide enough autologous skin for the patient.¹³⁸ However, the routine use of CEA was hampered by its high risk of recurrent open wounds on the recipient site, long-term fragility, and increased rates of scar contractures.

The concept of tissue engineering in regenerative medicine integrates all of the technologies using living cells or biomaterials (synthetic or natural), to reconstruct or regenerate human tissues and organs, replace a deficient organ, or modify the body's genes. It is based on three inseparable pillars: cells, biomaterials used as scaffolds, and proteins (*e.g.*, growth factors).¹³⁹

MSC-based therapy combined with artificial scaffolds offers a promising strategy to promote wound healing or complete reconstruction of full-thickness skin. Trotter *et al.* have presented a

successful concept of a scaffold-free skin substitute.¹⁴⁰ Their method is based on the endogenous production of the ECM components by stromal cells (such as dermal fibroblasts or AD-MSCs), after stimulation with the ascorbic acid.^{140,141}

A similar approach was employed by Chan *et al.* to develop vascularized skin substitutes.¹⁴² The authors, however, used various biomaterials within one skin substitute to drive the fate of the AD-MSCs toward different lineages. The cells seeded in a collagen type 1-based matrix turned into fibroblast-like dermal cells, whereas the same cells embedded into a PEGylated-fibrin-based layer developed into a blood capillary network. In addition, the AD-MSCs differentiated into adipocytes in a third collagen type 1-based layer of construct, forming the hypodermis.

In a study performed by Ozpur *et al.*,¹⁴³ an *in vitro* skin tissue was produced using fibrin hydrogel containing AD-MSCs and keratinocytes. Results showed that this dermal substitute containing AD-MSCs provided reepithelialization of the wound, and additionally increased angiogenesis. Collagen deposition was also observed.¹⁴³

While Chan *et al.*¹⁴² used modified fibrin hydrogels only for a part of their skin substitutes, Monfort *et al.* based their three-layered skin substitutes exclusively on fibrin.¹⁴⁴ These investigators used AD-MSCs in the hypodermal part of the substitute, where they successfully differentiated into adipocytes. The bioengineered hypodermis showed a beneficial interaction with the upper layer of the substitute, influencing the behavior of the epidermis *in vitro*.

The group of Kellar and colleagues developed a novel tropoelastin-based scaffold for producing skin substitutes.¹⁴⁵ In this study, tropoelastin, which is the precursor of elastin found in the skin, was expressed in *Escherichia coli* producing large quantities of the protein and allowing the development of a skin scaffold using electrospinning procedures. *In vivo* experiments using this substitute showed rapid wound closure in SCID mice and increased thickness of the epidermis compared to biomaterials without AD-MSCs. Some investigators have also strayed further from traditional matrix molecules and examined the feasibility of a sodium carboxymethylcellulose (CMC) scaffold for skin repair using AD-MSCs.¹⁴⁶

To summarize, various biomaterials can be used to generate *ex vivo* skin substitutes from ECM proteins (collagen, elastin, etc.), to an exclusively fibrin scaffold, or more promisingly with a CMC scaffold, which closely mimics the *in vivo* microenvironment.

Current use of AD-MSCs in medicine

ATMP regulation. Currently, the majority of MSC therapies are considered in the category of ATMPs under international regulations. As ATMPs are covered in the European Union by European Regulation No 1394/2007 and Directive 2001/83/EC (on medicinal products for human use), their market authorization is managed at the European level. According to the guidelines emanating from the European Medicines Agency (EMA), a drug is considered an ATMP if it undergoes substantial changes and/or if its use is heterologous (its essential function is not the same in the donor as in the recipient).

In reality, the European medicines agency regulation does not describe substantial changes; it only lists manipulations that are not considered substantial, such as cutting, grinding, shaping, centrifugation, soaking in antibiotic or antimicrobial solutions, sterilization, irradiation, separation, concentration or purification of cells, filtration, lyophilization, freezing, cryopreservation, and vitrification. To illustrate this, AT or nonenzymatically purified SVF transplantation used to reconstitute dermis is not considered an ATMP because of its homologous use and minimal manipulation. Conversely, using cultured AD-MSCs for the same application is considered to be an ATMP.

ATMPs must be produced in facilities with good manufacturing practice (GMP) certification and pharmaceutical authority, by a qualified person with, specifically in France, the qualified person required to be a pharmacist registered with the college of pharmacists (the national body). Substantial efforts have been made to increase harmonization across regulatory authorities worldwide for the regulation of genes and cell therapies in regenerative medicine.

However, the European Union, United States of America, and Japan present some differences concerning eligibility criteria for regulatory exemption. Apart from the minimum criteria (minimal manipulation and homologous use), the Food and Drug Administration (FDA) has additionally emphasized that exempted products must be noncombination products, free of systemic effects, and independent from metabolic activity for their primary function.

Regulation of hospital exemptions by the EMA encompasses the use of custom-made ATMPs, used in a hospital setting for a specific patient, under the responsibility of an individual physician within the member state where they are manufactured and used. No export from one country to another is possible. However, the diversity of marketing au-

thorization procedures considering the American FDA, Japan agency (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency), and EMA leads to disparity in the accessibility of ATMPs.¹⁴⁷ Even so, uncontrolled, unproven stem cell therapies proliferate across the world leading to disastrous outcomes.^{148–151} Greater vigilance by physicians¹⁵² and by regulatory agencies is needed to avoid curbing the development of ATMPs.

State of play

AD-MSC clinical trials. AD-MSCs have been widely used in clinical trials in several parts of the world. Among AD-MSC-related clinical trials from 2000 to 2020, the majority have been performed in Asia and North America (Fig. 9A). Preferentially autologous (>80%), Phase 1 or 2 (>90%), clinical trials are often wrongly referenced on ClinicalTrials.org as AD-MSC therapies, where in fact 35% of the trials are truly related to SVF, 5% to fat grafting, and 2% to fat grafting combined with AD-MSCs (Fig. 9B, C). AD-MSCs as treatments are mostly for indications in orthopedics (*e.g.*, knee osteoarthritis and rotator cuff tear), autoimmune disorders (*e.g.*, MS, Crohn's disease, and rheumatoid arthritis), and skin wound healing (*e.g.*, burns and scars) (Fig. 9D).

Among the 332 clinical trials concerning AD-MSCs and reported on the website ClinicalTrials.gov, only 130 of these are related to randomized controlled trials, including 115 designed as parallel group randomized controlled trials, which thus seem to conform to the CONSORT Statement. This shows that, currently, few clinical trials are strictly conducted or at least conform to the CONSORT Statement.

Market authorized AD-MSCs therapies. In 2020, only a few AD-MSCs therapies, classified as ATMPs, actually hold a market authorization. On October 8, 2009, orphan designation (EU/3/09/667) was granted by the European Commission to Cellerix S.A. (Spain) for Alofisel® (Darvadstrocel) to treat Crohn's Disease anal fistula complication. Alofisel relates to expanded human allogeneic AD-MSCs (NCT00475410, NCT03706456), authorized in the European Union since March 23, 2018, to reduce the activity of the immune system and reduce inflammation, thus helping the fistula to heal.¹⁵³ Alofisel long-term efficacy was demonstrated in 51.5% of AD-MSC-treated patients versus 35.6% of placebo-treated patients in a trial with 212 patients.¹⁵⁴

Cell-assisted lipotransfer versus conventional autologous fat grafting (non-cell-assisted lipotransfer). Autologous fat transfer, or lipofilling, is

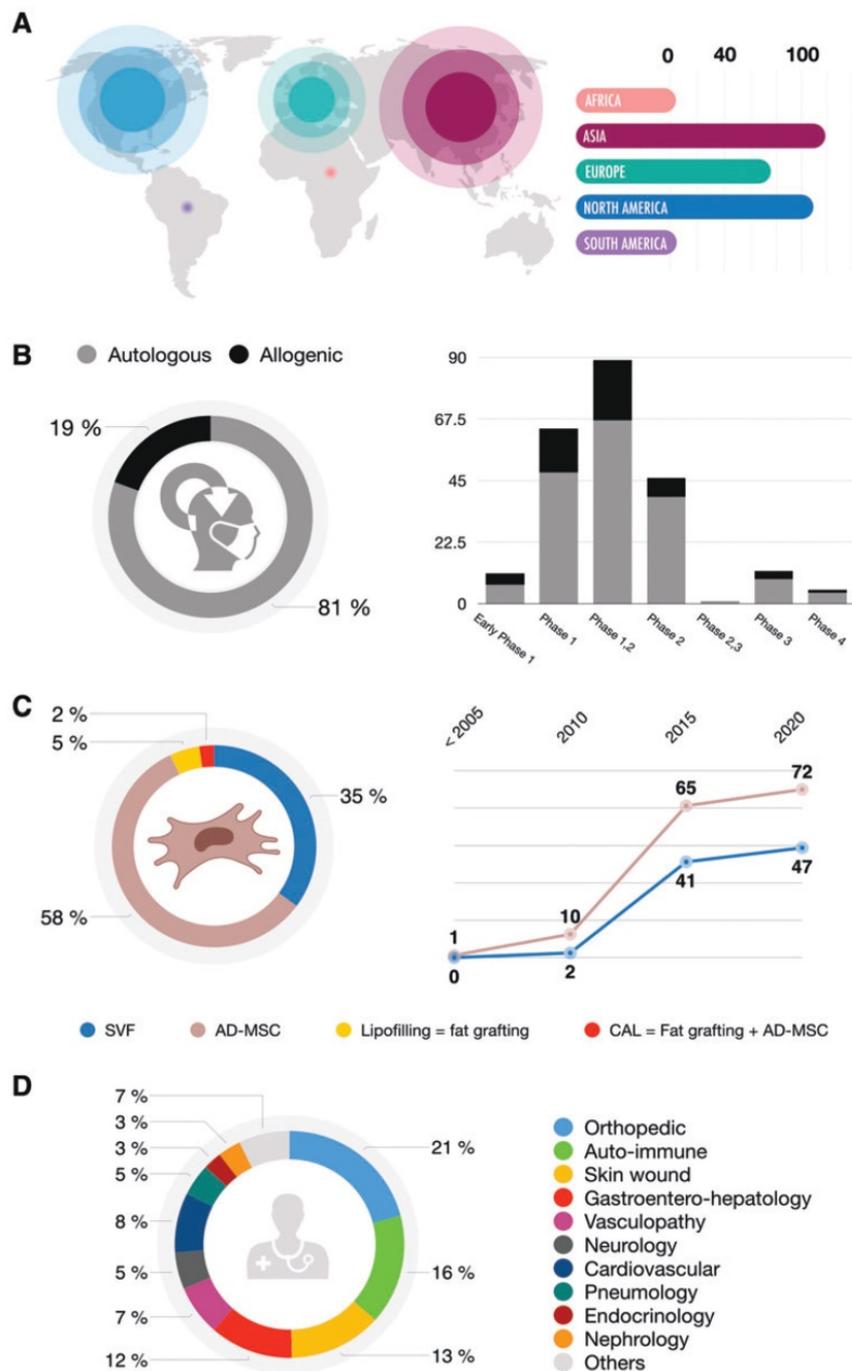


Figure 9. AD-MSC-related clinical trials in 2020. **(A)** World—location by continent. Among the clinical trials using AD-MSCs, the majority have been carried out in Asia (*i.e.*, South Korea 36, China 24, Russia 10, and Taiwan 10) and North America (United States of America 98) since the early 2000s. Europe is the third continent using AD-MSCs, among which Spain (37), Denmark (15), and France (13) are the most active. **(B)** Types and phases. Autologous therapies represent 81% of trials, whereas allogeneic therapies represent only 19% of AD-MSC clinical trials. Phase 1 and 2 clinical trials, using AD-MSCs as treatment, represent more than 90% of the total number, whereas phase 3 and 4 trials represent <10%. Not applicable and unknown phase clinical trials are not shown. **(C)** Cell products used from 2000 to 2020. Expanded or sorted AD-MSCs (*brown*) correspond to 58% of the total number, SVF (*blue*) related to enriched AD-MSC cellular soup corresponds to 35%, while lipofilling or fat grafting (*yellow*) represents only 5%, and CAL or fat grafting ± AD-MSCs (*red*) <2%. **(D)** Clinical indications. The three major indications that AD-MSCs are used in are orthopedics (21%), autoimmune (14%), and skin wound-related (13%) diseases. Data were obtained using a recurrent search of keywords (“adipose stem cell” or “adipose stromal cell” or “adipose derived stromal cell”) to identify AD-MSCs in clinical trials using the website ClinicalTrials.gov, completed on January 2020. CAL, cell-assisted lipotransfer. Color images are available online.

a common technique used for soft tissue reconstruction. It has been used for many years, but the technique is associated with a significant rate of graft resorption (20–80%). To improve the fat graft survival rate, several methods have been tested, one of which appears to be more promising: cell-assisted lipotransfer (CAL). In the CAL method, fat is enriched with AD-MSCs, contained in the SVF and obtained directly after enzymatic digestion, or after cell culture, to improve the rate of fat survival.

The resorption rate is explained by hypoxia within the lipofilling, which varies from one subject to another. Indeed, as is the case in all autograft transplants, the clinician hopes that the transferred tissue will be revascularized from the periphery and the base. Obviously, the cells in the most central part of the transplant are the most at risk of hypoxia. AD-MSCs reduce the resorption rate by decreasing the degree of hypoxia present in the graft.

Matsumoto *et al.* were the first to introduce the term CAL in 2006.¹⁵⁵ Of 20 *in vivo* studies reporting the effects of enrichment with SVF or AD-MSCs on rate of fat survival, 15 of the studies used immunodeficient animals^{54,155–168} and 5 used immunocompetent animals.^{169–173} Most of these studies showed a significant improvement in the fat survival rate with CAL. In 2008, Yoshimura *et al.* were the first to clearly describe the use of the CAL technique in humans.¹⁷⁴ Since then, many articles (randomized controlled trials, patient cohorts, case series, etc.) have studied and compared the efficacy of the CAL technique to standard lipofilling, and have found slight variations and promising results.

However, a well-conducted review of the literature, applying rigorous methodology and including 25 studies and 696 patients, came to the conclusion that fat graft enrichment with SVF cells actually improved graft survival (64 vs. 44%, $p > 0.0001$) for small-scale reinjected volumes <100 mL.¹⁷⁵ There are only two studies that compared conventional lipofilling versus fat grafts enriched with AD-MSCs and not SVF.^{176,177} These two studies showed that CAL with AD-MSCs was superior in terms of rate of fat survival, but only represent relatively poor clinical evidence. In the future, we need to perform studies comparing CAL with SVF to CAL with AD-MSCs.

Plastic surgery indications

AD-MSC actions on burns. One of the most common causes of chronic scarring seen in reconstructive surgery is wound healing after burns. It is common to see patients recovering from severe burns with scars that remain for months, despite having had well-performed skin grafts. AD-MSCs,

thanks to their properties, have a major role to play in the improvement of those scars. Foubert *et al.* have repeatedly shown the efficacy of local injection (direct, topical spray, or loading onto dermal matrix) on influencing angiogenesis and epithelialization in full-thickness thermal burns created on mini-pigs.¹⁷⁸

More recently, to better approximate the clinical situation in humans, they have developed a porcine model of severe burns (20%) treated with intravenous injection of AD-MSCs.¹⁷⁹ First, they showed the safety of intravenous injection, the acceleration of skin graft healing, and better graft elasticity when AD-MSCs were injected. In terms of current clinical trials, only one phase 2 clinical trial is investigating the role of allogeneic AD-MSCs in deep burns (NCT03113747).

AD-MSC action on excessive scarring: hypertrophic scars and keloids. Improvements in plastic surgery and intensive care treatment of deep burns have led to more and more pathological scars (hypertrophic and keloids) being seen in the clinic. Improvements in color, volume, plasticity and collagen architecture have been demonstrated with the use of AT and AD-MSCs.^{180,181} Both therapies also led to an increase in angiogenic markers coupled with a decrease in fibrotic markers such as TGF- β 1.^{182–184} Rapp *et al.* compared these two kinds of products in a porcine model of hypertrophic scar after burning. They reported very similar results, that is, a rapid reduction of erythema and a decrease in scar thickness.¹⁸⁵

However, it should be noted that most studies have not really investigated the impact of AD-MSCs on the evolution of hypertrophic scars, but rather on the hyperplastic phase of healing. Indeed, Deng *et al.* analyzed wound tissue at 45 days after the initial burn,¹⁸⁴ and Rapp *et al.* at 10 weeks.¹⁸⁵ This is problematic as it is difficult to define a hypertrophic scar before 9–12 months of scar evolution.

Finally, for keloid scars, which mainly differ from hypertrophic scars in their evolution over time, only two *in vitro* studies have, to our knowledge, reported a benefit of AD-MSCs. Spiekman *et al.* showed that AD-MSCs decreased myofibroblast differentiation and contraction of keloid scar-derived human fibroblasts conditioned with TGF- β 1.¹⁸⁶ Similarly, Liu *et al.* showed that AD-MSCs were associated with a decrease in synthesis and deposition of collagen, and therefore reduced fibrosis through the action of paracrine factors.¹⁸⁷

In conclusion, only one clinical trial (NCT03887208) is currently studying the effect of AD-MSCs on pathological scars (without defining its

hypertrophic or keloid origin). Interestingly, as shown by Rapp *et al.*,¹⁸⁵ who compared SVF and AD-MSCs in an animal model, the clinical trial from the Medical University of Warsaw predicted that AD-MSCs would be the most effective treatment. Indeed, several clinical trials, such as the one conducted by the Medical University of Warsaw (NCT03887208), aim to define the most suitable treatment in wound care. However, from another point of view, SVF injection without a prior culture step would be more appropriate to enhance the speed of care.

AD-MSC action on ischemic diseases. Chronic skin wounds, of either vascular or autoimmune origin, represent a great clinical challenge to overcome where AD-MSCs provide a possible solution. The main indications arising from skin wounds are ulcers from critical limb ischemia, necrotic angiodermatitis, pressure ulcers, plantar perforating disorders of diabetic foot, and systemic scleroderma.

AD-MSCs are well known for their use in ischemic diseases, including myocardial or cerebral ischemia-reperfusion injury, and lower limb and critical ischemia, both in animals and humans.¹⁸⁸ Several clinical studies have reported results on the use of AD-MSCs in these pathologies.^{189,190} For example, Bura *et al.*, in a phase 2 study—ACellDREAM II (NCT03968198)—evaluated the efficacy of intramuscular injections of autologous AD-MSCs in non-revascularizable critical limb ischemia patients.¹⁰³ This was carried out after demonstrating that AD-MSCs could improve ulcer progression, reduce pain scores, and improve walking distance without reported complications in a phase 1 study.

Concerning the treatment of limited or systemic scleroderma, several studies highlight the superiority of AD-MSCs compared to BM-MSCs,¹⁹¹ particularly in the reduction of cutaneous fibrosis.^{192,193}

Similarly, in a study on diabetic ulcers, treatment with AD-MSCs could be considered since Li *et al.* recently showed *in vitro* that exosomes secreted by AD-MSCs induced the proliferation of endothelial progenitor cells and the overexpression of Nrf2, showing protective effects.¹⁹⁴ In 2020, in terms of treatments aimed at healing diabetic foot ischemia, only one allogenic AD-MSC clinical trial is in progress as a phase 3 trial under the name “ALLO-ASC-SHEET” (NCT03754465, NCT03370874). It should be noted that this clinical trial used a biomaterial consisting of hydrogel in association with AD-MSCs, thus facilitating its use in the operating theater. da Silva *et al.* have already reported on the value of using AD-MSCs in combination with a biomaterial to treat substance loss in the diabetic foot.^{195,196}

The literature shows that usually, for the above indications, AD-MSCs alone were administered through one of four procedures: intradermal, intravenous, or subcutaneous injection, or applied topically.¹⁹⁷ However, cells could also be applied within a scaffold to improve post-transfusion survival such as in decellularized silk fibroin,¹⁹⁸ poly(lactide-co-glycolide),¹⁹⁹ or atelocollagen matrix silicon membrane.²⁰⁰ Finally, more randomized studies are required before they can be marketed for use in these indications.

New clinical perspectives for AD-MSCs

Apart from their current recognized uses in various pathologies, there are new avenues of research on applications for these cells.

Pain treatment. Chronic pain is a major public health problem that deeply affects patient's quality of life.²⁰¹ There is an increasing popularity of the use of AT grafting (lipofilling) for the management of painful scars, and there is now an abundance of evidence in the literature that supports this application. Recently, To *et al.* conducted a systematic review on this topic.²⁰² They included 18 studies published between 1990 and 2019. An improvement in analgesia was recorded in 12 of the 18 studies.

However, these were essentially low level of evidence studies, and future long-term randomized controlled trials with analgesic scores are required. These results underlined the important role of the AT in pain management, but only a few of the studies took a closer look at the effectiveness of AD-MSC therapy on scar pain. Moreover, in fact only one study set out to evaluate the role of AD-MSCs on chronic back pain due to intervertebral disc degeneration (NCT02338271).

As already mentioned above, the therapeutic efficiency of cell-based therapy with MSCs has been investigated in a number of disease models²⁰³ and reported findings that represent a promising alternative therapeutic choice for the management of several diseases. In particular, MSCs have received growing interest as a therapeutic option for several neuronal diseases.^{204,205} MSC-based therapies provide new strategies for curing life-threatening neuronal diseases due to their immunomodulatory function.²⁰⁶ In this sense, cell-based therapy can also be a feasible approach for treating chronic neuropathic pain.

In 2017, Brini *et al.* showed, in neuropathic diabetic pain, that AD-MSCs and their secretomes reversed thermal and mechanical allodynia and thermal hyperalgesia with a residual effect lasting 12 weeks.²⁰⁷ Both methods also prevented a loss of

skin innervation. In addition, in this indication, Osés *et al.* showed that deferoxamine (an iron chelator)-treated AD-MSCs showed higher mRNA levels for VEGF and ANGPT1, as well as for NGF, GDNF, and neurotrophin 3,²⁰⁸ coupled with increased neuroprotective potential. Unfortunately, well-conducted clinical trials studying the effect of AD-MSCs on this topic are lacking. The only reported trial on neuropathic pain did not concern diabetic patients, but rather traumatic neuropathies due to nerve damage (NCT02853942).

Interestingly, Mert *et al.* showed that AD-MSC (systemically or locally injected AD-MSCs)- or magnetic-based therapies can effectively attenuate signs of chronic neuropathic pain by modulating cytokine levels of injured nerves.²⁰⁹ Furthermore, findings in this article demonstrated that magnetic cell therapy may reverse signs such as allodynia and hyperalgesia in chronic constriction injury in neuropathic rats, thus suggesting that combination therapy with AD-MSCs/pulsed magnetic field may be a good approach for the management of chronic neuropathic pain.

Fodor and Paulseth, in 2016, demonstrated that intra-articular injection of AD-MSCs represents a potential new therapy for reduction of pain in osteoarthritis of the knee. Indeed, they reported both the safety of the injection and significant improvement in pain management in this indication.²¹⁰ Forouzanfar *et al.* in 2018 demonstrated, in a chronic constriction injury model in sciatic nerves in rats, that AD-MSCs transfected with *FGF-1* gene can drastically reduce mechanical and thermal hypersensitivity; spinal structural alterations and apoptosis were also significantly decreased.²¹¹

AD-MSC rejuvenation and inducible pluripotent stem cells. Despite their high proliferation rate, cultured AD-MSCs undergo replicative senescence in the course of the expansion process.^{212,213} This replicative senescence impairs their differentiation potential and requires a reliable standardization of cell therapy practices.²¹⁴ Rejuvenating senescent AD-MSCs through reprogramming may restore their plasticity and therefore improve their clinical efficacy, as has been demonstrated with inducible pluripotent stem cells (iPSCs).²¹⁵ However, no studies have succeeded in rejuvenating senescent AD-MSCs to date.

Currently, human AD-MSCs can be reprogrammed into iPSCs,^{216,217} with efficiencies higher than for other cell types,²¹⁸ after transduction with three human transcription factors that are classically used: *OCT3/4*, *SOX2*, and *KLF4*.²¹⁹ Conversely, iPSCs could also be used to generate AD-MSC-like cells by mesoderm and neuroepithe-

lium²²⁰ and additionally, fully differentiated white or brown adipocytes.²²¹ iPSCs can be used as a source of AD-MSCs, providing valuable insights for future regenerative medicine applications.

AD-MSC organoids. Over the last few decades, studies have tried to mimic tissue development using stem cells. Either pluripotent stem cells (embryonic stem cells or iPSCs) or adult stem cells introduced into 3D biomaterials, such as hydrogels, spontaneously self-organize to generate “mini-organs” termed organoids.²²² In addition to their scientific goals of understanding integrative microenvironment cellular behaviors, this recent concept may also have different applications. Organoids could be used as preclinical models to test pharmaceutical drug efficacy and toxicity.

Such advances could lead to an increase in *in vitro* studies, thus reducing the reliance on *in vivo* experiments according to the 3Rs rule (reduce, reuse, and recycle). Over the coming decades, it is hoped that organoids might be used as future generation organ replacement therapy. Nevertheless, a lot of work is still needed and several problems remain to be investigated and solved, including reproducibility, 3D characterization, and *in vivo* tracking.

Human AD-MSCs have been recently described as being capable of self-organizing into a vascularized 3D AT-like organoid.^{98,223} This WAT organoid could then be differentiated into a BAT organoid and used, after *in vivo* transplantation, as a factory for metabolic rebalance to cure several metabolic diseases as metabolic regulation quickly evolved.

Ease of use—directly from the operating theater. As mentioned above, the gold standard method for preparation remains enzymatic digestion; thus, there are commercial devices now available to carry out enzymatic digestion directly in the operating theater using clinical grade proteolytic enzymes, that is, enzymes that have been used in the clinic without adverse effects and have received EMA or FDA approval. These devices have demonstrated their efficiency in producing AD-MSCs.^{50,224} Limitations associated with their use relate to residual collagenase levels, the long handling time of tissue, and their high cost (both of the device and reagents).

As mentioned by Aronowitz and Hakakian,²²⁵ in the aim of improving the extraction efficiency of SVF, many companies have developed devices capable of producing SVF directly in the operating theater with as little human intervention as possible, to maintain the sterility of the sample, while also maintaining high rates of cell yield and via-

bility, while respecting GMP recommendations issued by the FDA in force in the United States. However, the results obtained are mixed. The various existing devices include the Cytori celution system[®] (Cytori Therapeutics, Inc., San Diego, CA), Tissue Genesis Icellator Cell Isolation system[®] (Tissue Genesis, Honolulu, HI), and Lipokit[®] (Medi-Kan Int., West Hollywood, CA). Some have been authorized for inclusion in trials, with patients, to demonstrate their efficacy (e.g., Cytori Therapeutics, Inc. for scleroderma).²²⁶

However, the main drawback of using these devices is the cost; in fact, the price for a procedure, in terms of operating time and consumables used, is £2,400 in the case of Celution[®]. In addition, the average cost for these devices is \$50,000.²²⁴ Celution, because of its lowest residual collagenase level and its cellular performance and the multiplicity of ongoing clinical projects, seems to be more “robust” than these competitors.²²⁴

Unlike these expensive autologous therapies, allogeneic products can originate from a single donation or from a pool of a small number of donations that make up the master cell bank. This master cell bank can be divided into several working cell banks, which will then lead to the production of different batches of clinical ATMPs. Since these libraries are limited in quantity, one of the major challenges of allogeneic therapies is the reproducibility of batches of ATMPs and the relatively variable clinical results obtained according to the batches of raw material. Special attention should therefore be paid to developing these ATMPs very early to select the “best” donors for the desired clinical application.

In the case of AD-MSCs for wound healing applications, it may be relevant to select donors according to different criteria, namely the number of colony-forming unit-fibroblasts reflecting the number of progenitors, the rate of proliferation, or their ability to modulate inflammation, measured through anti-inflammatory cytokine measurements. However, it will be crucial to study the reproducibility of several master cell banks to deal with events such as a stock-out due to high demand, or of a storage incident (e.g., distribution of liquid nitrogen or nitrogen tanks).

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

This review highlights the major fundamental and clinical research on the use of AD-MSCs in regenerative medicine, with a focus on wound healing and pain treatment. Despite a wide range of AD-MSC uses and depending on their multiple intended modes of action, the clinician will hopefully find here the method that best matches their desired clinical application.

First, the heterogeneity of cells has been underlined, especially regarding the use of AT or SVF, which contain not only AD-MSCs but also endothelial cells, fibroblasts, and immune cells. Aside from intrinsic factors such as age and/or body mass index of the donor, this cell heterogeneity is accentuated by the body region and the layers within the AT from which the AD-MSCs are harvested. A second crucial point to take into account is the isolation method used. Indeed, variations in the effects of AD-MSCs may depend on the digestion method used (either enzymatic or mechanical), or even more so on the culture conditions employed (2D or 3D). Finally, for the isolation and amplification of AD-MSCs, special attention should be paid to the composition of culture media, which may drive *in vitro* commitment and enhance immunosuppressive properties, among other effects.

In wound healing, after a substantial loss of tissue, AT as lipofilling would seem to be the easiest product to inject within a short time period. However, to obtain the best tissue-specific and long-term results, autologous AD-MSCs would seem the most appropriate product due to their biocompatibility, well-controlled purity, directed plasticity, and regenerative paracrine properties. Another problem results from the time required to extract and expand AD-MSCs in a GMP facility (2–3 weeks), since many pathologies require immediate treatment.

To overcome this problem, the clinician can work with SVF or allogeneic AD-MSC therapy, where cells are cryopreserved in cell banks. Allogeneic AD-MSCs are employed more and more frequently as a treatment strategy in 2020. This is due both to the possibility of obtaining reproducible results between patients (because AD-MSCs are produced under GMP, then termed ATMP) and the consequent gain in quality, and also being able to respond as soon as possible to the most urgent clinical situations with a reduced production cost.

It should be noted, however, that the lifetime of AD-MSCs may be very short, especially in the case of systemic injection. AD-MSCs are indeed quickly eliminated in the wound bed or they may migrate to filtration organs (such as lung, kidney, and liver). Their effectiveness therefore lies essentially in their paracrine mode of action through the release of soluble factors and EVs. It is therefore highly recommended that clinical trials should focus on allogeneic mass production or on the use of alternative cell-free therapies.

Another aspect to be addressed is the regeneration of a loss of tissue volume using AD-MSCs. Currently, injections of soluble factors or single

cells are not sufficient, whereas a bolder approach consisting of enrichment of autologous fat with AD-MSCs, called CAL, shows promising results.²²⁷ The use of a suitable scaffold able to be cell compatible and that could also direct regeneration remains challenging, depending on the architecture and nature of the injured tissue. Current prospects include integration of organoids or 3D bioprinting of stem/stromal cells into tissue engineering to generate prebuilt replacement organs.^{228,229}

Besides reducing inflammation and enhancing repair, AD-MSCs could also reduce pain sensation in acute or even chronic injuries such as neuropathic pain. Relieving pain is an underestimated property of AD-MSCs that could give rise to an alternative to opioid use, keeping in mind that, counterintuitively, opioids delay fat regeneration.²⁴

The review of current clinical trials shows the scientific community's enthusiasm for the use of these cells over the last decade. AD-MSC proof of concept in several indications in plastic surgery (such as burns, hypertrophic or keloids scars, and ischemic diseases) has been highlighted, and early phase clinical trials are now in progress. However, reviewing the clinical trials in progress in 2020 underlines the importance of clearly specifying the isolation and culture methods that are applied, and avoiding the misuse of terminology (*e.g.*, AD-MSCs instead of SVF) on Clinicaltrials.gov. The use of International Society for Cellular Therapy recommendations should bring a new perspective to help us to understand failed clinical trials and aid in interpretation of the results.

In conclusion, we hope that this review will assist clinicians to choose and administer the most suitable therapeutic product for a specific application. AD-MSCs remain a particularly unexplored source in regenerative medicine. The diversity of products derived from AD-MSCs should not represent a hindrance to development in the stem cell field, but rather represent major potential for versatile therapies in the near future.

SUMMARY

AD-MSCs represent a valuable source of MSCs for use in regenerative medicine. First, these cells can easily be prepared from the AT of a patient. Second, these cells can acquire, in addition to the classical mesodermal lineages (adipocytes, chondro-

TAKE-HOME MESSAGES

- MSCs, widely present in the body and capable of differentiating into the three classical mesodermal lineages (adipocytes, chondroblasts, and osteoblasts), represent an invaluable source of cells available for use in cell therapy.
- Adipose-derived MSCs are present in the AT, which can be easily obtained from liposuction (AT aspiration) or by dermolipectomy.
- The SVF, which contains the adipose-derived MSCs and other cells such as endothelial cells, hematopoietic cells, and fibroblasts, or purified adipose-derived MSCs, can be used for treating wounds.
- The main mode of action of these cells is through paracrine mechanisms, thanks to the numerous molecules that these cells can release.
- Many clinical trials are now underway, underlining the interest in using these preparations derived from AT. However, the protocols employed need to be better defined, particularly regarding the type of product that is being used (SVF or purified adipose-derived MSCs).
- Available off-the-shelf ATMPs could provide a safe alternative to autologous AT, SVF, or adipose-derived MSC grafting for the immediate treatment of emergency clinical implications (such as burns and trauma).
- New technological advances in tissue engineering such as 3D organoids and bioprinting draw particular attention to generate prebuilt replacement organs and replace large wound defect.

droblasts, and osteoblasts), endothelial or neuronal differentiation. Of major importance, they clearly demonstrate paracrine effects, particularly trophic, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. Treatments have thus far shown beneficial effects in various diseases, including postburn injury, excessive scarring, and ischemic conditions. However, in many cases, SVF, which is prepared from AT and contains not only AD-MSCs but also endothelial cells, hematopoietic cells, as well as fibroblasts, has been used. The specific properties of purified AD-MSCs remain to be defined. Numerous clinical trials using products prepared from patient AT have actually been completed, but very often, the precise product used and the method of preparation have not been clearly indicated. Tissue engineering using organoids or 3D bioprinting of purified and well-characterized AD-MSCs represents a new therapeutic option in regenerative medicine.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING SOURCES

None declared.

AUTHOR DISCLOSURE AND GHOSTWRITING

The authors declare that they have no competing financial interests to disclose. The content of this

article was expressly written by the authors listed and no ghostwriters were used.

ABOUT THE AUTHORS

Jérôme Laloze, MD, in the Department of Maxillo-Facial and Reconstructive Surgery and Stomatology, University Hospital Dupuytren, is a PhD student in the team “Myelin Maintenance and Peripheral Neuropathies” at the University of Limoges. **Loïc Fiévet, PharmD**, in the Department of Cell Therapy of French Blood Institute, is a PhD student in the team STROMALab at the University

Paul-Sabatier of Toulouse. **Alexis Desmoulière, PharmD, PhD**, is Professor of Physiology at the Faculty of Pharmacy, University of Limoges (France). His interest in wound biology extends over many years, and he has published widely on scar formation and on the role of fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. He is currently working on skin innervation, which plays a key role in the development of physiological processes and in patient quality of life. In addition, he is using tissue engineering to develop skin equivalents that are usable for *in vitro* biological testing and burn treatments.

REFERENCES

- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738–746.
- Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005;31:674–686.
- Liu ZJ, Velazquez OC. Hyperoxia, endothelial progenitor cell mobilization, and diabetic wound healing. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1869–1882.
- Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmoulière A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:1145–1157.
- Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev* 2019;99:665–706.
- Desmoulière A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int* 1995;19:471–476.
- Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in chronic wounds. *Int J Mol Sci* 2016;17:2085.
- Frykberg RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015;4:560–582.
- Ehrlich HP, Desmoulière A, Diegelmann RF, et al. Morphological and immunohistochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 1994;145:105–113.
- Laverdet B, Danigo A, Girard D, Magy L, Demiot C, Desmoulière A. Skin innervation: important roles during normal and pathological cutaneous repair. *Histol Histopathol* 2015;30:875–892.
- Abdo H, Calvo-Enrique L, Lopez JM, et al. Specialized cutaneous Schwann cells initiate pain sensation. *Science* 2019;365:695–699.
- Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122:103–111.
- Parfejevs V, Debbache J, Shakhova O, et al. Injury-activated glial cells promote wound healing of the adult skin in mice. *Nat Commun* 2018;9:236.
- Talagas M, Lebonvallet N, Berthod F, Misery L. Cutaneous nociception: role of keratinocytes. *Exp Dermatol* 2019;28:1466–1469.
- Chéret J, Lebonvallet N, Carré JL, Misery L, Le Gall-lanotto C. Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing. *Wound Repair Regen* 2013;21:772–788.
- Lebonvallet N, Laverdet B, Misery L, Desmoulière A, Girard D. New insights into the roles of myofibroblasts and innervation during skin healing and innovative therapies to improve scar innervation. *Exp Dermatol* 2018;27:950–958.
- Parkhouse N, Crowe R, McGrouther DA, Burnstock G. Painful hypertrophic scarring and neuropeptides. *Lancet* 1992;340:1410.
- Crowe R, Parkhouse N, McGrouther D, Burnstock G. Neuropeptide-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. *Br J Dermatol* 1994;130:444–452.
- Kim LR, Whelpdale K, Zurowski M, Pomeranz B. Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 1998;6:194–201.
- Smith PG, Liu M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002;307:281–291.
- Buckley G, Wong J, Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Denervation affects regenerative responses in MRL/MpJ and repair in C57BL/6 ear wounds. *J Anat* 2012;220:3–12.
- Laverdet B, Girard D, Bayout A, Bordeau N, Demiot C, Desmoulière A. Effects of small-fiber neuropathy induced by resiniferatoxin on skin healing and axonal regrowth after burn. *Burns* 2017;43:562–572.
- Barker AR, Rosson GD, Dellon AL. Wound healing in denervated tissue. *Ann Plast Surg* 2006;57:339–342.
- Labit E, Rabiller L, Rampon C, et al. Opioids prevent regeneration in adult mammals through inhibition of ROS production. *Sci Rep* 2018;8:12170–12179.
- Hua Z, Liu L, Shen J, et al. Mesenchymal stem cells reversed morphine tolerance and opioid-induced hyperalgesia. *Sci Rep* 2016;6:32096.
- Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther* 2010;21:1045–1056.
- Bianco P. Reply to MSCs: science and trials. *Nat Med* 2013;19:813–814.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230–247.
- Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009;88:792–806.
- Kobayashi K, Kubota T, Aso T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin. *Early Hum Dev* 1998;51:223–233.
- In't Anker PS, Scherjon SA, Keur der CK, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004;22:1338–1345.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multi-lineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211–228.

33. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT[®]) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* 2019; 21:1019–1024.
34. Bouacida A, Rosset P, Trichet V, et al. Pericyte-like progenitors show high immaturity and engraftment potential as compared with mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2012;7:e48648.
35. Bourin P, Peyrafitte J-A, Fleury-Cappellesso S. A first approach for the production of human adipose tissue-derived stromal cells for therapeutic use. *Methods Mol Biol* 2011;702:331–343.
36. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A* 2010;77:22–30.
37. Casteilla L, Planat-Bénard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells* 2011;3:25–33.
38. Monsarrat P, Vergnes JN, Planat-Bénard V, et al. An innovative, comprehensive mapping and multiscale analysis of registered trials for stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med* 2016;5:835.
39. Poissonnet CM, Burdi AR, Bookstein FL. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum Dev* 1983;8:1–11.
40. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–4295.
41. Maumus M, Peyrafitte J-A, D'Angelo R, et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:1141–1153.
42. Vijay J, Gauthier MF, Biswell RL, et al. Single-cell analysis of human adipose tissue identifies depot and disease specific cell types. *Nat Metab* 2020;2:97–109.
43. Rodbell M. Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. *J Biol Chem* 1964; 239:753–755.
44. Baptista LS, do Amaral RJFC, Carias RB, Aniceto M, Claudio-da-Silva C, Borojevic R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from liposyrate samples. *Cytotherapy* 2009;11:706–715.
45. Battah F, De Kock J, Ramboer E, et al. 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* 2011;25:1224–1230.
46. Shah FS, Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytotherapy* 2013;15:979–985.
47. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:1017–1026.
48. Raposio E, Caruana G, Bonomini S, Libondi G. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plast Reconstr Surg* 2014;133:1406–1409.
49. Condé-Green A, Rodriguez RL, Slezak S, Singh DP, Goldberg NH, McLenithan J. Comparison between stromal vascular cells' isolation with enzymatic digestion and mechanical processing of aspirated adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:54.
50. Markarian CF, Frey GZ, Silveira MD, et al. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnol Lett* 2014;36:693–702.
51. Mashiko T, Wu SH, Feng J, et al. Mechanical micronization of liposyrates: squeeze and emulsification techniques. *Plast Reconstr Surg* 2017;139:79–90.
52. Istrup T, Eikens M, Brunbiere ME, et al. Measured levels of human adipose tissue-derived stem cells in adipose tissue is strongly dependant on harvesting method and stem cell isolation technique. *Plast Reconstr Surg* 2020;145:142–150.
53. Girard AC, Atlan M, Bencharif K, et al. New insights into lidocaine and adrenaline effects on human adipose stem cells. *Aesthetic Plast Surg* 2013;37:144–152.
54. Condé-Green A, Wu I, Graham I, et al. Comparison of 3 techniques of fat grafting and cell-supplemented lipotransfer in athymic rats: a pilot study. *Aesthet Surg* 2013;33:713–721.
55. van den Brink SC, Sage F, Vértsey Á, et al. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nat Methods* 2017;14:935–936.
56. Varghese J, Griffin M, Mosahebi A, Butler P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:45.
57. Chaput B, Bertheuil N, Escubes M, et al. Mechanically isolated stromal vascular fraction provides a valid and useful collagenase-free alternative technique: a comparative study. *Plast Reconstr Surg* 2016;138:807–819.
58. Brennan MÁ, Renaud A, Guilloton F, et al. Inferior in vivo osteogenesis and superior angiogenesis of human adipose tissue: a comparison with bone marrow-derived stromal stem cells cultured in xeno-free conditions. *Stem Cells Transl Med* 2017;6:2172.
59. Raajendiran A, Ooi G, Bayliss J, et al. Identification of metabolically distinct adipocyte progenitor cells in human adipose tissues. *Cell Rep* 2019;27:1528–1540.
60. Regmi S, Pathak S, Kim JO, Yong CS, Jeong JH. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: challenges, opportunities, and future perspectives. *Eur J Cell Biol* 2019;98:151041.
61. Markman B, Barton FE. Anatomy of the subcutaneous tissue of the trunk and lower extremity. *Plast Reconstr Surg* 1987;80:248–254.
62. Baglioni S, Cantini G, Poli G, et al. Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One* 2012;7:e36569.
63. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cell utility is independent of anatomical harvest site. *Biores Open Access* 2015;4:131–145.
64. Shen W, Wang Z, Punyanita M, et al. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res* 2003;11:5–16.
65. Avelar J. Regional distribution and behavior of the subcutaneous tissue concerning selection and indication for liposuction. *Aesthetic Plast Surg* 1989;13:155–165.
66. Lockwood TE. Superficial fascial system (SFS) of the trunk and extremities: a new concept. *Plast Reconstr Surg* 1991;87:1009–1018.
67. Sbarbati A, Accorsi D, Benati D, et al. Subcutaneous adipose tissue classification. *Eur J Histochem* 2010;54:e48.
68. Chopra J, Rani A, Rani A, Srivastava AK, Sharma PK. Re-evaluation of superficial fascia of anterior abdominal wall: a computed tomographic study. *Surg Radiol Anat* 2011;33:843–849.
69. Lancerotto L, Stecco C, Macchi V, Porzionato A, Stecco A, De Caro R. Layers of the abdominal wall: anatomical investigation of subcutaneous tissue and superficial fascia. *Surg Radiol Anat* 2011;33:835–842.
70. Harley OJH, Pickford MA. CT analysis of fat distribution superficial and deep to the Scarpa's fascial layer in the mid and lower abdomen. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2013;66:525–530.
71. Gasperoni C, Salgarello M. Rationale of subdermal superficial liposuction related to the anatomy of subcutaneous fat and the superficial fascial system. *Aesthetic Plast Surg* 1995;19:13–20.
72. Golan R, Shelef I, Rudich A, et al. Abdominal superficial subcutaneous fat: a putative distinct protective fat subdepot in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:640–647.
73. Boulet N, Estève D, Bouloumié A, Galitzky J. Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients. *J Physiol Biochem* 2013;69:575–583.
74. Cancellaro R, Zulian A, Gentilini D, et al. Molecular and morphologic characterization of superficial and deep-subcutaneous adipose tissue subdivisions in human obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:2562–2570.
75. Kohli S, Lear SA. Differences in subcutaneous abdominal adiposity regions in four ethnic groups. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:2288–2295.
76. Wan D, Amirlak B, Giessler P, et al. The differing adipocyte morphologies of deep versus superfi-

- cial midfacial fat compartments: a cadaveric study. *Plast Reconstr Surg* 2014;133:615e–622e.
77. Schwalie PC, Dong H, Zachara M, et al. A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots. *Nature* 2018;559:103–108.
 78. Burl RB, Ramseyer VD, Rondini EA, Pique-Regi R, Lee YH, Granneman JG. Deconstructing adipogenesis induced by β 3-adrenergic receptor activation with single-cell expression profiling. *Cell Metab* 2018;28:300–304.
 79. Liu X, Xiang Q, Xu F, et al. Single-cell RNA-seq of cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Sci Data* 2019;6:190031.
 80. Oñate B, Vilahur G, Camino-López S, et al. Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. *BMC Genomics* 2013;14:625.
 81. Contreras GA, Thelen K, Ayala-Lopez N, Watts SW. The distribution and adipogenic potential of perivascular adipose tissue adipocyte progenitors is dependent on sexual dimorphism and vessel location. *Physiol Rep* 2016;4:e12993.
 82. Liu M, Lei H, Dong P, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the elderly exhibit decreased migration and differentiation abilities with senescent properties. *Cell Transplant* 2017; 26:1505–1519.
 83. Frazier T, Lee S, Bowles A, et al. Gender and age-related cell compositional differences in C57BL/6 murine adipose tissue stromal vascular fraction. *Adipocyte* 2018;7:183–189.
 84. Noël D, Caton D, Roche S, et al. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 2008;314: 1575–1584.
 85. Green S, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: finding the orphan a home. *Mol Cell Endocrinol* 1994;100:149–153.
 86. Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev* 2002;16:27–32.
 87. Wolock SL, Krishnan I, Tenen DE, et al. Mapping distinct bone marrow niche populations and their differentiation paths. *Cell Rep* 2019;28:302–305.
 88. Lustig M, Gefen A, Benayahu D. Adipogenesis and lipid production in adipocytes subjected to sustained tensile deformations and elevated glucose concentration: a living cell-scale model system of diabetes. *Biomech Model Mechanobiol* 2018;17:903–913.
 89. Mor-Yossef Moldovan L, Lustig M, et al. Cell shape alteration during adipogenesis is associated with coordinated matrix cues. *J Cell Physiol* 2019;234:3850–3863.
 90. Zielins ER, Paik K, Ransom RC, et al. Enrichment of adipose-derived stromal cells for BMPRI1A facilitates enhanced adipogenesis. *Tissue Eng Part A* 2016;22:214–221.
 91. Philippeos C, Telerman SB, Oulès B, et al. Spatial and single-cell transcriptional profiling identifies functionally distinct human dermal fibroblast subpopulations. *J Invest Dermatol* 2018; 138:811–825.
 92. Tabib T, Morse C, Wang T, Chen W, Lafyatis R. SFRP2/DPP4 and FMO1/LSP1 define major fibroblast populations in human skin. *J Invest Dermatol* 2018;138:802–810.
 93. Merrick D, Sakers A, Irgebay Z, et al. Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science* 2019;364:pii.eaav2501.
 94. Plikus MV, Guerrero-Juarez CF, Ito M, et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* 2017;355:748–35752.
 95. Sood J, Jayaraman L, Sethi N. Liposuction: anaesthesia challenges. *Indian J Anaesth* 2011;55: 220–227.
 96. Hughes KA, Reynolds RM, Andrew R, Critchley HOD, Walker BR. Glucocorticoids turn over slowly in human adipose tissue in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4696–4702.
 97. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:370–379.
 98. Muller S, Ader I, Creff J, et al. Human adipose stromal-vascular fraction self-organizes to form vascularized adipose tissue in 3D cultures. *Sci Rep* 2019;9:7250.
 99. Suga H, Glotzbach JP, Sorkin M, Longaker MT, Gurtner GC. Paracrine mechanism of angiogenesis in adipose-derived stem cell transplantation. *Ann Plast Surg* 2014;72:234–241.
 100. Leibacher J, Henschler R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:7.
 101. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc* 2007;39:573–576.
 102. Planat-Bénard V, Silvestre J-S, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109:656–663.
 103. Bura A, Planat-Bénard V, Bourin P, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy* 2014;16:245–257.
 104. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. *Differentiation* 2006;74:510–518.
 105. Feng N, Han Q, Li J, et al. Generation of highly purified neural stem cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells by Sox1 activation. *Stem Cells Dev* 2014;23:515–529.
 106. Qin Y, Zhou C, Wang N, Yang H, Gao WQ. Conversion of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to neural stem cell-like cells by a single transcription factor, Sox2. *Cell Reprogram* 2015;17:221–226.
 107. Hou L, Cao H, Wang D, et al. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Hematol* 2003;78: 256–261.
 108. Bae KS, Park JB, Kim HS, Kim DS, Park DJ, Kang SJ. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* 2011;52:401–412.
 109. Chung CS, Fujita N, Kawahara N, Yui S, Nam E, Nishimura R. A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Med Sci* 2013;75:879–886.
 110. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 2009; 76:56–66.
 111. Khalifian S, Sarhane KA, Tammia M, et al. Stem cell-based approaches to improve nerve regeneration: potential implications for reconstructive transplantation? *Arch Immunol Ther Exp* 2015;63: 15–30.
 112. Zack-Williams SD, Butler PE, Kalaskar DM. Current progress in use of adipose derived stem cells in peripheral nerve regeneration. *World J Stem Cells* 2015;7:64.
 113. Polak R, de Rooij B, Pieters R, Boer den ML. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells use tunneling nanotubes to orchestrate their micro-environment. *Blood* 2015;126:2404–2414.
 114. Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* 2018;22:824–833.
 115. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic micro-environment. *Cell* 2007;131:324–336.
 116. Lin RZ, Moreno-Luna R, Zhou B, Pu WT, Melero-Martin JM. Equal modulation of endothelial cell function by four distinct tissue-specific mesenchymal stem cells. *Angiogenesis* 2012;15:443–455.
 117. Watt SM, Gullo F, van der Garde M, et al. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *Br Med Bull* 2013;108:25–53.
 118. Bortolotti F, Ukovich L, Razban V, et al. In vivo therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure. *Stem Cell Rep* 2015;4:332–339.
 119. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004;22:377–384.

120. Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int* 2011;59:347–356.
121. Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolte JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med* 2010;5:933–946.
122. Ryu V, Garretson JT, Liu Y, Vaughan CH, Bartness TJ. Brown adipose tissue has sympathetic-sensory feedback circuits. *J Neurosci* 2015;35:2181–2190.
123. Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev* 2014;23:741–754.
124. Takaku S, Yanagisawa H, Watabe K, et al. GDNF promotes neurite outgrowth and upregulates galectin-1 through the RET/PI3K signaling in cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Neurochem Int* 2013;62:330–339.
125. Kimura M, Sakai A, Sakamoto A, Suzuki H. Glial cell line-derived neurotrophic factor-mediated enhancement of noradrenergic descending inhibition in the locus coeruleus exerts prolonged analgesia in neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2015;172:2469–2478.
126. Kim HY, Kim H, Oh KW, et al. Biological markers of mesenchymal stromal cells as predictors of response to autologous stem cell transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: an investigator-initiated trial and in vivo study. *Stem Cells* 2014;32:2724–2731.
127. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci* 2019;76:3323–3348.
128. Melief SM, Geutskens SB, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory function: the link with key immunoregulatory molecules. *Haematologica* 2013;98:e121–e122.
129. Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005;129:118–129.
130. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 2009;126:37–42.
131. Carreras-Planella L, Monguío-Tortajada M, Borràs FE, Franquesa M. Immunomodulatory effect of MSC on B cells is independent of secreted extracellular vesicles. *Front Immunol* 2019;10:1288.
132. Espagnolle N, Balguerie A, Arnaud E, Sensebe L, Varin A. CD54-mediated interaction with pro-inflammatory macrophages increases the immunosuppressive function of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Rep* 2017;8:961–976.
133. Manferdini C, Paoletta F, Gabusi E, et al. Adipose stromal cells mediated switching of the pro-inflammatory profile of M1-like macrophages is facilitated by PGE2: in vitro evaluation. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25:1161–1171.
134. da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:419–427.
135. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* 2009;259:150–156.
136. Zhang S, Danchuk SD, Bonvillian RW, et al. Interleukin 6 mediates the therapeutic effects of adipose-derived stromal/stem cells in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Stem Cells* 2014;32:1616–1628.
137. Gillies H, Millard DR, eds. *The Principles and Art of Plastic Surgery*, vol. 1. Boston, MA: Little Brown and Company, 1957.
138. Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature. *Burns* 2006;32:395–401.
139. Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science 1993;260:920–926.
140. Trottier V, Marceau-Fortier G, Germain L, Vincent C, Fradette J. IFATS collection: using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells* 2008;26:2713–2723.
141. Hata R, Senoo H. L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissue like substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol* 1989;138:8–16.
142. Chan RK, Zamora DO, Wrice NL, et al. Development of a vascularized skin construct using adipose-derived stem cells from debrided burned skin. *Stem Cells Int* 2012;2012:841203.
143. Ozpur MA, Guneren E, Canter HI, et al. Generation of skin tissue using adipose tissue-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2016;137:134–143.
144. Monfort A, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Izeta A. Production of human tissue-engineered skin trilayer on a plasma-based hypodermis. *J Tissue Eng Regen Med* 2013;7:479–490.
145. Machula H, Ensley B, Kellar R. Electrospun tropoelastin for delivery of therapeutic adipose-derived stem cells to full-thickness dermal wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014;3:367–375.
146. Rodrigues C, de Assis AM, Moura DJ, et al. New therapy of skin repair combining adipose-derived mesenchymal stem cells with sodium carboxymethylcellulose scaffold in a pre-clinical rat model. *PLoS One* 2014;9:e96241.
147. Kondo H, Saint-Raymond A, Yasuda N. What to know about medicines with new active ingredients approved in FY 2016/2016 in Japan and EU: a brief comparison of new medicines approved in Japan and the EU in 2016. *Ther Innov Regul Sci* 2018;52:214–219.
148. McLean AK, Stewart C, Kerridge I. Untested, unproven, and unethical: the promotion and provision of autologous stem cell therapies in Australia. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:33–38.
149. Tiwari SS, Desai PN. Unproven stem cell therapies in India: regulatory challenges and proposed paths forward. *Cell Stem Cell* 2018;23:649–652.
150. Caulfield T, Murdoch B. Regulatory and policy tools to address unproven stem cell interventions in Canada: the need for action. *BMC Med Ethics* 2019;20:51.
151. Riva L, Campanozzi L, Vitali M, Ricci G, Tambone V. Unproven stem cell therapies: is it my right to try? *Ann Ist Super Sanita* 2019;55:179–185.
152. Levine AD, Wolf LE. The roles and responsibilities of physicians in patients' decisions about unproven stem cell therapies. *J Law Med Ethics* 2012;40:122–134.
153. Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet* 2016;388:1281–1290.
154. Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, et al. Long-term efficacy and safety of stem cell therapy (Cx601) for complex perianal fistulas in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2018;154:1334–1334.
155. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 2006;12:3375–3382.
156. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:121S–128S.
157. Lu F, Li J, Gao J, et al. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2009;124:1437–1446.
158. Ko MS, Jung JY, Shin IS, et al. Effects of expanded human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the viability of cryopreserved fat grafts in the nude mouse. *Int J Med Sci* 2011;8:231–238.
159. Fu S, Luan J, Xin M, Wang Q, Xiao R, Gao Y. Fate of adipose-derived stromal vascular fraction cells after co-implantation with fat grafts: evidence of cell survival and differentiation in ischemic adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:363–373.
160. Luo S, Hao L, Li X, et al. Adipose tissue-derived stem cells treated with estradiol enhance survival of autologous fat transplants. *Tohoku J Exp Med* 2013;231:101–110.

161. Li L, Pan S, Ni B, Lin Y. Improvement in autologous human fat transplant survival with SVF plus VEGF-PLA nano-sustained release microspheres. *Cell Biol Int* 2014;38:962–970.
162. Xu F, Li H, Yin Q-S, et al. Human breast adipose-derived stem cells transfected with the stromal cell-derived factor-1 receptor CXCR4 exhibit enhanced viability in human autologous free fat grafts. *Cell Physiol Biochem* 2014;34:2091–2104.
163. Zhou SB, Chiang CA, Xie Y, et al. In vivo bioimaging analysis of stromal vascular fraction-assisted fat grafting: the interaction and mutualism of cells and grafted fat. *Transplantation* 2014;98:1048–1055.
164. Garza RM, Rennert RC, Paik KJ, et al. Studies in fat grafting: part IV. Adipose-derived stromal cell gene expression in cell-assisted lipotransfer. *Plast Reconstr Surg* 2015;135:1045–1055.
165. Jiang A, Li M, Duan W, Dong Y, Wang Y. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by adipose-derived stem-cells-assisted lipotransfer combined with bFGF. *ScientificWorldJournal* 2015;2015:968057.
166. Luo X, Cao W, Xu H, et al. Coimplanted endothelial cells improve adipose tissue grafts' survival by increasing vascularization. *J Craniofac Surg* 2015;26:358–364.
167. Zhu M, Dong Z, Gao J, et al. Adipocyte regeneration after free fat transplantation: promotion by stromal vascular fraction cells. *Cell Transplant* 2015;24:49–62.
168. Li K, Li F, Li J, et al. Increased survival of human free fat grafts with varying densities of human adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11:209–219.
169. 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;64:222–228.
170. He X, Zhong X, Ni Y, Liu M, Liu S, Lan X. Effect of ASCs on the graft survival rates of fat particles in rabbits. *J Plast Surg Hand Surg* 2013;47:3–7.
171. Ni Y, He X, Yuan Z, Liu M, Du H, Zhong X. Effect of fat particle-to-SVF ratio on graft survival rates in rabbits. *Ann Plast Surg* 2015;74:609–614.
172. Piccinno MS, Veronesi E, Loschi P, et al. Adipose stromal/stem cells assist fat transplantation reducing necrosis and increasing graft performance. *Apoptosis* 2013;64:222–228.
173. Seyhan N, Alhan D, Ural AU, Gunal A, Avunduk MC, Savaci N. The effect of combined use of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells on fat graft survival. *Ann Plast Surg* 2015;74:615–620.
174. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipotrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg* 2008;34:1178–1185.
175. Laloze J, Varin A, Gilhodes J, et al. Cell-assisted lipotransfer: friend or foe in fat grafting? Systematic review and meta-analysis. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12:e1237–e1250.
176. Koh KS, Oh TS, Kim H, et al. Clinical application of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in progressive hemifacial atrophy (Parry-Romberg disease) with microfat grafting techniques using 3-dimensional computed tomography and 3-dimensional camera. *Ann Plast Surg* 2012;69:331–337.
177. Kølle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2013;382:1113–1120.
178. Foubert P, Barillas S, Gonzalez AD, et al. Uncultured adipose-derived regenerative cells (ADRCs) seeded in collagen scaffold improves dermal regeneration, enhancing early vascularization and structural organization following thermal burns. *Burns* 2015;41:1504–1516.
179. Foubert P, Liu M, Anderson S, et al. Preclinical assessment of safety and efficacy of intravenous delivery of autologous adipose-derived regenerative cells (ADRCs) in the treatment of severe thermal burns using a porcine model. *Burns* 2018;44:1531–1542.
180. Bruno A, Delli Santi G, Fasciani L, Companari M, Palombo M, Palombo P. Burn scar lipofilling: immunohistochemical and clinical outcomes. *J Craniofac Surg* 2013;24:1806–1814.
181. Klinger M, Caviggioli F, Klinger FM, et al. Autologous fat graft in scar treatment. *J Craniofac Surg* 2013;24:1610–1615.
182. Sprout JE, Dalcin A, Weitauer N, Roberts RS. Hypertrophic sternal scars: silicone gel sheet versus Kenalog injection treatment. *Plast Reconstr Surg* 1992;90:988–992.
183. Sultan SM, Barr JS, Butala P, et al. Fat grafting accelerates revascularisation and decreases fibrosis following thermal injury. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012;65:219–227.
184. Deng X, Chen Q, Qiang L, et al. Development of a porcine full-thickness burn hypertrophic scar model and investigation of the effects of Shikonin on hypertrophic scar remediation. *Front Pharmacol* 2018;9:590.
185. Rapp SJ, Schwentker AR, Visscher MO, Van Aalst J, Pan BS. Effects of autologous fat and ASCs on swine hypertrophic burn scars: a multimodal quantitative analysis. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2017;5:e1547.
186. Spiekman M, Przybyt E, Plantinga JA, Gibbs S, van der Lei B, Harmsen MC. Adipose tissue-derived stromal cells inhibit TGF- β 1-induced differentiation of human dermal fibroblasts and keloid scar-derived fibroblasts in a paracrine fashion. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:699–712.
187. Liu J, Ren J, Su L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells inhibit the activity of keloid fibroblasts and fibrosis in a keloid model by paracrine signaling. *Burns* 2018;44:370–385.
188. Zhao Y, Zhang H. Update on the mechanisms of homing of adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy* 2016;18:816–827.
189. Gimble JM, Nuttall ME. Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) in regenerative medicine: pharmaceutical applications. *Curr Pharm Des* 2011;17:332–339.
190. Lee HC, An SG, Lee HW, et al. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ J* 2012;76:1750–1760.
191. Maria ATJ, Toupet K, Maumus M, et al. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *J Autoimmun* 2016;70:31–39.
192. Chen YW, Scutaru TT, Ghetu N, et al. The effects of adipose-derived stem cell-differentiated adipocytes on skin burn wound healing in rats. *J Burn Care Res* 2017;38:1–10.
193. Chen B, Wang X, Long X, et al. Supportive use of adipose-derived stem cells in cell-assisted lipotransfer for localized scleroderma. *Plast Reconstr Surg* 2018;141:1395–1407.
194. Li X, Xie X, Lian W, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model. *Exp Mol Med* 2018;50:29.
195. da Silva LP, Santos TC, Rodrigues DB, et al. Stem cell-containing hyaluronic acid-based spongy hydrogels for integrated diabetic wound healing. *J Invest Dermatol* 2017;137:1541–1551.
196. da Silva LP, Reis RL, Correlo VM, Marques AP. Hydrogel-based strategies to advance therapies for chronic skin wounds. *Annu Rev Biomed Eng* 2019;21:145–169.
197. Kuo YR, Wang CT, Cheng JT, Kao GS, Chiang YC, Wang CJ. Adipose-derived stem cells accelerate diabetic wound healing through the induction of autocrine and paracrine effects. *Cell Transplant* 2016;25:71–81.
198. Navone SE, Pascucci L, Dossena M, et al. Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:7–15.
199. Pan Z, Ding J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus* 2012;2:366–377.
200. Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Ann Plast Surg* 2009;62:317–321.
201. Dueñas M, Ojeda B, Salazar A, Mico JA, Failde I. A review of chronic pain impact on patients, their social environment and the health care system. *J Pain Res* 2016;9:457–467.

202. To K, Crowley C, Lim SK, Khan WS. Autologous adipose tissue grafting for the management of the painful scar. *Cytotherapy* 2019;21:1151–1160.
203. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:726–736.
204. Snyder EY, Teng YD. Stem cells and spinal cord repair. *N Engl J Med* 2012;366:1940–1942.
205. Laroni A, Novi G, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Towards clinical application of mesenchymal stem cells for treatment of neurological diseases of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013;8:1062–1076.
206. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 2012; 33:136–143.
207. Brini AT, Amodeo G, Ferreira LM, et al. Therapeutic effect of human adipose-derived stem cells and their secretome in experimental diabetic pain. *Sci Rep* 2017;7:9904–9915.
208. Oses C, Olivares B, Ezquer M, et al. Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferioxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS One* 2017;12:e0178011.
209. Mert T, Kurt AH, Altun İ, Celik A, Baran F, Gunay I. Pulsed magnetic field enhances therapeutic efficiency of mesenchymal stem cells in chronic neuropathic pain model. *Bioelectromagnetics* 2017;38:255–264.
210. Fodor PB, Paulseth SG. Adipose derived stromal cell (ADSC) injections for pain management of osteoarthritis in the human knee joint. *Aesthet Surg J* 2016;36:229–236.
211. Forouzanfar F, Amin B, Ghorbani A, et al. New approach for the treatment of neuropathic pain: fibroblast growth factor 1 gene-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells. *Eur J Pain* 2018;22:295–310.
212. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 2006;7:14.
213. Noer A, Boquest AC, Collas P. Dynamics of adipogenic promoter DNA methylation during clonal culture of human adipose stem cells to senescence. *BMC Cell Biol* 2007;8:18.
214. Liu F, Huang J, Ning B, Liu Z, Chen S, Zhao W. Drug discovery via human-derived stem cell organoids. *Front Pharmacol* 2016;7:334.
215. Lapasset L, Milhavel O, Prieur A, et al. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev* 2011;25:2248–2253.
216. Aoki T, Ohnishi H, Oda Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without c-MYC. *Tissue Eng Part A* 2010;16:2197–2206.
217. Chen MJ, Lu Y, Hamazaki T, et al. Reprogramming adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into pluripotent stem cells by a mutant adeno-associated viral vector. *Hum Gene Ther Methods* 2014;25:72–82.
218. Sugii S, Kida Y, Kawamura T, et al. Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3558–3563.
219. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2007;2:3081–3089.
220. Eto S, Goto M, Soga M, et al. Mesenchymal stem cells derived from human iPS cells via mesoderm and neuroepithelium have different features and therapeutic potentials. *PLoS One* 2018;13:e0200790.
221. Mohsen-Kanson T, Hafner A-L, Wdziekonski B, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into brown and white adipocytes: role of Pax3. *Stem Cells* 2014;32:1459–1467.
222. Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell* 2016;165:1586–1597.
223. Aubin K, Safoine M, Proulx M, et al. Characterization of in vitro engineered human adipose tissues: relevant adipokine secretion and impact of TNF- α . *PLoS One* 2015;10:e0137612.
224. Aronowitz JA, Ellenhorn JDI. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:932e–939e.
225. Aronowitz JA, Hakakian CS. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plast Reconstr Surg* 2015;135:454e.
226. Domenis R, Lazzaro L, Calabrese S, et al. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:2–15.
227. Laloze J, Varin A, Bertheuil N, Grolleau JL, Vaysse C, Chaput B. Cell-assisted lipotransfer: current concepts. *Ann Chir Plast Esthet* 2017;62:609–616.
228. Koch L, Deiwick A, Schlie S, et al. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol Bioeng* 2012;109:1855–1863.
229. Ong CS, Yesanatharao P, Huang CY, et al. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatr Res* 2018; 83:223–231.

Abbreviations and Acronyms

2D	= two dimensional
3D	= three dimensional
AD-MSC	= adipose-derived mesenchymal stromal cell
ALS	= amyotrophic lateral sclerosis
ANGPT1	= angiopoietin-1
AT	= adipose tissue
ATMP	= advance therapy medicinal product
BAT	= brown adipose tissue
BDNF	= brain-derived neurotrophic factor
BM	= bone marrow
BM-MSC	= BM-derived MSC
BMP	= bone morphogenetic protein
CAL	= cell-assisted lipotransfer
CEA	= cultured epidermal autografts
CGRP	= calcitonin gene-related peptide
CMC	= carboxymethylcellulose
CONSORT	= consolidated standards of reporting trials
CXCL12	= C-X-C motif chemokine 12
dSAT	= deep subcutaneous adipose tissue
ECM	= extracellular matrix
EGF	= epidermal growth factors
EMA	= European Medicines Agency
EV	= extracellular vesicle
eWAT	= epididymal white adipose tissue
FDA	= Food and Drug Administration
FGF	= fibroblast growth factor
GDNF	= glial cell line-derived neurotrophic factor
GMP	= good manufacturing practice
HGF	= hepatocyte growth factors
IDO	= indoleamine 2,3-dioxygenase
IGF-1	= insulin growth factor-1
IL	= interleukin
iPSC	= inducible pluripotent stem cell
iWAT	= inguinal white adipose tissue
MS	= multiple sclerosis
MSC	= mesenchymal stromal cell
NGF	= nerve growth factor
PBS	= phosphate-buffered saline
PDGF	= platelet-derived growth factor
PGE2	= prostaglandin E2
PPAR γ	= peroxisome proliferator-activated receptor- γ
SCI	= spinal cord injury
SP	= substance P
sSAT	= superficial subcutaneous adipose tissue
SVF	= stromal vascular fraction
TAC1	= tachykinin/neurokinin A
TGF	= transforming growth factor
VEGF	= vascular endothelial growth factor
VIP	= vasoactive intestinal peptide
WAT	= white adipose tissue

I.4.1. La sécrétion paracrine des AD-MSCs

Nous vous renvoyons aux deux publications précédentes qui décrivent parfaitement la sécrétion paracrine des AD-MSCs.

I.4.2. La fraction stromale vasculaire (FSV) et son mode d'extraction

Dans un contexte in vivo, les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la graisse (AD-MSCs) se trouvent entre les adipocytes au sein de la matrice extracellulaire. Pour leur étude et leur expansion en milieu in vitro, il est nécessaire de dégrader cette matrice à l'aide d'enzymes protéolytiques. Cette dégradation doit avoir lieu à 37°C pendant une durée variable selon différentes sources, en utilisant un tampon contenant de la collagénase pour décomposer les fibres de collagène de la matrice extracellulaire (Figure 26 A, B). Une fois les composants cellulaires séparés, le produit de la digestion enzymatique doit être centrifugé pour isoler la fraction stromale vasculaire (FSV). La FSV contient toutes les cellules à l'exception des adipocytes. En effet, après centrifugation, le prélèvement se sépare en trois phases, de haut en bas : les adipocytes, le milieu de digestion et enfin la FSV (contenant les cellules hématopoïétiques, endothéliales et stromales) (Figure 26C). Il est important de noter que la FSV contient approximativement entre 2 et 10% d'AD-MSCs (Yoshimura et al., 2006). En vue d'une amplification clinique des AD-MSCs pour des thérapies cellulaires, la culture des cellules est une étape cruciale (Figure 26D), suivant les bonnes pratiques de fabrication, étant donné que ces cellules sont classées comme des médicaments de thérapie innovante (Sensebé et al., 2013). Différents milieux de culture ont été proposés, historiquement basés sur un mélange de sérum de veau fœtal (SVF) complété éventuellement par des facteurs de croissance, particulièrement le facteur de croissance fibroblastique basique (b-FGF). Afin de réduire l'utilisation de produits d'origine animale pour des applications cliniques, le lysat plaquettaire est une alternative au SVF (Sensebé et al., 2011, 2013). Au-delà de l'évaluation de leur efficacité clinique, pour laquelle il n'existe actuellement pas de marqueurs prédictifs simples, la question de la sécurité d'utilisation de ces cellules a récemment émergé. Cela est dû en partie à des travaux suggérant la possibilité d'immortalisation des cellules après une culture prolongée. Cependant, il est important de noter que ces études ont depuis été retirées en raison d'erreurs expérimentales. Contrairement à cela, de nombreuses études ont montré que bien que les cellules mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (BM-MSCs) et les AD-MSCs puissent présenter des anomalies chromosomiques in vitro, celles-ci ne semblent pas conduire à une transformation cancéreuse mais plutôt à une sénescence cellulaire (Sensebé et al., 2012 ; Tarte et al., 2010). De plus, il convient de souligner que les données disponibles suggèrent que les MSCs n'ont pas tendance à persister in vivo chez les individus immunocompétents, et qu'aucun cas de cancer secondaire n'a été signalé parmi les milliers de patients déjà traités avec ces cellules. Cela suggère que le risque de cancérogenèse indirecte par le biais d'une immunosuppression semble faible. Sur la base de ces éléments, les essais cliniques se poursuivent sous une réglementation stricte, en évaluant soigneusement le rapport entre les bénéfices et les risques de l'utilisation de ces cellules en fonction du contexte clinique (Aronowitz & Ellenhorn, 2013).

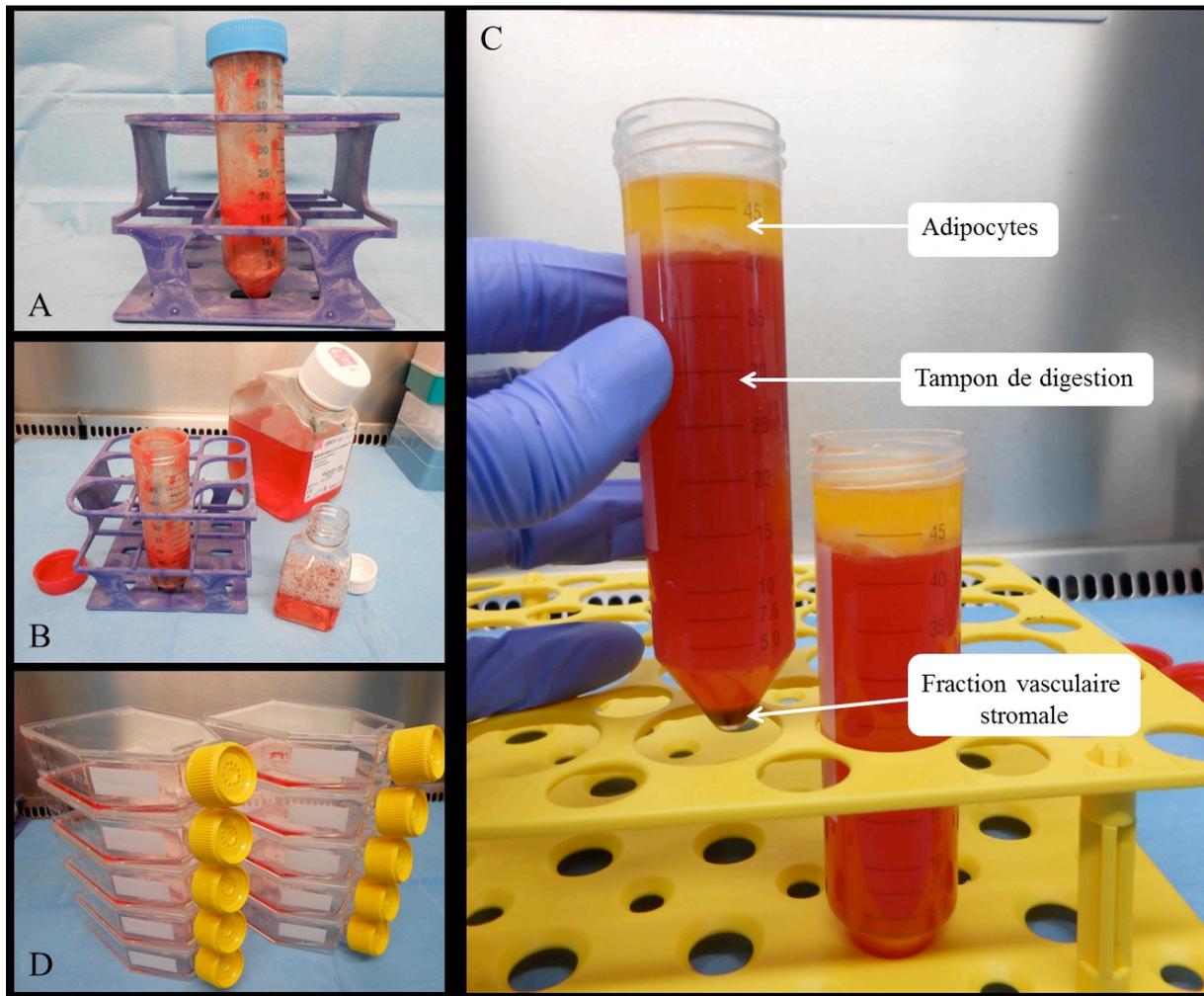


Figure 26 : Obtention de la fraction vasculaire stromale.

Illustration issue de la revue de Bertheuil et al. A- prélèvement de tissu adipeux. B- préparation d'un tampon de digestion contenant des enzymes protéolytiques. C- après digestion et centrifugation, nous obtenons 3 phases de haut en bas : les adipocytes, le tampon de digestion, la fraction stromale vasculaire. D- mise en culture de la fraction stromale vasculaire pour obtenir des AD-MSCs en culture.

L'intérêt des chirurgiens plasticiens se porte particulièrement sur l'utilisation directe de la fraction stromale vasculaire (FSV) en salle d'opération, évitant ainsi toute étape de culture cellulaire. Cette approche s'appuie sur le concept de la digestion enzymatique à l'aide de la collagénase, pour laquelle différentes machines sont disponibles pour les chirurgiens (Aronowitz & Ellenhorn, 2013).

Contrairement à la thérapie cellulaire, qui implique une population cellulaire "pure", la FSV englobe un ensemble cellulaire hétérogène, et les interactions potentielles au sein de cette population pourraient influencer des différences dans l'efficacité clinique, une question encore non résolue. De plus, il n'existe pas encore de normes standardisées pour l'obtention de la FSV, ce qui conduit à des mélanges cellulaires de compositions variables et hétérogènes.

En France, l'utilisation autologue de la FSV en salle d'opération est autorisée sans restriction légales, car les chirurgiens peuvent manipuler des tissus autologues tels que la réinjection de graisse dans la même procédure, en supposant que ce tissu conserve des fonctions cellulaires

de base. Cette situation diffère des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) cultivées, qui sont considérées comme des "Médicaments de thérapie innovante" et sont soumises à des contraintes plus strictes.

Cependant, le coût des procédures liées aux systèmes cliniques permettant la digestion enzymatique du tissu adipeux constitue un obstacle majeur à l'utilisation de la FSV en chirurgie plastique. Un nouvel espoir a émergé en 2013 avec la première description d'une digestion mécanique du tissu adipeux, appelée "nanofat grafting" par Tonnard et al. (2013) (Tonnard et al., 2013). Dans cette technique, le tissu est émulsifié en le passant entre des seringues, puis filtré à 500 µm. Une autre méthode mécanique a été décrite par Raposio et al. (2014), impliquant l'agitation du tissu suivi d'une centrifugation prolongée (Raposio et al., 2014).

Bien que ces deux techniques aient prétendu produire des MSCs dérivées de la fraction stromale vasculaire, aucune n'a été scientifiquement validée. De plus, il était probable que la composition de la FSV produite par ces deux techniques diffère, et par conséquent, le pourcentage de MSCs obtenues.

Pour répondre à cela, une caractérisation plus approfondie a été entreprise, comme détaillé dans l'article de Chaput et al. (2016) publié dans *Plastic and Reconstructive Surgery*. (Chaput et al., 2016). Cependant, il est nécessaire de poursuivre les efforts de caractérisation des sous-populations issues de ces techniques émergentes, ainsi que des études fonctionnelles pour déterminer si les cellules obtenues possèdent les mêmes propriétés immunomodulatrices et de soutien trophique que les MSCs cultivées. Une phase d'expérimentation clinique devra ensuite être entreprise pour mieux définir le rôle de ces techniques prometteuses dans l'arsenal thérapeutique des chirurgiens plasticiens. Ces points sont mis en évidence dans le commentaire publié par Laloze et al. (2021) (Laloze et al., 2021) en réponse au travail d'Alstrup et al. (2020), et paru dans *Plastic and Reconstructive Surgery* (Alstrup et al., 2020).

Measured Level of Human Adipose Tissue–Derived Stem Cells in Adipose Tissue Is Strongly Dependent on Harvesting Method and Stem Cell Isolation Technique

Sir:

We have read with great interest the study entitled “Measured Level of Human Adipose Tissue–Derived Stem Cells in Adipose Tissue Is Strongly Dependent on Harvesting Method and Stem Cell Isolation Technique.”¹ In the article, Alstrup et al. aim to compare the characteristics of adipose-derived mesenchymal stromal cells isolated from two types of plastic surgery samples, pieces of dermolipectomies that correspond to excised tissues, and lipoaspiration using the Coleman technique. We would like to thank the authors for this study because it is really important information to establish which method of harvesting is best.

Although this is not the first study comparing these two harvesting techniques, the authors have been able to overcome shortcomings of past studies.^{2,3} However, important points should be clarified after reading this article.

First, the authors do not specify where liposuction was performed. Indeed, if liposuction is performed at the subumbilical level (either before or after abdominoplasty), as is often the case, the repeated back-and-forth movements and tunnels left after liposuction make it impossible to know whether the excised tissues remain intact, as the authors claim, making an accurate comparison impossible. If it is another body region that is lipoaspirated, it is important to specify this because there are variations in cell yields depending on the body regions, as Alstrup et al. rightly point out in the Introduction.⁴ This point may represent a major bias of the study.

Second, the main data of this study show that enzymatic digestion associated with mechanical distortion results in 1.8 times more adipose-derived mesenchymal stromal cells in the excised tissue than in liposuction, highlighting the advantage of their combined digestion technique and the interest of using an intact tissue. In addition, the authors show that this difference is no longer significant with enzymatic digestion alone.

We agree with the authors that liposuction is too selective and does not recover vessels or fibrous tissue where adipose-derived mesenchymal stromal cells are present in high quantities. We would simply like to add that liposuction is more hemorrhagic than a scalpel excision, and therefore much of the aspirated tissue contains blood without adipose-derived mesenchymal stromal cells. Unfortunately, the authors do not discuss the results comparing the two techniques of sampling with enzyme digestion alone. However, Table 2 shows that there is a higher number of cells in the liposuction (33 versus 25), which is in disagreement with the results of their combined digestion. Enzyme digestion alone still represents the gold standard, so in the end, liposuction would seem to be more effective than

excised tissue. This inconsistency showed that mechanical digestion was necessary for collagenase to correctly digest excised tissues. It seems wise to now compare enzymatic digestion to mechanical digestion alone, which is increasingly practiced in studies and is producing interesting results. Moreover, because the data presented here are very different from the other publications on excised tissues,^{2,3} additional studies will be necessary to know the true potential of abdominoplasties as a donor site.

Other pitfalls should also be noted here. The authors talk about adipogenic and osteogenic differentiation but do not present any numerical data. Polymerase chain reaction experiments are essential to know the true power of differentiation. In addition, tests on angiogenic capacities and on immunomodulation (major capacity of adipose-derived mesenchymal stromal cells in regenerative medicine) would have been appreciated. In conclusion, we would like to thank Alstrup and his team for this innovative work, which offers new possibilities in the use of adipose-derived mesenchymal stromal cells.

DOI: 10.1097/PRS.0000000000000754

Jérôme Laloze, M.D.

University of Limoges
Myelin Maintenance and Peripheral Neuropathies
Faculties of Medicine and Pharmacy
Limoges, France
Department of Maxillofacial and Reconstructive Surgery
and Stomatology
Dupuytren University Hospital
Limoges, France

Elise Lupon, M.D.

Department of Maxillofacial and Reconstructive Surgery
and Stomatology
Dupuytren University Hospital
Toulouse, France

Julie Usseglio, M.D.

Department of Maxillofacial and Reconstructive Surgery
and Stomatology
Dupuytren University Hospital
Limoges, France
University of Limoges
Institute of Research for Ceramics (UMR CNRS 7315)
Limoges, France

Paul Girard, M.D.

Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic
Surgery
South Hospital
University of Rennes 1
Rennes, France

Alexis Desmoulière, Pharm.D., Ph.D.

Department of Maxillofacial and Reconstructive Surgery
and Stomatology
Dupuytren University Hospital
Limoges, France

Loïc Fiévet, Pharm.D.

University of Toulouse
STROMALab

346e

Etablissement Français du Sang-Occitanie
INSERM 1031
National Veterinary School of Toulouse
ERL5311 CNRS
Toulouse, France

Correspondence to Dr. Laloze
Department of Maxillofacial and Reconstructive Surgery
and Stomatology
Dupuytren University Hospital
2 Avenue Martin Luther King
87000 Limoges, France
jerome.laloze@chu-limoges.fr

DISCLOSURE

The authors have no financial interest to declare in relation to the content of this communication. The authors received no funding support for this work.

REFERENCES

1. Alstrup T, Eijken M, Brunbjerg ME, Hammer-Hansen N, Møller BK, Damsgaard TE. Measured level of human adipose tissue-derived stem cells in adipose tissue is strongly dependent on harvesting method and stem cell isolation technique. *Plast Reconstr Surg*. 2020;145:142–150.
2. Iyyanki T, Hubenak J, Liu J, Chang EI, Beahm EK, Zhang Q. Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield. *Aesthet Surg J*. 2015;35:467–476.
3. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006;8:166–177.
4. Raajendiran A, Ooi G, Bayliss J, et al. Identification of metabolically distinct adipocyte progenitor cells in human adipose tissues. *Cell Rep*. 2019;27:1528–1540.e7.

Reply: Measured Level of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Adipose Tissue Is Strongly Dependent on Harvesting Method and Stem Cell Isolation Technique

Sir:

We would like to thank the authors of the letter for very relevant questions regarding our article and a chance to clarify the topics.¹ For the first question, abdominoplasty was performed and the infraumbilical tissue was excised. Subsequently, the abdominal skin was split. Then, the tissue sample was split into two halves: liposuction was performed on one half of the tissue sample and excision was performed on the other half. Thus, liposuction and excision were performed at identical anatomical entities, and no manipulation of excised adipose tissue samples occurred before the stem cell isolation procedure.

As for the second question regarding adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yields, the authors of the letter state that the combination of mechanical distortion and enzymatic digestion increase adipose tissue-derived stem cell yield of a factor of 1.8 between excised and aspirated adipose

tissue samples. This statement is not clear to us. Table 1 describes the relations between the investigated groups; we report a factor of 2.1 for flow cytometry and 1.6 for fibroblast colony-forming unit assay quantification between excised and aspirated adipose tissue samples when isolated with the combination of mechanical distortion and enzymatic digestion. A factor of 1.8, quantified by fibroblast colony-forming unit assay, was found when we compared standard enzymatic digestion and combination of mechanical distortion and enzymatic digestion for aspirated adipose tissue. A factor of 2.3 was reported when quantified using flow cytometry.

A follow-up notion, that liposuction is a more hemorrhagic than excision, and that the liposuction samples therefore can be diluted with blood (not containing adipose tissue-derived mesenchymal stem cells) is mentioned. As we performed liposuction after abdominoplasty, the blood supply was disconnected, minimizing the risk of dilution noted by the authors of the letter. We do not have any data regarding this concern, but we did not notice a large dilution when the samples were washed before enzymatic and mechanical isolation.

As for discussing the results comparing excised and adipose tissue samples using standard enzymatic digestion, these data can be found in Table 1 with a median ratio of 0.94 and a value of $p = 0.72$. This finding is a main conclusion of the study, highlighting that standard enzymatic isolation is insufficient in extracting all resident adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. We have tried to highlight this in the second sentence in the Discussion section and through comparison to existing literature.

The authors of the letter mention that Table 2 reports a higher number of cells in the aspirated samples compared to excised samples (33,000 adipose-derived stem cells/ml versus 25,000 adipose-derived stem cells/ml quantified by flow cytometry) when only standard enzymatic isolation is performed. The authors of the letter further mention that this contradicts the conclusions of combination of enzymatic digestion and mechanical distortion.

As Table 2 demonstrates the average yields for each group, we recommend the reader to check Table 1 for statistical comparison between groups. In Table 1, comparison between excised and aspirated yield from standalone enzymatic digestion is presented with a median ratio of 0.94 and a value of $p = 0.72$; thus, the difference is far from statically significant and therefore does not contradict the conclusion of combination of enzymatic digestion and mechanical distortion.

It should be noted that the comparison displayed in Table 1 is available only for the units adipose-derived stem cells per gram. However, comparison between the groups using adipose-derived stem cells per milliliter produced equal confidence intervals and p values. The unit of adipose-derived stem cells per gram was chosen, as this is a more

I.4.3. Le milieu conditionné des MSCs

Diverses études menées *in vivo* ont examiné l'efficacité du produit de sécrétion des MSCs en vue d'améliorer le processus de cicatrisation dans des modèles de brûlures ou d'excision cutanée (Tableau 3). Les équipes de recherche ont adopté différentes techniques pour concentrer le milieu conditionné (MC), telles que l'ultracentrifugation ou la concentration par lyophilisation. Les articles de la littérature mentionnent principalement la dose injectée en termes de volume d'injection, ne fournissant ainsi aucune indication quant à la quantité de protéines ou de vésicules extracellulaires administrées. Seule une étude exprime la dose en équivalents cellulaires. En ce qui concerne les voies d'administration, le milieu conditionné est principalement administré localement, soit par injection sous-cutanée, soit en application topique au sein d'une crème ou d'un biomatériau. Seules deux études utilisent le MC par injection intrapéritonéale (I.P.). Il est également pertinent de noter que la majorité des études utilisent le MC dans des administrations répétées plutôt qu'en une seule injection unique, ce qui diffère des approches typiques de thérapie cellulaire.

L'ensemble de ces études mettent en évidence les propriétés intéressantes du MC dérivé des MSCs, notamment en ce qui concerne la modulation de l'inflammation, l'amélioration de la fermeture des plaies, la promotion de l'angiogenèse et le remodelage de la matrice extracellulaire, contribuant ainsi à la cicatrisation dans les modèles d'excision. Trois études ont également examiné l'impact du MC dans des modèles de brûlures. Ces trois études indiquent que le MC parvient à accélérer la fermeture des plaies et à améliorer l'angiogenèse et le remodelage de la matrice extracellulaire en réponse à des traumatismes.

Tableau 3 : Principales études précliniques *in vivo* utilisant du milieu conditionné pour améliorer la cicatrisation.

Ce tableau recense les études précliniques *in vivo* réalisées pour étudier l'effet du milieu conditionné (MC) de MSCs (CSM dans le tableau) dans la cicatrisation des plaies (liste non exhaustive). (Arno et al., 2014 ; Aryan et al., 2019 ; Bari et al., 2020 ; L. Chen et al., 2009 ; Mathen et al., 2021 ; Mehanna et al., 2015 ; Padeta et al., 2017 ; Payushina et al., 2018 ; Saheli et al., 2020 ; Santos et al., 2015 ; Shrestha et al., 2013 ; Sun et al., 2019 ; Tarcisia et al., 2017). Source : Thèse université M. Dedier : Intérêt du pré-conditionnement des Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) pour l'amélioration du traitement par autogreffe de peau des grands brûlés, octobre 2022.

Modèles	Références	Origines des CSM pour le sécrétome	Caractéristiques du MC				ACTIONS										
			Méthode de Concentration du MC	Dose et posologie	Voies d'administration	Type de Modèle	Cicatrisation	Immunomodulation	Migration / fermeture de la plaie	Angiogenèse	Remodelage	Prolifération					
Modèles de brûlure	(Aryan et al. 2018)	CSM de moelle osseuse humaine	Concentration 20 fois par lyophilisation	500 µl de MC tous les deux jours pendant 14 jours	I.P.	Modèle de brûlure de second degré rat				x	x				x		
	(Sun et al. 2019)	Human CSM gelée de Wharton	Absence de concentration	200 µl Application tous les deux jours pendant 8 semaines	Topique au sein d'un hydrogel	Modèles de plaies cutanées avec irradiation rat				x						x	
	(Padeta et al. 2017)	CSM de moelle osseuse humaine	N.R.	1 ml de MC deux fois par jour pendant 30 jours après le traumatisme	Topique dans une crème Bioplacement	Modèle de brûlure sévère rat				x							x
Modèles d'excision	(Liwien Chen et al. 2008)	CSM de moelle osseuse souris	Concentration 50 fois par ultrafiltration utilisant des unités de filtration de 5kDa	80 µl de MC en S.C. et 20 µl en topique une seule fois après le traumatisme	S.C. et topique	Modèle d'excision souris		x									
	(Shrestha et al. 2013)	CSM de cordon ombilical humain	Concentration par centrifugation	N.R. Tous les deux jours pendant 14 jours	S.C.	Plaies par excision dans un modèle de souris diabétiques		x									x
	(Arno et al. 2014)	CSM gelée de Wharton humain	N.R.	100 µl N.R.	Topique au sein de matrigel	Modèles d'excision souris		x									x
Modèles d'excision	(Santos et al. 2015)	CSM de cordon humain	Concentration 10 fois avec ultrafiltration et filtre de 3kDa	100 µl 3 fois	S.C.	Modèle d'excision rat				x							x
	(Mehanna et al. 2015)	CSM de moelle osseuse Rat	Absence de concentration	1 ml de MC une seule fois après le traumatisme	Topique dans un gel (mélange de fibrine et thrombine)	Modèle d'excision rat					x						x
	(Tarcisia et al. 2018)	CSM de tissu adipeux N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	Modèle d'excisions rat				x							
Modèles d'excision	(Payushina et al. 2018)	CSM de moelle osseuse rat	N.R.	100 µl 5 fois après le traumatisme puis J3, J5, J7 et J10	N.R.	Modèle d'excision rat					x						
	(Bari et al. 2020)	CSM du tissu adipeux humain	Concentration par TFF filtre de 5 kDa	2.106 équivalent cellules/mL 1 fois après le traumatisme	Topique au sein d'un biomatériau	Modèle d'excision souris					x						x
	(Saheli et al. 2020)	CSM de moelle osseuse humain	Concentration 50 fois par lyophilisation	N.R. 2 fois 12 h et 24 h après le traumatisme	I.P.	Plaies par excision dans un modèle de rat diabétique						x					x
Modèles d'excision	(Mathen et al. 2021)	CSM de cordon humain	Absence de concentration	1 ml N.R.	S.C.	Modèle d'excision rat											x

I.4.4. Les cytokines et facteurs de croissance

Ce chapitre est explicité dans la revue exhaustive publiée dans *Advance in Wound Care* (pages 81-83). (Laloze, Fiévet, et al., 2021)

I.4.5. Les vésicules extracellulaires

I.4.5.1. Caractéristiques et définition

Les vésicules extracellulaires (VE) sont des structures subcellulaires délimitées par une double couche lipidique similaire à la membrane plasmique (Figure 27A). Elles renferment des biomolécules provenant de la cellule d'origine, libérées de manière spontanée ou induite (Yáñez-Mó et al., 2015). Le terme générique "vésicules extracellulaires" englobe divers types de particules sécrétées par les cellules, tels que les exosomes, les microvésicules (MV) / ectosomes, les microparticules, les corps apoptotiques, ainsi que de petites, moyennes ou grandes vésicules. Ces catégories se distinguent par leur taille et leur mode de formation. Les exosomes (petites vésicules de 50 à 150 nm de diamètre), généralement formés via la voie endocytaire, correspondent aux vésicules intraluminales excrétées dans l'environnement extracellulaire (Figure 27B). Ils s'accumulent dans des corps multivésiculaires qui fusionnent avec la membrane plasmique avant d'être sécrétés. Les MV (vésicules de taille moyenne à grande, de 100 à 1000 nm de diamètre), en revanche, sont relâchées dans l'environnement extracellulaire à la suite d'une saillie de la membrane plasmique. Enfin, les corps apoptotiques, les plus grands (1-5 μm de diamètre), se forment à partir de fragments subcellulaires de cellules apoptotiques après leur désintégration (Mathieu et al., 2019).

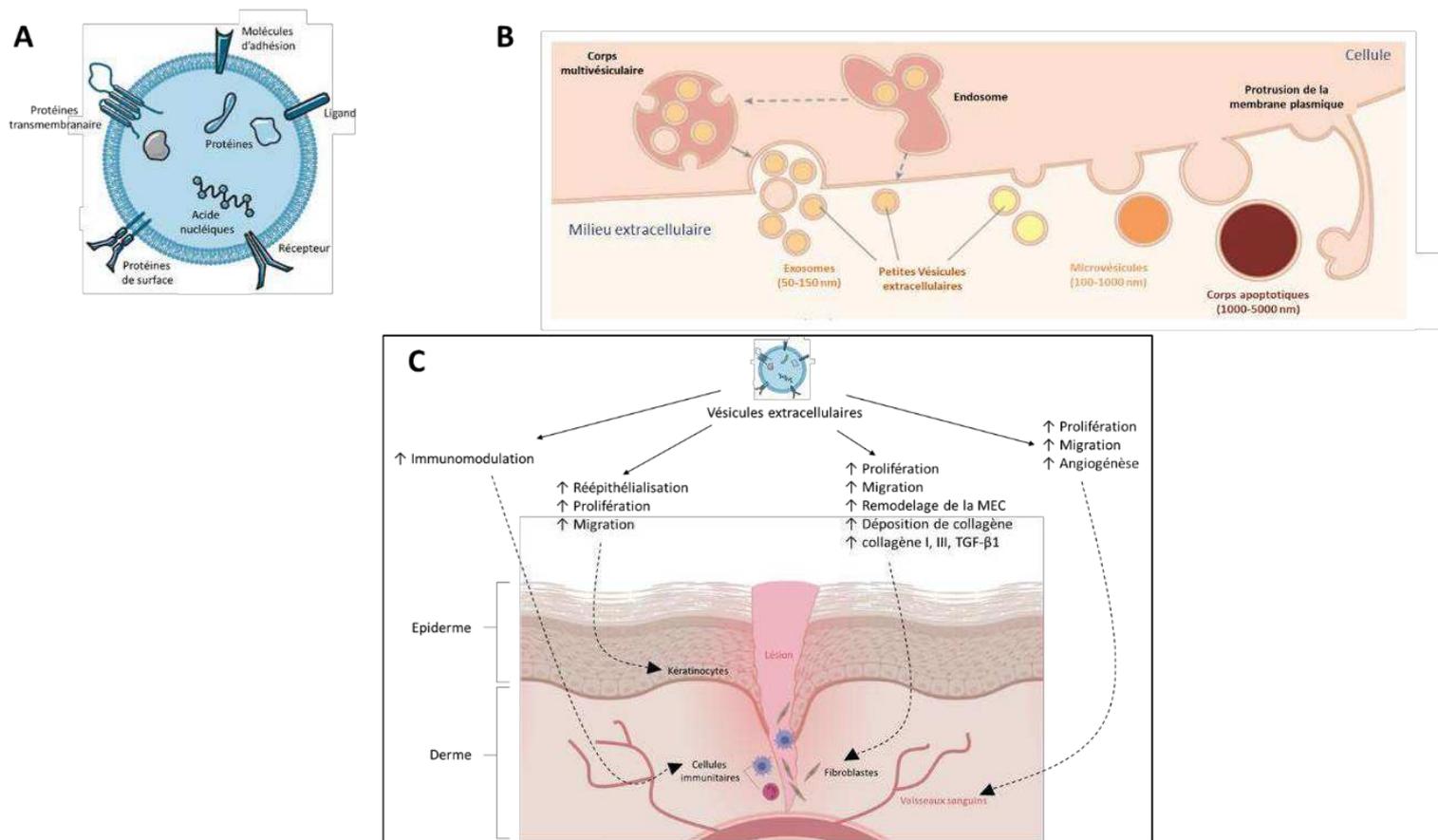


Figure 27 : Présentation schématique des vésicules extracellulaires et de leurs actions dans la cicatrisation.

(A) Schéma d'une vésicule extracellulaire (Cocozza et al., 2020). (B) Schéma de la formation des différents types de vésicules extracellulaires : exosomes, petites vésicules extracellulaires, microvésicules et corps apoptotiques (Wiklander et al., 2019). (C) Schéma de l'action des vésicules extracellulaires sur la cicatrisation inspiré de (Casado-Díaz et al., 2020).

La Société internationale pour les vésicules extracellulaires (ISEV) a établi des directives minimales d'information (MISEV pour *Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles*) à suivre pour l'étude des VE. Ce guide propose des méthodes d'isolement, de caractérisation et d'études fonctionnelles des VE, afin d'assister les groupes de recherche travaillant sur ce sujet (Théry et al., 2018). L'objectif principal de ces recommandations est de sensibiliser les chercheurs aux exigences expérimentales spécifiques au domaine des VE. À ce jour, les directives de l'ISEV conviennent que le terme "vésicules extracellulaires" englobe un continuum complexe de vésicules de tailles et de compositions différentes, résultant de divers mécanismes de formation et de libération. La caractérisation des VE est donc complexe et nécessite l'utilisation de multiples techniques. En effet, leur quantification peut être réalisée par le suivi individuel des nanoparticules, la microscopie électronique pour évaluer leur structure, ainsi que la détection par Western Blot ou cytométrie de flux des protéines couramment retrouvées dans les VE. La combinaison de ces approches permet de comparer et de nuancer les résultats expérimentaux entre différents groupes de recherche.

I.4.5.2. Propriétés des exosomes dans la cicatrisation cutanée

De nos jours, la recherche s'intéresse de plus en plus aux vésicules extracellulaires (VE) en raison de leurs nombreuses propriétés biologiques et des diverses applications potentielles de ces structures. En effet, plusieurs groupes de recherche envisagent d'utiliser les VE non pas comme des médicaments en eux-mêmes, mais plutôt comme des cargaisons capables de transporter des principes actifs tels que des protéines intracellulaires (Le Saux et al., 2021). Notre domaine d'étude se concentre davantage sur les VE en tant que produits capables de reproduire l'effet cellulaire sans la présence de la cellule elle-même, les distinguant ainsi en tant qu'agents thérapeutiques potentiels.

Plusieurs études précliniques ont révélé les effets bénéfiques des VE dans le traitement de diverses pathologies, notamment les lésions cardiaques, rénales, hépatiques, cérébrales et la cicatrisation cutanée (Bruno et al., 2012 ; Lai et al., 2010 ; B. Zhang, Wang, et al., 2015). Tout comme les MSCs, les VE semblent agir à différentes étapes de la cicatrisation : inflammation, prolifération, migration, soutien aux cellules de réparation, fermeture des plaies et remodelage de la matrice extracellulaire pour réduire la formation de cicatrices (Casado-Díaz et al., 2020) (Figure 27C). Bien qu'il existe des VE dérivées de divers types cellulaires, nous nous concentrerons ici uniquement sur les VE dérivées des MSCs.

Les VE semblent prometteuses pour moduler les activités d'immunomodulation et d'immunosuppression des MSCs. Par exemple, une étude a montré que le traitement des cellules mononucléées périphériques avec des VE réduisait leur sécrétion de cytokines inflammatoires IL-1 β et TNF- α tout en augmentant la production de TGF- β 1 (W. Chen et al., 2016). Dans un modèle de brûlure chez le rat, l'administration de VE dérivées du cordon ombilical a diminué le recrutement de leucocytes, en particulier de neutrophiles et de macrophages, au site de la lésion induite par la brûlure après 24 heures. En revanche, l'administration de VE dérivées de fibroblastes n'a eu aucun effet. Cette action anti-inflammatoire intéressante semble être liée à la présence abondante de miR-181c dans les exosomes des MSCs du cordon ombilical. Des études utilisant des analogues de ce miARN ont démontré son rôle dans la régulation de l'inflammation liée aux brûlures, notamment en réduisant l'expression de la protéine TLR4 (X. Li et al., 2016). En plus des résultats prometteurs du pré-conditionnement des MSCs, l'effet d'un pré-conditionnement inflammatoire tel que le LPS a été étudié sur les VE. Ces VE ont été capables d'induire la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, de réduire l'inflammation et d'accélérer la cicatrisation dans un modèle de plaie diabétique chez le rat. Ces effets sembleraient principalement être liés à l'abondance de miR-let-7b dans les exosomes des MSC préconditionnées. Ce type de miARN est capable de réduire la signalisation du TLR4, contribuant ainsi à la résolution de l'inflammation et au maintien de l'homéostasie tissulaire (Ti et al., 2015).

L'activité angiogénique des VE dérivées des MSCs a été étudiée dans de nombreux travaux, en particulier pour le traitement des ulcères chroniques liés au diabète. Une étude a démontré que l'ajout de VE dérivées d'AD-MSCs améliorait la néovascularisation et la survie d'un lambeau cutané (Bai et al., 2018). La néovascularisation et la fermeture des plaies étaient encore plus prononcées lorsque les MSCs avaient été préconditionnées à l'H₂O₂. Une autre étude a montré que les VE dérivées des MSCs du cordon ombilical étaient capables d'améliorer la prolifération, la migration et la formation de tubes par les cellules endothéliales en fonction de la dose. Ces VE ont même réussi à améliorer l'angiogenèse dans un modèle

de brûlure au deuxième degré chez le rat (B. Zhang, Wang, et al., 2015). Cette activité angiogénique a également été associée à une augmentation de la survie d'une greffe autologue de tissu adipeux ou lipofilling. Cependant, cette technique est limitée par une perte d'efficacité initiale due à une mortalité cellulaire des adipocytes réinjectés. De nombreuses études ont cherché à améliorer cette survie en combinant l'injection de cellules souches ou d'exosomes dérivés de ces cellules souches, créant ainsi ce que l'on appelle la cell assisted lipotransfer. L'article de Zhu et al. (Zhu et al., 2020) paru dans *Plastic and Reconstructive Surgery*, que nous avons commenté, illustre justement l'intérêt de ces exosomes dérivés d'AD-MSCs pour la survie des adipocytes ainsi que leur transformation en adipocytes bruns (favorisant la thermogénèse et témoignant d'une angiogénèse néo-associée) (Laloze, Lupon, et al., 2021) (voir page 114).

De nombreuses études ont montré que les effets bénéfiques des VE dans la cicatrisation sont en partie attribuables à leur capacité à moduler la migration des cellules responsables de la fermeture des plaies et à leur action sur le remodelage. Par exemple, des exosomes dérivés de BM-MSCs ont été capables d'augmenter la prolifération et la migration des fibroblastes dermiques sains ou issus de plaies chroniques. Dans le même modèle, ces exosomes ont également favorisé la formation de tubes par les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs) et activé les voies AKT, STAT et ERK (Shabbir et al., 2015). Plusieurs modèles d'excision ont montré des avantages à utiliser les VE dérivées des MSCs pour améliorer la ré-épithélialisation (Hu et al., 2016 ; Pelizzo et al., 2018 ; W. Zhang et al., 2018). L'administration d'exosomes issus d'AD-MSCs a réussi à accélérer la cicatrisation in vivo en impliquant notamment la voie de signalisation PI3K/Akt. L'ajout de ces vésicules aux fibroblastes a entraîné une sécrétion accrue d'ARNm et de protéines impliquées dans le remodelage, telles que les collagènes de type I et III, ainsi que la métalloprotéinase matricielle 1 (MMP1), le b-FGF et le TGF- β 1 (W. Zhang et al., 2018). Enfin, les VE ont été démontrées capables de traverser la barrière épidermique et d'augmenter l'expression de collagène de type I et d'élastine dans des modèles ex vivo de peau (Y. J. Kim et al., 2017).

À l'heure actuelle, peu d'études précliniques concernant les VE dans le contexte des brûlures sont disponibles. Celles-ci sont présentées dans le Tableau 4. Cependant, ces premiers résultats sont encourageants. Les vésicules extracellulaires semblent améliorer la cicatrisation en réduisant l'inflammation (X. Li et al., 2016), en optimisant le dépôt de collagène et le remodelage tissulaire (B. Zhang et al., 2016), ainsi qu'en favorisant l'angiogénèse (J. Liu et al., 2021; B. Zhang, Wu, et al., 2015).

Ces différentes études isolent les VE à l'aide de kits d'isolement spécifiques ou de la technique d'ultracentrifugation, et la dose est principalement exprimée en termes de quantité de protéines.

Plusieurs essais cliniques impliquant les VE dans le traitement de diverses affections cutanées sont en cours. Par exemple, un essai clinique italien utilise des VE dérivées du sérum de patients pour traiter les ulcères. Cet essai clinique (NCT04652531) a pu être initié après avoir démontré que l'administration de VE obtenues à partir du sérum de donneurs sains augmentait la densité des capillaires locaux et le signal Doppler par rapport au groupe témoin (Cavallari et al., 2017).

Tableau 4 : Principales études précliniques utilisant des VE pour traiter les brûlures.

Ce tableau recense les cas cliniques impliquant la thérapie par MSCs (CSM dans le tableau) pour traiter les brûlure profondes et étendues. Abréviations : SCT : surface corporelle totale, MO : moelle osseuse, Auto : autologue, Allo : allogénique. (X. Li et al., 2016 ; Liu et al., 2021 ; B. Zhang et al., 2016 ; B. Zhang, Wang, et al., 2015 ; B. Zhang, Wu, et al., 2015). Source : Thèse université M. Dedier : Intérêt du pré-conditionnement des cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) pour l'amélioration du traitement par autogreffe de peau des grands brûlés, octobre 2022.

Références	Source de CSM pour la production de VE	Méthode d'isolement des VE	Dose de VE Posologie	Voie d'administration	Modèle de brûlure	Résultats
(X. Li et al. 2016)	CSM de cordon humain	Centrifugation différentielle	200 µg 1 administration	S.C.	Brûlure de second degrés rat	Les VE améliorent la prolifération, la réépithélialisation et accélèrent la cicatrisation Cet effet implique la voie Wnt4/Beta-caténine et AKT
(J. Liu et al. 2021)	CSM de cordon humain	Ultracentrifugation	200 µg 1 administration	S.C.	Brûlure de second degrés rat	Les VE soutiennent les cellules endothéliales pour la formation de nanotubes et augmentent la densité vasculaire Cet effet implique la voie Wnt/b-catenine
(B. Zhang et al. 2016)	CSM de cordon humain	Filtration spécifique Kit d'isolement	800 µg 1 administration	I.V.	Brûlure de troisième degrés rat	L'injection réduit la réponse inflammatoire à la suite de la brûlure. Cet effet implique miR181c qui régulerait négativement la voie de signalisation du TLR4
(B. Zhang, Wang, et al. 2015)	CSM de cordon humain	Filtration spécifique	200 µg 1 administration	S.C.	Brûlure de second degrés rat	Les VE limitent l'expansion des cellules de la peau et le dépôt de collagène lors de la phase de remodelage de la matrice extracellulaire
(B. Zhang, Wu, et al. 2015)	CSM de cordon humain	Ultracentrifugation	1 mg 1 administration	S.C.	Brûlure de second degrés rat	Les VE accélèrent la réépithélialisation et améliorent l'angiogénèse Cet effet implique Ang-2.

Un autre essai de phase I/II enregistré dans Clinical Trials (NCT04173650) vise à utiliser des vésicules extracellulaires dérivées de MSC de la moelle osseuse allogéniques pour traiter l'épidermolyse bulleuse. Ce traitement repose sur la constatation que les vésicules extracellulaires issues de MSCs de la moelle osseuse ont démontré leur capacité à augmenter le taux de collagène VII, suggérant ainsi un potentiel thérapeutique pour l'épidermolyse bulleuse (McBride et al., 2017).

Il est important de noter qu'un traitement composé de produits de sécrétion contenant des protéines et des vésicules extracellulaires ne sera pas soumis au même cadre réglementaire que les MSCs, mais plutôt considéré comme un médicament biologique, similaire aux vaccins par exemple.

Par ailleurs, tout comme avec les MSCs, l'origine tissulaire semble influencer les effets biologiques des vésicules extracellulaires. Une analyse bio-informatique réalisée par Wang et al. a révélé que les vésicules extracellulaires provenant de trois sources différentes (tissu adipeux, moelle osseuse et tissu ombilical) présentent des contenus protéiques distincts, entraînant potentiellement des effets biologiques différents (Wang et al., 2020). Une autre équipe de recherche a observé que les vésicules extracellulaires issues de MSCs du tissu adipeux contiennent quatre fois plus de néprilysine que celles provenant de MSCs de la moelle

osseuse. Étant donné que la néprilysine est une enzyme cruciale dans la dégradation du peptide β -amyloïde, les vésicules extracellulaires provenant de ces deux sources ne sont probablement pas équivalentes en termes d'activité biologique et d'intérêt thérapeutique pour le traitement de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, caractérisée par une surexpression du peptide β -amyloïde (Katsuda et al., 2013).

Un point de vue succinct sur l'importance des exosomes en médecine régénérative a été publié dans la revue *BIOCELL* (Laloze & Desmoulière, 2022). De même, un commentaire dans *Plastic and Reconstructive Surgery* sur l'intérêt des exosomes dans le lipofilling a été effectué (Laloze, Lupon, et al., 2021).

Exosomes from adipose tissue-derived stem/stromal cells: A key to future regenerative medicine

JÉRÔME LALOZE^{1,2}; ALEXIS DESMOULIÈRE^{1,*}

¹ University of Limoges, Neuropathies and Therapeutic Innovations (UR 20218), Faculties of Medicine and Pharmacy, Limoges, F-87000, France

² Department of Maxillo-Facial and Reconstructive Surgery and Stomatology, University Hospital Dupuytren, Limoges, F-87000, France

Key words: Adipose-derived mesenchymal stem/stromal cell, Exosome, Regenerative medicine, Secretome

Abstract: Advances in regenerative medicine correlate strongly with progress in the use of adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. The range of therapeutic indications has also expanded over recent years. Numerous recent studies have highlighted the primary importance of paracrine secretion by these cells. Though it is interesting to compare the different types of such secretions, we believe that exosomes (extra-cellular vesicles possessing the same properties as their source cells) will likely be the main key in tomorrow's cell therapy. Exosomes also have many advantages compared to the direct use of cells, making these particles a major target in fundamental and translational research.

Background

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have an extremely broad therapeutic potential and numerous applications have already emerged over the last decade. Correlated with improvements in extraction and isolation techniques for these cells, the clinical indications for their use have become more precise and more numerous. As adipose tissue constitutes a very important reservoir for MSCs (Zuk *et al.*, 2002) and allows an easy extraction of MSCs, adipose tissue-derived (AD)-MSCs are considered as the cell of choice for regenerative medicine (Laloze *et al.*, 2021). Indeed, they have similar anti-inflammatory properties than their counterparts from other tissues (such as bone marrow-derived- or umbilical cord-derived-MSCs) (Puissant *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2009) making them the best candidate to treat diseases such as rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus (Lipsky, 2001). They are also known for their high angiogenic potential which allows their use in various ischemic diseases such as diabetic foot (da Silva *et al.*, 2017; da Silva *et al.*, 2019).

In addition to their capacity to differentiate into mesodermal cells and their self-renewal, which are the main characteristics of these cells, they have paracrine properties which would be beneficial in wound healing, for example, but also in tissue bioengineering. Studies in the 2000s

already showed the paracrine action of AD-MSCs which by secreting in particular interleukin-10 (IL-10), hepatocyte growth factor (HGF) and transforming growth factor (TGF)-beta inhibit the proliferation and secretion of pro-inflammatory cytokines by T lymphocytes (Puissant *et al.*, 2005; Wolf and Wolf, 2008; Yañez *et al.*, 2010) and induce a transition from the pro-inflammatory macrophage phenotype to an anti-inflammatory macrophage phenotype (Kim and Hematti, 2009; Manning *et al.*, 2015).

The paracrine functions of AD-MSCs are exerted in a variety of ways: cell to cell contact, secretion of soluble factors into the interstitium or secretion of extracellular vesicles. This last mechanism includes microvesicles (>150 nm) and exosomes (<150 nm) (Galipeau and Sensébé, 2018). The latter particles have gained more and more attention in translational research over recent years as they have many advantages for clinical use (Hu *et al.*, 2016).

Viewpoint

Exosomes are ubiquitous structures that reproduce most of the functional effects of the cells from which they are derived (Le Lay *et al.*, 2018) (Fig. 1). The main superiority of these particles is delivering higher levels of biomolecules leading to prolonged desired effect. In addition, exosomes show better homing to target tissue compared with parental cells. However, for optimal mass production of exosomes, it is necessary to have a reliable cell source (Mendt *et al.*, 2019). Due to the advantages described above, AD-MSCs currently represent the most promising cell source

*Address correspondence to: Alexis Desmoulière,
alexis.desmouliere@unilim.fr
Received: 28 February 2022; Accepted: 20 May 2022



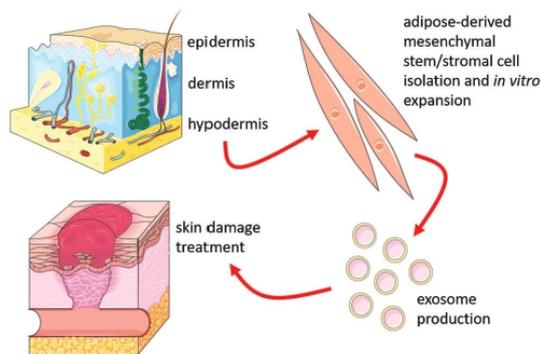


FIGURE 1. Exosomes obtained from adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells (AD-MSCs) for cutaneous wound treatment. AD-MSCs are easy to isolate and they produce significant quantities of exosomes, permitting their allogeneic use and the creation of exosome banks (realized by using in part Servier Medical ART, <https://smart.servier.com/>).

(Yeo *et al.*, 2013). Moreover, their small size avoids the problems of venous or arterial thrombosis (Cho *et al.*, 2018).

Vizoso *et al.* (2017) has also demonstrated the possibility of modifying exosomes before their use in order to obtain specific desired effects on targeted cells according to the required effect or therapy (Vizoso *et al.*, 2017). Additionally, it has been shown that the use of stem-cell-cultured conditioned media or exosomes was more economical and convenient than using cells since it avoids invasive cell transplantation procedures (Osugi *et al.*, 2012; Bian *et al.*, 2022). Thus, for all of the above-mentioned reasons, exosomes from AD-MSCs deserve the attention of researchers.

Moreover, numerous studies have already shown the efficacy of exosomes in pre-clinical models. Exosomes from AD-MSCs can stimulate cell migration, proliferation and collagen synthesis in fibroblasts, leading to accelerated wound healing *in vivo* (Hu *et al.*, 2016). Thus, there seem to be several mechanisms through which they could potentially enhance wound repair. They can also improve lipofilling by increasing angiogenesis and the rate of fat resorption. Indeed, they are similar to AD-MSCs in terms of fat resorption, up-regulating early inflammation and angiogenesis (Chen *et al.*, 2019). Recently, exosomes derived from hypoxia-treated AD-MSCs have shown great capacity to promote angiogenesis in lipofilling (Han *et al.*, 2019). Li *et al.* (2018) recently showed *in vitro* that exosomes secreted by AD-MSCs induced endothelial progenitor cell proliferation and the overexpression of nuclear factor erythroid 2 related factor (Nrf2), showing protective effects in a rat model of diabetic foot ulcer (Li *et al.*, 2018). They also promote increased collagen deposition in the late stage of wound healing in diabetic mice (Wang *et al.*, 2020).

Lastly, they have been shown to be therapeutically effective in animal disease models, for example by exhibiting immunosuppressive activity against atopic dermatitis (Cho *et al.*, 2018).

Discussion

Exosomes derived from AD-MSCs possess all the characteristics to be one of the main therapeutic tools in

regenerative medicine in the coming years. We therefore encourage the scientific community to concentrate their efforts on this subject. Indeed, some important aspects remain to be investigated.

One of the advantages of AD-MSCs is their heterogeneity, coming from multiple sources. They thus have different characteristics depending on their region of origin or even depending on the tissue layer from which they are collected (Vijay *et al.*, 2020; Raajendiran *et al.*, 2019). It therefore seems obvious that exosomes will not all possess the same properties and advantages. Comparative studies would therefore allow targeting their use according to the pathology.

It will also be important to compare the efficacy of exosomes to soluble secreted factors. It is known that trophic factors produced by these stem cells can promote growth and viability of adjacent cells. Exosomes are also able to support angiogenesis by secreting factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin 1 (Sacchetti *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2012; Watt *et al.*, 2013; Bortolotti *et al.*, 2015). C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12) also named stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) is also secreted by MSCs and allows the recruitment of other immune cells and progenitors to the site of injury (Oswald *et al.*, 2004). The use of these soluble factors would be faster, easier and more cost effective; however, we believe that exosomes contain all the necessary materials to reproduce the same effects as the source cell.

The concept of tissue engineering in regenerative medicine integrates all the technologies using living cells or biomaterials (synthetic or natural), in order to reconstruct or regenerate human tissues and organs. MSC-based therapy combined with artificial scaffolds offers a promising strategy to promote wound healing or complete reconstruction of full-thickness skin. In this context, exosomes can be considered as a combined carrier and scaffold. Their natural biocompatibility and cell-targeting characteristics allow exosomes to transport drugs (Taverna *et al.*, 2017). As Vizoso and his colleagues have previously shown (Vizoso *et al.*, 2017), many recent studies have also revealed that some characteristics and contents of exosomes can be modified by other substances. Under particular culture conditions, exosomes can serve as stable and efficient vehicles to be loaded with specific proteins, lipids, and genetic material, including mRNAs, miRNAs, other small non-coding RNAs, and DNA (Bungulawa *et al.*, 2018). Recently, Shafei *et al.* (2020) used exosomes loaded in alginate gel as a bioactive scaffold in an *in vivo* study. They showed that this active dressing technique could significantly promote wound healing, collagen synthesis and local angiogenesis (Shafei *et al.*, 2020).

Finally, despite the reservations expressed by some (Rezabakhsh *et al.*, 2021), the increasing number of clinical trials using exosomes (ClinicalTrials.gov) illustrates the safety and the potential efficacy of this type of treatment for treating diseases (Table 1).

Thus, we can conclude that exosomes represent a real challenge in basic research in order to benefit from their full potential. Numerous studies are still necessary to compare them to other actors but we see that exosomes are now a major key in regenerative medicine future.

TABLE 1

Clinical trials using exosomes from adipose tissue-derived stem/stromal cells

Clinical trials	Application
NCT04276987	Use for treat severe novel coronavirus pneumonia
NCT04270006	Treatment of periodontitis
NCT04544215	Treatment of pulmonary infection
NCT04388982	Treatment of Alzheimer's disease
NCT05259449	Diabetes
NCT03971955	Characterization of adult onset autoimmune diabetes
NCT04998058	Enhancement of bone formation in bone grafting

Availability of Data and Materials: No data are included within this viewpoint.

Author Contribution: Both authors contributed equally for this viewpoint.

Ethics Approval: No ethics approval was required for this study.

Funding Statement: The authors received no specific funding for this study.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest to report regarding the present study.

References

- Bian D, Wu Y, Song G, Azizi R, Zamani A (2022). The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: A comprehensive review. *Stem Cell Research & Therapy* **13**: 24. DOI 10.1186/s13287-021-02697-9.
- Bortolotti F, Ukovich L, Razban V, Martinelli V, Ruozzi G, Pelos B, Dore F, Giacca M, Zacchigna S (2015). *In vivo* therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure. *Stem Cell Reports* **4**: 332–339. DOI 10.1016/j.stemcr.2015.01.001.
- Bungulawa EJ, Wang W, Yin T, Wang N, Durkan C, Wang Y, Wang G (2018). Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *Journal of Nanobiotechnology* **16**: 81. DOI 10.1186/s12951-018-0403-9.
- Chen B, Cai J, Wei Y, Jiang Z, Desjardins HE et al. (2019). Exosomes are comparable to source adipose stem cells in fat graft retention with up-regulating early inflammation and angiogenesis. *Plastic and Reconstructive Surgery* **144**: 816e–827e. DOI 10.1097/PRS.00000000000006175.
- Cho BS, Kim JO, Ha DH, Yi YW (2018). Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis. *Stem Cell Research & Therapy* **9**: 187. DOI 10.1186/s13287-018-0939-5.
- da Silva LP, Reis RL, Correlo VM, Marques AP (2019). Hydrogel-based strategies to advance therapies for chronic skin wounds. *Annual Review of Biomedical Engineering* **21**: 145–169. DOI 10.1146/annurev-bioeng-060418-052422.
- da Silva LP, Santos TC, Rodrigues DB, Pirraco RP, Cerqueira MT, Reis RL, Correlo VM, Marques AP (2017). Stem

- cell-containing hyaluronic acid-based spongy hydrogels for integrated diabetic wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* **137**: 1541–1551. DOI 10.1016/j.jid.2017.02.976.
- Galipeau J, Sensébé L (2018). Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* **22**: 824–833. DOI 10.1016/j.stem.2018.05.004.
- Han Y, Ren J, Bai Y, Pei X, Han Y (2019). Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **109**: 59–68. DOI 10.1016/j.biocel.2019.01.017.
- Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, Huang F, Zhang H, Chen L (2016). Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Scientific Reports* **6**: 32993. DOI 10.1038/srep32993.
- Kim J, Hematti P (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology* **37**: 1445–1453. DOI 10.1016/j.exphem.2009.09.004.
- Laloze J, Fiévet L, Desmoulière A (2021). Adipose-derived mesenchymal stromal cells in regenerative medicine: state of play, current clinical trials, and future prospects. *Advances in Wound Care* **10**: 24–48. DOI 10.1089/wound.2020.1175.
- Le Lay S, Martinez MC, Andriantsitohaina R (2018). Extracellular vesicles as biomarkers and bioeffectors of metabolic syndrome. *Médecine/Sciences* **34**: 936–943. DOI 10.1051/medsci/2018239.
- Li X, Xie X, Lian W, Shi R, Han S, Zhang H, Lu L, Li M (2018). Exosomes from adipose-derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model. *Experimental & Molecular Medicine* **50**: 1–14. DOI 10.1038/s12276-018-0058-5.
- Lin RZ, Moreno-Luna R, Zhou B, Pu WT, Melero-Martin JM (2012). Equal modulation of endothelial cell function by four distinct tissue-specific mesenchymal stem cells. *Angiogenesis* **15**: 443–455. DOI 10.1007/s10456-012-9272-2.
- Lipsky PE (2001). Systemic lupus erythematosus: An autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nature Immunology* **2**: 764–766. DOI 10.1038/ni0901-764.
- Manning CN, Martel C, Sakiyama-Elbert SE, Silva MJ, Shah S, Gelberman RH, Thomopoulos S (2015). Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate tendon fibroblast responses to macrophage-induced inflammation *in vitro*. *Stem Cell Research & Therapy* **6**: 74. DOI 10.1186/s13287-015-0059-4.
- Mendt M, Rezvani K, Shpall E (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplantation* **54**: 789–792. DOI 10.1038/s41409-019-0616-z.
- Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M (2012). Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Engineering Part A* **18**: 1479–1489. DOI 10.1089/ten.tea.2011.0325.
- Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells* **22**: 377–384. DOI 10.1634/stemcells.22-3-377.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J et al. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived

- adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology* **129**: 118–129. DOI 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.
- Raajendiran A, Ooi G, Bayliss J, O'Brien PE, Schittenhelm RB, Clark AK, Taylor RE, Rodeheffer MS, Burton PR, Watt MJ (2019). Identification of metabolically distinct adipocyte progenitor cells in human adipose tissues. *Cell Reports* **27**: 1528–1540.e7. DOI 10.1016/j.celrep.2019.04.010.
- Rezabakhsh A, Sokullu E, Rahbarghazi R (2021). Applications, challenges and prospects of mesenchymal stem cell exosomes in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy* **12**: 521. DOI 10.1186/s13287-021-02596-z.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S et al. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**: 324–336. DOI 10.1016/j.cell.2007.08.025.
- Shafei S, Khanmohammadi M, Heidari R, Ghanbari H, Nooshabadi VT, Farzambar S, Akbari qomi M, Sanikhani NS, Absalan M, Tavosidana G (2020). Exosome loaded alginate hydrogel promotes tissue regeneration in full-thickness skin wounds: an *in vivo* study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **108**: 545–556. DOI 10.1002/jbm.a.36835.
- Taverna S, Pucci M, Alessandro R (2017). Extracellular vesicles: small bricks for tissue repair/regeneration. *Annals of Translational Medicine* **5**: 83. DOI 10.21037/atm.2017.01.53.
- Vijay J, Gauthier MF, Biswell RL, Louiselle DA, Johnston JJ et al. (2020). Single-cell analysis of human adipose tissue identifies depot and disease specific cell types. *Nature Metabolism* **2**: 97–109. DOI 10.1038/s42255-019-0152-6.
- Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: 1852. DOI 10.3390/ijms18091852.
- Wang J, Yi Y, Zhu Y, Wang Z, Wu S, Zhang J, Hu X, Nie J (2020). Effects of adipose-derived stem cell released exosomes on wound healing in diabetic mice. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery* **34**: 124–131.
- Watt SM, Gullo F, van der Garde M, Markeson D, Camicia R, Khoo CP, Zwaginga JJ (2013). The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *British Medical Bulletin* **108**: 25–53. DOI 10.1093/bmb/ldt031.
- Wolf D, Wolf AM (2008). Mesenchymal stem cells as cellular immunosuppressants. *Lancet* **371**: 1553–1554. DOI 10.1016/S0140-6736(08)60666-2.
- Yañez R, Oviedo A, Aldea M, Bueren JA, Lamana ML (2010). Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Experimental Cell Research* **316**: 3109–3123. DOI 10.1016/j.yexcr.2010.08.008.
- Yeo RW, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ, Lim SK (2013). Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**: 336–341. DOI 10.1016/j.addr.2012.07.001.
- Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS et al. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunology* **259**: 150–156. DOI 10.1016/j.cellimm.2009.06.010.
- 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. *Molecular Biology of the Cell* **13**: 4279–4295. DOI 10.1091/mbc.e02-02-0105.

grafting in a mouse model with immunosuppression. After repeated adipose-derived stem cell–derived extracellular vesicle supplementation, we did not observe the death of mice or any events that were not conducive to graft survival. We preliminarily consider xenogeneic local injection of adipose-derived stem cell–derived extracellular vesicles as a safe method in a mouse model with immunosuppression, and propose the possibility of allogeneic application of extracellular vesicles in the clinic. Compared with stem cell therapy, the main advantage of clinical application of stem cell–derived extracellular vesicles is its lower immunogenicity (no nucleus) that is more suitable to develop into an allogeneic biological agent, in addition to easier cryopreservation and transportation.

We agree with the view of Zhao and Sun that the grafted fat pad is damaged more severely when cut into smaller pieces to pass through a fine needle. In the follow-up experiments, we will consider grafting free fat with a 16-gauge needle in the murine model. In addition, according to a recent study performed by Wang et al.,⁹ more macrophages will be recruited in the donor site than in the recipient site after autologous fat grafting. Therefore, in the mouse model of autologous inguinal fat grafting we used in this study, tissue repair at the donor site may lead to decreased infiltration of macrophages in the grafted area and ultimately decrease the survival rate of the grafts, compared with human fat xenografting in the nude mouse model.

DOI: 10.1097/PRS.00000000000007820

Yuan-Zheng Zhu, M.D.

Yang-Yan Yi, M.D.

Department of Plastic Surgery
Second Affiliated Hospital of Nanchang University
Nanchang, Jiangxi, People's Republic of China

Correspondence to Dr. Yi
Department of Plastic Surgery
Second Affiliated Hospital of Nanchang University
No. 1 Minde Road
Nanchang, Jiangxi 330006, People's Republic of China
yyy0218@126.com

DISCLOSURE

The authors have no financial interest to declare in relation to the content of this communication. The authors received no funding support for this work.

REFERENCES

1. Zhu YZ, Zhang J, Hu X, Wang ZH, Wu S, Yi YY. Supplementation with extracellular vesicles derived from adipose-derived stem cells increases fat graft survival and browning in mice: A cell-free approach to construct beige fat from white fat grafting. *Plast Reconstr Surg*. 2020;145:1183–1195.
2. Sun Y, Shi H, Yin S, et al. Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving β -cell destruction. *ACS Nano* 2018;12:7613–7628.

3. Tao SC, Yuan T, Zhang YL, Yin WJ, Guo SC, Zhang CQ. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics* 2017;7:180–195.
4. Hu Y, Rao SS, Wang ZX, et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. *Theranostics* 2018;8:169–184.
5. Tao SC, Yuan T, Rui BY, Zhu ZZ, Guo SC, Zhang CQ. Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway. *Theranostics* 2017;7:733–750.
6. Zhu Y, Zhang J, Hu X, Wang Z, Wu S, Yi Y. Extracellular vesicles derived from human adipose-derived stem cells promote the exogenous angiogenesis of fat grafts via the let-7/AGO1/VEGF signalling pathway. *Sci Rep*. 2020;10:5313.
7. Han YD, Bai Y, Yan XL, et al. Co-transplantation of exosomes derived from hypoxia-preconditioned adipose mesenchymal stem cells promotes neovascularization and graft survival in fat grafting. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497:305–312.
8. Mou S, Zhou M, Li Y, et al. Extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells for the improvement of angiogenesis and fat-grafting application. *Plast Reconstr Surg*. 2019;144:869–880.
9. Wang Z, Chen Y, Zhu S, et al. The effects of macrophage-mediated inflammatory response to the donor site on long-term retention of a fat graft in the recipient site in a mice model. *J Cell Physiol*. 2020;235:10012–10023.

Supplementation with Extracellular Vesicles Derived from Adipose-Derived Stem Cells Increases Fat Graft Survival and Browning in Mice: A Cell-Free Approach to Construct Beige Fat from White Fat Grafting

Sir:

We have read with great interest the study entitled “Supplementation with Extracellular Vesicles Derived from Adipose-Derived Stem Cells Increases Fat Graft Survival and Browning in Mice: A Cell-Free Approach to Construct Beige Fat from White Fat Grafting.”¹ In this article, Zhu et al. seek to demonstrate the value of microvesicles derived from adipose-derived stromal cells. They conclude that these microvesicles increase the survival rate of fat grafting and promote the regeneration of beige adipose tissue.

As the authors make very clear, the main disadvantage of lipofilling is the fat resorption rate, which can reach 20 to 70 percent of the initial transfer.² Many current methods have been examined to try to lower this rate with varying degrees of success, including addition of adipose-derived stromal cells (cell-assisted lipotransfer),³ platelet-rich-plasma, and various growth factors (e.g., vascular endothelial growth factor, erythropoietin).⁴ The effectiveness of adipose-derived stromal cells lies essentially in their paracrine mode of action through a variety of pathways: cell-cell

884e

Copyright © 2021 American Society of Plastic Surgeons. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

contact, extracellular secretion, or mediated extracellular vesicle secretion (microvesicles or microparticles, exosome, or apoptotic bodies after efferocytosis by macrophages in the case of a wound injury).³ However, adipose-derived stromal cells rapidly disappear from the wound bed. It is therefore highly recommended that clinical trials should focus on allogeneic mass production or on the use of alternative cell-free therapies. We would like, first of all, to emphasize the quality of the study and the complex analyses carried out by these authors.

The main result found in the study is a significant and nonnegligible increase in fat graft survival (approximately 15.7 percent) between the groups with and without microvesicles. However, as Zhu et al. point out, the survival rate here is very low compared to that reported in the literature (39 percent at 12 weeks in the group with microvesicles versus 23.3 percent in the control group). Repeated injections into the graft are likely responsible for that. The use of a patch with continuous injection would undoubtedly be less deleterious. In addition, the grafting method used in mice is not optimal and is not comparable with conventional Coleman lipofilling used in humans.

In addition, the method used to measure the survival rate does not represent the gold standard. Indeed, the main tools used are imaging with magnetic resonance imaging or computed tomographic scan with three-dimensional volumetric computer analysis. As demonstrated in our meta-analysis, cell-assisted lipotransfer has an advantage over conventional lipofilling only in small volumes less than 100 ml.³ It would be interesting to study this phenomenon with microvesicles.

Moreover, although microvesicle use presents undeniable advantages over adipose-derived stromal cells, for reasons included in the discussion, it is necessary to perform a comparative study between the different methods of lipofilling enrichment in large-animal models first, and then in humans to clarify which methods present the best clinical interest.

Another important result of this study is the regeneration of beige adipocytes through an increase in the proportion of M2 macrophages in the tissue. The authors very prudently hypothesize that these microvesicles could be beneficial in the treatment of obesity or diabetes. Although very interesting, it is still too early to know how useful this treatment will be in these complex and multifactorial abnormalities.

DOI: 10.1097/PRS.00000000000007821

Jérôme Laloze, M.D.

Department of Maxillofacial and Reconstructive Surgery
and Stomatology
Dupuytren University Hospital
Limoges, France
University of Limoges
Myelin Maintenance and Peripheral Neuropathies
Faculties of Medicine and Pharmacy
Limoges, France

Elise Lupon, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery
Rangueil University Hospital
Toulouse, France
Vascularized Composite Allotransplantation Laboratory
Center for Transplantation Sciences
Massachusetts General Hospital
Harvard Medical School
Boston, Mass.

Paul Girard, M.D.

Department of Plastic, Reconstructive, and Aesthetic
Surgery
South Hospital
University of Rennes 1
Rennes, France

Silvia Gandolfi, M.D.

Department of Plastic, Reconstructive, and Hand Surgery
Charles Nicolle University Hospital
Rouen, France

Loïc Fiévet, Pharm.D.

University of Toulouse
STROMALab
Etablissement Français du Sang-Occitanie
INSERM 1031
National Veterinary School of Toulouse
ERL5311 CNRS
Toulouse, France

Alexis Desmoulière, Pharm.D., Ph.D.

University of Limoges
Myelin Maintenance and Peripheral Neuropathies
Faculties of Medicine and Pharmacy
Limoges, France

Correspondence to Dr. Laloze

Department of Maxillofacial and Reconstructive Surgery
and Stomatology
Dupuytren University Hospital
2 Avenue Martin Luther King
87000 Limoges, France
jerome.laloze@chu-limoges.fr

DISCLOSURE

None of the authors has a financial interest to declare in relation to the content of this communication. The authors received no funding support for this work.

REFERENCES

1. Zhu YZ, Zhang J, Hu X, Wang ZH, Wu S, Yi YY. Supplementation with extracellular vesicles derived from adipose-derived stem cells increases fat graft survival and browning in mice: A cell-free approach to construct beige fat from white fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2020;145:1183–1195.
2. Tiryaki T, Findikli N, Tiryaki D. Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: A preliminary report. *Aesthetic Plast Surg.* 2011;35:965–971.
3. Laloze J, Varin A, Gilhodes J, et al. Cell-assisted lipotransfer: Friend or foe in fat grafting? Systematic review and meta-analysis. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12:e1237–e1250.

4. Vyas KS, Vasconez HC, Morrison S, et al. Fat graft enrichment strategies: A systematic review. *Plast Reconstr Surg.* 2020;145:827–841.
5. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: Clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* 2018;22:824–833.

Reply: Supplementation with Extracellular Vesicles Derived from Adipose-Derived Stem Cells Increases Fat Graft Survival and Browning in Mice: A Cell-Free Approach to Construct Beige Fat from White Fat Grafting

Sir:

We thank Dr. Laloze et al. for their kind and insightful letter regarding our recent article identifying the finding that supplementation with extracellular vesicles derived from adipose-derived stem cells increases fat graft survival and browning by which extracellular vesicle-polarized M2 macrophages secrete catecholamines to promote beige adipose regeneration.¹

Laloze et al. describe the limits of the method we used to measure the survival rate of fat grafts, and suggested that the main tools used as the gold standard are imaging with magnetic resonance imaging or computed tomography with three-dimensional volumetric computer analysis. We agree with this view that intuitively evaluates the volume retention under noninvasive conditions, although we have provided evidence that adipose-derived stem cell extracellular vesicles promote the survival rate of fat grafts by pathologic detection.

As suggested by Laloze et al., it is necessary to perform a comparative study between the different methods of lipofilling enrichment in large-animal models first, and then in humans to compare the differences between adipose-derived stem cell extracellular vesicles and adipose-derived stem cells in regulating the survival and outcome of fat grafting, and to clarify which methods present the best clinical result. The comparative study between adipose-derived stem cell extracellular vesicles and adipose-derived stem cells is of great interest to us. Indeed, we compared the effects of both adipose-derived stem cells and adipose-derived stem cell extracellular vesicles to fat grafting in a model of nude mice. We co-grafted 100 µg/ml adipose-derived stem cell extracellular vesicles and 5×10^5 adipose-derived stem cells with 0.3-ml purified liposuction into the scalps of nude mice. The volume retention rate of adipose-derived stem cell-treated grafts was approximately 20 percent higher than that treated by adipose-derived stem cell extracellular vesicles at postoperative week 12. However, it is difficult to obtain convincing evidence in this comparative experiment because of the difference in dose units between adipose-derived stem cells (number of cells) and adipose-derived stem cell extracellular vesicles (protein concentration). We only hypothesize

that adipose-derived stem cell extracellular vesicles and other secretion groups derived from stem cells could replace stem cell therapy under the premise of appropriate doses and times in the models and that transplanted stem cells play only a paracrine role and not homing or differentiation. For the application of adipose-derived stem cell extracellular vesicles in fat grafting and other ischemic diseases, researchers should pay more attention to extracting extracellular vesicles with increased biological function by optimizing the microenvironment of cell culture. It is a feasible method for simulating the microenvironment of transplanted stem cells in vitro. Because transplanted stem cells participate in tissue regeneration almost only by means of paracrine rather than directional differentiation in fat grafting,² we used hypoxia incubator and serum-free medium to simulate the ischemic and hypoxic microenvironment of transplanted adipose-derived stem cells in our previous study. Adipose-derived stem cell extracellular vesicles cultured under hypoxia possess a stronger ability to promote angiogenesis both in vitro and in a fat grafting mouse model compared with that cultured under normoxic conditions.³ In addition to hypoxic preconditioning, any treatment to simulate the microenvironment of transplanted stem cells, such as three-dimensional culture, oxidative stress stimulation and the intervention of a variety of cytokines may also alter the biological function of adipose-derived stem cell extracellular vesicles.

The potential therapy of adipose-derived stem cell-derived exosomes in obesity and diabetes by means of promoting M2 polarization of macrophages was studied by Zhao et al.⁴ Intraperitoneal administration of adipose-derived stem cell-derived exosomes led to a resistance to sustained weight gain in mice fed a high-fat diet, and significantly inhibited the mass growth of both visceral and subcutaneous white fat pads. In addition, treatment with adipose-derived stem cell-derived exosomes decreased the levels of serum triglyceride and total cholesterol in serum of mice fed a high-fat diet, and showed significant improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity even before the reduction in obesity progression. In our study, we also formed beige fat with increased oxygen consumption from the treatment of conditioned medium of adipose-derived stem cell extracellular vesicle-polarized M2 macrophages. Thus, we prudently hypothesize that M2 polarization of macrophages could be used as an auxiliary scheme for the therapy of obesity or type 2 diabetes, and adipose-derived stem cell extracellular vesicles could be used as the inducing factor of M2 polarization. However, targeted therapy for the secretory function of hypertrophic adipocytes should also be evaluated because the secretion of hypertrophic adipocytes is responsible for the accumulation of M1 macrophages.^{5,6}

DOI: [10.1097/PRS.00000000000007822](https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000007822)

Yuan-Zheng Zhu, M.D.

886e

Copyright © 2021 American Society of Plastic Surgeons. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

I.4.6. Méthode de préparation des produits de sécrétions

Tout d'abord, l'enthousiasme grandissant au sein de la communauté scientifique pour l'utilisation du microenvironnement cellulaire (MC) et en particulier des vésicules extracellulaires (VE) a conduit au développement et à la mise au point de nombreuses techniques et protocoles d'isolement de ces produits. Dans les études *in vivo* sur l'utilisation du MC, celui-ci est utilisé soit tel quel, soit il est concentré par ultracentrifugation ou lyophilisation. Lorsque l'objectif est plutôt d'isoler spécifiquement les VE du reste du sécrétome, les techniques d'isolement reposent sur les propriétés des VE : leur densité, leur taille et la présence ou l'absence de marqueurs de surface.

Par la suite, nous présenterons brièvement les différentes techniques utilisées jusqu'à présent, avec leurs avantages et leurs inconvénients, en mettant l'accent sur leur applicabilité clinique (Varderidou-Minasian & Lorenowicz, 2020) (voir Figure 28).

La méthode la plus couramment utilisée pour l'isolement des VE de petite taille est l'ultracentrifugation différentielle. Cette technique repose sur une série d'étapes de centrifugation à haute vitesse pour éliminer les cellules et les débris cellulaires volumineux, et ainsi faire précipiter les VE. Les particules plus larges restent dans le surnageant tandis que les VE de plus petite taille se trouvent dans le culot. Cependant, cette méthode présente des limites telles qu'un rendement en VE relativement faible, un risque de co-sédimentation de macromolécules non vésiculaires comme certaines protéines, ainsi qu'une possible altération de l'intégrité des VE due à la force de centrifugation élevée. De plus, l'ultracentrifugation peut induire l'agrégation des VE en raison des forces gravitationnelles importantes, et le processus est fastidieux et peu adapté à l'application clinique actuelle (Linares et al., 2015).

Une méthode alternative, développée pour réduire la co-sédimentation des protéines, consiste à isoler les plus petites VE en utilisant une centrifugation avec gradient de densité. L'échantillon est placé dans un tube contenant des solutions de sucrose et d'iodixanol de densités différentes, puis soumis à une ultracentrifugation. Cette technique exploite les propriétés de flottaison des VE en fonction de leur densité, permettant une meilleure séparation entre les VE et leurs impuretés (Théry et al., 2006).

Bien qu'elle offre des VE relativement pures, cette méthode requiert un équipement coûteux et comporte des risques d'endommagement et de perte des vésicules pendant l'isolement. De plus, les solutions de saccharose et d'iodixanol peuvent potentiellement affecter la fonctionnalité des VE et donc leur efficacité thérapeutique.

La chromatographie d'exclusion de taille (SEC pour *size exclusion chromatography*) sépare les VE des protéines solubles en fonction de leur taille. La SEC utilise une colonne contenant une matrice poreuse à travers laquelle passe la solution. Les plus petites particules, comme les protéines, sont ralenties car elles pénètrent dans les interstices de la colonne et sont éluées en dernier, tandis que les particules plus grandes passent plus facilement. Cette méthode a démontré son aptitude à isoler les VE tout en préservant leur intégrité, leurs propriétés biologiques et biophysiques (Mol et al., 2017).

La SEC est relativement simple à mettre en œuvre à grande échelle et peut être combinée à d'autres techniques pour améliorer la pureté de la préparation. Cependant, cette méthode peut entraîner une contamination de l'échantillon par des agrégats de protéines et de lipoprotéines.

L'ultrafiltration est une méthode d'isolement basée sur la taille et est également utilisée pour la concentration du MC. Elle repose sur l'utilisation de filtres à pores de différentes tailles : les petites particules passent à travers les pores tandis que les particules plus grandes sont exclues. Cependant, cette méthode présente des inconvénients majeurs tels que le colmatage des pores, ce qui réduit le rendement, ainsi que la force nécessaire pour faire passer l'échantillon à travers la membrane, ce qui peut endommager les VE. Pour surmonter ces problèmes, la technique de filtration par flux tangentiel (TFF pour *tangential flow filtration*) a été développée. Elle implique l'écoulement du fluide de manière tangentielle (perpendiculaire) par rapport à la membrane, évitant ainsi le colmatage des pores et les dommages aux VE. La TFF pourrait constituer une alternative plus favorable à l'ultrafiltration conventionnelle pour l'utilisation clinique des VE (Busatto et al., 2018).

Elle offre un rendement très élevé, avec une augmentation de cinq fois par rapport à l'ultracentrifugation, et elle est compatible avec une production clinique à grande échelle.

Le polyéthylène glycol (PEG) est une méthode d'isolement des VE par précipitation. Une fois ajouté à l'échantillon, le PEG provoque la précipitation des particules après une incubation et une centrifugation. Différents kits commerciaux utilisant le PEG pour isoler les VE, tels que l'*ExoQuick* (System Biosciences™) ou le "*Total Exosome Isolation Kit*" (Invitrogen™), sont disponibles. Bien que les méthodes basées sur le PEG soient abordables, offrent un bon rendement en VE et soient faciles à utiliser via des kits commerciaux, il est important de noter que l'échantillon précipité est de faible pureté en raison des différents contaminants qui co-précipitent avec les VE, tels que les agrégats de protéines ou les acides nucléiques, pouvant fausser les résultats expérimentaux (Weng et al., 2016).

Des méthodes basées sur l'immuno-affinité et la capture des VE en fonction de l'expression de protéines à leur surface ont également été développées, en utilisant des billes magnétiques couplées à des anticorps. Plus souvent, les membres de la famille des tétraspanines (CD9, CD63, CD81) situés à la surface des VE sont utilisés pour l'enrichissement (Lane et al., 2017).

Bien que cette méthode soit efficace pour la sélection spécifique des VE, elle nécessite une connaissance préalable des marqueurs exprimés par le sous-ensemble de VE ciblé. Le chercheur doit donc s'assurer de l'effet biologique et du potentiel thérapeutique de ce sous-ensemble, ainsi que du rendement de marquage. Cette technique, bien que très spécifique, présente des problèmes pour son application clinique en raison de son incapacité à être utilisée pour des volumes importants, ainsi que de la liaison souvent non réversible des billes.

La chromatographie par échange d'ions est la principale technique qui utilise la charge à la surface des VE, apportée par les composants membranaires (lipides) qui sont chargés négativement. Différents supports anioniques (billes, gels ou résines) sont utilisés comme phase solide pour retenir les vésicules chargées lors de leur passage. Après des étapes de lavage, les VE sont éluées en utilisant des solutions aqueuses capables de rompre les interactions ioniques établies entre les VE et la phase solide. Bien que cette technique n'impose pas de contraintes physiques aux VE, les conditions d'éluion peuvent affecter la

fonctionnalité et l'intégrité des VE. Cependant, cette technique peut être difficile à optimiser pour sélectionner des VE dans des milieux biologiques complexes (Boireau & Elie-Caille, 2021 ; Staubach et al., 2021).

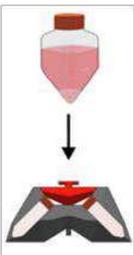
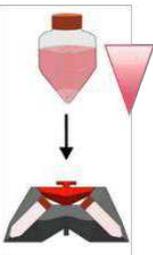
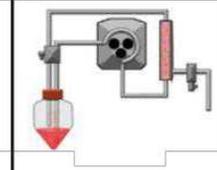
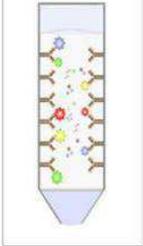
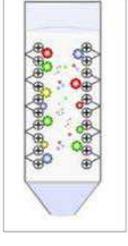
							
	Ultracentrifugation différentielle	Centrifugation avec gradient de densité	Précipitation au polyéthylène glycol	Filtration par flux tangentielle (TFF)	Chromatographie d'exclusion de taille (SEC)	Chromatographie immunoaffinité	Chromatographie par échange d'ions
Avantages	Facile d'utilisation	Facile d'utilisation	Facile d'utilisation	Bon rendement Compatible avec la clinique	N'endommage pas les VE	Bonne spécificité	N'endommage pas les VE
Inconvénients	Risque d'endommagement Co-sédimentation	Risque d'endommagement Co-sédimentation	Faible Spécificité	Complexe à mettre en place	Contamination possible par des protéines	Complicé avec des grand volume	Complexe à mettre en place
Passage en production	++	++	++	+++	+	++	+++

Figure 28 : Présentation des différentes méthodes d'isolement des vésicules avec leurs principaux avantages et inconvénients pour chacune des techniques.

Réalisé sur la base de (Cocozza et al., 2020 ; Staubach et al., 2021 ; Varderidou-Minasian & Lorenowicz, 2020).

Source : Thèse université M. Dedier : Intérêt du pré-conditionnement des Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) pour l'amélioration du traitement par autogreffe de peau des grands brûlés, octobre 2022.

La diversité des méthodes d'isolement conduit à des préparations de VE plus ou moins pures et différentes. Il est particulièrement important de prendre en compte la co-précipitation des protéines lors de l'isolement, car l'activité observée pourrait être le résultat d'une interaction entre les VE et les protéines, plutôt que des VE seules. Bien que la technique de TFF semble se distinguer des autres en raison de ses avantages pour une application clinique, de nombreuses techniques coexistent dans la littérature. Il peut donc être difficile de comparer les résultats expérimentaux obtenus avec différentes préparations résultant de différentes techniques d'isolement. Tout comme lors de la conception d'un médicament biologique, il est essentiel de garder à l'esprit que le processus définit le produit. Il est donc impératif, lors de la publication de résultats, de décrire minutieusement le processus d'isolation, car il est indissociable du produit porteur de l'efficacité thérapeutique.

I.4.7. Méthode d'analyse des produits de sécrétions

De même que pour les méthodes d'isolement, il existe une grande variété de techniques disponibles pour la détection et la caractérisation des microenvironnements cellulaires (MC) et des vésicules extracellulaires (VE), chacune ayant ses avantages en termes d'exactitude, de précision et de paramètres spécifiques mesurés (par exemple, pour les VE : structure, taille, contenu moléculaire, propriétés optiques). Différentes méthodes descriptives sont utilisées pour analyser ces produits et leur contenu, notamment la cytométrie, les techniques de *Western Blot* et de spectrométrie de masse pour analyser leur contenu protéique, ainsi que la RT-qPCR et les méthodes de séquençage pour analyser leur contenu en ARN. Dans la suite, nous aborderons des techniques de détection et de quantification des VE, ainsi que leur potentiel d'application clinique.

Le suivi individuel de particules (NTA pour *nanoparticle tracking analysis*) repose sur les propriétés de la lumière diffusée et du mouvement brownien pour calculer la distribution de taille des particules en suspension dans un liquide, ainsi que leur concentration (en particules/mL). Un faisceau laser traverse la chambre d'échantillon et les particules en suspension sur la trajectoire du faisceau diffusent la lumière, ce qui permet de les visualiser et de les suivre facilement. Le diamètre hydrodynamique des particules en suspension est calculé à partir de l'équation de Stokes-Einstein. Bien que cette méthode soit couramment utilisée pour quantifier les VE, elle est sensible à la contamination par d'autres particules que les VE. Les particules de plus de 100 nm ont tendance à être surestimées, car elles peuvent disperser la lumière en plusieurs points, ce qui entraîne une mesure de plusieurs événements pour une seule particule (Kestens et al., 2017).

Il est important de noter que cette technique n'est pas adaptée pour le MC non concentré qui se trouve en dessous de la limite de détection pour la quantification des VE. Récemment, le NTA peut également être réalisé par immunofluorescence avec des marqueurs fluorescents spécifiques aux VE, permettant de les distinguer des autres particules/protéines. Cependant, cette méthode spécifique nécessite un marquage supplémentaire avec un choix stratégique des marqueurs à utiliser, ainsi qu'un rendement de marquage satisfaisant.

La diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *dynamic light scattering*) est une autre méthode de quantification des VE en suspension. Similaire au NTA, la DLS mesure la taille et la distribution de la taille des particules en suspension en se basant sur leur mouvement brownien. L'échantillon est illuminé par un faisceau laser et les fluctuations de la lumière diffusée sont détectées selon un angle de collection choisi, puis analysées pour être reliées aux caractéristiques des particules. La DLS mesure les fluctuations d'intensité de diffusion à partir de l'échantillon global, tandis que le NTA, plus précis, mesure directement la diffusion de chaque particule observée.

La détection d'impulsion résistive accordable (TRPS pour *tunable resistive pulse sensing*) est une technique permettant de mesurer avec précision la taille, la charge et la concentration des VE. Les particules sont mesurées en tant que changement transitoire de la résistance électrique lorsqu'elles traversent un pore. Les données extraites du signal d'impulsion résistive peuvent être utilisées pour mesurer la taille et la charge en surface en comparant le signal à une série de billes d'étalonnage aux propriétés connues (Maas et al., 2017).

Cette technique peut être difficile à mettre en œuvre en raison du choix des billes d'étalonnage, qui peut être complexe pour des échantillons inconnus.

La microscopie électronique à balayage ou à transmission, SEM ou TEM, respectivement, est la plus couramment utilisée pour caractériser la structure des VE et les différencier des autres particules. Cependant, ces deux techniques sont confrontées au défi de la faible capacité de débit due à la longueur de préparation de l'échantillon et au risque de perte (Brisson et al., 2017).

De plus, le traitement de l'échantillon peut entraîner un rétrécissement des VE, sous-estimant ainsi leur taille réelle. Bien que la quantification des VE soit possible avec ces méthodes, elle est chronophage et laborieuse, nécessitant la collaboration d'une plateforme équipée de ces microscopes.

Différentes méthodes permettent de quantifier le contenu des VE. Ces méthodes peuvent également être utilisées pour caractériser le MC, bien que la limite de détection de la méthode puisse poser un problème si le produit est peu concentré. La méthode la plus couramment utilisée est la détermination de la teneur en protéines totales à l'aide de méthodes biochimiques telles que le dosage BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) ou le dosage de Bradford. Cependant, l'inconvénient de cette méthode est que les protéines co-isolées avec les VE peuvent influencer la précision de la mesure. La teneur totale en lipides peut être détectée à l'aide de l'essai à la sulfophosphaniline (Osteikoetxea, Balogh, et al., 2015) ou en mesurant la fluorescence de la bicouche lipidique. La quantification totale de l'ARN peut également être réalisée par électrophorèse capillaire.

La diversité des méthodes de quantification se retrouve dans les différentes expressions de doses que l'on peut rencontrer dans la littérature (Chia et al., 2017). Celles-ci peuvent être exprimées en différentes unités, les plus courantes étant le nombre de particules/mL ou la concentration en protéines totales/mL. Il existe également une quantification en termes de quantité de protéines par cellule sécrétrice ou de quantité de vésicules par cellule sécrétrice. L'expression de la dose en protéines totales/mL peut être biaisée par la pureté plus ou moins élevée de la préparation en fonction des techniques d'isolement utilisées.

Face aux spécificités techniques des MC et des VE, de nombreuses questions doivent être abordées dès les étapes de la recherche fondamentale pour garantir une transition réussie vers la clinique. Ces questions incluent le choix du tissu d'origine des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) pour la préparation des produits de sécrétion, les conditions de culture optimales, les méthodes d'isolement compatibles avec la clinique tout en préservant l'efficacité biologique du produit. À mesure que le domaine progresse, un modèle animal adéquat jouera également un rôle critique en fournissant des données précliniques soutenant la sécurité, la qualité et l'efficacité du produit. Pour accompagner la communauté scientifique vers la clinique, le groupe EVOLVE (*Extracellular Vesicle translatiOn to clinicaL perspectiVEs*) a publié des recommandations concernant la fabrication, les contrôles qualité, le développement préclinique et les essais cliniques, conformément à la législation européenne actuelle (Silva et al., 2021). Cet article se concentre sur les premières phases des essais cliniques en réponse au besoin actuel de développement de thérapies acellulaires basées sur un sécrétome enrichi.

I.5. Les techniques de chirurgie plastique

I.5.1. La lipoaspiration

La lipoaspiration reste la technique de référence pour la chirurgie de la silhouette. Réalisée seule ou combinée à d'autres actes, elle permet d'en affiner les contours en diminuant la masse adipeuse. La qualité du résultat esthétique obtenu repose sur une maîtrise de la technique chirurgicale mais aussi sur une sélection rigoureuse des patients. Acte très répandu (245 000 en 2008 aux États-Unis et 200 000 en 2003 en Allemagne (Grazer & De Jong, 2000 ; Lehnhardt et al., 2008)), la lipoaspiration est une technique chirurgicale banalisée à tort par le grand public, avec ses risques et ses complications propres. Elle doit rester le fruit d'un apprentissage chirurgical rigoureux pour la sécurité des patients et elle est indispensable à l'arsenal thérapeutique de tout chirurgien plasticien.

I.5.1.1. Principes de la technique

La paternité de la lipoaspiration moderne incombe à Y.-G. Illouz qui la met au point en 1977 (Y. G. Illouz, 1989). Il codifie la tunnellation du tissu adipeux à l'aide de canules à bout mousse en y alliant une hydrotomie. La finalité de la technique est d'aspirer la graisse à une certaine profondeur en laissant intact le tissu adipeux sous-dermique sur quelques millimètres. Cette aspiration se combine à la rétraction cutanée naturelle de toute cicatrisation pour donner le résultat esthétique final.

Qu'aspire-t-on ?

La meilleure indication de lipoaspiration reste les stéatoméries ou graisse de réserve (Figure 29 et 30). Ces stéatoméries peuvent être isolés ou regroupés en syndromes, notamment le syndrome des moitiés : moitié supérieure plutôt androïde et moitié inférieure plutôt gynoïde. L'obésité diffuse et la cellulite ne sont pas des indications de lipoaspiration.

L'objectif de la lipoaspiration est d'aspirer cette graisse de réserve à une profondeur idoine : le tissu adipeux sous-dermique (les quatre à cinq premiers millimètres) doit être préservé afin d'épargner les vascularisations sanguine et lymphatique et les connexions nerveuses, ainsi que le tissu adipeux sus-aponévrotique (Figure 31).

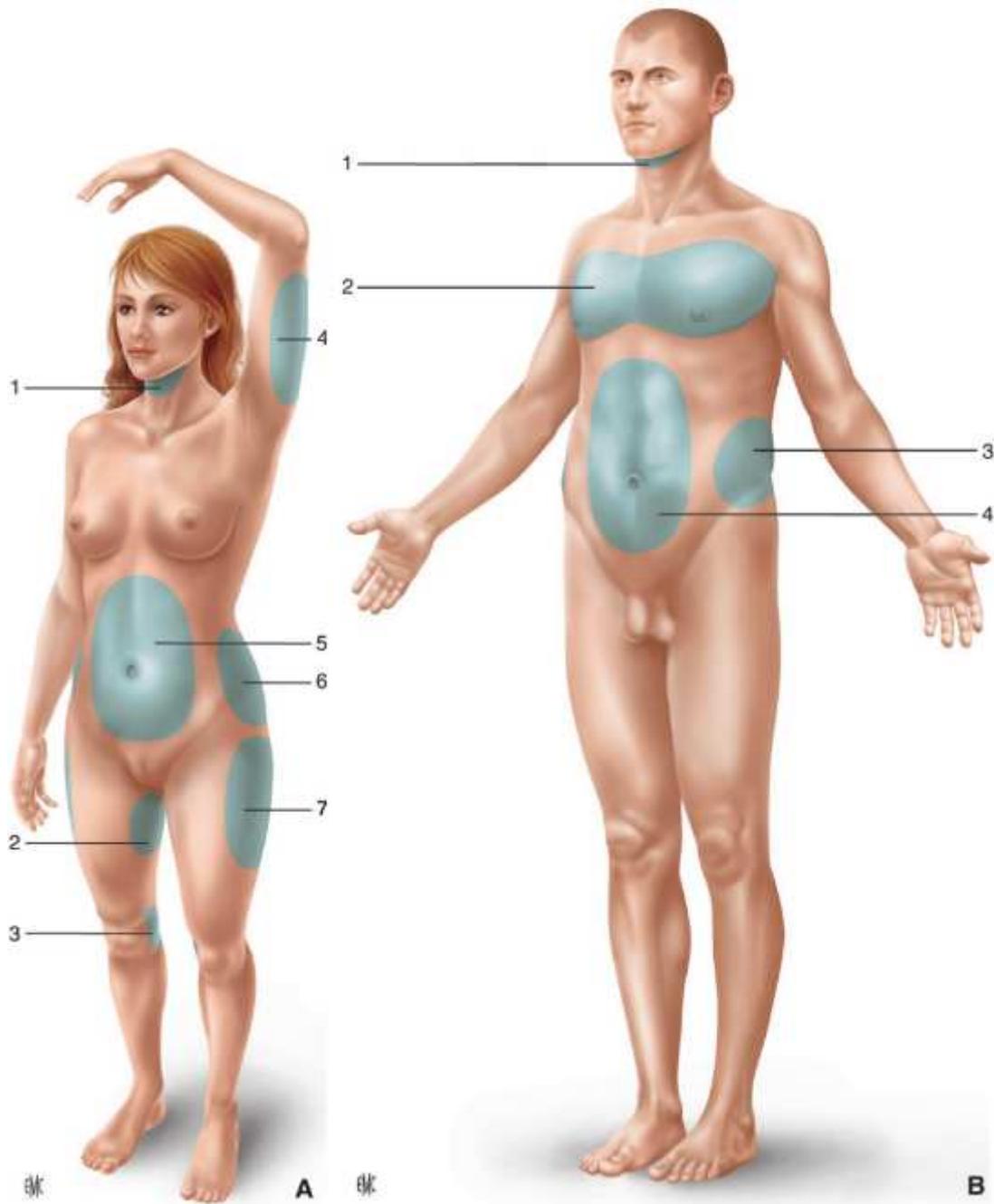


Figure 29 : Zones classiques de lipoaspiration.

A. Chez la femme. 1. Sous-mentale ; 2. Face interne des cuisses ; 3. Face interne des genoux ; 4. Face interne des bras ; 5. Abdomen ; 6. Hanches ; 7. Culotte de cheval.

B. Chez l'homme. 1. Sous-mental ; 2. Pectorale ; 3. Hanches ; 4. Abdomen. (Bustamante, 2012).
Source : EMC techniques chirurgicales en chirurgie plastique : lipoaspiration dans la chirurgie de la silhouette. 2012.

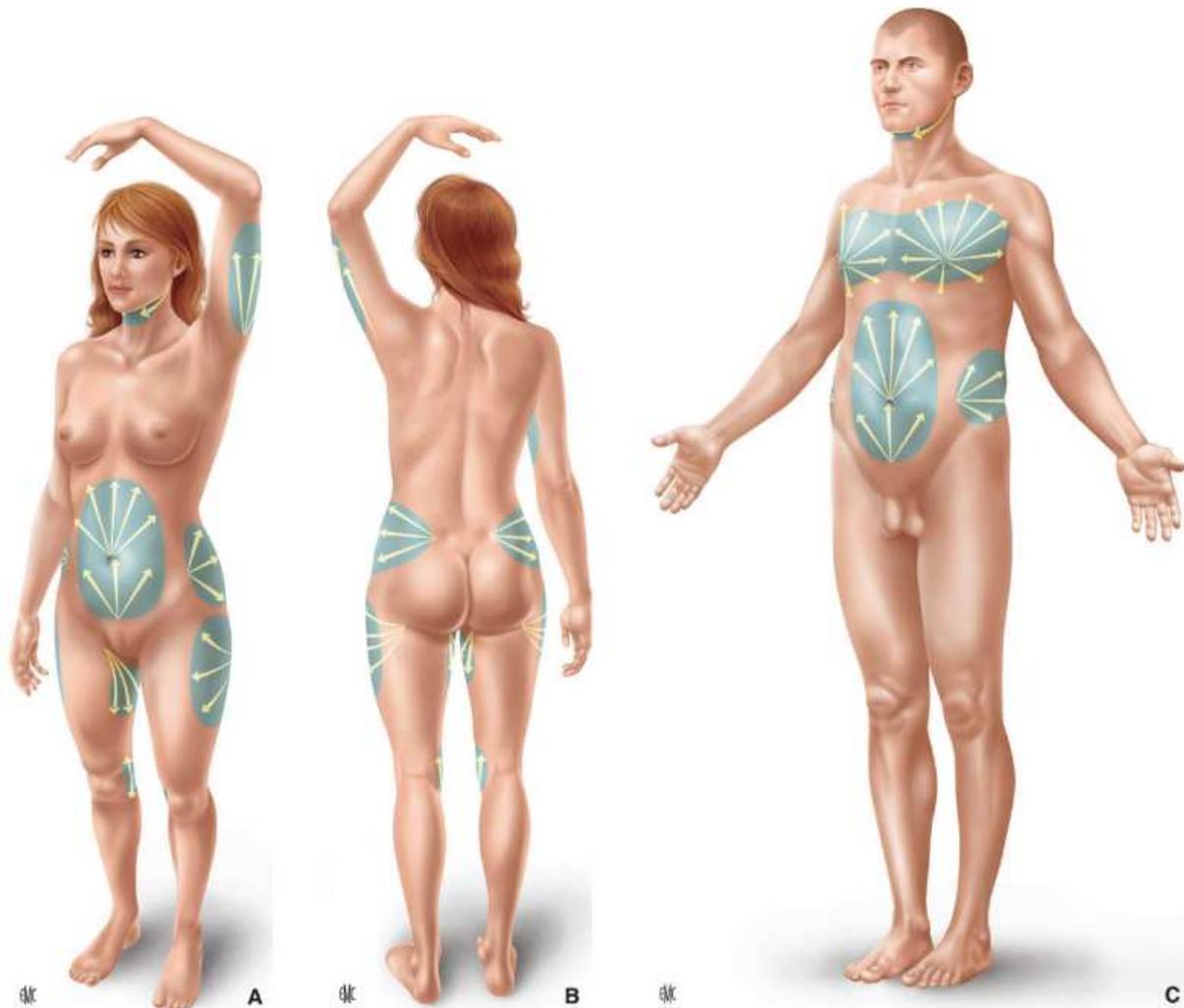


Figure 30 : Les différentes voies d'abord en fonction des zones et trajets des tunnellisations à réaliser (A à C).

Source : EMC techniques chirurgicales en chirurgie plastique : lipoaspiration dans la chirurgie de la silhouette. 2012.

Quelles zones aspirer ?

Il y a des zones de lipoaspiration classiques (abdomen, culotte de cheval, face interne des genoux, face interne des cuisses, hanches, région sous-mentale) et des zones moins classiques (mollets, chevilles, face interne des bras) avec des résultats plus difficiles à obtenir voire des suites opératoires plus houleuses (mollets). De même, en fonction des zones, la graisse ne s'aspire pas toujours avec la même facilité (la graisse sus-ombilicale est plus fibreuse et plus cloisonnée que celle de la culotte de cheval). Certains praticiens ont néanmoins l'expérience de ces zones réputées plus difficiles à lipoaspirer (Lillis, 1999).

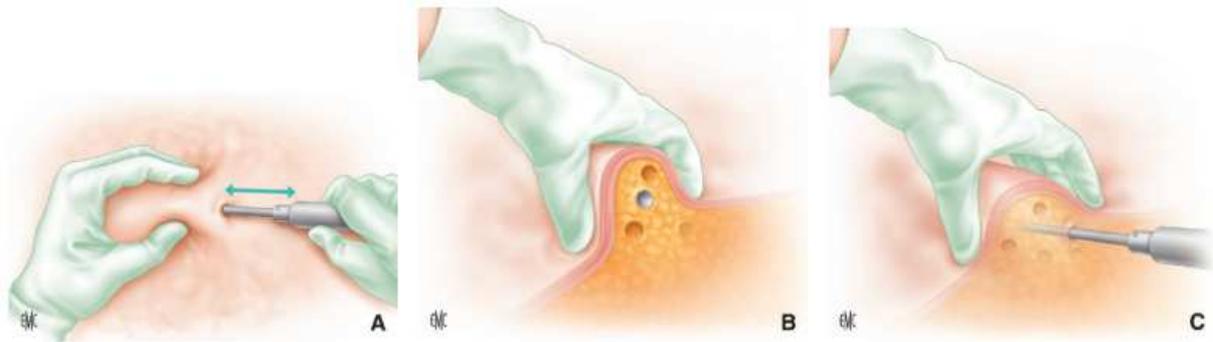


Figure 31 : Gestes à effectuer (pour un droitier).

La main gauche empaume le tissu adipeux et guide la main droite qui tunnellise avec la canule (A à C).
Source : EMC techniques chirurgicales en chirurgie plastique : lipoaspiration dans la chirurgie de la silhouette. 2012.

Matériel

La description du matériel qui suit, indispensable à toute lipoaspiration, est celle que l'on trouve en grande majorité sur nos plateaux techniques.

Canules

La lipoaspiration utilise des canules mousses, perforées, droites ou courbes, de longueur variable. Les diamètres les plus utilisés pour la silhouette s'échelonnent de 3 à 5 mm. La canule de 6 mm est déjà de gros calibre pour un gros stéatome ou stéatométrie. Pour le genou, les numéros trois et quatre sont communément utilisés. Idéalement en titane (car il glisse mieux), il existe aussi maintenant sur le marché des canules à usage unique. Le manche présente en général une empreinte pour le pouce qui permet d'intégrer l'orientation des orifices vers la profondeur. Cette canule est raccordée à un flexible lui-même relié à un bocal gradué de recueil de la graisse.

Tuyau

Le flexible est transparent pour permettre le contrôle permanent de la graisse aspirée. Une remontée de graisse hémorragique doit être le signal pour l'opérateur d'une infiltration adrénalinée insuffisante ou l'indication d'un changement de tunnel.

Pompe

Le tuyau est raccordé aux bords gradués transparents de recueil de la graisse aspirée, eux-mêmes reliés au moteur qui crée la pression négative pour permettre l'aspiration.

Variantes techniques

D'autres variantes techniques sont apparues sur le marché comme le laser et les ultrasons couplés aux canules classiques. Ces appareils sont plus onéreux et ont une efficacité relative. Les utilisateurs de ces appareils prônent un respect des structures vasculaires et nerveuses supérieur à la lipoaspiration conventionnelle. Des études comparatives n'ont objectivé aucune différence statistique significative (Blondeel et al., 2003). Par ailleurs, le désavantage majeur de ces variantes est de développer une énergie thermique importante avec risque de brûlures voire de nécrose cutanée. La lipoaspiration classique reste ainsi la technique de référence et elle est la plus communément disponible sur les plateaux techniques, hospitaliers ou privés.

I.5.1.2. Technique opératoire

La technique décrite est la plus communément enseignée dans les centres hospitalo-universitaires et la plus utilisée en pratique de ville.

Infiltration

L'intervention débute par une infiltration du tissu adipeux qui doit se faire à la même profondeur que la tunnellation. De la qualité de l'infiltration dépend aussi la régularité de l'aspiration. La proportion la plus classique est de 1 mg d'adrénaline pour un litre de sérum physiologique. L'infiltration peut être manuelle (à la seringue de 50 ml en général) ou mécanique (type pompe de Klein). L'avantage de la pompe est d'infiltrer les tissus de façon plus régulière et plus rapide. L'attente après infiltration est préférable. Il n'est pas nécessaire voire déconseillé d'infiltrer avec du sérum glacé. Le délai d'action de l'adrénaline est de 4 à 10 minutes pour obtenir un tissu adipeux exsangue. La proportion classique est d'infiltrer le volume correspondant à la quantité de graisse lipoaspirée. Certains opérateurs associent de la lidocaïne à leur infiltration : la dose maximale de lidocaïne à ne pas dépasser est de 55 mg/kg de poids corporel (Rao et al., 1999). Des doses excessives provoquent hypotension et bradycardie avec décès répertoriés sans véritable cause définie (Rao et al., 1999).

Incision

Les incisions à la lame 15 doivent être courtes, permettre juste l'entrée de la canule, dissimulées dans un pli, dans l'axe des membres, symétriques, à distance de la zone à lipoaspirer. Elles sont refermées en fin d'intervention par un fil fin (monobrin 4/0 ou 5/0). Pour une lipoaspiration abdominale, il est préférable d'éviter une incision périombilicale sur un abdomen flasque et/ou aux antécédents de laparotomie ; les risques de perforations digestives ont été répertoriés par des praticiens entraînés.

Lipoaspiration proprement dite

Il est souhaitable de tunneller dans un premier temps la masse adipeuse sans aspiration en espaçant les tunnels de façon régulière. L'aspiration est ensuite branchée. Il est préférable d'atteindre le maximum de dépression avant de débiter le geste, il n'en est que plus efficace et moins fatigant. La lipoaspiration est un acte physique pour le praticien. On effectue une dizaine de passages par tunnel pour le « vider » de son tissu adipeux en surveillant le flexible transparent. L'apparition de tissu hémorragique dans le flexible est l'indice pour l'opérateur qu'il doit changer de tunnel. Il faut rester dans le bon plan, ni trop profond, ni trop superficiel, orifice de la canule vers la profondeur (guide sur le manche de la canule). La main gauche (pour un droitier) contrôle en permanence le mouvement de la canule et apprécie le tissu adipeux restant. Elle empaume la canule et la guide au travers du tissu adipeux. Pour les zones convexes (culotte de cheval, hanches), il est possible de courber la canule afin de mieux épouser le tissu adipeux et d'éviter la butée de la canule en fin de trajet. Le travail doit être régulier et lent. Les tunnels sont créés en éventail : on débute par une grosse canule (n° 5 par exemple) pour l'abdomen, puis on termine par une canule plus fine n° 4, ou n° 4 puis n° 3 pour la face interne des genoux.

La régularité du geste est appréciée par le test du palper-rouler avec les deux mains.

La quantité aspirée est contrôlée sur le bocal gradué.

Il n'y a pas de drainage dans une lipoaspiration. Il est préférable en fin d'intervention d'exprimer les liquides résiduels par les incisions avant la fermeture. L'intervention se termine par la mise

en place du vêtement de contention ou d'un pansement compressif en cas de lipoaspiration très localisée. Il faut veiller à l'absence de plis lors de la mise en place du vêtement de contention. Certains opérateurs ne l'affectonnent pas en fin d'intervention car ils le considèrent comme un facteur de risque thromboembolique et ne le mettent que le lendemain, patient réveillé. Il n'y a à ce jour pas de publication en ce sens.

I.5.1.3. Suites

Les suites d'une lipoaspiration sont en règle générale simples mais il est impératif de revoir les patients lors d'une consultation précoce (j8), et d'ôter le vêtement de contention afin d'apprécier l'état cutané (ecchymoses, voire hématomes, œdème) et la douleur postopératoire. Les suites pour les lipoaspirations des membres inférieurs peuvent être plus délicates : œdème important ; difficultés à supporter le vêtement de contention. Cette consultation a pour but de rassurer les patients sur l'évolution des ecchymoses, de l'œdème, des dysesthésies, et de réitérer les consignes post- opératoires : durée de port du vêtement de contention, éviction solaire, *etc.*

Les patients sont ensuite revus à 1 puis 3 mois postopératoires.

I.5.1.4. Complications de la lipoaspiration

Complications spécifiques

Elles sont dominées par les séquelles esthétiques. Les défauts liés à une hypocorrection (lipométrie restante, défaut de symétrie) se corrigent plus facilement par une retouche. On propose en général un délai de 4 à 6 mois avant toute retouche, voire plus.

Les défauts liés à une hypercorrection (creux) ou erreur technique (aspiration trop superficielle, adhérences, ou trop profondes, au contact du fascia) sont beaucoup plus difficiles à corriger voire impossibles. Encore une fois, la sélection drastique des patients doit viser à minimiser ces mauvais résultats. Le temps est le meilleur allié du chirurgien dans les défauts minimes (visibilité du passage de la canule, vagues). Dans les cas extrêmes (cavité résiduelle), des comblements par réinjections de tissu adipeux peuvent s'avérer nécessaires.

On relève également :

- des troubles sensitifs (hypoesthésie), qui mettent en général 3 mois à disparaître ;
- des troubles de la pigmentation, qui peuvent survenir au décours d'ecchymoses et/ou en association avec une exposition solaire trop précoce ;
- des zones de cytotéatonécrose, qui peuvent aussi s'observer en région abdominale et mettent 3 mois à régresser.

Complications non spécifiques

Les risques de complications sévères oscillent entre 1% à 9,3% en fonction des séries (Grazer & De Jong, 2000 ; Y. H. Kim et al., 2011 ; Lehnhardt et al., 2008). La complication la plus fréquente est l'infection bactérienne allant jusqu'au choc septique avec fasciite nécrosante. Suivent les hémorragies, les perforations des viscères abdominaux et les embolies pulmonaires. Ces complications se produisent au cours des premières 24 heures suivant le geste chirurgical ; d'où le bien-fondé d'une surveillance d'une nuit en postopératoire. Elles résultent par ordre décroissant :

- d'une hygiène insuffisante ;

- d'infiltrations massives ;
- d'une prise en charge postopératoire diletante ;
- d'une mauvaise sélection des patients;
- d'un manque d'expérience chirurgicale.

I.5.2. Les dermolipectomies

I.5.2.1. Dermolipectomie abdominale ou abdominoplastie

I.5.2.1.1. Technique chirurgicale : plastie abdominale transversale basse ou dermolipectomie antérieure avec transposition de l'ombilic

Objectifs

L'objectif de cette intervention est de réaliser une exérèse du segment cutané-adipeux sous-ombilical. L'ensemble du segment cutané sous-ombilical est réséqué et le segment sus-ombilical va être déployé vers le bas. La cicatrice sus-pubienne s'étend plus ou moins latéralement (sur les flancs), en fonction de la morphologie du patient et de l'examen préopératoire, pour absorber tout l'excédent cutané. La plupart du temps, l'ombilic est préservé sur son pédicule pariétal et transposé. L'appréciation préopératoire des possibilités de fermeture cutanée après résection du segment sous-ombilical est essentielle. Idéalement, la cicatrice doit être basse et parfaitement dissimulable dans les sous-vêtements. On retrouve dans la littérature de nombreuses descriptions de cette technique avec des dessins préopératoires très variés (Flageul, 2001 ; Grazer, 1973 ; Regnault, 1975 ; Samama et al., 2011 ; Vernon, 1957) (Figure32).

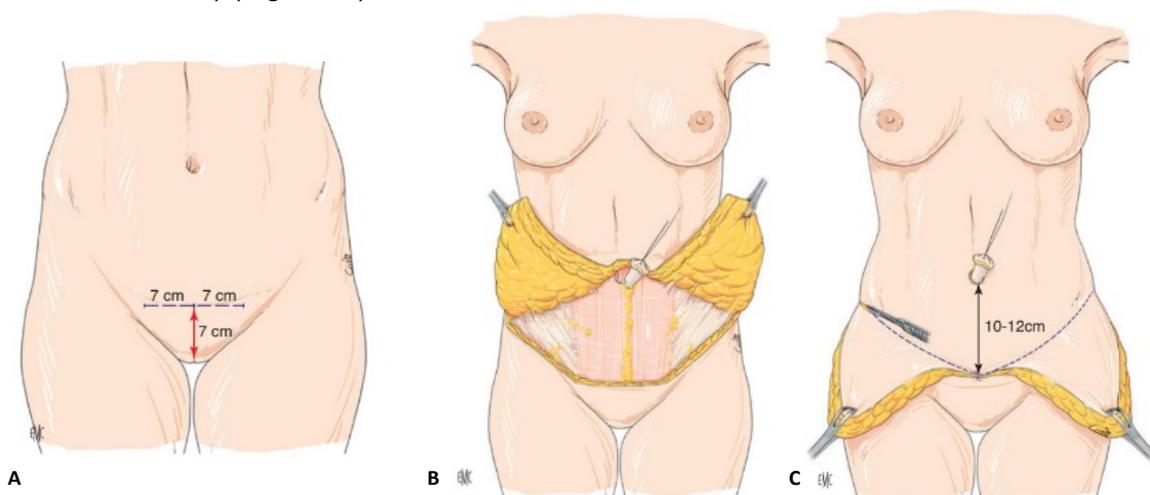


Figure 32 : Dermolipectomie abdominal antérieure.

A. Dessin préopératoire d'une dermolipectomie abdominale antérieure.

B. Aspect après décollement sus-aponévrotique.

C. Incision des lambeaux cutané-graisseux.

Source : EMC techniques chirurgicales chirurgie plastique : dermolipectomie abdominale et dermolipectomie totale circulaire. 2014

L'intervention est réalisée sous anesthésie générale avec intubation orotrachéale, en décubitus dorsal. Un billot en silicone ou un coussin roulé est placé sous les genoux pour

détendre la région abdominale. Des bas de contention sont systématiquement prescrits pour la prévention de la maladie thromboembolique.

Le dessin peut être établi en fonction des équipes, patiente en position debout avant l'anesthésie ou en décubitus dorsal. La ligne médiane est repérée au marqueur.

On applique la règle des 7, mais il existe dans la littérature d'innombrables modalités pour ce dessin préopératoire (Bracaglia et al., 2012 ; Ghosh & Jayakumar, 2012). En effet, on mesure 7 cm peau tendue depuis le sommet de la vulve, puis 7 cm de chaque côté. L'incision sus-pubienne s'étend d'une épine iliaque à l'autre. La volonté de limiter la longueur de la cicatrice latéralement peut entraîner l'apparition « d'oreilles » cutanées latérales qui peuvent nécessiter des retouches chirurgicales à distance. C'est pourquoi, pour limiter leur constitution, lors de l'abaissement du lambeau cutané abdominal supérieur, il faut tricher en ramenant la peau vers le centre, mais pas de façon excessive pour ne pas créer de plis verticaux.

La ligne sus-pubienne est tout d'abord incisée sur toute sa longueur au bistouri-lame pour ne pas brûler les berges puis le décollement se fait au bistouri électrique.

L'incision est initialement oblique vers le haut puis le décollement se poursuit au contact de l'aponévrose antérieure des muscles grands droits. En latéral, le décollement doit rester plus superficiel et moins étendu, juste au contact du fascia superficialis pour préserver le réseau lymphatique. Le Louarn préconise de préserver une épaisseur tissulaire au contact de l'aponévrose des grands droits de manière à conserver au maximum le réseau lymphatique et ainsi limiter la constitution de sérome (Le Louarn et al., 2004). En effet, l'étude du réseau lymphatique de la paroi abdominale montre qu'en sous-ombilical, le réseau lymphatique est profond et latéral, se drainant en inguinal et en dorsal. Le décollement doit être plus superficiel afin de le préserver. En sus-ombilical, il se draine principalement en axillaire, la dissection doit ainsi se réaliser au ras de l'aponévrose des grands droits, au contact du fascia profond.

En pratique, il est parfois difficile de respecter l'ensemble des réseaux lymphatiques.

L'hémostase est réalisée pas à pas au bistouri électrique sans hésiter à ligaturer au fil les troncs veineux qui restent souvent volumineux chez les anciens obèses même après l'amaigrissement. Un complément de liposuction est parfois utile pour améliorer la région sus-ombilicale et ainsi éviter un aspect globuleux après la fermeture (Y.-G. Illouz, 2008). L'isolement circulaire de l'ombilic est réalisé au bistouri-lame puis aux ciseaux de Metzenbaum.

Il faut préserver le pédicule nourricier pour éviter tout risque de nécrose ombilicale (néanmoins, certaines nécroses ombilicales surviennent en dépit d'une bonne réalisation chirurgicale).

En sus-ombilical, le décollement reste uniquement médial, en « tunnel », et il est poursuivi jusqu'à la xiphoïde et aux rebords costaux latéralement. En cas de cure de diastasis, il faut légèrement accentuer le décollement latéral pour éviter les aspects globuleux ou en « boudin » de cette région.

Après décollement complet, l'indication d'une cure de diastasis peut être posée (cf. infra). Le diastasis des droits est défini par un écartement entre le bord interne de chaque muscle grand droit d'au moins 4 cm et peut s'accompagner d'une véritable hernie de la ligne blanche. Le patient est à ce stade placé en position demi-assise autorisant un rapprochement des berges cutanées et une suture avec moins de tension est pratiquée. Le lambeau abdominal supérieur est fendu verticalement et on teste sa capacité à être abaissé jusqu'à la peau pubienne.

Un premier point de modélisation initiale aussi appelé « point de bâti » est placé au niveau médio-pubien. Les deux lambeaux abdominaux latéraux sont ensuite tractés vers le bas de manière à évaluer l'excédent cutané à réséquer.

Dans les cas où une fermeture directe est impossible ou présente une tension trop importante, il est préférable de réaliser une cicatrice verticale courte.

L'ombilic est extériorisé 10 à 12 cm au-dessus de l'incision sus-pubienne (pas moins !) à l'aide d'une incision ronde ou en V inversé et des points de haute tension sont placés de part et d'autre de celui-ci (Y.-G. Illouz, 2008 ; Le Louarn et al., 2004 ; Le Louarn & Pascal, 2000 ; T. Lockwood, 1993, 1995). Ces points peuvent être placés soit avant la fermeture inférieure, soit après à l'aide d'écarteurs de Farabeuf. Les points de haute tension supérieure vont permettre d'exercer une forte tension sur la partie sus-ombilicale du lambeau et de soulager le segment sous-ombilical. De plus, ils vont mieux définir l'ombilic dans sa partie inférieure.

Une abdominoplastie en bloc avec néo-ombilicoplastie (ou ombilicopoièse) décrite par Illouz en 1990 est également réalisable (Y. G. Illouz, 1992). Dans cette technique, la résection cutané-graisseuse se fait en bloc ; l'ombilic est réséqué et l'orifice ombilical est clôturé par un point en croix. Le néo-ombilic est ensuite positionné et réalisé à l'aide de deux lambeaux hémicirculaires. L'avantage de cette technique peut se trouver dans la prise en charge d'abdomen pendulum chez des patients en obésité morbide, diabétiques ou présentant des tares multiples mais très demandeurs d'un geste chirurgical. Ce type d'abdominoplastie peut ainsi se passer complètement de décollement sous-cutané et des complications qui peuvent en découler. Il faut également noter la simplicité et la rapidité du geste chirurgical.

Dans les situations où un excès cutané transversal existe et n'est pas suffisamment traité par la technique classique, une résection verticale peut se concevoir avec des dessins préopératoires en T inversés ou en « ancre de marine ». Il faut en avoir averti le patient et savoir que ce geste va accroître la rançon cicatricielle. De plus, il n'est pas toujours recommandé de le réaliser dans le même temps car il peut fragiliser la vascularisation distale du lambeau abdominal. Il faut donc évaluer sa faisabilité au cas par cas en fonction de la qualité de la paroi et du terrain du patient.

Lors de la fermeture, un cathéter multiperforé peut être mis en place avec diffusion lente d'un analgésique local de type ropivacaïne (Naropaine®). Décrits par Baroudi et Ferreira en 1998, des points de capitons étagés peuvent être placés pour limiter la formation de sérome mais leur réalisation demeure assez chronophage (Baroudi & Ferreira, 1998).

Un drainage aspiratif est placé soit au niveau pubien, soit à l'extrémité des sutures latérales. La fermeture cutanée se fait en deux plans, des points inversants sous-cutanés et un surjet intra-dermique au fil résorbable incolore monobrin 3/0 (Monocryl®).

Des pansements secs sont mis en place ainsi qu'une contention élastique par gaine abdominale à la fin de l'intervention.

Sans transposition de l'ombilic

L'excédent cutané (ou la laxité) ne permet pas toujours de proposer une technique avec transposition de l'ombilic. C'est le cas dans les « petits bedons », où l'excédent cutané sous-ombilical est modéré et où il existe une lipométrie sus-ombilicale sans réelle surcharge pondérale. Ce type de patient répond parfaitement aux méthodes de mini-dermolipectomies. Dans cette procédure, l'ombilic n'est, dans la majorité des cas, pas désolidarisé de la peau abdominale ; néanmoins, il peut au besoin être désinséré de celle-ci s'il apparaît nécessaire de l'abaisser. Il est envisageable de réaliser cette intervention sous anesthésie locale mais ce geste occasionne alors nécessairement un inconfort notable pour les patients. Dans ces cas, c'est la liposuction première qui va permettre de réaliser l'anesthésie lors de l'infiltration de la solution initiale. Il existe ici aussi de nombreux dessins préopératoires allant d'une dermolipectomie abdominale transversale classique a minima conservant une distance ombilic-pubis de 10 à 12 cm à la technique de « la fleur de lys » telle que décrite par Grolleau (Grolleau et al., 1998 ; Le Louarn et al., 2004).

Mini-abdominoplastie ou « minilift » abdominal

Il s'agit d'un ensemble de techniques qui se sont particulièrement développées après l'avènement de la liposuction dans l'objectif d'interventions chirurgicales combinées. En effet la liposuction permet d'agir sur des zones (surtout sus-ombilicales et latérales) qui ne sont pas intéressées par le décollement chirurgical. Les dessins préopératoires sont les classiques techniques du « fer à cheval » ou du minilift abdominal comprenant une exérèse en forme de croissant sus-pubien (Elbaz, 1974 ; Glicenstein, 1975) (Figure 33).

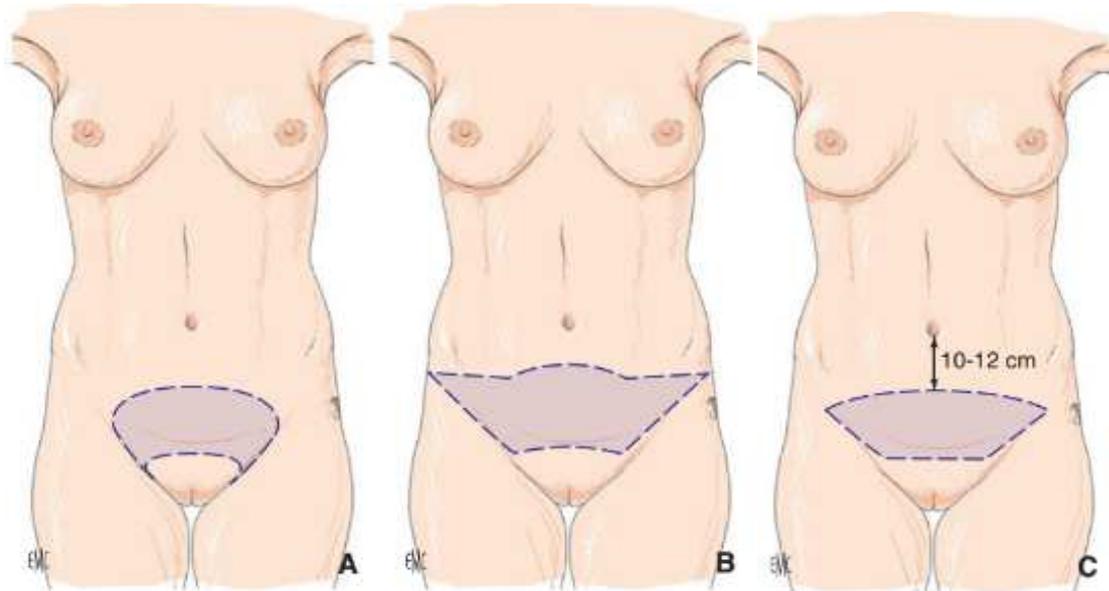


Figure 33 : Différents dessins préopératoires de mini-abdominoplasties.

A. Technique du « fer à cheval » B. Minilift abdominal comprenant une exérèse en forme de croissant sus-pubien C. Mini-dermolipectomie abdominale classique avec respect d'une distance ombilic-triangle pileux pubien de 10 à 12 cm.

Source : EMC techniques chirurgicales chirurgie plastique : dermolipectomie abdominale et dermolipectomie totale circulaire. 2014

Le schéma la plus simple demeure toutefois celui d'une dermolipectomie abdominale antérieure sous-ombilicale limitée avec respect d'une distance ombilic-triangle pileux pubien de 10 à 12 cm. Pour Flageul, à chaque fois que la suture finale occasionne une mise en tension anormale et une distorsion de la région ombilicale, il faut impérativement désinsérer l'ombilic.

Abdominoplastie en « fleur de lys » (Figure 34)

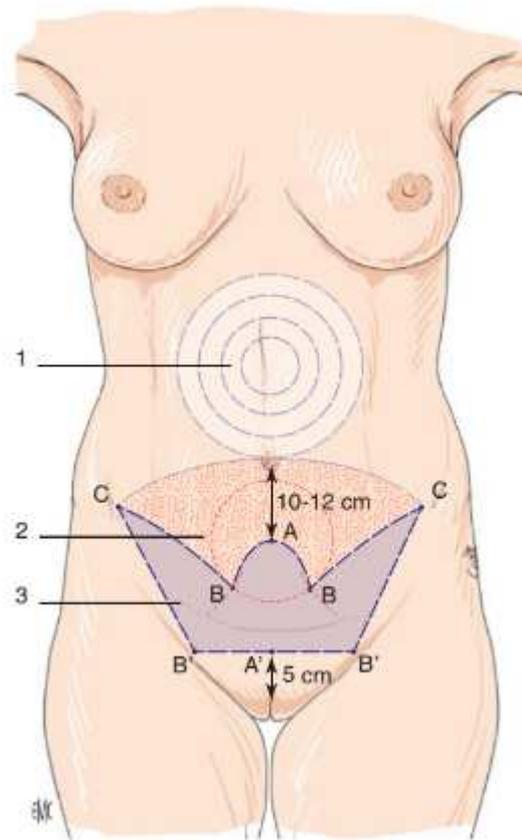


Figure 34 : Dessin pré-opératoire d'un abdominoplastie en « fleur de lys ».

1. Zone de lipoaspiration en sus-ombilical ; 2. Zone de décollement ; 3. Zone d'exérèse cutanée.

Source : EMC techniques chirurgicales chirurgie plastique : dermolipectomie abdominale et dermolipectomie totale circulaire. 2014

Les mesures sont faites peau tendue. La résection cutanéograsseuse sus-pubienne doit nécessairement conserver une distance ombilic-pubis d'au moins 10 à 12 cm. La distance ombilic-triangle pileux pubien est assez constante dans la population générale, aux alentours de 13 cm. Elle peut néanmoins être réduite à 10 à 12 cm sans radicalement modifier l'harmonie abdominale.

Le point A médian est repéré, situé 10 à 12 cm de l'ombilic. Le point A est abaissé par plicature au niveau pubien pour placer le point A' qui doit être situé à au moins 5 cm (plus volontiers 7 cm) du sommet de la vulve. Les points B' sont placés à l'horizontale de A', aux limites de l'insertion pileuse du pubis. Des lignes sont ensuite tracées vers le haut et l'extérieur depuis B' en direction des épaules. Le point C est placé plus ou moins loin en fonction de l'excédent cutané à absorber, celui-ci doit néanmoins rester très légèrement en dedans des épaules (environ 1,5 cm). Les points B sont placés à l'intersection des arcs de cercle de centre A et de rayon $[A'-B'] - 0,5$ cm, et de centre C et de rayon $[B'-C] - 1$ cm. Les différents points sont rejoints par des courbes arciformes.

L'intervention débute par la lipoaspiration périombilicale pour supprimer la lipométrie. La berge inférieure est ensuite incisée au bistouri-lame et le segment est décollé au bistouri électrique en conservant un matelas graisseux sus-pubien. Le périnysium du plan aponévrotique est respecté autant que possible pour limiter la formation de lymphocèle (les pédicules

épigastriques inférieurs et circonflexes iliaques superficiels sont coagulés si besoin). Ici aussi, une plicature aponévrotique est possible en cas de diastasis ou de voussure abdominale. La résection cutanée se fait avec la technique du « lambeau tracteur », permettant une coupe en biseau de la berge grasseuse crâniale et évitant ainsi un décalage avec la berge pubienne moins épaisse. Si nécessaire, l'ombilic peut être réinséré sur la paroi abdominale par des points d'amarrage cardinaux.

I.5.2.1.2. Dermolipectomie totale circulaire

La description de cette chirurgie dans la littérature apparaît dans les années 1960 (González-Ulloa, 1960), mais c'est surtout depuis les travaux basés sur des études anatomiques, de Ted Lockwood (Grolleau et al., 1998 ; T. Lockwood, 1993 ; T. E. Lockwood, 1991) dans les années 1990 puis de Le Louarn et Pascal dans les années 2000 (Pascal & Le Louarn, 2002) que cette chirurgie a été codifiée et popularisée en réduisant la durée opératoire et en diminuant les complications postopératoires en fréquence (50 à 70% selon les séries) et en sévérité (Coon et al., 2009 ; González-Ulloa, 1960 ; Kitzinger et al., 2013 ; Nemerofsky et al., 2006 ; Vico et al., 2010).

Objectif

Après un amaigrissement important, il se forme fréquemment un abdomen pendulum et une ptôse du pubis. La laxité cutanée s'étend parfois largement sur les régions latérales et postérieures du tronc et s'associe à une ptôse de la région glutéale et de la face latérale des cuisses gommant ou déplaçant leur rondeur naturelle surtout chez les femmes. Dans ces conditions, la dermolipectomie abdominale circulaire permet, en y associant une technique de lifting et de restauration volumique, de restituer une silhouette abdominale, pubienne, et un galbe cruro-fessier harmonieux.

Du fait de la prévalence de l'obésité et du développement de la chirurgie bariatrique, il existe un nombre croissant de candidats pour cette intervention.

Chez le non-obèse, les variations pondérales, les grossesses et le vieillissement entraînent également ces modifications morphologiques avec une laxité tissulaire moindre (du moins en vision photographique statique car elle peut être décelée à l'examen clinique). Cette intervention, dès lors que sa morbidité est acceptable, peut également être proposée pour une indication esthétique (en France : pendulum ne recouvrant pas le bord supérieur du pubis).

Intervention

Dessin préopératoire

Il doit permettre d'obtenir une cicatrice régulière, symétrique et bien placée, c'est-à-dire basse et entièrement dissimulable dans les sous-vêtements, gage de succès de cette chirurgie. Le dessin est l'élément clé de l'intervention.

Le plus utilisé est celui décrit par Pascal et Le Louarn (Pascal & Le Louarn, 2002) avec quelques modifications. Il doit impérativement être réalisé debout car une fois le patient installé, notamment en décubitus ventral, les modifications sont importantes particulièrement au niveau du pli fessier.

Le patient placé de profil, on trace une ligne verticale médiane séparant le corps en deux parties dont le devenir chirurgical sera opposé. En effet, schématiquement, tout ce qui est

situé en avant de cette ligne est tiré vers le bas (plastie abdominale antérieure) alors que ce qui est en arrière est remonté (temps postérieur).

On repère le niveau de l'élastique des sous-vêtements qui sert de référence pour la hauteur de la cicatrice puis le patient les retire pour le reste du dessin.

La hauteur de résection est appréciée par un pinch test réalisé de part et d'autre du niveau de la cicatrice idéale. Il n'y a pas de valeur constante et il faut s'adapter à chaque patient ; on peut noter que cette valeur varie d'un facteur 1,5 à 2 quand la peau est tendue. On vérifie la symétrie de résection des deux côtés. On dessine ensuite la résection postérieure, le patient étant debout tourné de dos. On commence par tracer de chaque côté la limite latérale entre la fesse et la cuisse matérialisée par une ligne verticale. S'il existe des lipoméries nécessitant une lipoaspiration, elles sont notées. Pour la résection médiane, on réalise un pinch test sans tension, le pouce étant enfoui au sommet du pli inter-fessier.

La résection ne doit être que de quelques centimètres pour limiter les désunions, fréquentes à ce niveau, et éviter une augmentation de hauteur du pli inter-fessier pouvant être très disgracieux. On trace ensuite de chaque côté une ligne rectiligne rejoignant les sommets des résections médiane et latérales (ces lignes doivent être symétriques). La ligne de résection inférieure est biphasique, d'abord rectiligne dans sa partie latérale jusqu'à la ligne de séparation cuisse/fesse, elle est ensuite légèrement concave vers le haut dans sa partie fessière et d'autant plus que le besoin de regalber la fesse est important. Les lambeaux fessiers sont dessinés sur toute la partie fessière du dessin et ne doivent pas dépasser la ligne de séparation latérale. Ils reposent sur la ligne de résection inférieure mais ne doivent jamais atteindre la ligne supérieure sous peine de créer un bourrelet supérieur sans regalber la fesse elle-même. Leur forme est globalement un demi-ovale dont la base inférieure représente la largeur de la fesse. Si la fesse est simplement ptosée mais normalement remplie, ils n'ont pas toujours une réelle utilité. Chez le sujet très amaigri, ils peuvent dépasser la ligne de séparation fesse/cuisse ; cette extension est totalement décollée des plans profonds pour être retournée vers l'intérieur et augmenter la projection de la fesse qui reste tout de même modérée.

La partie antérieure du dessin est semblable à celle d'une plastie abdominale antérieure. On demande au patient de maintenir fortement et symétriquement le tablier abdominal vers le haut et les repères pubiens (règle des 7 cm) sont placés sur une peau pubienne d'autant plus fortement tendue que le pubis est ptosé.

La ligne de résection rejoint latéralement le point inférieur du pinch test latéral. Elle est souvent située plus bas que dans une plastie abdominale classique mais elle remonte lors du lifting de la région cruro-fessière. La limite supérieure de la résection n'est pas dessinée car elle sera faite sur mesure en peropératoire en fonction de la laxité maximale après décollement antérieur.

Installation

On commence par le temps postérieur ; le patient est installé en décubitus ventral avec un billot sous le bassin (noter la modification du dessin de la résection médiane) et un autre sous le thorax. Le temps antérieur nécessite un nouveau champage après retournement du patient en décubitus dorsal.

Technique chirurgicale

Elle associe un lifting sans décollement à la partie postéro-latérale, un lifting avec décollement, dans la partie antérieure centrale, une restauration des volumes par lipoaspiration des lipoméries latérales éventuelles et augmentation fessière autologue par lambeaux.

Temps postérieur

On réalise une désépidermisation du lambeau au bistouri électrique pour limiter le saignement. L'hémostase se fait également au fur et à mesure de la progression du reste de la chirurgie. Le décollement se fait uniquement sur la zone de la partie fessière sous-jacente au lambeau, au ras du muscle gluteus maximus afin de créer une loge pour enfouir le lambeau, tout en respectant l'innervation sensitive. On réalise une résection du reste de la partie postérieure au-dessus du fascia superficialis et sans décollement pour respecter le réseau lymphatique. On réduit ensuite la hauteur du pédicule profond du lambeau (30 à 50% par rapport au dessin cutané) aux dépens de ses parties supérieures et inférieures afin qu'il puisse se ptôser dans la loge fessière, la combler entièrement et regalber après fermeture la région centrale de la fesse et non uniquement sa partie supérieure. Le lambeau peut être fixé par quelques points au fond de sa loge mais doit s'y placer naturellement.

On ferme ensuite l'extrémité latérale de la résection, puis la jonction fesse/cuisse et le milieu de la fesse. Ces zones correspondant à la tension maximale, il est intéressant d'y placer un à deux points dermiques profonds avec un fil tressé résorbable 0. Le reste est fermé classiquement en deux plans avec un surjet intradermique monobrin 3.0 résorbable. Du fait de l'absence de décollement supéro-latéral et du comblement de la loge fessière par le lambeau, un drainage postérieur aspiratif n'est pas systématique ; un cathéter multiperforé permettant l'instillation de ropivacaïne (Naropeine®) est ici intéressant pour améliorer le confort du patient.

Temps antérieur

De façon identique à une plastie abdominale antérieure avec haute tension supérieure, la résection latérale rejoint la résection postérieure. La fermeture est réalisée sur deux drains aspiratifs placés latéralement de façon que leur extrémité perforée atteigne partiellement le haut de la région postérieure. Un cathéter multiperforé peut également ici être mis en place.

I.5.2.2. Suites et mesures associées

En général, les patients sont alimentés le soir de l'intervention et le lever se fait de façon précoce dès le lendemain. Une prévention thromboembolique est obligatoirement mise en place comportant une héparine de bas poids moléculaire à dose préventive pour une durée de deux semaines et la mise en place de bas de contention. Une surveillance journalière de la formule sanguine est réalisée à la recherche d'une déglobulisation (actualisation des recommandations de la Société française d'anesthésie et de réanimation [2011]) (Samama et al., 2011) . Dans les déglobulisations postopératoires importantes, il ne faut pas hésiter à placer les patients sous préparation antianémique type Venofer® (complexe hydroxyde ferrique-dextran), puis sous suppléments en fer (Fumafer®, Tardyferon®) pour un à deux mois en sortie.

De même, une surveillance des plaquettes bihebdomadaire est nécessaire pour éviter tout risque de thrombopénies induites à l'héparine. La première surveillance des plaquettes doit

d'ailleurs être réalisée à 24 heures. Les drains aspiratifs sont retirés quand ils donnent moins de 40 mL/24 heures, soit aux alentours du deuxième au troisième jour pour les dermolipectomies abdominales et du cinquième au septième jour pour les dermolipectomies abdominales circulaires. Dès lors, la sortie est possible après réfection du pansement.

Un arrêt de travail de 15 jours à trois semaines est réalisé en fonction de la profession du patient et la reprise du sport peut se faire à trois mois. La gaine de contention abdominale est conservée jour et nuit pendant un à deux mois en fonction de la réparation ou non d'un diastasis (elle est indispensable, particulièrement en cas de cure de diastasis).

Résultats attendus

L'abdomen doit être plat de façon homogène avec un ombilic centré et naturel. Les cicatrices, de temps en temps inflammatoires, doivent être très discrètes à un an et parfaitement dissimulables dans les sous-vêtements.

Les résultats cosmétiques ne sont pas les uniques bienfaits de cette chirurgie. L'amélioration fonctionnelle pour les actes de la vie quotidienne est fréquemment signifiée par les patients. Également, les patients rapportent une amélioration notable en termes de qualité de vie, celle-ci étant présente tant sur un plan psychologique que sur le plan social. Cet aspect de la chirurgie ne doit pas être négligé dans notre prise en charge globale de ces patients (Gahagnon et al., 2011).

Des améliorations locales sont également notées, macération et ulcération des plis ainsi que mycoses s'améliorent fréquemment.

I.5.2.3. Complications

La démocratisation et les progrès réalisés dans le domaine de l'abdominoplastie ces dernières années, ne doivent pas faire oublier qu'il s'agit d'interventions à risques élevés de complications (Le Louarn et al., 2004).

Immédiates

Ce sont les suivantes :

- l'hématome est la complication la plus fréquente et nécessite une reprise chirurgicale systématique pour éviter les complications à type de déglobulisation massive ou de surinfection d'un hématome vieilli ;
- les nécroses cutanées locales ou étendues ne sont pas exceptionnelles et sont favorisées par des sutures en tension ou une intoxication tabagique. Quand elles sont étendues, il faut éviter de les greffer pour ne pas pérenniser la taille de la perte de substance. La cicatrisation dirigée est la méthode de choix. Elle peut être longue (parfois plusieurs mois) et il faut savoir suivre et entourer les patients. En cas de cicatrice inesthétique, celle-ci pourra être reprise à distance ;
- nécrose de l'ombilic (parfois inattendue...) : il est alors préférable de laisser la zone en cicatrisation dirigée et de prévoir une reconstruction à distance ;
- perforation pariétale (surtout par faux trajet lors d'une lipoaspiration associée) ;
- désunion cicatricielle : de petites désunions, intéressant quelques centimètres, ne sont pas rares. Les larges désunions nécessitent en revanche des soins prolongés et parfois la mise en place de pansements à pression négative ;
- une lymphocèle est classique en postopératoire et n'est pas à proprement parlé une complication (Rodby et al., 2011). Néanmoins, certaines lymphocèles peuvent être

abondantes, se chroniciser (par encapsulation), nécessitant des ponctions transcutanées, voire parfois, à quelques mois, des reprises chirurgicales si elles sont organisées. Il faut les prévenir en supprimant les espaces morts à l'aide de points de capitons lors de la fermeture et de gaines de contention élastiques. Ces lymphocèles peuvent également se surinfecter dans certaines situations. Elles peuvent surtout mimer une complication septique : discret syndrome fébrile et grosse inflammation locale. Ce tableau est résolutif en quelques heures après ponction évacuatrice et aucune antibiothérapie ne se justifie. Dans notre pratique, nous ne décidons de ponctionner les lymphocèles que si elles sont douloureuses ou très volumineuses menaçant les sutures ou entraînant une réaction inflammatoire cutanée ; les ponctions itératives étant suspectes d'entretenir le phénomène ;

- abcès de paroi, dermohypodermite nécrosante ou non, myosite ou fasciite parfois mortelles peuvent survenir après ce type de chirurgie et sont à prendre en charge le plus souvent chirurgicalement. Les diagnostics d'infections de paroi sont parfois difficiles et le dosage de la procalcitonine en association à la C reactive protein (CRP) reste très utile dans ces situations (Svoboda et al., 2007). Cela ne doit pas retarder la prise en charge chirurgicale si le diagnostic se confirme (clinique et tomodensitométrie) ;

- complications thromboemboliques : elles peuvent survenir en dépit d'un traitement anticoagulant bien conduit. Leur prévention doit être systématique et standardisée au sein des unités chirurgicales. Un bilan Doppler est pratiqué chaque fois que nécessaire. Leur incidence est variable en fonction des séries mais demeure aux alentours de 1% comprenant les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires (Chaouat et al., 2000) ;

- paresthésies pariétales : elles sont fréquentes (voire quasi constantes dans la zone sous-ombilicale) et parfois douloureuses, mais la plupart du temps, elles s'estompent complètement en 12 à 18 mois. Les patients doivent être au courant de cette éventualité.

À distance

Ce peut être de simples imperfections de résultats comme de réelles complications :

- défauts cicatriciels : la cicatrice peut présenter un décalage, être asymétrique ou tout simplement mal positionnée et ne pas être correctement dissimulée par les sous-vêtements. On retrouve aussi des cicatrices adhérentes ou invaginées. L'ombilic peut être élargi, non centré ou au contraire trop petit. On peut ainsi être amené à réaliser des retouches cicatricielles mais pas avant 12 à 18 mois. En fonction de l'importance des retouches, il est parfois possible de les réaliser sous anesthésie locale ;

- ascension de la berge inférieure avec étirement du triangle pileux : ce défaut s'estompe souvent sur les mois suivant l'intervention. En outre, il est particulièrement difficile de proposer un geste correcteur ;

- oreilles latérales : elles peuvent initialement passer inaperçues. Néanmoins, une reprise chirurgicale est le plus souvent nécessaire à quelques mois. Le seul moyen de les corriger est d'en réaliser une exérèse en allongeant la cicatrice latéralement. Une étape de liposuction préalable peut aussi être intéressante ;

- récurrence d'un diastasis ou d'une voussure pariétale : cela peut être la conséquence d'un défaut de correction chirurgicale ou d'un défaut de port de la gaine de contention par les patients. Une reprise chirurgicale est alors nécessaire et il faut cette fois-ci réfléchir à l'éventualité de mettre une plaque de renfort abdominal ;

- persistance d'excédent graisseux sous-ombilical par défauts ou asymétries dans la résection. Persistance d'un excédent graisseux sus-ombilical par défauts ou insuffisance de liposuction, ou par insuffisance de décollement latéral (Gliksman et al., 2006) : ces insuffisances de

résultats sont souvent accessibles à des gestes localisés de liposuccions secondaires que l'on peut proposer quatre à six mois après la chirurgie initiale ;

- persistance d'excédent cutané transversal qui peut nécessiter un deuxième temps chirurgical avec la réalisation d'une cicatrice verticale.

Objet du travail de thèse

Les lésions traumatiques ou tumorales peuvent aisément engendrer des séquelles fonctionnelles à type de cicatrice défectueuse si elles ne sont pas correctement prises en charge, et parfois même après une prise en charge adaptée, rapide et efficace. Chez l'homme, les problèmes de cicatrisation de ces lésions peuvent se manifester soit par un retard de cicatrisation (cicatrisation chronique qui se produit, par exemple, dans le cas de problèmes vasculaires, de diabète ou après une exposition aux radiations), soit par une cicatrisation excessive (comme c'est le cas pour les cicatrices hypertrophiques et chéloïdes). La guérison de ces séquelles cicatricielles est un véritable enjeu de santé publique. Actuellement, la prise en charge de ces cicatrices est longue, difficile d'un point de vue physiologique et psychologique, et très onéreuse pour la société. Il est donc indispensable de trouver de nouvelles méthodes pour prévenir leur apparition et les traiter une fois qu'elles sont installées. Le but de la médecine régénérative de nos jours est d'aboutir à une véritable régénération cutanée et non pas à une simple cicatrisation. Nous avons souhaité donc nous intéresser à la prise en charge en « amont » (de type préventif) et en « aval » (de type curatif) de ces cicatrices séquellaires quelle que soit la nature de la lésion initiale : traumatique ou tumorale. Pour cela, de multiples phénomènes complexes et le plus souvent intriqués sont nécessaires à prendre en compte pour pouvoir traiter ces cicatrices le plus efficacement possible.

Comme nous venons de le voir, les cellules souches possèdent un potentiel en médecine régénérative très important. Notamment les MSCs issues du TA, les AD-MSCs, sont actuellement très utilisées pour traiter différentes pathologies.

Le souhait initial de ce travail était donc d'étudier les effets des AD-MSCs dans la régénération cutanée (comme pour traiter une séquelle cicatricielle ou accélérer une cicatrisation). De nombreux travaux existent déjà sur le sujet, ce qui fait que notre travail s'inscrit dans une continuité de la recherche actuelle sur ces cellules. Cependant l'originalité résidait dans la comparaison entre les deux feuilletts du TA. Comme nous venons de le voir dans l'introduction, le TA est séparé en deux feuilletts distincts (SAT et DAT) par le fascia superficialis. Cette comparaison a été rendue beaucoup plus facile par la proximité du CHU et mon travail de clinicien en tant que chirurgien plasticien. Ainsi, il était aisé d'acheminer des pièces fraîches de dermolipectomies, afin de séparer les deux couches, d'extraire la FSV et de cultiver les AD-MSCs très rapidement au laboratoire. Les prélèvements abdominaux ont été choisis de par leur plus grande fréquence au bloc opératoire, la quantité de matériel disponible et le taux de cellules souches présentes à ce niveau. De plus, la majorité des études actuelles utilisent des cellules souches issues de l'abdomen facilitant la comparaison avec notre étude.

Pour cela, nous avons commencé par réaliser une revue exhaustive sur le sujet (insérée dans l'introduction de ce manuscrit) (Laloze et al, 2021). Grâce à cette revue essentiellement mais aussi aux autres travaux menés durant cette thèse, nous avons pu au fil du temps privilégier certains axes et en éliminer d'autres. L'objectif final de ce travail a ainsi été de comparer les effets des AD-MSCs issues des deux couches du TA abdominal, et plus particulièrement de leur sécrétion paracrine, que ce soit dans le surnageant de culture ou à travers les exosomes, sur deux propriétés clés dans la régénération cutanée : l'angiogenèse et la ré-innervation.

Nous souhaitons démontrer qu'il existe une différence d'efficacité en termes de régénération cutanée via l'angiogenèse et la ré-innervation entre les AD-MSCs (et/ou leurs exosomes) issues des deux couches du TA. Cela permettrait aux cliniciens d'adapter les prélèvements lors de lipoaspiration en fonction de l'effet souhaité ou de la pathologie à prendre en charge. Le but définitif de cette étude est donc bel et bien clinique, et il est majeur car nous sommes

persuadés que le lipofilling aura un intérêt crucial dans un avenir proche pour traiter de nombreuses pathologies ou symptômes.

Les cellules stromales mésenchymateuses dérivées des tissus adipeux humains (AD-MSCs) sont actuellement testées en tant que thérapies à base de cellules autologues pour la cicatrisation et la régénération des tissus. Des études récentes ont également démontré que les exosomes dérivés des AD-MSCs contribuent à la réparation des tissus et à la régénération des nerfs périphériques. Le tissu adipeux abdominal sous-cutané (AAT) est divisé en deux couches : la couche superficielle (sAAT) et la couche profonde (dAAT). Cependant, on ne sait pas s'il existe des caractéristiques particulières à chaque couche en termes de potentiel régénérateur des AD-MSCs. En utilisant des AD-MSCs purifiées et caractérisées à partir de trois abdominoplasties, nous avons comparé leurs sécrétomes et leurs exosomes afin d'identifier quelle couche pourrait être la plus appropriée comme source de thérapie cellulaire. L'analyse phénotypique des AD-MSCs contenant la fraction vasculaire stromale n'a pas révélé de différence entre les deux couches. Les sécrétomes des AD-MSCs ont montré un profil très similaire de contenu en cytokines et les deux couches ont été capables de libérer des exosomes avec des caractéristiques identiques. Cependant, par rapport au sécrétome, les exosomes libérés présentaient de meilleures propriétés biologiques. Il est intéressant de noter que les exosomes du dAAT semblent plus efficaces pour la neuromodulation, alors que ni les exosomes dérivés du sAAT ni ceux dérivés du dAAT n'ont d'effets significatifs sur la fonction endothéliale. Il apparaît donc que les exosomes dérivés des AD-MSCs des deux couches du tissu adipeux abdominal possèdent des caractéristiques différentes pour la thérapie cellulaire.

Article

Specific Features of Stromal Cells Isolated from the Two Layers of Subcutaneous Adipose Tissue: Roles of Their Secretion on Angiogenesis and Neurogenesis

Jérôme Laloze ^{1,2,*}, Marie Lacoste ¹, Faris Marouf ³, Gilles Carpentier ⁴, Laetitia Vignaud ¹, Benoit Chaput ^{5,6}, Audrey Varin ⁵, Alexis Desmoulière ¹ and Amandine Rovini ¹

- ¹ NeurIT Neuropathies Périphériques et Innovations Thérapeutiques UR 20218, Faculties of Medicine and Pharmacy, University of Limoges, 87000 Limoges, France; marie.lacoste.contact@gmail.com (M.L.); laetitia.vignaud@unilim.fr (L.V.); alexis.desmouliere@unilim.fr (A.D.); amandine.rovini@unilim.fr (A.R.)
 - ² Department of Maxillo-Facial, Plastic and Reconstructive Surgery, CHU Dupuytren, 87000 Limoges, France
 - ³ INSERM UMR 1302, Immunology and New Concepts in ImmunoTherapy, INCIT, Nantes University, 44035 Nantes, France; faris.marouf@chu-nantes.fr
 - ⁴ Gly-CRRET Research Unit 4397, Paris-Est Créteil University, 94000 Créteil, France; carpentier@u-pec.fr
 - ⁵ RESTORE Research Center, Team 2 FLAMES, Toulouse P. Sabatier University, INSERM, CNRS, EFS, ENVT, 31062 Toulouse, France; benoitchaput31@gmail.com (B.C.); audrey.varin@free.fr (A.V.)
 - ⁶ Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Toulouse University Hospital, 31100 Toulouse, France
- * Correspondence: jerome.laloze@unilim.fr



Citation: Laloze, J.; Lacoste, M.; Marouf, F.; Carpentier, G.; Vignaud, L.; Chaput, B.; Varin, A.; Desmoulière, A.; Rovini, A. Specific Features of Stromal Cells Isolated from the Two Layers of Subcutaneous Adipose Tissue: Roles of Their Secretion on Angiogenesis and Neurogenesis. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 4214. <https://doi.org/10.3390/jcm12134214>

Academic Editor: Dennis Paul Orgill

Received: 31 May 2023

Revised: 16 June 2023

Accepted: 19 June 2023

Published: 22 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Human-adipose-tissue-derived mesenchymal stromal cells (AD-MSCs) are currently being tested as autologous-cell-based therapies for use in tissue healing and regeneration. Recent studies have also demonstrated that AD-MSC-derived exosomes contribute to tissue repair and peripheral nerve regeneration. Subcutaneous abdominal adipose tissue (AAT) is divided into two layers: the superficial layer (sAAT) and the deep layer (dAAT). However, it is unclear whether there are particular characteristics of each layer in terms of AD-MSC regenerative potential. Using AD-MSCs purified and characterized from three abdominoplasties, we compared their secretomes and exosome functions to identify which layer may be most suitable as a source for cell therapy. Phenotypical analysis of the AD-MSCs containing stromal vascular fraction did not reveal any difference between the two layers. The AD-MSC secretomes showed a very similar pattern of cytokine content and both layers were able to release exosomes with identical characteristics. However, compared to the secretome, the released exosomes showed better biological properties. Interestingly, dAAT exosomes appeared to be more effective on neuromodulation, whereas neither sAAT nor dAAT-derived exosomes had significant effects on endothelial function. It thus appears that AD-MSC-derived exosomes from the two abdominal adipose tissue layers possess different features for cell therapy.

Keywords: adipose-tissue-derived-stromal cells; exosomes; paracrine secretion; angiogenesis; sensory neurons; skin regeneration

1. Introduction

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have now been widely studied over several decades [1]. They were first described in the bone marrow in 1976 by Friedenstein, then identified in other tissues such as the umbilical cord, placenta, and, more recently, in the adipose tissue (AT) [2]. Because MSCs are multipotent stem cells able to self-renew and to differentiate into many cell types including adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes, they represent a promising cell-based strategy to treat several diseases. Adipose tissue is mainly composed of adipocytes and the stromal vascular fraction (SVF), which consists of a heterogeneous population of cells that includes adipose-derived stem cells, endothelial cells, endothelial progenitor cells, pericytes, T cells, and other immune cells including M2 macrophages [3,4].

AD-MSCs are characterized by their ability to adhere to plastic cell cultures, with a fibroblastic shape as well as possessing a specific molecular profile (CD73, CD105, CD90, etc.). These stem cells have been increasingly studied in cell therapy and regenerative medicine. They show immunomodulatory capacities [5] and present therapeutic potential for treating inflammatory diseases such as Crohn's disease, disseminated lupus erythematosus, and scleroderma/systemic sclerosis [6,7]. Moreover, AD-MSCs can be obtained relatively easily and in large amounts from AT with minimal morbidity through lipoaspiration or abdominoplasty [8], two interventions widely used in plastic surgery, making them a major alternative source of MSCs.

The human body has various types of AT, which exhibit functional differences based on their regional distribution.

Anatomically, it is accepted that AT can be categorized into subcutaneous (deep and superficial) and internal (intrathoracic, visceral, and retroperitoneal) AT [9]. Subcutaneous AT is itself separated into two layers (superficial and deep) by the fascia superficialis, a very fine ubiquitous collagenous membrane well known to plastic surgeons. This reveals a complex architecture of the AT in which a superficial fascial system (SFS) separates the subcutaneous AT into two layers: the areolar layer or superficial AT (sAAT) and the lamellar layer or deep AT (dAAT) [10–15]. The sAAT is localized immediately below the skin and is formed by small fat lobules tightly packed between fibrous septae, derived from the SFS and oriented perpendicularly to the skin. The dAAT lies below the fascia superficialis and consists of large fat lobules, loosely packed within widely spaced vertical and oblique fibrous septae. The sAAT is widely found all over the body, whereas dAAT is more localized in specific body areas of the abdomen and hips [16–22].

Several studies have already compared the characteristics of AD-MSCs between the different types of AT (subcutaneous vs. internal), or indeed between different anatomical locations. These ATs have been shown to not only display morphological differences [23] but also exhibit some slight differences in their AD-MSCs depending on their location of origin [24,25]. The harvesting site is believed to affect both the yield of isolated cells as well as their growth properties [26]. However, no study to date has clearly compared the biological properties of AD-MSCs isolated from the sAAT with those from the dAAT.

In addition, the AT is considered one of the largest endocrine organs in the body, releasing secretory factors that exert systemic functions on tissues and organs. It is known that the therapeutic power of stromal cells lies primarily in their paracrine secretions that include cytokines and extracellular vesicles (EVs). EVs are small vesicles, characterized by a phospholipid bilayer, which contain a wide variety of proteins, DNA, mRNA, and miRNA molecules. There are different types of EVs that vary in origin, and in physical (size, density, sedimentation) and biochemical characteristics. Two main types of EVs have been described according to their origins: the first are small EVs termed "exosomes", with a diameter between 30 and 150 nm, of endosomal origin, secreted after fusion with the plasma membrane of a multivesicular endosome, and which may be a promising alternative to cell therapy in regenerative medicine thanks to their relative safety (non-tumorigenic, non-immunogenic, non-infectious, non-thrombotic, or embolic); the second are microvesicles (also called microparticles) formed from budding of the plasma membrane (100–1000 nm) [27].

The use of exosomes is both more convenient and economical for clinical applications, as invasive cell collection procedures are limited. In addition, the efficiency of using exosomes has been shown in the literature [28]. In addition, microvesicles can be mass-produced using custom cell lines under controlled laboratory conditions. The long-term repetitive administration of exosomes does not cause toxicity [29]. Modification of the key biological processes is possible in order to better target the desired effects on cells [30].

Several studies have been conducted using exosomes derived from AD-MSCs, particularly in skin regeneration [31]. These have shown the role of exosomes in stimulating cell migration, proliferation, and collagen synthesis in fibroblasts, ultimately leading to accelerated healing *in vivo*.

In the present study, we aimed (1) to investigate, in a comparative and more exhaustive manner, AD-MSCs from the two layers of the subcutaneous AT (sAAT and dAAT) in order to optimize their use in regenerative medicine and (2) to focus on the effects of their paracrine secretions (either the secretion products in the culture supernatant or the exosomes themselves) on endothelial function and neuron outgrowth with the aim of comparing the two layers of the AT. Highlighting potential differences in AD-MSC properties between the sAAT and the dAAT would, we hope, allow the clinical practice to be modified, with the aspiration of preferably a single layer according to clinical needs.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation, Purification, and Characterization of Human AD-MSCs

Abdominoplasties were performed in the plastic and reconstructive surgery department at the Limoges University Hospital Dupuytren with a standardized protocol and by the same operator. This study was approved by the hospital ethics committee and all patients gave oral and written consent. The lipoaspirate was washed with phosphate-buffered saline (PBS) and digested with 0.25% collagenase I (Gibco™, Grand Island, NY, USA). The obtained mixture was then filtered through nylon membranes (0.2 µm). Separation of the two layers of the AT from the fascia superficialis was performed using a scalpel and scissors and at least 10 g from each layer was placed in 50 mL tubes. To recover the SVF, the AT was digested in two steps: mechanical dissociation (Mayo scissors) followed by enzymatic digestion (type I collagenase; Gibco™) in 1X PBS on a shaker (maximum tilt and speed) for 1 h at 37 °C. Enzymatic digestion was stopped by adding complete medium (DMEM GlutaMax (1 g/L D-Glucose), 1% penicillin/streptomycin, 10% fetal bovine serum, and 20 ng/mL of basic fibroblast growth factor). The tissue remnants were filtered through a 100 µm cell filter (Steriflip, Darmstadt, Germany) to remove collagen debris and to obtain a homogeneous suspension. The filtrate was then centrifuged for 10 min at 590 × g. The supernatant, which corresponds to the adipocytes and serum, was aspirated, and the pellet (SVF) was resuspended in complete medium or PBS and further purified by removal of residual red blood cells using the standard Ficoll-Paque (Cytiva, Marlborough, MA, USA) gradient centrifugation. AD-MSCs recovered from superficial and deep subcutaneous AT were plated at 4000 cells/cm² on day 0 (passage 0 or P0) in alpha-MEM supplemented with 2% pooled human platelet lysate (Pan Biotech, Aidenbach, Germany), 1% GlutaMax, 1% non-essential amino acids (Gibco) and maintained at 37 °C and 5% CO₂. Cells were monitored daily with media renewal every 2 or 3 days and routinely counted using Trypan Blue. In addition, the AD-MSC immunophenotype was evaluated by flow cytometry using specific surface markers. The expression of positive (CD73, CD105, CD90) and negative (CD34, CD45, CD14, and CD19) markers was analyzed (MSC Phenotyping Kit, human, Miltenyi). Cell lines from three donors were used in the study.

A cell proliferation assay to characterize AD-MSC growth, by calculating the population doubling time (PDT), was then performed. The PDT (time during which the cell population doubled in number) was calculated according to the equation: PDT = culture time/PDN. The population doubling number (PDN) was calculated according to the formula $PDN = \log N/N_0 \times 3.31$, where N is the number of cells at the end of the culture period and N₀ is the number of cells at the start of culture. Cells were grown in 6-well plates at 4000 cells/cm² at P0 and 2000 cells/cm² at P1 until they reached confluence. Cells were then detached with trypsin and counted with Trypan blue, and these data were used to calculate the PDT. Finally, a comparison of the results between passages was performed.

2.2. AD-MSC Secretome Collection and Exosome Isolation

The AD-MSC secretome was obtained from AD-MSCs at P1–5. In order to collect the secretome, AD-MSCs at 70–80% of confluence were washed twice with 1X PBS and incubated in serum-free medium for 48 h. The supernatant was removed, pooled, and centrifuged at 300 × g for 10 min at 4 °C to remove cell debris, and then again at 2000 × g for 10 min at 4 °C and filtered through a 0.22 µm filter, hereafter referred to as the 'total

secretome'. The total secretome was either applied freshly or stored at -20°C for further use. Exosomes were isolated from the total secretome by ultracentrifugation at $120,000\times g$ for 2 h at 4°C , washed in PBS, and re-centrifuged at $120,000\times g$ for 2 h at 4°C .

2.3. Characterization of AD-MSC Exosomes

For each exosome preparation, the concentration of total proteins was quantified with the micro-BCA assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Exosomes were then resuspended in an appropriate volume of PBS or medium for further analysis or use. The concentration and size of purified exosomes were assessed by nanoparticle tracking analysis (NTA) on a Nanosight NS300 instrument. Further characterization of the isolated exosomes included labeling with antibodies against tetraspanin membrane molecules including CD9 (D3H4P, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), CD81 (SC-166029, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and CD63 (SC-5275, Santa Cruz Biotechnology), in addition to the endosomal pathway marker TSG101 (ab207567, Abcam, Cambridge, UK) and HSC70 (SC-7298, Santa Cruz Biotechnology). The membranes were probed with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (ab205718 and ab205719) and the signal detected by chemiluminescence was imaged on a Chemi Doc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The intensity of dots was analyzed using the Protein Array Analysis plugin on ImageJ.

2.4. Cytokine Secretion Profiling from Total Secretome and Exosomes

The cell-derived total secretome or exosomes were evaluated by the detection of human proteins including cytokines, growth factors, proteases, and soluble receptors, using the Human Cytokines Array C6 and C5 (RayBiotech, Peachtree Corners, GA, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 mL of cell culture supernatant or lysed exosomes was incubated with arrayed antibody membranes for 2 h at room temperature; membranes were then washed and incubated with the mixture of biotin-conjugated antibodies for another hour at room temperature. After washing, HRP-conjugated streptavidin was added to the membranes for 1 h at room temperature. The signal was developed with the detection buffer and imaged on a Chemi Doc XRS (Bio-Rad). Chemiluminescent cytokine array data were semi-quantified with Image J. The intensity of each cytokine spot was measured on the basis of gray-scale levels. The density for each cytokine was then averaged over duplicate spot signals.

2.5. In Vitro Wound Healing and Angiogenic Potential of AD-MSC Total Secretome and Exosomes

Human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs; kind gift from SILAB, Brive-la-Gaillarde, France) were isolated from human abdominoplasties with regulatory approval. Cells were grown in endothelial cell growth medium (ECGM-MV) (Promocell, Heidelberg, Germany) and used for experiments no later than P6. Two assays were performed in this study to assess the angiogenic responses of HDMECs to the AD-MSC total secretome and exosomes: (1) Tube-like formation assay: 5×10^3 HDMECs per well were seeded on a Geltrex™ (Gibco)-coated 15-well μ -Slide plate (Ibidi, Gräfelfing, Germany) and treated with the secretome (50%) or exosomes (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Images were taken on a phase-contrast microscope (Leica DMi8; $4\times$ magnification) and processed with an adapted version of the Angiogenesis Analyzer plugin for ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) [32]. The following parameters were analyzed: number of junctions and total length of master segments. Junctions refer to branching points and master segments are elements delimited by 2 junctions after limbing of the network (Figure 5A(a–d)). The normalized values were averaged over 3 experiments. (2) Wound healing migration assay: 5×10^3 HDMECs/well were seeded on rat tail collagen I (Gibco)-coated Incucyte® Imagelock 96-well plates and left to grow until they reached 95–100% confluence [32]. A scratch was made in each well with the Incucyte Woundmaker tool, and cells were then gently washed with PBS to remove any cell debris formed after making a scratch. HDMECs were treated either with the secretome (50%) or exosomes (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

for 24 h and incubated at 37 °C in 5% CO₂ in the Incucyte Live-Cell Analysis system (Sartorius, Germany). Imaging was performed every 2 h for a total duration of 24 h with a ×10 objective. The area of wound closure was calculated and analyzed using the Incucyte Scratch Wound Cell Migration software module of the ZOOM imaging system. The experiments were performed in three technical replicates for each treatment.

2.6. hiPSC Differentiation into Sensory Neurons (Appendix A)

The method for differentiation of human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) into sensory neurons (iSNs) was adapted from available protocols [33,34]. Briefly, hiPSCs (PCi-CAU, Phenocell, Grasse, France) were cultured on human-embryonic-stem-cell-qualified Geltrex™ as colonies, in StemMACS™ iPS-Brew XF (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) with daily medium changes. When hiPSCs reached approximately 60–70% confluency, they were sub-cultured using Accutase (Stemcell Technologies, Saint-Egrève, France) (day 0), and when the same confluence was achieved, neural crest differentiation (days 1–8) was initiated by switching to NDM medium (DMEM-F12, Neurobasal Medium at a 1:1 ratio, Glutamax, N2 Supplement, B27 Supplement, non-essential amino acids, and 0.1 mM β-mercaptoethanol) containing 500 nM LDN-193189 (Selleckchem, Houston, TX, USA) and 10 μM SB431542 (Sigma, Kawasaki City, Japan). The following day (day 2), the same two factors were added, together with 3 μM CHIR-99021 (Sigma). On day 3, the medium was changed to remove LDN, and on day 4 SB was not added, but CHIR was included until day 10, with medium changes on odd days. This results in differentiation of the hiPSC cells to neural crest progenitor cells (NCPCs). On day 11 of differentiation, NCPCs were maintained in NDM medium for expansion with the addition of 10 ng/mL of FGF-2 and 10 ng/mL of epidermal growth factor (Peprotech, Cranbury, NJ, USA). Cells were then dissociated with accutase and reseeded onto 6-well plates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), μ-slide chambers (Ibidi, Gräfelfing, Germany), or microfluidic chambers. Differentiated sensory neurons were maintained in NDM medium with neuronal growth factors ((20 ng/mL of human β-nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3, and glial-derived neurotrophic factor (GDNF); Peprotech) and 200 μM ascorbic acid (Sigma).

2.7. Axonal Regeneration

iSNs on days 15–19 underwent an axonal injury model following dissociation as single cells with accutase and re-plating in a Geltrex™-coated 96-well plate. Cells were exposed to the total secretome or exosomes for 5 days with complete media change every other day and imaged on an Incucyte 10x on days 1 and 5. To quantify neurite outgrowth induced after the re-plating, a customized version of the ImageJ Angiogenesis Analyzer plugin was used and the total branching length was normalized to the analyzed area. Three technical replicates were performed on different batches of differentiated neurons.

2.8. Neurosphere Formation and Quantification of Axonal Outgrowth

On day 6, NCPCs were dissociated with accutase and seeded at a density of 9000 cells/well in 150 μL of NDM medium in a 96-well non-adherent V-bottom plate (Corning, Somerville, MA, USA) for neurosphere formation. The neurospheres were allowed to grow in NDM medium for 6 days until day 12, before being transferred into a Geltrex™-coated 96-well plate and treated with either NGF (20 ng/mL), the total secretome (50% of the total volume), or exosomes (10 μg/mL) and cultured for a further 5 days. The culture medium was completely refreshed every 2 days. Images of iSN neurospheres were captured using a phase-contrast microscope (Leica DMI8; 4× magnification) on days 0 and 5. For the quantification of the area and perimeter of a neurosphere, the Image J polygon tool was used to define the edge of the neurosphere through the junction of the neurites as previously described in detail in [35].

2.9. Data Analysis

All experiments were repeated at least three times. Results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism using one-way analysis of variance (ANOVA) or a two-tailed unpaired *t* test where appropriate. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

2.10. Ethics Approval

This study was approved by the Ethics Committee of Limoges University Hospital Dupuytren (protocol code ProDiCet, N° 312-2019-78 on 9 December 2019). Informed oral and written consent was obtained from all the patients.

3. Results

3.1. Characteristics of the Patients and Phenotypic Analysis of AD-MSCs

Three female patients gave their oral and written consent for this study. Their characteristics were very similar, with a mean age of 52.7 years (48–59), mean body mass index of 26.64 (25.28–27.7), and average weight loss of 5 kg (0–15). Two patients underwent delayed-deep inferior epigastric perforator (DIEP) surgery (reconstructive breast surgery after mastectomy for breast cancer), whereas the other patient underwent abdominoplasty (post-bariatric surgery). Guillain–Barré syndrome was noted for the third patient.

AD-MSCs from both layers of the AT were successfully isolated from the three donors. Cells showed adherence to the plastic culture flask and were characterized using flow cytometry for the expression of MSC-specific cell surface markers [36]. As shown in Figure 1, P0 AD-MSCs from both layers did not express the hematopoietic lineage markers CD14, CD19, CD34, and CD45 (3.22% for sAAT and 1.95% for dAAT). By contrast, cells from both layers were positively sorted for CD73 (89.89% vs. 93.38%, respectively, for the sAAT and the dAAT), CD105 (75.66% vs. 79.56%), and CD90 (96.97% vs. 95.24%). These results confirmed the phenotypic profile of the purified AD-MSCs.

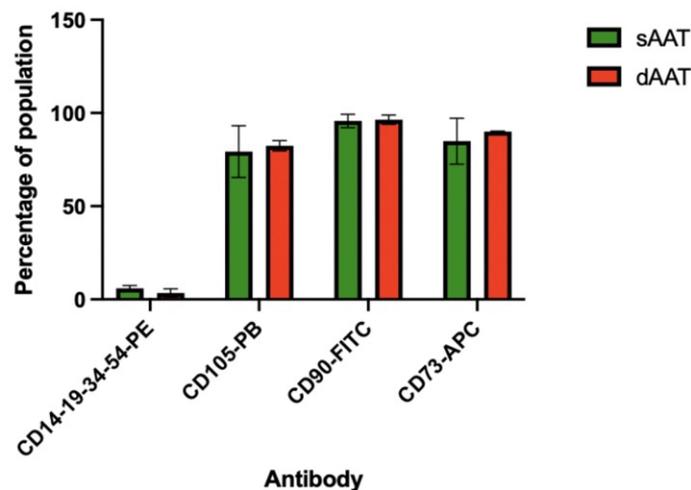


Figure 1. Phenotypic profiling of the extracted AD-MSCs by fluorescence-activated cell sorting at P0 ($n = 4$).

3.2. Proliferation Assay

The population doubling time (PDT) for AD-MSCs from the superficial AT layer was slightly lower than that of AD-MSCs from the deep layer, indicating a faster proliferation rate of AD-MSCs derived from the superficial layer. However, a significant decrease in PDT was observed with increased passage number for AD-MSCs from both layers. AD-MSCs derived from the superficial layer of the AT doubled their population on average over

56.89 ± 3.82 h at passage 0 (P0) and 36.04 ± 2.48 h from passage 1 to passage 3 (P1–3), whereas those derived from the deep layer of the AT at P0 and P1–3 exhibited a doubling time of 62.36 ± 3.91 h and 39.96 ± 2.73, respectively (Figure 2).

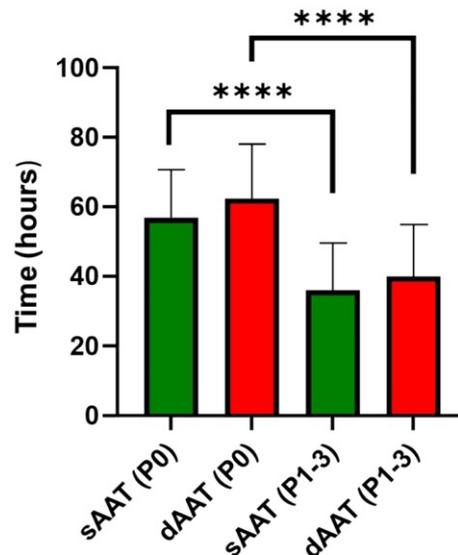


Figure 2. Population doubling time (hours) for AD-MSCs (superficial and deep) at passage 0 (P0) and subsequent passages from P1 to P3 (P1–3), (***, $p < 0.0001$, $n \geq 3$).

3.3. Cytokine Secretion Profiling from AD-MSC Total Secretome

In order to define the proteins in the total AD-MSC secretome, the cell culture supernatant of P1–P6 cells from the three donors was collected following the depletion of platelet lysate for 48 h. The results shown in Figure 3A,B for the total secretome showed several cytokines at different expression levels including CCL5, IL6, angiogenin, and others. However, all detected cytokines had similar expression patterns, resulting in no significant differences being found between the two AT layers. The panel of cytokines detected was correlated with the process of wound healing and skin regeneration and more specifically with inflammation, neurostimulation, and angiogenesis. Based on these results, we then investigated the effect of AD-MSCs and their paracrine secretions on endothelial function and neuronal processes.

3.4. Characterization of Exosomes Secreted by AD-MSCs from sAAT and dAAT

In order to determine the size distribution and the number of particles, nanoparticle tracking analysis (NTA) was performed, showing mean sizes of 167.47 nm (sAAT) and 165.4 nm (dAAT) with modes of 127.68 nm (sAAT) and 123.3 nm (dAAT) (Figure 4A), with no significant difference between exosomes in the two AT layers.

The yield of isolated exosomes from both layers, measured by NTA, also showed no significant difference. Ten milliliters of the culture supernatant of AD-MSCs from the sAAT contained 4.44×10^9 particles compared to 4.02×10^9 for those of AD-MSCs from dAAT. These results show that AD-MSCs derived from both layers of the AT (superficial and deep) secreted an equivalent amount of exosomes during the same period (48 h).

Western blots confirmed that the isolated nanoparticles corresponded to exosomes. The presence of the exosomal markers CD63, CD9, CD81, TSG101, and HSC70 was assessed on purified exosomes lysed with RIPA (Figure 4B). Western blot analysis demonstrated that exosomes secreted by AD-MSCs from both layers expressed CD9, CD63, CD81, TSG101, and HSC70, which are well-accepted exosome biomarkers [37,38].

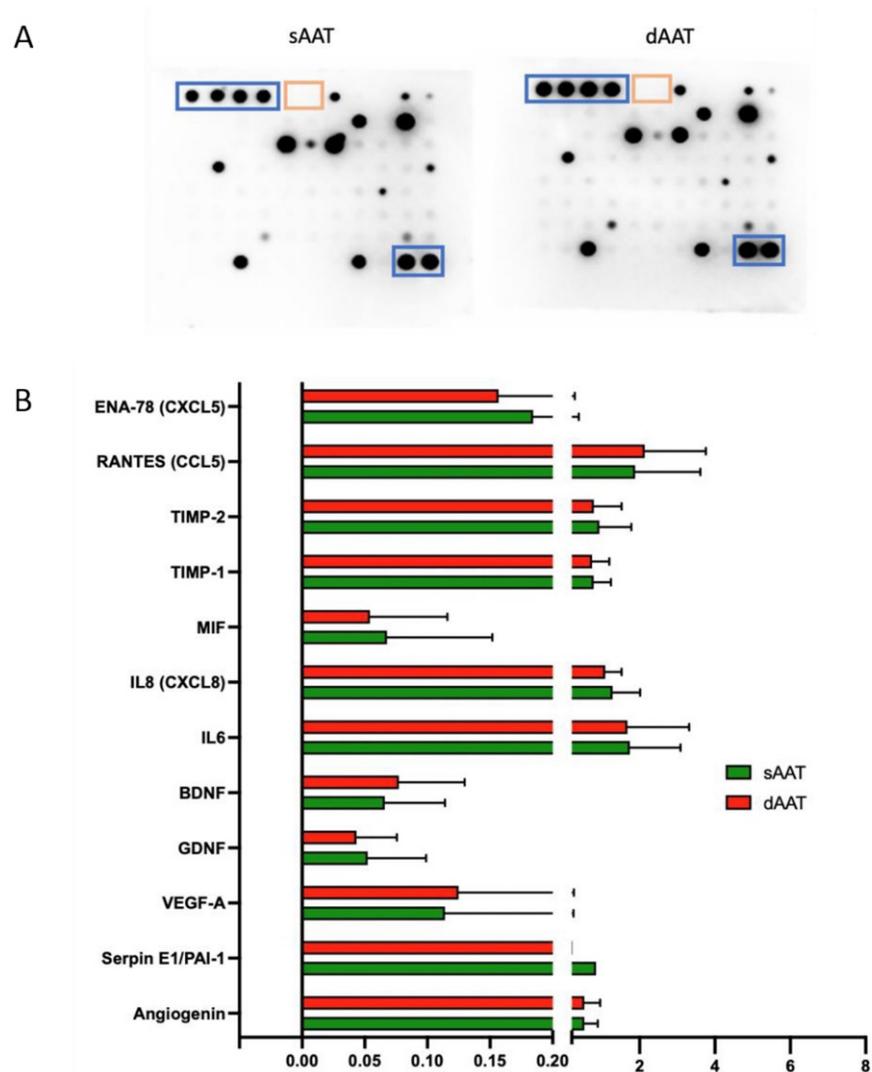


Figure 3. Cytokine expression profile of the conditioned media collected from AD-MSCs. (A) Representative image of cytokine antibody array, after incubation with the supernatant of AD-MSC DLA12 P5 from sAAT (left) and dAAT (right). Positive and negative controls are highlighted in blue and orange, respectively. Protein loading was the same for each membrane. (B) Quantification of the immunoblotting signals detected by chemiluminescence for the detectable cytokines in each sample ($n = 5$). T-tests showed no significant differences.

3.5. Angiogenic and Migration Potential of HDMECs Exposed to AD-MSC Exosomes from sAAT and dAAT

AD-MSC exosomes have been previously reported to promote angiogenesis [39] and wound healing [40]. To compare more specifically the role of exosomes and other released factors derived from both AT layers on the angiogenic and migratory activity of endothelial cells, we used HDMECs isolated from abdominoplasties. Low-passage-number HDMECs were treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of sAAT- or dAAT-derived exosomes or with 50% (v/v) of the respective AD-MSC total secretome, then in vitro tubulogenesis and migration experiments were performed. When plated on Geltrex[®] within 4–6 h, HDMECs spontaneously initiated

vascular morphogenesis and formed multicellular tubular networks that were stable for up to 24 h (see Figure 5). HDMECs exposed to both sAAT and dAAT exosomes formed a complex anastomosis network (Figure 5A(e,f)), which was as extensive and well connected as the non-treated control (no significant difference found). By contrast, when half of the HDMEC media was replaced by the total secretome collected from either sAAT or dAAT AD-MSCs, a marked decrease in the number of junctions and total length of the established network was observed (Figure 5B,C). The angiogenesis network formed by HDMECs exposed to purified exosomes, either from sAAT or dAAT, showed a quantitatively more complex organization than when HDMECs were exposed to the AD-MSC total secretome in terms of numbers of junctions and length of total master segments. The process of angiogenesis involves the regulation of cell survival, proliferation, differentiation, and migration, all of which are processes known to be affected by exosomes. For the scratch wound assay, cell migration was observed over 24 h (Figure 5C,D). This showed that HDMECs treated with exosomes from the sAAT were as efficient as non-treated cells in healing the scratch wound. In addition, dAAT exosomes and the total secretome from both AT layers did not allow complete wound closure.

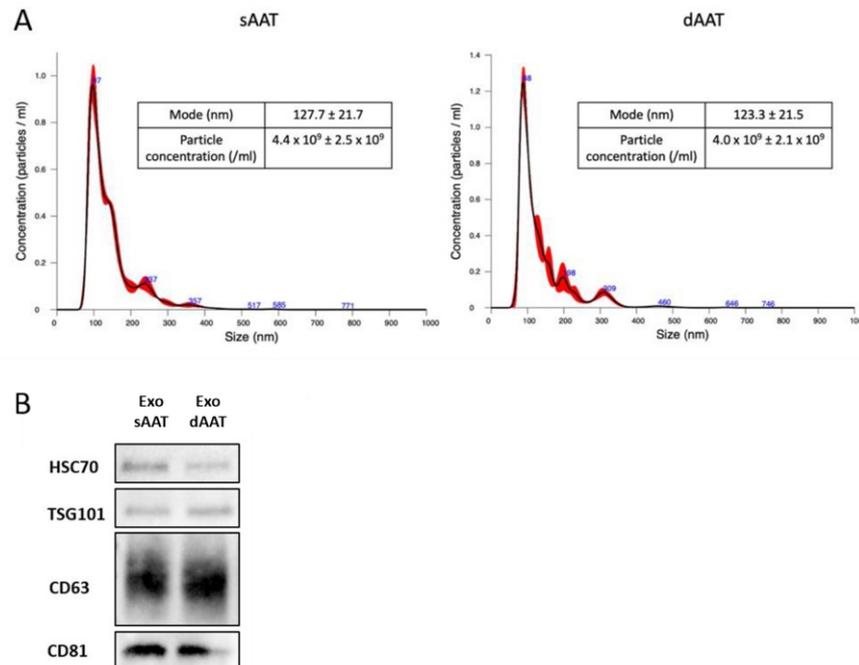


Figure 4. Characterization of exosomes isolated from sAAT and dAAT AD-MSCs. (A) Nanosight analysis of the size distribution of particles (exosomes) isolated from the culture supernatant of AD-MSCs. Particle distribution, mean, modal size, and particle concentration for the supernatant of AD-MSC sAAT (left) and dAAT (right) ($n \geq 3$). (B) Western blot analysis of exosome markers. The exosomes used were derived from AD-MSCs from passage 1 to passage 3 and technical replicates were performed on AD-MSCs from the three donors ($n = 4$).

Overall, these results suggest that AD-MSCs exosomes at a concentration of 10 µg/mL do not exert any negative biological activity on endothelial function. We can also conclude that exosomes seem to be of more interest than the secretome that inhibited angiogenesis. These data also point to there being no difference between the two layers of the AT.

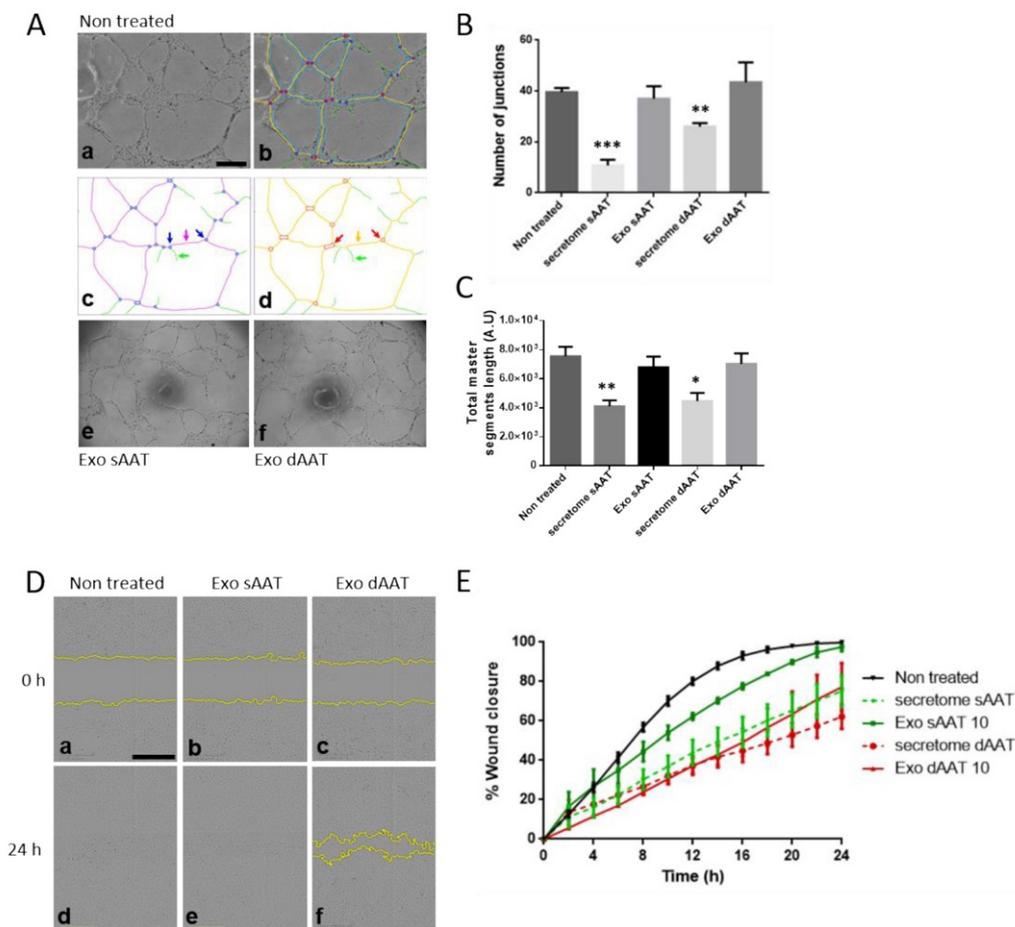


Figure 5. Analysis of angiogenic and migration potential of human endothelial cells in response to AD-MSCs exosomes. (A–C) HDMECs were plated on Geltrex® and cultured with sAAT- or dAAT-derived exosomes (10 µg/mL) or the AD-MSC total secretome. Representative pictures of tube formation were taken after 24 h and the network properties were quantified using the Angiogenesis Analyzer ImageJ plugin. (a) Initial image sample of non-treated HDMECs. (b) Network analysis with customized version of «Angiogenesis Analyzer». (c) Quantified vectorial objects: green arrow, «branch»; magenta arrow, «segment»; and blue arrows, «junctions». (d) Red arrows, «master junctions»; orange arrow, «master segment»; and green arrow, branch. (e,f) Network formation following exposure to exosomes from sAAT and dAAT, respectively. Tube formation ability was quantified by measuring (B) the number of junctions and (C) the total length of master segments over three experiments. Two-sample T-tests were performed against the untreated control. Data are presented as mean ± standard deviation (SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The unit of area and length is pixel (px). Scale bars, 500 µm. (D,E) The cell migration of HDMECs was measured using the wound healing assay (scratch assay). Once cells had reached 80% confluence in a 96-well plate, a scratch was made using the Sartorius wound maker tool, rinsed with PBS, and exposed to (D(a,d)) regular HDMEC media or (D(b,c,e,f)) exosomes or the secretome from either sAAT or dAAT, and plates were immediately placed in the Incucyte® biostation. Images were acquired with a 10× objective over 24 h. (D) Representative images of HDMECs at 0 and 24 h post scratch. Scale bars 500 µm. (E) Quantitative analysis of the relative scratch area over time obtained using Sartorius Live-Cell Analysis system.

3.6. Neurotrophic Effects of AD-MSC Exosomes from sAAT and dAAT

AD-MSCs are able to secrete various pro-neurogenic cytokines to enhance neuronal growth [41]. Since cutaneous innervation plays a known role in wound healing and skin repair, we investigated the effect of AD-MSCs exosomes and the AD-MSCs total secretome on human neurite outgrowth in physiological conditions as well as in a surrogate model of nerve damage. iSNs were obtained by sequential differentiation of hiPSC into neural crest cells and further as mature neurons expressing markers of the sensory lineage and able to release neuropeptide (Appendix A). We first assessed the effect of AD-MSCs exosomes and the total secretome on iSN neurite outgrowth. Neural crest cells were differentiated as 3D neurospheres and further replated on Geltrex-coated plates to allow for neurite outgrowth in response to NGF (positive control condition), 10 µg/mL of exosomes, or the total secretome from both AT layers. Cells were grown in these conditions for 5 days with images being taken on days 1 and 5. As shown in Figure 6, neurite processes already extended 24 h post plating on Geltrex; yet, at this stage, no statistical difference was found between NGF and exosomes, or the total secretome (Figure 6A,B). In contrast, on day 5, neurites had grown significantly in response to NGF (mean values ± SEM: 700.2 ± 25.58 vs. 196 ± 21.28 on day 1, $p < 0.0001$). In comparison to this control group, only dAAT exosomes showed the same efficacy in promoting neurite outgrowth (mean values ± SEM: 700.2 ± 25.58 vs. 749.0 ± 24.39, $p = 0.24$), while both secretomes and sAAT exosomes had a significantly smaller effect than NGF (mean values ± SEM: 700.2 ± 25.58 vs. 239.0 ± 7.761, $p < 0.0001$ for sAAT secretome; 320.8 ± 43.16, $p = 0.01$ for dAAT secretome, and down to 579.2 ± 30.23, $p < 0.0001$ for sAAT exosomes) (Figure 6B). Moreover, the results of this first experiment show that, similarly to NGF, only exosomes significantly increased neurite outgrowth on day 5. Conversely, the complete secretome of AD-MSCs from both layers had no effect on neurite growth on day 5. Interestingly, exosomes derived from dAAT had a significantly higher efficacy than those derived from sAAT on neurite growth on day 5 (749.0 ± 24.39 vs. 579.2 ± 30.23, $p = 0.02$).

We next examined the potential of AD-MSCs exosomes to regenerate neurites following in vitro neuronal injury since cutaneous innervation has a significant impact on a proper wound repair. The ability to re-plate differentiated cells after they have extended cellular processes within a complex network enables the study of neurite regeneration and synapse assembly in cells that are post-mitotic, as the neurites are initially damaged during re-plating. This serves as a model for investigating neurite regeneration following traumatic injury (e.g., spinal cord injury) or to identify growth-promoting molecules and screening therapeutic compounds. Differentiated iSNs detached using accutase could be successfully re-plated as a dissociated neuronal culture, with neuronal projections beginning to re-extend by 24 h (Figure 6C). Using a modified version of the Angiogenesis Analyzer Plugin, we quantified the total branching length of the neurites on day 1 and 5 following re-plating and exposure to NGF, AD-MSCs exosomes, or the total secretome (Figure 6D). On day 1, compared to NGF, both AT layer secretomes and exosomes induced a significant restoration of the neurite network (in pixels, mean values ± SEM: secretome sAAT vs. NGF: 60,300 ± 9502 vs. 31,539 ± 2642, $p = 0.0057$; exosomes sAAT: 76,591 ± 6832, $p < 0.0001$; secretome dAAT: 69,529 ± 6205, $p = 0.0002$; exosomes dAAT: 56,006 ± 10,291, $p = 0.0440$). On day 5, compared to NGF, only sAAT exosomes did not significantly improve neurite regeneration (in pixels, mean values ± SEM: secretome sAAT: 213,764 ± 3858 vs. NGF: 98,256 ± 24,331, $p = 0.0006$; exosomes sAAT: 119,376 ± 24,747, $p = 0.5597$; secretome dAAT: 216,472 ± 4907, $p = 0.0005$; exosomes: dAAT 182,328 ± 18,122, $p = 0.03344$). These results suggest that when neurons are injured, AD-MSCs exosomes and even the total secretome may be more favorable to neurite regeneration than addition of NGF alone. Finally, as with neuronal outgrowth, there is a tendency for a greater effect of dAAT exosomes compared to sAAT on nerve repair, though this was not statistically significant.

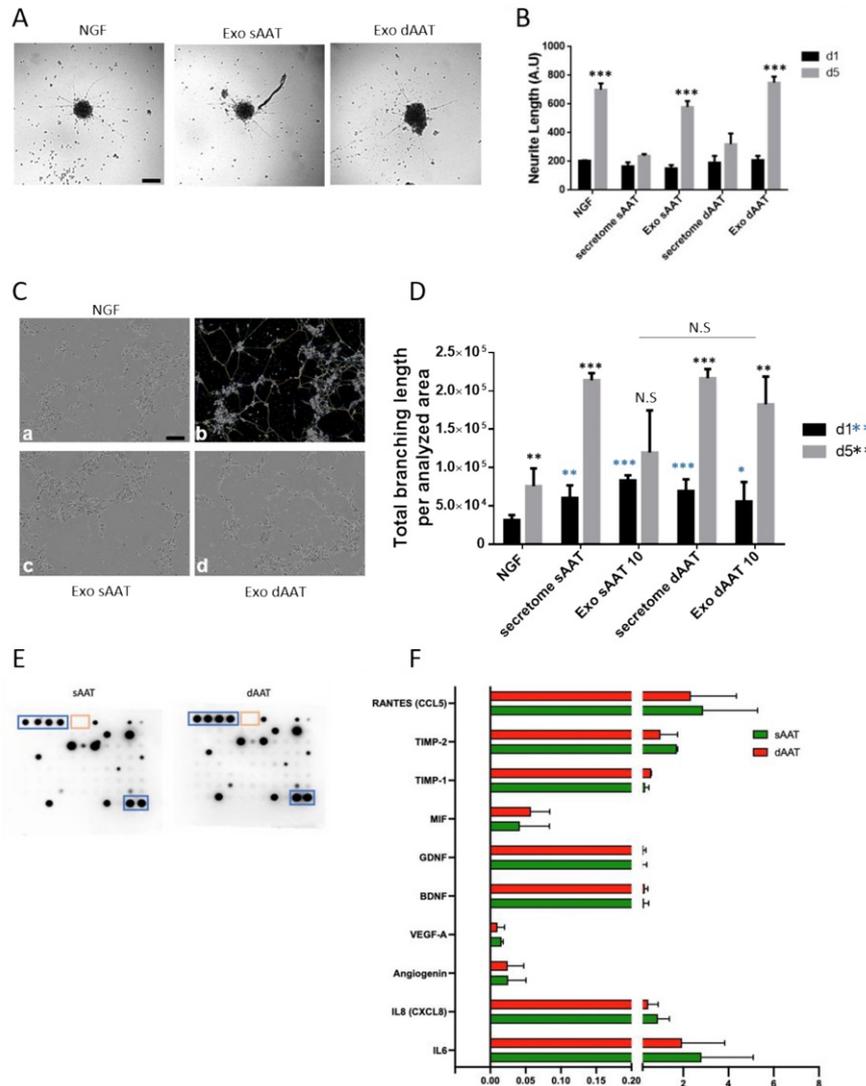


Figure 6. Neuroprotective properties of AD-MSCs exosome content. Assessment of neurite outgrowth (A,B) in human nociceptors grown as neurospheres and exposed for 5 days to either NGF, sAAT, and dAAT exosomes (10 µg/mL) or the total secretome. Phase contrast images of the spheres were taken (A) and neurite length was measured on day 1 and 5 post treatment (B). Scale bar, 150 µm. Restoration of neurite outgrowth (C,D) in human sensory neurons dissociated as single cells, and re-plated and exposed for 5 days to either NGF, sAAT, and dAAT exosomes (10 µg/mL) or the total secretome. (C) Representative pictures of the neuronal network were taken on day 1 and 5 and the network properties were quantified using a customized version of the Angiogenesis Analyzer ImageJ plugin. Scale bar, 100 µm. (a) Initial image sample of NGF-treated human sensory neurons. (b) Network analysis with customized version of «Angiogenesis Analyzer» and vectorial objects as defined in (A), and (c,d) neuronal network developed in response to sAAT and dAAT exosomes, respectively. (D) Quantification of the total branching length developed and normalized to the analyzed area. * shows significance versus the control group (NGF) on day 1 and * on day 5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (E) Cytokine antibody array membranes of sAAT and dAAT

exosome content with positive (blue square) and negative (yellow squares) internal controls. An equal amount of exosomal proteins was loaded for each membrane. (F) Quantification of the antibody array using ImageJ software.

To identify the exosome content that may be involved in neurite outgrowth and repair, the expression of 83 cytokines in the exosomes from both sAAT and dAAT was analyzed. The results in Figure 6E,F show the differences in expression of neurogenic and inflammation regulators between sAAT and dAAT exosomes. Interestingly, we found that exosomes from both layers have a very similar protein content, composed of neurotrophic factors, such as BDNF and GDNF, but also of factors such as RANTES that has been described to play a neurotrophic role in dorsal root ganglia sensory neuron migration and differentiation [42] and the macrophage migration inhibitory factor MIF, which is involved in neuroinflammation and also promotes outgrowth of neuronal processes [43].

These results suggest that exosomes from the AT layers have a neurotrophic content that could be beneficial to peripheral sensory neurons during regeneration.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to systematically and comprehensively analyze the human AD-MSCs secretome and exosomes from both sAAT and dAAT. The identification of novel aspects of the physiology of AD-MSCs and their secretome is of paramount importance for clinical practice in regenerative medicine. AD-MSCs have a unique immune modulatory function that makes them suitable for cellular therapy, including repairing tissue damaged by chronic inflammation or autoimmune diseases. However, several drawbacks have limited their therapeutic potential: those related to poor engraftment efficiency, non-specific differentiation, the potential risk of tumor formation, their short half-life, and difficulty in quality control.

In this study, two surgical indications were selected to recover AT: post-bariatric surgery or breast reconstruction where an abdominal harvest is necessary (so-called DIEP). The main originality of this study lies in the comparison of cells derived from the two layers of AT, necessitating the use of fresh tissue samples rather than tissue extracted from liposuction. Although very commonly practiced in plastic surgery, the liposuction procedure does not permit the operator to distinguish between the two layers, leaving uncertainty about the nature of the tissue removed. Additionally, studies have previously reported that there was no difference in the culture and characteristics of AD-MSCs derived from several harvesting techniques (liposuction, resection, and ultrasound) [25].

In our study, only one area was harvested for stem cell collection: the abdomen. We focused on this region since previous studies have shown that the abdomen was the richest anatomical area in terms of stem cells and that there were no morphological differences in cells between areas [25,26]. For clinical purposes, the abdomen is a preferred body area for plastic surgeons both for its ease of access and the reservoir it provides. In addition, Raposio et al. showed that AD-MSCs used in cell therapy had to be derived from subcutaneous adipose tissue to be of interest as an advanced therapy medicinal product (ATMP) [44].

Although the patient sample size was quite limited, they exhibited very similar characteristics, including relatively low weight loss. Also, patient comorbidities (history of breast cancer and Guillain–Barré syndrome) were for the most part negligible and did not affect the results obtained subsequently. It would be interesting in the future to conduct a similar study on a larger panel of patients to see if these results are confirmed. In such a study, it would also be important to match the results according to characteristics that may influence AD-MSC potential and their biological properties. Indeed, it is known that high BMI and significant weight loss can alter the morphological and metabolic appearance of stem cells.

The results of immunophenotypic characterization showed no significant difference between AD-MSCs from the two layers. Both were positive for CD73, CD90, and CD105 and negative for CD14, CD19, CD34, and CD45. These results are consistent with a previously published study [45]. The results obtained by flow cytometry confirmed the AD-MSC identity of the purified cells.

It is now accepted that the main interest in the use of these stem cells lies in their paracrine secretion: that is, their secretion of cytokines and growth factors and the release of extracellular vesicles such as exosomes. Indeed, even if 98% of AD-MSCs *in vitro* do not express the HLA-DR complex, they do show some immunogenicity that could decrease the effects of cell therapy. Studies have also shown that these cells are rapidly eliminated by the body (by phagocytosis and urinary elimination essentially), hence the importance of paracrine effects. For these reasons, the current focus is mostly on the study of cell secretions into the supernatant and of cytokines or EVs as a way to substitute for the cells themselves.

In terms of the proteome study, AD-MSCs from both layers of the AT showed similar patterns of cytokine expression, these being mainly involved in biological process such as inflammation, neoangiogenesis, and neuromodulation. These three major functions play crucial roles in skin healing and in various other physiological and pathological processes and are consistent with the widely reported functions of AD-MSCs. Comparison of the cytokine content obtained by an antibody array between the cell supernatant and exosome content did not show significant differences between the two layers of the AT. However, we found that the expression of neuromodulation-related cytokines, such as BDNF and GDNF, was higher in the exosomes (Figures 3B and 6F), which may explain their superior effects on axonal repair and neurite outgrowth. A limitation of this antibody array analysis is the presence of exosomes in the culture supernatant. It is possible that Proteome Profiler[®] also detects the content of exosomes, making it difficult to compare the content of the supernatant with that of the exosomes. However, we believe that the lipid bilayer of exosomes is sufficiently resistant to not to be permeabilized in our protocol, with the Proteome Profiler[®] membrane thus not showing the contents of vesicles. Indeed, it is reported in the literature that analysis of the protein content of exosomes requires the use of specific detergents, which were not employed in our study [46–48]. In addition, the thawing of cells and supernatants does not compromise exosome assays, with electron microscopy studies showing that EVs are still present after thawing. Conversely, there is no certainty about the effects of freezing on exosomes, and for this reason, we excluded previously frozen exosomes in this study. A future proteomic study will be performed to further investigate in more detail the Proteome Profiler[®] results.

We then looked at the production of exosomes by AD-MSCs of both AT layers. AD-MSCs from sAAT appeared to secrete slightly more exosomes than AD-MSCs from the deep AT (Figure 4A), though this difference was not significant.

One of the main interests for the use of AD-MSCs in cell therapy is their cytokine secretion and their secretion of exosomes. Here, we compared the effects of these two types of secretions on angiogenesis and neurite outgrowth, two key processes in skin regeneration. Some publications have previously reported that exosomes derived from AD-MSCs and bone marrow-MSCs have neuroprotective and immunomodulatory properties, attenuate neuroinflammation, promote neo-vascularization, induce neurogenesis, and reduce apoptotic loss of neural cells [49–52].

In our study, we chose to use HDMECs rather than HUVECs (human umbilical vein endothelial cells), because they are widely used in the bibliography [53], and, being derived from the dermis, are therefore more relevant for the study of skin healing. The number of junctions and the total length of the investigated segments (shown in Figure 5A–C) show the completeness of a formed vascular network. The main result in this part of the study was that the total secretome had a significant deleterious effect on the formation of a vascular network. Conversely, total exosomes had no effect compared to the control. Furthermore, no difference was found between the two separate layers of the AT for either the secretome or exosomes. These results differ from reports showing that AD-MSC-derived exosomes had the ability to promote angiogenesis [52,54]. However, most of these studies employed human umbilical vein endothelial cells, which are not representative of the cutaneous microvessel endothelium. For the secretome results, this can be attributed to the fact that the HDMEC growth medium was replaced largely by the AD-MSC supernatant.

Thus, there would be a lower concentration of growth factors in the AD-MSC supernatant (which is essentially AD-MSC culture medium) compared to the HDMEC culture medium. The second test on angiogenesis focused on the migration of endothelial cells after a mechanical wound or scratch test. Here, none of the conditions showed superiority to the control. However, only the sAAT condition allowed complete healing of the wound at 24 h. Moreover, we did observe that the secretome of the two layers surprisingly looked more interesting in this respect than the exosomes. Finally, the superficial layer appeared to show greater effects and be of more interest for both the secretome and exosomes, though these differences failed to reach significance. Further studies with a greater sample size may clarify this point.

Denervation of the skin has been shown to have a major role in delayed healing [55]. In our study, the choice of iSNs derived from hiPSCs had the advantage, compared to rodent sensory neurons, of being of human origin and to provide an alternative to animal experimentation. Regarding neurite outgrowth (Figure 6A,B), there is a beneficial effect observed on day 5 of all conditions, but only the exosomes had a statistically significant effect. Moreover, very interestingly, the effect for dAAT exosomes is significantly greater than for sAAT exosomes and appeared to be larger than for the NGF positive control. This could be explained by the fact that neurite outgrowth requires growth factors other than NGF, such as BDNF and GDNF, which are present in large quantities in the exosomes (Figure 6F). Finally, the effect of exosomes is also significantly greater than that of secretions for both tissue layers, and this could be explained by their protein content. Indeed, the proteins most involved in neurogenesis found using the proteome profiler are more highly expressed in exosomes. In the case of RANTES, for example, the expression was around 3 in exosomes compared to 2 in the secretome, and similar differences were seen for GDNF (1 vs. <0.1) and BDNF (1 vs. <0.05).

Our *in vitro* neuronal injury experiments showed that after neuronal damage, exposure to the secretome and exosomes of both layers promoted neurite growth in a highly significant manner compared to the control. Nevertheless, no significant superiority of exosomes from the dAAT over sAAT exosomes was observed. Finally, in contrast to neurite outgrowth, in this model, the effects of the secretome were more promising than those of exosomes. This difference might be explained by their cytokine profile, with greater anti-inflammatory and antioxidant components that are reported to contribute to neuronal repair.

5. Conclusions

This very initial study on three donors did not highlight major differences between the two layers of AT on the studied biological parameters. Direct extensions of this work could extend to the comparison of the proteome content and the effects of the full secretome and exosomes between different anatomical regions (abdominal versus thigh versus back...). Inclusion of additional samples would allow for reassessing the slight differences noted and especially to confirm if dAAT exosomes have a greater effect on neuromodulation than on neoangiogenesis. Overall, this study supports the concept that secretion products of AD-SMCs could play an important role in cellular bioengineering in the future.

Author Contributions: Conceptualization, J.L., A.D. and A.R.; methodology, J.L., G.C., A.D. and A.R.; validation, J.L., A.D. and A.R.; investigation, J.L., M.L., F.M., G.C., L.V., A.D. and A.R.; data curation, F.M., M.L. and A.R.; writing—original draft preparation, J.L. and A.R.; writing—review and editing, J.L., A.D. and A.R.; visualization, J.L., M.L., G.C., B.C., A.V., A.D. and A.R.; supervision, A.D. and A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by “Fondation des Gueules Cassées” with the call for proposals N°45-2022.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of University Hospital Dupuytren (protocol code ProDiCet, N° 312-2019-78 on 9 December 2019) for studies involving humans.

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Biscem technical platform (Limoges University, France) for the help and training received to perform flow cytometry (Ouk Catherine) and Incucyte use (Carion Claire), CAPTuR UMR Inserm 1308 (Limoges University, France) for providing technical support and advice related to exosome purification and characterization, and Silab (Brive-la-Gaillarde, France) for providing cellular material.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

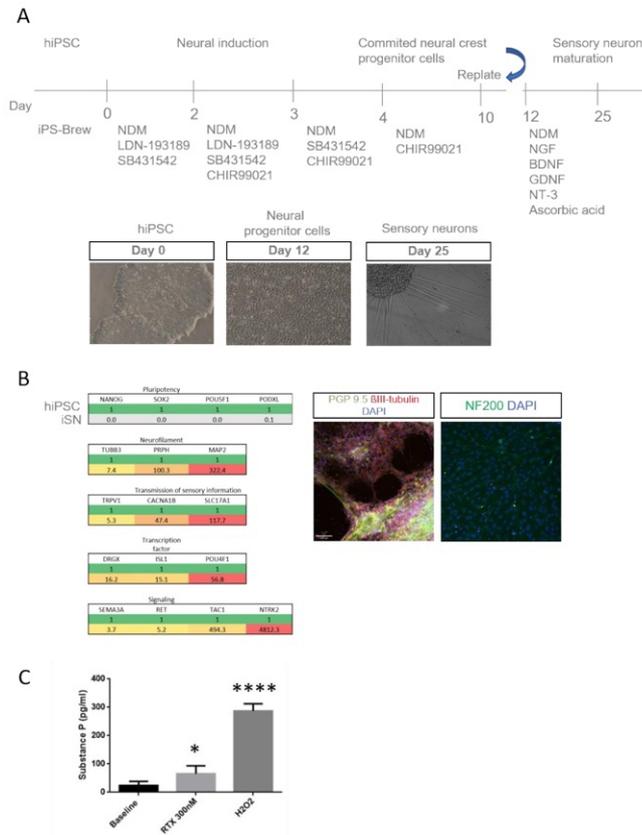


Figure A1. Characterization of human sensory neurons derived from hiPSC. (A) Differentiation timeline of iSNs with developmental steps (top), growth factors used at each step of differentiation (middle), and representative brightfield images of each step (bottom) are shown. (B) Phenotypical characterization of the iSNs populations obtained from day-12 NCPCs. The expression of markers (left) for the different stages was assessed by RT-qPCR comparing iSN d28 to hiPSC. Immunofluorescent (right) images of iSNs on day 20. For immunofluorescence, iSNs were fixed and stained for TUJ1 (red), NF200 (green), PGP 9.5 (green), and DAPI (blue). (C) Substance P release measured in the supernatant of iSN d25 after incubating for 45 min at 37 °C in the presence of RTX, resiniferatoxin (300 nM), or H202 (0.25%). Unpaired, two-tailed *t*-test, * *p* < 0.05, and **** *p* < 0.0001. *n* = 2–3 individual experiments from three separate sets of differentiations.

References

- Friedenstein, A.J.; Petrakova, K.V.; Kurolesova, A.I.; Frolova, G.P. Heterotopic transplants of bone marrow. analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **1968**, *6*, 230–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- da Silva Meirelles, L.; Chagastelles, P.C.; Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2204–2213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bertheuil, N.; Chaput, B.; Ménard, C.; Varin, A.; Garrido, I.; Grolleau, J.; Sensébé, L.; Watier, E.; Tarte, K. Les Cellules Stromales Mésochymateuses du Tissu Adipeux: Historique, Isolement, Propriétés Immunomodulatrices et Perspectives Cliniques. *Ann. Chir. Plast. Esthét.* **2015**, *60*, 94–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zuk, P.A.; Zhu, M.I.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 211–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Puissant, B.; Barreau, C.; Bourin, P.; Clavel, C.; Corre, J.; Bousquet, C.; Taureau, C.; Cousin, B.; Abbal, M.; Laharrague, P.; et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.* **2005**, *129*, 118–129. [[CrossRef](#)]
- Olmo, D.G.; Guadalajara, H.; Rubio-Perez, I.; Herreros, M.D.; De-La-Quintana, P.; Garcia-Arranz, M. Recurrent anal fistulae: Limited surgery supported by stem cells. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 3330–3336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Granel, B.; Daumas, A.; Jouve, E.; Harlé, J.-R.; Nguyen, P.-S.; Chabannon, C.; Colavolpe, N.; Reynier, J.-C.; Truillet, R.; Mallet, S.; et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: An open-label phase I trial. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 2175–2182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zuk, P.A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D.A.; Huang, J.I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z.C.; Fraser, J.K.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 4279–4295. [[CrossRef](#)]
- Shen, W.; Wang, Z.; Panyanita, M.; Lei, J.; Sinav, A.; Kral, J.G.; Imielinska, C.; Ross, R.; Heymsfield, S.B. Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. *Obes. Res.* **2003**, *11*, 5–16. [[CrossRef](#)]
- Avelar, J. Regional distribution and behavior of the subcutaneous tissue concerning selection and indication for liposuction. *Aesthet. Plast. Surg.* **1989**, *13*, 155–165. [[CrossRef](#)]
- Chopra, J.; Rani, A.; Rani, A.; Srivastava, A.K.; Sharma, P.K. Re-evaluation of superficial fascia of anterior abdominal wall: A computed tomographic study. *Surg. Radiol. Anat.* **2011**, *33*, 843–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harley, O.; Pickford, M. CT analysis of fat distribution superficial and deep to the Scarpa's fascial layer in the mid and lower abdomen. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **2013**, *66*, 525–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lancerotto, L.; Stecco, C.; Macchi, V.; Porzionato, A.; Stecco, A.; De Caro, R. Layers of the abdominal wall: Anatomical investigation of subcutaneous tissue and superficial fascia. *Surg. Radiol. Anat.* **2011**, *33*, 835–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lockwood, T.E. Superficial Fascial System (SFS) of the Trunk and Extremities. *Plast. Reconstr. Surg.* **1991**, *87*, 1009–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sbarbati, A.; Accorsi, D.; Benati, D.; Marchetti, L.; Orsini, G.; Rigotti, G.; Panetti, P. Subcutaneous adipose tissue classification. *Eur. J. Histochem.* **2010**, *54*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gasparoni, C.; Salgarello, M. Rationale of subdermal superficial liposuction related to the anatomy of subcutaneous fat and the superficial fascial system. *Aesthet. Plast. Surg.* **1995**, *19*, 13–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boulet, N.; Estève, D.; Bouloumié, A.; Galitzky, J. Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients. *J. Physiol. Biochem.* **2013**, *69*, 575–583. [[CrossRef](#)]
- Cancello, R.; Zulian, A.; Gentilini, D.; Maestrini, S.; Della Barba, A.; Invitti, C.; Corà, D.; Caselle, M.; Liuzzi, A.; Di Blasio, A.M. Molecular and morphologic characterization of superficial- and deep-subcutaneous adipose tissue subdivisions in human obesity. *Obesity* **2013**, *21*, 2562–2570. [[CrossRef](#)]
- Golan, R.; Shelef, I.; Rudich, A.; Gepner, Y.; Shemesh, E.; Chassidim, Y.; Harman-Boehm, I.; Henkin, Y.; Schwarzfuchs, D.; Ben Avraham, S.; et al. Abdominal Superficial Subcutaneous Fat: A putative distinct protective fat subdepot in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 640–647. [[CrossRef](#)]
- Kohli, S.; Lear, S.A. Differences in subcutaneous abdominal adiposity regions in four ethnic groups. *Obesity* **2013**, *21*, 2288–2295. [[CrossRef](#)]
- Lundbom, J.; Hakkarainen, A.; Lundbom, N.; Taskinen, M.-R. Deep subcutaneous adipose tissue is more saturated than superficial subcutaneous adipose tissue. *Int. J. Obes.* **2013**, *37*, 620–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wan, D.; Amirlak, B.; Giessler, P.; Rasko, Y.; Rohrich, R.J.; Yuan, C.; Lysikowski, J.; Delgado, I.; Davis, K. The Differing Adipocyte Morphologies of Deep versus Superficial Midfacial Fat Compartments: A cadaveric study. *Plast. Reconstr. Surg.* **2014**, *133*, 615e–622e. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Markman, B.; Barton, F.E. Anatomy of the Subcutaneous Tissue of the Trunk and Lower Extremity. *Plast. Reconstr. Surg.* **1987**, *80*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baglioni, S.; Cantini, G.; Poli, G.; Francalanci, M.; Squecco, R.; Di Franco, A.; Borgogni, E.; Frontera, S.; Nesi, G.; Liotta, F.; et al. Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Choudhery, M.S.; Badowski, M.; Muise, A.; Pierce, J.; Harris, D.T. Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Stem Cell Utility Is Independent of Anatomical Harvest Site. *BioResearch Open Access* **2015**, *4*, 131–145. [[CrossRef](#)]
- Oedayrajsingh-Varma, M.; van Ham, S.; Knippenberg, M.; Helder, M.; Klein-Nulend, J.; Schouten, T.; Ritt, M.; van Milligen, F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 166–177. [[CrossRef](#)]

27. Brennan, K.; Martin, K.; Fitzgerald, S.P.; O'Sullivan, J.; Wu, Y.; Blanco, A.; Richardson, C.; Mc Gee, M.M. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1039. [[CrossRef](#)]
28. Osugi, M.; Katagiri, W.; Yoshimi, R.; Inukai, T.; Hibi, H.; Ueda, M. Conditioned Media from Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defects. *Tissue Eng. Part A* **2012**, *18*, 1479–1489. [[CrossRef](#)]
29. Mendt, M.; Kamekar, S.; Sugimoto, H.; McAndrews, K.M.; Wu, C.-C.; Gagea, M.; Yang, S.; Blanco, E.V.R.; Peng, Q.; Ma, X.; et al. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *J. Clin. Investig.* **2018**, *3*, e99263. [[CrossRef](#)]
30. Vizoso, F.J.; Eiro, N.; Cid, S.; Schneider, J.; Perez-Fernandez, R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1852. [[CrossRef](#)]
31. Sasaki, M.; Abe, R.; Fujita, Y.; Ando, S.; Inokuma, D.; Shimizu, H. Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 2581–2587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Carpentier, G.; Berndt, S.; Ferratge, S.; Rasband, W.; Cuendet, M.; Uzan, G.; Albanese, P. Angiogenesis Analyzer for Image—A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay”. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ankam, S.; Rovini, A.; Baheti, S.; Hrstka, R.; Wu, Y.; Schmidt, K.; Wang, H.; Madigan, N.; Koenig, L.-S.; Stelzig, K.; et al. DNA methylation patterns in human iPSC-derived sensory neuronal differentiation. *Epigenetics* **2019**, *14*, 927–937. [[CrossRef](#)]
34. Saito-Diaz, K.; Zeltner, N. A protocol to differentiate nociceptors, mechanoreceptors, and proprioceptors from human pluripotent stem cells. *STAR Protoc.* **2022**, *3*, 101187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mucci, S.; Rodriguez-Varela, M.S.; Isaja, L.; Ferriol-Laffouillere, S.L.; Sevlever, G.E.; Scassa, M.E.; Romorini, L. Protocol for morphometric analysis of neurons derived from human pluripotent stem cells. *STAR Protoc.* **2022**, *3*, 101487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Viswanathan, S.; Shi, Y.; Galipeau, J.; Krampera, M.; Leblanc, K.; Martin, I.; Nolta, J.; Phinney, D.G.; Sensebe, L. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT[®]) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* **2019**, *21*, 1019–1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kalluri, R.; LeBleu, V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* **2020**, *367*, eaau6977. [[CrossRef](#)]
38. Pegtel, D.M.; Gould, S.J. Exosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88*, 487–514. [[CrossRef](#)]
39. Heo, J.S.; Kim, S. Human adipose mesenchymal stem cells modulate inflammation and angiogenesis through exosomes. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 2776. [[CrossRef](#)]
40. An, Y.; Lin, S.; Tan, X.; Zhu, S.; Nie, F.; Zhen, Y.; Gu, L.; Zhang, C.; Wang, B.; Wei, W.; et al. Exosomes from adipose-derived stem cells and application to skin wound healing. *Cell Prolif.* **2021**, *54*, e12993. [[CrossRef](#)]
41. Laloze, J.; Fiévet, L.; Desmoulière, A. Adipose-derived mesenchymal stromal cells in regenerative medicine: State of play, current clinical trials, and future prospects. *Adv. Wound Care* **2021**, *10*, 24–48. [[CrossRef](#)]
42. Bolin, L.M.; Murray, R.; Lukacs, N.W.; Strieter, R.M.; Kunkel, S.L.; Schall, T.J.; Bacon, K.B. Primary sensory neurons migrate in response to the chemokine RANTES. *J. Neuroimmunol.* **1998**, *81*, 49–57. [[CrossRef](#)]
43. Chai, X.; Zhang, W.; Li, L.; Wu, Y.; Zhu, X.; Zhao, S. Profile of MIF in Developing Hippocampus: Association With Cell Proliferation and Neurite Outgrowth. *Front. Mol. Neurosci.* **2020**, *13*, 147. [[CrossRef](#)]
44. Raposio, E.; Ciliberti, R. Clinical use of adipose-derived stem cells: European legislative issues. *Ann. Med. Surg.* **2017**, *24*, 61–64. [[CrossRef](#)]
45. Sun, C.-K.; Yen, C.-H.; Lin, Y.-C.; Tsai, T.-H.; Chang, L.-T.; Kao, Y.-H.; Chua, S.; Fu, M.; Ko, S.-F.; Leu, S.; et al. Autologous Transplantation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Markedly Reduced Acute Ischemia-Reperfusion Lung Injury in a Rodent Model. *J. Transl. Med.* **2011**, *9*, 118. [[CrossRef](#)]
46. Osteikoetxea, X.; Sódar, B.; Németh, A.; Szabó-Taylor, K.; Pálóczi, K.; Vukman, K.V.; Tamási, V.; Balogh, A.; Kittel, Á.; Pállinger, É.; et al. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9775–9782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Blijdorp, C.J.; Tutakhel, O.A.Z.; Hartjes, T.A.; Bosch, T.P.P.v.D.; van Heugten, M.H.; Rigalli, J.P.; Willemsen, R.; Musterd-Bhaggoe, U.M.; Barros, E.R.; Carles-Fontana, R.; et al. Comparing Approaches to Normalize, Quantify, and Characterize Urinary Extracellular Vesicles. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2021**, *32*, 1210–1226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Yan, L.; Liu, G.; Wu, X. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells in mechanical environment show improved osteochondral activity via upregulation of lncRNA H19. *J. Orthop. Transl.* **2021**, *26*, 111–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Guo, S.; Perets, N.; Betzer, O.; Ben-Shaul, S.; Sheinin, A.; Michalevski, I.; Popovtzer, R.; Offen, D.; Levenberg, S. Intranasal Delivery of Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Loaded with Phosphatase and Tensin Homolog siRNA Repairs Complete Spinal Cord Injury. *ACS Nano* **2019**, *13*, 10015–10028. [[CrossRef](#)]
50. Harrell, C.R.; Volarevic, A.; Djonov, V.; Volarevic, V. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as New Remedy for the Treatment of Neurocognitive Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1433. [[CrossRef](#)]
51. Riazifar, M.; Mohammadi, M.R.; Pone, E.J.; Yeri, A.; Lässer, C.; Segaliny, A.I.; McIntyre, L.L.; Shelke, G.V.; Hutchins, E.; Hamamoto, A.; et al. Stem Cell-Derived Exosomes as Nanotherapeutics for Autoimmune and Neurodegenerative Disorders. *ACS Nano* **2019**, *13*, 6670–6688. [[CrossRef](#)]
52. Huang, J.-H.; Yin, X.-M.; Xu, Y.; Xu, C.-C.; Lin, X.; Ye, F.-B.; Cao, Y.; Lin, F.-Y.; McBride, J.D.; Rodriguez-Menocal, L.; et al. Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Attenuates Apoptosis, Inflammation, and Promotes Angiogenesis after Spinal Cord Injury in Rats. *J. Neurotrauma* **2017**, *34*, 3388–3396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kachgal, S.; Putnam, A.J. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis* **2011**, *14*, 47–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Han, Y.; Ren, J.; Bai, Y.; Pei, X.; Han, Y. Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2019**, *109*, 59–68. [[CrossRef](#)]
55. Ashrafi, M.; Baguneid, M.; Bayat, A. The Role of Neuromediators and Innervation in Cutaneous Wound Healing. *Acta Dermatovenereologica* **2016**, *96*, 587–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Discussion

L'objectif principal de cette étude était de comparer les effets des produits de sécrétion des AD-MSCs issues des deux couches du tissu adipeux sous-cutané (superficiel et profond) sur deux aspects centraux de la régénération cutanée : la neurogenèse et l'angiogenèse. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, il existe plusieurs avantages quant à l'utilisation des exosomes et du sécrétome par rapport aux cellules mères : pas de risque de thrombose, pas d'immunogénéité, possibilité d'utilisation en allogénique avec création d'une banque, même rôle que les cellules mères, possibilité de servir de transporteur de médicaments et enfin, pas de dégradation ou d'évacuation rapides après injection dans l'organisme. En effet, des études ont montré que les AD-MSCs sont rapidement éliminées par l'organisme, d'où l'importance d'utiliser plutôt leurs produits de sécrétions paracrines (Gnecchi et al., 2006).

Tout d'abord, l'analyse *Nanosight*TM des particules issues des AD-MSCs nous a permis de confirmer qu'il s'agissait bien d'exosomes et de valider ainsi les expériences et les futurs résultats de l'étude. Nous avons réalisé l'analyse *Nanosight*TM sur des échantillons frais ou congelés et la taille des particules et leur nombre ne variaient pas ; la congélation ne semble donc pas altérer les exosomes. En effet, les études sont contradictoires sur ce sujet et pourrait représenter un biais pour nos résultats. Certains pensent que la congélation-décongélation des exosomes pourraient favoriser leur agrégation, voire les dégrader, et donc diminuer la significativité des résultats. De plus, notre protocole d'extraction des exosomes est largement utilisé dans la littérature (B. Liu et al., 2021). Les premiers résultats de la caractérisation des exosomes au *Nanosight*TM puis de leur contenu protéique en dosage Bradford et enfin, plus précisément, de leur contenu cytokinique par *Proteome Profiler* n'ont pas montré de différence significative entre les exosomes des deux couches. Ainsi, les deux couches du TA semblent produire autant d'exosomes par AD-MSCs, avec des tailles et un contenu similaire. Grâce au *Proteome Profiler*, nous avons identifié des protéines impliquées dans trois grandes fonctions centrales mises en jeu dans la cicatrisation cutanée (néoangiogenèse, neuromodulation, immunomodulation) et dans divers autres processus physiologiques et pathologiques. En effet, l'angiogénine, le VEGF-A et l'IL-8 sont impliqués dans la néoangiogenèse (Cucci et al., 2021 ; Fousek et al., 2021 ; Stanca Melincovici et al., 2018). Le GDNF, le BDNF et l'IL-6 sont des neuromodulateurs (Ferrini et al., 2021 ; Heinrich et al., 2003). Enfin, CCL5, MIF, TIMP-1, TIMP-2, l'IL-6 et l'IL-8 sont des immunomodulateurs (Calandra & Roger, 2003 ; Fousek et al., 2021 ; Heinrich et al., 2003 ; Ries et al., 2007 ; Škuljec et al., 2011). Certaines études ont déjà montré la présence de molécules telles que le BDNF dans les exosomes (Gelle et al., 2021). Une étude protéomique a été initiée pour approfondir ces résultats et pour faire apparaître plus clairement d'éventuelles différences. Nous pourrions ainsi connaître avec plus de précisions s'il n'existe vraiment aucune différence de contenu des exosomes entre les deux couches du TA.

Ensuite, l'analyse du contenu cytokinique du surnageant de culture a également permis de montrer la présence de protéines d'intérêt. Ici non plus, nous n'avons pas observé de différence selon l'origine des cellules. La présence d'exosomes dans le surnageant de culture pourrait être une limite à cette analyse de profilage protéomique. En effet, on peut envisager que la membrane du *Proteome Profiler* fixe également le contenu des exosomes, ce qui ne permettrait pas de comparer efficacement la qualité de la sécrétion en cytokines dans le surnageant et dans les exosomes. Cependant, nous pensons que les exosomes sont suffisamment résistants pour ne pas être altérés par la manipulation. En effet, des études ont montré qu'il était nécessaire d'utiliser des détergeants spécifiques pour altérer la bicouche lipidique des exosomes et analyser leur contenu (Blijdorp et al., 2021 ; Osteikoetxea, Sódar,

et al., 2015 ; Yan et al., 2020). Leur intégrité ne permettrait donc pas à leurs cytokines d'être libérées et de se fixer à la membrane du *Proteome Profiler*.

Si nous décidons de comparer les profils cytokiniques des surnageants de culture et des exosomes, nous pouvons noter que certaines cytokines impliquées dans la neuromodulation sont davantage présentes dans les exosomes, ce qui pourraient expliquer leur effet supérieur sur la repousse axonale et la croissance neuritique.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux propriétés pro-angiogéniques des produits de sécrétion des AD-MSCs, un paramètre largement reporté dans la littérature (B. Liu et al., 2021 ; Tögel et al., 2007). Lors du scratch test, les *human dermal microvascular endothelial cells* (HDMECs) ont été placées dans l'enceinte Incucyte S3™ 24 heures afin d'attribuer le comblement de la blessure à la migration cellulaire et non à la prolifération car leur temps de doublement est supérieur à cette durée (de même pour les fibroblastes) (Lee et al., 2010). Les exosomes du sAAT permettaient la fermeture de la brèche au même titre que le milieu de croissance des HDMECs alors que les exosomes du dAAT et le surnageant de culture avaient un effet délétère sur cette fermeture. Pour le surnageant, on peut attribuer cela au fait que du milieu de croissance HDMECs a été remplacé par du surnageant (v/v). Ainsi, il y aurait moins de facteurs de croissance dans le surnageant des AD-MSCs (qui est essentiellement constitué de milieu de culture AD-MSCs) que dans le milieu HDMECs. Nous avons également observé la formation de pseudo-tubes sur matrice gélifiée, un modèle expérimental déjà établi dans l'étude des propriétés angiogéniques des HDMECs (B. Liu et al., 2021). Ici, les exosomes du sAAT et du dAAT ont permis la création d'autant de jonctions que la condition contrôle, c'est-à-dire le milieu de croissance des HDMECs. Les surnageants du sAAT et du dAAT ont eu un effet délétère que l'on peut justifier de la même façon que pour le scratch test. Ces résultats sont cohérents avec ce qui a été décrit dans la littérature, à savoir que les exosomes dérivés des AD-MSCs ont la capacité de promouvoir l'angiogenèse (Han et al., 2019). De plus, d'après nos résultats de *Proteome Profiler* sur le contenu des exosomes, nous n'avons pas observé de différences quant aux cytokines impliquées dans la néoangiogenèse entre les exosomes des deux couches. Ceci peut expliquer qu'il n'y ait pas de différences observées entre ces deux conditions lors de la réalisation du scratch test ou de la formation de pseudo-tubes sur matrice. Ainsi, les exosomes des deux couches semblent utilisables dans la cicatrisation cutanée, pour favoriser l'angiogenèse, mais ces résultats restent à approfondir.

Nous nous sommes également intéressés aux propriétés neurogéniques des produits des AD-MSCs. Nous avons tout d'abord réalisé un modèle d'axotomie en créant un dommage neuronal *in vitro*. En effet, la possibilité de détacher puis de réensemencer des cellules différenciées après qu'elles aient étendu des processus cellulaires au sein d'un réseau complexe, permet d'étudier la régénération des neurites et l'assemblage des synapses dans des cellules post-mitotiques. Lors du passage avec l'utilisation d'enzymes pour détacher les cellules, les prolongements neuritiques sont détruits mais peuvent se reformer lors du réensemencement. Il s'agit donc d'un modèle pertinent pour étudier la régénération des neurites à la suite d'une lésion traumatique de neurones sensoriels différenciés et pour identifier des molécules favorisant leur repousse. Nous observons au jour 5 que les iSNs incubés avec les exosomes du dAAT ont formé une longueur totale de branche supérieure à la condition contrôle NGF contrairement aux iSNs incubés avec les exosomes du sAAT. On observe donc une différence entre les AD-MSCs du sAAT et du dAAT avec un effet bénéfique des exosomes du dAAT sur les iSNs. En accord avec les résultats concernant l'angiogenèse, on peut choisir de se concentrer sur les exosomes (les surnageants avaient un effet délétère pour l'angiogenèse et ici, les effets du surnageant sont nettement moins importants que ceux des exosomes). L'étude des profils protéiques nous a montré que les exosomes étaient

davantage pourvus de cytokines impliquées dans la neuromodulation, expliquant ainsi la différence d'effets entre les exosomes et les surnageants de culture. De plus, des études ont déjà montré un effet bénéfique des exosomes issus de MSCs sur la neuritogenèse et la gestion de la douleur (Cata et al., 2022 ; B. Liu et al., 2021). De même, après incubation des neurosphères dans nos différentes conditions, au jour 5, celles soumises aux exosomes du dAAT ont une longueur moyenne de neurites supérieure à celles soumises au NGF ou aux exosomes du sAAT. Encore une fois, les exosomes de la couche profonde paraissent plus intéressants que ceux de la couche superficielle pour la neuromodulation.

Un autre aspect essentiel dans la régénération cutanée est l'apparition du processus douloureux ainsi que son évolution dans le temps. Les dommages des terminaisons nerveuses cutanées induisent un influx centripète (potentiel d'action) entraînant la douleur, mais aussi un influx centrifuge dans les terminaisons nerveuses voisines conduisant à la libération de substance P, qui maintient la douleur, et de médiateurs neuro-inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine et les prostaglandines qui initient le processus d'inflammation (Lebonvallet et al., 2018). Ainsi, les patients atteints de pathologies qui arrêtent ou ralentissent ces messages peuvent alors voir leurs blessures se cicatriser de manière pathologique (blessures retardées ou chroniques). Cependant, la douleur peut persister anormalement ou même apparaître lorsque la plaie est cicatrisée, ce qui incommode le patient et l'amène souvent à consulter un médecin. L'objectif de la médecine régénérative est donc de gérer cette douleur chronique afin d'améliorer la qualité de vie du patient et de rétablir la guérison physiologique.

Nous avons donc étudié la capacité des iSNs à relarguer des neuropeptides, de la substance P en particulier, en présence des sécrétions des AD-MSCs du dAAT et du sAAT. Un kit ELISA Substance P qui permet un immunodosage compétitif a été utilisé sur du surnageant de culture de neurones. Le surnageant a été récolté 45 minutes après que le milieu ait été complété ou non par des exosomes issus des AD-MSCs sAAT ou dAAT à la concentration de 90 µg de protéines par millilitre, ou par 300 nM de résinifératoxine. On constate qu'après stimulation des iSNs par des exosomes sAAT et dAAT, uniquement dans le cas des exosomes dAAT, la substance P n'est plus détectée par le kit qui a une limite de détection basse à 5,3 pg/mL. Cependant, elle est détectée à 30,8 pg/mL dans le surnageant des iSNs soumis aux exosomes sAAT et à 44,7 pg/mL dans le surnageant témoin des iSNs (Tableau 5). Elle est également détectée à 130,022 pg/ml dans le surnageant après stimulation par la résinifératoxine.

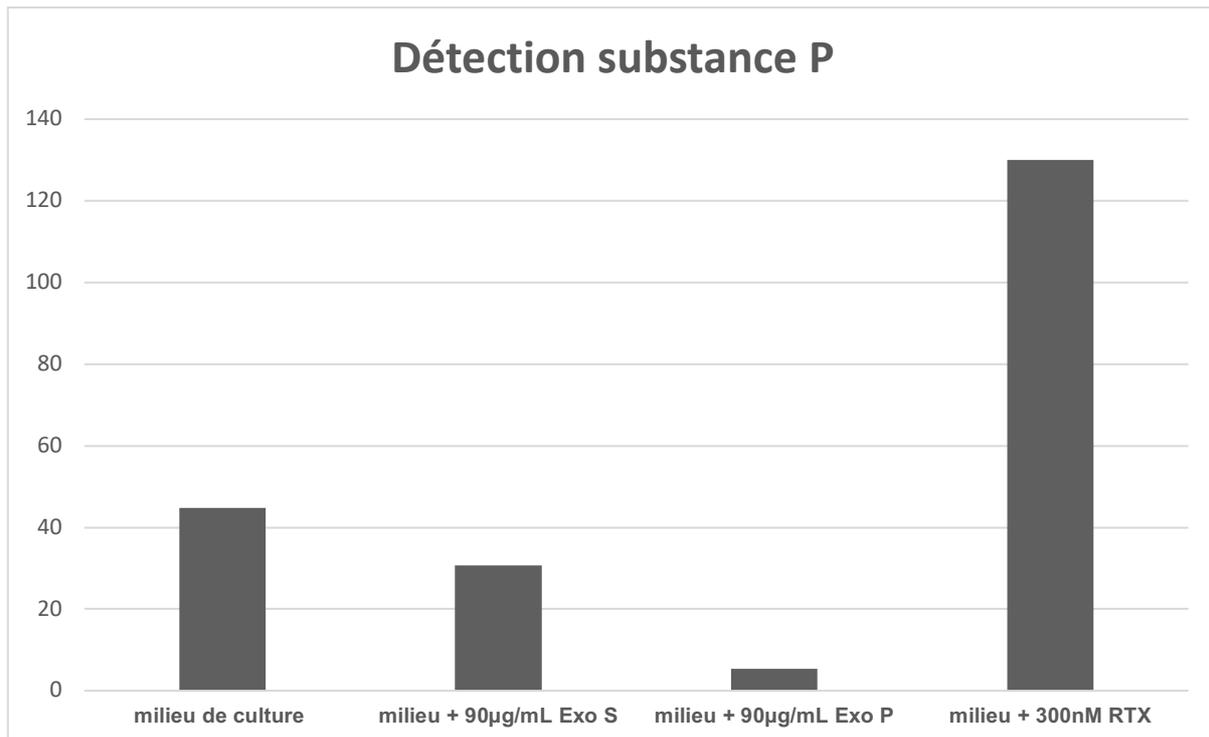


Tableau 5 : Test de détection de substance P en fonction de l'ajout d'exosomes des deux couches du TA sur un milieu de culture neuronal. N=1.

On retrouve ainsi le même effet bénéfique des exosomes du dAAT. Les exosomes du dAAT pourraient donc éventuellement inhiber la sécrétion de substance P et l'émission de signaux impliqués dans la douleur. On retrouve de la substance P après 45 minutes dans notre échantillon témoin, ce qui peut s'expliquer par les conditions expérimentales et l'induction d'un stress imposé aux cellules, qui ont été déplacées et maintenues à température ambiante pour les mesures. De plus, après stimulation par la résinifératoxine, un analogue de la capsaïcine capable d'activer le récepteur TRPV1 (*transient receptor potential vanilloïde 1*) impliqué dans la nociception (Aghazadeh Tabrizi et al., 2017), on retrouve encore davantage de substance P. Ce témoin positif prouve que nos cellules sont capables de répondre à un agent nociceptif.

Ainsi, les différents résultats d'axotomie, d'étude des neurosphères et de détection de substance P concernant la neuromodulation, montrent une tendance cohérente d'un effet plus important des exosomes du dAAT en comparaison avec ceux du sAAT.

Concernant les aspects fonctionnels des iSNs, plusieurs expérimentations restent à réaliser afin de vraiment comparer, de façon la plus exhaustive possible, les effets des produits de sécrétion sur la neuromodulation. Ceci permettrait de préciser le rôle et les effets éventuels de chaque couche. Nous souhaitons évaluer ainsi l'activité électrique des neurones à l'aide de puces MEAs (*microelectrode array*). De plus, la présence des neuromodulateurs contenus dans les exosomes pourrait être évaluée par dosage spécifique. De même, il faudrait réaliser des tests supplémentaires de relargage par les neurones d'autres neuropeptides comme le CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) en réponse à une exposition aux exosomes.

Concernant la migration des fibroblastes, nous n'avons pas observé d'effet délétère du sécrétome issu des AD-MSCs par rapport au témoin ou aux exosomes mais ces résultats sont préliminaires (n = 2) et restent à confirmer. De plus, nous avons regardé la fermeture de la brèche (scratch test) à 24 heures mais n'avons pas étudié la cinétique de fermeture sur un

temps plus court. D'autres études montrent un effet bénéfique des exosomes d'AD-MSCs sur la migration de fibroblastes ayant subi un scratch test (Hu, 2016).

Enfin, nous aimerions également tester les exosomes sur un système plus complexe que des types cellulaires isolés les uns des autres. Il serait envisageable de déposer des exosomes dans des chambres microfluidiques dans lesquelles nous avons le compartiment endothélial (HDMECs + fibroblastes) et le compartiment neuronal connecté grâce à des microcanaux au travers desquels les prolongements neuritiques peuvent passer (Figure 35). Dans le puit central, nous pourrions suivre si le réseau pseudo-vasculaire se met plus ou moins en place, plus ou moins vite, sous l'influence des cellules neuronales, et il est aussi possible d'étudier le relargage de substance P ou de CGRP par le compartiment neuronal sous l'influence des cellules endothéliales et des fibroblastes. L'influence des exosomes sur ces interactions pourraient être ensuite analysée.

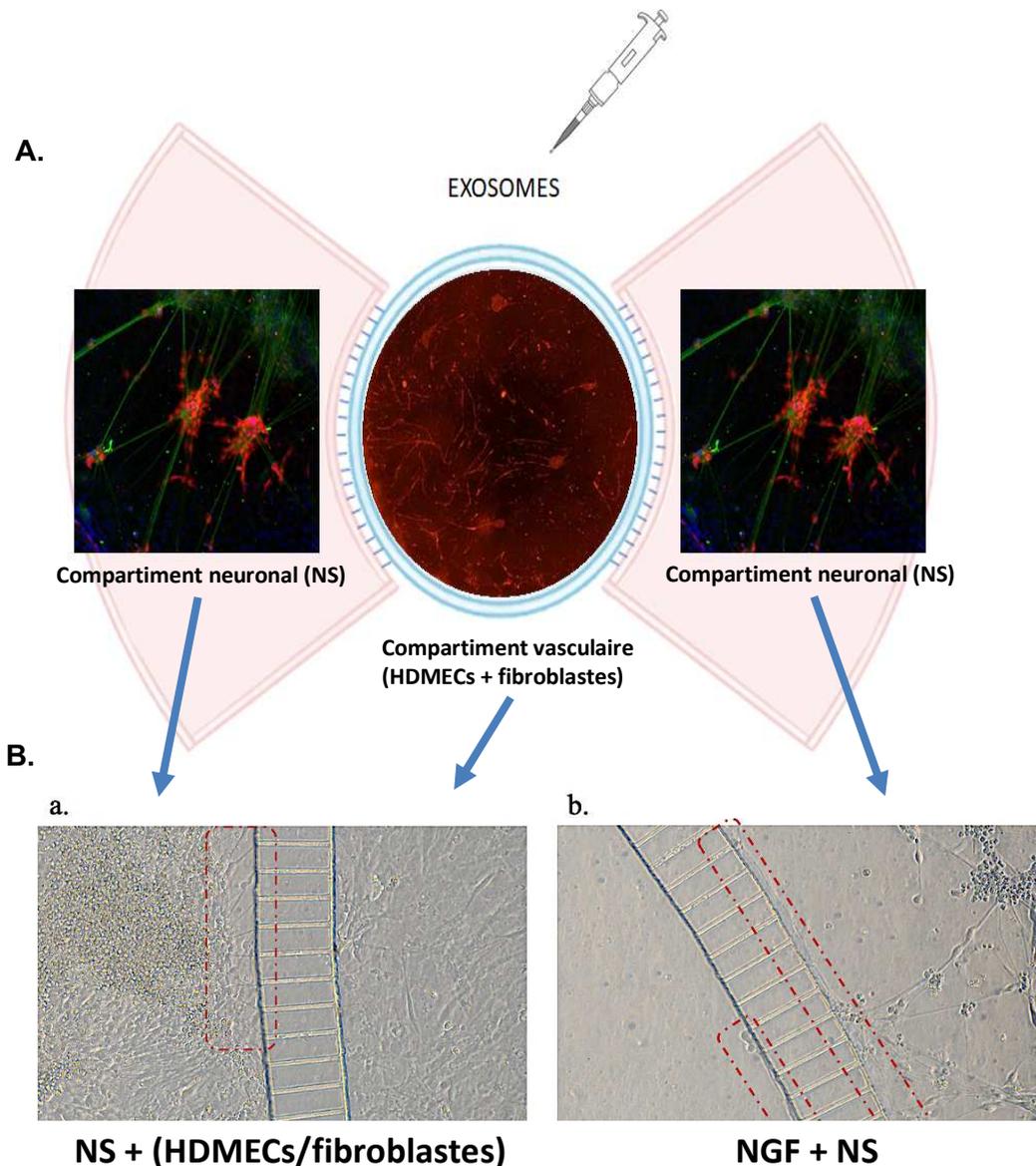


Figure 35 : Exemple de montage avec une chambre microfluidique.

- A. Le puit central sera composé du compartiment vasculaire (HDMECs + fibroblastes) et les puits latéraux seront eux composés du compartiment neuronal (IPs). Puis des exosomes seront rajoutés au puit central pour voir l'effet de ces derniers sur un système global comprenant toutes les cellules d'intérêts.
- B. Observation microscopique des cellules dans les chambres microfluidiques au jour 5 de la culture des NS avec co-culture HDMECs/fibroblastes (a.) ou NGF (b.). Grossissement 10x

Notre étude a montré qu'il existait des effets variables plus ou moins intéressants des exosomes des deux couches du TA. Nous avons souhaité ainsi regarder quels pouvaient être les mécanismes d'action des exosomes sur les cellules. Pour cela, une étude de l'internalisation des exosomes sur des fibroblastes a été menée. Après les centrifugations et les ultracentrifugations permettant d'isoler les exosomes, le culot obtenu a été repris dans 1 ml de diluant du kit PKH76 (Sigma-Aldrich™) et 6 ul de PKH76 (Sigma-Aldrich™). À environ 50% de confluence, les fibroblastes ont été mis en contact avec 90 µg de protéines par millilitre exosomes marqués avec du PKH76 (Sigma-Aldrich™) pendant 3 heures dans un incubateur.

Après saturation, un anticorps primaire anti-beta-actine (Sigma-Aldrich™) dilué au 1/200^{ème} a été incubé durant la nuit à 4°C. Il est utilisé afin de délimiter le cytoplasme des cellules en rouge et donc d'en déduire si les exosomes se trouvent à l'intérieur des cellules ou dans le milieu extracellulaire. Après l'incubation, 3 lavages au PBS ont encore été réalisés puis un anticorps secondaire AlexaFluor 594 anti-rabbit a été incubé pendant 1 heure. Enfin, 3 autres lavages ont été réalisés puis les lames ont été montées avec une lamelle et du DAPI, permettant de révéler les noyaux des cellules en bleu. Les cellules ont été observées au microscope confocal LSM 880 (Zeiss™). Nous pouvons voir très clairement que les exosomes sont parfaitement internalisés dans les cellules (Figure 36). Il est intéressant de noter que ces exosomes auraient même une tendance à se disposer de façon privilégiée autour des noyaux cellulaires. Cette expérience nous permet d'affirmer que les exosomes des AD-MSCs agissent grâce à une internalisation dans les cellules d'intérêts.

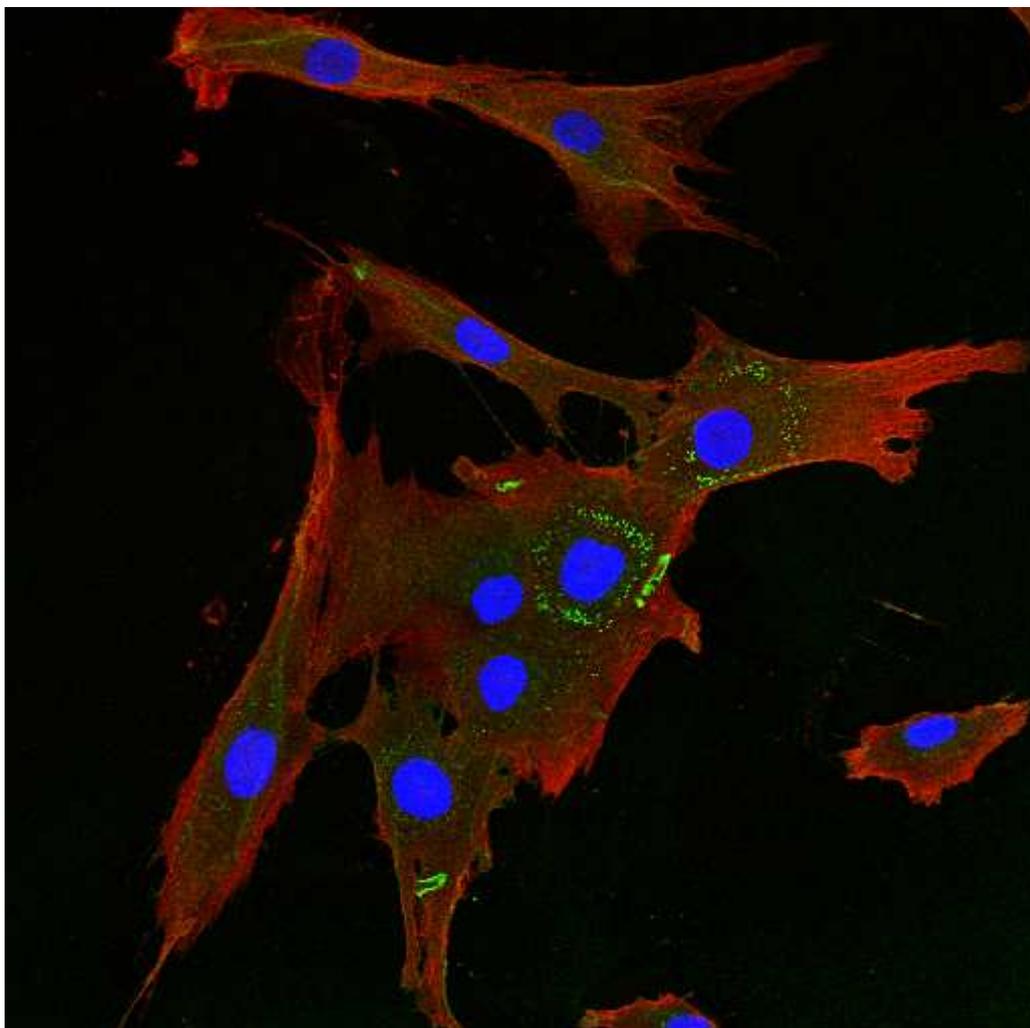


Figure 36 : Image au microscope confocal de l'internalisation des exosomes dans des fibroblastes. Le noyau et les membranes des fibroblastes sont marqués respectivement avec le DAPI (en bleu) et l'anticorps anti-béta-actine (en rouge). Les exosomes sont marqués au PKH76 (en vert).

Ainsi, nous voyons que les deux couches du TA possèdent des propriétés intéressantes quant à la régénération cutanée. Toutefois, les effets notamment sur l'angiogenèse et la neuromodulation ne sont pas complètement similaires entre ces deux couches. De plus, il existe de façon très intéressante des effets différents entre les cellules mères, les AD-MSCs issues des deux couches du TA et leurs produits de sécrétions, à savoir le surnageant total de culture ou les exosomes. Ces différents produits pourraient également avoir des intérêts beaucoup plus large en médecine régénérative : traitement de maladies inflammatoires, de neuropathies périphériques, de maladies immunitaires, amélioration de la prise de certains lambeaux en chirurgie plastique, optimisation du rendement lors d'un lipofilling... D'ailleurs sur ces derniers points, nous avons réalisé une méta-analyse ainsi qu'une revue qui montraient que l'ajout de la FSV voire d'AD-MSCs améliorait la survie des adipocytes greffés et par conséquent, le rendement du lipofilling (Laloze et al., 2017, 2018). Cette technique s'appelle *cell-assisted lipotransfer* ou CAL. De façon non significative, car seulement deux articles utilisaient des AD-MSCs, nous pouvions déjà dire que les cellules souches semblaient plus intéressante que la FSV en globalité. Grâce à notre étude, il serait intéressant de comparer la survie du lipofilling en ajoutant soit la FSV, soit les AD-MSCs, soit les exosomes. De plus, la couche superficielle serait plus pertinente, car plus adipogénique (résultats de master 2 non montrés ici).

REVIEW

Cell-assisted lipotransfer: Friend or foe in fat grafting? Systematic review and meta-analysis

J. Laloze^{1,2} | A. Varin² | J. Gilhodes³ | N. Bertheuil^{4,5} | J.L. Grolleau¹ | J. Brie⁶ | J. Usseglio⁶ | L. Sensebe² | T. Filleron³ | B. Chaput^{1,2} 

¹Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Ranguel Hospital, Toulouse, France

²STROMALab, Université de Toulouse, EFS, ENVT, INSERM U1031, Toulouse, France

³Biostatistic Unit, Institut Universitaire du Cancer Toulouse, Toulouse, France

⁴SITI Laboratory, Etablissement Français du Sang Bretagne, Rennes University Hospital, Rennes, France

⁵Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Hospital Sud, University of Rennes 1, Rennes, France

⁶Service de Chirurgie Maxillo-Faciale, réparatrice et stomatologie, CHU de Limoges, Toulouse, France

Correspondence

Dr Benoit Chaput, Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Ranguel Hospital, Avenue du Professeur Jean Poulhes, 31 000 Toulouse, France.

Email: benoitchaput31@gmail.com

Abstract

Autologous fat grafting is a common procedure for soft-tissue reconstruction but is associated with a graft resorption rate ranging from 20% to 80%. To improve the fat graft survival rate, a new technique, called cell-assisted lipotransfer (CAL), was developed. With CAL, fat is injected along with adipose-derived stromal cells that are assumed to improve fat survival rate. We conducted an evidence-based meta-analysis to evaluate the efficacy and safety of CAL as compared with conventional autologous fat grafting (non-CAL). The databases MEDLINE (via PubMed), Cochrane Library, EBSCO, Web of Science, and EMBASE were searched for reports of clinical trials, case series, and cohorts available from 2008 to 2016. We conducted a meta-analysis of the efficacy of CAL with data analysis concerning fat survival rate. The incidence of complications and the need for multiple procedures were evaluated to determine the safety of CAL. We identified 25 studies (696 patients) that were included in the systematic review; 16 studies were included in the meta-analysis to evaluate the efficacy of CAL. The fat survival rate was significantly higher with CAL than non-CAL (64% vs. 44%, $p < .0001$) independent of injection site (breast and face). This benefit of CAL was significant for only injection volumes <100 ml ($p = .03$). The two groups did not differ in frequency of multiple procedures after fat grafting, but the incidence of complications was greater with CAL than non-CAL (8.4% vs. 1.5%, $p = .0019$). The CAL method is associated with better fat survival rate than with conventional fat grafting but only for small volumes of fat grafting (<100 ml). Nonetheless, the new technique is associated with more complications and did not reduce the number of surgical procedures needed after the first fat grafting. More prospective studies are required to draw clinical conclusions and to demonstrate the real benefit of CAL as compared with common autologous fat grafting.

KEYWORDS

adipose-derived stromal cell, autologous fat grafting, cell-assisted lipotransfer, meta-analysis, reconstructive surgery, stromal vascular fraction

1 | INTRODUCTION

Autologous fat transfer or lipofilling is an unavoidable procedure in plastic surgery for soft-tissue correction, augmentation, and reconstruction. This procedure was first described over a century ago (Lexer, 1919), and recently, Coleman (2001) defined a standardized procedure that improved fat graft survival with a simplified process. Autologous fat is now considered an ideal filler because it is host compatible, is easily and repeatedly harvested with good results, and has a low complication rate (Coleman, 2001).

The main indications for lipofilling are the correction of tissue defects after cancer or radiotherapy, cosmetic breast augmentation or face filling, correcting post-traumatic defects, and treating facial atrophy for HIV-positive and antiretroviral-treated patients (Pu, Yoshimura, & Coleman, 2015). However, fat grafting can lead to several complications such as fat necrosis, calcifications, formation of cysts, and fat resorption that can be induced by hypoxia and tissue ischaemia. Indeed, 20% to 80% of resorption rates have been reported (Tiryaki, Findikli, & Tiryaki, 2011), which lead to multiple procedures and represent a major obstacle.

To increase fat graft survival and reduce complications, Matsumoto et al. (2006) proposed the idea of "cell-assisted lipotransfer" (CAL). In this technique, the lipoaspirate is enriched with a stromal vascular fraction (SVF) that contains all cells present in adipose tissue without adipocytes, that is, haematopoietic stem cells, endothelial cells, and stromal cells. Adipose-derived stromal cells (ASCs), which are accessible and abundant in adipose tissue (Zuk et al., 2002), share similar characteristics with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (Im, Shin, & Lee, 2005; Zuk et al., 2002). Indeed, ASCs, contained in SVF, might improve fat survival through different mechanisms. First, ASCs have immunomodulatory properties as well as angiogenic properties due to their ability to differentiate into endothelial-like cells (Miranville et al., 2004; Rehman et al., 2004). Second, they could release paracrine factors that could help the surrounding tissue resist hypoxia and ischaemia (Yoshimura, Suga, & Eto, 2009).

CAL was first used in humans by Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Hirohi, et al. (2008), who aimed to improve the efficacy of autologous fat grafting and minimize complications. Since this first application, many studies have evaluated the effect of CAL on the fat survival rate and on complications induced by this technique (Huang et al., 2016; Toyserkani, Quaade, & Sorensen, 2016; Zhou et al., 2016). However, the results obtained by the different studies were heterogeneous.

With this meta-analysis, we aimed to analyse all studies published on this topic to highlight the clinical advantage of the CAL technique in terms of efficacy, on the basis of fat survival rate and number of procedures needed to obtain optimal results, and in terms of safety, with the evaluation of complication incidence.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Search strategy

Two independent reviewers conducted a systematic review of related articles published between January 2008 and April 2016 in MEDLINE (via PubMed), Cochrane Library, EBSCO, EMBASE, and Web of Science databases. The following keywords were used for the search: "fat graft" or "fat transplantation" or "lipotransfer" or "lipofilling," or "lipograft" or "autologous fat" in combination with "SVF" or "stem cell" or "ADSCs" or "ASCs" or "ADRCs" or "cell assisted," or "progenitor-enriched" or "cell-enhanced." Grey literature was searched.

2.2 | Study selection

Article selection was based on an initial screening of titles and abstracts and was followed by a screening of the full texts. The eligibility criteria for studies were (a) fat grafting used for reconstruction or augmentation of soft tissues, (b) assessing the efficacy of fat grafting of SVF or ASC-enriched fat in humans, (c) with a complete follow-up (at least 3 months) and with an objective measure of the volume gain (MRI, computed tomography [CT], or 3D measurement), (d) inclusion of at least five cases, and (e) articles written in English.

2.3 | Data collection process and quality assessment

Data extracted were performed by two independent reviewers (J. L. and B. C.) who used a standard data collection form. Multiple surgical procedures were defined as the need for surgeons to perform repeated surgery to obtain patient and surgeon satisfaction.

Safety assessment was measured by evaluating complications, including cysts, calcifications, nodules, fibrosis, fat necrosis, and infection. Redness and temporary swelling immediately after the surgery or subcutaneous ecchymosis that resolved within 1 to 2 weeks were not considered complications.

Each study was assessed for study quality and level of evidence according to the Oxford Center for Evidence-Based Medicine 2011 guidelines (Howick et al., 2011). Two reviewers independently scored the study quality. Risk of bias and disagreements in scoring were discussed by all reviewers.

2.4 | Statistical analysis and validity assessment

The meta-analysis involved using R 3.2.2, package META (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Sixteen studies with sufficient and objective quantitative data were included in the meta-analysis to evaluate the efficacy of the CAL technique (CAL) as compared with classical fat grafting (non-CAL). The pooled estimates and 95% confidence intervals (CIs) for fat survival rate in the two groups were calculated by the logit transformation method and the DerSimonian and Laird random effects model (DerSimonian & Laird, 1986). To assess the heterogeneity of outcomes of the included studies, the inconsistency statistic (I^2) was calculated. Funnel plots were drawn to show publication bias. To minimize heterogeneity of the studies, subgroup analyses were performed. For all included studies, the incidence of complications and multiple surgical procedures were assessed by chi-squared test with STATA v12. To determine the factors that influenced the incidence of complications and multiple surgical procedures, subgroup analyses were performed to compare injection sites and stromal cell isolation methods with CAL. Statistical significance was defined with $p < .05$. Risk of bias assessment for randomized controlled trials involved using Revman 5.2 (The Cochrane Collaboration, 2012) according to the instructions for the Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias (Higgins et al., 2011).

3 | RESULTS

3.1 | Literature search

Database searches using predefined keywords yielded 4,398 articles. After adding articles from reference lists and removing duplicates, 2,799 potential articles were screened by reading the titles. From these, the abstracts and full text of 160 articles were screened. After a review of the full texts, 25 studies were included in the systematic review (Figure 1 and Table 1).

3.2 | Characteristics of included studies and quality assessment

The features of the 25 studies (696 cases) in the systematic review are in Tables 1–3. Concerning the efficacy of recipient sites, 10 studies

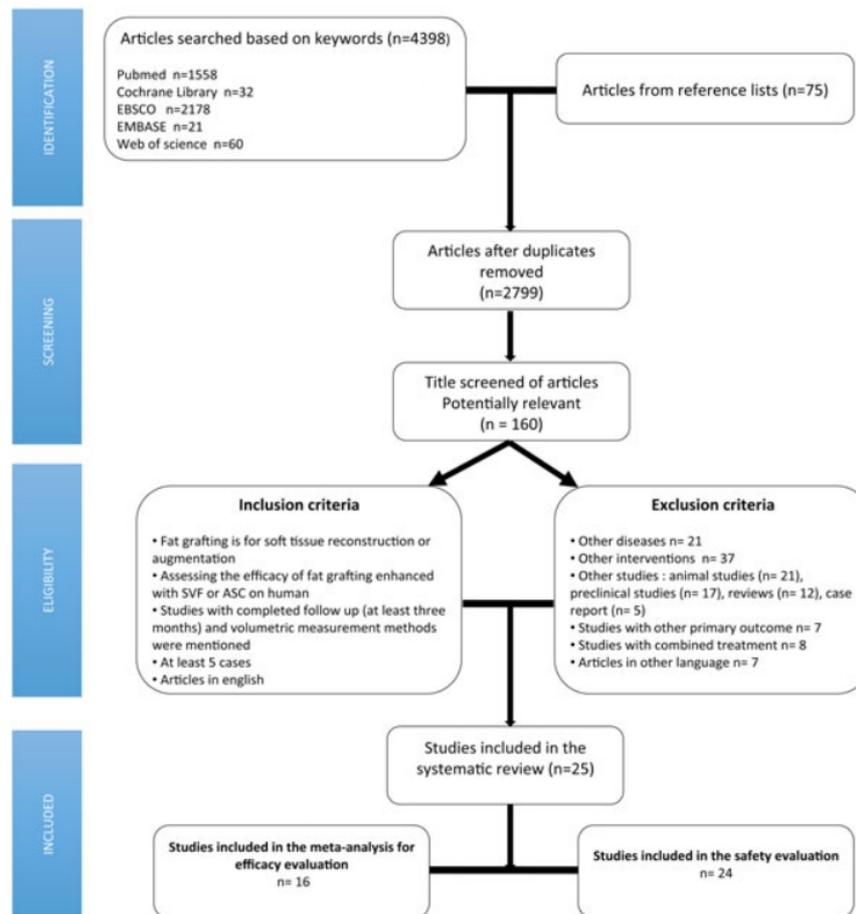


FIGURE 1 Flow chart of study selection. ASC = adipose-derived stromal cell; SVF = stromal vascular fraction

involved face filling (Chang, Li, Dong, Liu, & Lu, 2013; Gentile et al., 2014; Koh et al., 2012; Lee, Kim, Dhong, Park, & Yoon, 2012; Li et al., 2013; Sasaki, 2015; Schendel, 2015; Sterodimas, De Faria, Nicaretta, & Boriani, 2011; Tanikawa, Agueno, Bueno, Passos-Bueno, & Alonso, 2013; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al., 2008), 11 studies breast augmentation (Dos Anjos, Matas-Palau, Mercader, Katz, & Llull, 2015; Gentile et al., 2012; Gentile, Scioli, Orlandi, & Cervelli, 2015; Jung, Kim, & Song, 2016; Kamakura & Ito, 2011; Peltoniemi et al., 2013; Perez-Cano et al., 2012; Tissiani & Alonso, 2016; Wang, Luo, Lu, Fan, & Hu, 2015; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Hirohi, et al., 2008; Yoshimura et al., 2010), 3 studies multiple injection sites (Doi et al., 2013; Herold, Ueberreiter, Busche, & Vogt, 2013; Tiryaki et al., 2011), and 1 study upper-arm filling (Kolle et al., 2013). Fourteen had a non-CAL control group (Table 1; Chang et al., 2013; Gentile et al., 2012; Gentile et al., 2014; Gentile et al., 2015; Koh et al., 2012; Kolle et al., 2013; Lee et al., 2012; Li et al., 2013; Peltoniemi et al., 2013; Sasaki, 2015; Sterodimas et al., 2011; Tanikawa et al., 2013; Tissiani & Alonso, 2016; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al., 2008), and 11 did not have a control group (CAL alone; Doi et al., 2013; Dos Anjos et al., 2015; Herold et al., 2013; Jung et al., 2016; Kamakura & Ito, 2011; Perez-Cano et al., 2012; Schendel, 2015; Tiryaki et al., 2011; Wang et al., 2015; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Hirohi, et al., 2008;

Yoshimura et al., 2010). Most studies of CAL ($n = 23$) used freshly isolated SVF as a supplement (Chang et al., 2013; Doi et al., 2013; Dos Anjos et al., 2015; Gentile et al., 2012; Gentile et al., 2014; Gentile et al., 2015; Herold et al., 2013; Jung et al., 2016; Kamakura & Ito, 2011; Lee et al., 2012; Li et al., 2013; Peltoniemi et al., 2013; Perez-Cano et al., 2012; Sasaki, 2015; Schendel, 2015; Sterodimas et al., 2011; Tanikawa et al., 2013; Tiryaki et al., 2011; Tissiani & Alonso, 2016; Wang et al., 2015; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Hirohi, et al., 2008; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al., 2008; Yoshimura et al., 2010), and only two studies used enriched fat with in vitro-cultivated ASCs (Koh et al., 2012; Kolle et al., 2013). SVF was isolated manually in 13 studies (Chang et al., 2013; Koh et al., 2012; Kolle et al., 2013; Lee et al., 2012; Li et al., 2013; Schendel, 2015; Sterodimas et al., 2011; Tanikawa et al., 2013; Tissiani & Alonso, 2016; Wang et al., 2015; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Hirohi, et al., 2008; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al., 2008; Yoshimura et al., 2010), and an automatic isolation device was used in 10 studies (Doi et al., 2013; Dos Anjos et al., 2015; Gentile et al., 2012; Gentile et al., 2014; Herold et al., 2013; Jung et al., 2016; Kamakura & Ito, 2011; Peltoniemi et al., 2013; Perez-Cano et al., 2012; Sasaki, 2015). Two studies compared automatic and manual isolation (Gentile et al., 2015; Tiryaki et al., 2011). One study used manual isolation for fat

TABLE 1 Characteristics of the included studies

No. Study	Intervention	No. of patients	Age, year (M ± SD, range)	BMI, kg/m ² (M ± SD, range)	Recipient sites	No. of operations	Volume injected, ml (M ± SD, range)	Volumetric measurement method	Volume gain, ml (M ± SD, range)	% fat survival rate (M ± SD, range)	Follow-up, months (range)	Patients satisfaction
1	Tankawa et al. (2013)	7	12.1 ± 2.2 (9–15)	2 patients <20; 5 patients 20–25	Face	1	27 ± 7	CT scan	NA	88 ± 13	6	7 excellent results
2	Wang et al. (2015)	12	32 ± 7.3 (28–56)	22.1 ± 3.24	Breast augmentation	1	256 ± 36.27	MRI	125.35 ± 45.49	48.2 ± 16.7	6	92%
3	Peltoniemi et al. (2013)	10	48.5 ± 7.9 (29–58)	24.8 ± 3.9 (20.3–32.5)	Breast augmentation	1	Left: 289.6 ± 88.8; right: 279.3 ± 72.1 Left: 303.1 ± 27.6; right: 297.5 ± 27.6	MRI	Left: 147.7 ± 70.5; right: 147.1 ± 57.3 Left: 156.4 ± 26.9; right: 163.5 ± 24	Left: 49.2 ± 10; right: 51.8 ± 9.5 Left: 52 ± 10.3; right: 55.1 ± 7.6	6	Satisfied
4	Perez-Cano et al. (2012)	67	52 (37–68)	24.5 (17–31)	Partial mastectomy	2 in 36% of case	140 (35–250)	MRI	NA	NA	12	75%
5	Kolle et al. (2013)	10	28.4 ± 8.9 (22.34.8)	24.7 ± 2 (23.3–26.1)	Upper arm	1	28.2 ± 3.2 (25.94–30.46)	MRI	23 ± 3.2 (20.57–25.43)	80.9 ± 6 (76.6–85.2)	Average 4 (121 days)	NA
6	Gentile et al. (2012)	10	(19–60)	NA	Breast soft tissue defects	1	28.6 ± 3.3 (26.26–30.94)	MRI + Ultrasound	4.66 ± 2.1 (3.16–6.16)	16.3 ± 7.2 (11.1–21.4)	63	All satisfied
7	Jung et al. (2016)	10	34.4 ± 9.15 (19–41)	20.18 ± 2.84	Breast augmentation	1	Left: 196.2 ± 49.69; right: 246.2 ± 62.99	MRI	NA	Average 50%	12	NA
8	Steroidimas et al. (2011)	10	43.9 ± 16.9 (22–72)	21.5 (17.4–25.2)	Face	1	74.3 ± 47	Satisfaction	NA	NA	18	76% of good results
9	Schendel (2015)	10	46.2 ± 17.7 (25–70)	21.6 (17.1–25.6)	Face	2 in 30% of case and 3 in 40% of case	78.5 ± 49.4	3D computer volumetric analysis	NA	68	12.6	80% of good results
10	Lee et al. (2012)	9	43.3 ± 14.7 (29–68)	NA	Left face	1	NA	Physical + photos	NA	NA	3 (12 weeks)	>72%
11	Tiryaki et al. (2011)	29	NA	NA	Right face Breast: 17 face; 5, and others: 7	2 in 13.8%	(10–390)	Physical + photos	NA	NA	10	Average 60%

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

No. Study	Intervention	No. of patients	Age, year (M ± SD, range)	BMI, kg/m ² (M ± SD, range)	Recipient sites	No. of operations	Volume injected, ml (M ± SD, range)	Volumetric measurement method	Volume gain, ml (M ± SD, range)	% fat survival rate (M ± SD, range)	Follow-up, months (range)	Patients satisfaction
12 Sasaki (2015)	SVF + fat	9	65.5 (52–77)	22 (21–30.8)	Face	1	9 ± 2 (9–11)	3D analyse	NA	72.9 ± 50 (49–79)	12	90–95% satisfied
	Fat	92	60.5 (58–63)	22 (19.9–24.2)		1	8.5 ± 1 (8–10)			38.3 ± 12.9 (18–56)		
13 Koh et al. (2012)	ASCs + fat	5	28	NA	Face	1	29.9 ± 6.7	3D CT + 3D scan	18.1 ± 5.2	61.1 ± 13.7	15	90%
	Fat	5				1	12.5 ± 3.4		4.4 ± 1.9	34.3 ± 5.3		62%
14 Li et al. (2013)	SVF + fat	26	29.5 ± 6.8	NA	Face	1	17.5 ± 7.3	CT scan + photos	11.5 ± 5.3	64.8 ± 10.2	6	NA
	Fat	12	29.1 ± 6			1	16.2 ± 6.3		7.6 ± 3.3	46.4 ± 9.3		NA
15 Chang et al. (2013)	SVF + fat	10	27.5 (19–35)	NA	Face	2 in 30%, 3 in 20%	34.4 ± 13.7	CT scan	NA	68.3 ± 1.7	18	NA
	Fat	10					38.2 ± 14.9			58.5 ± 1.3		
16 Herold et al. (2013)	SVF + fat	3	36 ± 16.6 (23–58)	NA	Scars wounds	1	90 (50–150)	Physical + photos	NA	NA	12 (8–15)	Satisfied
17 Dos Anjos et al. (2015)	SVF + fat high	56	39.36 ± 12.83	21.57 ± 1.75	Breast reconstruction	2 in 3.9%	270.74 ± 55.6	3D scan + MRI	NA	75	18	
	SVF + fat low	21	37.8 ± 18.89	21.59 ± 2.09			229.09 ± 63.42			50		
18 Yoshimura et al. (2010)	SVF + fat	15	37.1 ± 12.5	19.5 ± 1.4	Breast augmentation	1	Left: 259 ± 39; right: 268 ± 29	3D scan	Left: 143 ± 80; right: 155 ± 50	57 ± 29	12	1 (all patients were satisfied)
19 Kamakura and Ito (2011)	SVF + fat	20	35.6 ± 8.8 (21–52)	NA	Breast augmentation	1	Right: 244.9 ± 36.1 (166–330); left: 235.1 ± 34 (166–290)	MRI	NA	NA	9	75%
20 Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al. (2008)	SVF + fat	3	38.7 ± 8.1 (33–48)	NA	Face	1	100 ± 10	Photos	NA	NA	10	1 >80%; 2 in 60–80%; 1 in 60–80%; 2 in 40–60%
	Fat	3	46.3 ± 7.8 (42–55)			1	133 ± 104					Satisfied
21 Gentile et al. (2014)	SVF + fat	10	(23–67)	NA	Face	2 in 40%	NA	MRI + US	NA	63	12 (8–15)	Satisfied
	Fat	10								39		
22 Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al. (2008)	SVF + fat	40	35.8 ± 9.1 (20–62)	19.1–1.9 (16.8–27.5)	Breast augmentation	1	Left: 268.1 ± 47.6; right: 277.3 ± 39.1	3D scan	(100–200)	55 ± 26	6	Satisfied
23 Doi et al. (2013)	SVF + fat	42	43.2 ± 13 (20–66)	20 ± 2.4 (16.8–27.5)	24 breasts augmentation 3 breasts reconstruction 13 faces rejuvenation 2 faces reconstruction	1	217 ± 60	Physical + photos	NA	NA	(3–18)	Satisfied

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

No. Study	Intervention	No. of patients	Age, year (M ± SD, range)	BMI, kg/m ² (M ± SD, range)	Recipient sites	No. of operations	Volume injected, ml (M ± SD, range)	Volumetric measurement method	Volume gain, ml (M ± SD, range)	% fat survival rate (M ± SD, range)	Follow-up, months (range)	Patients satisfaction
24	Tissiani and Alonso (2016) Fat	8	49.75 ± 11.46 (36–69)	25.87 ± 3.51 (20.8–32.4)	Breast reconstruction	1	111.5 ± 22.8 (96–147)	MRI scan	55.4 ± 16.51 (31.73–76.09)	51.39 ± 18.53 (27.65–72.86)	36 (20–49)	Patients: score 8/10; surgeons: 2.3
25	Gentile et al. (2015) SVF + fat	11	49.63 ± 5.66 (41–58)	26.26 ± 2.38 (23.5–30.9)	Breast soft tissue defects	2	134.3 ± 40.8 (45–180)	MRI + photos	116.23 ± 108.49 (-12.3 to 406.48)	78.85 ± 74.87 (-27.33 to 276.51)	16 (8–30)	Patients: score 5/10; surgeons: 2.9
		50	(19–65)	NA			187 (110–250)		NA		12	
		10 (Celution)								63 ± 6.2		
		10 (Medikhan)								39 ± 3.5		
		10 (Fafstem)								52 ± 4.6		
		10 (Mystem)								43 ± 3.8		
		10 (manual)								39 ± 4.4		

Note. ASCs = adipose-derived stromal cells; BMI = body mass index; CT = computed tomography; MRI = magnetic resonance imaging; NA = not available; SVF = stromal vascular fraction; US = ultrasound.

grafts <100 ml (11 patients) and automatic isolation for fat grafts ≥100 ml (18 patients; Table 2; Tiryaki et al., 2011). We analysed 4 randomized controlled trials (Koh et al., 2012; Kolle et al., 2013; Sterodimas et al., 2011; Tanikawa et al., 2013), 11 clinical trials (Dos Anjos et al., 2015; Gentile et al., 2012; Gentile et al., 2014; Gentile et al., 2015; Jung et al., 2016; Kamakura & Ito, 2011; Lee et al., 2012; Peltoniemi et al., 2013; Perez-Cano et al., 2012; Schendel, 2015; Tissiani & Alonso, 2016), 5 cohort studies (Chang et al., 2013; Li et al., 2013; Tissiani & Alonso, 2016; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Hirohi, et al., 2008; Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al., 2008), and 5 case series (Herold et al., 2013; Sasaki, 2015; Tiryaki et al., 2011; Wang et al., 2015; Yoshimura et al., 2010). According to the Oxford Center for Evidence-Based Medicine 2011 guidelines (Howick et al., 2011), the levels of evidence were II for 3 studies, III for 16 studies, and IV for 6 studies (Table 3). Funnel plot analysis revealed no publication bias. Characteristics of the studies included in the meta-analysis are shown in Table 4.

3.3 | Validity assessment

On heterogeneity assessment, the inconsistency value (I^2) was 85% with CAL and 70.5% with non-CAL, which characterized heterogeneity across the 16 studies in the meta-analysis (Figures 2 and 3). Subgroup analysis allowed for minimizing the heterogeneity of the meta-analysis (Figures 2–4). Funnel plots (Figure 5a and 5b) demonstrated no publication bias in both groups. Risk of bias assessment conducted for the four randomized controlled trials is in the Supporting Information.

3.4 | Efficacy assessment

Our efficacy assessment focused on the fat survival rate, defined as the percentage of mean volume gain to mean volume injected. The fat survival analysis involved 16 eligible studies with scientific measurement of volume gain (by MRI, CT, or 3D measurement). The fat survival rate was significantly higher with CAL than non-CAL (64%, 95% CI [58, 69] vs. 44%, [38, 51]; $p < .0001$; Figures 2 and 3).

On subgroup analysis of recipient sites (Figures 2 and 3), fat survival rate was significantly higher with CAL than non-CAL for breast filling (mean injection volume 237.67 ± 64.2 ml: 61%, 95% CI [54, 67] vs. 45%, [37, 53]; $p = .0028$) and face filling (mean injection volume 39.56 ± 35.55 ml: 69% [60, 78] vs. 51% [41, 60]; $p = .007$). In the only study in which patients received fat grafting in the upper arm, the fat survival rate was 82% and 17% with CAL and non-CAL ($p < .0001$). The CAL technique increased the survival rate of fat regardless of recipient site (breast, face, and arm).

Considering that different stromal cell isolation methods may alter ultimate fat survival, we compared automatic isolation and manual isolation in CAL groups (Figure 4). Fat survival rates did not differ between automatic or manual isolation (62%, 95% CI [53, 70] vs. 66% [58, 74]; $p = .4585$).

We found a significant correlation between the injected volume and fat survival rate with CAL ($p = .0191$) but not non-CAL ($p = .3818$; Table 5). For injected volumes <100 ml, the difference was still significant with CAL ($p = .0300$) but not non-CAL and not with volumes ≥100 ml (Table 5).

TABLE 2 Details of adipose stem cell enrichment methods and fat centrifugation

No.	Study	Intervention	Cell concentration ($\times 10^5$ cells/ml fat aspirate) ($M \pm SD$, range)	Stem cell isolation method	Fat centrifugation
1	Tanikawa et al. (2013)	SVF + fat	5.7 \pm 5.7	Manual	700 g, 3 min
2	Wang et al. (2015)	SVF + fat	1	Manual	700 g, 3 min
3	Peltoniemi et al. (2013)	SVF + fat	NA	Automatic	NA
4	Perez-Cano et al. (2012)	SVF + fat	NA	Automatic	1,500 rpm, 5 min
5	Kolle et al. (2013)	ASCs + fat	200	Manual	3,000 rpm, 3 min
6	Gentile et al. (2012)	SVF + fat	0.5	Automatic	3,000 rpm, 3 min
7	Jung et al. (2016)	SVF + fat	2.63	Automatic	400 g, 5 min
8	Sterodimas et al. (2011)	SVF + fat	NA	Manual	1,200 g, 5 min
9	Schendel (2015)	SVF + fat	0.497	Manual	700 g, 5 min
10	Lee et al. (2012)	SVF + fat	NA	Manual	3,000 rpm, 3 min
11	Tiryaki et al. (2011)	SVF + fat	7 in 11 cases	Automatic in 18 cases manual in 11 cases	NA
12	Sasaki (2015)	SVF + fat	2 \pm 1.2 (1.7–3.2)	Automatic	1,200 g, 3 min
13	Koh et al. (2012)	ASCs + fat	3	Manual	3,000 rpm, 3 min
14	Li et al. (2013)	SVF + fat	NA	Manual	1,000 rpm, 3 min
15	Chang et al. (2013)	SVF + fat	10	Manual	1,000 rpm, 3 min
16	Herold et al. (2013)	SVF + fat	NA	Automatic	NA
17	Dos Anjos et al. (2015)	SVF + fat	5.83 (not raw lipoaspirate: fat washed)	Automatic	NA
18	Yoshimura et al. (2010)	SVF + fat	NA	Manual	700 g, 3 min
19	Kamakura and Ito (2011)	SVF + fat	3 (per g)	Automatic	NA
20	Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al. (2008)	SVF + fat	NA	Manual	700 g, 3 min
21	Gentile et al. (2014)	SVF + fat	0.5	Automatic	3,000 rpm, 3 min
22	Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al. (2008)	SVF + fat	NA	Manual	700 g, 3 min
23	Doi et al. (2013)	SVF + fat	7 \pm 3.5	Automatic	700 g, 5 min
24	Tissiani and Alonso (2016)	SVF + fat	11.1 \pm 18.3 (0.42–64)	Manual	750 g, 5 min
25	Gentile et al. (2015)	SVF + fat	NA	Automatic (Medikhan)	4,000 rpm, 8 min
				Automatic (Celution)	NA
				Automatic (Fatstem)	1,700 rpm, 10 min
				Automatic (Mystem)	NA
				Manual	NA

Note. ASCs = adipose-derived stromal cells; NA = not available; SVF = stromal vascular fraction.

3.5 | Multiple fat graft procedures

Overall, 56/656 patients (8.5%) required multiple fat graft procedures to obtain optimal results. The incidence of multiple procedures did not differ between the CAL and non-CAL groups (8.8% [40/452] vs. 7.8% [16/204]; $p = .783$). With facial fat grafting, the incidence did not differ between the groups (7.6% [9/119 multiple procedures] vs. 10.1% [16/158], $p = .461$). However, with breast fat grafting, the incidence of multiple fat graft procedures was higher but not significantly with CAL than non-CAL (9.6% [31/323] vs. 0% [0/36], $p = .057$; Figure 6a).

The stromal cell isolation method was not significantly associated with the incidence of multiple operations (9.7% for automatic isolation vs. 6.5% for manual isolation, $p = .188$).

3.6 | Safety assessment

We analysed the incidence of complications, including cysts, calcifications, nodules, fat necrosis, and infection. The mean follow-up duration

was 11.6 \pm 6.58 months. The total complication incidence was 6.3% (41/646). Overall, cysts were the most common complication (4.8%, 31/646), followed by fat necrosis (0.8%, 5/646), calcifications (0.5%, 3/646), and nodules (0.3%, 2/646). We found only one case of infection.

Twenty-four studies reported the incidence of complications with CAL versus non-CAL, which was significantly higher with CAL than non-CAL (8.4% [38/452] vs. 1.5% [3/194], $p = .0019$). The complication incidence by graft site was similar for the two groups (breast: $p = .336$ and face: $p = .509$). However, cyst formation occurred exclusively in patients who received breast filling, and the incidence of cyst formation was similar with CAL and non-CAL ($p = .491$; Figure 6b). With CAL, the complication incidence was not linked to the method of SVF isolation ($p = .377$). In addition, with CAL, the incidence of cyst formation was higher with automatic than manual isolation of SVF (6.9% vs. 1.6%, $p = .002$; Figure 6b). With CAL, the proportion of complications was higher with injection of fat volume ≥ 100 ml than < 100 ml ($p = .0067$). This difference was not found with non-CAL ($p = .2568$; Table 6).

TABLE 3 Study design and level of evidence

No.	Study	No. of patient	Study design	Level of evidence
1	Tanikawa et al. (2013)	14	Randomized prospective clinical trial	II
2	Wang et al. (2015)	12	Case series	IV
3	Peltoniemi et al. (2013)	18	Clinical trial	III
4	Perez-Cano et al. (2012)	67	Single-arm clinical trial	III
5	Kolle et al. (2013)	20	Randomized prospective clinical trial	II
6	Gentile et al. (2012)	20	Clinical trial	III
7	Jung et al. (2016)	10	Prospective trial	III
8	Sterodimas et al. (2011)	20	Randomized clinical trial	III
9	Schendel (2015)	10	Prospective clinical trial	III
10	Lee et al. (2012)	18	Clinical trial	III
11	Tiryaki et al. (2011)	29	Case series	IV
12	Sasaki (2015)	101	Prospective case series	III
13	Koh et al. (2012)	10	Randomized prospective clinical trial	II
14	Li et al. (2013)	38	Retrospective cohort	III
15	Chang et al. (2013)	20	Retrospective cohort	III
16	Herold et al. (2013)	3	Case series	IV
17	Dos Anjos et al. (2015)	77	Retrospective clinical trial	III
18	Yoshimura et al. (2010)	15	Case series	IV
19	Kamakura and Ito (2011)	20	Single-arm clinical trial	III
20	Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al. (2008)	6	Prospective cohort	III
21	Gentile et al. (2014)	20	Clinical trial	III
22	Yoshimura, Sato, Aoi, Kurita, Inoue, et al. (2008)	40	Retrospective cohort	IV
23	Doi et al. (2013)	42	Retrospective cohort	IV
24	Tissiani and Alonso (2016)	19	Prospective clinical trial	III
25	Gentile et al. (2015)	50	Prospective clinical trial	III

Note. Study design and level of evidence based on Oxford Center for Evidence-Based Medicine 2011 guidelines (Howick et al., 2011).

4 | DISCUSSION

4.1 | Cell-assisted lipotransfer

Currently, the use of CAL is not widespread because with the few available studies and low level of evidence of efficacy, many surgeons consider the procedure as having little or no effect. As well, the isolation of SVF or ASCs to enrich lipofilling presents a legal problem that is an obstacle in many countries. However, the interest in CAL is increasing with the publication of many articles

on the topic (Huang et al., 2016; Jotzu et al., 2011; Kuno & Yoshimura, 2015; Ma et al., 2015; Toyserkani et al., 2016; Zhou et al., 2016). Thus, we reviewed all clinical trials, cohort, and case series published on this topic between January 2008 and April 2016 to determine the efficacy and the safety of CAL as compared with conventional fat grafting.

Recently, Zhou et al. (2016) proposed a meta-analysis on this topic but had different conclusions, especially on increased fat survival rate after breast lipofilling. This difference is linked to the six studies added to our meta-analysis.

TABLE 4 Characteristics of the meta-analysis with CAL and conventional autologous fat grafting (non-CAL and NCAL)

	Fat survival rates			Impact of stromal cell isolation method on fat survival rate with CAL
	At different recipient sites with CAL	At different recipient sites with NCAL	CAL vs. NCAL	
No. of studies	1	10	16	16
Volume injected	2,458	1,128	3,586	2,458
Heterogeneity χ^2	.1694	.1045	.2248	.1694
Heterogeneity p	<.0001	.0004	<.0001	<.0001
Heterogeneity I^2 (%)	85	70.5	874	85
Modelling method	Random effects model	Random effects model	Random effects model	Random effects model
Overall fat survival rate (95% CI)	0.64 [0.58, 0.69]	0.44 [0.38, 0.51]	0.57 [0.52, 0.62]	0.64 [0.58, 0.69]
p between groups	.0531	.0106	<.0001	.4585

Note. CAL = cell-assisted lipotransfer; CI = confidence interval; NCAL = non-cell-assisted lipotransfer.

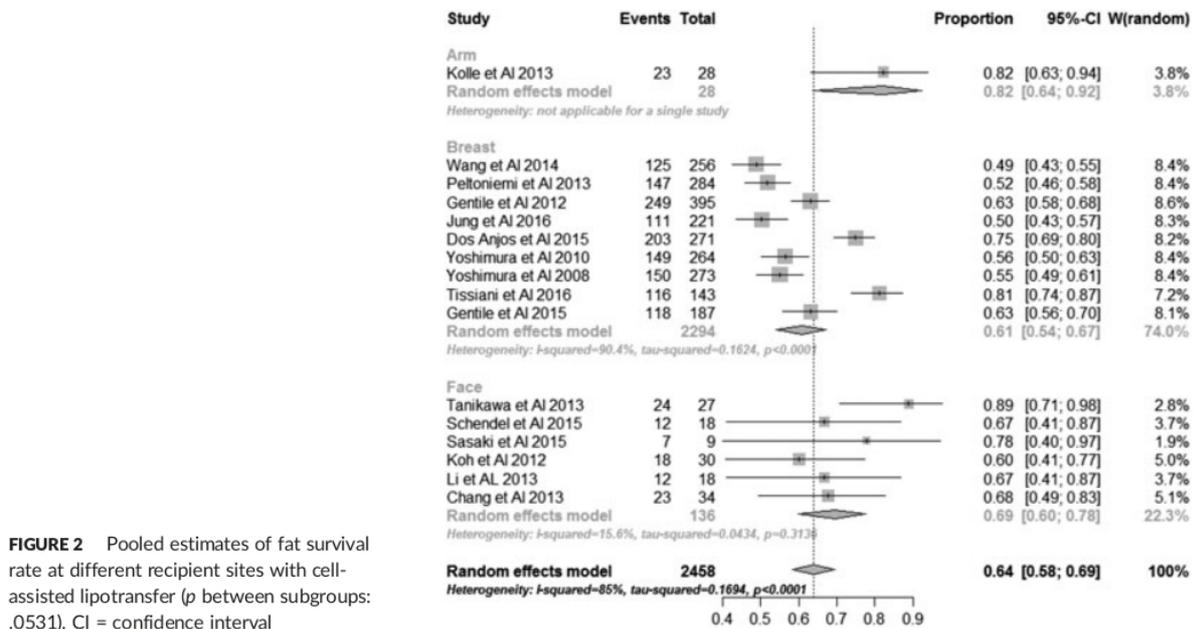


FIGURE 2 Pooled estimates of fat survival rate at different recipient sites with cell-assisted lipotransfer (p between subgroups: .0531). CI = confidence interval

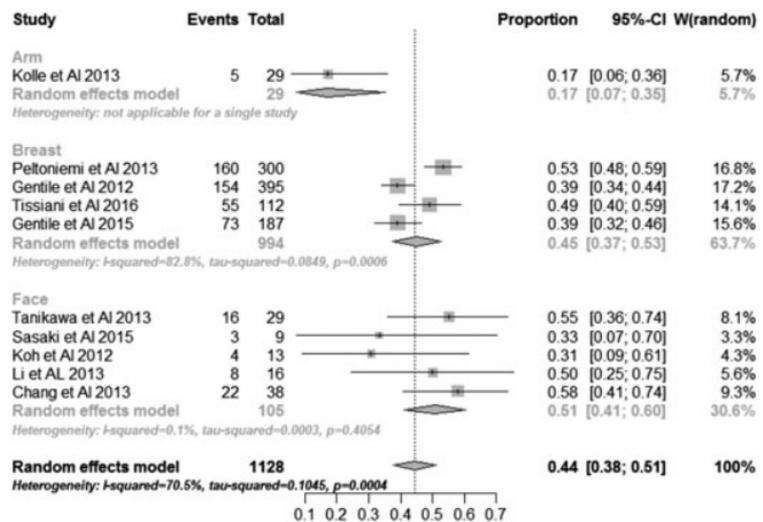


FIGURE 3 Pooled estimates of fat survival rate at different recipient sites with non-cell-assisted lipotransfer (p between subgroups: .0106). CI = confidence interval

4.2 | Meta-analysis outcomes

We analysed 16 articles to evaluate the efficacy of the CAL technique on the fat survival rate. Unlike in the Zhou et al. (2016) meta-analysis, the study of Gentile et al. (2014) was not included in our meta-analysis because of incomplete data concerning the injected volume and the volume gain. We highlighted that CAL significantly increased the fat survival rate after facial and breast fat grafting (Figures 2 and 3) but did not decrease the number of multiple surgical procedures as compared with non-CAL (Figure 6).

The incidence of complications was significantly higher with CAL than non-CAL (Figure 6). After screening the newly included articles (Doi et al., 2013; Dos Anjos et al., 2015; Gentile et al., 2015; Herold et al., 2013; Jung et al., 2016; Sasaki, 2015; Schendel, 2015; Tissiani & Alonso, 2016), we noted that all of the complications described

occurred with CAL. The volume of injected fat but not isolation method or technical surgery may explain this difference. To compensate for fat resorption, many surgeons tend to inject more fat. Unfortunately, with CAL, the greater the volume of grafted fat, the more frequent the complications. This finding was probably linked to the development of a local hypoxic state. Therefore, the increased volume of lipofilling in more recent studies may explain in part the increased complication rates. Nevertheless, the increased complication rate with conventional lipofilling is hardly explainable, with an overall increased incidence of cysts, which, in our opinion, could explain in part the volume maintenance with CAL (Figure 6). The increase in complication rate was specifically related to the injection of large volumes, particularly for the breast, and consisted essentially of an increased number of cysts. Indications for CAL should be limited to small volumes and not major reconstructions.

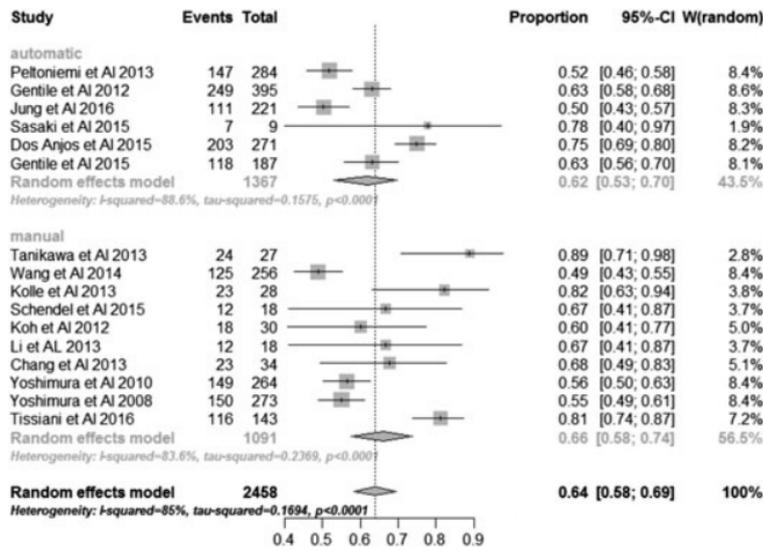


FIGURE 4 Subgroup analysis of the adipose stem cell isolation method with cell-assisted lipotransfer. Pooled estimates of fat survival rates for the automatic and manual methods of adipose stem cell isolation (p between groups: .4585). CI = confidence interval

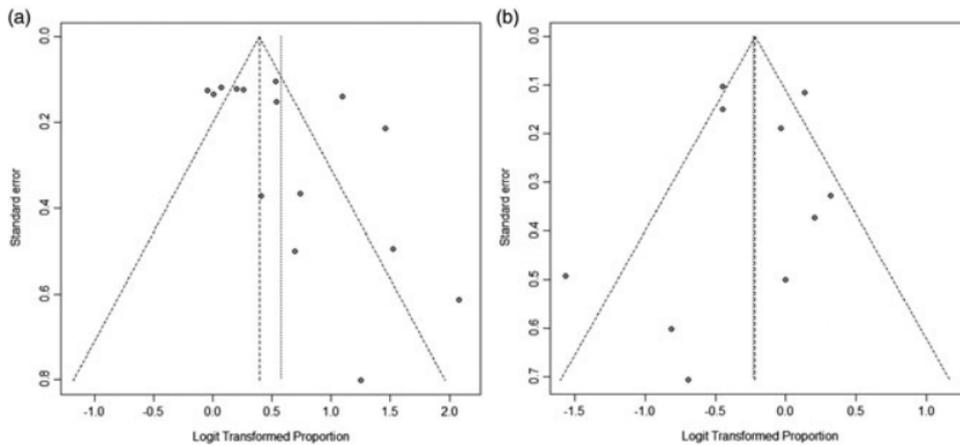


FIGURE 5 (a) Funnel plot analysis of publication bias for studies of cell-assisted lipotransfer (p for symmetry in funnel plot: .08123) and (b) non-cell-assisted lipotransfer (p for symmetry in funnel plot: .7793)

TABLE 5 Fat survival rate by volume injected with CAL and NCAL

				CAL		NCAL		Total	
	CAL	NCAL	Total	<100 ml	≥100 ml	<100 ml	≥100 ml	<100 ml	≥100 ml
Fat survival (%)	$\rho = -.5777$	$\rho = .3110$	$\rho = -.1022$	0.7 (0.6–0.9)	0.6 (0.5–0.8)	0.4 (0.2–0.6)	0.4 (0.4–0.5)	0.6 (0.2–0.9)	0.5 (0.4–0.8)
	$p = .0191$	$p = .3818$	$p = .6192$	$p = .0300$		$p = .8312$		$p = .3975$	

Note. Significance by the Kruskal–Wallis test (p value). ρ = Spearman correlation coefficient; CAL = cell-assisted lipotransfer; NCAL = non-cell-assisted lipotransfer.

We wondered whether the injected volume of fat was correlated with an increase in fat survival rate or complications. We found a significantly negative correlation between the injected volume and fat survival rate with CAL, which was not found with non-CAL (Table 5). Indeed, the greater the injected volume, the greater the reduction in fat survival rate. Moreover, with injected volume <100 ml, the difference was significant with only CAL and not non-CAL (Table 5). Therefore with CAL, concerning fat survival rate, small volumes of fat grafting seem more beneficial (Figure 6). The complication percentage was greater with ≥100-ml fat injection with CAL than

non-CAL (Table 6). Therefore, the use of CAL seems more efficient for injection of small volumes of fat (<100 ml).

Methods to measure the volume of injected fat and the volume gained differed among studies. Some used MRI and 3D measurement, whereas others used CT. Despite different measurement methods, several papers showed no significant difference in the obtained results. Although some authors consider MRI the gold standard for breast volume analysis, Dos Anjos et al. (2015) demonstrated that 3D scanning analysis did not differ from MRI analysis and could even be cheaper and more accessible for some practitioners. These data were confirmed

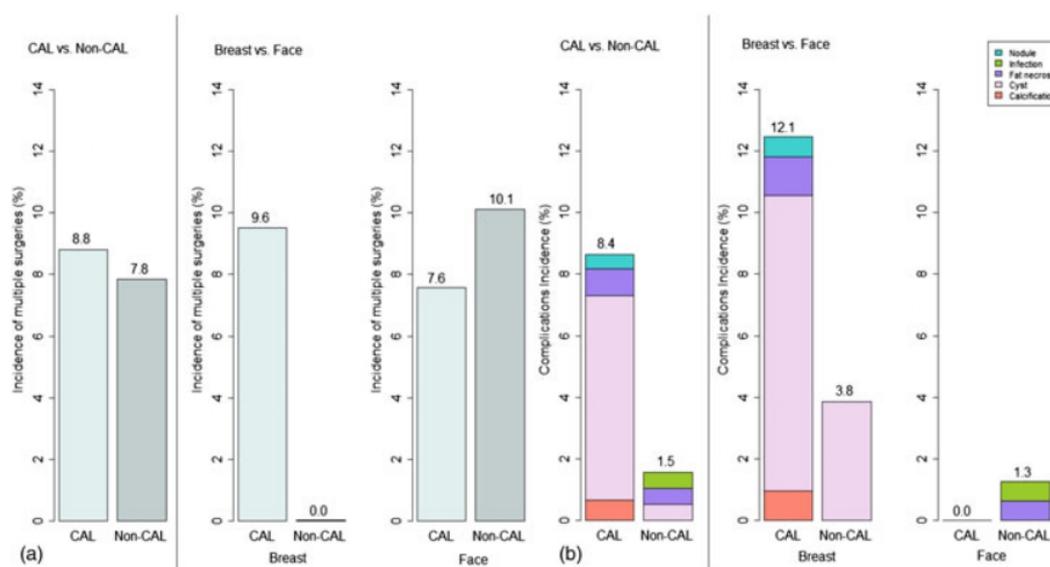


FIGURE 6 (a) Incidence of multiple fat graft procedure and (b) incidence of complications. CAL = cell-assisted lipotransfer

TABLE 6 Percentage of complications by volume injected with CAL and NCAL

	CAL		NCAL		Total	
	<100 ml	≥100 ml	<100 ml	≥100 ml	<100 ml	≥100 ml
Complications (%)	0.0 (0.0–0.0) <i>p</i> = .0067	10.0 (0.0–36.4)	0.0 (0.0–10.0) <i>p</i> = .2568	6.3 (0.0–33.3)	0.0 (0.0–10.0) <i>p</i> = .0031	10.0 (0.0–36.4)

Note. Significance of the Kruskal–Wallis test (*p* value). CAL = cell-assisted lipotransfer; NCAL = non-cell-assisted lipotransfer.

by Herold et al. (2013). Moreover, Zhou et al. (2016) found no significant difference between the techniques used to measure the fat survival rate.

The CAL technique was developed to increase fat engraftment and decrease the need for multiple procedures. Indeed, multiple procedures are frequent after conventional lipofilling and are associated with new hospitalizations, general anaesthesia, and also significant additional financial cost. Our study shows that CAL increased the fat survival rate (Figures 2 and 3), but the volume gain was not sufficient to satisfy both the patient and the surgeon in a single procedure or to avoid multiple surgeries (Figure 6).

The number of SVF cells added to the fat may define an optimal mix index for fat survival rate, but we found no correlation between number of SVF cells added to the fat and fat survival rate. These data agree with Jung et al. (2016), who evaluated the association between retained fat volume and the ratio of SVF cells to grafted fat volume and found no association at 3 months or 1 year. One reason for these results is the few patients examined (47). Indeed, only five studies in our review included all the necessary data (i.e., the injected volume with the gained volume and number of cells injected in the graft). The number of cells used by the investigators may have been insufficient for large volumes of fat grafting.

4.3 | Oncological safety

The link between the CAL technique and cancer is considered controversial. Indeed, several studies based on in vitro culture or animal

models demonstrated that ASCs may promote breast tumour growth and invasion (Donnenberg, Zimmerlin, Rubin, & Donnenberg, 2010; Eterno et al., 2014; Yu, Jun, Bae, & Jung, 2008) and increase the risk of cancer recurrence (Zhao, Dumur, Holt, Beckman, & Elmore, 2010). Two systematic reviews of human studies showed an increase in breast cancer incidence after fat grafting (Claro, Figueiredo, Zampar, & Pinto-Neto, 2012; Largo et al., 2014). In parallel, other recent studies have shown conflicting results (Kronowitz et al., 2016; Wazir et al., 2016). In this context, in January 2015, the French National Health Authority published official recommendations based on these data (Chaput, Mojallal, Vaysse, Lopez, & De Bonnecaze, 2015), with lipofilling authorized for non-risk populations. In our review, the only cancer that developed after fat grafting was found in the study of Perez-Cano et al. (2012), a pelvic metastasis unrelated to the use of CAL. No other sign of cancer was found. All cysts and nodules were reported to be benign. From this study, a statement about the development of cancer at this stage was not possible. However, ASCs must be used cautiously, especially after cancer remission. Hence, further studies with long-term follow-up are needed to assess the risk of cancer and complications with CAL, whether after breast or facial fat grafting.

4.4 | Limitations

Our study has some limitations. As a meta-analysis, we analysed available publications that summarized various technical procedures for preparing CAL that are highly variable and not standardized and are performed by different surgeons. Moreover, as well as fat processing,

steps in fat harvesting, such as infiltration solution, cannula size, and negative pressure, may affect outcomes (Gir et al., 2012). We found some heterogeneity within the included studies. Non-CAL patient samples were often few, which could limit the scientific analysis conclusions. The inconsistency value was 85% for CAL studies and 70.5% for non-CAL studies.

Moreover, the evaluation of patient and surgeon satisfaction is poorly described in many studies. Indeed, only a few articles described an objective method or a validated scale used to evaluate patient or surgeon satisfaction: Perez-Cano et al. (2012) used a 6-point Likert scale and a quality-of-life score, and Tissiani and Alonso (2016) used three tools for patient satisfaction evaluation: the Michigan questionnaire, a visual analogue scale, and a score scale. Future studies will require a better methodology on this point to allow for proper comparison.

The difference in the SVF isolation technique could also be a study bias. Indeed, 10 studies used an automatic isolation method and 13 a manual procedure; in two studies, both techniques were used. Tiryaki et al. (2011) advocated for automatic isolation with fat volume ≥ 100 ml and a manual one with volume < 100 ml. Gentile et al. (2015) compared different automatic isolation methods to the manual method. The optimal SVF extraction method was the automatic one ($63\% \pm 6.2\%$ of volume maintenance with Celution and $52\% \pm 4.6\%$ with the Fastem as compared with the manual method: $39\% \pm 4.4\%$). In 2013, Doi et al. (2013) found no difference between the automatic and manual methods in number of cells extracted from adipose tissue and cell viability.

More controlled and randomized clinical trials are needed to decrease these limitations and conclude more significantly on the safety of CAL. To reach this objective, these trials require standardized methods of SVF isolation and volume measurement and a constant percentage of cells associated with the graft (corresponding to the optimal mix index). Concerning oncological safety, the mean follow-up of the studies appears insufficient to properly evaluate this issue. A follow-up of at least 5 years is needed for future studies.

Ultimately, the two main clinical goals of the addition of ASCs in CAL—the augmentation of fat survival rate, which should decrease the number of multiple procedures, and the reduction of complications—seem to be compromised. Indeed, although CAL seems more effective than non-CAL with breast and facial fat grafting in terms of fat graft survival rate, there was a significant augmentation in complications, and there was no reduction of multiple fat graft procedures.

5 | CONCLUSION

This meta-analysis supports that CAL allows for a higher fat grafting survival rate than non-CAL. Unfortunately, CAL did not decrease the multiple procedures required and increased the complication rate, especially with breast injection and large volumes. However, the advantage of CAL appears only significant in the injection of small fat volumes, < 100 ml. More randomized and controlled clinical studies are needed to draw concrete conclusions for the use of CAL in the clinical setting. A standardization of procedures is needed in terms of volume evaluation and patient satisfaction measurement, and an optimal mix index must be defined. Ultimately, a prospective randomized

controlled study accounting for the limitations we mention with a longer follow-up is required to evaluate the oncological safety and the real efficacy of this procedure.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that there is no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J. L. contributed in the concept and design of the study, data acquisition, and interpretation and drafting revision and approval of the final manuscript to submit; A. V. in the concept and design of the study, data acquisition, critical revision, and approval of the final manuscript to submit; J. G. in the statistical analysis and interpretation; N. B. in the concept and design of the study; J. L. G. in the manuscript redaction and critical revision and approval of the final manuscript to submit; J. B. in the critical revision and approval of the final manuscript to submit; J. U. in the critical revision and approval of the final manuscript to submit; L. S. in the concept and design of the study and critical revision and approval of the final manuscript to submit; T. F. in the statistical analysis and interpretation; B. C. in the concept and design of the study, critical revision, drafting revision, and approval of the final manuscript to submit.

ORCID

B. Chaput  <http://orcid.org/0000-0002-8567-3479>

REFERENCES

- Chang, Q., Li, J., Dong, Z., Liu, L., & Lu, F. (2013). Quantitative volumetric analysis of progressive hemifacial atrophy corrected using stromal vascular fraction-supplemented autologous fat grafts. *Dermatologic Surgery*, *39*, 1465–1473.
- Chaput, B., Mojallal, A., Vaysse, C., Lopez, R., & De Bonnecaze, G. (2015). For the first time, a national health authority provides official recommendations for autologous fat grafting in the breast. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *136*, 713e–714e.
- Claro, F. Jr., Figueiredo, J. C., Zampar, A. G., & Pinto-Neto, A. M. (2012). Applicability and safety of autologous fat for reconstruction of the breast. *The British Journal of Surgery*, *99*, 768–780.
- Coleman, S. R. (2001). Structural fat grafts: The ideal filler? *Clinics in Plastic Surgery*, *28*, 111–119.
- DerSimonian, R., & Laird, N. (1986). Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clinical Trials*, *7*, 177–188.
- Doi, K., Tanaka, S., Iida, H., Eto, H., Kato, H., Aoi, N., ... Yoshimura, K. (2013). Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automated processing system: Bench and bed analysis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *7*, 864–870.
- Donnenberg, V. S., Zimmerlin, L., Rubin, J. P., & Donnenberg, A. D. (2010). Regenerative therapy after cancer: What are the risks? *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *16*, 567–575.
- Dos Anjos, S., Matas-Palau, A., Mercader, J., Katz, A. J., & Llull, R. (2015). Reproducible volume restoration and efficient long-term volume retention after point-of-care standardized cell-enhanced fat grafting in breast surgery. *Plastic and reconstructive Surgery Global open*, *3*, e547
- Etemo, V., Zambelli, A., Pavesi, L., Villani, L., Zanini, V., Petrolo, G., ... Amato, A. (2014). Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget*, *5*, 613–633.
- Gentile, P., De Angelis, B., Pasin, M., Cervelli, G., Curcio, C. B., Floris, M., ... Cervelli, V. (2014). Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: Basic and clinical evaluation for cell-based

- therapies in patients with scars on the face. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 25, 267–272.
- Gentile, P., Orlandi, A., Scioli, M. G., Di Pasquali, C., Bocchini, I., Curcio, C. B., ... Cervelli, V. (2012). A comparative translational study: The combined use of enhanced stromal vascular fraction and platelet-rich plasma improves fat grafting maintenance in breast reconstruction. *Stem Cells Translational Medicine*, 1, 341–351.
- Gentile, P., Scioli, M. G., Orlandi, A., & Cervelli, V. (2015). Breast reconstruction with enhanced stromal vascular fraction fat grafting: What is the best method? *Plastic and reconstructive Surgery Global open*, 3, e406
- Gir, P., Brown, S. A., Oni, G., Kashefi, N., Mojallal, A., & Rohrich, R. J. (2012). Fat grafting: Evidence-based review on autologous fat harvesting, processing, reinjection, and storage. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 130, 249–258.
- Herold, C., Ueberreiter, K., Busche, M. N., & Vogt, P. M. (2013). Autologous fat transplantation: Volumetric tools for estimation of volume survival. A systematic review. *Aesthetic Plastic Surgery*, 37, 380–387.
- Higgins, J. P., Altman, D. G., Gotzsche, P. C., Juni, P., Moher, D., Oxman, A. D., ... Sterne, J. A. (2011). The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ*, 343, d5928.
- Howick J, Chalmers I, Glasziou P, Greenhalgh T, Heneghan C, Liberati A, Moschetti I, Phillips B, Thornton H 2011. "The 2011 Oxford CEBM evidence levels of evidence (introductory document)." Oxford Centre for Evidence-Based Medicine.
- Huang, S., Zhao, W., Wang, Z., Tao, K., Liu, X., & Chang, P. (2016). Potential drawbacks in cell-assisted lipotransfer: A systematic review of existing reports (review). *Molecular Medicine Reports*, 13, 1063–1069.
- Im, G. I., Shin, Y. W., & Lee, K. B. (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 845–853.
- Jotzu, C., Alt, E., Welte, G., Li, J., Hennessy, B. T., Devarajan, E., ... Song, Y. H. (2011). Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 34, 55–67.
- Jung, H. K., Kim, C. H., & Song, S. Y. (2016). Prospective 1-year follow-up study of breast augmentation by cell-assisted lipotransfer. *Aesthetic Surgery Journal*, 36, 179–190.
- Kamakura, T., & Ito, K. (2011). Autologous cell-enriched fat grafting for breast augmentation. *Aesthetic Plastic Surgery*, 35, 1022–1030.
- Koh, K. S., Oh, T. S., Kim, H., Chung, I. W., Lee, K. W., Lee, H. B., ... Choi, J. W. (2012). Clinical application of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in progressive hemifacial atrophy (Parry-Romberg disease) with microfat grafting techniques using 3-dimensional computed tomography and 3-dimensional camera. *Annals of Plastic Surgery*, 69, 331–337.
- Kolle, S. F., Fischer-Nielsen, A., Mathiasen, A. B., Elberg, J. J., Oliveri, R. S., Glovinski, P. V., ... Drzewiecki, K. T. (2013). Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 382, 1113–1120.
- Kronowitz, S. J., Mandujano, C. C., Liu, J., Kuerer, H. M., Smith, B., Garvey, P., ... Valero, V. (2016). Lipofilling of the breast does not increase the risk of recurrence of breast cancer: A matched controlled study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 137(2), 385–393.
- Kuno, S., & Yoshimura, K. (2015). Condensation of tissue and stem cells for fat grafting. *Clinics in Plastic Surgery*, 42, 191–197.
- Largo, R. D., Tchang, L. A., Mele, V., Scherberich, A., Harder, Y., Wettstein, R., & Schaefer, D. J. (2014). Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to healthy breast tissue: A systematic review. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 67, 437–448.
- Lee, S. K., Kim, D. W., Dhong, E. S., Park, S. H., & Yoon, E. S. (2012). Facial soft tissue augmentation using autologous fat mixed with stromal vascular fraction. *Archives of plastic surgery*, 39, 534–539.
- Lexer E 1919. Die freien tansplantationen : 2 Teile : Verlag von Ferdinand Enke in Stuttgart.
- Li, J., Gao, J., Cha, P., Chang, Q., Liao, Y., Liu, C., ... Lu, F. (2013). Supplementing fat grafts with adipose stromal cells for cosmetic facial contouring. *Dermatologic Surgery*, 39, 449–456.
- Ma, L., Wen, H., Jian, X., Liao, H., Sui, Y., Liu, Y., & Xu, G. (2015). Cell-assisted lipotransfer in the clinical treatment of facial soft tissue deformity. *Plastic surgery (Oakville, Ont.)*, 23, 199–202.
- Matsumoto, D., Sato, K., Gonda, K., Takaki, Y., Shigeura, T., Sato, T., ... Yoshimura, K. (2006). Cell-assisted lipotransfer: Supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Engineering*, 12, 3375–3382.
- Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., & Bouloumie, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, 110, 349–355.
- Peltoniemi, H. H., Salmi, A., Miettinen, S., Mannerstrom, B., Saariniemi, K., Mikkonen, R., ... Herold, C. (2013). Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: A prospective comparative study. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 66, 1494–1503.
- Perez-Cano, R., Vranckx, J. J., Lasso, J. M., Calabrese, C., Merck, B., Milstein, A. M., ... Weiler-Mithoff, E. M. (2012). Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: The RESTORE-2 trial. *European Journal of Surgical Oncology*, 38, 382–389.
- Pu, L. L., Yoshimura, K., & Coleman, S. R. (2015). Fat grafting: Current concept, clinical application, and regenerative potential, part 1. *Clinics in Plastic Surgery*, 42, ix–ix.
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Claus, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., ... March, K. L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109, 1292–1298.
- Sasaki, G. H. (2015). The safety and efficacy of cell-assisted fat grafting to traditional fat grafting in the anterior mid-face: An indirect assessment by 3D imaging. *Aesthetic Plastic Surgery*, 39, 833–846.
- Schendel, S. A. (2015). Enriched autologous facial fat grafts in aesthetic surgery: 3D volumetric results. *Aesthetic Surgery Journal*, 35, 913–919.
- Sterodimas, A., De Faria, J., Nicaretta, B., & Boriani, F. (2011). Autologous fat transplantation versus adipose-derived stem cell-enriched lipografts: A study. *Aesthetic Surgery Journal*, 31, 682–693.
- Tanikawa, D. Y., Aguená, M., Bueno, D. F., Passos-Bueno, M. R., & Alonso, N. (2013). Fat grafts supplemented with adipose-derived stromal cells in the rehabilitation of patients with craniofacial microsoma. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132, 141–152.
- 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 Plastic Surgery*, 35, 965–971.
- Tissiani, L. A., & Alonso, N. (2016). A prospective and controlled clinical trial on stromal vascular fraction enriched fat grafts in secondary breast reconstruction. *Stem Cells International*, 2016, 2636454.
- Toyserkani, N. M., Quaade, M. L., & Sorensen, J. A. (2016). Cell-assisted lipotransfer: A systematic review of its efficacy. *Aesthetic Plastic Surgery*, 40, 309–318.
- Wang, L., Luo, X., Lu, Y., Fan, Z. H., & Hu, X. (2015). Is the resorption of grafted fat reduced in cell-assisted lipotransfer for breast augmentation? *Annals of Plastic Surgery*, 75, 128–134.
- Wazir, U., El Hage Chehade, H., Headon, H., Oteifa, M., Kasem, A., & Mokbel, K. (2016). Oncological safety of lipofilling in patients with breast cancer: A meta-analysis and update on clinical practice *Anticancer Research*, 36(9), 4521–4528. Review. PMID: 27630291
- Yoshimura, K., Asano, Y., Aoi, N., Kurita, M., Oshima, Y., Sato, K., ... Harii, K. (2010). Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *The Breast Journal*, 16, 169–175.

- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Hirohi, T., & Harii, K. (2008). Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: Supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plastic Surgery*, 32, 48–55. discussion 56–47
- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Inoue, K., Suga, H., ... Harii, K. (2008). Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: Efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatologic Surgery*, 34(9), 1178–1185.
- Yoshimura, K., Suga, H., & Eto, H. (2009). Adipose-derived stem/progenitor cells: Roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regenerative Medicine*, 4, 265–273.
- Yu, J. M., Jun, E. S., Bae, Y. C., & Jung, J. S. (2008). Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells and Development*, 17, 463–473.
- Zhao, M., Dumur, C. I., Holt, S. E., Beckman, M. J., & Elmore, L. W. (2010). Multipotent adipose stromal cells and breast cancer development: Think globally, act locally. *Molecular Carcinogenesis*, 49, 923–927.
- Zhou, Y., Wang, J., Li, H., Liang, X., Bae, J., Huang, X., & Li, Q. (2016). Efficacy and safety of cell-assisted lipotransfer: A systematic review and meta-analysis. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 137, 44e–57e.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., ... Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279–4295.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

Supplemental data (figure). Fat survival rate by volume injected with CAL.

How to cite this article: Laloze J, Varin A, Gilhodes J, et al. Cell-assisted lipotransfer: Friend or foe in fat grafting? Systematic review and meta-analysis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12:e1237–e1250. <https://doi.org/10.1002/term.2524>



ELSEVIER

Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



GENERAL REVIEW

Cell-assisted lipotransfer: Current concepts



Transfert graisseux enrichi en cellules souches : concepts actuels

J. Laloze^{a,b}, A. Varin^b, N. Bertheuil^{c,d}, J.L. Grolleau^a,
C. Vaysse^{e,f}, B. Chaput^{a,b,*}

^a Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Rangueil Hospital, 1, avenue Jean-Poulhès, 31059 Toulouse, France

^b STROMA lab, Université de Toulouse, EFS, ENVT, INSERM U1031, Toulouse, France

^c Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, hôpital Sud, University of Rennes 1, Rennes, France

^d SITI Laboratory, établissement français du Sang-Bretagne, Rennes University Hospital, Rennes, France

^e Inserm U1037, CRCT, Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France

^f Department of Surgery, IUCT-Oncopole, Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France

Received 28 November 2016; accepted 27 March 2017

KEYWORDS

Autologous fat grafting;
Adipose-derived stromal cells;
Cell-assisted lipotransfer;
Concise review;
Current concepts

MOTS CLÉS

Transfert de tissu adipeux ;
Cellules stromales mésoenchymateuse du

Summary Autologous fat transfer, or lipofilling, is a common technique used for soft tissue reconstruction. It has been used for many years, but the technique is associated with a significant graft resorption rate (20% to 80%). To improve the fat graft survival rate, several methods have been tested, and one has appeared more promising: cell-assisted lipotransfer (CAL). In the CAL method, fat is enriched with adipose-derived stromal cells (ASC), contained in the stromal vascular fraction (SVF) obtained after enzymatic digestion of fat or after cell culture to improve the fat survival rate. In this concise review, we present the clinical indications, and the technical principles of CAL, as well as a presentation of ASC. To conclude, we present the main results (efficacy, complications and safety) obtained from different studies of this technique.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Le transfert autologue de tissu adipeux est une technique largement éprouvée depuis de nombreuses années pour la correction de défauts des tissus mous dus à une perte de substance, une malformation ou dans un but purement esthétique. Une des problématiques majeures de cette technique est la résorption graisseuse pouvant aller de 20 à 80 % selon les études. Pour pallier à ce phénomène de résorption graisseuse, de nombreuses évolutions de la technique de *lipofilling* ont été proposées dont une qui semble être prometteuse, le « cell-

* Corresponding author. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Rangueil University Hospital, avenue du Professeur-Jean-Poulhès, 31000 Toulouse, France.

E-mail address: benoitchaput31@gmail.com (B. Chaput).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anplas.2017.03.011>

0294-1260/© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

tissu adipeux ;
Revue de la littérature ;
Concepts actuels

assisted lipotransfer » (CAL). Le CAL consiste à enrichir le lipoaspirat avec des cellules stromales mésenchymateuses issues du tissu adipeux de la patiente soit sous forme native (fraction stroma vasculaire), soit sous forme cultivées (cellules stromales du tissu adipeux). Au travers de cet article, nous souhaitons exposer quels sont les grands principes du CAL (indications et technique), avec notamment un rappel sur les ASC et leurs capacités, puis enfin les principaux résultats issus des études portant sur cette technique (efficacité, complications).

© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Autologous fat grafting or lipofilling has completely changed the management of soft tissue defects in the last 20 years. Lipofilling was first described over a century ago [1] and is now seen as an ideal filler, because it is host-compatible, easily and repeatedly harvested, with good results and a low complication rate. Over the years this technique has been further improved, and since the 1990s the most frequently used technique is Coleman's procedure [2]. Coleman modified the technique by focusing on several key points to reduce the invasiveness of cell harvesting and processing and standardized the implantation process. Today, conventional autologous lipotransfer consists of fat aspiration using low suction, followed by purification and centrifugation of fat, which is then reimplanted for soft-tissue correction. The main indications for lipofilling are the correction of contour defects after trauma, cancer, radiotherapy, or for purely aesthetic reasons.

However, autologous fat grafting is associated with a significant fat graft resorption rate. The fat survival rate varies from 20% to 80% in the literature [3–7]. In addition, local ischemia in the recipient site can lead to the two characteristic complications of autologous fat grafts; adipocyte necrosis and consequent volume loss. This initial ischemia limits the fat engraftment and requires several surgical procedures to obtain an optimal result. Because of the inconstant and sometimes low survival rates associated with lipofilling, researchers have tried to increase the vascularization of the graft with multiple products, such as insulin [8], vascular endothelial growth factor (VEGF) [9], platelet-rich plasma (PRP) [10], and also by enriching the fat with stromal cells. These stromal cells are known for their angiogenic properties [11]. This procedure defines cell-assisted lipotransfer (CAL), an autologous fat transfer enriched with stromal cells [12]. The aim of this concise review is to present the main principles of CAL (indications, current concepts and technique), including a discussion of ASC, and finally the main findings (efficacy, complications and safety) from the literature on this technique.

Update on Adipose-derived Stromal Cells (ASC)

Mesenchymal stromal cells (MSC) were described for the first time in the bone marrow (BM-MSC) in the 1970s by Friedenstein [13]. Cells with capabilities and characteristics similar to BM-MSC have been found in the stroma of many other organs and tissues [14,15], including adipose tissue [14]. Adipose tissue can be obtained in a minimally invasive way via liposuction, whereas BM aspiration is an invasive proce-

dure associated with higher morbidity. Moreover, adipose tissue has a higher MSC yield compared to bone marrow [16]. Adipose-derived stromal cells (ASC) are present in large amounts in the stromal vascular fraction (SVF) obtained after enzymatic digestion of the lipoaspirate. The SVF contains ASC as well as a heterogeneous cell population, such as hematopoietic stem cells, endothelial cells and pericytes [17–19]. After culture of SVF, non-adherent cells contained in the SVF are eliminated, and the ASC remain the majority of cells in the culture, based on adherence to plastic. ASC share similar characteristics with BM-MSC [20]. They are pluripotent cells and can differentiate into cells derived from the mesodermal lineage: adipocytes, osteoblasts and chondrocytes [14,21]. They also present better pro-angiogenic properties compared to BM-MSC and can be an interesting tool for treatment of acute ischemia of the lower limbs [11]. The ASC express markers in common with other mesenchymal stromal cells (MSC), including CD105, CD73, CD90, and are negative for CD31 and the CD45 [22]. In contrast to BM-MSC, ASC express the CD34 marker (present in the SVF fraction), which decreases after several passages in culture [22,23]. These cells are also capable of modulating the inflammatory and immune response [14,15,24], which has made them new tools in regenerative medicine for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases [25] such as lupus erythematosus [26], rheumatoid arthritis [27] or Crohn's disease [28]. And through a different mechanism, cultivated ASC, or ASC contained in the SVF, may improve fat survival. Indeed, as described previously, ASC can differentiate into adipocyte or endothelial cells and promote vascularization and regeneration of the fat [29–31]. Also, ASC may remain as original ASC in the graft [12] and release paracrine factors such as HGF or SDF-1 that can promote angiogenesis and help the surrounding tissue resist hypoxia and ischemia.[30,32,33] (Fig. 1).

What is cell-assisted lipotransfer?

The assumption behind CAL is that combining ASC with lipofilling will increase engraftment. CAL was first used in humans by Yoshimura et al., who aimed to improve the efficacy of autologous fat grafting and minimize complications [34]. In the operating room under general anesthesia, the removal of adipose tissue is performed according to the Coleman technique [2] as non-traumatically as possible to avoid injury to the tissues. Before harvesting, the donor site is thoroughly infiltrated with saline solution containing dilute lidocaine (0.08%) and epinephrine (1/500,000). After fifteen minutes, fat is harvested with a 2.5 mm diameter cannula connected to a 20 mL syringe under low pressure. The sample

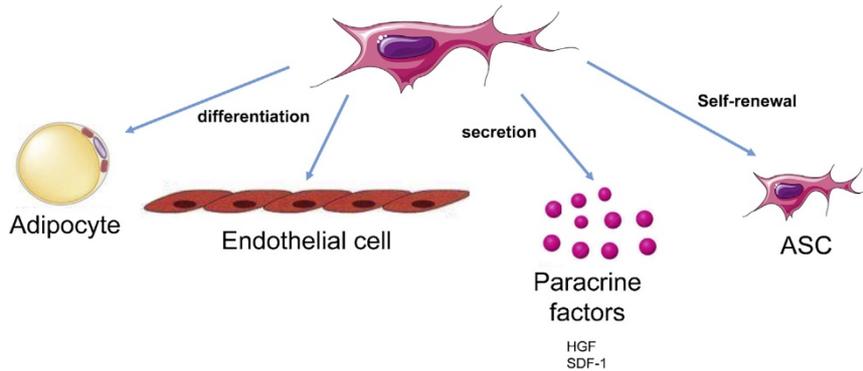


Figure 1 ASC potential mechanisms for improving the fat survival rate.

is then transferred to a 50 mL syringe and is centrifuged at low speed for 3 min. The superior phase (liquid and oily layer) is removed, leaving the fatty layer. Half of this sample is used to extract the stromal vascular fraction (containing ASC), and the other half receives the SVF and will be grafted per Coleman’s technique.

The SVF is isolated from the fat portion as described by Yoshimura et al. [34]. Briefly, the fat is washed with a solution of phosphate-buffered saline (PBS) and is digested with 0.075% collagenase at 37 °C in a shaker bath. After filtration, the SVF is washed several times in PBS to remove blood cells and adipocytes as well as the collagenase residues.

The remaining adipose tissue is centrifuged at 800 g for 10 min and the oil present in the superior phase is removed. Then, the washed adipose tissue is transferred in 10 mL sterile syringes placed in ice until the addition of the SVF. The cells and the tissue are gently mixed and after 10 to 15 minutes, the SVF-enriched lipoaspirate is placed in the injection syringe.

The injection is performed by micro-incisions using Coleman’s technique. Droplets (≈ 500 µl) of fat grafts are deposited with each pass as the cannula is withdrawn and in multiple tissue planes after multiple passes. Regular distribution of the fat is essential to successful fat grafting. The total injected amount is calculated to have an over-correction of about 20 to 30% (Fig. 2).

Mastumoto et al. were the first to introduce the term CAL in 2006 [12]. In vivo models (20 studies) studied the effect of fat enrichment with SVF or ASC on fat rate survival. Fifteen studies used immunodeficient animals [12,31,35–47] and 5 studies used immunocompetent animals [48–52]. Most of these studies showed a significant improvement in the fat survival rate with CAL.

In 2008, Yoshimura was the first to clearly describe the use of the CAL technique in humans. Since then, many articles (randomized controlled trials, patient cohorts, case series, etc.) have studied and compared the efficacy of the CAL technique to standard lipofilling and have found slight variations and promising results [53–82] (Fig. 3). Similarly, several systematic reviews or meta-analyses have demonstrated promising results, which can reinforce the CAL technique as the gold standard for fat grafts [81–83].

Results

Efficacy

The main goal of CAL is to increase fat engraftment. An objective measure of fat grafting is necessary and requires imaging exams, such as computed tomography or MRI [68].

Methods measuring the volume gained after surgery have been different between studies. Some authors used MRI 3D scanning, while others used computed tomography. In a few

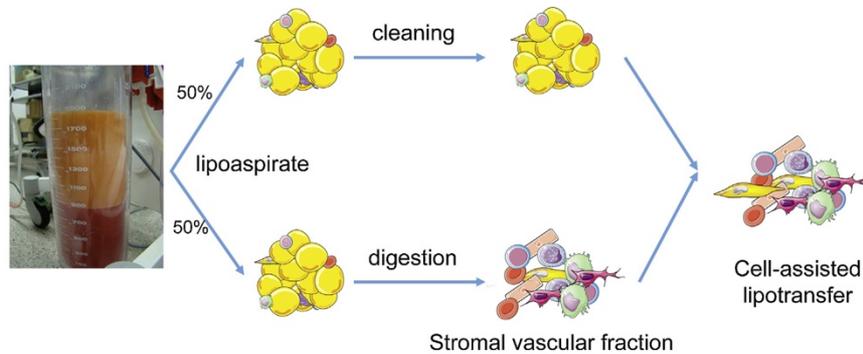


Figure 2 Cell-assisted lipotransfer technique.

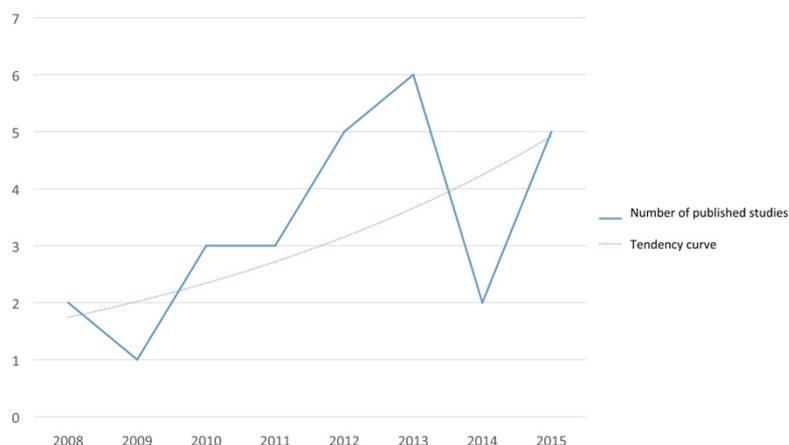


Figure 3 CAL publications over the years.

studies, the measurement of fat gain was not objective, being based on patient satisfaction [60] or physical examination with photos [55,62,63,72,74]. Some had a protocol for evaluating the fat survival rate with multiple imaging techniques, depending on the time since treatment [68].

Two studies have compared the efficacy of CAL with cultivated ASC. Koh et al. showed that the fat resorption rate was decreased in the non-CAL group compared to the CAL group (20.59% versus 46.81%) [65]. Similarly, Kolle et al. showed that the fat survival rate was 80.9% (76.6–85.2) for ASC-enriched grafts, whereas it was 16.3% (11.1–21.4) for the control grafts, yielding a relative survival improvement of 5.0 [57].

Finally, most studies have agreed on the efficacy of CAL over conventional lipofilling. Nevertheless, there are few comparative randomized studies, and most of them have a low or weak level of evidence. In their recent meta-analysis, Zhou et al. concluded that CAL seems more effective than conventional lipofilling, but only for the face [81]. The fat survival rate did not seem to be improved for the breast and other injection sites [81].

Indications for CAL

As for lipofilling, the main indications for CAL are soft tissue reconstruction and cosmetic augmentation. In the literature, the breast and the face are the two main recipient sites studied.

Procedures for lipofilling and SVF isolation

The procedures for lipofilling, as well as SVF isolation and ASC culture, are very heterogeneous among the studies. First of all, only two articles enriched the fat graft with cultivated ASC [57,65]; all the others used SVF. These two studies were two randomized controlled clinical studies that demonstrated a beneficial effect of CAL on fat survival.

Moreover, SVF extraction methods were different from one study to another. SVF was extracted using a manual method in thirteen studies and automatic methods in ten studies, and only two papers compared the two extraction methods [63,76]. Only Gentile et al. compared different

automatic methods to the manual one in order to define the best stromal cell isolation method [76].

Complications after the CAL technique

We found the same complications after the CAL technique as after conventional lipofilling. The main complications were oil cysts, followed by fat necrosis, calcifications, nodules and fibrosis. Nevertheless, we found two differences compared to conventional lipofilling. First, there were no cases of post-operative infection found after the CAL technique. And conversely, calcifications were found only for the CAL technique.

Interestingly, regarding complications after CAL, the complications, mainly oil cysts, happened only after fat grafting in the breast. No complications were found in the face region.

Oncological risk

Only one paper noted cancer development after CAL [56], but that was a pelvic metastasis completely unrelated to the treatment. No other sign of cancer was found. All the cysts and nodules were reported to be benign.

Two systematic reviews of human studies demonstrated increased breast cancer after fat grafting [84,85]. Other recent studies have shown conflicting results [86,87]. However, several studies based on in vitro culture or animal models demonstrated that ASC may promote breast tumor growth and invasion [88–90] and increase the risk of cancer recurrence [91]. Therefore, the oncologic safety of CAL is still unclear [92–94]. In this context, ASC-enriched lipofilling must be used cautiously, especially after cancer remission. Concerning this specific issue, further studies with long-term follow up are needed to clarify the risk of developing cancer after CAL surgery.

Discussion

Currently, the use of CAL as a surgical technique is not very widespread due to two main problems. First, the few available studies and the low level of evidence of efficacy make many surgeons consider this procedure as having little

Table 1 Characteristics of the four prospective comparative randomized clinical trials.

Study	Intervention	Number of patients	Number of procedures	Fat survival rate (% , \pm SD)	Volumetric measurement method	Complications
Sterodimas et al. [60]	SVF + Fat	10	1	NA	Satisfaction	NA
	Fat	10	1	NA		NA
Koh et al. [65]	ASC + Fat	5	1	61.1 \pm 13.7	3D Scan	No adverse events
	Fat	5	1	34.3 \pm 5.3		No adverse events
Tanikawa et al. [53]	SVF + Fat	7	1	88 \pm 13	CT Scan	No adverse events
	Fat	7	1	54 \pm 20		One infection
Kølle et al. [57]	ASC + Fat	10	1	80.9 \pm 6	MRI	No adverse events
	Fat	10	1	16.3 \pm 7.2		No adverse events

ASC: adipose-derived stromal cell; SVF: stromal vascular fraction; MRI: magnetic resonance imaging.

or no effect. Second, isolation of SVF or ASC to enrich lipofilling presents a legal problem that is an obstacle in many countries. In fact, stromal cell manipulation is strictly controlled by numerous health authorities to avoid potential drifts.

In the present literature, there are only 4 prospective randomized clinical studies comparing CAL with the conventional lipofilling technique [53,57,60,65], 11 non-randomized clinical trials, 5 cohort studies and 5 case series. The 4 randomized studies have shown that CAL increases the survival rate of the fat graft beyond that of conventional lipofilling (Table 1). However, high-level randomized controlled clinical trials which could confirm these data are still lacking.

In their meta-analysis, Zhou et al. showed the efficacy of CAL only for filling of the face region, but CAL did not reduce the rate of complications [81]. They concluded that CAL seemed to be beneficial only for the face procedure.

The CAL procedure still has many limitations. We found significant heterogeneity in the available studies. First, several SVF extraction methods exist. We found both automatic and manual isolation methods with collagenase digestion. Gentile et al. compared different automatic isolation methods to the manual method [76]. They demonstrated that the optimal SVF extraction method was the automatic one (51% maintenance of contour restoring compared to the manual method at 39%) [76]. On the other hand, Doi et al. in 2013 showed that there was no difference between automatic and manual methods on the number of extracted cells from adipose tissue and on cell viability [74].

Exclusively enzymatic digestions were used by the authors, but currently non-enzymatic SVF extraction is being developed to limit collagenase use. In addition, the cost of enzymatic digestion remains significant, and the effects on the extracted cells are still not completely understood. Mechanical procedures for SVF extraction could enable production of collagenase-free SVF, but more studies are required [95–97].

Concerning the evaluation of fat resorption, measurement methods are different between studies, but several papers demonstrated that this difference had no impact on the obtained results. Although some authors consider MRI to be the gold standard for breast volume analysis, Zhou et al. showed that there was no significant difference in the techniques used to measure the fat survival rate [81]. In addition,

Dos Anjos et al. [69] demonstrated that measurements obtained with 3D scanning were not different compared to the MRI analysis and may be cheaper and more accessible for some practitioners. This data was confirmed by Herold et al. [68].

We found only two articles which enriched lipofilling with cultivated ASC [57,65], and they demonstrated that ASC-enriched lipofilling has a better survival rate than SVF-enriched fat (60% versus 45%) [81]. The advantage of this protocol is having only ASC, and no contaminating cells such as red blood cells or hematopoietic cells. However, in vitro culture in a GMP-laboratory is needed to isolate and produce cultivated ASC. Moreover, the use of cultivated ASC requires a second procedure, increasing the risk and the cost of the fat graft. [98]. Therefore, it will be necessary to compare the effect of ASC and SVF on fat survival. Thus, more randomized studies with a complete description of the methodology used comparing the two treatments are necessary to determine which would be most beneficial for patients.

Conclusion

CAL can be a promising procedure for overcoming the limitations of conventional lipofilling. Publications on this subject are increasingly numerous in recent years, but the efficacy of this procedure is still difficult to prove. More controlled and randomized clinical trials are necessary in order to conclude on the efficacy and safety of CAL. To achieve this objective, these trials will require standardized methods of SVF isolation and volume measurement, as well as a constant percentage of injected cells in the graft.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] Lexer E. Die freien tansplantationen: 2 Teile: Verlag von Ferdinand Enke in Stuttgart 1919.
- [2] Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? Clin Plast Surg 2001;28(1):111–9.

- [3] Parrish JN, Metzinger SE. Autogenous fat grafting and breast augmentation: a review of the literature. *Aesthetic Surg J Am Soc Aesthetic Plast Surg* 2010;30(4):549–56.
- [4] Fournier PF. Fat grafting: my technique. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al* 2000;26(12):1117–28.
- [5] Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 1995;19(5):421–5.
- [6] Ersek RA. Transplantation of purified autologous fat: a 3-year follow-up is disappointing. *Plast Reconstr Surg* 1991;87(2):219–27. discussion 228.
- [7] Khouri RK, Eisenmann-Klein M, Cardoso E, Cooley BC, Kacher D, Gombos E, et al. 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* 2012;129(5):1173–87.
- [8] Yuksel E, Weinfeld AB, Cleek R, Wamsley S, Jensen J, Boutros S, et al. 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* 2000;105(5):1712–20.
- [9] Topcu A, Aydin OE, Ünlü M, Barutcu A, Atabay A. Increasing the viability of fat grafts by vascular endothelial growth factor. *Arch Facial Plast Surg* 2012;14(4):270–6.
- [10] Pires Fraga MF, Nishio RT, Ishikawa RS, Perin LF, Helene A, Malheiros CA. Increased survival of free fat grafts with platelet-rich plasma in rabbits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63(12):e818–22.
- [11] Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109(5):656–63.
- [12] Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 2006;12(12):3375–82.
- [13] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6(2):230–47.
- [14] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279–95.
- [15] Im G-I, Shin Y-W, Lee K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(10):845–53.
- [16] Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24(4):150–4.
- [17] Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2010;77(1):22–30.
- [18] Kanthilal M, Darling EM. Characterization of mechanical and regenerative properties of human, adipose stromal cells. *Cell Mol Bioeng* 2014;7(4):585–97.
- [19] Bertheuil N, Chaput B, Ménard C, Varin A, Garrido I, Grolleau JL, et al. Adipose-derived stromal cells: history, isolation, immunomodulatory properties and clinical perspectives. *Ann Chir Plast Esthet* 2015;60(2):94–102.
- [20] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytherapy* 2013;15(6):641–8.
- [21] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211–28.
- [22] Maumus M, Peyrafitte J-A, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumié A, Casteilla L, et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes* 2005;29(9):1141–53.
- [23] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006;24(2):376–85.
- [24] Kapur SK, Katz AJ. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie* 2013;95(12):2222–8.
- [25] Casteilla L, Planat-Benard V, Bourin P, Laharrague P, Cousin B. Use of adipose tissue in regenerative medicine. *Transfus Clin Biol* 2011;18(2):124–8.
- [26] Choi EW, Shin IS, Song JW, Yun TW, Yang J, Choi KS, et al. Transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells prevents the development of lupus dermatitis. *Stem Cells Dev* 2015;24(17):2041–51.
- [27] Choi EW, Yun TW, Song JW, Lee M, Yang J, Choi KS. Preventive effects of CTLA4lg-overexpressing adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells in rheumatoid arthritis. *Cytherapy* 2015;17(3):271–82.
- [28] Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual M, Pascual I, De-La-Quintana P, Trebol J, et al. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int J Colorectal Dis* 2009;24(1):27–30.
- [29] Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004;110(3):349–55.
- [30] Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Claus S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;109(10):1292–8.
- [31] Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006;118(3 Suppl):1215–85.
- [32] Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cornetta K, et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells* 2007;25(12):3234–43.
- [33] Kim W-S, Park B-S, Sung J-H. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9(7):879–87.
- [34] Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 2008;32(1):48–55. NaN–7.
- [35] Lu F, Li J, Gao J, Ogawa R, Ou C, Yang B, et al. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2009;124(5):1437–46.
- [36] Luo S, Hao L, Li X, Yu D, Diao Z, Ren L, et al. Adipose tissue-derived stem cells treated with estradiol enhance survival of autologous fat transplants. *Tohoku J Exp Med* 2013;231(2):101–10.
- [37] Li L, Pan S, Ni B, Lin Y. Improvement in autologous human fat transplant survival with SVF plus VEGF-PLA nano-sustained release microspheres. *Cell Biol Int* 2014;38(8):962–70.
- [38] Conde-Green A, De Amorim NFG, Pitanguy I. Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: a comparative study (English). *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63(8):1375–81.
- [39] Garza RM, Rennert RC, Paik KJ, Atashroo D, Chung MT, Duscher D, et al. Studies in fat grafting: Part IV. Adipose-derived stromal cell gene expression in cell-assisted lipotransfer. *Plast Reconstr Surg* 2015;135(4):1045–55.

- [40] Ko M-S, Jung J-Y, Shin I-S, Choi E-W, Kim J-H, Kang SK, et al. Effects of expanded human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the viability of cryopreserved fat grafts in the nude mouse. *Int J Med Sci* 2011;8(3):231–8.
- [41] Li K, Li F, Li J, Wang H, Zheng X, Long J, et al. Increased survival of human free fat grafts with varying densities of human adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma. *J Tissue Eng Regen Med* 2014.
- [42] Luo X, Cao W, Xu H, Wang L, Zhang Z, Lu Y, et al. Coimplanted endothelial cells improve adipose tissue grafts' survival by increasing vascularization. *J Craniofac Surg* 2015;26(2):358–64.
- [43] Xu F, Li H, Yin Q-S, Liu D, Nan H, Zhao P, et al. Human breast adipose-derived stem cells transfected with the stromal cell-derived factor-1 receptor CXCR4 exhibit enhanced viability in human autologous free fat grafts. *Cell Physiol Biochem* 2014;34(6):2091–104.
- [44] Zhu M, Dong Z, Gao J, Liao Y, Xue J, Yuan Y, et al. Adipocyte regeneration after free fat transplantation: promotion by stromal vascular fraction cells. *Cell Transplant* 2015;24(1):49–62.
- [45] Jiang A, Li M, Duan W, Dong Y, Wang Y. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by adipose-derived stem-cells-assisted lipotransfer combined with bFGF. *ScientificWorldJournal* 2015;2015:968057.
- [46] Fu S, Luan J, Xin M, Wang Q, Xiao R, Gao Y. Fate of adipose-derived stromal vascular fraction cells after co-implantation with fat grafts: evidence of cell survival and differentiation in ischemic adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 2013;132(2):363–73.
- [47] Zhou S-B, Chiang C-A, Xie Y, Li H, Liu K, Kobayashi E, et al. In vivo bioimaging analysis of stromal vascular fraction-assisted fat grafting: the interaction and mutualism of cells and grafted fat. *Transplantation* 2014;98(10):1048–55.
- [48] Seyhan N, Alhan D, Ural AU, Gunal A, Avunduk MC, Savaci N. The effect of combined use of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells on fat graft survival. *Ann Plast Surg* 2015;74(5):615–20.
- [49] Zhu M, Zhou Z, Chen Y, Schreiber R, Ransom JT, Fraser JK, et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg* 2010;64(2):222–8.
- [50] Piccinno MS, Veronesi E, Loschi P, Pignatti M, Murgia A, Grisendi G, et al. Adipose stromal/stem cells assist fat transplantation reducing necrosis and increasing graft performance. *Apoptosis* 2013;18(10):1274–89.
- [51] He X, Zhong X, Ni Y, Liu M, Liu S, Lan X. Effect of ASCs on the graft survival rates of fat particles in rabbits. *J Plast Surg Hand Surg* 2013;47(1):3–7.
- [52] Ni Y, He X, Yuan Z, Liu M, Du H, Zhong X. Effect of fat particle-to-SVF ratio on graft survival rates in rabbits. *Ann Plast Surg* 2015;74(5):609–14.
- [53] Tanikawa DYS, Aguenta M, Bueno DF, Passos-Bueno MR, Alonso N. Fat grafts supplemented with adipose-derived stromal cells in the rehabilitation of patients with craniofacial microsomia. *Plast Reconstr Surg* 2013;132(1):141–52.
- [54] Wang L, Luo X, Lu Y, Fan Z-H, Hu X. Is the resorption of grafted fat reduced in cell-assisted lipotransfer for breast augmentation? *Ann Plast Surg* 2015;75(2):128–34.
- [55] Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, Mannerström B, Saariniemi K, Mikkonen R, et al. Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2013;66(11):1494–503.
- [56] Pérez-Cano R, Vranckx JJ, Lasso JM, Calabrese C, Merck B, Milstein AM, et al. Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial. *Eur J Surg Oncol* 2012;38(5):382–9.
- [57] Kølbe S-FT, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2013;382(9898):1113–20.
- [58] Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Curcio CB, et al. A comparative translational study: the combined use of enhanced stromal vascular fraction and platelet-rich plasma improves fat grafting maintenance in breast reconstruction. *Stem Cells Transl Med* 2012;1(4):341–51.
- [59] Jung HK, Kim CH, Song SY. Prospective 1-year follow-up study of breast augmentation by cell-assisted lipotransfer. *Aesthetic Surg J Am Soc Aesthetic Plast Surg* 2016;36(2):179–90.
- [60] Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Boriani F. Autologous fat transplantation versus adipose-derived stem cell-enriched lipografts: a study. *Aesthetic Surg J Am Soc Aesthetic Plast Surg* 2011;31(6):682–93.
- [61] Schendel SA. Enriched Autologous Facial Fat Grafts in Aesthetic Surgery: 3D Volumetric Results. *Aesthetic Surg J Am Soc Aesthetic Plast Surg* 2015;35(8):913–9.
- [62] Lee SK, Kim D-W, Dhong E-S, Park S-H, Yoon E-S. Facial soft tissue augmentation using autologous fat mixed with stromal vascular fraction. *Arch Plast Surg* 2012;39(5):534–9.
- [63] Tiryaki T, Findikli N, Tiryaki D. Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: a preliminary report. *Aesthetic Plast Surg* 2011;35(6):965–71.
- [64] Sasaki GH. The safety and efficacy of cell-assisted fat grafting to traditional fat grafting in the anterior mid-face: an indirect assessment by 3D imaging. *Aesthetic Plast Surg* 2015;39(6):833–46.
- [65] Koh KS, Oh TS, Kim H, Chung IW, Lee KW, Lee HB, et al. Clinical application of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in progressive hemifacial atrophy (Parry-Romberg disease) with microfat grafting techniques using 3-dimensional computed tomography and 3-dimensional camera. *Ann Plast Surg* 2012;69(3):331–7.
- [66] Li J, Gao J, Cha P, Chang Q, Liao Y, Liu C, et al. Supplementing fat grafts with adipose stromal cells for cosmetic facial contouring. *Dermatol Surg* 2013;39(3 Pt 1):449–56.
- [67] Chang Q, Li J, Dong Z, Liu L, Lu F. Quantitative volumetric analysis of progressive hemifacial atrophy corrected using stromal vascular fraction-supplemented autologous fat grafts. *Dermatol Surg* 2013;39(10):1465–73.
- [68] Herold C, Ueberreiter K, Busche MN, Vogt PM. Autologous fat transplantation: volumetric tools for estimation of volume survival. A systematic review. *Aesthetic Plast Surg* 2013;37(2):380–7.
- [69] Dos Anjos S, Matas-Palau A, Mercader J, Katz AJ, Llull R. Reproducible volume restoration and efficient long-term volume retention after point-of-care standardized cell-enhanced fat grafting in breast surgery. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2015;3(10):e547.
- [70] Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, et al. Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J* 2010;16(2):169–75.
- [71] Kamakura T, Ito K. Autologous cell-enriched fat grafting for breast augmentation. *Aesthetic Plast Surg* 2011;35(6):1022–30.
- [72] Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipotrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg* 2008;34(9):1178–85.
- [73] Gentile P, De Angelis B, Pasin M, Cervelli G, Curcio CB, Floris M, et al. Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical evaluation for cell-based therapies in patients with scars on the face. *J Craniofac Surg* 2014;25(1):267–72.
- [74] Doi K, Tanaka S, Iida H, Eto H, Kato H, Aoi N, et al. Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automat-

- ed processing system: bench and bed analysis. *J Tissue Eng Regen Med* 2013;7(11):864–70.
- [75] Tissiani LAL, Alonso N. A prospective and controlled clinical trial on stromal vascular fraction enriched fat grafts in secondary breast reconstruction. *Stem Cells* 2016;2016(2):2636454–51.
- [76] Gentile P, Scioli MG, Orlandi A, Cervelli V. Breast reconstruction with enhanced stromal vascular fraction fat grafting: what is the best method? *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2015;3(6):e406.
- [77] Domenis R, Lazzaro L, Calabrese S, Mangoni D, Gallelli A, Bourkhoula E, et al. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Curr Stem Cell Res Ther* 2015;6:2.
- [78] Toyserkani NM, Jensen CH, Sheikh SP, Sørensen JA. Cell-assisted lipotransfer using autologous adipose-derived stromal cells for alleviation of breast cancer-related lymphedema. *Stem Cells Transl Med* 2016;5(7):857–9.
- [79] Calabrese C, Orzalesi L, Casella D, Cataliotti L. Breast reconstruction after nipple/areola-sparing mastectomy using cell-enhanced fat grafting. *Ecancermedicallscience* 2009;3:116.
- [80] Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A-L, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS One* 2010;5(6):e10999.
- [81] Zhou Y, Wang J, Li H, Liang X, Bae J, Huang X, et al. Efficacy and safety of cell-assisted lipotransfer: a systematic review and meta-analysis. *Plast Reconstr Surg* 2016;137(1):44e–57e.
- [82] Toyserkani NM, Quaade ML, Sørensen JA. Cell-Assisted Lipotransfer: A systematic review of its efficacy. *Aesthetic Plast Surg* 2016;40(2):309–18.
- [83] Grabin S, Antes G, Stark GB, Motschall E, Buroh S, Lampert FM. Cell-assisted lipotransfer. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112(15):255–61.
- [84] Claro F, Figueiredo JCA, Zampar AG, Pinto-Neto AM. Applicability and safety of autologous fat for reconstruction of the breast. *Br J Surg* 2012;99(6):768–80.
- [85] Largo RD, Tchang LAH, Mele V, Scherberich A, Harder Y, Wettstein R, et al. Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to healthy breast tissue: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2014;67(4):437–48.
- [86] Kronowitz SJ, Mandujano CC, Liu J, Kuerer HM, Smith B, Garvey P, et al. Lipofilling of the breast does not increase the risk of recurrence of breast cancer: a matched controlled study. *Plast Reconstr Surg* 2016;137(2):385–93.
- [87] Wazir U, El Hage Chehade H, Headon H, Oteifa M, Kasem A, Mokbel K. Oncological safety of lipofilling in patients with breast cancer: a meta-analysis and update on clinical practice. *Anticancer Res* 2016;36(9):4521–8.
- [88] Donnenberg VS, Zimmerlin L, Rubin JP, Donnenberg AD. Regenerative therapy after cancer: what are the risks? *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(6):567–75.
- [89] Eterno V, Zambelli A, Pavesi L, Villani L, Zanini V, Petrolo G, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget* 2014;5(3):613–33.
- [90] Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev* 2008;17(3):463–73.
- [91] Zhao M, Dumur CI, Holt SE, Beckman MJ, Elmore LW. Multipotent adipose stromal cells and breast cancer development: think globally, act locally. *Mol Carcinog* 2010;49(11):923–7.
- [92] Chaput B, Foucras L, Le Guellec S, Grolleau JL, Garrido I. Recurrence of an invasive ductal breast carcinoma 4 months after autologous fat grafting. *Plast Reconstr Surg* 2013;131(1):e123–4.
- [93] Chaput B, Grolleau JL, Bertheuil N, Ebudery H, Chavoïn JP, Garrido I. Another suspected case of breast cancer recurrence after lipofilling? Remain cautious. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2014;67(8):1156–7.
- [94] Alharbi M, Garrido I, Vaysse C, Chavoïn JP, Grolleau JL, Chaput B. Latissimus dorsi flap invasion by ductal breast carcinoma after lipofilling. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2013;1(8):e68.
- [95] Chaput B, Bertheuil N, Escubes M, Grolleau JL, Garrido I, Laloze J, et al. Mechanically isolated stromal vascular fraction provides a valid and useful collagenase-free alternative technique: a comparative study. *Plast Reconstr Surg* 2016;1.
- [96] Bertheuil N, Chaput B. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plast Reconstr Surg* 2015;135(2):e454–5.
- [97] Chaput B, Bertheuil N, Grolleau J-L, Garrido I, Laloze J, Varin A. Mechanical isolation of stromal vascular fraction: a new advance in stem cells therapy? *Plast Reconstr Surg* 2016.
- [98] Llobet L, Montoya J, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E. Side effects of culture media antibiotics on cell differentiation. *Tissue Eng Part C Methods* 2015;21(11):1143–7.

Conclusion

Cette étude a permis de montrer qu'il existait des différences entre les produits de sécrétion des AD-MSCs issues des deux couches du TA abdominal sous-cutané. Les exosomes semblent le produit de sécrétion le plus bénéfique pour favoriser l'angiogenèse et la neurogenèse. Le surnageant total semble délétère au ratio utilisé. Plus précisément, concernant la néoangiogenèse, nous n'avons pas observé de différence entre les exosomes issus des couches superficielles (sAAT) et profondes (dAAT) du TA sous-cutané abdominal. Concernant la neurogenèse, les exosomes issus de la couche profonde du TA sous-cutané abdominal semblent donner de meilleurs résultats.

Enfin, concernant les fibroblastes, nous n'avons pas observé d'effet du sécrétome ou des exosomes.

Selon cette étude *in vitro*, les exosomes issus du sAAT et du dAAT pourraient être utilisés pour la cicatrisation et la régénération cutanée mais ces données restent à approfondir, en particulier l'aspect concernant la diminution de la douleur potentiellement induite par les exosomes.

Références bibliographiques

- Abraira, V. E., & Ginty, D. D. (2013). *The Sensory Neurons of Touch*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.051>
- Abu-Hijleh, M. F., Roshier, A. L., Al-Shboul, Q., Dharap, A. S., & Harris, P. F. (2006). The membranous layer of superficial fascia: Evidence for its widespread distribution in the body. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 28(6), 606–619.
<https://doi.org/10.1007/s00276-006-0142-8>
- Aghazadeh Tabrizi, M., Baraldi, P. G., Baraldi, S., Gessi, S., Merighi, S., & Borea, P. A. (2017). Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Clinical Implications of TRPV1 Receptor Antagonists. *Medicinal Research Reviews*, 37(4), 936–983.
<https://doi.org/10.1002/MED.21427>
- Ahima, R. S., Qi, Y., Singhal, N. S., Jackson, M. B., & Scherer, P. E. (2006). Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes*, 55 Suppl 2(SUPPL. 2).
<https://doi.org/10.2337/DB06-S018>
- Arno, A. I., Amini-Nik, S., Blit, P. H., Al-Shehab, M., Belo, C., Herer, E., Tien, C. H., & Jeschke, M. G. (2014). Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Research and Therapy*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/SCRT417/FIGURES/5>
- Aronowitz, J. A., & Ellenhorn, J. D. I. (2013). Adipose stromal vascular fraction isolation: A head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132(6). <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182a80652>
- Aryan, A., Bayat, M., Bonakdar, S., Taheri, S., Haghparast, N., Bagheri, M., Piryaei, A., & Abdollahifar, M. A. (2019). Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Wound Healing in Deep Second-Degree Burns in Male Rats. *Cells Tissues Organs*, 206(6), 317–329. <https://doi.org/10.1159/000501651>
- Bahr, R., Hansson, P., & Sejersted, O. M. (1990). Triglyceride/fatty acid cycling is increased after exercise. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 39(9), 993–999.
[https://doi.org/10.1016/0026-0495\(90\)90313-2](https://doi.org/10.1016/0026-0495(90)90313-2)
- Bai, Y., Han, Y. di, Yan, X. long, Ren, J., Zeng, Q., Li, X. dong, Pei, X. tao, & Han, Y. (2018). Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by hydrogen peroxide enhanced skin flap recovery in ischemia-reperfusion injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500(2), 310–317.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.04.065>
- Bari, E., Di Silvestre, D., Mastracci, L., Grillo, F., Grisoli, P., Marrubini, G., Nardini, M., Mastrogiacomo, M., Sorlini, M., Rossi, R., Torre, M. L., Mauri, P., Sesana, G., & Perteghella, S. (2020). GMP-compliant sponge-like dressing containing MSC lyo-secretome: Proteomic network of healing in a murine wound model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 155, 37–48.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2020.08.003>
- Baroudi, R., & Ferreira, C. A. A. (1998). Seroma: How to Avoid It and How to Treat It. *Aesthetic Surgery Journal*, 18(6), 439–441. [https://doi.org/10.1016/S1090-820X\(98\)70073-1/2/10.1016_S1090-820X_98_70073-1-FIG2.JPEG](https://doi.org/10.1016/S1090-820X(98)70073-1/2/10.1016_S1090-820X_98_70073-1-FIG2.JPEG)
- Beylot, M., Martin, C., Laville, M., Riou, J. P., Cohen, R., & Mornex, R. (1991). Lipolytic and ketogenic fluxes in human hyperthyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73(1), 42–49. <https://doi.org/10.1210/JCEM-73-1-42>
- Blijdorp, C. J., Tutakhel, O. A. Z., Hartjes, T. A., van den Bosch, T. P. P., van Heugten, M. H., Rigalli, J. P., Willemsen, R., Musterd-Bhaggoe, U. M., Barros, E. R., Carles-Fontana,

- R., Carvajal, C. A., Arntz, O. J., van de Loo, F. A. J., Jenster, G., Clahsen-Van Groningen, M. C., Cuevas, C. A., Severs, D., Fenton, R. A., van Royen, M. E., ... Hoorn, E. J. (2021). Comparing approaches to normalize, quantify, and characterize urinary extracellular vesicles. *Journal of the American Society of Nephrology*, 32(5), 1210–1226. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020081142/-DCSUPPLEMENTAL>
- Blondeel, P. N., Derks, D., Roche, N., Van Landuyt, K. H., & Monstrey, S. J. (2003). The effect of ultrasound-assisted liposuction and conventional liposuction on the perforator vessels in the lower abdominal wall. *British Journal of Plastic Surgery*, 56(3), 266–271. [https://doi.org/10.1016/S0007-1226\(03\)00112-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1226(03)00112-7)
- Boireau, W., & Elie-Caille, C. (2021). Les vésicules extracellulaires - Définition, séparation, caractérisation. *Médecine/Sciences*, 37(12), 1092–1100. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/2021201>
- Bracaglia, R., Tambasco, D., Marco D'Etto, & Gentileschi, S. (2012). "Inverted-Y": a modified vest-over-pants abdominoplasty pattern following bariatric surgery. *Aesthetic Plastic Surgery*, 36(5), 1179–1185. <https://doi.org/10.1007/S00266-012-9956-4>
- Braun, J. E. A., & Severson, D. L. (1992). Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *The Biochemical Journal*, 287 (Pt 2)(Pt 2), 337–347. <https://doi.org/10.1042/BJ2870337>
- Braverman, I. M. (2000a). The Cutaneous Microcirculation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5, 3–9. <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00010.x>
- Braverman, I. M. (2000b). The Cutaneous Microcirculation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5, 3–9. <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00010.x>
- Brisson, A. R., Tan, S., Linares, R., Gounou, C., & Arraud, N. (2017). Extracellular vesicles from activated platelets: a semiquantitative cryo-electron microscopy and immuno-gold labeling study. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1268255>, 28(3), 263–271. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1268255>
- Bruno, S., Grange, C., Collino, F., Deregibus, M. C., Cantaluppi, V., Biancone, L., Tetta, C., & Camussi, G. (2012). Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival in a Lethal Model of Acute Kidney Injury. *PLOS ONE*, 7(3), e33115. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0033115>
- Busatto, S., Vilanilam, G., Ticer, T., Lin, W. L., Dickson, D. W., Shapiro, S., Bergese, P., & Wolfram, J. (2018). Tangential Flow Filtration for Highly Efficient Concentration of Extracellular Vesicles from Large Volumes of Fluid. *Cells* 2018, Vol. 7, Page 273, 7(12), 273. <https://doi.org/10.3390/CELLS7120273>
- Bustamante, K. (2012). Lipoaspiration dans la chirurgie de la silhouette. *EMC - Techniques Chirurgicales - Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique*, 7(3), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S1286-9325\(12\)59670-6](https://doi.org/10.1016/S1286-9325(12)59670-6)
- Caggiati, A. (1999). The saphenous venous compartments. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 21(1), 29–34. <https://doi.org/10.1007/BF01635049>
- Calandra, T., & Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 3(10), 791–800. <https://doi.org/10.1038/NRI1200>
- Calvo, J. C., Rodbard, D., Katki, A., Chernick, S., & Yanagishita, M. (1991). Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes with 3-isobutyl-1-methylxanthine and dexamethasone stimulates cell-associated and soluble chondroitin 4-sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 11237–11244. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)99154-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)99154-4)

- Casado-Díaz, A., Quesada-Gómez, J. M., & Dorado, G. (2020). Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 518822. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00146/BIBTEX>
- Cata, J. P., Uhelski, M. L., Gorur, A., & Dougherty, P. M. (2022). Nociception and Pain: New Roles for Exosomes. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 28(4), 349–363. <https://doi.org/10.1177/10738584211027105>
- Cavallari, C., Ranghino, A., Tapparo, M., Cedrino, M., Figliolini, F., Grange, C., Giannachi, V., Garneri, P., Deregibus, M. C., Collino, F., Rispoli, P., Camussi, G., & Brizzi, M. F. (2017). Serum-derived extracellular vesicles (EVs) impact on vascular remodeling and prevent muscle damage in acute hind limb ischemia. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08250-0>
- Chaouat, M., Levan, P., Lalanne, B., Buisson, T., Nicolau, P., & Mimoun, M. (2000). Abdominal dermolipectomies: early postoperative complications and long-term unfavorable results. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 106(7), 1614–1618. <https://doi.org/10.1097/00006534-200012000-00029>
- Chaput, B., Bertheuil, N., Escubes, M., Grolleau, J. L., Garrido, I., Laloze, J., Espagnolle, N., Casteilla, L., Sensebé, L., & Varin, A. (2016). Mechanically Isolated Stromal Vascular Fraction Provides a Valid and Useful Collagenase-Free Alternative Technique: A Comparative Study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 138(4), 807–819. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002494>
- Chen, L., Tredget, E. E., Liu, C., & Wu, Y. (2009). Analysis of Allogenicity of Mesenchymal Stem Cells in Engraftment and Wound Healing in Mice. *PLOS ONE*, 4(9), e7119. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0007119>
- Chen, W., Huang, Y., Han, J., Yu, L., Li, Y., Lu, Z., Li, H., Liu, Z., Shi, C., Duan, F., & Xiao, Y. (2016). Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunologic Research*, 64(4), 831–840. <https://doi.org/10.1007/S12026-016-8798-6/METRICS>
- Chia, B. S., Low, Y. P., Wang, Q., Li, P., & Gao, Z. (2017). Advances in exosome quantification techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 86, 93–106. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2016.10.012>
- Chopra, J., Rani, A., Rani, A., Srivastava, A. K., & Sharma, P. K. (2011). Re-evaluation of superWcial fascia of anterior abdominal wall: A computed tomographic study. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 33(10), 843–849. <https://doi.org/10.1007/S00276-011-0801-2>
- Cocozza, F., Grisard, E., Martin-Jaular, L., Mathieu, M., & Théry, C. (2020). SnapShot: Extracellular Vesicles. *Cell*, 182(1), 262-262.e1. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.04.054>
- Coon, D., Gusenoff, J. A., Kannan, N., El Khoudary, S. R., Naghshineh, N., & Rubin, J. P. (2009). Body mass and surgical complications in the postbariatric reconstructive patient: analysis of 511 cases. *Annals of Surgery*, 249(3), 397–401. <https://doi.org/10.1097/SLA.0B013E318196D0C6>
- Cucci, L. M., Satriano, C., Marzo, T., & La Mendola, D. (2021). Angiogenin and Copper Crossing in Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/IJMS221910704>
- Czech, M. P. (2002). Fat targets for insulin signaling. *Molecular Cell*, 9(4), 695–696. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00509-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00509-9)
- Despres, J. P., Nadeau, A., Tremblay, A., Ferland, M., Moorjani, S., Lupien, P. J., Theriault, G., Pinault, S., & Bouchard, C. (1989). Role of deep abdominal fat in the association

- between regional adipose tissue distribution and glucose tolerance in obese women. *Diabetes*, 38(3), 304–309. <https://doi.org/10.2337/DIAB.38.3.304>
- Diraison, F., Yankah, V., Letexier, D., Dusserre, E., Jones, P., & Beylot, M. (2003). Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *Journal of Lipid Research*, 44(4), 846–853. <https://doi.org/10.1194/JLR.M200461-JLR200>
- Elbaz, J. S. (1974). A PROPOS DES PLASTIES ABDOMINALES. TECHNIQUE DU “FER A CHEVAL.” *Annales de Chirurgie Plastique*, 19(2), 155–158.
- Entenmann, G., & Hauner, H. (1996). Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *The American Journal of Physiology*, 270(4 Pt 1). <https://doi.org/10.1152/AJPCCELL.1996.270.4.C1011>
- Felten, D. L., Shetty, A. Narsinha., & Netter, F. H. (Frank H. (2011). *Atlas de neurosciences humaines de Netter*.
- Ferrini, F., Salio, C., Boggio, E. M., & Merighi, A. (2021). Interplay of BDNF and GDNF in the Mature Spinal Somatosensory System and Its Potential Therapeutic Relevance. *Current Neuropharmacology*, 19(8), 1225–1245. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666201116143422>
- Flageul, G. (2001). *Chirurgie plastique de l'abdomen*.
- Fousek, K., Horn, L. A., & Palena, C. (2021). Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. *Pharmacology & Therapeutics*, 219. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107692>
- Gahagnon, T., Guerreschi, P., Pattou, F., & Martinot-duquennoy, V. (2011). [Study of the benefits after body contouring surgery at the university hospital in Lille]. *Annales de Chirurgie Plastique et Esthétique*, 56(4), 298–307. <https://doi.org/10.1016/J.ANPLAS.2011.05.001>
- Gelle, T., Samey, R. A., Plansont, B., Bessette, B., Jauberteau-Marchan, M. O., Lalloué, F., & Girard, M. (2021). BDNF and pro-BDNF in serum and exosomes in major depression: Evolution after antidepressant treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 109. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2020.110229>
- Ghosh, A., & Jayakumar, R. (2012). Modified abdominoplasty incision for short scar. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery: JPRAS*, 65(12), 1753–1754. <https://doi.org/10.1016/J.BJPS.2012.08.002>
- Giuseppe Sterzi. (1910). Giulio Casseri anatomico e chirurgo (1552 c.-1616). *Nuovo Archivio Veneto*, XIX, 25–111.
- Glicenstein, J. (1975). Les difficultés du traitement chirurgical des dermodystrophies abdominales. *Annales de Chirurgie Plastique*, 20(2), 147–155.
- Gliksman, J., Himy, S., Ringenbach, P., & Andreoletti, J. B. (2006). [Abdominoplasty: towards a two procedures surgery? Retrospective study of postoperative complications about 100 cases]. *Annales de Chirurgie Plastique et Esthétique*, 51(2), 151–156. <https://doi.org/10.1016/J.ANPLAS.2005.11.001>
- Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O. D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L. G., Pratt, R. E., Ingwall, J. S., & Dzau, V. J. (2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6), 661–669. <https://doi.org/10.1096/FJ.05-5211COM>
- González-Ulloa, M. (1960). Belt lipectomy. *British Journal of Plastic Surgery*, 13(C), 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0007-1226\(60\)80035-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1226(60)80035-5)

- Grazer, F. M. (1973). Abdominoplasty. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 51(6), 617–623. <https://doi.org/10.1097/00006534-197306000-00001>
- Grazer, F. M., & De Jong, R. H. (2000). Fatal outcomes from liposuction: census survey of cosmetic surgeons. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 105(1), 436–446. <https://doi.org/10.1097/00006534-200001000-00070>
- Green, B. G. (2004). Temperature perception and nociception. *Journal of Neurobiology*, 61(1), 13–29. <https://doi.org/10.1002/NEU.20081>
- Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Moos, M. C., Londos, C., & Kimmel, A. R. (1993). Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), 12035–12039. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.24.12035>
- Gregoire, F. M. (2001). Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 226(11), 997–1002. <https://doi.org/10.1177/153537020122601106>
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., & Sul, S. (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, 78(3).
- Grolleau, J. L., Lavigne, B., Chavoïn, J. P., & Costagliola, M. (1998). A predetermined design for easier aesthetic abdominoplasty. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 101(1), 215–221. <https://doi.org/10.1097/00006534-199801000-00037>
- Han, Y., Ren, J., Bai, Y., Pei, X., & Han, Y. (2019). Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 109, 59–68. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2019.01.017>
- He, Q., Engelson, E. S., & Kotler, D. P. (2005). A comparison of abdominal subcutaneous adipose tissue pattern in obese and lean HIV-infected women. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 53–57. <https://doi.org/10.1093/JN/135.1.53>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 1), 1–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>
- Hu, L., Wang, J., Zhou, X., Xiong, Z., Zhao, J., Yu, R., Huang, F., Zhang, H., & Chen, L. (2016). Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep32993>
- Hunstad, J., & Repta, R. (2009). Atlas of Abdominoplasty with DVD. *Atlas of Abdominoplasty with DVD*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4080-4.X0001-X>
- Ibrahimi, A., & Abumrad, N. A. (2002). Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5(2), 139–145. <https://doi.org/10.1097/00075197-200203000-00004>
- Illouz, Y. G. (1989). Refinements in the lipoplasty technique. *Clinics in Plastic Surgery*, 16(2), 217–233. [https://doi.org/10.1016/s0094-1298\(20\)31336-5](https://doi.org/10.1016/s0094-1298(20)31336-5)
- Illouz, Y. G. (1992). A new safe and aesthetic approach to suction abdominoplasty. *Aesthetic Plastic Surgery*, 16(3), 237–245. <https://doi.org/10.1007/BF00190070>
- Illouz, Y.-G. (2008). Liposculpture et chirurgie de la silhouette. *EMC - Techniques Chirurgicales - Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique*, 3(4), 1–34. [https://doi.org/10.1016/S1286-9325\(08\)44504-1](https://doi.org/10.1016/S1286-9325(08)44504-1)
- Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., Takeshita, F., Sakai, Y., Kuroda, M., & Ochiya, T. (2013). Human adipose tissue-derived

- mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Scientific Reports* 2013 3:1, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep01197>
- Kestens, V., Bozatzidis, V., De Temmerman, P. J., Ramaye, Y., & Roebben, G. (2017). Validation of a particle tracking analysis method for the size determination of nano- and microparticles. *Journal of Nanoparticle Research : An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology*, 19(8). <https://doi.org/10.1007/S11051-017-3966-8>
- Kim, Y. H., Cha, S. M., Naidu, S., & Hwang, W. J. (2011). Analysis of postoperative complications for superficial liposuction: a review of 2398 cases. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 127(2), 863–871. <https://doi.org/10.1097/PRS.0B013E318200AFBF>
- Kim, Y. J., Yoo, S. mi, Park, H. H., Lim, H. J., Kim, Y. L., Lee, S., Seo, K. W., & Kang, K. S. (2017). Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(2), 1102–1108. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.09.056>
- Kitzinger, H. B., Cakl, T., Wenger, R., Hacker, S., Aszmann, O. C., & Karle, B. (2013). Prospective study on complications following a lower body lift after massive weight loss. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 66(2), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2012.09.006>
- Klein, S., Fontana, L., Young, V. L., Coggan, A. R., Kilo, C., Patterson, B. W., & Mohammed, B. S. (2004). Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 350(25), 2549–2557. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA033179>
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P. V., & Lim, S. K. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4(3), 214–222. <https://doi.org/10.1016/J.SCR.2009.12.003>
- Laloze, J., Fiévet, L., & Desmoulière, A. (2021). Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Medicine: State of Play, Current Clinical Trials, and Future Prospects. *Advances in Wound Care*, 10(1), 24–48. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2020.1175>
- Laloze, J., Lupon, E., Girard, P., Gandolfi, S., Fiévet, L., & Desmoulière, A. (2021). Supplementation with Extracellular Vesicles Derived from Adipose-Derived Stem Cells Increases Fat Graft Survival and Browning in Mice: A Cell-Free Approach to Construct Beige Fat from White Fat Grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 147(5), 884E–886E. <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000007821>
- Laloze, J., Varin, A., Bertheuil, N., Grolleau, J. L., Vaysse, C., & Chaput, B. (2017). Cell-assisted lipotransfer: Current concepts. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique*, 62(6), 609–616. <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2017.03.011>
- Laloze, J., Varin, A., Gilhodes, J., Bertheuil, N., Grolleau, J. L., Brie, J., Usseglio, J., Sensebe, L., Filleron, T., & Chaput, B. (2018). Cell-assisted lipotransfer: Friend or foe in fat grafting? Systematic review and meta-analysis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2), e1237–e1250. <https://doi.org/10.1002/term.2524>
- Lamotte, R. H., Dong, X., & Ringkamp, M. (n.d.). *Sensory neurons and circuits mediating itch*. <https://doi.org/10.1038/nrn3641>
- Lancerotto, L., Stecco, C., MacChi, V., Porzionato, A., Stecco, A., & De Caro, R. (2011). Layers of the abdominal wall: Anatomical investigation of subcutaneous tissue and superficial fascia. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 33(10), 835–842. <https://doi.org/10.1007/s00276-010-0772-8>

- Lane, R. E., Korbie, D., Trau, M., & Hill, M. M. (2017). Purification Protocols for Extracellular Vesicles. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1660, 111–130.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_10/COVER
- Laviola, L., Perrini, S., Cignarelli, A., Natalicchio, A., Leonardini, A., De Stefano, F., Cuscito, M., De Fazio, M., Memeo, V., Neri, V., Cignarelli, M., Giorgino, R., & Giorgino, F. (2006). Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes*, 55(4), 952–961. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.55.04.06.DB05-1414>
- Le Louarn, C., & Pascal, J. F. (2000). High superior tension abdominoplasty. *Aesthetic Plastic Surgery*, 24(5), 375–381. <https://doi.org/10.1007/S002660010061>
- Le Louarn, C., Pascal, J. F., Levet, Y., Searle, A., & Thion, A. (2004). Abdominoplastic complications. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique*, 49(6), 601–604.
<https://doi.org/10.1016/j.anplas.2004.10.008>
- Le Saux, S., Aubert-Pouëssel, A., Mohamed, K. E., Martineau, P., Guglielmi, L., Devoisselle, J. M., Legrand, P., Chopineau, J., & Morille, M. (2021). Interest of extracellular vesicles in regards to lipid nanoparticle based systems for intracellular protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, 113837.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.113837>
- Lebonvallet, N., Laverdet, B., Misery, L., Desmoulière, A., & Girard, D. (2018). New insights into the roles of myofibroblasts and innervation during skin healing and innovative therapies to improve scar innervation. *Experimental Dermatology*, 27(9), 950–958.
<https://doi.org/10.1111/EXD.13681>
- Lechner, S. G., & Lewin, G. R. (n.d.). *Hairy Sensation*.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00059.2012>
- Lee, J. H., Yoo, J. H., Oh, S. H., Lee, K. Y., & Lee, K. H. (2010). Knockdown of moesin expression accelerates cellular senescence of human dermal microvascular endothelial cells. *Yonsei Medical Journal*, 51(3), 438–447.
<https://doi.org/10.3349/YMJ.2010.51.3.438>
- Lehnhardt, M., Homann, H. H., Daigeler, A., Hauser, J., Palka, P., & Steinau, H. U. (2008). Major and lethal complications of liposuction: a review of 72 cases in Germany between 1998 and 2002. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 121(6).
<https://doi.org/10.1097/PRS.0B013E318170817A>
- Letexier, D., Pinteaur, C., Large, V., Fréring, V., & Beylot, M. (2003). Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, 44(11), 2127–2134. <https://doi.org/10.1194/JLR.M300235-JLR200>
- Li, W., & Ahn, A. C. (2011). Subcutaneous fascial bands--a qualitative and morphometric analysis. *PloS One*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0023987>
- Li, X., Liu, L., Yang, J., Yu, Y., Chai, J., Wang, L., Ma, L., & Yin, H. (2016). Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation. *EBioMedicine*, 8, 72–82.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.030>
- Lillis, P. J. (1999). Liposuction of the knees, calves, and ankles. *Dermatologic Clinics*, 17(4), 865–879. [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(05\)70134-0](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(05)70134-0)
- Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N., & Brisson, A. R. (2015). High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles.
<https://doi.org/10.3402/Jev.v4.29509>, 4(1). <https://doi.org/10.3402/JEV.V4.29509>
- Liu, B., Kong, Y., Shi, W., Kuss, M., Liao, K., Hu, G., Xiao, P., Sankarasubramanian, J., Guda, C., Wang, X., Lei, Y., & Duan, B. (2021). Exosomes derived from differentiated

- human ADMSC with the Schwann cell phenotype modulate peripheral nerve-related cellular functions. *Bioactive Materials*, 14, 61–75.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.11.022>
- Liu, J., Yan, Z., Yang, F., Huang, Y., Yu, Y., Zhou, L., Sun, Z., Cui, D., & Yan, Y. (2021). Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Enhancing Angiogenesis through Delivering Angiopoietin-2. *Stem Cell Reviews and Reports*, 17(2), 305–317.
<https://doi.org/10.1007/S12015-020-09992-7/METRICS>
- Lockwood, T. (1993). Lower body lift with superficial fascial system suspension. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 92(6), 1112–1122. <https://doi.org/10.1097/00006534-199311000-00018>
- Lockwood, T. (1995). High-lateral-tension abdominoplasty with superficial fascial system suspension. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 96(3), 603–615.
<https://doi.org/10.1097/00006534-199509000-00012>
- Lockwood, T. E. (1991). Transverse flank-thigh-buttock lift with superficial fascial suspension. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 87(6), 1019–1027.
<https://doi.org/10.1097/00006534-199106000-00002>
- Luiken, J. J. F. P., Coort, S. L. M., Koonen, D. P. Y., Van Der Horst, D. J., Bonen, A., Zorzano, A., & Glatz, J. F. C. (2004). Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 448(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S00424-003-1199-4>
- Maas, S. L. N., Broekman, M. L. D., & de Vrij, J. (2017). Tunable resistive pulse sensing for the characterization of extracellular vesicles. *Methods in Molecular Biology*, 1545, 21–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_2/COVER
- Marin, P., Høgh-Kristiansen, I., Jansson, S., Krotkiewski, M., Holm, G., & Bjorntorp, P. (1992). Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans. *The American Journal of Physiology*, 263(3 Pt 1).
<https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1992.263.3.E473>
- Markman, B., & Barton, F. E. (1987). Anatomy of the subcutaneous tissue of the trunk and lower extremity. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 80(2), 248–254.
<https://doi.org/10.1097/00006534-198708000-00015>
- Mathen, C., Ghag Sawant, M., Gupta, R., Dsouza, W., & Krishna, S. G. (2021). Evaluation of Potential Application of Wharton’s Jelly-Derived Human Mesenchymal Stromal Cells and its Conditioned Media for Dermal Regeneration using Rat Wound Healing Model. *Cells Tissues Organs*, 210(1), 31–44. <https://doi.org/10.1159/000513895>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology* 2019 21:1, 21(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- McBride, J. D., Rodriguez-Menocal, L., Guzman, W., Candanedo, A., Garcia-Contreras, M., & Badiavas, E. V. (2017). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived CD63+ Exosomes Transport Wnt3a Exteriorly and Enhance Dermal Fibroblast Proliferation, Migration, and Angiogenesis In Vitro. <https://Home.Liebertpub.Com/Scd>, 26(19), 1384–1398. <https://doi.org/10.1089/SCD.2017.0087>
- Mead, J. R., Irvine, S. A., & Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 80(12), 753–769. <https://doi.org/10.1007/S00109-002-0384-9>
- Mehanna, R. A., Nabil, I., Attia, N., Bary, A. A., Razek, K. A., Ahmed, T. A. E., & Elsayed, F. (2015). The Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their

- Conditioned Media Topically Delivered in Fibrin Glue on Chronic Wound Healing in Rats. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/846062>
- Mol, E. A., Goumans, M. J., Doevendans, P. A., Sluijter, J. P. G., & Vader, P. (2017). Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(6), 2061–2065. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2017.03.011>
- Nash, L. G., Phillips, M. N., Nicholson, H., Barnett, R., & Zhang, M. (2004). Skin ligaments: regional distribution and variation in morphology. *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 17(4), 287–293. <https://doi.org/10.1002/CA.10203>
- Nemerofsky, R. B., Oliak, D. A., & Capella, J. F. (2006). Body lift: an account of 200 consecutive cases in the massive weight loss patient. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(2), 414–430. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000197524.18233.BB>
- Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y., & Kadowaki, T. (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(6), 1354–1361. <https://doi.org/10.1172/JCI1235>
- Osteikoetxea, X., Balogh, A., Szabó-Taylor, K., Németh, A., Szabó, T. G., Pálóczi, K., Sódar, B., Kittel, Á., György, B., Pállinger, É., Matkó, J., & Buzás, E. I. (2015). Improved Characterization of EV Preparations Based on Protein to Lipid Ratio and Lipid Properties. *PLOS ONE*, 10(3), e0121184. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0121184>
- Osteikoetxea, X., Sódar, B., Németh, A., Szabó-Taylor, K., Pálóczi, K., Vukman, K. V., Tamási, V., Balogh, A., Kittel, Á., Pállinger, É., & Buzás, E. I. (2015). Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(38), 9775–9782. <https://doi.org/10.1039/C5OB01451D>
- Padeta, I., Nugroho, W. S., Kusindarta, D. L., Fibrianto, Y. H., & Budipitojo, T. (2017). Mesenchymal Stem Cell-conditioned Medium Promote the Recovery of Skin Burn Wound. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(3), 132–141. <https://doi.org/10.3923/AJAVA.2017.132.141>
- Park, H. S., & Lee, K. (2005). Greater beneficial effects of visceral fat reduction compared with subcutaneous fat reduction on parameters of the metabolic syndrome: a study of weight reduction programmes in subjects with visceral and subcutaneous obesity. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 22(3), 266–272. <https://doi.org/10.1111/J.1464-5491.2004.01395.X>
- Pascal, J. F., & Le Louarn, C. (2002). Remodeling bodylift with high lateral tension. *Aesthetic Plastic Surgery*, 26(3), 223–230. <https://doi.org/10.1007/S00266-002-1478-Z>
- Payushina, O. V., Butorina, N. N., Sheveleva, O. N., & Domaratskaya, E. I. (2018). Effect of Mesenchymal Stromal Cells and Conditioned Media on Healing of Skin Wound. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 165(4), 572–575. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4215-6>
- Pelizzo, G., Avanzini, M. A., Icaro Cornaglia, A., De Silvestri, A., Mantelli, M., Travaglino, P., Croce, S., Romano, P., Avolio, L., Iacob, G., Dominici, M., & Calcaterra, V. (2018). Extracellular vesicles derived from mesenchymal cells: perspective treatment for cutaneous wound healing in pediatrics. *Regenerative Medicine*, 13(4), 385–394. <https://doi.org/10.2217/RME-2018-0001>
- Potenzieri, C., & Udem, B. J. (n.d.). *Basic Mechanisms of Itch*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03791.x>

- Rao, R. B., Ely, S. F., & Hoffman, R. S. (1999). Deaths Related to Liposuction. *New England Journal of Medicine*, 340(19), 1471–1475.
<https://doi.org/10.1056/nejm199905133401904>
- Raposo, E., Caruana, G., Bonomini, S., & Libondi, G. (2014). A Novel and Effective Strategy for the Isolation of Adipose-Derived Stem Cells. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 133(6), 1406–1409. <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000000170>
- Regnault, P. (1975). Abdominal dermolipectomies. *Clinics in Plastic Surgery*, 2(3), 411–429.
[https://doi.org/10.1016/s0094-1298\(20\)30299-6](https://doi.org/10.1016/s0094-1298(20)30299-6)
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., & Hanson, R. W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 30413–30416.
<https://doi.org/10.1074/JBC.R300017200>
- Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M., & Neth, P. (2007). MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, 109(9), 4055–4063.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-10-051060>
- Rodby, K. A., Stepniak, J., Eisenhut, N., & Lentz, C. W. (2011). Abdominoplasty with suction undermining and plication of the superficial fascia without drains: a report of 113 consecutive patients. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 128(4), 973–981.
<https://doi.org/10.1097/PRS.0B013E3182268D88>
- Saheli, M., Bayat, M., Ganji, R., Hendudari, F., Kheirjou, R., Pakzad, M., Najar, B., & Piryaei, A. (2020). Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors. *Archives of Dermatological Research*, 312(5), 325–336. <https://doi.org/10.1007/S00403-019-02016-6/METRICS>
- Samama, C.-M., Gafsou, B., Jeandel, T., Laporte, S., Steib, A., Marret, E., Albaladejo, P., Mismetti, P., & Rosencher, N. (2011). Prévention de la maladie thromboembolique veineuse postopératoire. Actualisation 2011. Texte court. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 30(12), 947–951.
<https://doi.org/10.1016/J.ANNFAR.2011.10.008>
- Santos, J. M., Camões, S. P., Filipe, E., Cipriano, M., Barcia, R. N., Filipe, M., Teixeira, M., Simões, S., Gaspar, M., Mosqueira, D., Nascimento, D. S., Pinto-Do-Ó, P., Cruz, P., Cruz, H., Castro, M., & Miranda, J. P. (2015). Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1186/S13287-015-0082-5/FIGURES/7>
- Schultz, R. L., Feitis, R., & Sallas, D. (1996). *The endless web: fascial anatomy and physical reality*. 126.
https://books.google.com/books/about/The_Endless_Web.html?hl=fr&id=0R3grwUxWO8C
- Sen, A., Lea-Currie, Y. R., Sujkowska, D., Franklin, D. M., Wilkison, W. O., Halvorsen, Y. D. C., & Gimble, J. M. (2001). Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *Journal of Cellular Biochemistry*, 81(2), 312–319. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20010501\)81:2<312::AID-JCB1046>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20010501)81:2<312::AID-JCB1046>3.0.CO;2-Q)
- Sensebé, L., Bourin, P., & Tarte, K. (2011). Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Human Gene Therapy*, 22(1), 19–26.
<https://doi.org/10.1089/hum.2010.197>

- Sensebé, L., Gadelorge, M., & Fleury-Cappellesso, S. (2013). Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3). <https://doi.org/10.1186/SCRT217>
- Sensebé, L., Tarte, K., Galipeau, J., Krampera, M., Martin, I., Phinney, D. G., & Shi, Y. (2012). Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell*, 10(1), 9–10. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.005>
- Shabbir, A., Cox, A., Rodriguez-Menocal, L., Salgado, M., & Van Badiavas, E. (2015). Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Https://Home.Liebertpub.Com/Scd*, 24(14), 1635–1647. <https://doi.org/10.1089/SCD.2014.0316>
- Shrestha, C., Zhao, L., Chen, K., He, H., & Mo, Z. (2013). Enhanced healing of diabetic wounds by subcutaneous administration of human umbilical cord derived stem cells and their conditioned media. *International Journal of Endocrinology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/592454>
- Skobe, M., & Detmar, M. (2000). Structure, Function, and Molecular Control of the Skin Lymphatic System. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5, 14–19. <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00001.x>
- Škuljec, J., Sun, H., Pul, R., Bénardais, K., Ragancokova, D., Moharreggh-Khiabani, D., Kotsiari, A., Trebst, C., & Stangel, M. (2011). CCL5 induces a pro-inflammatory profile in microglia in vitro. *Cellular Immunology*, 270(2), 164–171. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2011.05.001>
- Spiegelman, B. M., & Farmer, S. R. (1982). Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell*, 29(1), 53–60. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90089-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90089-7)
- Stanca Melincovici, C., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I.-M., Roman, A. L., & Mişu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*, 59(2), 455–467. <http://www.rjme.ro/>
- Staubach, S., Bauer, F. N., Tertel, T., Börger, V., Stambouli, O., Salzig, D., & Giebel, B. (2021). Scaled preparation of extracellular vesicles from conditioned media. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 177, 113940. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.113940>
- Sul, H. S., Smas, C., Mei, B., & Zhou, L. (2000). Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *International Journal of Obesity*, 24, S15–S19. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801494>
- Sun, J. Y., Zhang, Y. F., Song, X. J., Zhu, J., & Zhu, Q. S. (2019). The Healing Effects of Conditioned Medium Derived from Mesenchymal Stem Cells on Radiation-Induced Skin Wounds in Rats. *Cell Transplantation*, 28(1), 105–115. https://doi.org/10.1177/0963689718807410/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0963689718807410-FIG7.JPEG
- Svoboda, P., Kantorová, I., Scheer, P., Radvanova, J., & Radvan, M. (2007). Can procalcitonin help us in timing of re-intervention in septic patients after multiple trauma or major surgery? *Hepato-Gastroenterology*, 54(74), 359–363.
- Tarcisia, T., Damayanti, L., Antarianto, R. D., Moenadjat, Y., & Pawitan, J. A. (2017). Adipose derived stem cell conditioned medium effect on proliferation phase of wound healing in Sprague Dawley rat. *Medical Journal of Indonesia*, 26(4), 239–245. <https://doi.org/10.13181/MJI.V26I4.1755>

- Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J. J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., Splingard, M., Dulong, J., Monnier, D., Gourmelon, P., Gorin, N. C., & Sensebé, L. (2010). Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*, *115*(8), 1549–1553. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-05-219907>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, *30*(1), 3.22.1-3.22.29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.CB0322S30>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>, *7*(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thörne, A., Lönnqvist, F., Apelman, J., Hellers, G., & Arner, P. (2002). A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *26*(2), 193–199. <https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0801871>
- Ti, D., Hao, H., Tong, C., Liu, J., Dong, L., Zheng, J., Zhao, Y., Liu, H., Fu, X., & Han, W. (2015). LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *Journal of Translational Medicine*, *13*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12967-015-0642-6/FIGURES/8>
- Tögel, F., Weiss, K., Yang, Y., Hu, Z., Zhang, P., & Westenfelder, C. (2007). Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *292*(5). <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00339.2006>
- Tonnard, P., Verpaele, A., Peeters, G., Hamdi, M., Cornelissen, M., & Declercq, H. (2013). Nanofat grafting: Basic research and clinical applications. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *132*(4), 1017–1026. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31829fe1b0>
- Varderidou-Minasian, S., & Lorenowicz, M. J. (2020). Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair: challenges and opportunities. *Theranostics*, *10*(13), 5979–5997. <https://doi.org/10.7150/THNO.40122>
- Vernon, S. (1957). Umbilical transplantation upward and abdominal contouring in lipectomy. *American Journal of Surgery*, *94*(3), 490–492. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(57\)90807-3](https://doi.org/10.1016/0002-9610(57)90807-3)
- Verreth, W., De Keyzer, D., Pelat, M., Verhamme, P., Ganame, J., Bielicki, J. K., Mertens, A., Quarck, R., Benhablès, N., Marguerie, G., Mackness, B., Mackness, M., Ninio, E., Herregods, M. C., Balligand, J. L., & Holvoet, P. (2004). Weight-loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. *Circulation*, *110*(20), 3259–3269. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000147614.85888.7A>

- Vico, P. G., De Vooght, A., & Nokerman, B. (2010). Circumferential body contouring in bariatric and non-bariatric patient. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 63(5), 814–819. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.01.075>
- Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 21(6), 697–738. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0415>
- Wang, Z. gang, He, Z. yi, Liang, S., Yang, Q., Cheng, P., & Chen, A. min. (2020). Comprehensive proteomic analysis of exosomes derived from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13287-020-02032-8/FIGURES/7>
- Weiner, F. R., Shah, A., Smith, P. J., Rubin, C. S., & Zern, M. A. (1989). Regulation of collagen gene expression in 3T3-L1 cells. Effects of adipocyte differentiation and tumor necrosis factor alpha. *Biochemistry*, 28(9), 4094–4099. <https://doi.org/10.1021/BI00435A070>
- Weng, Y., Sui, Z., Shan, Y., Hu, Y., Chen, Y., Zhang, L., & Zhang, Y. (2016). Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst*, 141(15), 4640–4646. <https://doi.org/10.1039/C6AN00892E>
- Wiklander, O. P. B., Brennan, M., Lötvall, J., Breakefield, X. O., & Andaloussi, S. E. L. (2019). Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Science Translational Medicine*, 11(492). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAV8521>
- Yan, L., Liu, G., & Wu, X. (2020). Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells in mechanical environment show improved osteochondral activity via upregulation of LncRNA H19. *Journal of Orthopaedic Translation*, 26, 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.JOT.2020.03.005>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. <https://doi.org/10.3402/Jev.v4.27066>, 4(2015), 1–60. <https://doi.org/10.3402/JEV.V4.27066>
- Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I., & Gonda, K. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of Cellular Physiology*, 208(1), 64–76. <https://doi.org/10.1002/JCP.20636>
- Zhang, B., Shi, Y., Gong, A., Pan, Z., Shi, H., Yang, H., Fu, H., Yan, Y., Zhang, X., Wang, M., Zhu, W., Qian, H., & Xu, W. (2016). HucMSC Exosome-Delivered 14-3-3ζ Orchestrates Self-Control of the Wnt Response via Modulation of YAP During Cutaneous Regeneration. *Stem Cells*, 34(10), 2485–2500. <https://doi.org/10.1002/STEM.2432>
- Zhang, B., Wang, M., Gong, A., Zhang, X., Wu, X., Zhu, Y., Shi, H., Wu, L., Zhu, W., Qian, H., & Xu, W. (2015). HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells*, 33(7), 2158–2168. <https://doi.org/10.1002/STEM.1771>
- Zhang, B., Wu, X., Zhang, X., Sun, Y., Yan, Y., Shi, H., Zhu, Y., Wu, L., Pan, Z., Zhu, W., Qian, H., & Xu, W. (2015). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Exosomes Enhance Angiogenesis Through the Wnt4/β-Catenin Pathway. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(5), 513–522. <https://doi.org/10.5966/SCTM.2014-0267>

- Zhang, W., Bai, X., Zhao, B., Li, Y., Zhang, Y., Li, Z., Wang, X., Luo, L., Han, F., Zhang, J., Han, S., Cai, W., Su, L., Tao, K., Shi, J., & Hu, D. (2018). Cell-free therapy based on adipose tissue stem cell-derived exosomes promotes wound healing via the PI3K/Akt signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 370(2), 333–342.
<https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2018.06.035>
- Zhu, Y. Z., Zhang, J., Hu, X., Wang, Z. H., Wu, S., & Yi, Y. Y. (2020). Supplementation with Extracellular Vesicles Derived from Adipose-Derived Stem Cells Increases Fat Graft Survival and Browning in Mice: A Cell-Free Approach to Construct Beige Fat from White Fat Grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 145(5), 1183–1195.
<https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000006740>
- Zimmerman, A., Bai, L., & Ginty, D. D. (2015). *The gentle touch receptors of mammalian skin HHS Public Access*. <https://doi.org/10.1126/science.1254229>
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., & Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306(5700), 1383–1386. <https://doi.org/10.1126/science.1100747>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228.
<https://doi.org/10.1089/107632701300062859>

Spécificités des cellules stromales mésenchymateuses isolées des deux couches du tissu adipeux sous-cutané : rôles de leur sécrétion sur l'angiogenèse et la neurogenèse

Ces dernières années, les cellules stromales mésenchymateuses ont suscité un engouement au sein de la communauté scientifique dans le domaine de la régénération tissulaire, grâce à leurs propriétés trophiques et immunomodulatrices. Plus particulièrement, les cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux (AD-MSCs) sont de plus en plus utilisées en chirurgie plastique mais aussi en recherche fondamentale et clinique. Elles ont un impact par exemple sur la survie du lipofilling, sur le traitement des douleurs neuropathiques après incisions chirurgicales, sur les problèmes d'ischémie-reperfusion... Malgré la diversité des approches d'ingénierie tissulaire et les recherches sur les substituts cutanés, la prise en charge des plaies chroniques reste un défi majeur de santé publique. La littérature récente montre que les effets de ces cellules sont liés principalement à leur sécrétion paracrine : dans le surnageant de culture ou via les exosomes. Le tissu adipeux abdominal sous-cutané (AAT) est divisé en deux couches : la couche superficielle (sAAT) et la couche profonde (dAAT). Cependant, il n'est pas certain que chaque couche présente des caractéristiques similaires et pertinentes en termes de potentiel régénérateur des AD-MSCs. Le premier axe du travail a été de comparer les caractéristiques des AD-MSCs (obtenues par digestion enzymatique du TA d'abdominoplasties) par cytométrie en flux, par essai de prolifération et de différenciation en cellules mésodermiques. Une comparaison de leurs propriétés immunosuppressives a également été réalisée. Après une revue de la littérature exhaustive sur les AD-MSCs, nous avons voulu comparer les effets de ces cellules et de leurs produits de sécrétion sur leurs capacités angiogéniques et neurostimulatrices. Nous avons commencé par comparer le profil sécrétoire des AD-MSCs par Proteom Profiler®. A la suite de ces résultats, nous nous sommes intéressés aux effets du sécrétome complet et des exosomes sur la migration des cellules endothéliales puis la formation de réseaux vasculaires, du côté angiogénique, et sur la repousse axonale après blessure ainsi que la croissance neuritique d'un point de vue neuromodulation. Tout d'abord, nos résultats montrent qu'il existe bien une différence entre les deux couches du TA, notamment sur la prolifération des AD-MSCs en faveur du sAAT et sur la différenciation adipogénique en faveur du dAAT. L'analyse phénotypique de la fraction stromale vasculaire a révélé que la couche superficielle était plus pure avec moins de cellules hématopoïétiques et plus d'AD-MSCs. Ensuite, l'analyse des caractéristiques des exosomes obtenus par ultracentrifugation différentielle n'a pas montré de différences significatives entre les deux couches. L'analyse du contenu cytokinique du surnageant complet et des exosomes n'a détecté aucune différence également. En ce qui concerne l'angiogénèse, nous nous sommes rendus compte que le sécrétome était délétère par rapport au contrôle quant à la formation d'un réseau vasculaire et à la migration des cellules endothéliales. Les exosomes avaient un effet pro-angiogénique mineur cependant plus important que le sécrétome complet. En ce qui concerne la neuritogenèse, les exosomes possédaient des effets encore une fois plus intéressants que le sécrétome. De plus, les exosomes des AD-MSCs issues du dAAT étaient significativement plus intéressants que ceux des AD-MSCs issues du sAAT pour la croissance neuritique uniquement. Ainsi, ils semblent plus efficaces sur la neuromodulation, alors que les exosomes d'aucune couche n'ont d'impact significatif sur la fonction endothéliale. Dans tous les cas, les exosomes possèdent des propriétés plus importantes que le sécrétome complet. En conclusion, des différences parfois significatives ont été mises en évidence entre les deux couches et entre les produits de sécrétion ce qui laisse entrevoir des perspectives cliniques différentes en fonction de la couche prélevée.

Mots-clés : AD-MSCs, tissu adipeux, exosomes, innervation, angiogenèse, cicatrisation cutanée

Specific features of mesenchymal stromal cells isolated from both layers of subcutaneous adipose tissue: roles of their secretion on angiogenesis and neurogenesis

In recent years, mesenchymal stromal cells have become a hot topic in the scientific community in the field of tissue regeneration, thanks to their trophic and immunomodulatory properties. In particular, adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (AD-MSCs) are increasingly used in plastic surgery, as well as in basic and clinical research. Despite the diversity of tissue engineering approaches and research into skin substitutes, the management of chronic wounds remains a major public health challenge. Recent literature shows that the effects of these cells are mainly linked to their paracrine secretion: in the culture supernatant or via exosomes. Subcutaneous abdominal adipose tissue (AAT) is divided into two layers: the superficial layer (sAAT) and the deep layer (dAAT). However, it is not clear whether each layer has similar characteristics relevant to the regenerative potential of AD-MSCs. The first line of work was to compare the characteristics of AD-MSCs (obtained by enzymatic digestion of abdominoplasty) by flow cytometry, proliferation assay and differentiation assay into mesodermal cells. A comparison of their immunosuppressive properties was also carried out. Following an exhaustive literature review on AD-MSCs, we set out to compare the effects of these cells and their secretory products on their angiogenic and neurostimulatory capacities. We began by comparing the secretory profile of AD-MSCs using Proteom Profiler®. Following these results, we turned our attention to the effects of the complete secretome and exosomes on endothelial cell migration and vascular network formation, from the angiogenic point of view, and on axonal regrowth after injury and neuritic growth from a neuromodulatory point of view. First, our results show that there is indeed a difference between the two layers of the AT, notably on AD-MSCs proliferation in favor of sAAT and on adipogenic differentiation in favor of dAAT. Phenotypic analysis of the vascular stromal fraction revealed that the superficial layer was more pure, with fewer hematopoietic cells and more AD-MSCs. Next, analysis of exosome characteristics obtained by differential ultracentrifugation showed no significant differences between the two layers. Analysis of the cytokine content of the complete supernatant and exosomes detected no differences either. Regarding angiogenesis, we found that the secretome was deleterious to vascular network formation and endothelial cell migration compared with the control. Exosomes had minor pro-angiogenic effects, but therefore more important than the complete secretome. Regarding neuritogenesis, exosomes again had more interesting effects than the secretome. Moreover, exosomes obtained from dAAT-derived AD-MSCs were significantly more interesting than those obtained from sAAT-derived AD-MSCs for neuritic growth alone. Thus, they appear to be more effective on neuromodulation, whereas no exosomes of the two layers have any significant impact on endothelial function. In all cases, exosomes possess more important properties than the complete secretome. In conclusion, some significant differences between the two layers and between the secretion products were highlighted, suggesting different clinical prospects depending on the layer harvested.

Keywords: AD-MSCs, adipose tissue, exosomes, innervation, angiogenesis, skin repair

