

Régénération Tissulaire PRP-GRAISSE : Applications potentielles et cadre juridique

Tissue Regeneration PRP-FAT: Potential Applications and Legal Framework

B Hersant, M Sid Ahmed-Mezi, S La Padula, JP Meningaud

Département de chirurgie plastique, reconstructrice, esthétique et maxillo-faciale - Hôpital Henri Mondor - Créteil, France.

Résumé

Le tissu adipeux présente l'avantage de la facilité de prélèvement et la possibilité de pouvoir réaliser des autogreffes. L'intérêt du lipofilling a été longtemps considéré comme volumateur mais la découverte de son caractère trophique a fait du lipofilling le traitement de médecine régénérative le plus utilisé dans le domaine de la régénération tissulaire.

En effet, le tissu adipeux est une source potentielle de cellules souches adultes dites de type mésenchymateux (CSM) avec de multiples potentiels de différenciation. Les CSM sont isolés à partir de la mise en culture de la fraction stromale vasculaire (SVF) constituée d'une population hétérogène de cellules aux propriétés régénératives. La SVF est issue de la digestion enzymatique ou du fractionnement mécanique du tissu adipeux. Elle est ainsi considérée comme un produit cellulaire alternatif permettant de s'affranchir des étapes de culture et d'expansion cellulaire des CSM.

Malheureusement, en France, l'utilisation des CSM et de la SVF doivent répondre à des contraintes réglementaires étant des produits de la thérapie cellulaire ou « Médicament de Thérapie Innovante » MTI (Directive Européenne 2009/12/CE) limitant ainsi leur utilisation par les équipes de recherche pour des validations en clinique. Ces limites ont permis de développer de nouvelles techniques de transfert de tissu adipeux sans passer par des étapes de digestion ou de culture cellulaire. Ainsi, le développement de canules permettant le prélèvement de « micro » lobules adipeux a permis l'utilisation d'une graisse riche en cellules souches. Plus récemment, Tonnard et al (14). ont décrit une technique mécanique permettant l'obtention de graisse émulsifiée ou « nanofat » à partir d'un prélèvement de micrograisse. Selon les auteurs, cette graisse émulsifiée serait riche en cellules progénitrices.

Ces outils de médecine régénérative devraient être utilisés et validés pour des indications précises dans chaque domaine chirurgical.

Mots clés

- ◆ Médecine régénérative
- ◆ Régénération tissulaire
- ◆ PRP
- ◆ Graisse
- ◆ Lipofilling
- ◆ Micrograisse
- ◆ Nanograisse
- ◆ Cadre juridique

Abstract

Adipose tissue has the advantage of easy removal and the possibility of autografts. The interest of lipofilling has long been considered as volumizing but the discovery of its trophic character has made lipofilling the most used regenerative medicine treatment in the field of tissue regeneration.

Indeed, adipose tissue is a potential source of adult stem cells known as mesenchymal stem cells (MSC) with multiple differentiation potentials. MSCs are isolated from the culture of the stromal vascular fraction (SVF), a heterogeneous population of cells with regenerative properties. SVF is derived from enzymatic digestion or mechanical fractionation of adipose tissue. It is thus considered as an alternative cell product that allows to avoid the culture and cell expansion stages of MSCs.

Unfortunately, in France, the use of MSCs and SVF must meet regulatory constraints as they are cell therapy products or "Medicinal Products for Innovative Therapy" MTI (European Directive 2009/12/EC), limiting their use by research teams for clinical validation. These limits have allowed the development of new adipose tissue transfer techniques without going through digestion or cell culture steps. Thus, the development of cannulas for the removal of "micro" adipose lobules has made it possible to use fat rich in stem cells. More recently, Tonnard et al (14). have described a mechanical technique for obtaining emulsified fat or "nanofat" from a micro-fat sample. According to the authors, this emulsified fat would be rich in progenitor cells.

These tools of regenerative medicine should be used and validated for precise indications in each surgical field.

Keywords

- ◆ Regenerative medicine
- ◆ Tissue regeneration
- ◆ PRP
- ◆ Fat
- ◆ Lipofilling
- ◆ Microfat
- ◆ Nano-fat
- ◆ Legal framework

Correspondance

*Barbara Hersant, MD, PhD - Département de chirurgie plastique, reconstructrice, esthétique et maxillo-faciale - Hôpital Henri Mondor - 51, Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil.
E-mail : barbara.hersant@gmail.com - Tel : 01 49 81 21 11*

Lipofilling ou greffe de tissu adipeux : une thérapie avancée

L'intérêt du lipofilling a été longtemps considéré comme volumateur mais la découverte de son caractère trophique (2000) a fait du lipofilling le traitement de médecine régénérative le plus utilisé.

Des études récentes ont démontré que la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux représentait un réservoir de cellules précurseurs dont le potentiel pro-angiogénique était comparable à celui des cellules souches dérivées de la moelle osseuse (1). De plus, il a été démontré que des cellules souches mésenchymateuses (CSM) étaient également présentes dans le tissu adipeux. Ce dernier représente donc un nouveau réservoir potentiel de cellules pluripotentes qui pourraient être utilisées en médecine régénérative.

Le transfert de tissu adipeux autologue est une procédure déjà appliquée pour obtenir l'augmentation des pertes de volume des tissus mous. Les greffes de tissu adipeux prélevé par liposuction sont réinjectées de manière sous-cutanée pour restaurer les volumes des zones en défaut. Ainsi, la greffe de tissu adipeux est utilisée pour corriger des déformations congénitales et des plaies traumatiques complexes avec perte de tissu mou, après une chirurgie oncologique, après séquelles de radiothérapie (2).

Nouvelles techniques de transfert de tissu adipeux riches en cellules progénitrices

Une des contraintes de l'utilisation des MTI en cliniques est le délai nécessaire et les coûts associés à leur amplification in vitro. Ces limites ont conduit au développement de nouveaux produits cellulaires.

Plusieurs techniques ont été proposées pour le prélèvement du tissu adipeux. Coleman et al. (3) ont décrit une technique minimisant le traumatisme des adipocytes. Avec une canule à 2 trous de 3 mm à bords arrondis reliée à une seringue de 10 mL, la graisse est aspirée manuellement en retirant le piston. La canule est poussée à travers le site de prélèvement, le chirurgien tire sur le piston de la seringue et créer une légère pression négative qui permet à des lambeaux de graisse de passer à travers la canule et l'ouverture Luer-Lok dans le cylindre de la seringue. Une fois remplie, la seringue est déconnectée de la canule, qui est remplacée par un bouchon qui scelle l'extrémité Luer-Lok de la seringue. La graisse aspirée dans les seringues est centrifugée à 3000 RPM (Rotation per minute) pendant 3 min pour isoler la 2^e graisse. Cependant, la diminution du temps de centrifugation à 1mn a montré récemment son intérêt pour la viabilité cellulaire (4) Après la centrifugation, trois couches sont observées : la première couche comprend l'huile, qui peuvent être éliminés à l'aide d'un matériau absorbant ; la deuxième couche est constituée de tissu adipeux ; et la troisième couche contient du sang, du liquide tissulaire et l'anesthésique local et est éjectée de la base de la seringue. La couche intermédiaire est utilisée pour la greffe de tissu adipeux (5).

De nouvelles techniques de prélèvement de tissu adipeux ont été développées en utilisant des canules de seulement 0.7 mm de diamètre, utilisées pour traiter les zones délicates du visage telles que les paupières et les lèvres.

Trois types de graisse sont distingués

Macrofat

La graisse macrofat se caractérise par des lobules de graisses d'un diamètre de 2,4 mm. La graisse macrofat est de nature plus structurée et s'injecte facilement à travers une canule de calibre 18 ou 19G (gauge). La graisse macrofat est utilisée pour l'augmentation structurale dans les régions temporales, les compartiments graisseux profonds de la joue (médiale et prézygomatique, la région pyriforme, la mandibule, la région latérale des sourcils, le pont nasal et la columelle ainsi que le menton et les lèvres). Elle est à risque de résorption, de cystostéatonecrose, de kystes huileux et d'infection (6-8).

Microfat

La micrograisse (microfat) est caractérisée par des lobules de graisses d'un diamètre de 1 mm et sont obtenues en prélevant la graisse avec des canules de 2 mm de diamètre dont les multiples trous font chacun moins de 1 mm. La microcanule de prélèvement possède des orifices conçus spécifiquement pour fournir un prélèvement de graisse constitué de lobules d'adipocytes calibrés en volume. Les microcanules de déposition possèdent un diamètre calibré sur la taille des unités cellulaires obtenus avec la canule de prélèvement (Figure 1).

La micro-graisse est utilisée pour la trophicité mais aussi pour le comblement.

Nanofat

La nano-graisse (nanofat) est caractérisée par des lobules de graisse de 400 à 600 µm. La nano-graisse est obtenue en prenant la micrograisse émulsifiée et en la faisant passer entre deux seringues de 10ml reliées entre elles par un connecteur Luer-Lok femelle-femelle. Après 3 minutes de transfert continu (20 à 30 passages), la graisse est devenue un liquide émulsifié avec un aspect blanchâtre riche en SVF. La matière grasse émulsionnée est par la suite filtrée à travers un filtre superfin pour obtenir le nanofat (9).

La nanofat peut être facilement injectée à l'aide d'une aiguille de calibre 27, 30, 32 G. Il s'agit d'un ensemencement cellulaire destiné à l'amélioration de la trophicité.

Les nano-graisses peuvent être centrifugées pour éliminer les acides gras libres et créer un gel qui peut être appliqué en combinaison avec une crème qui favorise la pénétration dermique et peut être appliquée par des techniques de mésothérapie après un resurfaçage au laser ou un lifting du visage. Une combinaison des trois types de greffes de graisse est utilisée dans une chirurgie esthétique faciale ou une greffe de graisse faciale (10-13).

Tonnard et al ont cherché à déterminer le contenu cellulaire des greffes de nanofat (14). Dans leur étude, ils ont montré que les greffes de nanofat étaient dépourvues d'adipocytes matures et l'architecture native était perturbée. Cependant, les nanogreffes ont conservé un approvisionnement riche en cellules souches adipeuses. Plusieurs cas cliniques utilisant des

greffes de nanofat ont montré une amélioration de la qualité de la peau 6 mois après l'intervention. Par conséquent, l'auteur suggère que même si les nanogreffes ne contiennent pas d'adipocytes viables, leur teneur élevée en cellules souches est cliniquement utiles dans les indications de rajeunissements de la peau.

Association du PRP et lipofilling et applications cliniques

Le PRP (Plasma Riche en Plaquettes) et le tissu adipeux sont utilisés dans différentes aires thérapeutiques (15).

Lipofilling-PRP en chirurgie plastique

En chirurgie plastique, reconstructrice et maxillofaciale, le PRP en association au tissu adipeux est utilisé dans les lésions cutanées et la cicatrisation des plaies notamment pour le traitement des pertes de substances cutanées d'origine traumatiques, post-infectieuse, post-inflammatoires, la restauration des volumes (Figure 2), pour le traitement des cicatrices de brûlure dans le but d'améliorer la trophicité des cicatrices (Figure 3), cicatrices pathologiques (cicatrices chéloïdes), les greffes de peau, les radiodermes et des ulcères de la peau ainsi pour le comblement de defects pathologiques comme les lipodystrophies et les atrophies faciales. En chirurgie maxillo-faciale et esthétique, ces produits cellulaires sont utilisés dans les fentes maxillofaciales, liftings cervico facials et le rajeunissement facial (16-19).

Lipofilling et/ou PRP en urologie

En urologie, le PRP est en étude dans la dysfonction érectile et le traitement de la fertilité et la régénération de la vessie et des reins. En association au lipofilling, le PRP est également évalué pour le traitement des fistules (20).

Lipofilling et/ou PRP en gynécologie

Différentes études cliniques ont rapporté également des applications du PRP dans les troubles urogénitaux (syndrome génito-urinaire, fistules génitales, prolapsus génital et l'incontinence urinaire). Le PRP est également une voute prometteuse en médecine de la reproduction et en gynécologie fonctionnelle (dysfonction sexuelle et atrophie vulvo-vaginale) (21).

PRP en orthopédie

En orthopédie le PRP associé ou pas à l'acide hyaluronique est également en évaluation pour améliorer et accélérer la cicatrisation des tendons, dans l'arthrose et pseudarthrose, les épicondylites et arthroplasties (22).

Problème de survie cellulaire de la greffe de tissu adipeux

Un des obstacles principaux de la greffe de tissu adipeux réside dans la résorption partielle du tissu transplanté, qui est due à la nécrose du tissu adipeux après son implantation. Cette nécrose est la conséquence du dommage causé au tissu durant son prélèvement, d'une part, et au manque de disponibilité des nutriments au centre des particules de tissu adipeux, d'autre part. Pour pouvoir garantir la survie des adipocytes, il est nécessaire de créer un microenvironnement optimal qui permet une distribution architecturale correcte des adipocytes, l'interaction entre cellules, leur croissance et leur différenciation, et qui offre une protection précoce des phénomènes inflammatoires environnants, ainsi qu'un réseau capillaire capable de délivrer des niveaux adéquats de nutriments. En effet, il existe 3 zones dans le greffon adipocytaire qui explique la nécrose et l'intérêt d'un adjuvant pour améliorer la survie adipocytaire (Figure 4).

Plusieurs stratégies ont été rapportées pour améliorer la survie des greffons graisseux, comme la thérapie adjuvante en ajoutant la fraction vasculaire stromale (FSV), en améliorant l'angiogenèse par l'ajout de facteurs de croissance ou en utilisant des facteurs chimiques stimulant les cellules, comme l'insuline ou l'érythropoïétine (23-28).

Parmi ces stratégies, le PRP est récemment apparu comme une nouvelle matrice pour améliorer la survie de la greffe de graisse.

Le plasma riche en plaquettes

Le plasma riche en plaquettes (PRP) est défini comme un produit biologique autologue dérivé du sang du patient, et dans lequel, après un processus de centrifugation, une fraction plasmatique est obtenue avec une concentration plaquettaire supérieure à celle du sang circulant (29) (Figure 5 et 6). Ce procédé technologie thérapeutique gagne en intérêt pour la médecine régénérative en raison de son potentiel à stimuler et accélérer la régénération cellulaire et tissulaire (30).

L'idéologie du traitement PRP est l'inversion du rapport plaquettes / globules rouges en diminuant les globules rouges à 5 % (qui sont moins utiles dans le processus de guérison) et surtout en concentrant les plaquettes contenant une concoction puissante de facteurs de croissance à 94 %. La concentration idéale reste à définir. La grande variabilité des dispositifs utilisés pour isoler le PRP (31) dans différentes études peut altérer les caractéristiques de la dégranulation des plaquettes qui pourraient affecter les résultats cliniques (32,33).

Les facteurs de croissance contenus dans les granules alpha des plaquettes agissent en se liant à des récepteurs spécifiques sur les membranes cellulaires des cellules cibles (34). Ces effets comprennent la chimiotaxie (attraction des cellules dans la plaie), induisant la migration et la prolifération des cellules, et stimulent les cellules à réguler à la hausse la production de protéines (35). Ces facteurs de croissances régulent non seulement la migration et la prolifération cellulaire, mais aussi le

remodelage de la matrice extracellulaire et favorisent l'angiogenèse, créant un environnement idéal qui favorise le processus de cicatrisation cutanée (36).

Avantages de l'association PRP et greffe de tissu adipeux

Dans une étude publiée, nous avons montré d'une part que le PRP joue un rôle bénéfique dans la survie adipocytaire dans le cadre de transfert graisseux autologue, due en partie aux facteurs proangiogéniques contenus dans le PRP, mais aussi à la faculté du PRP à favoriser la prolifération des cellules souches adipocytaires au sein de la greffe de graisse injectée. De plus, il semblerait que l'effet du PRP serait potentialisé par son activation par du chlorhydrate de calcium. Ainsi, le relargage des facteurs de croissance peut se faire de manière lente et progressive pour ainsi accompagner au mieux les cellules adipocytaires greffés durant cette période critique que constitue la première semaine (37).

Le PRP autologue peut ainsi être utilisé comme un système de délivrance pour les applications d'ingénierie tissulaire in vivo. En effet, de nombreuses substances actives sont contenues dans les granules α des plaquettes ; ces substances actives peuvent stimuler la revascularisation d'un gel enrichi en adipocytes et constituer une matrice tridimensionnelle permettant l'arrangement des adipocytes en une organisation spatiale adéquate. Ainsi le PRP stimule la prolifération des ASC et le tissu adipeux in vitro. Ces cellules souches sont généralement présentes dans le prélèvement du tissu adipeux et donc sont habituellement présentes dans les greffes de graisse.

Fraction Stroma Vasculaire (FSV)

La FSV est isolée par la digestion de la partie lipidique du lipoaspirat par une collagénase en séparant le contenu en deux phases distinctes : la fraction flottante des adipocytes matures et les composants cellulaires d'intérêt dans la fraction aqueuse inférieure (38-39). Cette séparation peut être améliorée par centrifugation ; néanmoins, une séparation comparable peut être obtenue par séparation de phase et filtration par gravité (40). Bien que la centrifugation soit plus efficace, elle permettra également de sédimenter toutes les cellules présentes, tandis que la filtration peut être conçue pour capturer uniquement les types de cellules importantes en fonction de leur taille, enrichissant ainsi le cocktail cellulaire spécifique. La centrifugation de la fraction aqueuse donne un culot rougeâtre qui contient des cellules FSV. Les érythrocytes, un contaminant majeur présent dans le culot de FSV, peuvent être lysés pour isoler une population plus pure de cellules souches et/ou de cellules SVF si elles sont destinées à une expansion in vitro (41). La FSV contient une variété de cellules : les cellules souches mésenchymateuses, les péricytes, des cellules vasculaires, des fibroblastes, des pré-adipocytes, les monocytes, les macrophages, globules rouges, des tissus fibreux et la matrice extracellulaire (ECM).

Pour des applications cliniques en médecine régénérative, un des avantages de l'utilisation de la FSV est son utilisation extemporanée sans passer par les étapes de culture cellulaire.

Le nombre de cellules souches contenues dans la FSV adipeux peut fluctuer considérablement comme les patients peuvent avoir une texture et une densité de tissu adipeux différentes (42).

Les cellules souches du tissu adipeux

Les Adipose Derived Stem cells (ADSC) ont d'abord été caractérisées en 2001 et ont depuis été largement étudiées et utilisées comme source majeure de cellules à potentiel régénératif, avec des caractéristiques similaires à celles des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (43-46). Les cellules souches sont des cellules capables de s'autorenouveler générant des cellules filles identiques pour maintenir le pool de cellules souches, et de se différencier en lignées cellulaires multiples (progéniteurs ayant un potentiel plus restreint).

Caractérisations des CSM du tissu adipeux (potentiel de différenciation, prolifération et actions paracines et immunomodulatrices)

Plusieurs études ont démontré la capacité des cellules souches du tissu adipeux à se différencier en lignées adipogéniques, ostéogéniques et chondrogéniques, voire en lignée myogénique, conduisant au muscle squelettique, au muscle lisse et aux cardiomyocytes (47). Il a également été démontré que les CSM possèdent le potentiel de se différencier en cellules des lignées ectodermiques et endodermiques, comme les cellules neuronales, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les hépatocytes, les cellules pancréatiques et les cellules hématopoïétiques (48-56). De plus, elles possèdent également un potentiel de migration (57) et une capacité à proliférer et qui peut être stimulées par divers facteurs de croissance. (58). Les principaux effets des CSM sont médiés par une activité paracrine. Les ASC produisent et sécrètent une grande variété de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines qui peuvent être impliqués dans la cicatrisation des plaies en sécrétant des facteurs de croissance angiogéniques et anti-apoptotiques (59). De plus, les CSM du tissu adipeux modulent les monocytes, macrophages, les lymphocytes T et B en induisant la réponse immunitaire de l'hôte (Figure 7).

Les CSM du tissu adipeux en thérapie cellulaire

Un des avantages de l'utilisation des CSM du tissu adipeux et pas des moindres est la facilité d'obtention de ces cellules et qui ne pose pas de problème éthique contrairement aux cellules souches embryonnaires. En effet, elles sont récupérées directement à partir de la graisse des « déchets chirurgicaux » après dermolipéctomie ou lipoaspiration 10 à 100 millions de cellules souches peuvent être obtenues à partir de 300 millilitres de lipoaspirat dont plus de 90 % seraient viables (60). Un grand nombre de cellules souches peut être obtenu en peu de passages.

Optimisation des protocoles de thérapie cellulaire utilisant les CSM du tissu adipeux

La médecine régénérative, qui vise à stimuler les mécanismes de réparation et de régénération tissulaire, offre la possibilité de proposer des stratégies de traitement efficaces en combinaison. Cependant, dans ce domaine, les approches d'ingénierie tissulaire proposées jusqu'à présent ont impliqué l'expansion in vitro de cellules autologues ou allogéniques (61). L'avenir de la chirurgie reconstructrice favorisera la thérapie cellulaire autologue si possible extemporanée pour la régénération de la peau. Malgré des résultats prometteurs obtenus sur des modèles animaux de lésions, l'utilisation des ASC a donné des résultats mitigés dans les essais cliniques pour la cicatrisation cutanée (62), en raison de la faible viabilité de ces dernières après greffe.

Dans étude publiée dans *International Stem Cells*, nous avons montré que l'association du PRP à la thérapie cellulaire par injection de CSM du tissu adipeux semble améliorer la cicatrisation cutanée dans le modèle murin. En effet, le traitement par injection de CSM et de l'association de CSM et PRP améliore la régénération cutanée de manière significative. Le délai de cicatrisation est également amélioré significativement par l'association de CSM et PRP par rapport au CSM seules, au PRP seul et au témoin. Nous avons pu expliquer ces résultats pré-cliniques par la mise en évidence d'une activation du sécrétome des CSM par le PRP, reflétée par une activation de l'expression transcriptionnelle du VEGF et de l'IL-6 d'origine humaine dans les biopsies greffées de souris et également par l'augmentation de la survie des CSM (63).

Loi bioéthique et aspects réglementaires

Produits dérivés du sang : une réglementation précise

Les préparations de Concentrés plaquettaire autologues (CPA) sont considérées comme des produits dérivés du sang humain. Elles sont par conséquent soumises à l'article L. 1221-8 du code de la santé publique. En revanche, le code de la santé publique prévoit une utilisation des concentrés plaquettaire autologues à des fins thérapeutiques dans le cadre d'une seule et même intervention médicale, sans être conservés ou préparés au sein d'un organisme ou d'un établissement tiers.

Dans un communiqué publié le 10 janvier 2018, l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) rappelle que l'usage à visée esthétique de concentrés plaquettaire autologues (CPA), également dénommés plasma riche en plaquettes (PRP), est interdit en France. C'est donc l'objectif de l'intervention (visée thérapeutique ou visée esthétique) qui détermine la réglementation applicable. Il est donc possible d'utiliser le PRP en chirurgie fonctionnelle ou reconstructrice (ex : cicatrice).

Thérapie cellulaire et loi bioéthique

L'utilisation des cellules souches est qualifiée par l'ANSM en produits cellulaires à finalité thérapeutique sont des cellules humaines utilisées à des fins thérapeutiques autologues,

Lorsque ces produits cellulaires à finalité thérapeutique sont des spécialités pharmaceutiques ou d'autres médicaments fabriqués industriellement (médicament de thérapie innovante MTI), ils sont alors régis par les règles applicables au médicament. Ils entrent par ailleurs dans le champ de la pharmacovigilance.

Les MTI sont les cellules ou tissus ont été soumis à une manipulation substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés et/ou les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur. D'après la réglementation 1394/2007, les manipulations non substantielles regroupent : le découpage, broyage, la centrifugation, stérilisation, l'irradiation, séparation, concentration, cryopréservation et la congélation.

Quatre catégories de MTI sont définies : les MTI de thérapie génique, les MTI de thérapie cellulaire somatique, les MTI issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante (associant un MTI avec un dispositif médical).

Quand ils ne sont pas fabriqués de manière industrielle, ils sont alors qualifiés de préparations de thérapie cellulaire, y compris lorsque les cellules humaines servent à transférer du matériel génétique. Elles sont ainsi soumises à la biovigilance.

Les produits cellulaires à finalité thérapeutique fabriqués industriellement sont soumis à l'exigence, préalablement à leur commercialisation, de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché. Ils doivent être fabriqués dans des établissements pharmaceutiques autorisés.

Les préparations de thérapie cellulaire, qui ne sont pas fabriquées industriellement, sont soumises à une autorisation préalable de l'ANSM qui recueille au préalable l'avis de l'Agence de biomédecine. Cette autorisation est délivrée après évaluation de leur procédé de préparation et de conservation et de leurs indications thérapeutiques.

L'ANSM délivre par ailleurs les autorisations aux établissements ou organismes exerçant les activités de préparation, conservation, la distribution et la cession, à des fins thérapeutiques autologues ou allogéniques, des préparations de thérapie cellulaire. L'autorisation est délivrée après avis de de l'agence de biomédecine (64).

Manipulations non substantielles d'après le règlement (CE) 1394/2007 :

- découpage ;
- broyage ;
- centrifugation ;
- stérilisation ;
- irradiation ;
- séparation, concentration ;
- cryopréservation, congélation.

Conclusion

La graisse émulsifiée semble ainsi être une alternative simple aux procédés de thérapie cellulaire et à la préparation de SVF. L'injection d'adipocytes fragmentés présents dans la graisse émulsifiée et les cytokines libérées pourraient donc avoir un effet stimulant sur la différenciation et la régénération tissulaire.

Dans le domaine de la médecine régénérative, les biothérapies cellulaires offrent des perspectives majeures dans de nombreuses pathologies où les ressources thérapeutiques sont aujourd'hui insuffisantes. Par ailleurs, l'essor de ces produits cellulaires repose aujourd'hui sur des progrès dans la connaissance fondamentale des processus physiopathologiques sous-tendant la maladie concernée mais également celle du mécanisme d'action précis des cellules administrées.

Références

- Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A* 2010;77:22-30.
- Simonacci F, Bertozzi N, Grieco MP, Grignaffini E, Raposio E. Procedure, applications, and outcomes of autologous fat grafting. *Ann Med Surg (Lond)*. 2017;20:49-60.
- Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg* 200;28:111-9.
- Hoareau L, Bencharif K, Girard AC, Gence L, Delarue P, Hulard O, Festy F, Roche R. Effect of centrifugation and washing on adipose graft viability: a new method to improve graft efficiency. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013;66:712-9.
- Coleman SR. Greffe structurelle de graisse : plus qu'une charge permanente. *Plast. Reconstr. Surg*. 2006;118:1085-120.
- Eto, H., Kato, H., Suga, H., Aoi, N., Doi, K., Kuno, S., and Yoshimura, K. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast Reconstr Surg* 2012;129:1081.
- Alexander D, Bucky LP. Breast augmentation using preexpansion and autologous fat transplantation—a clinical radiological study. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127:2451-2452.
- Spear SL, Pittman T. A prospective study on lipoaugmentation of the breast. *Aesthet Surg J*. 2014;34:400-8.
- Wei H, Gu SX, Liang YD, Liang ZJ, Chen H, Zhu MG, Xu FT, He N, Wei XJ, Li HM. Nanofat-derived stem cells with platelet-rich fibrin improve facial contour remodeling and skin rejuvenation after autologous structural fat transplantation. *Oncotarget*. 2017;8:68542-68556.
- Cohen SR, Hewett S, Ross L, Delaunay F, Goodacre A, Ramos C, Leong T, Saad A. Regenerative Cells For Facial Surgery: Biofilling and Biocontouring. *Aesthet Surg J*. 2017;37(suppl_3):S16-S32.
- Dasiou-Plakida D. Grosses injections pour le rajeunissement du visage: 17 ans d'expérience chez 1720 patients. *J. Cosmet. Dermatol*. 2003; 2 : 119-125.
- Mazzola RF. *Quality Edition Médicale*; St. Louis, MO: 2009. Injection de graisse: du remplissage à la régénération; pp. 373-422.
- 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.
- Chou TM, Chang HP, Wang JC. Autologous platelet concentrates in maxillofacial regenerative therapy. *Kaohsiung J Med Sci*. 2020 Feb 12.
- Picard F, Hersant B, Bosc R, Meningaud JP. The growing evidence for the use of platelet-rich plasma on diabetic chronic wounds: A review and a proposal for a new standard care. *Wound Repair Regen*. 2015;23:638-43
- Picard F, Hersant B, Bosc R, Meningaud JP. Should we use platelet-rich plasma as an adjunct therapy to treat "acute wounds," "burns," and "laser therapies": A review and a proposal of a quality criteria checklist for further studies. *Wound Repair Regen*. 2015;23:163-70.
- Hersant B., SidAhmed-Mezi M., Bosc R., Meningaud J.P. Autologous Platelet-Rich Plasma/Thrombin Gel Combined with Split-Thickness Skin Graft to Manage Postinfectious Skin Defects: A Randomized Controlled Study. *Adv. Skin Wound Care*. 2017;30:502-508.
- Hersant B, SidAhmed-Mezi M, Picard F, Hermeziu O, Rodriguez AM, Ezzedine K, Meningaud JP. Efficacy of Autologous Platelet Concentrates as Adjuvant Therapy to Surgical Excision in the Treatment of Keloid Scars Refractory to Conventional Treatments: A Pilot Prospective Study. *Ann Plast Surg*. 2018;81:170-175
- Davis NF, Cunnane EM, Quinlan MR, Mulvihill JJ, Lawrentschuk N, Bolton DM, Walsh MT. Biomaterials and Regenerative Medicine in Urology. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1107:189-198.
- Dawood AS, Salem HA. Current clinical applications of platelet-rich plasma in various gynecological disorders: An appraisal of theory and practice. *Clin Exp Reprod Med*. 2018;45:67-74.
- Jones IA, Togashi RC, Thomas Vangness C Jr. The Economics and Regulation of PRP in the Evolving Field of Orthopedic Biologics. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2018;11:558-565.
- Yoshimura K., Sato K., Aoi N., Kurita M., Hirohi T., and Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 2008;32:56-57.
- Yoshimura K., Sato K., Aoi N., Kurita M., Inoue K., Suga H., Eto H., Kato H., Hirohi T., and Harii K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adiposederived stem cells. *Dermatol Surg* 2008;34:1178.
- Chung C.W., Marra K.G., Li H., Leung A.S., Ward D.H., Tan H., Kelmendi-Doko A., and Rubin J.P. VEGF microsphere technology to enhance vascularization in fat grafting. *Ann Plast Surg* 69,213, 2012. 168
- Lu F., Li J., Gao J., Ogawa R., Ou C., Yang B., and Fu B. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2009;124:1437.
- Yuksel E., Weinfeld A.B., Cleek R., Wamsley S., Jensen J., Boutros S., Waugh J.M., Shenaq S.M., and Spira M. 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;105:1712.
- Hamed S., Egozi D., Kruchevsky D., Teot L., Gilhar A., and Ullmann Y. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. *PLoS One* 2010;5:13986.
- Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10:225-228.
- Anitua E., Alkhraisat M.H., Orive G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J. Control. Release*. 2012;157:29-38.
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) *Trends Biotechnol*. 2009;27:158-167.
- Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14:357-162.
- Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002;22:547-557.
- Roubelakis M.G., Trohatou O., Roubelakis A., Mili E., Kalaitzopoulos I., Papazoglou G., Pappa K.I., Anagnostou N.P. Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Rev*. 2014;10:417-428.
- Cross K.J., Mustoe T.A. Growth factors in wound healing. *Surg. Clin. N. Am*. 2003;83:531-545.

35. Demidova-Rice T.N., Hamblin M.R., Herman I.M. Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: Role of growth factors in normal and pathological wound healing: Therapeutic potential and methods of delivery. *Adv. Skin Wound Care.* 2012;25:349-370
36. Hersant B, Bouhassira J, SidAhmed-Mezi M, Vidal L, Keophiphath M, Chheangsun B, Niddam J, Bosc R, Nezet AL, Meningaud JP, Rodriguez AM. Should platelet-rich plasma be activated in fat grafts? An animal study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2018;71 :681-690.
37. 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.
38. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-28.
39. SundarRaj S, Deshmukh A, Priya N, et al. Development of a system and method for automated isolation of stromal vascular fraction from adipose tissue lipoaspirate. *Stem Cells Int.* 2015;2015:1-11.
40. Riis S, Zachar V, Boucher S, et al. Critical steps in the isolation and expansion of adipose-derived stem cells for translational therapy. *Expert Rev Mol Med.* 2015;17:11.
41. Martin AD, Daniel MZ, Drinkwater DT, Clarys JP. Adipose tissue density, estimated adipose lipid fraction and whole body adiposity in male cadavers. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1994;18(2):79-83.
42. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. 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.
43. Gimble JM, Bunnell BA, Frazier T, Rowan B, Shah F, Thomas-Porch C, Wu X. Adipose-derived stromal/stem cells: a primer. *Organogenesis.* 2013;9:3-10.
44. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, Fadavi D, Toronto JD, Wirth GA, Paydar KZ, Evans GR, Widgerow AD. Stromal vascular fraction: a regenerative reality? Part 1: current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2016;69:170-9. 155
45. Bunnell BA, Flaot M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008;45:115-20.
46. Fraser J.K., Schreiber R., Strem B. Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc Med.* 2006;3:533-537.
47. Fujimura J., Ogawa R., Mizuno H., Fukunaga Y., Suzuki H. Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;333:116-121.
48. Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004;109:656-663.
49. Brzoska M., Geiger H., Gauer S., Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;330:142-150.
50. Banas A., Teratani T., Yamamoto Y. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology.* 2007;46:219-228.
51. Timper K., Seboek D., Eberhardt M. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;341:1135-1140.
52. Corre J., Barreau C., Cousin B. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J. Cell Physiol.* 2006;208:282-288.
53. Scanarotti C., Bassi A.M., Catalano M. Neurogenic-committed human pre-adipocytes express CYP1A isoforms. *Chem. Biol. Interact.* 2010;184:474-483.
54. Coradeghini R., Guida C., Scanarotti C. A comparative study of proliferation and hepatic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2010;191:466-477.
55. Aluigi M.G., Coradeghini R., Guida C. Pre-adipocytes commitment to neurogenesis 1: preliminary localisation of cholinergic molecules. *Cell Biol. Int.* 2009;33:594-601.
56. Izadpanah R., Kaushal D., Kriedt C. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 2008;68:4229-4238.
57. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *Stem cells.* 2012;30:804-810.
58. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;109:1292-8.
59. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg.* 2009; 79: 235-244.
60. Böttcher-Haberzeth S, Biedermann T, Reichmann E. Tissue engineering of skin. *Burns.* 2010;36:450-60.
61. Sorrell JM, Caplan AL. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1:30.
62. Hersant B, Sid-Ahmed M, Braud L, Jourdan M, Baba-Amer Y, Meningaud JP, Rodriguez AM. Platelet-Rich Plasma Improves the Wound Healing Potential of Mesenchymal Stem Cells through Paracrine and Metabolism Alterations. *Stem Cells Int.* 2019;2019:1234263.
63. Boucher, H., & Cras, A. (2018). Médicaments de thérapie innovante : réglementation et applications cliniques. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2018(507), 44-51.



Figure 1 : Prélèvement d'un microlipofilling en circuit fermé pour éviter l'oxydation et la contamination de la graisse et à l'aide de canules avec des micro-orifices de prélèvement.



Figure 2 : Restauration de volume mammaire après mastectomie partielle par lipofilling.



Figure 3 : Lipofilling à visée trophique pour traiter une séquelle de brûlure profonde.

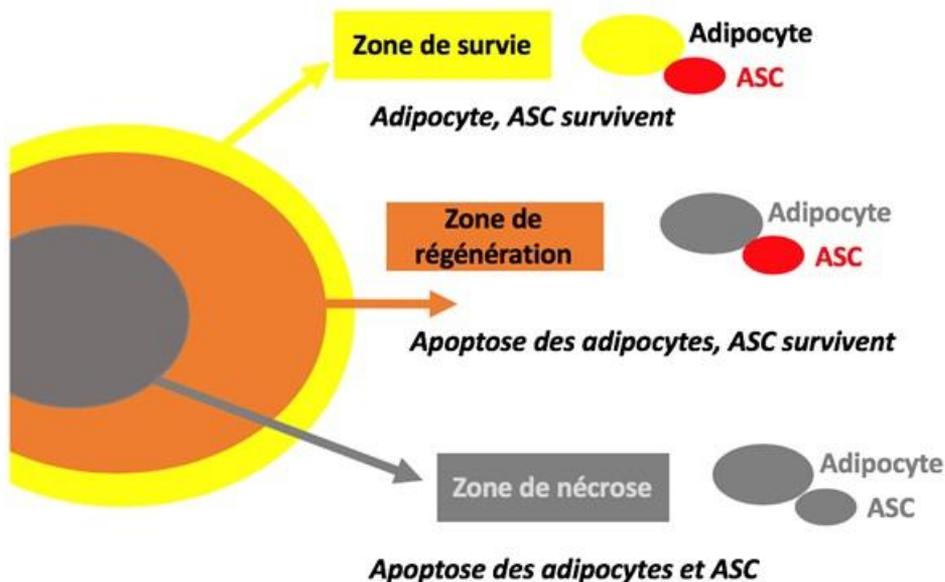


Figure 4 : Trois zones du greffon adipocytaire. ASC : adipocyte Stem Cell. Le PRP agirait sur la phase régénérative (en orange).

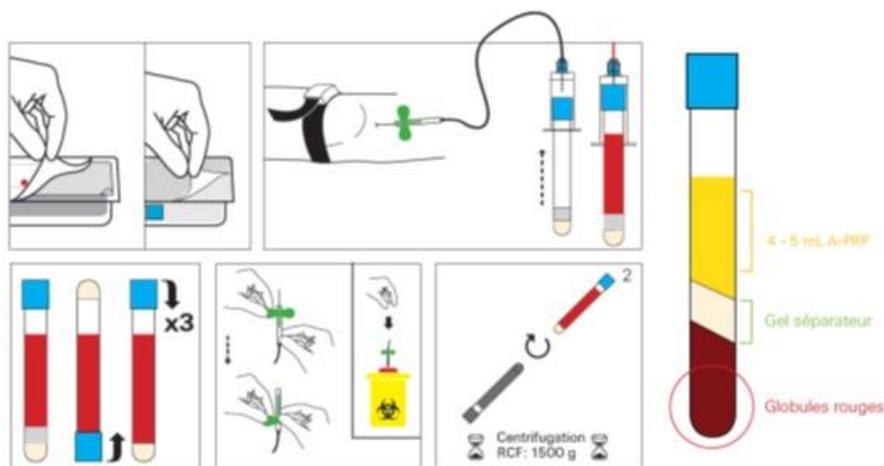


Figure 5 : Préparation autologue de plasma riche en plaquettes (A-PRP) à l'aide du dispositif RegenBCT®. Suite à la centrifugation, le sang est fractionné et des éléments cellulaires sédimentent à la surface du gel dans les tubes RegenBCT® (Blood Cell Therapy).

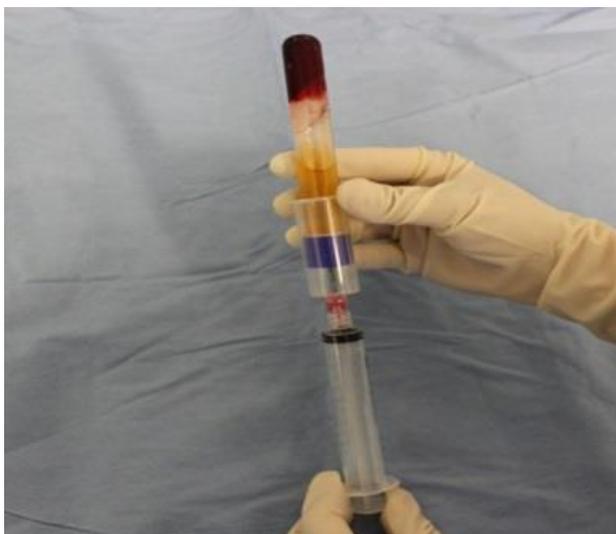


Figure 6 : Plasma riche en plaquettes après centrifugation.

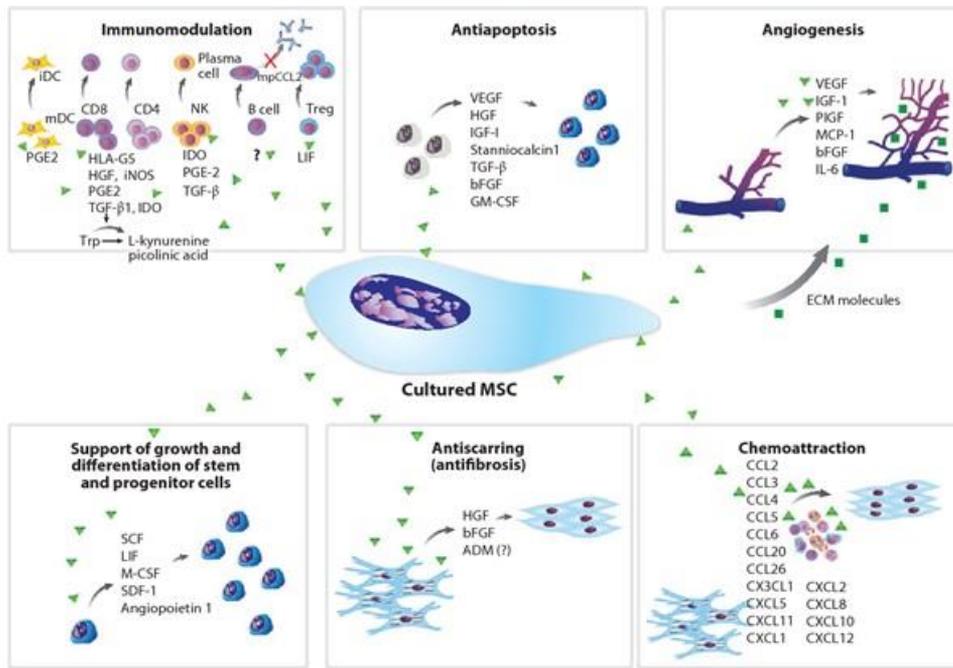


Figure 7 : Le rôle paracrin des CSM.